

## ¿Por qué secuenciar el genoma de *Tetrahymena*?

Juan Carlos Gutiérrez

Departamento de Microbiología III. Facultad de Biología. Universidad Complutense. 28040 Madrid.  
E-mail: juancar@bio.ucm.es

### ***Tetrahymena*: el microorganismo-modelo.**

El protozoo ciliado *Tetrahymena thermophila* constituye, junto con *Paramecium*, un microorganismo eucariota modelo dentro del grupo de los protozoos ciliados. La principal razón de ello es su elevado grado de "domesticación" en el laboratorio, junto con sus características genéticas. Las características más importantes que han hecho de este ciliado un microorganismo-modelo las podemos resumir en los siguientes puntos:

- **Su crecimiento.** Se puede cultivar en cultivo puro o axénico (tanto medio líquido como sólido) y en medio definido, lo cual es esencial para aislar mutantes auxótrofos. La densidad celular que se puede alcanzar en condiciones óptimas (32 °C) es del orden de  $10^6$  células/ml. Igualmente, se puede desarrollar el cultivo continuo, alcanzando niveles de biomasa muy superiores.

- **Su tamaño.** No es uno de los mayores ciliados que se conocen, pero es relativamente grande (40-50  $\mu$ m de longitud), lo que facilita la posibilidad de transformación por microinyección directamente en el macronúcleo. En la Figura 1 se muestra una micrografía obtenida por microscopía óptica de un cultivo de este microorganismo.

- **Su genoma.** Como todos los ciliados, presenta en el mismo recinto citoplasmático dos tipos de núcleos estructuralmente y funcionalmente diferentes (dimorfismo nuclear). El micronúcleo (2n) constituido por 5 pares de cromosomas metacéntricos (un número muy bajo en comparación con otros ciliados), puede sufrir mitosis y meiosis por lo que la segregación de genes micronucleares es típicamente mendeliana. Este núcleo representa la línea germinal ya que sólo interviene durante la conjugación, y no expresa su contenido durante el ciclo crecimiento-división. Por el contrario, el segundo núcleo denominado, por su mayor tamaño, macronúcleo (45n), el cual se origina a partir del micronúcleo durante la conjugación, es el transcripcionalmente activo durante toda la vida del microorganismo. Su ADN no se distribuye mitóticamente, sino que existe un reparto aproximado (amitosis) de su contenido poliploide durante la división entre las dos futuras células hijas. Por lo que, los elementos (moléculas subcromosómicas) del macronúcleo experimentan una segregación al azar (segregación fenotípica), fenómeno que a un genetista le podría recordar a la segre-

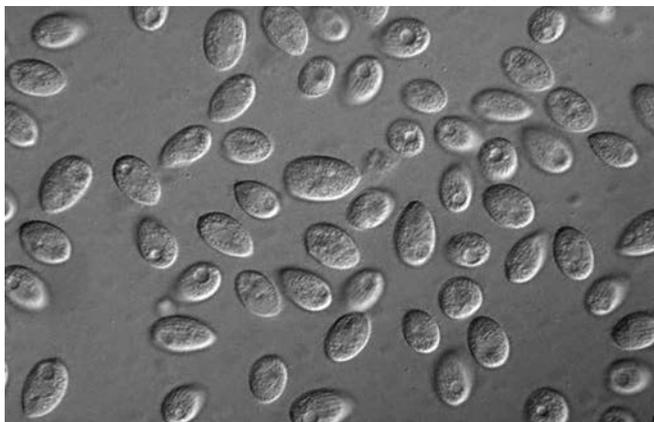


Figura 1. Células de *Tetrahymena thermophila*.

gación de plásmidos incompatibles en bacterias. Así, un heterocigoto Aa puede dar lugar, después de n divisiones, a líneas celulares separadas homocigotas AA y aa. Las piezas de ADN que constituyen el macronúcleo (unas 300 piezas autoreplicativas (ARPs) subcromosómicas acentroméricas) se pueden separar por electroforesis de campo pulsado. Y todas ellas tienen telómeros  $(G_4T_2)_{50-80}$  en ambos extremos.

