

Microbiología eucariótica: la levadura, un modelo experimental para señalización y reprogramación celular

César Nombela, Javier Arroyo y María Molina.

Departamento de Microbiología y Parasitología.
Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid (UCM).

Desde el inicio de los sesenta el Profesor Villanueva estableció su grupo de investigación independiente fijándose en algunos de los sistemas microbianos más complejos. Las investigaciones sobre microorganismos eucarióticos, como levaduras y hongos, o especies bacterianas, como los actinomicetos con su crecimiento filamentosos, fueron punto focal de la amplia y extensa escuela científica de quien recordamos en este monográfico. Los organismos modelo –como sistemas para entender la fenomenología biológica– son la base del triunfo de la Biología Experimental, que marca la investigación en Ciencias de la Vida en la segunda mitad del pasado siglo y que conduce a la preeminencia actual de la Biomedicina.

La especie *Neurospora crassa*, un hongo filamentosos haploide y accesible fácilmente al estudio de mutantes, sirvió como sistema experimental en los cuarenta, para la formulación de la correspondencia entre genes y enzimas por parte de Beadle y Tatum. Pero los hongos unicelulares, las levaduras, habrían de tomar el testigo. De hecho, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, inseparable de la historia de la alimentación del *Homo sapiens*, tiene también un lugar destacado como sistema experimental en la historia de la Ciencia. El descubrimiento de la fermentación por Pasteur o su empleo para caracterizar enzimas así lo atestiguan en el pasado, sin que haya dejado su lugar en la vanguardia de la investigación en el presente.

EN LA FORJA DEL NOBEL

Hace muchos años que la genética mendeliana puso de manifiesto que el material hereditario de la levadura consta de 16 grupos de ligamiento. Su genoma, el segundo de los secuenciados en su totalidad, consta de unas 13,3 MB y unos 6000 genes, que se agrupan en esos 16 cromosomas de tamaños muy diferentes. Como organismo unicelular con diseño celular (eucariótico) propio de muchos organismos pluricelulares, *S. cerevisiae* ha resultado ser un modelo adecuado para el estudio de fenómenos biológicos fundamentales. Sus células ovales en crecimiento asexual emiten yemas que se agrandan hasta alcanzar el tamaño de la célula madre, para pro-

ceder a la separación de ambas. Es el ciclo mitótico de crecimiento. En estirpes heterotálicas se activan procesos de apareamiento entre células de tipo sexual opuesto, con la generación de células diploides en las que un proceso meiótico, con formación de un asca, originará cuatro ascosporas haploides. La segregación mendeliana de caracteres ha permitido analizar y mapear con precisión muchos de sus genes, antes de que la clonación hiciera posible conocer su secuencia nucleotídica.

En 1975, en el congreso VI Congreso Nacional de Microbiología celebrado en Salamanca, Leland Hartwell daba cuenta de sus estudios, iniciados diez años antes aún lejos de la Tecnología del DNA recombinante, sobre el ciclo de división celular. Cientos de mutantes termosensibles, afectados en diversos puntos de control del ciclo mitótico (mutantes *cdc*) le llevaron a desentrañar los pasos de la división celular. Es algo que amplió y perfeccionó Paul Nurse con la levadura *Schizosaccharomyces pombe*, especie mucho más próxima evolutivamente al hombre. Hartwell y Nurse verían reconocidos sus esfuerzos con el premio nobel en 2001. El mismo reconocimiento llegaría en 2013 para Randy Schekman que años antes abordó con gran éxito el transporte de proteínas y tráfico de vesículas con *S. cerevisiae* como sistema experimental. Y pronto volvería a repetirse el más alto reconocimiento a un investigador de levadura, con Yoshinori Ohsumi recibiendo el nobel en 2016 por desentrañar los mecanismos de la autofagia.

Lo anterior es una pequeña muestra del valor de la levadura como sistema experimental para entender la vida. El desarrollo de la Biología Sintética y la Biología de Sistemas constituyen ejemplos muy actuales.

