

REFERENCIAS

- Rico S, Yepes A, Rodríguez H, Santamaría J, Antoraz S, Krause E, Díaz M, Santamaría RI. (2014 a). Regulation of the AbrA1/A2 two-component system in *Streptomyces coelicolor* and the potential of its deletion strain as a heterologous host for antibiotic production. PLoS One 9: e109844.
- Rico S, Santamaría RI, Yepes A, Rodríguez H, Laing E, Bucca G, Smith CP, Díaz M. (2014b). Deciphering the regulon of the *Streptomyces coelicolor* AbrC3, a positive response regulator of antibiotic production. Appl. Environ. Microbiology 80:2417-2428.
- Rodríguez H, Rico S, Díaz M, Santamaría RI. (2013). Two-component systems in *Streptomyces*: key regulators of antibiotic complex pathways. Microbial Cell Factories 12:127.
- Sevillano L, Díaz M, Santamaría RI. (2013). Stable expression plasmids for *Streptomyces* based on a toxin-antitoxin system. Microbial Cell Factories 12:39
- Díaz M, Sevillano L, Rico S, Lombo F, Braña AF, Salas JA, Méndez C, Santamaría RI. (2013). High level of antibiotic production in a double polyphosphate kinase and phosphate-binding protein mutant of *Streptomyces lividans*. FEMS letters 342:123-129.
- Sevillano L, Díaz M, Santamaría RI. (2012). Identification of the first functional toxin-antitoxin system in *Streptomyces*. PLoS ONE 7: e32977.
- Yepes A, Rico S, Rodríguez A, Santamaría RI, Díaz M. (2011). Novel two-components systems involved in antibiotic regulation in *Streptomyces coelicolor*. PLoS ONE 6: e19980.
- Pérez J, Muñoz-Dorado J, Braña AF, Shimkets LJ, Sevillano L, Santamaría RI. (2011). *Myxococcus xanthus* induces actinorhodin overproduction and aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. Microbial Biotechnology 4:175-183.
- Esteban A, Díaz M, Yepes A, Santamaría RI. (2008). Expression of the *pstS* gene of *Streptomyces lividans* is regulated by the carbon source and is partially independent of the PhoP regulator. BMC Microbiology 8:201 doi:10.1186/1471-2180-8-201.
- Díaz M, Ferreras E, Moreno R, Yepes A, Berenguer J, Santamaría RI, (2008). High-level overproduction of *Thermus* enzymes in *Streptomyces lividans*. Applied Microbiology and Biotechnology 79:1001-1008.

Pequeños RNAs reguladores de cianobacterias

Adaptación a estrés nutricional y diferenciación celular

Alicia M. Muro Pastor

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (CSIC-Universidad de Sevilla)

alicia@ibvf.csic.es



Miembros actuales del grupo. De izquierda a derecha: Isidro Álvarez Escribano, Alberto Vázquez Naharro, Alicia M. Muro Pastor, Agustín Vioque Peña y Manuel Brenes Álvarez.

Las cianobacterias son un grupo de microorganismos utilizado clásicamente como modelo para estudiar distintos aspectos del proceso fotosintético. Más recientemente son objeto de interés biotecnológico como factorías para la producción de distintos compuestos, incluyendo biocombustibles. Las cianobacterias fotosintéticas son microorganismos muy versátiles, con requerimientos nutricionales muy reducidos y una enorme capacidad de adaptación a entornos cambiantes. Basta mencionar que en la naturaleza la disponibilidad de su «nutriente» fundamental, la luz solar, está sometida a alternancia diaria de periodos de luz-oscuridad así como a cambios de intensidad que dependen de la hora del día o la época del año.

La adaptación de las cianobacterias a las situaciones de deficiencia de nitrógeno está orquestada globalmente por NtcA, un regulador transcripcional de la familia FNR/CRP. En ausencia de amonio esta respuesta implica en primera instancia una modificación metabólica encaminada al uso de fuentes de nitrógeno alternativas, incluyendo la reutilización de los aminoácidos de las proteínas que forman parte de los complejos antena fotosintéticos. Pero además, algunas cianobacterias filamentosas exhiben un proceso de transformación morfológica y funcional de algunas células vegetativas en heterocistos (literalmente, células diferentes), especializados en la fijación de nitrógeno atmosférico (nitrógeno molecular, N_2).

Los heterocistos se diferencian a intervalos semi-regulares a lo largo de los filamentos y contienen un ambiente microaerobio apropiado para el funcionamiento de la enzima nitrogenasa, que cataliza la fijación del nitrógeno atmosférico. Una vez se ha establecido la fijación de nitrógeno atmosférico, los filamentos se comportan como organismos pluricelulares en los que se establece una división de tareas entre las células vegetativas, en las que se lleva a cabo la fijación fotosintética de carbono, y los heterocistos, en los que se fija el nitrógeno. Células vegetativas y heterocistos son interdependientes, de manera que el

crecimiento de los filamentos depende de las relaciones de transporte que se establecen entre ambos tipos celulares (Figura 1) (Maldener y Muro-Pastor, 2010; Muro-Pastor y Hess, 2012). Se desconoce en gran medida cómo se produce la selección de determinadas células del filamento para su transformación en heterocistos.