- **Su ciclo biológico.** *Tetrahymena* presenta una biología típicamente eucariota. Su multiplicación es exclusivamente por bipartición transversal. La división celular acompaña un complejo proceso morfogénico, en donde se elabora la ciliación de las futuras células hijas. Además del ciclo crecimiento-división, este ciliado presenta un proceso sexual (conjugación) en donde se intercambian núcleos gaméticos (pronúcleos haploides) las dos células conjugantes. Del resultado de la conjugación derivan cuatro células (cariónidas) con nuevos macronúcleos y micronúcleos. Este proceso ha sido extensamente estudiado por numerosos ciliatólogos, siendo el proceso de conjugación mejor conocido (citológica y genéticamente) entre todos los ciliados [1]. La especie *T. thermophila* tiene siete tipos conjugantes (*mating types*) diferentes, y para conjugar ambos tipos celulares han de presentar tipos conjugantes distintos. La transformación del micronúcleo (2n) en el nuevo macronúcleo (45n), una vez se han fusionado los pronúcleos (n) derivados de cada célula conjugante, constituye uno de los procesos que más ha llamado la atención a los ciliatólogos moleculares, y consiste en una intensa reorganización del ADN (fragmentación en lugares especi-

ficos en los 5 pares de cromosomas micronucleares para originar las 300 piezas subcromosómicas o minicromosomas (ARPs), adición de telómeros en los extremos y amplificación para dar las 45 copias del macronúcleo).

• **Su avanzado análisis genético.** *Tetrahymena* es uno de los ciliados en que se han desarrollado mejores herramientas para el análisis genético: fácil aislamiento y caracterización de mutantes (dominantes y recesivos) obtenidos tras mutagénesis estándar, proceso de conjugación fácilmente inducible en el laboratorio y altamente sincrónico, posibilidad de inducción de alteraciones viables de la conjugación (citogamia, exclusión genómica, bloqueo de la fusión de los pronúcleos), que conlleva la obtención de homocigosis total a ambos niveles micro- y macronuclear, o la producción de heterocariontes (micro- y macronúcleo genéticamente distintos en la misma célula), fácil mantenimiento de mutaciones letales, cepas nulisómicas (pérdida de uno o más cromosomas) o *knockouts* en estado homocigoto en el micronúcleo, o la posibilidad de mapear o localizar genes en los 5 pares de cromosomas micronucleares utilizando cepas nulisómicas [2].

• **Su avanzado análisis molecular.** Podemos transformar *Tetrahymena* por electroporación, bombardeo biolístico o microinyección. El ADN transformante se puede introducir en el micronúcleo, el macronúcleo vegetativo o desarrollándose en la conjugación (esbozo macronuclear). Se pueden construir vectores plasmídicos utilizando el ADNr macronuclear (esta molécula está representada en 9.000 copias/macronúcleo). Se puede sobre-expresar genes, ya utilizando vectores de alto número de copias como utilizando promotores inducibles de metalotioneínas (exponiendo a la célula a un metal pesado como el Cd), pudiendo incrementar la expresión génica en un rango de unas 1.000 veces. Un novedoso método, desarrollado en *T. thermophila*, hace posible la construcción y utilización de ribosomas con ARN antisentido, frente a un determinado ARNm insertado en el ARNr 26S, y no alterando la funcionalidad del ribosoma. Lo que facilita la evaluación de la no expresión de dicho gen (esencial o no para la célula).

### Participación de *Tetrahymena* en descubrimientos fundamentales.

Como una consecuencia de ser un microorganismo-modelo, ampliamente utilizado en múltiples áreas de la Biología, *Tetrahymena* ha sido el protagonista único en el desarrollo de descubrimientos fundamentales o hitos realmente relevan-

tes en Biología. Estos son algunos de ellos:

- Fue el primer microorganismo eucariota en el que se desarrolló la inducción de cultivos sincrónicos, facilitando el análisis de las diferentes fases del ciclo celular eucariota [3].
- Fue uno de los sistemas vivos que participó en el descubrimiento de los lisosomas y peroxisomas [4].
- Ha sido un modelo para la identificación y purificación de los diferentes componentes de un motor celular eucariota (el cilio, base de la movilidad de los ciliados).
- Fue el sistema vivo pionero en el estudio de los telómeros, la enzima telomerasa (la primera retro-transcriptasa eucariota descubierta) y la función de los telómeros en la senescencia celular [5].
- En este ciliado se descubrió, por primera vez, la capacidad autocatalítica del ARN (ribozimas), lo que le valió a Thomas R. Cech el premio Nobel de Química en 1989. De tal manera, que los intrones del grupo I de *Tetrahymena* constituyen actualmente una de las cinco clases de ribozimas descritas (con autocatálisis intramolecular o en *cis*). Se cree que, en el futuro, una de las posibles aplicaciones de las ribozimas sea la terapia génica, inhibiendo la expresión temprana de virus oncogénicos de ADN.
- El descubrimiento, relativamente reciente, de la función de la acetilación de histonas en la expresión génica se debe a estudios realizados en este ciliado [6].

### Características únicas de *Tetrahymena* a ser explotadas en un futuro.

Otras características de *Tetrahymena* que hacen de este ciliado una herramienta extremadamente útil y relevante en el futuro desarrollo de diversas áreas biológicas son:

- Su utilización en la biomonitorización de un medio acuático (como bioindicador de la presencia de contaminantes). Este ciliado se ha utilizado en la evaluación de más de 2.000 compuestos potencialmente tóxicos para el ser humano originados por diferentes procesos industriales. Al ser un microorganismo sin pared celular en estado vegetativo, su sensibilidad frente a agentes xenobióticos es mayor que cualquier microorganismo eucariota con pared celular. *Tetrahymena* es uno de los pocos microorganismos eucariotas, junto con las bacterias, en que se ha descrito mejor la aclimatación a solventes orgánicos, por lo que ofrece una oportunidad única para el estudio de dicha aclimatación. Es un excelente modelo eucariota para estudiar el estrés causado por metales pesados (sistema idóneo, por la posibilidad de análisis

genético y rápido crecimiento, en estudios ecotoxicológicos y genotoxicidad). Sus metalotioneinas (proteínas queladoras de metal pesado) son inusualmente ricas en residuos de cisteína (dominios de quelación), por lo que podrían servir como elementos en la construcción de biosensores moleculares para metales pesados [7].

• *Tetrahymena* es el hospedador natural de la bacteria patógena *Legionella*. La ruta fagocítica es reprogramada por la bacteria de una manera similar a aquella que ocurre en los macrófagos humanos. Esto hace que el binomio *Tetrahymena/ Legionella* pueda ser una magnífica oportunidad para estudiar los factores genéticos de ambos (hospedador y bacteria) involucrados en la patogenicidad bacteriana. Este ciliado es, igualmente, un potencial hábitat celular para la formación de numerosos reservorios para diversas bacterias patógenas, por lo que es un modelo excelente para desarrollar estrategias que prevengan la entrada de patógenos que reprograman la ruta fagocítica.

• Tanto en *Tetrahymena* como en *Paramecium* el ATP es un quimiorepelente. Los ciliados son los únicos microorganismos eucariotas que muestran receptores para ATP, los cuales presentan una reacción cruzada con anticuerpos frente a receptores de ATP (que al mismo tiempo son los receptores del dolor) de vertebrados [8]. Por lo tanto, este ciliado constituye una buena oportunidad para estudiar la transducción celular sensorial y las rutas de transducción de señal. Este protista responde a la morfina, la insulina e histamina, y el opioide  $\beta$ -endorfina afecta a la fagocitosis. *Tetrahymena* posee proteínas G, componentes de la ruta del inositol fosfolípido, protein-kinasas, sistemas adenilato ciclasa/AMPC, guanilato ciclasa/GMPc, sistemas calcio-calmodulina y óxido nítrico. En resumen, este ciliado constituye un modelo microbiano para el estudio de la inflamación, receptores del dolor, el efecto de hormonas y otros mecanismos de transducción de señal, junto con el efecto de fármacos naturales o sintéticos sobre sistemas de transducción de señal. Por todo ello, es potencialmente importante en aplicaciones farmacéuticas y biotecnológicas.