SEÑALIZACIÓN Y REPROGRAMACIÓN

La levadura ha resultado igualmente muy útil para esclarecer detalles de las rutas de señalización y su conservación evolutiva en toda la escala *Eukarya*. Durante años los esfuerzos de nuestro grupo de investigación se centraron en el estudio de la pared celular de levaduras, una estructura >>>

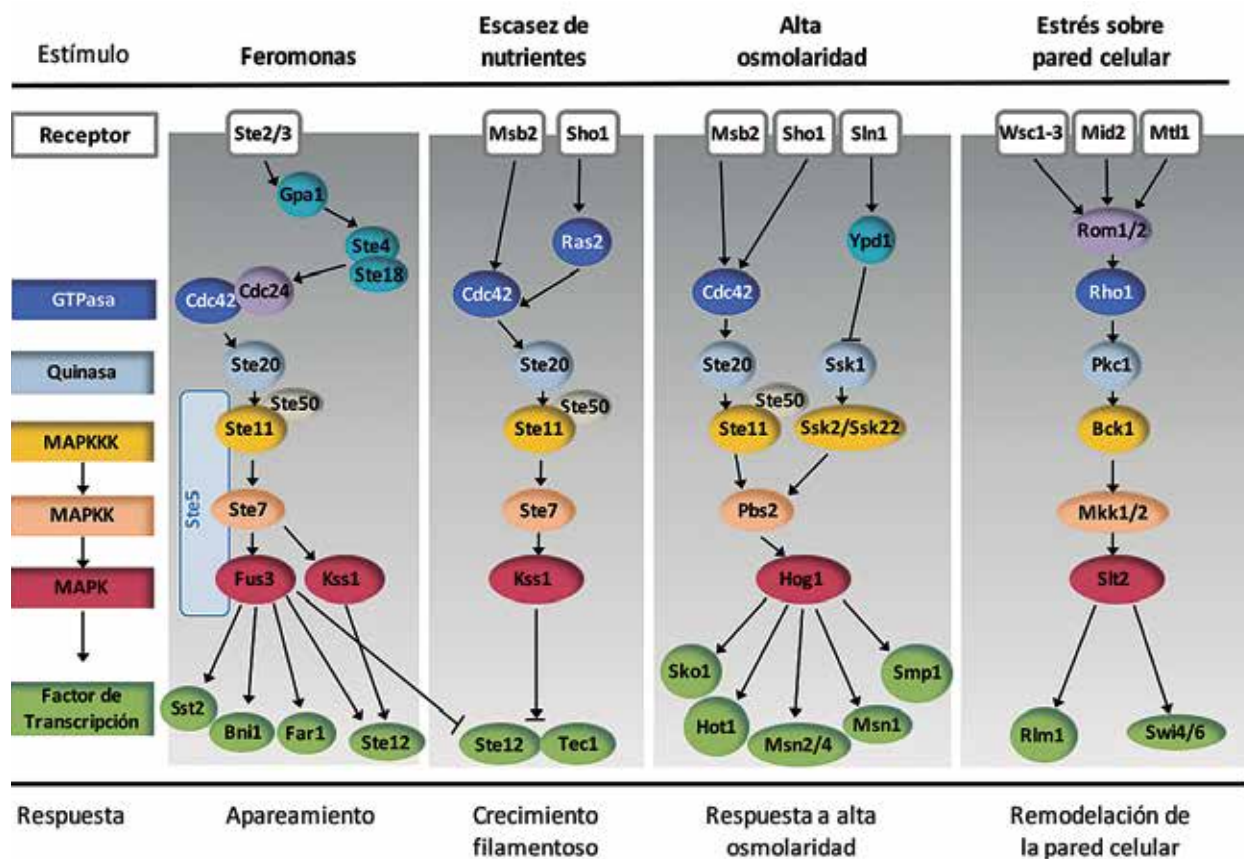


Figura 1

Principales rutas de MAPK en *Saccharomyces cerevisiae* (diseñada por Ana Belén Sanz. UCM)

>>> consistente y dinámica, integrada por polisacáridos y proteínas, que rodea a la célula en contacto con la membrana citoplasmática dándole forma y protegiendo su integridad frente a los avatares del ambiente externo.

