

INSTITUTO DE ESPAÑA
REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

**SEÑALES Y RESPUESTAS CELULARES
EN MICROORGANISMOS
EUCARIÓTICOS: GLOBALIZACIÓN
Y REPROGRAMACIÓN DE SISTEMAS**

DISCURSO DEL
EXCMO. SR. D. CÉSAR NOMBELA CANO

LEÍDO EN LA SESIÓN DEL DÍA 25 DE OCTUBRE DE 2007
PARA SU INGRESO COMO ACADÉMICO DE NÚMERO

Y CONTESTACIÓN DEL
EXCMO. SR. D. JULIO RODRÍGUEZ VILLANUEVA



MADRID 2007

Depósito legal: M. 45.187-2007

Imprime: REALIGRAF, S. A.
Pedro Tezano, 26
28039 Madrid

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 5 |
| De Pasteur a Schrödinger; entender la vida | 8 |
| Múltiples facetas del valor actual de los estudios microbianos | 11 |
| LA VIDA MICROBIANA, SOPORTE DE LA BIOSFERA | 15 |
| La vida microbiana, instrumento y base fundamental del conocimiento biológico | 19 |
| De los Sistemas Microbianos a la Microbiología de Sistemas | 20 |
| Impacto del conocimiento microbiológico en la fenomenología biológica | 21 |
| El árbol de la vida: un tronco y sus raíces microbianas | 24 |
| Sistemas microbianos eucarióticos | 26 |
| Las levaduras y “la levadura”: un estilo de vida y un aliado del investigador | 27 |
| UN SALTO GENÓMICO: LA VIDA CON 6000 GENES | 31 |
| LA CÉLULA DE LEVADURA EN SU MEDIO: DESARROLLO Y SUPERVIVENCIA | 35 |
| Generación de una interfase celular con el ambiente: la pared celular | 35 |
| Cómo abordar la biogénesis de la pared celular de la levadura | 36 |
| La MAP quinasa Slr2: un hallazgo inesperado que desvela claves de la integridad celular en levaduras | 38 |
| MAP quinastas de integridad celular: Slr2, Mkc1 y otras | 41 |
| LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE INTEGRIDAD CELULAR DE LA LEVADURA: CAMBIAR EN RESPUESTA AL CAMBIO | 45 |
| Arquitectura de los circuitos regulatorios controlados por MAP quinastas (MAPKs) | 47 |
| Integrantes de la ruta de señalización de IC | 49 |

| | |
|---|------------|
| Activación de la ruta de IC: del ciclo celular a la respuesta frente a emergencias | 53 |
| Reparación del daño producido en la superficie celular: análisis genómico de la activación de la ruta de IC | 55 |
| Proteínas de Integridad Celular | 58 |
| También se encuentran proteínas inesperadas en la superficie celular | 61 |
| PATOGENICIDAD DE HONGOS: FENÓMENOS DE SUPERFICIE Y RESPUESTAS CELULARES DEL PATÓGENO | 63 |
| Infección oportunista | 65 |
| Modelo experimental | 66 |
| Patogenicidad y virulencia | 67 |
| La superficie celular, interfase entre patógeno y hospedador | 68 |
| Transmisión de señales controlada por MAP-quinasas en <i>C. albicans</i> : percepción de estrés y respuestas frente al hospedador | 71 |
| GLOBALIZACIÓN Y REPROGRAMACIÓN DE SISTEMAS | 75 |
| La fosforilación de proteínas, un elemento clave de la señalización | 78 |
| Señales en bacterias | 78 |
| Las señales en hongos y mamíferos | 79 |
| Receptores, activación de señales y respuestas | 80 |
| Soportes para incorporar los bloques de quinasas que integran el módulo de fosforilación | 81 |
| Utilización de componentes comunes | 82 |
| Naturaleza combinatoria de las vías de transmisión de señales | 82 |
| Sistemas reprogramables | 85 |
| <i>Salmonella</i> , ¿patógeno de levadura? | 88 |
| Reprogramación letal, ¿qué hay de la acción antifúngica? | 90 |
| La búsqueda de antifúngicos debe continuar | 93 |
| COMENTARIOS FINALES: LA AGENDA POST-GENÓMICA ... | 95 |
| BIBLIOGRAFÍA CITADA | 99 |
| DISCURSO DE CONTESTACIÓN POR EL EXCELENTÍSIMO SEÑOR DON JULIO RODRÍGUEZ VILLANUEVA | 107 |

INTRODUCCIÓN

*Excelentísima Señora Presidenta
Excelentísimos Señores y Señoras Académicos
Señoras y Señores*

Supone para mí una especial satisfacción el ser admitido como Académico de Número en esta Real Corporación, sentimiento de satisfacción que se acrecienta por el hecho de que mi ingreso tenga lugar en presencia de todos ustedes. Si algo caracteriza a un ambiente académico es la ambición intelectual, el rigor y la exigencia por avanzar en el conocimiento, y el debate sereno entre aquellos que están unidos en afanes comunes por el progreso de la Ciencia, sin otra jerarquía que la que procede del saber. Yo espero, desde hoy, poder unir mis esfuerzos a los de quienes, a diario, hacen posible la tarea de la Real Academia Nacional de Farmacia, al servicio de la sociedad y en función de su competencia y compromiso con el ancho mundo de las Ciencias Farmacéuticas.

Soy consciente de que he sido elegido para la medalla que desempeñó el Profesor Domingo Espinós Pérez; mi predecesor fue un médico y un extraordinario profesor de Medicina. El recuerdo personal que de él tengo, me trae la memoria de un hombre cordial, un universitario dedicado y un académico muy querido en esta casa. Excede de las posibilidades razonables el que yo intente, si quiera, glosar su extensa trayectoria, tan fecun-

da en la práctica de la Medicina y en su proyección docente. Ha dejado un envidiable legado, que se hace realidad en su extensísima obra escrita, así como en la formación de una escuela que continúa su labor. El tratado de Medicina Interna, de Espinós y Díaz Rubio, como editores científicos, es una obra de referencia para la formación de muchas promociones. Las publicaciones especializadas, suponen un conjunto magnífico de aportaciones a diversos aspectos de la patología humana, desde las hemoglobinopatías, hasta las enfermedades respiratorias. Supo compaginar su dedicación a la docencia habitual, con una intensa participación en cursos y conferencias de toda índole. Su actividad universitaria tuvo prolongación natural en las Reales Academias de Farmacia y Medicina, en las que dejó un gran vacío con su marcha, tan prematura.

Vaya para su esposa, María Teresa, a quien agradezco que me haya facilitado la preparación de esta semblanza, y para todos sus hijos, el testimonio del aprecio de este académico que tendrá siempre el recuerdo de su predecesor.

Igualmente obligado es que dé cuenta también de la gratitud que debo a quienes han hecho posible que hoy pueda ocupar esta tribuna. Quisiera que la densidad de lo que exprese compense la brevedad imperativa de lo expresado.

Quien deseó con mayor intensidad mi ingreso en esta casa, fue mi tío, el Profesor D. César González, maestro de varias generaciones de farmacéuticos y profesores de Farmacognosia —promotor de la transición a la Farmacología—, hombre de saber enciclopédico y académico de pro en esta Academia, al igual que en la de Medicina.

Tengo una deuda de especial gratitud con los académicos que presentaron mi candidatura, los profesores Mariano Esteban, Antonio Martínez y, mi maestro, el Profesor Julio Rodríguez Villanueva, que ha accedido a responder a mis palabras. Parafraseando al poeta Lostalé, “de su mano pude empezar a caminar por el horizonte”, el de la dedicación a la Ciencia y a la Universidad, y también encontrar posterior guía en mi otro maestro, el Profesor Severo Ochoa.

Siento que mi trayectoria profesional ha sido un privilegio, un don; tengo muy presente que, si soy como persona, es gracias a todo lo compartido con otros. Con mis compañeros de estudios; con todos los miembros del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia, de nuestra Universidad Complutense, en donde ocupó la que fue la primera cátedra de Microbiología de la Universidad española, creada ya en 1900, en pleno auge de los estudios sobre los microbios. Con ellos, el trabajo docente e investigador de cada día, se convierte en una estimulante aventura intelectual. Como lo fue el trabajar para el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), junto a personas de extraordinaria calidad humana y competencia profesional. Valoro igualmente la amistad y el aprecio de mis colegas microbiólogos, aprendí mucho cooperando con ellos en el desarrollo de nuestra disciplina, en asociaciones científicas en España y en Europa. Mi reconocimiento, también, muy especial a las empresas del sector farmacéutico que valoraron nuestro trabajo y a los sectores de la Administración sanitaria con los que pude colaborar.

Doy gracias a Dios por todo ello, consciente de que mi anclaje de hombre libre, ciudadano del mundo, lo tengo a través de España, mi patria, con cuyo futuro y el de sus ciudadanos me siento comprometido. Resumiré mis emociones en estos momentos, en el recuerdo de mis padres, Ramón y Carmen, y en lo que para mí significa el compartir mi existencia con Nohelly, mi mujer, la madre de mis hijos.

El poeta José García Nieto, ingresaba en la Real Academia Española, en 1982, con un discurso titulado “Nuevo Elogio de la Lengua Española”. Expresaba su emoción con hondura –Hoy he puesto mi mano, como otros días/ como otras noches, como otras madrugadas/ en el papel/ y mi mano temblaba... Así, se expresaba quien llevaba a la Academia su quehacer poético.

Yo también he creído que hoy —en medio de tantas emociones— había de decir para ustedes algo de lo que ha sido mi quehacer, en muchos años de investigación microbiológica, junto con tantos colaboradores y compañeros. Nos ha interesado profundizar en las señales y respuestas celulares, en microorganismos eucarióticos, para entender su comportamiento y para pro-

yectarlo en las cuestiones que son relevantes para los microbiólogos. En nuestro grupo, incorporamos esas tradiciones y tratamos de hacer una investigación abierta al futuro.

De Pasteur a Schrödinger; entender la vida

La célebre afirmación de Louis Pasteur “*los microbios tienen la última palabra*”, ha seguido citándose como una de esas formulaciones que en Ciencia acabaron resultando proféticas. Pronunciada en medio de polémicas científicas, propias del siglo XIX, sobre la existencia y actividades características de la vida microbiana, se puede decir que sirvió de pórtico para un gran capítulo de avances en el conocimiento de los fenómenos biológicos en general. Los estudios iniciales abordados por la gran escuela pasteuriana, junto con otros científicos de relevancia, se orientaban en buena medida a la solución de problemas; había que resolver las enfermedades infecciosas o las alteraciones de productos alimentarios y bebidas. Pero, la consolidación científica de la investigación microbiana estuvo impregnada de un notable interés por las cuestiones del conocimiento fundamental. En la resolución de la polémica sobre la generación espontánea, que Pasteur zanjó definitivamente, estaba en juego ciertamente la conservación de productos de interés. Pero, responder a la pregunta —¿es posible la generación de formas de vida elementales a partir de la materia inanimada?— era el acicate intelectual que movió a los científicos a plantear demostraciones definitivas. En pleno desarrollo de la Ciencia empírica, que exigía experiencias claras como base para las afirmaciones sobre el mundo físico, avanzaron los estudios microbianos y se situaron definitivamente en a posición central que ocupan en las Ciencias de la Vida.

La “*palabra de los microbios*” ha seguido siendo elocuente desde entonces. Primero, porque las respuestas a las preguntas que los científicos se hicieron, sobre los agentes infecciosos, su acción patógena y su control, han tenido como resultado la consolidación de la Microbiología como una disciplina biológica y biomédica fundamental, con amplias e imprescindibles aplicaciones. Pero, también, porque de su manejo experimental han

ido surgiendo ideas, conceptos y paradigmas, que alimentan el progreso del conocimiento de la vida.

Los estudios con microorganismos volvieron a tener mucho que decir cuando, en el siglo XX, se plantea una pregunta fundamental que habría de propiciar importantes aproximaciones experimentales para responderla. Qué es la vida, constituye esa pregunta fundamental, que surge en buena medida desde el ámbito de la Física. Erwin Schrödinger, había sido protagonista del desarrollo de las ideas propias de la Física cuántica, las que componen lo que se ha denominado “realismo no clásico” (10), un edificio científico basado en el principio de incertidumbre, el análisis probabilístico de los fenómenos y la importancia del observador en los fenómenos observados. En 1944 Schrödinger recogió una serie de planteamientos de gran originalidad en un libro así titulado, ¿Qué es la vida?

La vida parece ser el comportamiento ordenado y reglamentado de la materia, que no está asentado exclusivamente en su tendencia a pasar del orden al desorden, sino basado en parte en un orden preexistente que es mantenido.

Esta formulación de Schrödinger, globalizadora del concepto de lo viviente, en función de una característica de honda significación física —orden que se mantiene frente al caos, y se propaga— habría de tener una notable influencia en el pensamiento científico, porque fue, sin duda, la que impulsó el desarrollo de la Biología Molecular. Pero, si hago referencia al gran físico, es porque la vía microbiana, como objeto de abordaje de los fenómenos de la vida, resultó esencial para un progreso sin precedentes en el conocimiento de lo vivo. Ampliemos más adelante esta idea, pero debe quedar constancia de que los sistemas microbianos han sido fundamentales para elaborar respuestas a la pregunta subsiguiente: ¿En qué consiste este *orden*, o, cómo se ordenan los procesos vitales? La palabra clave que emerge es *regulación*, el orden se basa en la regulación de los sistemas. Y todo ello implica una *programación* y unos procesos de *comunicación*, que se materializan en la transmisión de *señales* las cuales se traducen en *respuestas* celulares. Son ya más de seis décadas, el período en el que el conocimien-

to de los fenómenos biológicos se basa en abordar la programación de los organismos vivos, así como los detalles de la ejecución del programa, es decir, en profundizar en fenómenos regulatorios. El conocimiento actual revela la complejidad de los circuitos de regulación, así como la forma en que la programación de los vivientes está abierta a la novedad, al cambio; el mantenimiento del orden, implica respuestas al cambio y capacidad de evolucionar.

Las tecnologías de gran escala, de reciente desarrollo, es decir, los análisis de grandes conjuntos de genes, proteínas, metabolitos y funciones propician una aproximación nueva a conocimiento de los seres vivos, que es la de la interpretación de su naturaleza a través de la integración de datos y observaciones sobre los elementos que de ellos forman parte. De ahí que hablemos de sistemas. El análisis detallado de algunos componentes (genes, proteínas, metabolitos), de sus características y su funcionalidad, es decir, la aproximación reduccionista, basada en la caracterización detallada de componentes de las células, ha propiciado éxitos indudables. Hoy, sin embargo, cabe buscar una integración de todos esos datos y observaciones, para el conocimiento global de los sistemas. Y entre las cuestiones que surgen de esos planteamientos está la similitud (homología), y el grado que alcanza, de los integrantes de los circuitos regulatorios y el propio diseño de los mismos. La conclusión es que hay una globalización de los sistemas biológicos. Del conocimiento de su programación cabe plantear la reprogramación de los sistemas, incluso emplear componentes de unos para reorganizar los otros. De ahí que haya cobrado todo su valor el planteamiento de la Biotecnología moderna, a través de la cual el conocimiento biológico propicia la “intervención” biotecnológica, base fundamental de tantas aplicaciones, especialmente, entre otras, en la producción y aplicación de medicamentos.

En este texto pretendemos dar cuenta de avances recientes acerca de fenómenos de comunicación, en células de microorganismos eucarióticos. El trabajo de investigación de nuestro grupo, junto con el de otros grupos de investigadores, nos ha permitido caracterizar determinados circuitos regulatorios, que operan a través de señales, las cuales determinan respuestas celulares.

Todo ello nos revela aspectos de una programación, inherente a la naturaleza de estas células, que puede modificarse mediante las tecnologías que han hecho posible la aludida intervención biotecnológica, basada en la modificación permanente de la programación celular. La exploración científica de estas cuestiones resulta fascinante en los tiempos actuales, por la amplitud y profundidad que permiten las nuevas tecnologías. Pero la crónica de nuestros hallazgos, enmarcada en el conjunto de los esfuerzos de otros muchos investigadores, también está centrada en la búsqueda de las aplicaciones que, tradicionalmente y en tiempos más recientes, han procurado los microbiólogos: el combate frente a los patógenos y la explotación de las capacidades microbianas que nos son de utilidad. El valor de los estudios microbianos tiene, en la actualidad, matices especiales que hemos de comentar para completar esta introducción.