Nuestro trabajo se centra en el estudio de los procesos de adaptación al estrés de carencia de nitrógeno (incluyendo la diferenciación de heterocistos), desde la perspectiva de la participación de pequeños RNAs reguladores (small RNAs, sRNAs). Este tipo de moléculas, que ejerce efectos regulatorios a nivel post-transcripcional, está implicado en prácticamente cualquier respuesta adaptativa estudiada en bacterias. En concreto, nos interesa identificar sRNAs que formen parte del regulón NtcA de respuesta a déficit de nitrógeno, así como sRNAs específicamente implicados en la diferenciación de heterocistos.

Con este objetivo hemos llevado a cabo un análisis global del transcriptoma de respuesta a la carencia de nitrógeno en la cianobacteria modelo *Anabaena* (*Nostoc*) sp. PCC7120. Utilizando una metodología de RNASeq de extremos 5' primarios hemos podido definir todos los transcritos que se producen en *Anabaena* tanto en condiciones control como en las primeras horas de adaptación a la carencia de nitrógeno. Además, comparando los resultados obtenidos en la estirpe silvestre con los obtenidos en una estirpe mutante *hetR*, que no diferencia heterocistos, hemos podido definir dos categorías de transcritos cuya expresión responde a la disponibilidad de nitrógeno. Por un lado, aquellos transcritos cuya transcripción se induce en la estirpe silvestre pero no en la estirpe mutante *hetR* estarían en principio vinculados con el proceso de diferenciación. Por otro, aquellos transcritos regulados cuya expresión (inducción o represión) tiene lugar de forma similar tanto en la estirpe silvestre como en la estirpe mutante *hetR* formarían parte de una respuesta general a la carencia de nitrógeno (regulón NtcA), no específicamente vinculada con la diferenciación de heterocistos (Mitschke et al, 2011).

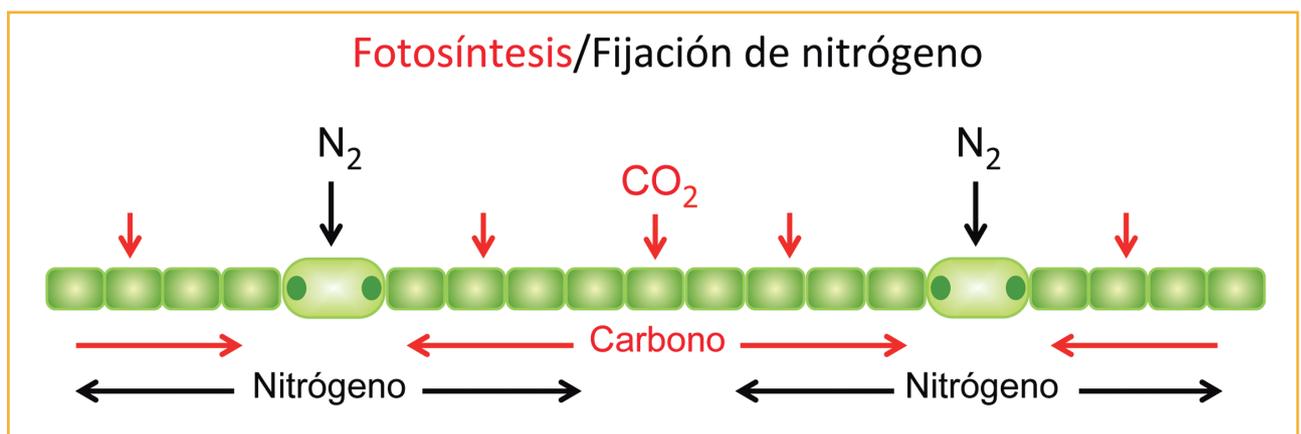


Figura 1. Relaciones funcionales entre heterocistos y células vegetativas. Los heterocistos proporcionan nitrógeno fijado al resto de las células del filamento cianobacteriano, en las que tiene lugar la fijación fotosintética de CO_2 . Ambos tipos celulares son interdependientes.

A partir del conjunto de datos de RNASeq hemos identificado una serie de pequeños RNAs cuya regulación en función de la disponibilidad de nitrógeno sugiere que pudieran estar implicados tanto en la respuesta general de adaptación a la carencia de nitrógeno como específicamente en la diferenciación de heterocistos. Hemos identificado, por ejemplo, sRNAs cuya expresión tiene lugar desde promotores que contienen secuencias para la unión del regulador transcripcional NtcA. Estos sRNAs formarían parte del regulón NtcA proporcionando una vía de regulación indirecta por parte de este regulador transcripcional.