Estas son algunas de las características únicas que hacen de este ciliado un microorganismo eucariota digno de ser considerado como protagonista de un futuro proyecto de secuenciación del genoma.

---

### **Proyectos piloto de secuenciación del genoma-macronuclear *Tetrahymena/ Paramecium*: la sorpresa.**

Actualmente, existen sólo dos genomas micro-

bios eucariotas completamente secuenciados; el primero fue el de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (sobre 1997-98) y el segundo ha sido completado este año (2002) en otra levadura, *Schizosaccharomyces pombe*, lo que demuestra el merecido poder de la comunidad de científicos dedicados al estudio de estos microorganismos. Igualmente, está ya muy avanzado el genoma del protozoo parásito *Plasmodium falciparum* (de interés obvio por ser el causante de la malaria). Además, existen más de una docena de proyectos de secuenciación de genomas en otros microorganismos eucariotas, algunos de los cuales son: *Leishmania*, *Giardia*, *Trypanosoma* o *Entamoeba* (todos ellos parásitos), junto con *Candida*, *Aspergillus* o *Neurospora*, entre otros. Pero entre todos ellos no encontramos todavía a ningún protozoo ciliado. Los dos mejores candidatos para abordar proyectos similares son *Tetrahymena thermophila* y/o *Paramecium*, aunque personalmente, por las múltiples razones anteriormente expuestas, pienso que el primero es un candidato más idóneo que el segundo. En ambos casos, el tamaño estimado del genoma macronuclear ha secuenciado es del orden de unas 200 Mb, similar al tamaño del genoma de la mosca del vinagre (*Drosophila*), un orden de magnitud superior al de *Saccharomyces* y unas quince veces inferior al del ser humano. A pesar de la ardua tarea que implica abordar este proyecto de secuenciación, que necesariamente implicaría la participación de varios grupos de diferentes países, junto con una buena financiación, se han llevado a cabo dos modestos proyectos piloto en ambos ciliados. El primero comenzó en 1999 en *Paramecium*, y el coordinador de los 12 grupos que participaron en este mini-proyecto fue el Dr. J. Cohen (Francia). En este proyecto se trataba de identificar y secuenciar el máximo número posible de genes macronucleares de este ciliado, para lo que se transformaron (por microinyección) una serie de cepas mutantes con diferentes fragmentos de ADN macronuclear (digestiones con varias endonucleasas), identificando por complementación la mezcla de fragmentos que lleva el gen que revierte el fenotipo mutante a silvestre, y tras fraccionación (por tamaños) de dicha mezcla se llevó a cabo la clonación de la sub-fracción y se seleccionó el clon que recupera el fenotipo silvestre. Pues bien, se obtuvo una genoteca formada por fragmentos de ADN macronuclear de un rango de 6 a 12 Kb, y con unas 3.139 secuencias codificantes de un tamaño promedio de 500 pb. Como en este ciliado hay pocos y pequeños intrones, es como secuenciar una genoteca de ADNc. Al descartarse las secuencias menores de 100 pb, el número de

secuencias se redujo a 2.990, lo que representaría una proporción del genoma del 1-2% (1,5 Mb). De todas ellas, tras su secuenciación, se identificaron unas 726 de las cuales 4 codificaban para diferentes ARNs (ARNt / ARNr) y el resto (722) para proteínas, de las cuales 9 eran genes conocidos en *Paramecium* (existentes ya en bases de datos), mientras los 713 restantes contenían marcos abiertos de lectura (ORFs) completamente nuevos [9]. Todos los cuales, de forma provisional, se han clasificado en diversas categorías funcionales, así, por ejemplo, hay 64 involucrados en el transporte celular, 82 en crecimiento, 33 en el balance iónico, etc. La sorpresa fue encontrar que muchas de las proteínas codificadas por estos genes de *Paramecium* presentan una mayor similitud con las correspondientes de los seres humanos, mientras que en otro microorganismo eucariota (con genoma completamente secuenciado) como es *Saccharomyces*, esas mismas proteínas son menos similares. Esta sorpresa (agradable para los ciliatólogos) se confirmó en el segundo proyecto-piloto, desarrollado en *Tetrahymena thermophila*. En el cual participaron sólo 4 grupos (EEUU y Canadá), y se llevó a cabo la secuenciación de varias genotecas de ADNc [10]. De los 157 clones secuenciados, el 17% se identificaron con secuencias de genes conocidos de *Tetrahymena* ya existentes en bancos de datos, mientras que un 52% del total encontraban similitud con otros organismos. Entre estas últimas, el 95% de las mismas fueron similares a proteínas humanas, y el 11% de ellas no se encontraban en otros microorganismos eucariotas (incluyendo *Saccharomyces*). En resumen, estos genes específicos de multicelularidad se presentan tanto en *Tetrahymena* como *Paramecium*, pero no así en otros microorganismos eucariotas como las levaduras.