Múltiples facetas del valor actual de los estudios microbianos

Los estudios microbianos, continúan proporcionando notables progresos en el conocimiento de la vida en general, pero, también, siguen dando lugar a tecnologías de vital importancia así como soluciones para problemas inmediatos. Aunque algunas veces esas soluciones no se deriven con la rapidez y eficacia deseadas, al menos, el manejo de los microorganismos, hoy día, resulta accesible para el investigador, mucho más de lo que resultó nunca.

A pesar su corto período de desarrollo, ya que el estudio científico de los microorganismos no lleva mucho más de un siglo de abordaje intenso, sigue representando un campo de las Ciencias de la Vida de extraordinaria vitalidad. Proporciona modelos de trabajo, estrategias de aproximación experimental y nuevas ideas y posibilidades para el avance del conocimiento biológico. En el manejo de los microorganismos es donde se materializan con más claridad las posibilidades de la Biología actual: entender la programación de las células, así como poder proceder a su reprogramación, en función del conocimiento preciso del programa.

La sociedad actual necesita seguir afrontando numerosos problemas de posible etiología microbiana, abordándose bastantes de ellos en períodos de tiempo tan cortos y con tanta eficacia, que habría parecido imposible hacerlo en épocas no muy lejanas. Entre éstos, y a modo de ejemplo, se suele citar el que surge al inicio de la década de los 80, cuando la humanidad hubo de enfrentarse a una pandemia devastadora, debida a la emergencia y diseminación de un virus, el HIV, causante de un síndrome de inmunodeficiencia que minaba profundamente las defensas que el organismo opone a cualquier infección. Muchos han sido los recursos puestos a contribución para estudiar este agente infeccioso, y aun más los esfuerzos de miles de investigadores de todo el mundo que los han empleado. Pero, si analizamos la secuencia temporal de logros alcanzados en el combate frente a este virus, tan infeccioso, nos asombraría constatar la rapidez con la que se logró su identificación, así como el conocimiento de su genoma y los innumerables detalles de su biología. En no mucho más tiempo, surgía todo un arsenal terapéutico para bloquear la multiplicación, como consecuencia de los avances logrados. El rédito fundamental, sin duda, ha sido la posibilidad de controlar la enfermedad y mejorar la calidad de vida de los enfermos. El que, hasta ahora, el SIDA persista en el mundo, como uno de los problemas infecciosos de primera magnitud, que su contagio continúe produciéndose con intensidad, o el hecho de que la medicación no esté disponible para todos los que la puedan necesitar, representa la otra cara de la cuestión. En cualquier caso, no cabe duda de que la Ciencia ha hecho su trabajo con una gran aportación; a día de hoy, nuestra mentalidad al considerar a los agentes infecciosos, y la amenaza que pueden suponer para la salud humana, nada tiene que ver con la de épocas pasadas.

En un pasado reciente, se sitúa también un número elevado de otros muchos éxitos derivados del estudio de los microorganismos. Son logros de los que se incorporan a cualquier lista de aquellas consecuciones propias de los avances científicos de los últimos cien años, que ilustran el valor de la tarea investigadora para la sociedad. Desde el tratamiento preventivo mediante vacunas, hasta la terapia curativa basada en fármacos antimicrobianos (antibióticos y quimioterápicos), pasando por la seguridad alimentaria en aspectos esenciales, y tantas otras cuestiones que

el común de las personas considera problemas superados, o susceptibles de control, gracias al avance de la Microbiología. Son, todos ellos, extensos capítulos de progreso, pasado y presente, que, si ya han tenido consecuciones que están escritas con letras de oro en la historia del avance científico-técnico —pensemos en el descubrimiento de las penicilinas, en el desarrollo de los antibióticos de amplio espectro, en la erradicación de la viruela mediante vacunación, etc.— aun están en vías de mostrar su mejores posibilidades en el futuro.

Aunque llegue menos a la percepción de la gente, igualmente asentado está el beneficio que se deriva del empleo de microorganismos, o del conocimiento de los mismos, para los más variados propósitos. Desde la producción y transformación de alimentos y bebidas, hasta la fabricación de fármacos recombinantes —una de las grandes aportaciones a la Farmacología de los años 80— pasando por el empleo de agentes microbianos en la limpieza, depuración, descontaminación o reciclaje de materiales.

No obstante, también queda meridianamente claro que persiste lo que podemos llamar la “amenaza microbiana”. Persiste y adopta nuevas formas que a su vez plantean nuevas amenazas. Una buena parte de la humanidad, sigue viviendo en situaciones que les hacen vulnerables a los agentes infecciosos microbianos y parasitarios. Sus condiciones de vida, alimentación y disponibilidad de recursos, están tan alejadas de las que se dan en el mundo más desarrollado y rico, que cualquier análisis sobre las causas de mortalidad, en uno y otro sector del planeta, arrojan resultados verdaderamente impactantes. En los países desarrollados, entre los que nos encontramos, la mortalidad debida a enfermedades infecciosas no pasa del 6%, son las enfermedades cardiovasculares y las degenerativas las que acaban con la vida de la mayor parte de la población. Sin embargo, la mortalidad debida a infecciones en el mundo que aun espera su desarrollo económico y social, alcanza a más del 45%. Así de asimétrica es la situación. Con ello, la globalización mundial creciente, en todas sus facetas y manifestaciones, generaliza y hace permanente esa posibilidad de que se sigan diseminando las enfermedades transmisibles, y de que agentes infecciosos bien conocidos, u otros emergentes, se extiendan y sigan suponiendo un peligro para la

salud pública ya sea en el ámbito global, o en extensas zonas o lugares concretos del mundo.

Hace escasas semanas, la Organización Mundial de la Salud (OMS) hacía público su informe anual, en buena medida dedicado a efectuar una llamada de atención sobre el alcance de la

**EL INFORME DE LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS)
2007, UNA LLAMADA DE ATENCIÓN SOBRE EL ALCANCE
DE LA AMENAZA INFECCIOSA ACTUAL.**

En agosto de 2007, la OMS ha hecho público su informe anual, centrado en promover la seguridad global en Salud Pública.

Las condiciones de vida y la movilidad en el conjunto del planeta suponen aspectos nuevos en cuanto al riesgo de epidemias y pandemias. En 2006 viajaron en líneas aéreas 2.100 millones de pasajeros. A los agentes infecciosos existentes se sumaron los patógenos microbianos emergentes que van surgiendo debido a la evolución de la patogenicidad microbiana. Desde 1970, los agentes infecciosos emergentes han venido apareciendo han una tasa de más de uno por año; 40 enfermedades infecciosas actuales eran desconocidas para la generación anterior.

Problemas principales derivados de la amenaza de enfermedades con tendencias epidémicas:

- Desde septiembre de 2003 al mismo mes de 2006 se produjeron 685 alertas de declaración obligatoria por peligro para la Salud Pública, casi la mitad de ellas en el continente africano.
- Reparición significativa, en el último cuarto de siglo, de enfermedades con tendencias epidémicas como el cólera, la fiebre amarilla, la infección meningocócica.
- Extensión de infecciones víricas como Ébola, fiebre hemorrágica de Marburg, virus Nipah.
- La diseminación de la poliomielititis en Nigeria por deficiencias en el manejo de los métodos preventivos eficaces bien establecidos.
- La terapia antimicrobiana, seriamente afectada por la adaptación microbiana a los antibióticos y su utilización inadecuada. Tuberculosis multirresistente, un problema globalmente extendido. También la extensión de la infección hospitalaria, la resistencia en agentes de gastroenteritis, en virus como VIH, etc.
- Enfermedades infecciosas subsiguientes a alteraciones climáticas.
- La amenaza del empleo bélico de agentes infecciosos y sus nuevas modalidades potenciales (bioterrorismo).
- La emergencia en el siglo XXI del Síndrome Respiratorio Agudo y Grave (SRAG).
- La permanente preocupación por la extensión del virus de la gripe aviar y su posible transmisión a humanos.

amenaza infecciosa a nivel global (113). Persiste la amenaza microbiana, con nuevas facetas muy relacionadas con la acción del hombre, sus movimientos, costumbres, hábitos de vida, etc.

Cabría preguntarse, entonces, si nada hay nuevo en este aspecto, pues la humanidad se ha visto afectada por enfermedades infecciosas desde tiempo inmemorial, aunque sólo desde hace no mucho más de siglo y medio tiene algún conocimiento científico de los microbios, que le permita defenderse de manera racional de sus efectos patogénicos. La respuesta a esa pregunta es inequívoca: aunque sigue habiendo amenazas infecciosas, ciertamente las situaciones son muy distintas de las del pasado. Entre otras cosas, porque nuestra comprensión del mundo microbiano es mucho mayor, hasta permitirnos entender su evolución —la pasada y la que podría tener lugar en el futuro— y con ello hacerle frente de manera racional.

LA VIDA MICROBIANA, SOPORTE DE LA BIOSFERA

Es lógico que las adaptaciones de algunas especies microbianas a la vida parásita llamaran la atención, y ocuparan los esfuerzos de los primeros microbiólogos empeñados en desarrollar conocimiento para combatirla. Sin embargo, desde los momentos iniciales de la Microbiología, se ha formulado una visión más general, completa e interactiva con el ambiente, de lo que representa la vida microbiana en la naturaleza. De alguna manera, esta aproximación resultó más anticipatoria de las posibilidades actuales, que cristalizan continuamente en la vida de los microbios en el ambiente. La amplia distribución, la variedad de adaptaciones de los microbios, la riqueza de formas de vida son reconocidas, aunque en buena medida los detalles estén aun por explorar y por establecer. La brillantez y la creatividad del trabajo investigador de gigantes del desarrollo del conocimiento, como Louis Pasteur y Robert Koch, en la segunda mitad del siglo XIX y, en parte, en los inicios del XX, tuvo tal trascendencia, se derivaron de todo ello tales beneficios, que otros avances pudieron quedar notablemente oscurecidos. Entre ellos sin duda habría que mencionar las propuestas de Winogradsky, que también en pleno siglo XIX planteaba ya una visión dinámica de la vida

microbiana, en interacción con el medio ambiente, tratando de reflejar la actividad de las formas más elementales de vida y sus consecuencias para la biosfera.

Como suele ocurrir en Ciencia, la evolución de las ideas y conceptos ha ido pareja con el progreso metodológico, pero, las posibilidades de plantear nuevos métodos y aproximaciones experimentales, a su vez, se ha ido basando en formulaciones con las que el científico “sueña” nuevas opciones de aproximación al conocimiento que persigue. La metáfora del sueño me sirve para expresar lo que de creativo tiene la investigación científica. Las escuelas de Pasteur y Koch consagraban la aproximación reduccionista al conocimiento microbiano; una estrategia que en parte dura hasta nuestros días y que ha sido extraordinariamente productiva. El análisis detallado de fenómenos biológicos, “reducidos” a un nivel accesible, acotados a condiciones definidas y reproducibles, ha permitido alcanzar notables grados de profundidad en el conocimiento, para su posterior extrapolación. El conocimiento de los microorganismos se benefició enormemente de la posibilidad de cultivarlos, aislando estirpes puras en los correspondientes cultivos.

Pero, la referida visión de Winogradsky, y otras escuelas como la de Beijerinck, lejos de limitarse a lo que puede ser el agente microbiano en cultivo puro, en medio rico en nutrientes, suponían una percepción del microorganismo mucho más dinámica, situado en su ambiente natural en donde está sometido a variación y fluctuación, incluso a cambios morfológicos. Al plantear lo que se llamó “cultivos de enriquecimiento”, como una forma distinta de aislar estirpes, se utilizaba una estrategia de competencia, entre organismos presentes en cualquier mezcla natural, diseñando los medios y las condiciones de manera que favorecieran el desarrollo de unos frente a otros. Si los postulados de Koch significaron la definición (reduccionista) de microbio patógeno, basada en su aislamiento en cultivo puro, Winogradsky llegó a hablar de contra-postulados señalando la importancia, entre otras cosas, de los cultivos recién aislados (90). Hay una visión anticipatoria en esta concepción del microorganismo en el ambiente, y en el afán de incorporar el máximo de datos a su descripción. La Microbiología de Sistemas emerge en la actuali-

dad, a partir de los abordajes de gran escala que las tecnologías de desarrollo más reciente hacen posible.

La vida microbiana sería posible sin la existencia de formas de vida no microbiana; sin embargo, la vida en general resultaría imposible en la tierra sin la existencia de los microbios. El propio Cajal, se refería hace más de un siglo a esta cuestión con la lucidez que le caracterizaba (18):

En la cadena de la vida todos los eslabones son igualmente dignos, porque todos resultan igualmente necesarios. Juzgamos pequeño lo que vemos de lejos ó no lo sabemos ver. Aun adoptando el punto de vista antropomórfico, ¡qué de cuestiones de alta humanidad laten en el misterioso protoplasma del más humilde microbio! Nada parece más transcendental en bacteriología que el conocimiento de las bacterias infecciosas, y nada más secundario que el de los microbios inofensivos que pululan en las infusiones y materias orgánicas en descomposición; y, no obstante, si desaparecieran estos humildes hongos, cuya misión es reintegrar en la circulación general de la materia los principios secuestrados por los animales y plantas superiores, bien pronto el planeta se tornaría inhabitable para el hombre.

Los microbios son la base de la biosfera, el soporte fundamental de la vida. Cierto es que algunos microbios causan problemas serios de salud, pero no lo es menos que los microbios son fundamentales para la salud del planeta y de sus hábitats. Por su versatilidad y capacidad de adaptación, que les permite colonizar los más variados ambientes y desarrollarse con eficacia, los microorganismos han conformado el planeta tal como lo conocemos.

Muchos años de trabajo microbiológico se han basado en el cultivo de las especies microbianas, en toda una gama de medios y sistemas de cultivo de laboratorio. Sin embargo, impacta conocer las estimaciones actuales sobre la realidad de las especies microbianas existentes: todo indica que hasta ahora sólo se ha podido cultivar una fracción no superior al 1% de las especies microbianas. Según esta estimación quedaría un 99% de la vida microbiana por describir y por estudiar (58), no se conoce por tanto nada de la inmensa mayoría del mundo microbiano. ¿Cómo

se puede llegar a estas conclusiones estimativas? Entre otras cosas, abordando el rastro genético de estos organismos a través de los estudios metagenómicos.

Siguiendo con las estimaciones, cabe comentar algunas cifras ilustrativas de lo que la vida microbiana representa en la biosfera y en su mantenimiento (5). Se estima que en el planeta existen 5×10^{31} células microbianas, cuyo peso supondría 50.000 billones de toneladas. Todo ello ilustra, en cifras, lo que debe suponer la significativa e imprescindible actividad natural, en el reciclaje de los elementos fundamentales (carbono, nitrógeno, azufre, hidrógeno, oxígeno), el papel en la disponibilidad de nutrientes para vida vegetal, que sostiene a la vida de los animales y del hombre, y la relevancia para la fotosíntesis de los microorganismos —más de la mitad de actividad fotosintética es microbiana—. Otra estimación es la de que los microbios constituyen el 90% de la biomasa total de la biosfera, si se excluye lo que representa la celulosa, y el 60% si se incluye la masa de celulosa existente. Si añadimos que la colonización del organismo humano, por parte de los microorganismos, llega a suponer la presencia en el mismo de un número de células microbianas que es un orden de magnitud superior al número de células propias, podemos ver materializada la significación para la salud humana.

Las aproximaciones reduccionistas y las más sintéticas, es decir las que tratan de integrar las observaciones en una visión más global, definen de manera simplificadora la historia de las bases metodológicas de la investigación en Microbiología, al igual que otros campos biológicos. Las primeras resultaron notablemente útiles, al par que se veían potenciadas por la naturaleza de organismos sencillos propia de los microbios. Así se desarrolló la Biología Molecular, en buena medida basada en estudios microbianos, al poner a disposición del experimentador unas tecnologías potentes que posibilitaron un avance explosivo. Pero, los fenómenos biológicos no se producen de manera separada, unos de otros, ni los organismos se desarrollan, normalmente, en condiciones de laboratorio, ni los componentes biológicos (proteínas, genes, metabolitos) se encuentran aislados en las células. Llega por tanto el momento de la integración de datos, de la comprensión de los organismos o de sus partes como “sistema”;

en esto la Microbiología de nuevo está llamada a plantear cuestiones de frontera para abrir camino en general en Ciencias de la Vida. Me propongo en este trabajo mostrar algunas de estas posibilidades, por lo que habré de volver sobre el tema. Quede constancia, en este punto, de que se trata de una aproximación que se enraíza en algunos de los logros obtenidos en los inicios del conocimiento más científico de los microorganismos, según hemos señalado anteriormente.