Tratando de definir los genes que controlan la biogénesis de la pared celular, realizamos un descubrimiento notablemente inesperado. Un mutante termosensible de *S. cerevisiae*, cuyas células deficientes en la formación de la pared celular perdían su integridad creciendo a la temperatura no permisiva, era complementado por un gen que denominamos *SLT2*, y que codifica una enzima del grupo de enzimas fosforilantes de proteínas en serina o treonina. Las referidas enzimas, denominadas “quinasas de proteínas activadas por mitógenos” (MAPK), están en el eje central de circuitos de señalización que recogen estímulos externos a la célula y que activan respuestas a nivel genético, controlando la expresión de genes específicos.

La descripción de la MAPK *SlT2* contribuyó a la identificación de las cascadas de señalización que la célula utiliza para activar respuestas en diversas situaciones de estrés. Desde entonces, nuestros esfuerzos se han dirigido al estudio de estos circuitos de señalización, en especial

la ruta controlada por *SLT2*, que hemos denominado “ruta de integridad de pared celular” (CWI, por *Cell Wall Integrity*) o, simplemente, “ruta de integridad celular”¹. Esta ruta permite a las células de levadura reaccionar a diversos tipos de estrés que amenazan a la pared celular, situaciones en las que el funcionamiento de esta vía resulta esencial para que la célula se mantenga viva.

SEÑALIZACIÓN Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN SITUACIONES DE ESTRÉS

Las rutas de transducción de señales mediadas por MAPKs permiten detectar y responder adecuadamente a cambios en sus condiciones ambientales de crecimiento o a la presencia de diferentes estímulos. De este modo regulan procesos celulares esenciales como la proliferación, la diferenciación o la respuesta a situaciones de estrés. Constan de módulos conservados, integrados por quinasas de proteínas, que responden al estímulo de forma específica a través receptores situados en la membrana celular a los que están acoplados. El módulo prin-

¹ La falta de funcionamiento de esta vía de señalización conduce, en determinadas situaciones, a una formación deficiente de la pared celular, con la consiguiente lisis de la célula que pierde su integridad.

principal de estas rutas está formado una triada de quinasas, que se activan de forma secuencial, una MAP quinasa quinasa (MAPKKK) que fosforila y activa a una MAP quinasa quinasa (MAPKK) en residuos serina y treonina, que a su vez fosforila a la MAP quinasa en residuos treonina y tirosina. La activación de la MAPK es responsable finalmente de la generación de respuestas de adaptación a través de diversos mecanismos, regulando procesos como el transporte de iones, el tráfico vesicular, la morfogénesis, la progresión a través del ciclo celular, el metabolismo, y muy especialmente la expresión génica.

El conocimiento actual de las rutas de MAPKs en muchos organismos, incluido el humano, está basado, en buena parte, en la investigación desarrollada en la levadura. Así, muchos de los componentes de estas rutas y los mecanismos moleculares por los que estas cascadas operan, que están bien conservados en todos los eucariotas, se identificaron inicialmente en este microorganismo. El genoma de *Saccharomyces cerevisiae* codifica cinco MAPK, Fus3, Kss1, Hog1, Slt2 y Smk1, que regulan las rutas de apareamiento, crecimiento filamentosos e invasivo, estrés osmótico (HOG), integridad celular (CWI) y esporulación, respectivamente, en este organismo (*Figura 1*).

Los cambios en la expresión génica son eventos cruciales de las respuestas adaptativas al estrés. Sin duda, una de las funciones mejor caracterizadas de las MAPKs es su papel en la regulación de estos patrones de expresión. El desarrollo de análisis genómicos en levadura para cuantificar los niveles de RNAm y la estabilidad de los mismos, así como para caracterizar la interacción de proteínas reguladoras con la cromatina ha proporcionado una visión global de los cambios en la expresión génica en respuesta a una gran variedad de estreses ambientales y ha permitido un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan la expresión génica en estas condiciones. Estos mecanismos median el control por las diferentes MAPKs de varios pasos durante la biogénesis del RNAm, desde la dinámica de la cromatina, la iniciación de la transcripción y la elongación, hasta la estabilidad y el transporte del RNAm.

