

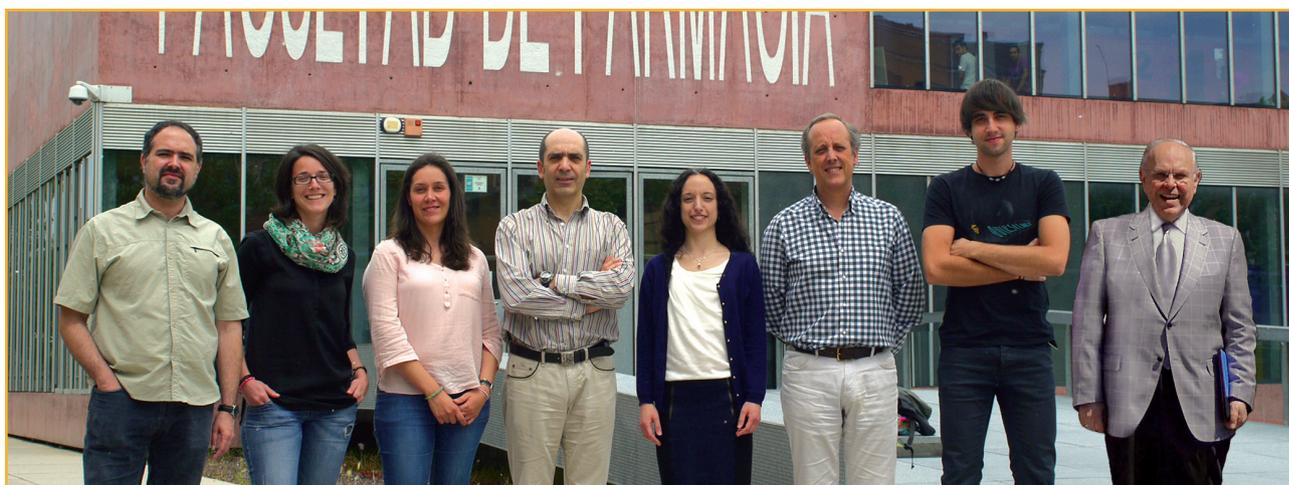
# Genómica Funcional de Levaduras

## Reguladores, efectores y rutas de señalización implicadas en la integridad celular

Raúl García, A. Belén Sanz, Sonia Díez-Muñiz, Enrique Bravo, Victoria Mascaraque, José Manuel Rodríguez-Peña, César Nombela y Javier Arroyo

Depart. de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid

jarroyo@ucm.es



**Foto de grupo.** Algunos miembros del grupo Grupo UCM-920640 (Genómica Funcional de Levaduras y Hongos). De izquierda a derecha: Raúl García, A. Belén Sanz, Sonia Díez-Muñiz, José Manuel Rodríguez-Peña, Victoria Mascaraque, Javier Arroyo, Enrique Bravo y César Nombela.

**N**uestro grupo (Grupo UCM-920640: Genómica Funcional de Levaduras y Hongos) posee una larga trayectoria de investigación en biología molecular y genómica funcional de levaduras y en particular en la caracterización de los procesos que regulan la integridad de la pared celular y la morfogénesis en *Saccharomyces cerevisiae*.

El principal objetivo de nuestra investigación se centra en la caracterización de nuevos elementos genéticos y mecanismos moleculares relevantes para la biogénesis y construcción de la pared celular fúngica, las rutas de transducción de señales que regulan el mantenimiento de la integridad de esta estructura, así como la maquinaria transcripcional necesaria para regular la expresión génica en respuesta a situaciones de estrés que comprometen la integridad celular.

Nuestro grupo también ha tenido un papel importante en el desarrollo de infraestructuras genómicas en el entorno de la Universidad Complutense (Javier Arroyo es Director del Centro de Genómica y Proteómica UCM/PCM; César Nombela es Director de la Cátedra Extraordinaria de Genómica y Proteómica UCM) y de proyectos de secuenciación y caracterización funcional de genomas fúngicos.