La vida microbiana, instrumento y base fundamental del conocimiento biológico

El conocimiento de la propia existencia de la vida microbiana hubo de esperar a la disponibilidad de medios de observación de lo más pequeño, que permitieran constatar, mediante imágenes, la existencia de ese mundo de organismos microscópicos, lo que no llegó hasta 1676 con Van Leeuwenhoek. Esa espera fue aun mayor, para disponer de la demostración científica de que realmente se trataba de seres vivos, con sus capacidades para llevar a cabo actividades biológicas. Desde hace más de un siglo la experimentación con microorganismos ha resultado esencial para configurar el progreso del conocimiento biológico. Ello supone que la metodología experimental para abordar las cuestiones fundamentales, de las que proporcionan resultados de valor general, se ha aplicado, y, en buena medida, desarrollado, en estudios que abordaban las propiedades y características de especies microbianas. Con ello, los sistemas microbianos están presentes en el encadenamiento de avances científicos, en el que se consolidan los conceptos, se perfeccionan los métodos o se desarrollan otros nuevos, se plantean nuevas hipótesis y se asientan ideas y teorías sobre la vida y los fenómenos que les son propios.

En el párrafo anterior, he utilizado la expresión “sistemas microbianos”. El contenido de esta expresión cobra un sentido especial en el momento científico actual cuando se habla abiertamente de una Biología de Sistemas —en la que la Microbiología de Sistemas ha de jugar un papel pionero— para referirse a la síntesis que la investigación biológica actual persigue. Se trata de integrar los datos y la información que proporcionan

las tecnologías de escala —Genómica, Proteómica, Metabolómica, y demás aproximaciones ‘ómicas— que se derivan del trabajo actual. Con ello, se pretende transformar en conocimiento lo que hasta ahora es información, manejable solamente gracias a los procedimientos informáticos. El desarrollo de estas ideas puede representar ese punto de inflexión al que las Ciencias de la Vida aspiran en la actualidad y, a partir del cual, se pueda construir la síntesis pretendida, así como la formulación de modelos predictivos de funcionamiento de las células, los organismos, ecosistemas, etc.

De los Sistemas Microbianos a la Microbiología de Sistemas

La referencia a los sistemas microbianos ha sido una constante desde que se lleva a cabo experimentación con microorganismos. En cada caso, el sistema constituye lo que es objeto de experimentación, y viene definido por los materiales que se emplean para el trabajo correspondiente, así como los fenómenos cuyo estudio se puede abordar. Ese carácter instrumental para la experimentación, que tiene el sistema de trabajo, es la base también del alcance que pueden tener los datos y las observaciones que de dicha experimentación se derivan. Un sistema experimental puede ser una estirpe microbiana o un conjunto de estirpes, así como sus componentes celulares y las actividades que llevan a cabo o las funciones que gobiernan.

El estudio de sistemas microbianos ha permitido obtener resultados de relevancia general para el conocimiento. El éxito de demostraciones como la de la capacidad transformante del ADN del pneumococo, desborda la mera significación de este resultado para el conocimiento de la biología y patogenicidad del microbio, con ser esto importante, ya que significó nada menos que la prueba científica de que el ADN es el material hereditario de los seres vivos. La relevancia de cada sistema está naturalmente en la importancia de los resultados desde el punto de vista de lo que muestran y demuestran. Cuando determinados logros científicos se califican como “elegantes” se suele tratar de demostraciones que combinan la sencillez con el valor general de las con-

clusiones que permiten. En los abordajes científicos también existe imaginación y creatividad, lo cual depende de la elección de un buen sistema experimental. Los microorganismos constituyen un conjunto de seres vivos de inagotables posibilidades para el avance científico.

El salto en el manejo de sistemas microbianos para la experimentación, a la Microbiología de Sistemas, supone una aspiración razonable, en función de los avances registrados y de la naturaleza de la investigación actual en Ciencias de la Vida. Los objetivos y posibilidades de la Microbiología de Sistemas se formulan en un informe reciente (6):

La Microbiología de Sistemas, parte integrante de la Biología de Sistemas, constituye una aproximación diferente al estudio de los sistemas biológicos. Se esfuerza en abordar las propiedades emergentes de los microorganismos que se derivan del conocimiento de las interrelaciones entre genes, proteínas, otras macromoléculas, moléculas pequeñas, orgánulos y el ambiente. Son, estas interacciones, a menudo no lineales, las que desvelan las características emergentes de los sistemas biológicos, que generalmente no se pueden abordar mediante estrategias clásicas. Como complemento a la tendencia al reduccionismo, largamente mantenida, la microbiología de sistemas se basa en la consideración del organismo o la comunidad como un todo, integrando el conocimiento básico con la Genómica, la Metabolómica y otros datos, para crear una imagen integrada de cómo funciona una célula o una comunidad microbiana..... La Microbiología de Sistemas busca la identificación de la forma en que evolucionan las funciones microbianas, y cómo se derivan las propiedades emergentes de células y comunidades, a partir de secuencias genéticas lineales aparentemente de gran simplicidad.

Impacto del conocimiento microbiológico en la fenomenología biológica

Para situar el tema en el ámbito de los planteamientos actuales, y de la búsqueda de un desarrollo de la Microbiología de Sistemas, me parece de interés el describir una serie de hechos fundamentales para el conocimiento biológico, en los que los

avances en el conocimiento de la vida microbiana se han encajado de una forma notable, resultando decisivos para configurar el pensamiento biológico.

A pesar del mencionado éxito de Pasteur y Koch, con sus fecundas escuelas, que propició un crecimiento explosivo de las investigaciones microbianas y abrió el camino para el control de las infecciones, hasta la década de los 40, los estudios de Microbiología constituían un capítulo aparte en las Ciencias de la Vida. Costaba a muchos el integrar a los microorganismos en el esquema general de los organismos vivos, en función de la unidad básica que existe en los procesos biológicos fundamentales. Recuerdo personalmente una conferencia del Profesor Sol Spiegelman, en los años setenta, en la que comentaba las dificultades que había tenido en torno a los años cuarenta, para lograr la aceptación de un trabajo en una revista científica que incluía contenidos de Genética. Se trataba de uno de los primeros trabajos de análisis de características de algunas estirpes bacterianas, que permitía conclusiones sobre la transmisión de información genética. Tras el proceso habitual de evaluación del texto sometido por el investigador, los editores rechazaban el trabajo, argumentando que las bacterias “no podían tener Genética, puesto carecían de núcleo”. Algo tan secundario —hoy lo sabemos— como la carencia en las células bacterianas de un núcleo diferenciado, separado del resto del citoplasma por una membrana, suponía una barrera para homologar las posibilidades de las bacterias a la hora de proporcionar información genética de valor general.

La década de los 40 del pasado siglo aportó ideas y propuestas de gran fertilidad para el progreso biológico. Por ello, consideramos que el impulso de Schrödinger, fue decisivo al propugnar que la vida —materia ordenada que se propaga manteniendo el orden pre-existente— debería analizarse en el marco de las leyes físicas que rigen en la naturaleza. Los detalles de la información que mantiene y propaga ese orden fueron desvelados en buena medida en estudios microbianos, con ello se consolidaba la idea de la unidad básica que subyace en todos los seres vivos. La secuencia de hallazgos resulta notablemente expresiva.

El cuadro que se muestra más adelante, recoge aspectos salientes de esta aportación al conocimiento a la que me refiero, la

que se deriva del empleo de sistemas microbianos. Resulta fascinante constatar cómo desde modelos de estudio bien definidos, se pudo plantear una experimentación controlable que permitiera saltos y avances en el conocimiento muy importantes. La aplicación de algunas tecnologías verdaderamente potentes fue posible precisamente por el empleo de esos modelos, planteando aproximaciones experimentales que se dirigían a entender procesos fundamentales. De todo ese esfuerzo, fueron surgiendo los resultados y las teorías que han ido conformando verdaderos paradigmas, muchos de los más establecidos en la experimentación biológica.

LOS MODELOS MICROBIANOS DE EXPERIMENTACIÓN EN LA CONFIGURACIÓN DE PARADIGMAS BIOLÓGICOS

Algunos de los avances logrados mediante el empleo experimental de organismos microbianos, constituyen momentos estelares del progreso científico.

- *El material hereditario lo constituye el ADN celular.* Avery, McLeod y McCarthy demuestran, en 1944, que ADN extraído de células de una bacteria patógena, el pneumococo (*Streptococcus pneumoniae*), es capaz de transformar a otras células modificando permanentemente propiedades heredables, como la morfología colonial y el poder patógeno en un modelo experimental de ratón.
- *Los genes codifican enzimas.* Lederberg y Tatum, en 1945, establecen, en *Neurospora crassa*, que los genes codifican enzimas responsables del metabolismo del hongo. El ADN por tanto es el portador de la información para las proteínas.
- *Las mutaciones en el material genético se producen con carácter aleatorio.* El test de la fluctuación de Luria y Delbrück, en 1946, muestra la naturaleza espontánea y aleatoria de la mutación genética, independiente de sus consecuencias fenotípicas.
- *Cartografía fina, inter e intragénica, de virus bacterianos.* En 1950, Seymour Benzer establece el mapa genético detallado de la región *rII* del bacteriófago T4 de *Escherichia coli*, utilizando procedimientos de genética mendeliana. Establecido el concepto de cistrón.
- *Descifrado el código genético.* En 1960, un extracto acelular de *E. coli* traduce un ARNm sintético (Nieremberg), los tripletes del código identificados en poco tiempo (Ochoa, Khorana).
- *La agrupación de genes en operones muestra los detalles de la regulación génica.* Jacob y Monod en 1964.
- *La Ingeniería Genética hace posible el aislamiento de genes y su modificación y reintroducción estable en las células.*
- *Secuenciados los primeros genomas de organismos celulares.* El genoma de la bacteria *Haemophilus influenzae* y de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, conocidos en 1995 y 1996, respectivamente.

El árbol de la vida: un tronco y sus raíces microbianas

La última gran aportación de la Microbiología Molecular al conocimiento de la evolución biológica ha sido, sin duda, la propuesta de los tres grandes reinos o dominios de seres vivos, basada en el análisis de secuencias de ARN ribosómico (ARNr). Estos elementos genéticos, altamente conservados ya que todos los organismos celulares poseen ribosomas, con un diseño muy similar, han sido el instrumento para profundizar en la estructura del árbol de la vida y sus ramificaciones. A través de un notable esfuerzo llevado a cabo por Woese y colaboradores, para poner de manifiesto detalles de la diversidad microbiana, se pudo establecer, ya en 1976, un panorama preciso de las relaciones entre los distintos tipos de organismos vivos. Se generó un esquema que sigue siendo válido, tras completar numerosos detalles adicionales, sobre el tronco y las ramificaciones que definen la emergencia de los seres vivos y el proceso evolutivo en sus grandes líneas.

El resultado es una imagen coherente, basada en el análisis detallado de secuencias del citado ARNr, de especies representativas de la diversidad biológica, que a modo de reloj molecular permite postular los patrones de emergencia y evolución de los tres grandes grupos de organismos celulares, que surgieron como ramas de ese tronco de los seres vivos en etapas tempranas de la evolución. Con la visión que proporciona este esquema de emergencia de la vida y desarrollo de la evolución, se ha abierto paso lo que se ha denominado la tercera edad de oro de la Microbiología (66). La primera y la segunda, estarían representadas, respectivamente, por los inmensos avances de Pasteur y Koch de finales del siglo XIX, y por el desarrollo de la Biología Molecular microbiana en los 50 y 60 del pasado siglo XX.

Los análisis comparativos de las referidas secuencias de ARNr proporcionan una visión completa, la más precisa que cabe conocer hasta el momento actual, de la emergencia y diversificación de la vida en el planeta, desde las formas más elementales. El esquema que de todo ello se deduce, configura una teoría sólidamente justificada que revela la extensión y amplitud de la vida microbiana como base de la biosfera. La emergencia de tres

grandes reinos, *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*, como resultado de esas tres ramificaciones, refleja con precisión un panorama evolutivo general. Los dos primeros, exclusivamente integrados por organismos microbianos, ilustran las formas de vida y adaptaciones, que se producen en ellos con una notable diversificación por lo que respecta a formas de vida, metabolismo energético y adaptación a los ambientes más variados. El que ambos troncos, *Bacteria* y *Archaea*, se caractericen como organismos procarióticos (carentes de núcleo celular diferenciado) no significa que exista entre ellos demasiada afinidad, ya que el segundo comparte con *Eukarya* muchas facetas de su diseño molecular y funcional. En cuanto a este tercer reino, el de los organismos eucarióticos, cuyas células poseen un núcleo diferenciado además de otros atributos específicos, está igualmente integrado por una mayoría de especies microbianas, además de los seres vivos más complejos, vegetales y animales.

Este patrón de organización de las formas fundamentales de vida, y su emergencia a partir de células microbianas, se completa con las evidencias y datos que permiten postular la contribución de organismos procarióticos a la generación de la organización celular eucariótica. Orgánulos propios de la célula eucariótica, como las mitocondrias y cloroplastos, derivan de organismos procarióticos, incorporados como simbioses al citoplasma de los eucariotas primitivos, de acuerdo con un conjunto muy sólido de evidencias y observaciones experimentales. Si cada célula, incluidas todas las que integran los organismos pluricelulares más complejos, constituye en sí un auténtico cosmos individualizado, podemos decir que, de alguna manera, toda la vida es vida microbiana, está enraizada en estas etapas tan ancestrales que se remontan a momentos de los que sólo el reloj molecular nos puede dar alguna información. A la luz de estas formulaciones, auténtico paradigma del conocimiento biológico actual, cobra sentido la propuesta que establece una serie de marcas temporales, en el proceso de aparición y evolución de la vida en la Tierra:

- primeros seres celulares (hace 3500 millones de años);
- primeros organismos eucarióticos (2000 Ma);
- primeros organismos multicelulares (1000 Ma);

- precursores de los vertebrados y el hombre (600 Ma) y,
- la gran explosión del Cámbrico (530-520 Ma) con los grandes grupos de animales con simetría bilateral.
- Los homínidos y la aparición del hombre apenas hace algo más de 200.000 años.

Sistemas microbianos eucarióticos

La organización celular eucariótica es la propia de los (macro)organismos más complejos, animales y plantas. Pero, los referidos análisis filogenéticos revelan que la diversificación de organismos eucarióticos ha dado lugar también, y en primera instancia, a numerosas especies microbianas. Entre ellas las hay unicelulares o pluricelulares sin diferenciación en tejidos. La complejidad de su organización significa también adaptaciones a formas de vida diferentes y estilos de multiplicación y desarrollo muy variados. El estilo de vida microbiana es igualmente propio de los eucariotas y no se restringe a los procariotas.

Entre los microorganismos eucarióticos está el amplio y extenso grupo de los hongos. Al resto de los microbios eucarióticos se les engloba en el grupo de los protistas, un término antiguo que abarcaría a los protozoos, las microalgas y los hongos mucosos. En cuanto a los hongos, no todas las especies son microbianas, ya que muchos de ellos alcanzan tamaños macro, en algunos casos incluso extraordinariamente grandes. Pero una buena parte de los hongos son microscópicos, incluso muchos unicelulares, por lo que su utilización como modelos experimentales ha sido constante, así como extraordinariamente productiva para las Ciencias de la Vida. En la naturaleza la presencia de los hongos es amplia y diversa, siendo clave para la degradación de la materia orgánica y reciclaje del carbono. Pero, su relación con el hombre pasa también por formar parte de la *Microbiota* del organismo humano, o comportarse como patógenos, ya sea oportunistas o patógenos obligados.