La regulación de programas transcripcionales específicos se logra a través de las diferentes rutas de MAPKs con la participación de factores de transcripción específicos. Así, la activación de la MAPK Slt2 en respuesta a situaciones que comprometen la integridad celular, conduce a la activación de dos factores de transcripción, SBF (Swi4/Swi6) y Rlm1 (*Figura 1*). Rlm1 es responsable de la activación transcripcional de la mayoría de la respuesta mediada por esta ruta, mientras que SBF, que es esencial para la transcripción específica de genes de ciclo celular,

también regula la expresión de ciertos genes en respuesta a estrés. Mientras que Rlm1 se activa por Slt2 mediante fosforilación, SBF es activado por Slt2 y por la pseudoquinasa Mlp1 a través de un mecanismo no catalítico. En el caso de la ruta de alta osmolaridad, Hog1 regula la respuesta transcripcional a través de la combinación de diversos factores de transcripción como Msn2/4, Hot1, Smp1 y Sko1 (*Figura 1*). El papel de las MAPKs en la regulación de estas respuestas no solo se limita a la fosforilación de los factores de transcripción sino también a la asociación con la cromatina para el reclutamiento de diferentes elementos reguladores. En este contexto, el papel de Hog1 en relación a las respuestas a estrés osmótico ha sido ampliamente estudiado. Además de Hog1, otras MAPKs, como Fus3, Kss1, o Slt2, también se asocian con genes de las respuestas que regulan.

El posicionamiento y la dinámica de los nucleosomas es un paso crucial en la regulación transcripcional. La estructura de la cromatina se regula a través de factores que modifican histonas y factores remodeladores que desplazan, desensamblan o reensamblan nucleosomas. Así, una vez que Hog1 se une los promotores de sus genes diana, a través de la interacción con sus factores de transcripción correspondientes, media el ensamblaje del complejo de preiniciación y el reclutamiento de la RNA Pol II y de diferentes coactivadores, incluidas actividades modificadoras de la cromatina. De esta forma, el estrés osmótico induce, a nivel de los promotores de los genes de respuesta, un cambio importante en la organización de los nucleosomas, que depende de la MAPK Hog1, de los complejos remodeladores de cromatina RSC y SWI/

LOS ORGANISMOS MODELO —como sistemas para entender la fenomenología biológica— son la base del triunfo de la Biología Experimental, que marca la investigación en Ciencias de la Vida en la segunda mitad del pasado siglo y que conduce a la preeminencia actual de la Biomedicina.

SNF, así como del reclutamiento del complejo histona deacetilasa Rpd3. Con respecto a la ruta CWI, el reclutamiento del factor de transcripción Rlm1 a los promotores de los genes diana en condiciones de estrés requiere de su activación por la MAP quinasa. La interdependencia de la unión de Slt2 y Rlm1 a estos promotores apoya un modelo de reclutamiento preferente del complejo Slt2-Rlm1 activado a estos promotores. El complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF también se une a los promotores mediante la interacción directa con Rlm1 para alterar localmente los nucleosomas, proceso >>>