### RESPUESTAS DE ADAPTACIÓN A SITUACIONES DE ESTRÉS SOBRE LA PARED CELULAR

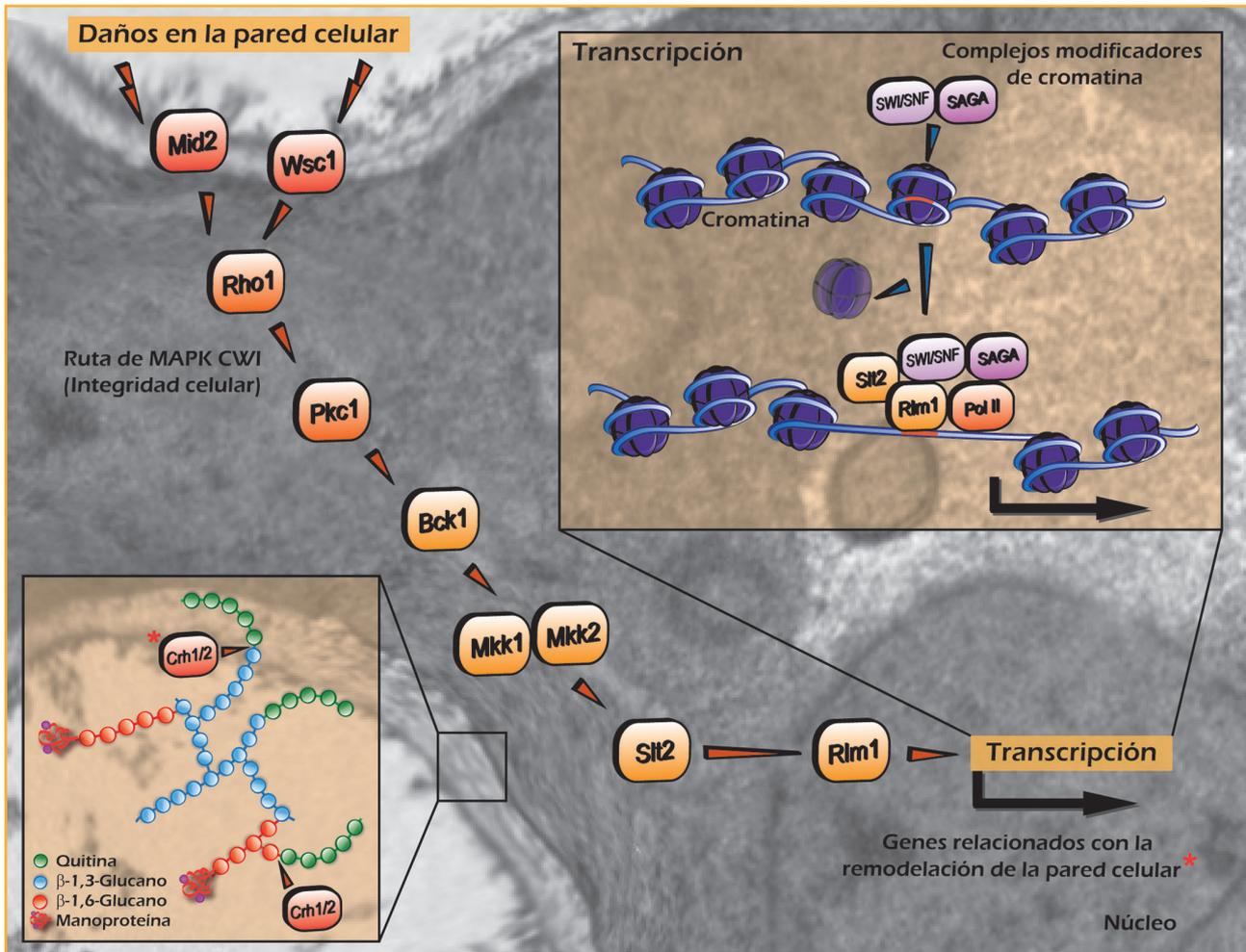
La pared celular fúngica es una estructura esencial, tanto para el mantenimiento de la morfología celular, como para

la protección de la célula frente a las diversas condiciones adversas del medio externo. Por ello, en situaciones de estrés que afectan a la integridad de esta estructura se induce, en *S. cerevisiae*, una respuesta transcripcional que tiene como consecuencia la remodelación de su pared celular, permitiendo a la célula sobrevivir en estas circunstancias. Nuestro laboratorio ha sido pionero en la caracterización de estas repuestas inducidas, tanto por drogas que interfieren con la construcción de la pared celular, como por mutaciones en genes importantes para su integridad (Arroyo *et al.*, 2009; Arroyo *et al.*, 2011; García *et al.*, 2004; García *et al.*, 2009). Estas repuestas implican principalmente genes relacionados con la remodelación de la pared celular, estrés, metabolismo y transducción de señales (Arroyo *et al.*, 2009).

