# Transducción de Señales en *Saccharomyces cerevisiae*

Esmeralda Alonso, Teresa Fernández-Acero, Pablo Fernández-Piñar, Ahmad Ismail, Isabel Rodríguez-Escudero, María Rodríguez-Escudero, Almudena Sacristan-Reviriego, Andrea Valderrey, Rafael Rotger, Víctor J. Cid, Humberto Martín y María Molina.

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid

molmifa@ucm.es

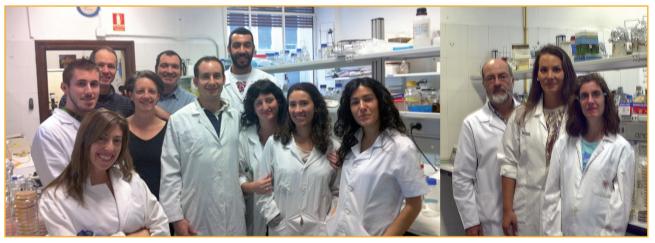


Foto de grupo. Integrantes del grupo de investigación a principios del 2014. En la imagen izquierda, Teresa Fernández-Acero (al frente), Ignacio Bravo, María Molina, Pablo Fernández Piñar, María Rodríguez-Escudero, Esmeralda Alonso y Almudena Sacristán Reviriego (primera fila); Humberto Martín, Víctor J. Cid y Ahmad Ismail (al fondo); en la imagen derecha, Rafael Rotger, Andrea Valderrey e Isabel Rodríguez-Escudero.

uestro grupo es uno de los grupos de investigación consolidados de la Universidad Complutense de Madrid (Grupo de Transducción de Señales en Saccharomyces cerevisiae: https://www.ucm.es/signalyeast/), ubicado en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia, que está además integrado en el Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). El equipo, formado en la actualidad por 12 miembros, 6 de ellos doctores y 6 realizando su tesis doctoral, está coordinado por la Dra. María Molina y los Dres. Humberto Martín y Víctor Jiménez Cid. Desde su formación, el trabajo del grupo ha estado financiado a través de proyectos europeos y nacionales, y actualmente también forma parte del Programa PROMPT (Programas i+d grupos de la Comunidad de

Madrid: http://www.prompt.es/) con otros siete grupos de investigación interesados en la Programación de Circuitos Microbianos en Medicina Protectiva y Terapéutica.

Nuestras líneas de investigación están enfocadas hacia el estudio de las rutas y mecanismos moleculares de transducción de señales en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, considerada un organismo eucariótico modelo. Los procesos de señalización son esenciales para que las células reconozcan el ambiente que les rodea, se adapten y se comuniquen con otras células. Dichas rutas, muy conservadas a lo largo de la evolución, son las encargadas de responder a los estímulos extracelulares mediante la generación de modificaciones post-traduccionales en las proteínas y cambios en la expresión génica. Esta respuesta resulta en

la mayoría de los casos esencial para la proliferación y la supervivencia celular.

La experiencia de nuestro grupo en este tema es fruto de una larga travectoria, que comienza hace más de veinte años con la clonación del gen SLT2, bajo la dirección de los Dres. César Nombela y Miguel Sánchez (Torres et al. 1991). El interés de estos investigadores por comprender los procesos de biosíntesis y degradación de la pared celular de las levaduras, les condujo a la búsqueda de genes con actividad supresora del fenotipo de unos mutantes autolíticos, amablemente cedidos desde el NIH (National Institute of Health) en Bethesda por los Dres. Enrico Cabib y Angel Durán. Uno de ellos resultó codificar una proteín quinasa de la familia de las MAPKs, Slt2, que era responsable del mantenimiento de la integridad de la pared celular en condiciones que suponían un peligro para la estabilidad de esta estructura esencial que rodea y protege a la célula. A partir de entonces, gracias a nuestro trabajo y al de otros grupos de investigación nacionales e internacionales, se fue configurando una ruta de señalización (denominada CWI, por Cell Wall Integrity) formada por diferentes componentes que, desde los sensores de superficie que perciben el estímulo, van activándose en cadena hasta activar a la MAPK, que regula una respuesta compensatoria para evitar que una alteración en la pared celular pueda conducir a una pérdida de viabilidad. Además, en los últimos años hemos utilizado nuestros conocimientos en la señalización celular en levaduras para estudiar proteínas relacionadas con enfermedades humanas mediante su expresión heteróloga en S. cerevisiae. El desarrollo de estas levaduras humanizadas nos ha permitido demostrar que este sistema modelo constituve una plataforma biológica con un gran potencial para la realización de estudios genéticos y farmacológicos sobre proteínas que interfieren con procesos de señalización intracelular conservados a lo largo de la escala filogenética.