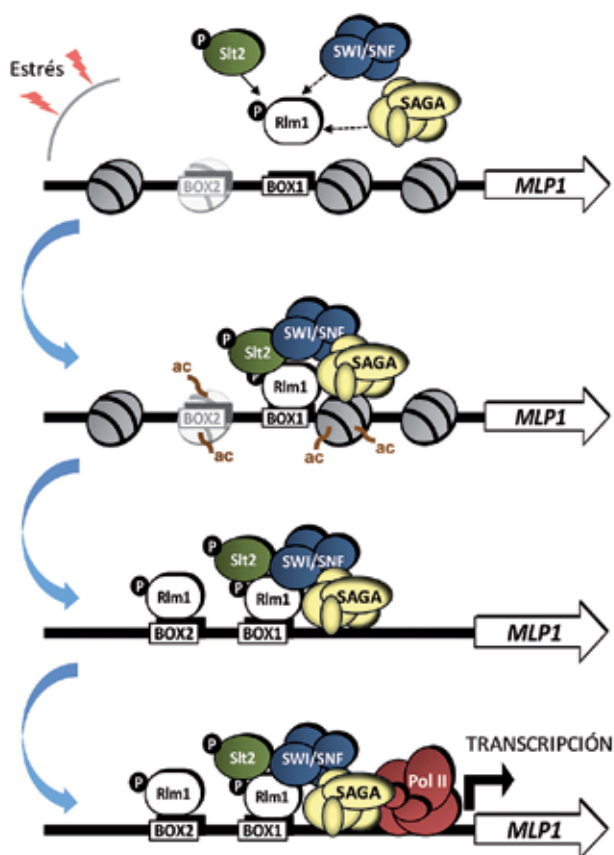


Figura 2

Modelo de activación transcripcional de los genes regulados por la ruta CWI (diseñada por Ana Belén Sanz. UCM)

>>> que se facilita a través del reclutamiento simultáneo del complejo SAGA que media la acetilación de histonas. De esta forma, una vez remodelada la cromatina de los genes dependientes de Rlm1, Slt2 reclutaría la RNA Pol II para iniciar la transcripción (Figura 2).

Además de regular el inicio de la transcripción, las MAPKs juegan un papel importante en la regulación de la elongación. Así, Hog1 se asocia con las regiones codificantes de los genes osmódependientes, donde desempeña un papel esencial mediante la fosforilación directa del factor de elongación Spt4 para regular la actividad del RNA Pol II en elongación. Hog1 también interactúa con el complejo de remodelación de cromatina RSC para dirigir su asociación con las regiones codificantes y modificar la organización de nucleosomas a este nivel. Por otro lado, la MAPK Slt2, de forma independiente de su actividad catalítica, también media una función reguladora de la elongación de genes regulados por SBF. Esta función está mediada por la interacción de Slt2 con el complejo de elongación Paf1. La interacción de Slt2 con Paf1 permite la elongación

de la transcripción de genes como *FKS2* al evitar la terminación prematura de la transcripción por el complejo Sen1-Nrd1-Nab3.

Los estudios en levadura de los mecanismos mediados por MAPK que regulan la expresión génica en respuesta a estrés dejan claro, por tanto, el papel de estas en la regulación de la transcripción, tanto en el inicio como en la elongación, así como su participación, no solo en la fosforilación de los respectivos activadores transcripcionales sino como parte de los complejos de transcripción que inducen la expresión de los genes diana. Estos mecanismos, aunque globalmente similares, difieren entre distintas MAPKs e incluso también de forma específica en diferentes genes regulados a través de la misma ruta, lo que sugiere la necesidad de mecanismos muy finos de regulación para que se produzcan respuestas adaptativas adecuadas. Los mecanismos de regulación de la expresión génica parecen bastante conservados entre levaduras y mamíferos, por lo que la información sobre estos mecanismos mediados por MAPKs en levadura puede ser relevante para entender estos mecanismos y enfermedades relacionadas con ellos en humanos.

REPROGRAMAR Y "HUMANIZAR" LA LEVADURA

Aunque las levaduras no tienen tejidos, sangre ni cerebro, muchos de los descubrimientos sobre procesos biológicos fundamentales realizados en este microorganismo están resultando extremadamente útiles para comprender los mecanismos moleculares y celulares de enfermedades humanas como el cáncer, la diabetes, el Parkinson o el Alzheimer. Entre las posibilidades que ofrece este sistema microbiano para la modelización de patologías humanas, se encuentra también lo que se ha venido a denominar "humanización" de la levadura, consistente en expresar proteínas humanas implicadas en enfermedades y conseguir que estas se acoplen o interfieran con la maquinaria celular eucariótica, como lo hacen en sus células de origen. Si con ello se consigue un fenotipo de toxicidad celular, fácilmente detectable, se abre la posibilidad de realizar i) estudios de relación estructura-función mediante análisis mutagénico de dichas proteínas; ii) identificación de sus dianas moleculares, bien a través del análisis de sus efectos sobre procesos biológicos concretos (ciclo celular, rutas de señalización, citoesqueleto, tráfico vesicular, etc) o bien mediante *screenings* genéticos o genómicos de supresión, utilizando genotecas o colecciones completas de mutantes y de sobreexpresión de genes; iii) determinación de su localización celular y sus interacciones con estructuras y orgánulos; y iv) búsqueda de inhibidores específicos con fines terapéuticos mediante *screenings* farmacológicos (Figura 3).