La ruta de integridad celular o ruta CWI (Figura 1), mediada por la MAPK Slt2, a través del factor de transcripción Rlm1 y de distintos sensores dependiendo del tipo de daño, es la principal responsable de la de la activación

de estas repuestas transcripcionales (Arroyo *et al.*, 2009; Bermejo *et al.*, 2010; García *et al.*, 2004; Sanz *et al.*, 2012). Sin embargo, otras rutas de señalización por MAPK están también implicadas. Así, las repuestas de adaptación al estrés sobre la pared celular mediadas por actividades que degradan la red de  $\beta$ -1,3 glucano requieren de una conexión entre la ruta HOG (alta osmolaridad) y la ruta CWI (Bermejo *et al.*, 2008; García *et al.*, 2009; Rodríguez-Peña *et al.*, 2013; Rodríguez-Peña *et al.*, 2010).

Dado que estas repuestas se disparan en presencia de antifúngicos inhibidores de  $\beta$ -1,3-glucan-sintasa, la caracterización de los mecanismos moleculares implicados es fundamental, no solo para entender procesos biológicos básicos sobre la dinámica de la pared, sino para identificar potenciales dianas terapéuticas con la posibilidad de combinar terapias sinérgicas utilizando inhibidores de la síntesis de  $\beta$ -1,3-glucano, junto con fármacos que inhiban los mecanismos de adaptación. Además, la señalización



**Figura 1.** Respuestas de adaptación a través de la ruta CWI. La activación de la MAPK Slt2 induce la activación del factor de transcripción Rlm1 que recluta a los promotores de los genes regulados los complejos Swi/Snf y SAGA necesarios para la activación transcripcional. Una de las proteínas efectoras es Crh1, que junto con Crh2, es responsable de la unión covalente de la quitina al  $\beta$ -1,3 y al  $\beta$ -1,6 glucano en la pared celular.

mediada por la MAPK humana ERK5, ortólogo de Slr2, es clave en procesos de proliferación celular y en el desarrollo cardiovascular, lo que hace de esta ruta de señalización una diana altamente atractiva para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

### CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA A TRAVÉS DE LA RUTA DE MAPK DE INTEGRIDAD CELULAR (CWI)

La activación de la transcripción en situaciones de estrés es un proceso complejo que depende, no solo de los factores de transcripción regulados por las MAPKs, sino de la necesidad de remodelar la cromatina. El desarrollo de *screenings* transcripcionales, utilizando la colección completa de mutantes de *S. cerevisiae*, nos ha permitido identificar genes necesarios para la activación transcripcional a través de la ruta CWI, tanto en condiciones basales (Arias *et al.*, 2011) como en condiciones de estrés (Sanz *et al.*, 2012). Así, el complejo remodelador SWI/SNF y el acetilador de histonas SAGA participan en la regulación de la expresión génica a través de esta ruta. Swi/Snf es reclutado en condiciones de estrés por el factor de transcripción Rlm1 a las regiones promotoras de los genes regulados, donde promueve la desorganización de nucleosomas necesaria para que se produzca una respuesta adecuada (Sanz *et al.*, 2012). En estas condiciones, también se produce el reclutamiento de SAGA a estos promotores, siendo necesaria una colaboración entre ambos complejos (Figura 1).

### LAS PROTEÍNAS CRH Y EL «CROSSLINKING» QUITINA-GLUCANO EN LA PARED CELULAR

Uno de los principales efectos de estas respuestas de adaptación es la remodelación de la pared celular a través de proteínas efectoras. En el contexto de una colaboración científica desarrollada en los últimos años con los grupos del Dr. Enrico Cabib (NIDDK, NIH, Bethesda, MA, USA) y Vladimír Farkas (Academy of Sciences, Slovakia), hemos identificado y caracterizado funcionalmente la primera familia de proteínas fúngicas implicadas en el «crosslinking» entre polisacáridos de la pared celular, la familia Crh. Estas proteínas, Crh1 y Crh2, participan en el entrecruzamiento de dos polímeros esenciales de la pared: la quitina y el glucano (Figura 1). Hemos demostrado la actividad bioquímica transglicosilasa quitina-glucano de estas proteínas, tanto *in vivo* como *in vitro* (Cabib *et al.*, 2007; Cabib *et al.*, 2008; Mazan *et al.*, 2013). Esta actividad se induce en condiciones de estrés. En ausencia de Crh1 y Crh2, la quitina que se produce en las células no puede unirse covalentemente ni al  $\beta$ -1,3 ni al  $\beta$ -1,6 glucano, lo que conlleva problemas en la estabilidad de la pared. El correcto funcionamiento de este entrecruzamiento es necesario, no solo para el mantenimiento de la integridad celular en condiciones de estrés, sino para un perfecto ensamblaje de los componentes de la pared celular a lo largo del ciclo y la morfogénesis de la levadura (Blanco *et al.*, 2012; Cabib and Arroyo, 2013).