### ESTUDIO DE LA RUTA DE INTEGRIDAD CELULAR (CWI) DE S. CEREVISIAE

Las aportaciones de nuestro grupo en esta línea de investigación han permitido la identificación de interacciones moleculares entre componentes que integran la ruta CWI (Soler et al., 1995; Jiménez-Sánchez et al., 2007), de estímulos responsables de su activación, gracias al desarrollo de un sistema de inmunodetección de la activación de la MAPK (Martín et al., 2000; Rodríguez-Pachón et al., 2002), la caracterización de moduladores negativos de la señalización, como las proteín fosfatasas Msg5 y Sdp1 (Flández et al., 2004; Martin et al., 2005; Marín et al., 2009; Palacios et al. 2011; Sacristán-Reviriego et al., 2014), v de mecanismos de retroalimentación que operan en dicha ruta, como la retrofosforilación de las MAPKKs Mkk1 y Mkk2 por la MAPK Slt2 (Jiménez-Sánchez et al., 2007). También hemos llevado a cabo análisis a gran escala, tanto fenotípicos utilizando colecciones genómicas de mutantes (de Groot et al., 2001) dentro de provecto EUROFAN (European Functional Analysis Network), como transcriptómicos

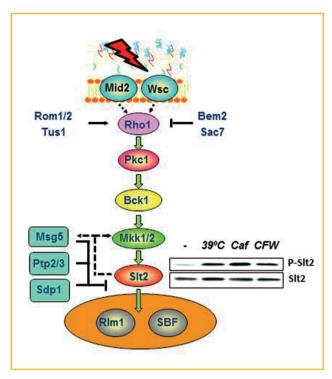


Figura 2. Esquema de la ruta de señalización de integridad celular en S. cerevisiae. El inmunoblot, realizado con anticuerpos anti-fosfo-MAPK (panel superior) o anti-Slt2 (panel inferior) refleja el incremento de fosforilación de la MAPK Slt2 en respuesta a distintos estímulos que activan la ruta: choque térmico (39 °C), cafeína (Caf) y blanco de calcoflúor (CFW).

(Marín et al., 2009) y, más recientemente, fosfoproteómicos (Mascaraque et al. 2013). Estas estrategias globales, realizadas en colaboración con las Unidades de Genómica y Proteómica del PCM/UCM dirigidas por el Dr. Javier Arroyo y la Dra. Concha Gil, han generado muchos datos interesantes que abren nuevas vías de estudio sobre el funcionamiento y regulación de la ruta CWI. Por ejemplo, mediante el estudio fosfoproteómico cuantitativo diferencial realizado utilizando SILAC (Stable Isotope Labeling of Amino acids in Cell culture), hemos podido identificar un conjunto de proteínas que incrementan su fosforilación en condiciones de hiperactivación de Pkc1, algunas de la cuales presentan el motivo característico de fosforilación por MAPKs, siendo por tanto potenciales sustratos de Slt2. Uno de los actuales objetivos de nuestro grupo es confirmar cuales de estas proteínas son efectores de la ruta CWI.

La esencialidad de la pared celular y su ausencia en células humanas confiere a esta estructura la característica de ser una excelente diana de fármacos antifúngicos. Por ello, la comprensión del mecanismo compensatorio que desencadena esta ruta en presencia de compuestos que alteran la pared celular es fundamental para la consecución de una terapia antifúngica eficaz. El desarrollo de nuevos bioensayos para la búsqueda de compuestos dirigidos hacia esta diana es uno de nuestros objetivos prioritarios.