Con esta estrategia, se han conseguido levaduras humanizadas no solo con proteínas que tienen ortólogos en la

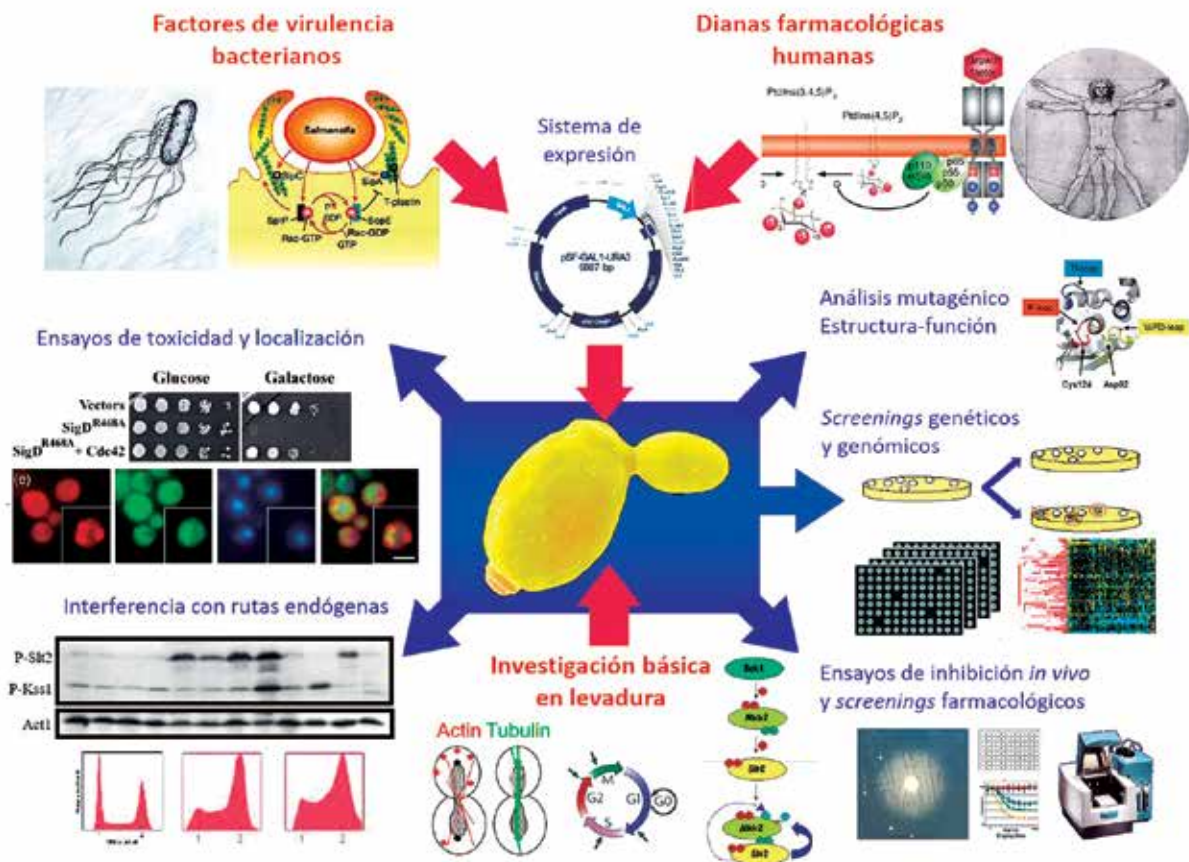
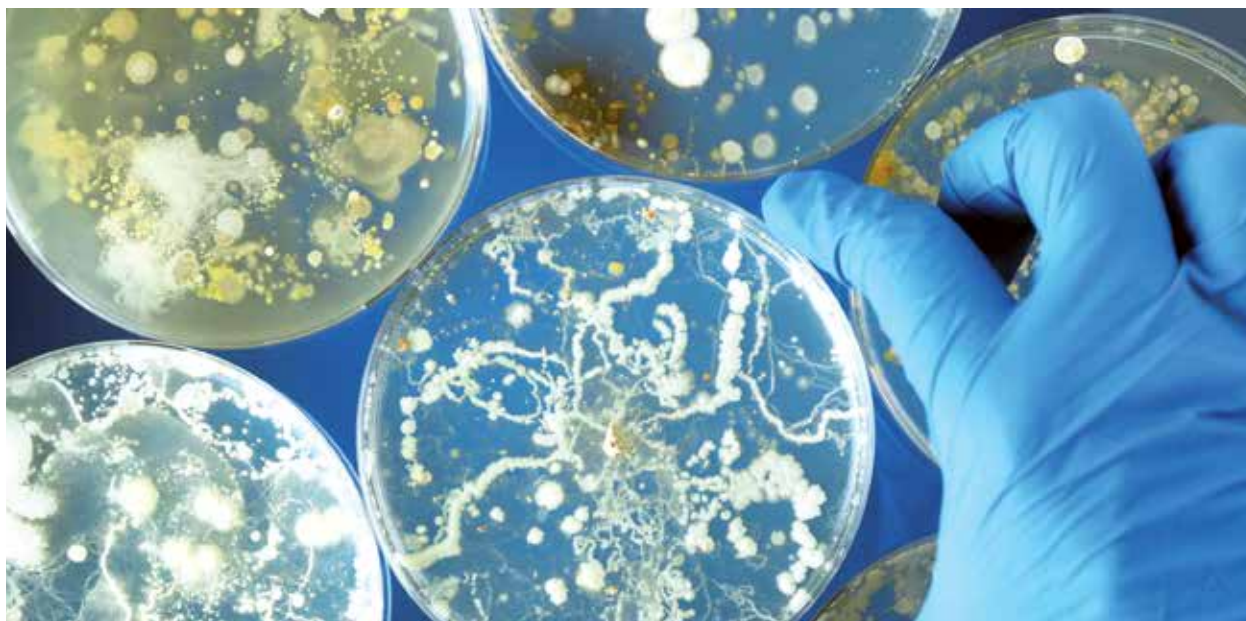