### PUBLICACIONES

- Arias P, Díez-Muñiz S, García R, Nombela C, Rodríguez-Peña JM y Arroyo J. (2011). Genome-wide survey of yeast mutations leading to activation of the yeast cell integrity MAPK pathway: novel insights into diverse MAPK outcomes. *BMC Genomics*. 12: 390.
- Arroyo J, Bermejo C, García R y Rodríguez-Peña JM. (2009). Genomics in the detection of damage in microbial systems: cell wall stress in yeast. *Clin Microbiol Infect*. 15 Suppl 1: 44-46.
- Arroyo J, Hutzler J, Bermejo C, Ragni E, García-Cantalejo J, Botías P, Piberger H, Schott A, Sanz AB y Strahl S. (2011). Functional and genomic analyses of blocked protein O-mannosylation in baker's yeast. *Mol Microbiol*. 79: 1529-1546.
- Bermejo C, García R, Straede A, Rodríguez-Peña JM, Nombela C, Heinisch JJ y Arroyo J. (2010). Characterization of sensor-specific stress response by transcriptional profiling of *wsc1* and *mid2* deletion strains and chimeric sensors in *Saccharomyces cerevisiae*. *OMICS*. 14: 679-688.
- Bermejo C, Rodríguez E, García R, Rodríguez-Peña JM, Rodríguez de la Concepción ML, Rivas C, Arias P, Nombela C, Posas F y Arroyo J. (2008). The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Mol Biol Cell*. 19: 1113-1124.
- Blanco N, Reidy M, Arroyo J y Cabib E. (2012). Cross-links in the cell wall of budding yeast control morphogenesis at the mother-bud neck. *J Cell Sci*. 125: 5781-5789.
- Cabib E y Arroyo J. (2013). How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall. *Nat Rev Microbiol*. 11: 648-655.
- Cabib E, Blanco N, Grau C, Rodríguez-Peña JM y Arroyo J. (2007). Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to beta(1-6) glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol*. 63: 921-935.
- Cabib E, Farkas V, Kosik O, Blanco N, Arroyo J y McPhie P. (2008). Assembly of the yeast cell wall. Crh1p and Crh2p act as transglycosylases *in vivo* and *in vitro*. *J Biol Chem*. 283: 29859-29872.
- García R, Bermejo C, Grau C, Perez R, Rodríguez-Peña JM, Francois J, Nombela C y Arroyo J. (2004). The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem*. 279: 15183-15195.
- García R, Rodríguez-Peña JM, Bermejo C, Nombela C y Arroyo J. (2009). The high osmotic response and cell wall integrity pathways cooperate to regulate transcriptional responses to zymolyase-induced cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 284: 10901-10911.
- Mazan M, Blanco N, Kovacova K, Firakova Z, Rehulka P, Farkas V y Arroyo J. (2013). A novel fluorescence assay and catalytic properties of Crh1 and Crh2 yeast cell wall transglycosylases. *Biochem J*. 455: 307-318.
- Rodríguez-Peña JM, Díez-Muñiz S, Bermejo C, Nombela C y Arroyo J. (2013). Activation of the yeast cell wall integrity MAPK pathway by zymolyase depends on protease and glucanase activities and requires the mucin-like protein Hkr1 but not Msb2. *FEBS Lett*. 587: 3675-3680.
- Rodríguez-Peña JM, García R, Nombela C y Arroyo J. (2010). The high-osmolarity glycerol (HOG) and cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay: a yeast dialogue between MAPK routes. *Yeast*. 27: 495-502.
- Sanz AB, García R, Rodríguez-Peña JM, Díez-Muñiz S, Nombela C, Peterson CL y Arroyo J. (2012). Chromatin remodeling by the SWI/SNF complex is essential for transcription mediated by the yeast cell wall integrity MAPK pathway. *Mol Biol Cell*. 23:2805-2817.