**SEM**@foro

38

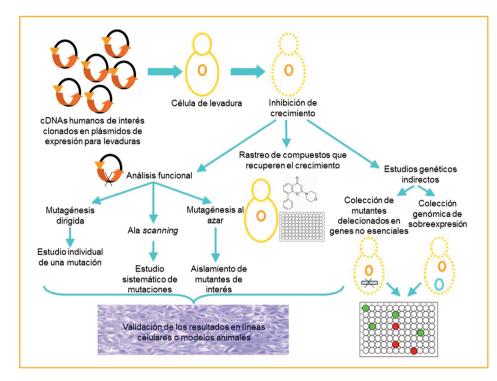


Figura 3. Estrategias para la investigación con levaduras humanizadas. El cDNA de interés clonado en un plásmido de expresión condicional en levaduras ocasiona la inhibición de su crecimiento. Esto permite llevar a cabo estudios funcionales mediante técnicas de mutagénesis; rastrear colecciones de compuestos en busca de moléculas que recuperen el crecimiento; y realizar estudios genéticos indirectos, para determinar posibles moduladores del fenotipo (que se indican en rojo y en verde en la placa multipocillo) empleando tanto la colección de mutantes delecionados en genes no esenciales como la colección genómica de sobreexpresión. Los resultados obtenidos en este sistema deben ser validados en líneas celulares. Esquema realizado por Teresa Fernández-Acero Bascones para su tesis doctoral

## MODELIZACIÓN EN LEVADURA DE LA RUTA ONCOGÉNICA PI3K-PTEN-AKT

Otra de nuestras líneas de investigación está basada en la explotación de las características de S. cerevisiae como modelo biológico para estudiar patologías humanas, mediante la integración de módulos de señalización heterólogos en circuitos endógenos de la levadura. Existe una gran conservación funcional entre este microorganismo unicelular y las células de organismos superiores en lo que se refiere a procesos importantes para las funciones vitales de la célula y a las respuestas adaptativas a través de rutas de señalización. En este contexto, hace unos años conseguimos reconstituir en nuestro laboratorio una ruta oncogénica humana mediante la expresión de p110, la subunidad catalítica de la fosfatidilinositol-3-kinasa PI3K (Rodríquez-Escudero et al., 2005a) y de PKB/Akt, su principal quinasa efectora (Rodríquez-Escudero et al., 2009). La hiperactivación de estas proteínas proto-oncogénicas, que es característica de algunos tipos de tumores, se reproduce en la levadura generando un efecto letal, que es contrarrestado por la expresión del qen supresor de tumores PTEN (la PtdIns(3,4,5)P3-fosfatasa que cataliza la reacción inversa a PI3K) (Cid et al., 2008). Esto nos ha permitido utilizar este sistema sintético de levadura «humanizada» como una plataforma de ensayo in vivo en la que analizar de forma específica, sencilla y económica la actividad de los componentes de esa ruta y utilizarla

para la búsqueda de fármacos en rastreos de alto rendimiento (HTS). Hemos analizado alelos de PTEN asociados a tumores y otros síndromes, y realizado mutagénesis sistemáticas y al azar para anticipar mutaciones con potencial oncogénico en estas proteínas (Andrés-Pons et al., 2007, Rodríguez-Escudero et al., 2011a). Para poder realizar estos trabajos de carácter transversal hacia otras áreas de conocimiento, ha sido fundamental el establecimiento de colaboraciones con otros grupos de investigación, como la que mantenemos desde hace ocho años con el Dr. Rafael Pulido (actualmente en el Instituto de Investigación BioCruces, Bilbao) o, más recientemente, con la Fundación MEDINA (Centro de Excelencia en Investigación de Medicamentos Innovadores en Andalucia) para la realización de los rastreos farmacológicos de inhibidores de PI3K (Fernández-Acero et al., 2012), cuya identificación es otro de nuestros objetivos actuales.