Las levaduras y “la levadura”: un estilo de vida y un aliado del investigador

Los hongos unicelulares, las levaduras, representan ese sector de la vida microbiana, caracterizado por la organización celular eucariótica, que mejor se ha prestado a analizar cuestiones básicas. Desde la fermentación, como resultado de la acción microbiana (Pasteur), hasta la existencia de enzimas en las células capaces de llevar a cabo procesos metabólicos (Buchner), las levaduras han aportado un material experimental adecuado para responder a preguntas de investigación básicas, a lo largo de muchos años. Las transformaciones de alimentos y bebidas, que son de tanta utilidad práctica para el hombre, han sido determinantes del interés científico por este tipo de organismos.

En términos generales, las pautas de crecimiento y desarrollo de las levaduras son las que corresponden a los hongos, grupo del que forman parte. Sin embargo, por su carácter unicelular, así como por su participación en procesos naturales de transformación de gran utilidad alimentaria, las levaduras se han convertido en los hongos mejor conocidos. El desarrollo de las levaduras en la situación natural, se produce normalmente por multiplicación asexual. En condiciones de acceso a nutrientes en abundancia, la masa de las células se incrementa lo que significa un crecimiento ordenado de sus componentes, que conduce a la división celular. Este proceso mitótico significa la duplicación del material genético —integrado por varios cromosomas— para generar un reparto que asegure la generación de dos células hijas, idénticas a la célula madre.

Pero, también en estirpes de muchas especies de levaduras se dan procesos de sexualidad, con la consiguiente generación de cigotos, producto de la fusión de núcleos de distintas estirpes, para generar un ciclo reproductivo sexual. La sexualidad en las levaduras tiene las mismas bases de la sexualidad en los organismos superiores. Es decir, se debe a la existencia de tipos sexuales opuestos y complementarios, capaces de estimulación mutua para la fusión de células, y la posterior generación de una progenie con la dotación genética combinada de ambos progenitores. Naturalmente ello asegura las posibilidades notables de re-

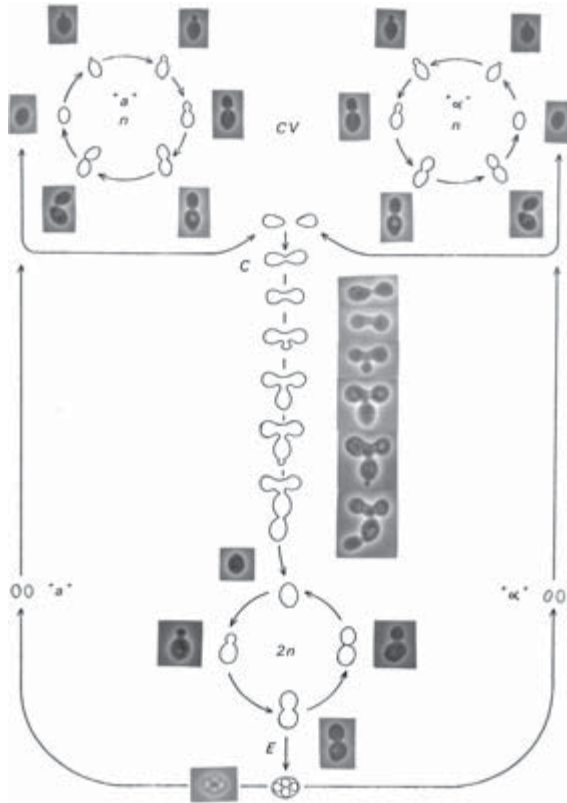


FIGURA 1. El ciclo de desarrollo de *Saccharomyces cerevisiae*, consta de fases de crecimiento asexual, sea haploide o diploide, así como de procesos de apareamiento que suponen la transición entre unas y otras. El ciclo mitótico se manifiesta en el crecimiento de las células ovales mediante procesos de gemación. La meiosis tiene lugar cuando una célula diploide genera un asca, con cuatro ascosporas haploides. La facilidad de manejo de estas estirpes en el laboratorio ha sido la base para el avance de la Genética de esta especie y su posterior empleo en Ingeniería Genética, Genómica y Proteómica. La figura, creada a partir de imágenes de microscopía de contraste de fases, está tomada de la Tesis Doctoral de Francisco del Rey (Universidad de Salamanca, 1979), dirigida por Isabel García-Acha y César Nombela.

combinación y generación de diversidad genética propias de la sexualidad. También en los hongos se dan otros procesos que son base de recombinación genética, como los de heterocariosis en hongos filamentosos; es decir, la confluencia en una misma hifa de núcleos procedentes de distintas estirpes. En una perspectiva microbiana, sin embargo, hay que señalar que esta capacidad de combinar dotaciones genéticas —de intercambiar genes, en definitiva— no alcanza en los hongos el grado y la generalidad que tiene en las bacterias. En estas, la transferencia lateral de genes se produce con tal profusión que convierte su dotación genética en un patrimonio ampliamente compartido por especies muy diferentes, sin que medien las situaciones de diferenciación de tipos sexuales como las conocemos en los eucariotas.

Si las levaduras, en general, son importantes para la especie humana, hay una especie de levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, que por sí misma agota las características más salientes de estos hongos, hasta el punto de que es frecuente referirse a esta especie simplemente como “la levadura”. La popularidad de este hongo unicelular, del grupo de los ascomicetos, se basa en su accesibilidad para el estudio de las cuestiones biológicas más variadas, algo que ha hecho de la especie un modelo de experimentación a lo largo de más de cien años. La Figura 1 recoge un esquema, basado en imágenes de microscopía, ilustrativo de los ciclos de desarrollo y las posibilidades experimentales que ofrecen. Se trata de un organismo de crecimiento rápido, en el que los ciclos sexual y asexual, se manejan con facilidad en laboratorio. La experiencia ha permitido acumular una cantidad notable de estirpes, haploides y diploides, con cuya experimentación se han logrado resultados de valor general, que hacen de *S. cerevisiae* una referencia fundamental para el conocimiento biológico. Entre otros muchos aspectos definitorios de la utilidad experimental y el valor científico, del trabajo con esta especie microbiana eucariótica, resaltamos los siguientes:

El estudio de todo tipo de mutaciones genéticas, para su caracterización en estirpes haploides y diploides. Análisis mendeliano de complementación y recombinación permitieron desde hace tiempo realizar una notable cartografía genética de esta especie, situando en sus 16 cromosomas varios cientos de mar-

cadores, mucho antes de la secuenciación completa de su genoma.

— El análisis de procesos esenciales para el desarrollo de cualquier tipo de célula eucariótica, como el ciclo de multiplicación celular, o los procesos de secreción de proteínas. La facilidad para el aislamiento de mutantes, mediante selección fenotípica, seguida de su caracterización genética, bioquímica, citológica, hizo posible un conocimiento detallado de este conjunto de funciones, así como su extrapolación a otros organismos de mayor complejidad.

— La disponibilidad de elementos genéticos extracromosómicos (plásmidos o replicones derivados del propio genoma de la especie) permitió aplicar muy pronto, en esta especie, las tecnologías del ADN recombinante para el aislamiento, expresión y manejo de genes, homólogos y heterólogos. Pronto también se convirtió en un sistema para la producción de proteínas y otros productos recombinantes de notable aplicación en Farmacia, como la vacuna frente a la hepatitis B.

— La secuenciación completa de su genoma, lograda en los inicios de la Genómica, lo que propició el establecimiento de pautas para el análisis funcional de genes en gran escala y otras tecnologías como la Proteómica, la caracterización de interacciones entre proteínas (tecnología de doble híbrido) o complejos proteicos celulares.

Lo anterior significa que la información científica existente sobre esta especie supone un compendio de lo más relevante de las Ciencias de la Vida. *S. cerevisiae* también es conocida como “la levadura de gemación”, en alusión al proceso de multiplicación asexual, que determina su morfogénesis característica propia de células ovales. El éxito de esta especie, como modelo experimental, ha propiciado el que surjan otras levaduras, con ventajas complementarias para la experimentación. Entre estas, cabe señalar *Schizosaccharomyces pombe*, con una forma de reproducción asexual basada en el alargamiento celular y la fisión, para dar las dos células hijas, o *Candida albicans*, levadura unicelular de forma oval, como *S. cerevisiae*, pero que puede crecer

también formando hifas como un hongo filamentoso. Este dimorfismo, junto con su carácter de patógeno oportunista, hacen también de *C. albicans* un modelo de investigación muy utilizado en numerosos laboratorios incluido el nuestro

UN SALTO GENÓMICO: LA VIDA CON 6000 GENES

Hoy es común el hacer referencia a cualquier cuestión biológica conocida en clave genómica, tal ha sido la extensión del trabajo de secuenciación de genomas y de genómica comparada que se viene realizando. Esto nos lleva a un marco de análisis en el que la mayor parte de los fenómenos específicos, que puedan ser objeto de consideración, se pueden plantear en este contexto más general, que suponen los genomas y la información que de ellos disponemos. La investigación con levaduras no es una excepción, de hecho, el conocimiento del genoma de *S. cerevisiae* ha venido marcando pautas de avance en la Genómica, tanto desde el punto de vista metodológico como conceptual.

La secuenciación de genomas ha tenido un curso desigual, en cuanto a los grupos de organismos secuenciados hasta el momento. Se han secuenciado ya muchos genomas de organismos sencillos, pero pocos de entre los organismos más complejos. En concreto, debemos estar ya cerca de disponer de unos 500 genomas bacterianos conocidos, mientras que entre los eucariotas no pasa de unas cuatro docenas en total¹. Aun existiendo variaciones notables, la mayoría de los genomas bacterianos tienen un tamaño en torno a 2-4 Mb², situándose el límite inferior en torno al medio millón de pares de bases en algunas especies bacterianas. La información genética en las bacterias es compacta, no se encuentran, en estos organismos, las abundantes zonas de secuencias no informacionales y secuencias repetidas que hay en los genomas más complejos. Pues bien, el trabajo con los genomas bacterianos de menor tamaño está permitiendo acercarse a la definición del “genoma mínimo”, es decir el mínimo tamaño

¹ La página web GOLD (www.genomesonline.org) recoge de forma actualizada la información sobre genomas secuenciados.

² Mb o Mbase (megabase) en términos de genoma supone un millón de pares de bases.

genómico capaz de albergar suficientes genes para la vida de una célula procariótica. Estas estimaciones del genoma mínimo vienen a cifrar su envergadura en unos 300 genes (43), lo que requeriría un material genético de tamaño menor que ese medio millón de pares de bases (0,5 Mb). Serían éstos, los genes necesarios para soportar las funciones esenciales —metabólicas y biosintéticas— de mantenimiento, crecimiento y desarrollo de una célula bacteriana, que pudiera vivir en un ambiente ideal, con disponibilidad de nutrientes y sin tener que soportar situaciones de estrés de diversa índole.

La Genómica de levaduras se desarrolló en paralelo a la Genómica bacteriana, de hecho, el de *S. cerevisiae* fue el primer genoma completo, cuya secuenciación se emprendió³ como un proyecto global, y fue el segundo genoma conocido en su totalidad, ya que poco antes de su finalización se completó y publicó la secuenciación del genoma de la bacteria *Haemophilus influenzae*. En la secuenciación del genoma de esta bacteria, es en la que el famoso científico Craig Venter puso a punto el procedimiento de secuenciación de alto rendimiento conocido como *shotgun sequencing*.

El cuadro siguiente reúne detalles del genoma de *S. cerevisiae*⁴; se trata de un conjunto de información científica relevante para los temas que tratamos a continuación, referidos a los microorganismos eucarióticos, su programa genético, procesos de señalización y posibilidades de modificarlos. De cualquier forma, el conocimiento del genoma de la levadura comenzaba a revelar lo que es la vida con 6000 genes (44), un número de un orden de magnitud superior al de la bacteria mínima. Estaba abierto el camino para adentrarse en los planteamientos, globales, a los

³ La iniciativa de secuenciar el genoma completo de la levadura partió de la Comisión Europea, al comienzo de la década de los 90, fue realmente un proyecto en el que el viejo continente tuvo un papel pionero. Más de 100 laboratorios de diferentes estados europeos constituyeron un consorcio para llevar a cabo esta secuenciación, en etapas en que todavía la secuenciación en gran escala resultaba laboriosa y cara. Sin embargo, como pudimos constatar en nuestro grupo, como participantes en el referido consorcio, los planteamientos obligadamente artesanales en aquellos momentos, aportaron experiencias del mayor interés para todos. Finalmente, se sumaron los esfuerzos de algunos grupos norteamericanos y japoneses, para completar el trabajo a principios de 1996.

⁴ La página web www.yeastgenome.org alberga toda la información del genoma de *S. cerevisiae* con un detalle y una precisión extraordinarios.

EL GENOMA DE LA LEVADURA, UN COMPENDIO DE LAS CLAVES DE LA VIDA DE UNA CÉLULA, MATERIALIZADA EN 6000 GENES

La caracterización funcional de los genes de *S. cerevisiae* es de las más completas. La información de todo tipo está accesible en www.yeastgenome.org

- Tamaño de 12,068 Mb, regiones repetidas 1,321, total 13.389 Mb.
- Los 16 grupos de ligamiento, cartografiados mediante genética mendeliana, se concretan en 16 cromosomas secuenciados, de tamaños muy diversos, con los correspondientes 16 centrómeros y 32 telómeros.
- La correspondencia del mapa genético preexistente, con la del mapa físico resultante de la secuenciación, es aceptable con las deficiencias que cabe esperar de la cartografía genética.
- Identificados 6609 ORFs: caracterizados, 4655; no caracterizados, 1139; dudosos, 815. 229 genes de ARNt y 27 de ARNr. 50 copias del retrotransposón Ty, con capacidad de codificación de partículas víricas.
- Notable profusión de genes reguladores y con otras actividades: 115 genes de proteína-quinasas; 53 transportadores de sustratos; 40 proteasas; 37 esterasas; 34 de la superfamilia Ras GTPasa; 34 transportadores mitocondriales; 27 proteínas inducidas por estrés; 25 transportadores de aminoácidos y poliaminas; 23 proteínas de membrana, etc.
- Un 73% de los genes no son esenciales, muchos genes son redundantes, con funciones parecidas o muy relacionadas.
- La duplicación de genes y regiones génicas más extensas, incluso genomas completos ha sido un mecanismo esencial para conformar los genomas de levaduras, un factor fundamental para su evolución (Goffeau, 2004).
- La duplicación se puede producir por repetición en tándem, durante la replicación, conversión génica, transferencia horizontal y confluencia de genomas en una célula. La duplicación de fragmentos y de genomas puede ir seguida de reorganización o pérdida de función.
- Estos mecanismos evolutivos determinan una notable capacidad de diversificación en líneas filogenéticas de levaduras muy próximas, tanta divergencia molecular que equivale a la de todo el phylum de los cordados.

que desde entonces podemos aspirar en todos los organismos: conocer la totalidad de los genes que los integran, y caracterizar la totalidad de las funciones que desempeñan. Es la hora de la Genómica funcional.

Los avances en el conocimiento genómico de la levadura han propiciado la caracterización detallada de otros genomas de levaduras, muy en especial las dos especies antes mencionadas de *Sch. Pombe* y *C. albicans*. La primera de ellas presenta un genoma de igual tamaño y menor número de genes, pero mayor complejidad (122). En las 12,5 Mb secuenciadas se identifican 4824

genes, el número más bajo de los organismos eucarióticos secuenciados hasta el momento. Las regiones génicas regulatorias son más extensas que en *S. cerevisiae*, lo que refleja una mayor complejidad en los elementos génicos y mecanismos de control. El 43% de los genes tienen intrones, de los que existen 4730 distribuidos en el genoma. Al menos 50 genes de la levadura de fisión tienen un notable grado de homología con genes humanos asociados a enfermedades (50% a cáncer).

La Genómica comparada, utilizando datos obtenidos con profusión de genomas bacterianos, genomas de microorganismos eucarióticos y los de organismos pluricelulares con diferenciación en tejidos, permite una perspectiva interesante desde el punto de vista evolutivo. En una primera aproximación se utilizan, por un lado, genomas de bacterias y archaeas, por otro, se analizan los de eucariotas unicelulares, como ambas levaduras aquí consideradas, y de organismos superiores como la planta *Arabidopsis* y los metazoos, la mosca *Drosophila*, el gusano *Caenorhabditis elegans* y la especie humana. La búsqueda, en estos genomas, de genes conservados y genes específicos de cada tipo de organización, permite algunas conclusiones sobre lo que es esencial para cada tipo de organización biológica.