Figura 3

Modelización de patologías en la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae* mediante expresión heteróloga de proteínas humanas y bacterianas (diseñada por Víctor Jiménez Cid. UCM)

levadura, como los receptores de tipo GPCR (*G protein-coupled receptors*), sino con otras que no los tienen, como p53, proteínas de la familia PARP (*poly ADP ribose polymerase*), el péptido β amiloide, la α -sinucleína o la huntingtina, relacionadas con cáncer y enfermedades neurodegenerativas. También hay ejemplos de humanización de la levadura con una ruta de señalización parcial o completa, mediante la co-expresión de varias proteínas humanas relacionadas funcionalmente. Este es el caso de la ruta PI3K/PTEN-Akt que nuestro grupo de investigación consiguió reconstituir en la levadura con éxito hace unos años, en colaboración con el grupo de Rafael Pulido del Instituto de Investigación Sanitaria Biocruces. La levadura carece de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) de clase I, enzima que en las células humanas convierte el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) en fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃). Este segundo mensajero lipídico tiene numerosas funciones, entre ellas la activación de Akt, una proteína quinasa activadora de la proliferación celular e inhibidora de la apoptosis. La hiperactivación de esta ruta es, por tanto, oncogénica. Por ello, la fosfatidilinositol fosfatasa PTEN, que es capaz

de catalizar la reacción inversa a la que realiza la PI3K, es una proteína supresora de tumores. La sobreproducción en la levadura de la PI3K humana, controlada por un promotor fuerte e inducible por galactosa (*GAL1*), provoca toxicidad celular por eliminar de la membrana plasmática el PIP₂, un lípido esencial para este microorganismo. Esta toxicidad se elimina cuando se co-expresa PTEN, lo que indica que estas proteínas humanas están llevando a cabo su actividad catalítica en la levadura. Si la proteína que se co-expresa es Akt, esta proteína quinasa es reclutada a la membrana plasmática por el PIP₃ generado por la PI3K, donde es fosforilada y activada por proteínas quinasa de levadura ortólogas a las que realizan esta modificación postraduccional sobre Akt en las células humanas. Este proceso puede monitorizarse observando la localización celular de Akt fusionada a GFP (*Green Fluorescent Protein*) y por inmunodetección de las formas fosforiladas de esta quinasa con anticuerpos específicos. La reconstitución de la ruta PI3K/PTEN-Akt en este modelo microbiano ha permitido estudiar su funcionalidad, conocer el efecto de mutaciones asociadas a cáncer o autismo en la actividad de PTEN y definir nuevas >>>



