

C. Martín, P. Muñoz, D. García-de-Viedma and S. Samper (2019). "A *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain persists at high rates and extends its geographic boundaries 20 years after importation". *Sci Rep. Mar* 18;9(1):4687.

Spertini, F., R. Audran, R. Chakour, O. Karoui, V. Steiner-Monard, A. C. Thierry, C. E. Mayor, N. Rettby, K. Jaton, L. Vallotton, C. Lazor-Blanchet,

J. Doce, E. Puentes, D. Marinova, N. Aguilo and C. Martín (2015). "Safety of human immunisation with a live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine: a randomised, double-blind, controlled phase I trial." *Lancet Respir Med* 3(12): 953-962.

Tameris, M., H. Mearns, A. Penn-Nicholson, Y. Gregg, N. Bilek, S. Mabwe, H. Geldenhuys, J. Shenje, A. K. K. Luabeya, I. Murillo, J. Doce, N. Aguilo,

D. Marinova, E. Puentes, E. Rodriguez, J. Gonzalo-Asensio, B. Fritzell, J. Thole, C. Martín, T. J. Scriba, M. Hatherill and M. C. T. Team (2019). "Live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine MTBVAC versus BCG in adults and neonates: a randomised controlled, double-blind dose-escalation trial." *Lancet Respir Med* 7(9): 757-770.

WHO (2018). "Global Tuberculosis Report 2018."

RNAs reguladores de cianobacterias

Alicia M. Muro Pastor



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



De izquierda a derecha: Manuel Brenes Álvarez, Alicia M. Muro Pastor, Agustín Vioque Peña, Elvira Olmedo Verd e Isidro Álvarez Escribano.

Las cianobacterias son un grupo de microorganismos fotosintéticos con requerimientos nutricionales muy reducidos y una enorme capacidad de adaptación a entornos cambiantes, por lo que son objeto de interés biotecnológico para la producción sostenible de distintos compuestos, incluyendo biocombustibles. Los mecanismos de adaptación de las cianobacterias a la deficiencia de nitrógeno están controlados por el regulador transcripcional NtcA, que regula el uso de distintas fuentes de nitrógeno, incluyendo en última instancia la posibilidad de fijar nitrógeno atmosférico (N_2) mediante la nitrogenasa, una enzima extremadamente sensible al oxígeno cuya actividad es incompatible con

la fotosíntesis oxigénica. En cianobacterias complejas, como nuestro organismo modelo *Nostoc* sp. PCC 7120, esta incompatibilidad se resuelve confinando la nitrogenasa en unas células especializadas denominadas heterocistos. En condiciones de fijación de nitrógeno los filamentos se comportan como organismos pluricelulares con división de tareas entre dos tipos celulares interdependientes, las células vegetativas y los heterocistos (figura 1) (Muro-Pastor & Hess 2012). La diferenciación de heterocistos, que está en última instancia controlada por NtcA, depende también de HetR, un regulador específico de diferenciación celular. Nuestro trabajo se centra en el estudio de la partici-

pación de RNAs reguladores, tanto pequeños RNAs (sRNAs) como RNAs antisentido en los procesos de adaptación al estrés de carencia de nitrógeno y la diferenciación de heterocistos.

Hemos definido el "paisaje transcripcional" de nuestro organismo modelo mediante una metodología de RNASeq que evidenció abundante transcripción no codificante. La inclusión de una estirpe mutante *hetR*, que no es capaz de diferenciar heterocistos, nos permitió clasificar las respuestas transcripcionales a la deficiencia de nitrógeno en dos grandes regulones, el regulón NtcA, de respuestas globales, y el regulón HetR, que

incluye respuestas específicamente relacionadas con la diferenciación de heterocistos (Mitschke *et al.*, 2011). En ambos regulones hemos identificado moléculas de RNA potencialmente reguladoras.

Utilizando la información derivada del análisis transcriptómico hemos diseñado un acercamiento informático para la predicción de secuencias transcritas como sRNAs a partir de regiones intergénicas (Brenes-Álvarez *et al.*, 2016). Este acercamiento implementa un análisis de conservación filogenética que sugiere que algunos de los sRNAs predichos se transcribirían de hecho como RNAs funcionales. Así, por ejemplo, NsrR1 (nitrogen stress-repressed RNA 1) es un sRNA de 45 nucleótidos, codificado en todos los genomas de estirpes formadoras de heterocistos, cuya expresión es reprimida por NtcA y que participa en la regulación de la expresión de la proteína NblA, implicada en el reciclaje de aminoácidos en condiciones de carencia de nitrógeno (Álvarez-Escribano *et al.*, 2018). De esta forma, la regulación de los niveles de la proteína NblA estaría operada por un circuito mixto en el que participan un regulador transcripcional (NtcA) y un sRNA (NsrR1). También hemos analizado NsiR4 (nitrogen stress-induced RNA 4), que se transcribe desde un promotor activado por NtcA y que participa en la regulación de la asimilación de amonio a través de la modulación de la traducción de la proteína IF7, un factor inactivante de la glutamina sintetasa (Klähn *et al.*, 2015).