Varios grupos de genes de notable relevancia para la célula eucariótica, están ausentes en los procariotas. Entre ellos están, genes responsables de la funcionalidad de las histonas y el empaquetamiento del ADN, genes que aseguran la formación de los ribosomas eucarióticos de mayor tamaño, así como los elementos genéticos responsables del procesamiento del ARNm (splicing) y algunos genes del ciclo celular. Especial interés tienen los genes responsables de las funciones de procesamiento proteolítico de polipéptidos, así como de proteína-quinasas, como algo específico de la organización celular eucariótica. Este tipo de programación biológica revela la importancia regulatoria tanto de la degradación de proteínas, como de la modulación de su actividad.

De alguna forma se podría interpretar que los controles regulatorios, que aseguran la capacidad adaptativa a condiciones cambiantes, en las células superiores, se han de basar, en buena medida, en una regulación más inmediata y directa de la activi-

dad de las proteínas, que en la regulación de la velocidad de crecimiento, con la consiguiente reducción de niveles de algunas actividades por cese de su biosíntesis, más propia de los procariontas.

La comparación paralela, en la búsqueda de genes esenciales para el paso de organismos unicelulares a pluricelulares diferenciados no pasa de identificar un factor de transcripción, una proteína fijadora de ARN y otra con afinidad por selenio. Cabe conjeturar que, la transición de procariotas a eucariotas, requiere un equipamiento genético nuevo mucho más complejo que el necesario para la transición de unicelulares a pluricelulares diferenciados. Esta última se ha debido basar en buena medida en la combinación de diversos dominios estructurales y patrones genéticos, para generar la creciente complejidad. Todo ello, es coherente con los tiempos estimados por la filogenia para estas transiciones, 2000 millones de años para la primera y 500 millones para la segunda.

El profundizar en el análisis de los programas genéticos, en la medida en que lo permite el conocimiento de genomas, nos adentra en la idea de un mundo biológico globalizado; la aparición de posibilidades genéticas nuevas es reducida y costosa, frente a las posibilidades de manejar las opciones ya existentes para generar complejidad.

LA CÉLULA DE LEVADURA EN SU MEDIO: DESARROLLO Y SUPERVIVENCIA

Generación de una interfase celular con el ambiente: la pared celular

El ambiente intracelular, separado del exterior por la membrana citoplasmática, alberga todo el conjunto de componentes fundamentales para la realización de las funciones básicas, es decir, el desarrollo y la multiplicación de la célula. Sin embargo, aunque la membrana citoplasmática constituye una barrera osmótica, bien equipada para los intercambios específicos con el exterior, no asegura una protección mecánica suficiente. La presión

osmótica en el interior de la célula puede ser muy elevada e imposible de controlar por la resistencia que aporte la membrana, una envoltura dotada de fluidez en su estructura. Por ello, muchos organismos, incluidas las plantas, disponen de una envoltura externa a la membrana, mucho más robusta para aportar esa protección, que llamamos pared celular. La mayor parte de los organismos unicelulares (bacterias, levaduras), y de los pluricelulares sin diferenciación en tejidos, también poseen una pared celular. De hecho, entre las bacterias sólo aquellas que pueden desarrollarse en condiciones que contrarresten la presión osmótica interna, los micoplasmas, por ejemplo, carecen de esta envoltura externa que es la pared. Las células de los organismos animales tampoco tienen pared celular, aunque sí una membrana citoplasmática adecuada para el mantenimiento de su integridad.

La pared celular, aun cuando constituya una estructura extracelular, por ser externa a la membrana, representa una parte integrante de la célula, está adherida a la propia membrana y en íntima relación con ella. La biosíntesis de sus componentes es función de los sistemas biosintéticos celulares, como la de cualquier otro conjunto de elementos estructurales de la célula. El estudio de la pared celular microbiana es un capítulo extenso de la tarea de investigación microbiológica, ya que los microorganismos no pueden sobrevivir sin esta protección. A modo de coraza externa, es portadora de los componentes con los que el microbio interactúa con el ambiente, en general. Además, lejos de constituir una estructura inerte, representa una interfase dinámica, en continuo proceso de renovación (34), ya que el crecimiento y la multiplicación de la célula demandan la generación de la estructura, sin afectar a la protección de la célula.

Cómo abordar la biogénesis de la pared celular de la levadura

Las primeras aproximaciones al estudio de esta estructura se dirigieron a los componentes de la pared celular, al estudio de su naturaleza química y, cuando fue posible abordarlos, a los mecanismos enzimáticos que dan lugar a su biosíntesis. La pared celular representa del 20% al 30% del peso seco total (86) de la

célula, una proporción altamente significativa que indica el esfuerzo funcional de la célula para crear su propia protección.

La imagen estructural que ofrece la pared celular de la levadura, mediante microscopía electrónica, muestra una envoltura externa, de mucho mayor grosor que la membrana citoplasmática, en la que se pueden distinguir dos o múltiples capas. La capa externa, oscura por su elevada densidad electrónica, consiste en un conjunto de proteínas altamente glucosiladas. La capa más interna la integran fundamentalmente los polisacáridos que le dan consistencia. Muchos de los detalles conocidos sobre esta estructura han sido descritos (55), al igual que se han formulado modelos adecuados para dar cuenta de la ordenación de sus componentes (74). El conocimiento acumulado sobre la estructura y composición química de la pared celular de los hongos en general, se ha basado en muchos años de abordajes químicos, sobre la naturaleza de los polisacáridos y las glucoproteínas integrantes, así como de la investigación de las enzimas que dan lugar a su biosíntesis. La pared celular de la levadura es representativa de la de los hongos en general, si bien en todo el conjunto de estos organismos se dan diversos patrones definitorios también de aspectos específicos de los distintos grupos (59).

En nuestro laboratorio, nos planteamos hace más de 25 años profundizar en aspectos de la pared celular de *S. cerevisiae*, que nos informaran sobre la propia formación de esta estructura protectora en el curso del desarrollo de las células. Se trataba de responder sobre todo a preguntas funcionales sobre su biogénesis dentro del proceso de crecimiento y desarrollo. Como sistema experimental nos centramos inicialmente en un conjunto de enzimas que, en el tubo de ensayo, mostraban capacidades hidrolíticas (glucanasas), degradando el 1,3- β -glucano estructural de la pared celular de la levadura, así como de hongos filamentosos. La dinámica de crecimiento de la pared, acoplada al desarrollo celular, podía requerir la modificación hidrolítica del glucano preexistente, para lo cual deberían ser necesarias algunas de las glucanasas que se detectaban en distintas localizaciones celulares (19). Además, la síntesis de estas enzimas en la levadura, parecía regulada en función del ciclo mitótico, o del ciclo meiótico, que conduce a la formación de esporas en las ascas (29).

Experiencias previas de trabajo en bacterias demostraban ampliamente la importancia funcional de enzimas auto-hidrolíticas de la pared celular bacteriana (autolisinas). Son enzimas degradativas que juegan un papel fundamental en el desarrollo de dicha pared; la acción antibacteriana de los antibióticos β -lactámicos se debía al descontrol de este equipo enzimático, en la célula bacteriana sometida a la acción del antibiótico en cuestión.

Decidimos también plantear estrategias genéticas, basadas en el amplio desarrollo que había experimentado la genética de la levadura, por la facilidad para aislar mutantes, así como caracterizarlos mediante procesos de complementación y recombinación. La hipótesis —razonable en aquel entonces— de que la obtención de mutantes, carentes de alguna de estas enzimas autolíticas, debería determinar un fenotipo de alteración en la formación de la pared celular, no pudo ser confirmada. Un mutante deficiente en la actividad 1,3- β -glucanasa mayoritaria, crecía y se desarrollaba sin ninguna alteración aparente (109). Este hallazgo, para nuestro grupo, fue la primera constatación de la existencia en *S. cerevisiae* de numerosos genes dispensables, tal como habría de ponerse de manifiesto más tarde. Ya hemos señalado que, al menos tres cuartas partes de los genes que alberga el genoma de la levadura son dispensables, la célula puede vivir en diversas condiciones sin precisar de su función. La frustración de lograr un altamente esperado mutante, y constatar después que carece de fenotipo, es algo que muchos grupos han experimentado. La alta redundancia del genoma de este organismo lo explica. Para nosotros fue el acicate de nuevas búsquedas mediante estrategias genéticas que orientaron nuestra inquietud por cuestiones de elevado interés y relevancia biológica.

La MAP quinasa Slt2: un hallazgo inesperado que desvela claves de la integridad celular en levaduras

La falta de significación fenotípica, de la deficiencia en 1,3- β -glucanasa de *S. cerevisiae*, nos llevó a explorar otra estrategia genética. Decidimos centrarnos en otros tipos de mutantes, que desde el principio mostraran un fenotipo alterado en la generación de su pared celular, para tratar de identificar los genes que

controlaran las funciones correspondientes. Nuestro colega Angel Durán, trabajando en los 70 en el laboratorio de Enrico Cabib (NIH, Bethesda, Maryland), había aislado varios mutantes termo-sensibles que, creciendo con normalidad a 25°C, resultaban inviables cuando la temperatura se elevaba a 37°C, un fenotipo letal que se podía remediar estabilizando el medio con agentes que equilibran la presión osmótica del interior de la célula. La disponibilidad de varios de estos mutantes, así como las técnicas de clonación de genes en levadura, introducidas al principio de los años 80 habrían de resultar altamente productivas. Los mutantes termosensibles —condicionales letales— con frecuencia están afectados de mutaciones que determinan pérdida parcial de la actividad de la proteína, de manera que sólo al elevar la temperatura se materializa la pérdida total de función. Con ello, el fenotipo deficiente se manifiesta sólo en esas condiciones de mayor temperatura. Sin embargo, no habría de ser así en la estirpe mutante en la que concentramos nuestros esfuerzos, como veremos, la mutación significaba pérdida total de función de la proteína, pero los efectos fenotípicos sólo suponían la inviabilidad de la célula a la temperatura alta, es decir, en condiciones de estrés térmico.

Los mutantes autolíticos (17) mostraban un fenotipo ilustrativo de la función protectora de la pared celular. Las condiciones habituales de crecimiento son notablemente hipo-osmóticas, al igual que ocurre normalmente en la naturaleza, de manera que la célula de *S. cerevisiae* no puede sobrevivir sin la pared celular. A temperatura no permisiva, sólo la adición de sustancias que elevaran la presión osmótica del medio⁵ permitía la viabilidad de las células, así como su multiplicación. Uno de estos mutantes, que mostraba con notable claridad el referido fenotipo autolítico termosensible, un defecto que se podía remediar por adición de un estabilizador osmótico, fue caracterizado en detalle por nosotros. Mediante genética mendeliana, llegamos a la conclusión de que identificaba un gen al que denominamos *LYT2*. Ello nos permitió plantear la clonación del gen afectado, utilizando una

⁵ Cualquier soluto que eleve la presión osmótica puede ser adecuado, si se emplea a suficiente concentración. Entre los salinos se suele utilizar cloruro sódico, pero es preferible una sustancia como el sorbitol, neutral desde el punto de vista de que no se transporta a través de la membrana, a una concentración de 0,5-1M.

genoteca de la levadura, ligada a un vector episómico de los que generan varias copias en la célula.

La búsqueda de un gen capaz de complementar la deficiencia genética de la referida estirpe mutante, *S. cerevisiae* *lyt2*, nos llevaría a un hallazgo inesperado, que habría de influir notablemente en la trayectoria científica de nuestro grupo. El gen clonado no mostraba ningún patrón indicativo de que codificara algún tipo de proteína con actividad enzimática biosintética, o modificadora, de componentes de la pared celular. Del análisis de su secuencia se deducía claramente que el producto de este gen era una quinasa de proteínas, de las que fosforilan cadena polipeptídicas, introduciendo los grupos fosfato en serina y treonina (115). El hecho de que el fenotipo del mutante se expresara de forma condicional (temperatura de 37°C, pero a 25°C) supuso un factor de confusión inicial, pero nos abrió las puertas a aspectos clave de las funciones afectadas. A través de nuestro trabajo y el de otros grupos, pronto pudimos determinar que la afectación del mutante no era debida a una mutación letal condicional, sino a un cambio genético que significaba la pérdida completa de función del gen. Los problemas de interpretación iniciales nos llevaron a denominar al gen clonado con el nombre de *SLT2*, así es como es conocido en la literatura científica. La actividad de la proteína quinasa *Slt2*, resulta crítica para el crecimiento celular a temperatura elevada (67) y el alelo mutante original estaba afectado por una mutación de sustitución, de la glicocola en posición 35 por aspártico, con la consiguiente pérdida de actividad.

El descubrimiento de la quinasa *Slt2* suponía la primera evidencia de un control regulatorio que afecta a la formación de la pared celular, por primera vez conocíamos un gen cuya funcionalidad resultaba relevante para la generación de una estructura compleja, sin estar directamente involucrado en la biosíntesis de sus componentes. Así quedaba patente, por el hecho de que *Slt2* presenta los patrones de estructura propios de las quinasas que ya se habían denominado MAP (*mitogen activated protein*) quinasas, de las que se conocían varios ejemplos en organismos superiores como los mamíferos. Son proteínas que habían sido identificadas por su papel central en el crecimiento y desarrollo, de

ahí su nombre de “quinasas activadas por mitógenos”. Así mismo, disponíamos de un gen cuya delección no causaba un fenotipo deficiente en condiciones de crecimiento a temperatura normal (la levadura está adaptada a crecer a 25°C o menos), pero cuya funcionalidad era crítica para la vida en condiciones de estrés térmico. En lo sucesivo nos referimos a cada una de estas quinasas MAP, como MAP-quinasa o MAPK.

El trabajo de nuestro grupo habría de concentrarse en la función de este gen para la formación de la pared celular y la morfogénesis, así como otros muchos de los fenómenos relacionados. Pero, de su estudio, pudimos percibir aspectos muy ilustrativos de vida microbiana eucariótica. Dos de esos aspectos son de resaltar; primero, hay muchos genes dispensables, la célula puede prescindir de ellos y desarrollarse con normalidad en una gran variedad de condiciones. Y, segundo, la supervivencia microbiana se basa en la capacidad de resistir al estrés, una buena parte de la información genética es requerida para responder a situaciones de agresión externa. La “soledad” del organismo unicelular demanda una dotación de funciones para la supervivencia en situaciones difíciles.

Además nos abrió el camino, para profundizar, junto con otros muchos grupos de investigadores en la existencia de circuitos regulatorios, bien integrados en la fisiología de la célula eucariótica, que articulan respuestas frente a estímulos de muchos tipos, mediante una activación de la transmisión de señales. Señales, respuestas, comunicación intra- e intercelular, son palabras que resumen aspectos del orden mantenido que es inherente a la vida.

MAP quinasas de integridad celular: Slt2, Mkc1 y otras

El descubrimiento de la quinasa Slt2, que tanto influyó nuestra trayectoria investigadora, abrió también el interés de otros laboratorios a los fenómenos básicos, por los que se regulan la generación de esa interfase de la célula microbiana con el ambiente. Incluso, dos años después de nuestra descripción del gen *SLT2*, se llevó a cabo reislamiento del mismo, utilizando una estrategia relacionada con la nuestra misma estrategia, con

la pretensión de renombrar⁶ este gen como *MPK1* (60), por parte de otro grupo interesado en proteína quinasas.

Nuestras investigaciones sobre la pared celular de levadura han estado también conectadas a la idea de comprender una serie de fenómenos de estos organismos que pueden ser relevantes para el desarrollo de antifúngicos, algo que como microbiólogos nos parece un objetivo fundamental (ver más adelante). Por ello, veníamos manejando desde hace tiempo la especie patógena oportunista *C.albicans*, en la que pudimos demostrar la existencia de un homólogo del gen *SLT2*, al que denominamos gen *MKC1*. Este gen, de la levadura patógena, resulta también ser funcional en *S. cerevisiae*, por lo que pudimos clonarlo en esta especie, seleccionando estirpes en las que el gen heterólogo produjera la correspondiente complementación funcional. En *C. albicans*, pudimos clonar un gen homólogo de *SLT2* al que designamos *MKC1* (77). La Figura 2 esquematiza las características de ambos genes, ilustrando al alto grado de homología existente entre ambos.