»» mutaciones con potencial oncogénico. Además, el uso de esta levadura humanizada como plataforma de *screening* ha permitido a nuestro grupo identificar, de forma selectiva y económica, compuestos inhibidores de PI3K con posible actividad antitumoral, en colaboración con la Fundación MEDINA (Centro de excelencia en la investigación y desarrollo de nuevos fármacos).

Las proteínas humanas no son las únicas proteínas implicadas en enfermedades que se pueden estudiar mediante expresión heteróloga en levadura. Desde hace unos años se han ido incrementando progresivamente los trabajos en los que se estudian proteínas bacterianas asociadas a procesos de patogenicidad utilizando este sistema celular como modelo de célula hospedadora. Esto es posible debido a que muchas bacterias aprovechan la maquinaria de la propia célula hospedadora para favorecer su invasión, proliferación o supervivencia, mediante la inyección, a través de sistemas especializados de secreción, de efectores que bien mimetizan o bien interactúan con proteínas humanas para ejercer su acción. Si la expresión de dichos efectores de virulencia bacterianos en la levadura provoca toxicidad por acoplarse o interferir con los mismos procesos que son su diana en las células humanas, disponemos de un sistema con las mismas posibilidades de análisis funcional y *screening* farmacológico que presenta la levadura humanizada (Figura 3).

La expresión heteróloga en levadura de proteínas relacionadas con patologías humanas no solo resulta muy eficaz para analizar mecanismos moleculares de dichas enfermedades, sino que ofrece una oportunidad muy interesante para profundizar en la propia biología de este microorganismo. Dichas proteínas, ya sean humanas o bacterianas, se convierten a su vez en herramientas con las que

modificar los procesos celulares de la levadura y analizar las consecuencias fisiológicas (Figura 3). El conocimiento biológico básico generado en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se puede extrapolar, además, a otros hongos y, de manera general, a cualquier célula eucariótica, lo que dota de un gran valor añadido a este tipo de estudios realizados utilizando este excelente modelo celular.

COMENTARIO FINAL

La extrapolación de datos obtenidos experimentalmente con organismos modelo ha supuesto una estrategia muy potente para avanzar en Ciencias de la Vida, gracias a la conservación de los procesos básicos en toda la escala biológica. En el futuro ya presente, la modelización constituye una forma de encajar la inmensidad de los datos que la tecnología actual proporciona en formulaciones coherentes que permitan abarcar, quizá explicar, la complejidad de los sistemas biológicos. Convertir trillones de datos en conocimiento es el objetivo, algo a lo que ha contribuido notablemente el conocimiento profundo de organismos modelo. ■

PARA SABER MÁS

de Nadal E, Ammerer G, Posas F. Controlling gene expression in response to stress, *Nat. Rev. Genet.*, 12 (2011) 833-45.
 Laurent JM, Young JH, Kachroo AH, Marcotte EM. Efforts to make and apply humanized yeast, *Brief Funct Genomics*, 15 (2016) 155-63.
 Rodríguez-Escudero I, Roelants FM, Thorner J, Nombela C, Molina M, Cid VJ. Reconstitution of the mammalian PI3K/PTEN/Akt pathway in yeast, *Biochem J* 390 (2005) 613-23.
 Sanz AB, García R, Rodríguez-Peña JM, Nombela C, Arroyo J. Cooperation between SAGA and SWI/SNF complexes is required for efficient transcriptional responses regulated by the yeast MAPK Sit2, *Nucleic Acids Res.*, 44 (2016) 7159-72.
 Müller B, Grossnicklaus U, 2010. Model organisms—A historical perspective. *Journal of Proteomics* 73: 2054-63.