

Mecanismos de regulación genética y epigenética en hongos Mucorales

FRANCISCO ESTEBAN NICOLÁS MOLINA, VICTORIANO GARRE MULA

Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, 30100 Murcia

✉ vgarre@um.es



Figura 1. Miembros actuales del grupo de investigación. De izquierda a derecha, Ghizlane Tahiri Zainane, Eusebio Navarro Ros, Joaquín Martínez Espinosa, Pablo Carrillo Marín, Rubén Martínez Segura, Gabriel Navarro del Saz, Victoriano Garre Mula, Francisco Esteban Nicolás Molina, Carlos Lax Molina, Natalia Nicolás Muñoz, Elena Alejos Santos, Carmen Gil de Pareja Zapata.

El grupo de Genómica y Biotecnología Molecular de Hongos de la Universidad de Murcia (**Figura 1**) se creó hace más de 30 años por los profesores Santiago Torres Martínez y Rosa María Ruiz Vázquez. Actualmente, está dirigido por Francisco Esteban Nicolás Molina y Victoriano Garre Mula. Desde su constitución, el grupo ha centrado sus investigaciones en el estudio de la regulación de la expresión génica en los Mucorales, un grupo de hongos incluido dentro de los hongos basales o no dicario-

uticos. A pesar de tratarse de organismos poco estudiados, estos hongos presentan características relevantes tanto desde una perspectiva básica como aplicada. En el ámbito de la investigación básica, su estudio puede revelar mecanismos de regulación aún no descritos, contribuyendo a una mejor comprensión de la evolución de estos mecanismos en eucariotas. En cuanto a su aplicación biotecnológica, destacan por su notable capacidad para acumular lípidos y carotenos, que hace que sean

utilizados para su producción a nivel industrial. Además, los Mucorales incluyen patógenos oportunistas de otros organismos, incluyendo plantas y animales. De hecho, unas 40 especies pueden causar mucormicosis (Lax *et al.*, 2024b), una infección grave en humanos cuya forma diseminada puede alcanzar una mortalidad cercana al 100%. Esta enfermedad ha recibido tradicionalmente poca atención, pero la pandemia de COVID-19 marcó un punto de inflexión, ya que supuso un incremento importante

de casos, especialmente en India, donde se declaró una epidemia de mucormicosis en algunos estados. La elevada gravedad de la enfermedad se debe a diversos factores, entre ellos, la resistencia intrínseca de los Mucorales a la inmensa mayoría de los antifúngicos utilizados en la clínica. En respuesta a esta creciente amenaza, la Organización Mundial de la Salud incluyó a los Mucorales en su primera lista de patógenos fúngicos prioritarios, publicada en 2022.

El grupo ha realizado un gran esfuerzo en el desarrollo de herramientas moleculares para la modificación genética y el estudio funcional de los Mucorales, empleando como modelos principales a *Mucor lusitanicus* y *Rhizopus microsporus* (Nicolás *et al.*, 2018; Lax *et al.*, 2021). Actualmente, los estudios combinan estas herramientas de modificación genómica, incluyendo CRISPR-Cas9, con técnicas ómicas, como DAP-seq (*DNA Affinity Purification and sequencing*), RNA-seq, ChIP-seq, MNase-seq, secuenciación de segunda y tercera generación y proteómica. La primera línea de investigación del grupo se centró en la caracterización de los mecanismos moleculares implicados en la respuesta a la luz, lo que permitió identificar los receptores de luz azul y otras proteínas reguladoras. Estos estudios revelaron que en la evolución de los Mucorales ha ocurrido una duplicación y subfuncionalización de los receptores de luz azul que, por el contrario, aparecen en copia única en los hongos dicarióticos (Silva *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2008). El estudio de la respuesta a la luz permitió la identificación del mecanismo de silenciamiento génico o interferencia de RNA (RNAi) en *M. lusitanicus*, que fue genéticamente diseccionado, convirtiéndose en uno de los sistemas de RNAi mejor caracterizado en hongos (Torres-Martínez and Ruiz-Vázquez 2017). Este mecanismo es tremendamente complejo, con distintas rutas que controlan funciones que van desde el mantenimiento de la estabilidad genómica, protegiendo contra material genético exógeno como elementos genéticos móviles, a la regulación de funciones endógenas. Entre los hallazgos más destacados, se encuentra el descubrimiento de un mecanismo de resistencia antifúngica transitoria basado en el silenciamiento de los genes que codifican las dianas de los antifúngicos (Calo *et al.*, 2014).