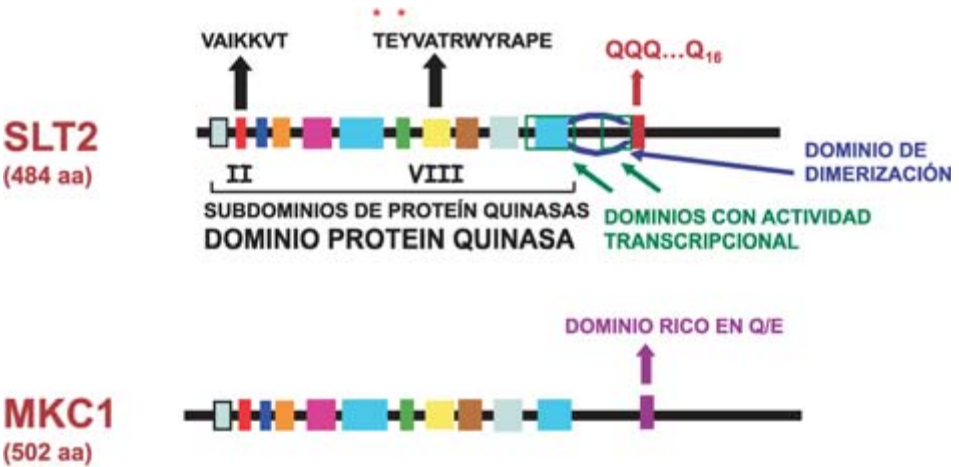


FIGURA 2. Esquema representativo de las MAP quinasas de Integridad Celular de *S. cerevisiae* (*Slt2*) y *C. albicans* (*Mkc1*). Se muestran los dominios estructurales más significativos.

⁶ Habitualmente, la comunidad científica tiene convenido el utilizar las designaciones que proponen los descubridores de cualquier gen, cuando publican sus hallazgos por primera vez. Cuando se trata de un gen clonado y secuenciado, la designación aparece además en las bases de datos de genes. Por ello, no tuvo éxito el intento de hacer desaparecer la designación *Slt2*, que se sigue utilizando con profusión para este gen en la literatura científica.

De nuevo, el hallazgo de un gen codificante de una MAP quinasa, en esta otra especie modelo que es *C. albicans*, resultaba decisivo para nuestra propia experiencia, así como para calibrar las consecuencias funcionales de la acción del gen correspondiente. El estudio de su funcionalidad requirió una estrategia más laboriosa, pues *C. albicans* es una especie diploide y la delección de un gen, mediante las estrategias habituales implica eliminar los dos alelos, por tanto proceder en dos pasos (95). Se obtuvieron estirpes con uno de los alelos *MKC1* deleccionado, así como con la doble delección, pero sólo estas últimas mostraban un fenotipo claro.

Un resumen de las experiencias que aportó este nuevo paso es el siguiente: La pérdida del gen *MKC1* no anula la viabilidad de *C. albicans*, sino que determina un fenotipo de sensibilidad especial al crecimiento a elevada temperatura. En este caso, las temperaturas han de ser más elevadas que 37°C, lo que es coherente con la adaptación de la especie a vivir como comensal en el organismo humano y animal. El crecimiento a 42°C, de la estirpe doblemente deleccionada (la designación es *C. albicans mkc1Δ/mkc1Δ*) sí que determina una reducción notable de la viabilidad, y mucho más si se produce un choque térmico a temperaturas más elevadas, como 55°C. Igualmente, se observa una mayor sensibilidad a cafeína, lo que se remedia por estabilización osmótica con sorbitol. La afectación de la pared celular se pone de manifiesto por una mayor sensibilidad de las células al tratamiento con mezclas de enzimas que degradan la pared celular de los hongos, las mezclas utilizadas para generar protoplastos. En ambos casos, la pérdida del gen tiene consecuencias drásticas, mientras que la estirpe silvestre resiste muy bien estas condiciones.

La caracterización de la función del gen en *C. albicans*, reveló con mayor claridad cuál puede ser la función de las MAP quinasa de integridad celular. La clave estaba en que las células requerían esta función para hacer frente a un estrés térmico en condiciones hipo-osmóticas. De carecer de la funcionalidad de la MAP quinasa, las consecuencias fenotípicas son de una mayor debilidad de la pared celular, pero que en condiciones normales de crecimiento, en situaciones en que el organismo se desarrolla

en la situación térmica habitual, el requerimiento de estas funciones es menos aparente, no parecen ser requeridas. Las palabras clave para explicar la actuación de este gen eran supervivencia en condiciones adversas, por la debilidad de la protección externa. Ello nos llevó a hablar de pérdida de integridad celular (67), una expresión que se incorporaría a la literatura científica, para establecer el concepto de ruta de integridad celular, para designar a la ruta de señalización definida por la MAP quinasa Slt2.

Pronto pudimos, además, analizar en *C. albicans*, si la carencia de la función de *MKC1*, tenía algún efecto sobre su poder patógeno, es decir su capacidad de producir infección. Un análisis de la capacidad infecciosa, llevado a cabo en un modelo de infección experimental de ratón, arrojaba un resultado claro, pero necesitado de una interpretación adecuada. Por inoculación de estirpes (32) de *C. albicans*, silvestre o las privadas respectivamente de una o de las dos copias del gen, se observa un indudable efecto del gen en el poder patógeno. El modelo experimental de ratón empleado, utiliza lotes de animales a los cuales se les inocula el microorganismo infeccioso, a través de la vena de la cola. En cada lote, inoculado con una estirpe determinada, se observa el porcentaje de mortalidad y el tiempo transcurrido para que este efecto se produzca. La pérdida de las dos copias del gen significa una reducción de la capacidad de producir la muerte del ratón, comparada con la capacidad virulenta de la estirpe silvestre. La delección de una de las copias determina, en este caso, una situación intermedia.

A la luz de los resultados indicados, la pregunta de si el gen *MKC1* es un factor de virulencia, o resulta fundamental para la patogenicidad, tendría una respuesta indicativa, pero no definitiva. Así ha ocurrido con muchos genes clonados de *C. albicans*, su eliminación significa una pérdida parcial del poder patógeno. Entonces, ¿es la patogenicidad un fenómeno gradual? La respuesta es sí, ya hace tiempo que los microorganismos pueden ser más o menos patógenos, por diversas razones, que van desde una capacidad infecciosa disminuida, hasta una capacidad agresiva más o menos intensa, una vez que la infección se ha producido. Pero, la patogenicidad de *C. albicans*, y su relación con genes y

funciones como la que nos ocupa, merece mayor espacio en este texto, por lo que se analiza en mayor detalle más adelante.

Se han identificado genes homólogos de Slt2 en otros muchos organismos, como hongos y plantas, con frecuencia recurriendo a nuestras estirpes de *S. cerevisiae*, para rastrear genotecas en busca de genes homólogos, ya que la alta homología suele permitir su funcionamiento. En la Tabla 1, se muestra un resumen de algunos de estos genes.

TABLA 1. MAPKs de integridad celular (homólogos a Slt2)

| Especie | MAPK | Referencia | Relevancia funcional |
|-----------------------------------|-------------|-------------------|-----------------------------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Slt2 | (115) | Integridad celular |
| <i>Candida albicans</i> | Mkc1 | (77) | Integridad celular |
| <i>Pichia pastoris</i> | Pim1 | (21) | Integridad celular |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | Mpk1 | (57) | Integridad celular |
| <i>Schizosacharomyces pombe</i> | Pmk1 | (114) | Integridad celular |
| <i>Pneumocystis carinii</i> | Mkp1 | (39) | Integridad celular |
| <i>Magnaporthe grisea</i> | Mps1 | (123) | Patogénesis |
| <i>Claviceps purpurea</i> | CPMK2 | (73) | Patogénesis |
| <i>Kluyveromyces lactis</i> | KLMPK1 | (54) | Relacionada con IC |
| <i>Medicago xativa</i> Alfalfa | MMK2 | (51) | Respuesta a patógenos |

LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE INTEGRIDAD CELULAR DE LA LEVADURA: CAMBIAR EN RESPUESTA AL CAMBIO

El descubrimiento en nuestro laboratorio de la MAP quinasa Slt2, permitió poner en relación lo que parecía un conjunto de funciones fundamentales de la célula de la levadura —la generación estable de su pared celular— con otras observaciones acerca de fenómenos regulatorios. La función de Slt2 era requerida, en términos precisos, para seguir manteniendo la capacidad de ge-

nerar la pared celular, cuando la célula ha de crecer en condiciones de estrés térmico. Así mismo, se conocían, o se fueron conociendo, otros genes que codifican otras quinasas de proteína, como *PKC1* (62) y *BCK1* (22), cuya delección determinaba fenotipos similares a los debidos a la pérdida de función de Slt2, aunque no se habían relacionado previamente de forma tan clara con las funciones de la pared celular. La carencia de la primera de ellas, además, determinaba un fenotipo de lisis celular a cualquier temperatura de crecimiento, no sólo la temperatura elevada, que podía remediarse por estabilización osmótica. Por diversas evidencias genéticas y bioquímicas, así como llevando a cabo comparaciones de secuencias, las actividades de las proteínas codificadas en estos genes se pudieron situar en una cascada secuencial de reacciones de fosforilación, que es capaz de recibir estímulos, generar señales y articular respuestas celulares. Dadas las características de esta ruta de transmisión de señal se le ha denominado “ruta de integridad celular” (IC). La ruta de integridad celular (IC) se identificó con posterioridad a otra ruta de señalización similar, en concreto la ruta de apareamiento, que activa el reconocimiento entre células de tipo sexual opuesto. Paralelamente se caracterizaba la existencia de otras vías de transmisión de señales, con similitudes en su organización. Una de ellas, es la ruta que permite a la célula reaccionar a situaciones de alta osmolaridad en el medio, acumulando glicerol en su citoplasma. Ha sido denominada ruta de alta osmolaridad-glicerol (*High Osmolarity-glycerol*, abreviadamente HOG) (47). De alguna manera contrarresta el efecto opuesto al de la integridad celular, aquél es supervivencia al estrés hiper-osmótico, mientras que éste permite superar el hipo-osmótico.

A lo largo de más de quince años, el control de la integridad celular ha sido objeto de atención en muchos laboratorios, por lo que conocemos numerosos detalles de su organización y funcionamiento, si bien quedan aun bastantes aspectos por investigar. La ruta IC, al igual que otros circuitos regulatorios, que existen tanto en la levadura como en otros organismos superiores, por ejemplo, en las células de los mamíferos, responde a un diseño común con otras rutas de señalización similares. A medida que se van conociendo los detalles, se pone de manifiesto que estas vías regulatorias tienen una arquitectura que permite la recep-

ción de estímulos, así como la transmisión de las señales que estos originan, de manera que, finalmente, se active la respuesta celular correspondiente.

Hay una distribución espacio-temporal del sistema señalizador, de manera que sus componentes se localizan en los espacios celulares que corresponde (membrana, citoplasma, núcleo), y actúan de forma coordinada durante los períodos de tiempo precisos. Las rutas de señalización suponen, por tanto, sistemas de comunicación intracelular, que se conectan al exterior. Constituyen, igualmente, una red de interacciones que han de funcionar de forma de forma precisa, con controles regulatorios en muchos de sus puntos de activación. El Profesor Jesús Pla, de nuestro departamento, ha insistido en denominar al conjunto de circuitos regulatorios que constituyen las rutas de señalización, como el “sistema nervioso” de unos organismos como los hongos, que bien en forma unicelular (levaduras) o bien creciendo como hifas, han de reconocer el ambiente en el que se desarrollan y actuar en consecuencia. La designación propuesta es ciertamente muy gráfica, pues la existencia de un conjunto de rutas de señalización, así como la interrelación que a veces se establece entre ellas, da lugar a esquemas ciertamente complejos, que podrían asemejarse a incipientes redes neuronales.

Arquitectura de los circuitos regulatorios controlados por MAP quinasas (MAPKs)

La arquitectura de estos circuitos regulatorios, propios de las células de los microorganismos eucarióticos, y que tiene sus homólogos en otros organismos más complejos como animales y plantas, refleja igualmente algunos aspectos de en qué consiste la mayor complejidad de la célula eucariótica, con respecto a la bacteriana. Los numerosos estudios sobre sus elementos integrantes y su organización, muestran que hay cuatro facetas esenciales en el funcionamiento de cada ruta de señalización: (i) los sensores, es decir los receptores que reciben los estímulos; (ii) los sistemas que comunican dicho estímulo al interior celular para activar reacciones de fosforilación de proteínas; (iii) un conjunto de enzi-

mas con actividad de proteína quinasas, integrantes de una cadena de reacciones secuenciales de fosforilación, es decir un módulo de quinasas de proteína, que culmina en la fosforilación de una MAP quinasa; y (iv) finalmente, los componentes celulares sobre los que actúa la MAP quinasa, para articular la respuesta celular, generalmente basada entre otras cosas en la expresión regulada de genes. Las MAPKs actúan, por tanto, a nivel del núcleo, activando de manera regulada el funcionamiento de un número elevado de genes. Esto incluye la fosforilación de factores de transcripción, pero puede implicar también otras actuaciones directas sobre el material genético (ver más adelante).

Son cuatro escalones propios de unas rutas celulares cuya arquitectura se nos revela realmente compleja, especialmente si se compara con los sistemas bacterianos o con otros elementos regulatorios propios de la célula eucariótica. Por ello, sólo a través del análisis detallado, tanto de los integrantes de estas rutas como de su funcionalidad, podemos llegar a calibrar los resultados que aporta al funcionamiento celular, un sistema de tan complejo diseño. Desde el punto de vista de esa funcionalidad, las rutas de señalización suponen:

— Una notable *especificidad* en la recepción de señales. Los sensores son capaces de discriminar los estímulos y transmitirlos adecuadamente, con la intensidad necesaria.

— Una significativa capacidad de *amplificación de la señal*. La cascada de reacciones de fosforilación multiplica las moléculas de proteína receptoras del estímulo por un mecanismo de amplificación catalítica.

— Una vía de *transmisión de señal altamente controlable*, pues muchos de los integrantes de la cadena, particularmente la quinasa MAP, están sometidos no sólo a activación sino a controles negativos de su actividad, por ejemplo mediante la acción de fosfatasa.

— Una *distribución espacial* de la respuesta que se inicia en la superficie celular y llega hasta el propio núcleo, determinando la expresión de genes concretos. Igualmente, los integrantes de la

cascada pueden localizarse en zonas específicas de la célula, como lugares de crecimiento o las estructuras del citoesqueleto.

— Una *interrelación* entre las rutas de señalización, que permite aprovechar algunos de sus tramos en procesos comunes con otras, especialmente en determinadas circunstancias. La economía celular, así como el hecho de que muchos de los mecanismos sean compartidos, conduce a ese aprovechamiento de recursos regulatorios que son estos sistemas bien afinados de funcionamiento celular.

En definitiva, este aspecto de la comunicación intracelular, se regula en función de la intensidad (*tuning*), del momento (*timing*) y de los participantes (*teaming*) en cada situación de respuesta a los estímulos que provienen del exterior celular, mediante diversos tipos de mecanismos moleculares, tanto pre-traduccionales como post-traduccionales que ajustan la conformación, la abundancia y la localización de componentes celulares.