Por otro lado, la diferenciación de heterocistos tiene lugar como consecuencia del establecimiento de un patrón transcripcional exclusivo de algunas células del filamento, de manera que la expresión de muchos de los genes cuyos productos se requieren para la transformación morfológica y metabólica de algunas células vegetativas en heterocistos tiene lugar sólo en estas células. Se desconoce en gran medida cuales son los determinantes moleculares que conducen a la expresión de los promotores específicos de heterocisto. En este contexto, hemos identificado algunos sRNAs, como NsiR1 (Ionescu et al, 2010), que se expresan exclusivamente en células diferenciadas (Figura 2). El promotor del gen *nsiR1* contiene un motivo de secuencia que hemos demostrado aparece asociado a la expresión diferencial en heterocistos (Mitschke et al, 2011). La expresión de NsiR1 puede considerarse un marcador temprano de diferenciación, dado que permite identificar células que han iniciado el proceso mucho antes de que puedan detectarse otros signos morfológicos característicos, como el aumento de tamaño o la desaparición de pigmentos fotosintéticos (Muro-Pastor, 2014).

En todos los casos hemos seleccionado especies de sRNA cuya conservación filogenética en numerosos genomas cianobacterianos sugiere que se trata de sRNAs funcionales. Actualmente estamos analizando las posibles funciones de estos RNAs utilizando una combinación de estrategias que incluye el análisis global del transcriptoma de estirpes con niveles alterados de los mismos y la predicción computacional de dianas utilizando un algoritmo que implementa criterios de conservación filogenética de las posibles interacciones entre los sRNAs y sus dianas.

Nuestro trabajo se lleva a cabo en colaboración con el laboratorio dirigido por Wolfgang R. Hess (Genetics and Experimental Bioinformatics, University Freiburg) y está financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2010-14821), el Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2013-48282-C2-1-P) y la Junta de Andalucía (BIO-215).

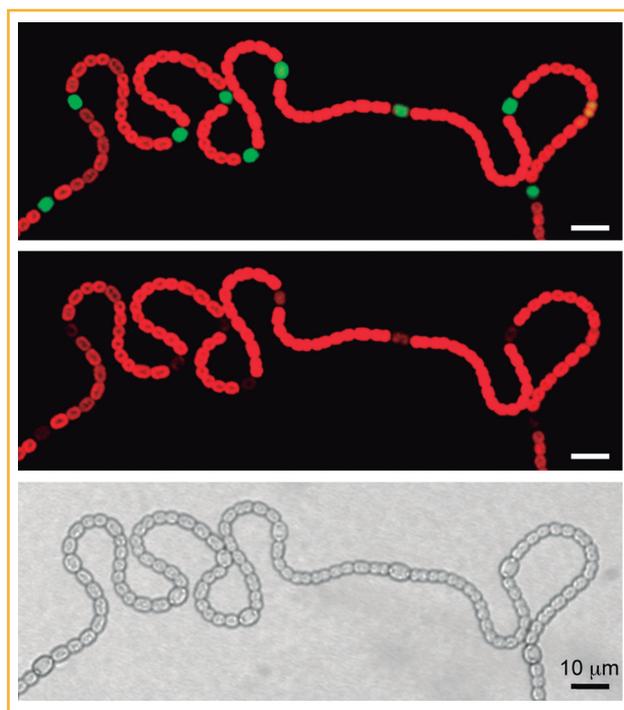


Figura 2. La diferenciación de heterocistos implica patrones transcripcionales exclusivos de este tipo celular. La imagen de microscopía confocal de fluorescencia (arriba) muestra la expresión, específica en heterocistos, de la proteína testigo GFP desde el promotor del gen *nsiR1*. NsiR1 es un pequeño RNA que puede considerarse un marcador muy temprano de diferenciación. La imagen de fluorescencia roja (centro) y la imagen de luz blanca (abajo) ilustran otros aspectos como la disminución en el contenido de pigmentos fotosintéticos o el aumento de tamaño característicos de los heterocistos maduros.

PUBLICACIONES RECIENTES

- Maldener I, Muro-Pastor AM.** (2010). Cyanobacterial heterocysts. En Encyclopedia of Life Sciences (ELS) (John Wiley & Sons, Ltd).
- Ionescu D, Voss B, Oren A, Hess WR, Muro-Pastor AM.** (2010). Heterocyst-specific transcription of NsiR1, a non-coding RNA encoded in a tandem array of direct repeats in cyanobacteria. *J Mol Biol* 398:177-188.
- Mitschke J, Vioque A, Haas F, Hess WR, Muro-Pastor AM.** (2011). Dynamics of transcriptional start site selection during nitrogen stress-induced cell differentiation in *Anabaena* sp. PCC7120. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:20130-20135.
- Muro-Pastor AM, Hess WR.** (2012). Heterocyst differentiation: from single mutants to global approaches. *Trends Microbiol* 20:548-557.
- Muro-Pastor AM.** (2014). The heterocyst-specific NsiR1 small RNA is an early marker of cell differentiation in cyanobacterial filaments. *mBio* 5:e01079-01014.