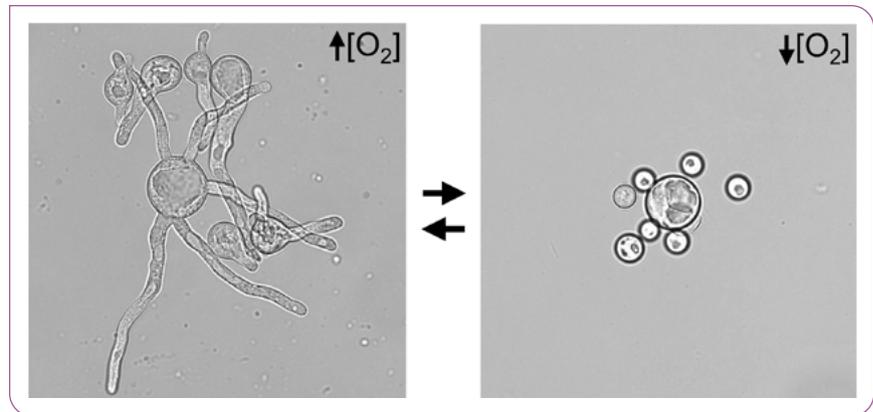


Figura 2. Dimorfismo en *M. lusitanicus*. Esporas de la estirpe silvestre creciendo como micelio en presencia de oxígeno (izquierda) y como levaduras en ausencia de oxígeno (derecha). Imágenes obtenidas por Gabriel Navarro del Saz.

Las líneas de investigación actuales del grupo se centran principalmente en dos áreas: la caracterización de los mecanismos moleculares que regulan la capacidad infectiva del hongo y el estudio de la regulación epigenética mediada por metilación de adeninas en el DNA. En la primera línea, aunque se han abordado diversos aspectos del proceso infectivo, los esfuerzos se concentran actualmente en la caracterización de los mecanismos reguladores implicados en el dimorfismo. *M. lusitanicus* y otros Mucorales pueden crecer en forma de levadura o micelio (**Figura 2**), dependiendo de la disponibilidad de oxígeno, y esta propiedad está estrechamente relacionada con su virulencia, pues mutantes bloqueados en la forma de levadura muestran una reducción significativa en su capacidad infectiva. Las investigaciones del grupo han demostrado que *M. lusitanicus* presenta genes parálogos específicos de cada forma de crecimiento, dando lugar a una organización genómica con una parte dedicada al crecimiento levaduriforme y otra al crecimiento micelial. La búsqueda sistemática de proteínas implicadas en la regulación de la transición dimórfica ha permitido identificar proteínas clave con dominios presentes en sistemas de transducción de señales, como quinasa de proteínas, que resultan esenciales para el cambio morfológico. Actualmente, las investigaciones en esta línea se centran en caracterizar la cascada completa de señalización mediante enfoques genéticos, transcriptómicos y proteómicos. Componentes de esta cascada podría representar posibles dianas para el desarrollo de nuevos antifúngicos contra los Mucorales.

La segunda línea principal de investigación se centra en la caracterización del papel de la N6-metil adenina (6mA) del DNA en la regulación de la expresión génica. El análisis de los niveles de 6mA en representantes de todos los grupos fúngicos ha revelado que los hongos basales, como los Mucorales, presentan generalmente elevados niveles de 6mA en su genoma, mientras que los hongos dicarióticos (ascomicetos y basidiomicetos), al igual que la mayoría de los eucariotas, excepto algas verdes y ciliados, muestran niveles extremadamente bajos. En las especies con altos niveles de 6mA, como *R. microsporus* (**Figura 3**), predomina la metilación simétrica (ambas cadenas metiladas) en el dinucleótido ApT, mientras que en las que presentan niveles bajos, la metilación mayoritaria es la asimétrica (una sola cadena metilada), encontrándose en distintas secuencias. Además, en las primeras, los sitios metilados se agrupan en torno al inicio de la transcripción de genes activamente expresados (Lax *et al.*, 2024a), mientras que en las segundas, la distribución es más homogénea y su vínculo con la transcripción no está claro.