### S. CEREVISIAE COMO MODELO DE CÉLULA HOSPEDADORA DE PATÓGENOS BACTERIANOS

Fue a finales de los años 90 cuando nos integramos con el grupo de patogenésis bacteriana del Dr. Rafael Rotger de nuestro mismo Departamento. Nuestra intención era demostrar la utilidad del sistema de levadura para la caracterización de proteínas de virulencia bacterianas que interfieren con la señalización de la célula hospedadora. En



39

esos momentos se estaban comenzando a conocer las estrategias que emplean los patógenos para invectar proteínas al citoplasma de sus células diana, a través de sistemas de secreción especializados que actúan como jeringas moleculares. Dado que las funciones con las que interfieren estas proteínas o efectores están especialmente relacionadas con la modulación de las rutas de transducción de señales, parecía posible mimetizar esta interacción aprovechando la conservación funcional de la levadura. Y así lo demostramos mediante la expresión en S. cerevisiae de algunos efectores de función conocida de Salmonella (SopE, v SptP) en nuestro trabajo pionero en esta línea de investigación (Rodríquez-Pachón et al., 2002). Tras poner a punto el sistema, hemos seguido trabajando con éxito en estudios similares con otros efectores menos conocidos, como SopB y SteC (Alemán et al., 2005; Rodríquez-Escudero et al., 2006, 2011b; Fernández-Piñar, et al., 2012) de esta misma bacteria, o de cepas enteropatógenas de Escherichia coli (Rodríquez-Escudero et al., 2005b). El interés despertado por esta herramienta celular nos ha llevado a establecer numerosas colaboraciones con investigadores tanto nacionales como internacionales que estudian la patogenicidad de diferentes bacterias patógenas, como Brett Finlay de la Univ. British Columbia (Vancouver), Francisco Ramos de la Universidad de Sevilla, Miguel Ángel Valvano y José Antonio Bengoechea, ambos actualmente en Queen's University (Belfast), Jaime Mota del ITQB (Lisboa) o Suzana Salcedo del IBCP (Lvon)

# **PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES**

- Alemán A, Rodríguez-Escudero I, Mallo GV, Cid VJ, Molina M, Rotger R. (2005) The amino-terminal non-catalytic region of *Salmonella typhimurium* SigD affects actin organization in yeast and mammalian cells. Cell Microbiol 7:1432-46.
- Andrés-Pons A, Rodríguez-Escudero I, Gil A, Blanco A, Vega A, Molina M, Pulido R, Cid VJ. (2007) In vivo functional analysis of the counterbalance of hyperactive phosphatidylinositol 3-kinase p110 catalytic oncoproteins by the tumor suppressor PTEN. Cancer Res 67:9731-9.
- Cid VJ, Rodríguez-Escudero I, Andrés-Pons A, Romá-Mateo C, Gil A, den Hertog J, Molina M, Pulido R. (2008) Assessment of PTEN tumor suppressor activity in nonmammalian models: the year of the yeast. Oncogene 27:5431-42.
- Fernández-Acero T, Rodríguez-Escudero I, Vicente F, Monteiro MC, Tormo JR, Cantizani J, Molina M, Cid VJ. (2012) A yeast-based in vivo bioassay to screen for class I phosphatidylinositol 3-kinase specific inhibitors. J Biomol Screen 17:1018-29.
- Fernandez-Piñar P, Alemán A, Sondek J, Dohlman HG, Molina M, Martín H. (2012) The Salmonella effector SteC inhibits Cdc42-mediated signaling through binding to the exchange factor Cdc24 in Saccharomyces cerevisiae. Mol Biol Cell 23:4430-43.
- Flández M, Cosano IC, Nombela C, Martín H, Molina M. (2004) Reciprocal regulation of Slt2 MAP kinase and isoforms of Msg5 dual-specificity protein phosphatase modulates the yeast cell integrity pathway. J Biol Chem 279:11027-34.
- **Groot PW de, Ruiz C, Vázquez de Aldana CR, et al.** (2001) A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Comp Funct Genomics 2:124-42.