Los protozoos ciliados surgieron hace unos 1.000 millones de años (era Proterozoica, eón Precámbrico), son más antiguos que los hongos (incluyendo las levaduras). Si recordamos el árbol filogenético de los eucariotas elaborado usando el ARNr, podemos ver que pudo existir un ancestro común para los ciliados y, por otra parte, los hongos, animales y plantas. Por lo que, los genes de multicelularidad (de biología animal) pudieran haber surgido en ese ancestro común, manteniéndose en los ciliados y perdiéndose en otros microorganismos eucariotas (las levaduras han perdido estructuras comunes en metazoos, como los centriolos). En cualquier caso, poseemos (en los ciliados) una magnífica oportunidad de atribuir funciones (genómica funcional) a muchos genes presentes igualmente en el ser humano y que se desconoce aún su función. Esta es una de las prin-

cipales razones que podemos argumentar en defensa de un futuro proyecto de secuenciación completa de genoma macronuclear de *Tetrahymena*. El propulsor más entusiasta de este gran proyecto es el Dr. E. Orias (EEUU), con el que nuestro grupo participa actualmente en un mini-proyecto sobre aislamiento y caracterización de genes de *Tetrahymena* involucrados en múltiples formas de estrés celular, lo que contribuirá, igualmente, al conocimiento del genoma macronuclear de *Tetrahymena*. Esperemos que la propuesta de la secuenciación del genoma de *Tetrahymena* (apoyada por numerosos grupos de diversos países) se haga realidad en un próximo futuro.

### Bibliografía.

- Orias E. Ciliate Conjugation. En: Gall JG (ed.) The Molecular Biology of Ciliate Protozoa. Academic Press, Inc. Orlando, 1986. pp. 45-84.
- Gutiérrez JC, Orias E. (1992) Genetic characterization of *Tetrahymena thermophila* mutants unable to secrete capsules. *Developmental Genetics*. 13:160-166.
- Zeuthen E. (1958). Artificial and induced periodicity in living cells. *Adv. Biol. Med. Phys.* 6:37-73.
- Muller M, Baudhuin P, De Duve C. (1966). Lysosomes in *Tetrahymena pyriformis* I. Some properties and lysosomal localization of acid hydrolases. *J. Cell Physiol.* 68:165-175.
- Greider CW, Blackburn EH (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell*. 43:405-413.
- Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD. (1996). *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*. 84:843-851.
- Gutiérrez JC, Díaz S, Benítez L, Martín-González A. (2001). Ciliated protozoa metallothioneins as biomarkers of heavy metal pollution. *Biomarkers' 2001*. (Portugal).
- Kim MY, Kuruville HG, Ragu S, Hennessey TM. (1999). ATP reception and chemosensory adaptation in *Tetrahymena thermophila*. *J. Exp. Biol.* 202: 407- 417.
- Dessen P, Zagulski M, Gromadka R, Plattner H, Kissmehl R, Meyer E, Bétermier M, Schultz JE, Linder JU, Pearlman RE, Kung C, Forney J, Satir BH, Van Houten JL, Keller A-M, Froissard M, Sperling L, Cohen J. (2001). *Paramecium* genome survey: a pilot project. *TIG*. 17:306-308.
- Fillingham JS, Chilcoat ND, Turkewitz AP, Orias E, Reith M, Pearlman RE. (2002). Analysis of expressed sequence tags (ESTs) in the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*; matches to human proteins of unknown function. *J. Euk. Microbiol.* (en prensa).