

## Grupo de Genómica y Biotecnología Molecular de Hongos

Francisco E. Nicolás, Eusebio Navarro y Victoriano Garre



Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia

Componentes del grupo de investigación en noviembre de 2018. De izquierda a derecha: Junhuan Yang (doctoranda visitante), Ghizlane Tahiri (máster), José Tomás Cánovas Márquez (doctorando), Carlos Lax Molina (doctorando), Sergio López García (post-doc), Maribel Navarro Mendoza (doctoranda), Victoriano Garre (IP), Laura Murcia Flores (Profesora Asociada), Francisco E. Nicolás Molina (Ramón y Cajal), Carlos Pérez Arques (doctorando), Pablo Martínez García (doctorando), José Antonio Pérez Ruiz (doctorando), Eusebio Navarro Ros (Profesor Contratado Doctor) y Macario Osorio Concepción (Post-doc CONACYT)



Nuestro grupo, Genómica y Biotecnología Molecular de Hongos (<https://www.um.es/mucorgen/>, <https://www.facebook.com/mucorgen/>, @mucorgen), está dirigido por Francisco E. Nicolás, Eusebio Navarro y Victoriano Garre, contando en la actualidad con un total de 13 miembros, en los que se incluyen 6 estudiantes de doctorado, 2 estudiantes de máster y 2 contratados post-doctorales. Nuestras investigaciones tienen como objetivo la caracterización de los mecanismos de regulación de la expresión génica y su evolución en hongos poco evolucionados (hongos basales), que han sido, en términos generales, poco estudiados debido a las dificultades para manipular su genoma. Para ello, de la mano de los fundadores del grupo, los profesores Rosa M. Ruiz Vázquez y Santiago Torres Martínez, se seleccionó a *Mucor circinelloides* (en adelante *Mucor*) como modelo de estudio, basándose en los trabajos pioneros de la profesora M. Isabel González Roncero que establecieron un procedimiento de transformación genética en este hongo. Esta tecnología, y su perfeccionamiento posterior por nuestro grupo (Gutiérrez et al. 2011; Nicolás et al. 2018), está permitiendo tratar de responder preguntas clave de la biología de los hongos basales, lo que recuerda una de las frases del gran científico Sidney Brenner: "Progress in science depends on new techniques, new discoveries and new ideas, probably in that order".

Aunque nuestro interés en *Mucor* es muy amplio, es evidente que solo podemos afrontar el estudio de unos pocos aspectos concretos, entre los que destacan: la regulación de la expresión génica por RNAs no codificantes de pequeño tamaño (sRNAs) y por metilación de las adeninas del DNA; los centrómeros de *Mucor* y el papel del mecanismo de silenciamiento génico (RNAi) en su estructura y evolución; y los mecanismos moleculares que le permiten a los hongos Mucorales, grupo al que pertenece *Mucor*, causar la infección fatal conocida como Mucormicosis. Una de las aportaciones recientes más importantes de las investigaciones del grupo ha sido la disección genética de los mecanismos de silenciamiento génico, que ha llevado al descubrimiento de que, además de proteger el genoma de material genético exógeno, regulan la expresión de varios procesos fundamentales del hongo, como la esporulación asexual o el cruzamiento sexual. El grado de sofisticación alcanzado por la regulación dependiente de RNAi en *Mucor*, a través de la generación de varios mecanismos de silenciamiento génico con funciones especializadas en la fisiología y el desarrollo (Torres-Martínez and Ruiz-Vázquez 2017), supera lo observado en otros hongos considerados más evolucionados (superiores) pertenecientes a los phyla Ascomycota y Basidiomycota, sugiriendo que los mecanismos de silenciamiento génico han evolucionado de forma distinta en hongos basales y superiores.

El descubrimiento de que uno de los mecanismos de silenciamiento génico (Calo et al. 2014) está implicado en la generación de epimutantes resistentes a antifúngicos ha llevado al grupo a interesarse por los procesos moleculares implicados en la mucormicosis. Esta es una infección poco frecuente, pero cuya incidencia está aumentando en los últimos años, presentando una mortalidad del 50-90 % en el caso de infecciones diseminadas. La alta mortalidad se explica en parte por la elevada resistencia de los hongos Mucorales a la mayoría de los antifúngicos utilizados en clínica. Nuestro grupo está siguiendo distintas aproximaciones experimentales para la identificación de los mecanismos moleculares que permiten a un hongo saprófito, como *Mucor*, cambiar su fisiología y producir una infección superando las barreras tanto pasivas como activas presentes en el hospedador. Así, se ha desarrollado una estrategia de genómica funcional basada en el mecanismo de RNAi que ha permitido identificar dos genes implicados en la infección (Trieu et al. 2017), se ha establecido un modelo de infección de pez cebra (López-Muñoz et al. 2018), se han identificado genes implicados en la captación de hierro (Navarro-Mendoza et al. 2018), un proceso esencial en el proceso de infección, y se ha caracterizado la respuesta transcriptómica del hongo a la fagocitosis por macrófagos, con la identificación de genes, incluyendo factores transcripcionales, que son necesarios para sobrevivir a la fagoci-

tos y producir la infección (Pérez-Arques et al. 2019). Sorprendentemente, un porcentaje importante de los genes implicados en el proceso de infección están regulados por uno de los mecanismos de silenciamiento génico presentes en *Mucor*, denominado no canónico. Este mecanismo presenta características muy distintas a los mecanismos más extendido en la naturaleza, entre las que destacan la ausencia de la participación de proteínas Dicer y Argonata (Calo et al. 2017; Trieu et al. 2015). Las particularidades de este mecanismo han hecho que nuestro grupo dedique un gran esfuerzo a su caracterización, en concreto la proteína R3B2, una proteína con similitud a las RNasas III de bacterias y que cumple funciones equivalentes a las proteínas Dicer en los mecanismos canónicos. El hecho de que esta proteína esté presente solo en Mucorales la convierte en una posible diana para el control de la mucormicosis.