Integrantes de la ruta de señalización de IC

El conocimiento que tenemos de la ruta IC de la levadura (61), ilustra la forma en que se materializan en ella muchos de los aspectos antes mencionados (Figura 3):

Los sistemas de recepción y transmisión inicial de las señales, integrados por uno o varios receptores de la superficie celular, que actúan como *sensores*, reaccionan ante determinados estímulos. La complejidad del propio proceso receptor, se refleja en el caso de la ruta IC por la existencia de al menos cinco proteínas de membrana, pertenecientes a dos subfamilias, que pueden desempeñar esa acción. Los receptores denominados Wsc1, Wsc2 y Wsc3, por un lado, y los Mid2 y Mtl1, que también han recibido otras designaciones, son proteínas integradas en la membrana citoplasmática, con un extremo C-terminal citoplasmático, un dominio trans-membrana y un ectodominio periplásmico, rico en serina y treonina que está altamente glicosilado. Se ha propuesto que podrían constituir una especie de sensores mecáni-

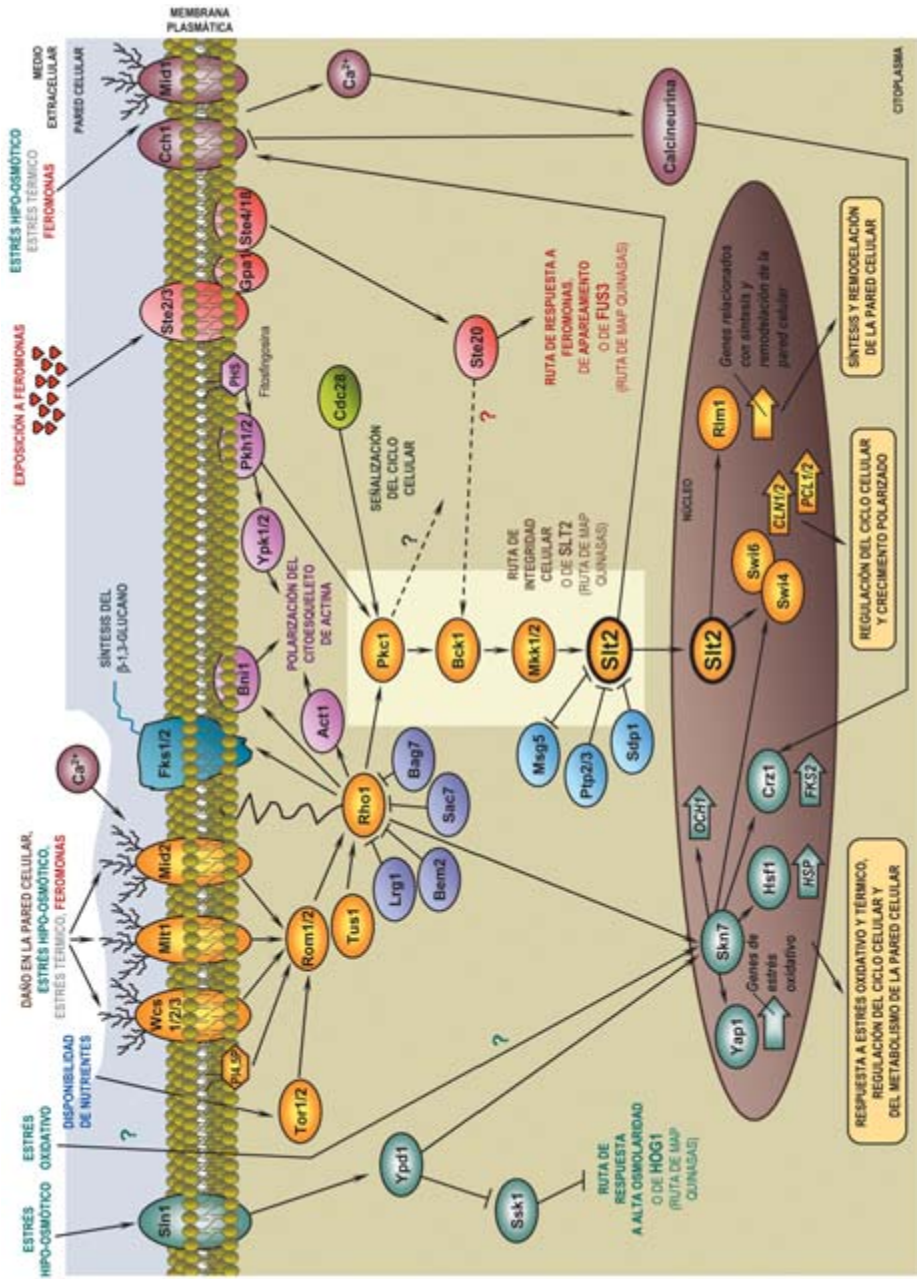


FIGURA 3. Diagrama esquemático la ruta de señalización de Integridad Celular de *S. cerevisiae*, controlada por la MAPK Slt2 y el conjunto de interrelaciones con otras vías de señalización, así como otros componentes celulares. RUTAS DE MAPK: **amarillo-ámbar**: Ruta de **integridad celular** o de **Slt2**; **verde oscuro**: Ruta de **respuesta a alta osmolaridad** o de **Hog1** (solamente señalados los elementos relacionados directa o indirectamente con la ruta de Slt2). **rojo**: Ruta de **respuesta a feromonas**, de **apareamiento** o de **Fus3** (igualmente, solamente los relacionados con Slt2). **OTRAS RUTAS o GRUPOS**: **azul**: **Fosfatasa** que actúan a nivel de Slt2. **violeta**: **rosas**: **GAPs** (GTPase-activating proteins) de Rho1. Promueven el paso de su estado activo (Rho1 unida a GTP) a su estado inactivo (Rho1 unida a GDP). **verde azulado**: Complejo de la **glucan sintetasa** (Fks1/2) activado tras su unión con Rho1 en su estado activo (Rho1-GTP). **rojo teja**: Ruta de la **calcineurina**. **verde**: Señalización de **ciclo celular**.

cos, si bien esta opción no está confirmada. También faltan muchos detalles por conocer en relación con la forma en que estos receptores actúan para transmitir la señal al primer efector, perteneciente al grupo de las proteínas G.

La señal recibida por alguno de los receptores de superficie, que actúan como sensores, ha de ser trasladada mediante *moléculas señalizadoras*. En las células eucarióticas, y en la levadura en concreto, existen una cantidad notable de estas moléculas pertenecientes a familias definidas estructural y funcionalmente, principalmente del tipo de las GTPasas (proteínas G heterotriméricas o pertenecientes a la superfamilia Ras) y de las quinasas de proteínas o de lípidos. La actividad enzimática de estos componentes está a su vez regulada por segundos mensajeros no proteicos (como AMPc, fosfolípidos, calcio, etc.) o por moduladores de naturaleza proteica como las proteínas GAP (GTPase-activating protein) o GEF (GDP/GTP exchange factor), en el caso de las GTPasas, y las fosfatasa de proteínas o de lípidos, en el caso de las quinasas. El componente fundamental en la ruta de IC para este propósito, es la GTPasa Rho1, que es activada por la acción de la GEF Rom2, la cual se dispara por la actuación del sensor. Con ello, los impulsos principales de la pared celular son trasladados, activando la proteína quinasa Pkc1. Ambas proteínas, Rho1 y Pkc1, tienen un papel esencial en el progreso de la señal a través de la ruta IC, pero igualmente participan en reacciones colaterales, y alcanzan una notable distribución en distintas localizaciones celulares. La activación de Pkc1, resultante de la generación del estímulo, determina la activación del módulo de fosforilación o módulo de MAPK.

El progreso de la señal afecta ya a este *módulo de fosforilación*, integrado en todas estas rutas por tres quinasas que actúan de manera secuencial, para fosforilarse en cascada. Este módulo triple de quinasas, tan ampliamente extendido, culmina en la fosforilación de una MAPK, la fosforilasa definitoria de la ruta y que finalmente activará la respuesta celular. Se han adoptado terminologías comunes para designar a las proteína-quinasas de estos tripletes, identificadas en cascadas microbianas y de mamíferos; con designaciones alusivas a su funcionalidad. A la primera de ellas se le denomina MAPKKK (MAP-quinasa-quinasa-qui-

nasa), lo que significa que su función es fosforilar a otra proteína con actividad fosforilante, designada a su vez como MAPKK (MAP-quinasa-quinasa), que a su vez fosforila a la MAP-quinasa (MAPK) la efectora al final de la cascada. La activación de las MAPKs se produce finalmente por adición de dos grupos fosfato a la cadena proteica, en concreto en una treonina y una tirosina, que son características de su dominio de activación (ver Figura 2). En la ruta de IC, la identificación de los genes responsables de las tres quinastas en *S. cerevisiae*, determinó una nomenclatura de los mismos tan arbitraria como suele ser común, si bien los nombres se han ido consolidando en la literatura de manera inevitable. El gen *BCK1*, codifica la MAPKKK, denominada lógicamente Bck1. En cuanto a la función MAPKK, se aislaron dos genes homólogos, *MKK1* y *MKK2*, que codifican las enzimas Mkk1 y Mkk2, y actúan llevando a cabo la fosforilación del eslabón central de la ruta, la quinasa Slt2, codificada por el gen *SLT2* (111).

La activación de Slt2 determina la respuesta celular propiamente dicha. La localización de esta proteína, tanto en el núcleo como en el citoplasma, revela una notable complejidad en sus efectos funcionales. En cualquier caso, las dianas mejor establecidas, como sustratos de fosforilación por parte de Slt2, son dos factores de transcripción situados en el núcleo, Rlm1 y SBF (Swi4/Swi6). Además, existen varias posibles dianas citoplasmáticas para esta MAPK lo que indica que una multiplicidad de acciones que añade interés al estudio de su función.

La ruta de señalización de IC, considerada en conjunto, engloba una serie de funciones, de percepción de cambios en el ambiente físico-químico externo, que a la célula de levadura no le pueden pasar desapercibidos, puesto que afectan de manera fundamental a su homeostasis. Son cambios que demandan a su vez modificaciones en la célula, todo en aras de su mantenimiento, lo que en este caso significa mantenimiento de su integridad. Algo que se pone de manifiesto porque al desaparecer el funcionamiento de ruta de IC, la levadura moriría. Ello es debido a la pérdida de la capacidad de reaccionar, precisamente porque al crecer no puede generar una pared celular estable. Desde el punto de vista operativo, y a la vista de infinidad de resultados experi-

mentales, la ruta de IC se puede calificar como una cadena de reacciones para superar situaciones de estrés, en concreto las que se derivan de algún tipo de choque térmico, y, como indicamos más adelante, otras agresiones debidas fundamentalmente a agentes que debilitan, alteran o degradan la pared celular. La vida de la levadura en el ambiente natural está plagada de este tipo de circunstancias.

La pregunta que surge entonces es si la maquinaria celular implicada, cuya generación supone una notable cantidad de esfuerzo biosintético por parte de la célula, existe únicamente para responder a esas situaciones de emergencia. La respuesta es claramente no; muchos de los integrantes de la ruta de IC forman parte de procesos habituales que se desarrollan en situaciones no agresivas para la célula, se integran en la economía celular de las más diversas formas. Además, incluyen numerosos controles regulatorios, de manera que su actuación se adapte a las circunstancias en cada caso.

Activación de la ruta de IC: del ciclo celular a la respuesta frente a emergencias

El descubrimiento de muchos aspectos del funcionamiento de la ruta de IC, en especial el de la MAPK Slt2, se ha basado en la necesidad de estas funciones en situaciones de estrés (térmico y otros). Sin embargo, una vez perfilados los componentes celulares integrados en esta cascada de reacciones, el abordaje experimental de su funcionamiento y regulación se ha podido afinar mucho mejor. Una estrategia desarrollada en nuestro laboratorio bajo la dirección de la Profesora María Molina, y ampliamente utilizada, es la determinación directa de la activación de la MAPK Slt2, mediante el empleo de dos anticuerpos. Anticuerpos dirigidos frente a la proteína permiten detectar, y cuantificar en su caso, los niveles de la misma, mientras que con anticuerpos capaces de reconocer la doble fosforilación de esta proteína hacen posible cuantificar su grado de activación (69). El procedimiento ha tenido un notable éxito para analizar, de manera precisa y directa, la activación de la ruta de IC y otras cascadas de señalización dependientes de MAPKs.

Muchas de las observaciones relevantes sobre esta cuestión tienen que ver con la polaridad de los componentes, es decir su localización en puntos de crecimiento de la célula, que en la levadura se polarizan en las zonas por donde emerge y se desarrolla la yema que dará lugar a la célula hija. Así, durante el crecimiento vegetativo existe una activación dependiente del ciclo celular, que coincide con la aparición de la yema emergente (124). También existe activación de la ruta asociada al crecimiento apical durante el proceso de apareamiento (15). En consonancia con esto, Slt2 se localiza en la zona apical de la prolongación del *shmoo*⁷ y en la yema durante su emergencia y desaparece en cuanto la yema comienza a crecer de manera isodiamétrica, coincidiendo con el final de la fase G1 (118). En el momento de la citoquinesis, Slt2 también se localiza en la zona del septo, pero por dificultades técnicas nadie ha demostrado que en esta fase exista una activación de la ruta. La localización en la yema emergente depende de su interacción con la proteína del polarisoma Spa2, que a su vez también incorpora a ese lugar a Mkk1 y Mkk2. Ni la presencia de Mkk1/2 ni la fosforilación activadora de Slt2 son necesarias para la localización de la MAPK en estos sitios de polaridad (datos nuestros no publicados). Por tanto, es posible que dicha localización sea un pre-requisito para su activación dependiente de ciclo, pero no al contrario.

Por tanto, hay todo un conjunto de observaciones demostrativas de la regulación de Slt2, en consonancia con el desarrollo del ciclo de crecimiento de las células, que indican su funcionalidad acoplada a procesos de vida en situaciones “normales”, es decir no estresantes. Pero, es en algunas situaciones de emergencia, causadas por diversos agentes, en las que resulta más patente la necesidad de la ruta de IC para la supervivencia de estas células. De hecho, el seguimiento de la localización celular de Slt2, o de otros componentes de la ruta de IC, resulta altamente indicativo, pues la respuesta conlleva desplazamientos y relocalizaciones de las proteínas propias de la ruta.

⁷ Se denomina *shmoo* a la forma que adopta la célula de la levadura, al ser estimulada por la hormona sexual antes del apareamiento. Se producen notables cambios de forma, lo que implica una profunda remodelación de la pared celular.

La ruta de integridad celular se activa en respuesta a la despolarización del citoesqueleto de actina; esta despolarización se produce bien como consecuencia de un cambio de temperatura (como sabemos) o bien por acción de agentes químicos como la trunculina, un inhibidor de la polimerización de actina (45). El mecanismo molecular de esta activación no se conoce, pero la ha implicado en el “punto de control” (*checkpoint*) morfogénico, que bloquea el ciclo celular en la fase G2 hasta que la polaridad de la actina se restablece. Se desconocen tanto el mecanismo que conecta la despolarización de la actina, con la activación de la ruta, como el que comunica a Slt2 con los mecanismos de control de ciclo.

Todas las MAPKs se activan en el citoplasma, donde se encuentran las MAPKKs, y una vez activadas se traslocan al núcleo para desencadenar una respuesta transcripcional. En este sentido, Slt2 es excepcional porque siempre se encuentra más enriquecido en el núcleo que en el citoplasma, independientemente de su estado de fosforilación. En cuanto a la localización de otros miembros de la ruta, no existen datos claros de localización de Bck1, la MAPKKK. La localización de Pkc1 sí ha sido estudiada en profundidad (30), (8). En lo que concierne a su papel como pieza clave para la activación de Slt2, cabe destacar que su localización resulta un marcador adecuado de los sitios de activación de la GTPasa Rho1, con un patrón similar al descrito anteriormente para Slt2. Cuando se pierde la polaridad por un choque térmico, por ejemplo, Pkc1 se reubica desde los sitios de polaridad a todo el contorno celular hasta que la polaridad se restablece. Sin embargo, tratando las células con zimoliasa (un complejo enzimático capaz de degradar la pared celular) se refuerza la localización en sitios de polaridad.

Reparación del daño producido en la superficie celular: análisis genómico de la activación de la ruta de IC

Como hemos dicho, nuestro interés en estas investigaciones ha estado siempre inspirado en la posibilidad de aprovechar el conocimiento de estos mecanismos, propios de la célula fúngica, para desarrollar estrategias que permitan su destrucción. Nada

más apropiado para interferir con su desarrollo y provocar su muerte, que conocer mejor cómo se defiende frente a estos ataques que pueden tener lugar en la superficie celular. Si el hallazgo de la función esencial, la que desempeña la MAPK Slt2, se basó en su relevancia para resistir al estrés térmico, pronto se puso de manifiesto que la pérdida de esta función también hacía más vulnerable a la célula, al ataque de agentes que alteran las estructuras de la pared celular.

La dinámica de la pared celular demanda el que se produzca una remodelación de la misma, cuando la levadura crece en las condiciones adversas que pueden provocar determinados agentes que alteran la estructura. Eso es lo que ocurre en presencia de Rojo Congo, de Blanco de Calcofluor o de inhibidores de la glucan sintasa (neumocandinas), se pone en marcha una respuesta. Esta respuesta celular correctora ha sido estudiada con cierto detalle (97), (55), (61), se da también en situaciones de alteración permanente, como la carencia de genes importantes para la construcción de la pared celular, y ha recibido el expresivo nombre de “mecanismo compensatorio” (28).