Paralelamente, se ha llevado a cabo una caracterización funcional de esta modificación epigenética en los Mucorales, identificándose las metiltransferasas responsables de la metilación asimétrica y simétrica en hongos basales (Lax *et al.*, 2024a). Uno de los descubrimientos más relevantes es el papel esencial de la metilación simétrica en hongos con alto niveles de 6mA. Además, mediante análisis de DAP-seq, se ha definido la red reguladora de factores transcripcionales modulados

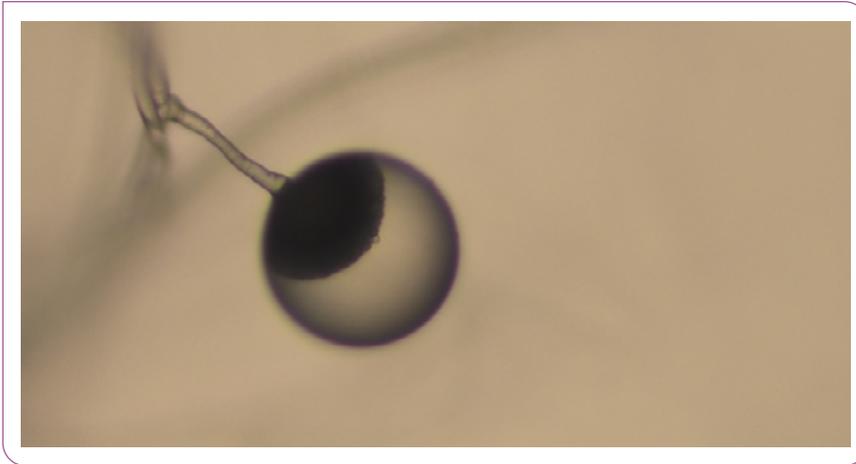


Figura 3. Esporangio de *R. microsporus*. Imagen obtenida por Carlos Lax Molina.

por la 6mA simétrica en *R. microsporus*. En los próximos años, los esfuerzos se centrarán en explorar la interacción entre esta modificación y otras modificaciones epigenéticas de la cromatina, con el fin de desentrañar la secuencia de eventos cromatínicos asociados a la activación de la transcripción mediada por 6mA.

Bibliografía

- Calo S, Shertz-Wall C, Lee SC, Bastidas RJ, Nicolás FE, Granek JA, Mieczkowski P, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM, Cardenas ME, Heitman J.** (2014) Antifungal drug resistance evoked via RNAi-dependent epimutations. *Nature* 513:555–558.
- Lax C, Mondo SJ, Osorio-Concepción M, Muszewska A, Corrochano-Luque M, Gutiérrez G, Riley R, Lipzen A, Guo J, Hundley H, Amirebrahimi M, Ng V, Lorenzo-Gutiérrez D, Binder U, Yang J, Song Y, Cánovas D, Navarro E, Freitag M, Gabaldón T, Grigoriev IV, Corrocha-**
- no LM, Nicolás FE, Garre V.** (2024a) Symmetric and asymmetric DNA N6-adenine methylation regulates different biological responses in Mucorales. *Nat Commun* 15:6066.
- Lax C, Navarro-Mendoza MI, Pérez-Arques C, Navarro E, Nicolás FE, Garre V.** (2021) Stable and reproducible homologous recombination enables CRISPR-based engineering in the fungus *Rhizopus microsporus*. *Cell Rep Methods* 1:100124.
- Lax C, Nicolás FE, Navarro E, Garre V.** (2024b) Molecular mechanisms that govern infection and antifungal resistance in Mucorales. *Microbiol Mol Biol Rev* 88:e0018822.
- 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.
- Silva F, Navarro E, Peñaranda A, Murcia-Flores L, Torres-Martínez S, Garre V.** (2008) A RING-finger protein regulates carotenogenesis via proteolysis-independent ubiquitylation of a White Collar-1-like activator. *Mol Microbiol* 70:1026–1036.
- Silva F, Torres-Martínez S, Garre V.** (2006) Distinct white collar-1 genes control specific light responses in *Mucor circinelloides*. *Mol microbiol* 61:1023–37.
- Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM.** (2017) The RNAi universe in fungi: A varied landscape of small RNAs and biological functions. *Annu Rev Microbiol* 71:371–391.