El mecanismo de silenciamiento génico de *Mucor* también está implicado en el control de la expresión de los retrotransposones localizados en los centrómeros del hongo. En esta línea de investigación se han identificado y caracterizado los centrómeros de *Mucor*, siendo esta la primera descripción de estos elementos claves en el funcionamiento de los cromosomas en hongos basales. Estos centrómeros presentan una estructura no encontrada previamente, que incluye una secuencia específica que podría ser reconocida por una proteína desconocida, determinando de esta forma que estas regiones se comporten como centrómeros.

Por último, nuestro grupo está tratando de desentrañar la función de la metilación de adeninas en el DNA en la regulación de la expresión génica. Esta modificación epigenética está presente desde bacterias hasta humanos, siendo su abundancia muy baja en

eucariotas, excepto en hongos basales, donde se ha encontrado una correlación positiva entre metilación de la región promotora y expresión génica. Nuestro grupo lidera un proyecto del Joint Genome Institute (JGI) del Departamento de Energía de Estados Unidos para determinar la función de esta modificación en la regulación de la expresión génica en este grupo de hongos (<https://jgi.doe.gov/our-projects/csp-plans/approved-proposals-fy18/>). Aparte de su interés básico, esta modificación podría ser diana para el desarrollo de fármacos que controlasen de forma eficaz a los hongos Mucorales y, por tanto, pudieran ser utilizados de forma selectiva y específica para combatir la mucormicosis.

La importancia a nivel mundial del grupo en aspectos relacionados con *Mucor* ha propiciado que mantenga un número importante de colaboraciones con grupos nacionales e internacionales. Entre estos destacan los grupos de Joseph Heitman (Duke University, EE. UU.), Sebastian Falk (University of Vienna, Austria), Víctor Meza Carmen (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México), Yuanda Song (Shandong University of Technology, China), Kaustuv Sanyal (Jawaharlal Nehru Centre for Advanced Scientific Research, Bangalore, India), Xavier Capilla y Josep Guarro (Universitat Rovira i Virgili), Ulrike Binder and Michaela Lackner (University of Innsbruck, Austria), Kerstin Voigt (Leibniz Institute for Natural Product and Infection Biology, Jena, Alemania), Tamás Papp (University of Szeged, Hungría) y Luis Corrochano (Universidad de Sevilla).

### PUBLICACIONES RECIENTES MÁS RELEVANTES

**Calo S, Shertz-Wall C, Lee SC, Bastidas RJ, Nicolás FE, Graneck JA, Mieczkowski P, Torres-Martínez**

**S, Ruiz-Vázquez RM, Cardenas ME, Heitman J.** (2014). Antifungal drug resistance evoked via RNAi-dependent epimutations. *Nature* 513: 555–8.

**Calo S, Nicolás FE, Lee SC, Vila A, Cervantes M, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM, Cardenas ME, Heitman J.** (2017). A non-canonical RNA degradation pathway suppresses RNAi-dependent epimutations in the human fungal pathogen *Mucor circinelloides*. *PLOS Genet* 13: e1006686.

**Gutiérrez A, López-García S, Garre V.** (2011). High reliability transformation of the basal fungus *Mucor circinelloides* by electroporation. *J Microbiol. Methods* 84: 442–6.

**López-Muñoz A, Nicolás FE, García-Moreno D, Pérez-Oliva AB, Navarro-Mendoza MI, Hernández-Oñate MA, Herrera-Estrella A, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM, Garre V, Mulero V.** (2018). An adult zebrafish model reveals that mucormycosis induces apoptosis of infected macrophages. *Sci Rep* 8: 12802.

**Navarro-Mendoza MI, Pérez-Arques C, Murcia L, Martínez-García P, Lax C, Sanchis M, Capilla J, Nicolás FE, Garre V.** (2018). Components of a new gene family of ferroxidases involved in virulence are functionally specialized in fungal dimorphism. *Sci Rep* 8: 7660.

**Nicolás FE, Navarro-Mendoza MI, Pérez-Arques C, López-García S, Navarro E, Torres-Martínez S, Garre V.** (2018). Molecular tools for carotenogenesis analysis in the mucoral *Mucor circinelloides*. In *Methods in Molecular Biology*, (Humana Press, New York, NY), pp. 221–237.

**Pérez-Arques C, Navarro-Mendoza MI, Murcia L, Lax C, Martínez-García P, Heitman J, Nicolás FE, Garre V.** (2019). *Mucor circinelloides* thrives inside the phagosome through an Atf-mediated germination pathway. *MBio* 10: 1–15.

**Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM.** (2017). The RNAi universe in fungi: a varied landscape of small RNAs and biological functions. *Annu Rev Microbiol* 71: 371–91.

**Trieu TA, Calo S, Nicolás FE, Vila A, Moxon S, Dalmay T, Torres-Martínez S, Garre V, Ruiz-Vázquez RM.** (2015). A non-canonical RNA silencing pathway promotes mRNA degradation in basal fungi. *PLoS Genet* 11: 1005168.

**Trieu TA, Navarro-Mendoza MI, Pérez-Arques C, Sanchis M, Capilla J, Navarro-Rodríguez P, Lopez-Fernandez L, Torres-Martínez S, Garre V, Ruiz-Vázquez RM, Nicolás FE.** (2017). RNAi-based functional genomics identifies new virulence determinants in mucormycosis. *PLoS Pathog* 13: e1006150.