Hemos diseñado también un acercamiento global a la identificación de transcritos específicos de los heterocistos, entre los que hemos encontrado tanto sRNAs como RNAs antisentido que podrían ejercer un papel regulador. Para ello hemos hibridado microarrays que incluyen todas las secuencias genómicas que se transcriben en nuestro organismo modelo, ya sean estas codificantes o no codificantes, con una serie de muestras de RNA correspondientes a la estirpe silvestre y la estirpe mutante *hetR* cultivadas con distinta disponibilidad de nitrógeno. A partir de los datos resultantes hemos construido una red de co-expresión y llevado a cabo un análisis de “clustering” en el que los diferentes transcritos aparecen agrupados en función de patrones transcripcionales comunes (Brenes-Álvarez *et al.*, 2019). Entre los

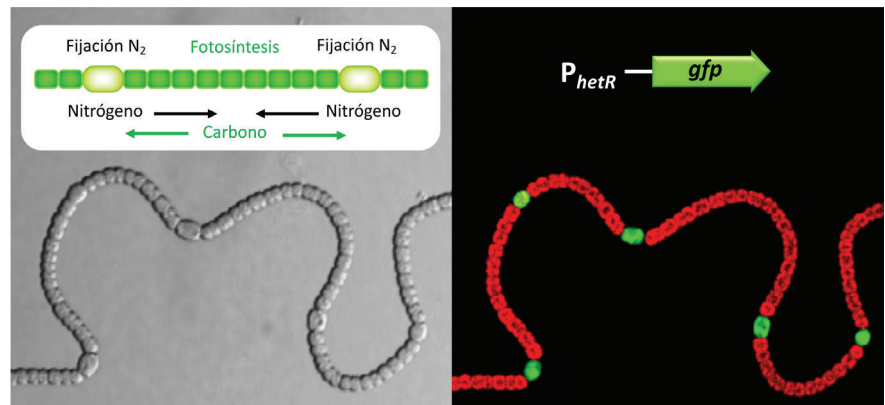


Figura 1. Las cianobacterias formadoras de heterocistos son organismos multicelulares con división de tareas metabólicas. Se muestran las relaciones funcionales entre heterocistos (células especializadas en la fijación de nitrógeno atmosférico) y células vegetativas (que llevan a cabo la fijación fotosintética del CO_2). La expresión de la proteína testigo GFP desde el promotor del regulador de la diferenciación *HetR* ilustra la existencia de patrones transcripcionales exclusivos de heterocistos. La fluorescencia roja corresponde a los pigmentos fotosintéticos de las células vegetativas.

transcritos transcripcionalmente agrupados con los de genes implicados en diferenciación de heterocistos aparece por ejemplo NsiR1 (nitrogen stress-induced RNA 1), un sRNA de 60 nucleótidos que se puede considerar un marcador muy temprano de células en diferenciación (Muro-Pastor 2014) y cuyo papel regulador estamos actualmente analizando. Asimismo, entre los transcritos que se expresan exclusivamente en heterocistos aparecen varios transcritos antisentido, como el *as_glpX*, que se transcribe en la hebra contraria del gen que codifica la sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa, una enzima requerida para la fijación fotosintética de CO_2 . La transcripción de este RNA antisentido específicamente en los heterocistos contribuiría a la reprogramación metabólica que acompaña la diferenciación de estas células especializadas (Olmedo-Verd *et al.*, 2019).

En resumen, en los últimos años hemos contribuido a definir circuitos reguladores mixtos que implican a los reguladores transcripcionales NtcA y *HetR* y a moléculas de RNA no codificantes cuya expresión está bajo control de los mismos. Nuestro trabajo se lleva a cabo en colaboración con el laboratorio dirigido por Wolfgang R. Hess (Genetics and Experimental Bioinformatics, Universidad de Freiburg, Alemania) y está financiado actualmente por el Programa Estatal de Fomento de la Investigación Científica y Técnica de Excelencia (BFU2016-74943).

http://www.ibvf.us-csic.es/en/RNAbiology/Regulatory_RNAs

BIBLIOGRAFÍA

- Olmedo-Verd E, Brenes-Álvarez M, Vioque A, Muro-Pastor AM.** (2019). A heterocyst-specific antisense RNA contributes to metabolic reprogramming in *Nostoc* sp. PCC 7120. *Plant Cell Physiol* 60: 1646-1655.
- Brenes-Álvarez M, Mitschke J, Olmedo-Verd E, Georg J, Hess WR, Vioque A, Muro-Pastor AM.** (2019). Elements of the heterocyst-specific transcriptome unravelled by co-expression analysis in *Nostoc* sp. PCC7120. *Environ Microbiol* 21: 2544-2558.
- Hou S, Brenes-Álvarez M, Reinmann V, Alkhnabshi OS, Backofen R, Muro-Pastor AM, Hess WR.** (2019). CRISPR-Cas systems in multicellular cyanobacteria. *RNA Biol* 16: 518-529.
- Álvarez-Escribano I, Vioque A, Muro-Pastor AM.** (2018). NsiR1, a nitrogen stress-repressed sRNA, contributes to the regulation of *nblA* in *Nostoc* sp. PCC 7120. *Front Microbiol* 9: 2267.
- Muro-Pastor AM, Brenes-Álvarez M, Vioque A.** (2017). A combinatorial strategy of alternative promoter use during differentiation of a heterocystous cyanobacterium. *Environ Microbiol Rep* 9: 449-458.
- Brenes-Álvarez M, Olmedo-Verd E, Vioque A, Muro-Pastor AM.** (2016). Identification of conserved and potentially regulatory small RNAs in heterocystous cyanobacteria. *Front Microbiol* 7: 48.
- Klähn S, Schaal C, Georg J, Baumgartner D, Knippen G, Hagemann M, Muro-Pastor AM, Hess WR.** (2015). The sRNA NsiR4 is involved in nitrogen assimilation control in cyanobacteria by targeting glutamine synthetase inactivating factor IF7. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: E6243-6252.
- Muro-Pastor AM.** (2014). The heterocyst-specific NsiR1 small RNA is an early marker of cell differentiation in cyanobacterial filaments. *mBio* 5: e01079-14.
- Muro-Pastor AM, Hess WR.** (2012). Heterocyst differentiation: from single mutants to global approaches. *Trends Microbiol* 20: 548-557.
- 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.