- Jimenez-Sanchez M, Cid VJ, Molina M. (2007) Retrophosphorylation of Mkk1 and Mkk2 MAPKKs by the Slt2 MAPK in the yeast cell integrity pathway. J Biol Chem 282:31174-85.
- Marín MJ, Flández M, Bermejo C, Arroyo A, Martín H, Molina M. (2009)

  Different modulation of activity and output of yeast MAPKs by distinct stimuli and isoforms of the dual-specificity phosphatase Msg5.

  Mol Gen Genom 281:345-59.
- Martin H, Rodriguez-Pachon JM, Ruiz C, Nombela C, Molina M. (2000) Regulatory mechanisms for modulation of signalling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 275:1511-9.
- Martín H, Flández M, Nombela C, Molina M. (2005) Protein phosphatases in MAPK signalling: We keep learning from yeast. Mol Microbiol 58:6-16.
- Mascaraque V, Hernáez ML, Jiménez-Sánchez M, Hansen R, Gil C, Martín H, Cid VJ, Molina M. (2013) Phosphoproteomic analysis of protein kinase C signaling in Saccharomyces cerevisiae reveals Slt2 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent phosphorylation of eisosome core components. Mol Cell Proteomics 12:557-74.
- Palacios L, Dickinson RJ, Sacristán-Reviriego A, Didmon MP, Marín MJ, Martín H, Keyse SM, Molina M. (2011) Distinct docking mechanisms mediate interactions between the Msg5 phosphatase and mating or cell integrity mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 286:42037-50.
- Rodriguez-Escudero I, Roelants FM, Thorner J, Nombela C, Molina M, Cid VJ. (2005a) Reconstitution of the mammalian PI3K-PTEN-Akt pathway in yeast. Biochem J 390:613-23.
- Rodríguez-Escudero I, Hardwidge PR, Nombela C, Cid VJ, Finlay BB, Molina, M. (2005b) Enteropathogenic *Escherichia coli* type III effectors alter cytoskeletal function and signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology 151:2933-2945.
- Rodríguez-Escudero I, Rotger R, Cid VJ, Molina M. (2006) Inhibition of Cdc42-dependent signalling in *Saccharomyces cerevisiae* by phosphatase-dead SigD/SopB from *Salmonella typhimurium*. Microbiology 152:3437-52.
- Rodríguez-Escudero I, Andrés-Pons A, Pulido R, Molina M, Cid VJ. (2009) Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of mammalian protein kinase B/Akt in *Saccharomyces cerevisiae*, an *in vivo* model for the functional study of Akt mutations. J Biol Chem 284:13373-83.
- Rodríguez-Escudero I, Oliver MD, Andrés-Pons A, Molina M, Cid VJ, Pulido R. (2011a) A comprehensive functional analysis of PTEN mutations: implications in tumor- and autism-related syndromes. Hum Mol Genet 20:4132-42.
- Rodríguez-Escudero I, Ferrer NL, Rotger R, Cid VJ, Molina M. (2011b) Interaction of the *Salmonella* effector protein SopB with host cell Cdc42 is involved in intracellular replication. Mol Microbiol 80:1220-40.
- Rodríguez-Pachón JM, Martín H, North G, Rotger R, Nombela C, Molina M. (2002) A novel connection between the yeast Cdc42 GTPase and the Slt2-mediated cell integrity pathway identified through the effect of secreted Salmonella GTPase modulators. J Biol Chem 277:27094-102.
- Sacristán-Reviriego A, Madrid M, Cansado J, Martín H, Molina M. (2014) A conserved non-canonical docking mechanism regulates binding of dual specificity phosphatases to cell integrity MAPKs in budding and fission yeasts. PLoS One 9:e85390.
- Soler M, Plovins A, Martin H, Molina M, Nombela C. (1995) Characterization of domains in the yeast MAP kinase Slt2 (Mpk1) required for functional activity and in vivo interaction with protein kinases Mkk1 and Mkk2. Mol Microbiol 17:833-42.
- Torres L, Martin H, Garcia-Saez MI, Arroyo J, Molina M, Sanchez M, Nombela C. (1991) A protein kinase gene complements the lytic phenotype of Saccharomyces cerevisiae lyt2 mutants. Mol Microbiol 5:2845-54.