Tal como cabría esperar, los procesos que se activan en el mecanismo compensatorio suponen (i) un aumento en la síntesis de quitina, el polisacárido menos abundante en la pared celular de *S. cerevisiae*, pero que tiene una notable relevancia como orientador de muchos de los procesos de construcción del entramado de la pared celular; (ii) una redistribución del complejo biosintético 1,3-b-glucan sintasa por toda la célula, lo que da cuenta de una actividad intensa de formación de polisacáridos estructurales; (iii) cambios significativos en la asociación entre polímeros de dicha pared celular, como la reducción notable de asociación de proteínas unidas directamente a quitina (52); y (iv) una modulación notable en las proteínas de la pared celular, manifestada en el aumento de la síntesis de muchas de ellas (105).

En nuestro laboratorio, se ha venido abordando una caracterización de los detalles moleculares del mecanismo compensatorio, dirigida por el Profesor Javier Arroyo, que todavía está en marcha. Se basa en abordajes de análisis a todo lo largo del genoma (*genome-wide*), que emplean tanto análisis transcriptó-

micos utilizando micro-arrays de ADN (40) como estudios de rastreo de colecciones completas de mutantes, delecionados en todos y cada uno de los genes de *S. cerevisiae*. Los análisis transcripcionales indicados suelen conducir a un elevado número de datos, que con frecuencia no todos encajan dentro de un modelo que explique la totalidad de las observaciones. Sin embargo, también arrojan luz de forma notable sobre algunos aspectos clave. Un resumen de los hechos establecidos sería el siguiente:

La respuesta más común, articulada frente al tratamiento con una gran variedad de agentes agresivos de la pared, o provocada por deficiencias génicas, incluye la activación de la transcripción de genes de remodelación de la pared celular, de estrés, de metabolismo y de transducción de señales. Es la ruta de IC la que principalmente regula la respuesta celulares a agresiones a la pared celular. Ello significa que la MAPK Slt2 es el instrumento principal, que además lo hace de forma casi totalmente dependiente del factor de transcripción Rlm1p.

Sin embargo, este tipo de análisis también pone de manifiesto las implicaciones de otras rutas de señalización en la respuesta frente a daños en la pared celular, mostrando una vía prometedora para caracterizar algunos de los patrones del “diálogo” entre rutas de señalización. Entre estas, destacan la ruta de señalización de “alta osmolaridad-glicerol” (ruta HOG) (106), Rodríguez et al., 2007, sometido a publicación) y la ruta de Calcineurina. Es a través de la utilización de diversos tipos de agentes causantes del daño en la superficie celular (Rojo Congo, zimoliasa, neumocandinas) como se demuestra el ajuste en la respuesta y la necesidad de diversos tramos de activación de las rutas, para desencadenarla. En definitiva, hay un notable grado de ajuste en el funcionamiento de las rutas de transducción de señales, capaz incluso de activar diferentes respuestas frente a algún tipo de daño más general, dependiendo del agente que lo cause. Resultados muy recientes obtenidos en nuestro laboratorio, demuestran que la discriminación de señales, debe estar basada en la especificidad del receptor-sensor que se encarga de la captación de dichas señales, y en el propio proceso de transmisión intracelular de la misma, que acaba confluyendo en al activación de un tipo de factor de transcripción.

La activación de la vía de señalización de IC, por parte de agentes que perturben la pared celular, constituye también un sistema muy adecuado para profundizar en los mecanismos finales de regulación de la expresión génica. Como señalamos más adelante representa una opción muy adecuada para profundizar en la propia especificidad de la ruta. De hecho, las MAPKs no sólo se fijan a los factores de transcripción a nivel de los promotores que regulan, sino que participan en complejos proteicos que se fijan a la cromatina, ocupando regiones estructurales de los genes que regulan (96), lo que aporta un mecanismo que añade posibilidades de especificidad a sus capacidades regulatorias. Por ello, en nuestro laboratorio se aborda también esta temática.

Proteínas de Integridad Celular

Los aspectos hasta aquí descritos, abarcan apenas algunos detalles sobre la generación de esa estructura protectora de la célula de la levadura, en especial en situaciones menos favorables, que constituye la pared celular. El bloque de reacciones de la ruta de IC conecta su formación con el conjunto integrado de funciones celulares. Pero, hay otras posibilidades para aproximarse a la biogénesis de la estructura. En nuestro caso, nos ha interesado especialmente el estudio de las proteínas de la pared de la levadura —lo que puede denominarse el subproteoma de la pared celular— además de abordar en concreto el análisis detallado de algunas de ellas. La Profesora Concha Gil se responsabiliza de manera directa de los estudios de Proteómica.

En el curso de los primeros análisis sistemáticos de genómica funcional, una vez secuenciado el genoma de *S. cerevisiae*, diseñamos junto con otros grupos de investigación un ensayo sistemático de estirpes delecionadas en varios cientos de genes, para detectar la implicación de cada uno de ellos en las funciones de biogénesis de la pared celular (27). Los ensayos para rastrear un conjunto tan elevado de estirpes se diseñaron de manera jerárquica; tras unas primeras pruebas sencillas que supusieran una primera búsqueda indicativa, se procedía a caracterizar en mayor detalle, mediante estudios mucho más específicos, solamente

aquellos genes que se revelaran como buenos candidatos a funciones de pared celular. Entre otras, se incluían desde la activación del mecanismo compensatorio, hasta la afectación del subproteoma de la pared celular y alguna más.

Extrapolando los resultados, y asumiendo que los genes estudiados constituían una muestra aleatoria del conjunto, pudimos estimar que más del 20% del genoma de *S. cerevisiae*, es decir unos 1200 genes deben de estar implicados en la biogénesis de la estructura. Tal es la complejidad de los mecanismos para generarla, como hemos visto en una pequeña parte, que podemos presumir que la estimación es coherente con la realidad. Naturalmente, ese elevado número de genes tiene que codificar sistemas enzimáticos biosintéticos, proteínas regulatorias y, además, proteínas estructurales integrantes de la propia pared celular, cuya presencia es conocida desde hace tiempo, si bien sigue estando pendiente una caracterización completa de todo ese subproteoma.

Las manoproteínas constituyen un 40% del peso seco de la pared celular, muchas han sido caracterizadas tras su extracción por procedimientos que denotan su unión covalente a los polisacáridos estructurales. Un buen número de estas moléculas proteicas, están unidas a 1,6- β -glucano a través de un residuo de glucosil-fosfatidil-inositol (GPI) (26), constituyendo una población muy característica, dentro del proteoma de la pared celular. Llevará tiempo completar las funciones de todas y cada una de estas proteínas, individualmente. Pero algunos de nuestros datos, apuntan también a funciones importantes para la integridad de la pared celular y su conexión con la ruta de señalización de IC. Dos aspectos merecen comentario en este punto:

Las proteínas con anclajes GPI, denominadas Pst1 y Ecm33 son homólogas y presentan un patrón de estructura típico de las que tienen el referido anclaje. La primera fue identificada en las primeras aproximaciones proteómicas al estudio de la pared celular de la levadura (87), mientras que la segunda se identificó por la homología del gen codificante con la primera. Aunque las células son viables, la delección del gen *ECM33* conduce a defectos que causan un debilitamiento de la pared celular, deficiencias que se agravan cuando se deleciona además el gen *PST1* (88). La

delección del primero conduce a una activación permanente de la ruta de IC, con niveles elevados de Slt2, todo apunta a una activación de mecanismos compensatorios de una deficiencia probablemente debida a defectos de glicosilación en las proteínas.

La búsqueda en las bases de datos del genoma de *S. cerevisiae*, nos puso en la pista de una familia de proteínas de pared celular, que, por los patrones de su secuencia podía tener interés en relación con la dinámica de esta estructura. Uno de los genes, fue secuenciado por nosotros como parte del fragmento del cromosoma VII, que nos correspondió dentro de los esfuerzos de más de 100 grupos europeos, para secuenciar este genoma, en etapas aun relativamente artesanales. Nos interesó este gen, porque de su secuencia se podía predecir una proteína con características muy interesantes, para nuestros propósitos de entender la dinámica de la pared celular. Esta proteína respondía a las características de proteína de secreción (por su péptido-senal), con un dominio de anclaje GPI (situado en el extremo C-terminal). Igualmente, la comparación dejaba claro que incorporaba dominios de actividad enzimática potencial, del tipo de β -glucanasas bacterianas, o de transglicosidasas de eucariotas, es decir, su función podía estar relacionada con la formación o remodelación de estos polisacáridos de la pared celular. Además, rastreando la totalidad de las secuencias, resultó que en el genoma de *S. cerevisiae* existían otros dos genes parálogos⁸, incluidos en cromosomas diferentes. Todo ello ilustra el valor de la genómica comparada, y de la identificación de genes ortólogos⁹ y parálogos, en el curso de estas búsquedas. Esta familia de proteínas, a las que denominamos Crh1, Crh2 y Crr1, las dos primeras por dar un fenotipo sensible a Rojo Congo, cuando la célula pierde su función, y la tercera por su relación con las anteriores, resulta ser igualmente relevante para la integridad celular (Rodríguez-Peña et al., 2000). La proteína más relevante de estas tres se transporta a los lugares de crecimiento polarizado, por vías secretoras compartidas con las que transportan los sistemas de síntesis de quitina. Para su posicionamiento correcto, se requiere el andamiaje que origina el cuello de gemación y el anillo de septinas (107).

⁸ Parálogos son genes homólogos presentes en el mismo genoma.

⁹ Ortólogos, genes homólogos pertenecientes a genomas distintos.

Todo un ejemplo de organización espacial precisa de los procesos morfogénéticos de la levadura, que demandan el situar a cada componente en un espacio determinado con precisión. Como era de esperar, la transcripción del gen *CRH1*, es activada notablemente en la respuesta celular propia del mecanismo compensatorio, provocada por agentes que dañan a la superficie celular. La demostración reciente, mediante estrategias bioquímicas y genéticas, de que Crh1 y Crh2, son las primeras enzimas para las que se prueba un papel en el entrecruzamiento de polisacáridos (quitina y glucano) (16), en la pared celular, de la levadura acentúa el interés de estas proteínas, para la morfogénesis celular. Su manejo está igualmente justificado si se trata de buscar elementos funcionales en los que intervenir, para desarrollar una acción antifúngica.

También se encuentran proteínas inesperadas en la superficie celular

Como hemos señalado, las aproximaciones de gran escala, genómicas, proteómicas, etc. suelen producir gran cantidad de datos, algunos de los cuales no encajan, en principio, en modelos bien establecidos. Ese ruido de fondo puede ser debido a artefactos experimentales o ser representativo de fenómenos de poco interés. Sin embargo, también puede poner de manifiesto cuestiones en las que anteriormente no se había pensado, que aportan nueva información, ya que se han empleado estrategias experimentales distintas. Este es el caso de algunos de nuestros recientes estudios del subproteoma de la pared celular, tanto de *S. cerevisiae* como de *C. albicans*, los dos modelos experimentales que manejamos.

Los hechos observados requieren investigación adicional, para esclarecer algo de lo que puede ser su función en relación con la pared celular, pero hemos de describirlos porque las evidencias son relevantes. La extracción de proteínas de paredes celulares aisladas, y lavadas de manera exhaustiva, da lugar a extractos con una cantidad significativa de proteínas carentes de péptido señal. Entre ellas, están proteínas enzimáticas, como las responsables de la vía glucolítica propia del metabolismo celular, un

equipo enzimático típico del citoplasma, integrado por proteínas de abundancia elevada. También se han encontrado otras proteínas carentes de péptido-síñal como proteínas de choque térmico (*heat shock*), incluso algunas de las que interactúan con el ribosoma. La detección de estas proteínas en el espacio extracelular se ha atribuido con frecuencia a posibles artefactos experimentales, puesto que la gran cantidad de estas moléculas podía determinar su adherencia a la pared celular. Sin embargo, también tiene lugar su secreción por parte de protoplastos (células privadas de la pared celular) en medio osmóticamente estable que les permite ser viables y regenerar su pared (87). La posible desestabilización de la membrana, con la consiguiente lisis, de una parte de los protoplastos, se puede descartar empleando controles que demuestran la ausencia de otras proteínas citoplasmáticas, que no sean las indicadas.

¿Cabe entonces pensar en la existencia de mecanismos de secreción de proteínas, que no dependan de la posesión de un péptido señal? El descubrimiento del referido péptido, un dominio proteico altamente lipófilo, que dirige a la proteína a través del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, en su proceso de secreción, consolidó un modelo canónico de exportación de proteínas, que resulta altamente coherente. Las proteínas de secreción buscan su camino hacia el exterior a través del péptido-síñal, que posteriormente es eliminado *in vivo* una vez que la proteína es transportada. Son hechos que están también ampliamente demostrados. Por ello, las observaciones indicadas, resultantes de estudios proteómicos nos obligan a efectuar experimentación rigurosa, tanto para demostrar la fiabilidad de la observación como para profundizar en su significación biológica.

El primero de los aspectos —la capacidad de estas proteínas para transportarse hacia el exterior— viene siendo corroborado mediante experimentos genéticos. La observación más relevante ha consistido en desarrollar construcciones híbridas de proteínas recombinantes, en las que la invertasa interna de la levadura, se fusiona en su extremo N-terminal con el extremo N-terminal de la enolasa, una de las proteínas metabólicas encontradas en la superficie celular. Si esta construcción génica se incorpora a

la célula de la levadura, el resultado es la secreción de la invertasa interna, una proteína que en situación normal no es exportada. La conclusión es que el extremo N-terminal de la enolasa es capaz de dirigir la secreción de proteínas en *S. cerevisiae*, aunque no tiene la secuencia típica de un péptido-señal (64). Estas observaciones vienen avaladas por otros muchos datos, como la demostración de que en células intactas, y empleando agentes incapaces de penetrar la membrana se puede acceder a estas proteínas, lo que indica su presencia en la superficie (117), así como otro conjunto de evidencias.

A pesar de las dificultades que suelen existir para aceptar propuestas que se apartan de los hechos establecidos, las indicaciones de que pueden darse mecanismos de secreción alternativa, de proteínas carentes de un péptido-señal N-terminal son cada vez mayores, tanto en levaduras como en bacterias y células de animales (81). Hace falta profundizar en aspectos funcionales, incluso valorar en qué medida se trata de proteínas con funciones dobles, dependiendo de la localización. En nuestro caso, atribuimos un valor adicional a estos hechos, por su relación con la interacción de hongos patógenos con el hospedador en procesos infecciosos, una cuestión de la que tratamos en el bloque siguiente.

PATOGENICIDAD DE HONGOS: FENÓMENOS DE SUPERFICIE Y RESPUESTAS CELULARES DEL PATÓGENO

La capacidad microbiana de producir infección, también se da en algunas especies de levaduras, así como en otros grupos de hongos microscópicos. Los fenómenos inherentes se han de abordar como una situación más de la vida de estos organismos, aquella en que el medio ambiente es el organismo del hospedador. Nuestro interés por el conocimiento básico sobre de la Biología de la levadura *S. cerevisiae*, ha ido paralelo durante muchos años con el de profundizar en otra especie, *C. albicans*, que también sirve de modelo de trabajo, en especial por su carácter de patógena oportunista. Se trata de un organismo cuyo crecimiento en las condiciones habituales de laboratorio tiene lugar en

forma de levaduras ovales; sin embargo, en diversas condiciones se activa su desarrollo en forma de hifas, lo que origina el micelio de un hongo filamentoso típico. El suero sanguíneo, añadido al medio de cultivo, estimula esta transición de forma, lo que siempre se ha asociado con el potencial poder patógeno de *C. albicans*. Esta capacidad de crecer en forma de levadura o de hifa ha hecho que se designe a esta especie como dimórfica. En realidad, es capaz de adoptar también otras morfologías, como la de pseudohifas o clamidosporas.

Hace unos 25 años que nuestro grupo comenzó a trabajar con este organismo. El avance en las metodologías para su estudio, tales como análisis genéticos, clonación de genes y reintroducción de los mismos en las células, hasta culminar en la secuenciación de su genoma y estudio de su proteoma, han sido muy significativos. Con ello, hoy *C. albicans* se ha convertido en sistema de trabajo, casi tan accesible para estudios de nivel molecular como *S. cerevisiae*, por lo cual es objeto de atención en muchos laboratorios de todo el mundo. Nuestros esfuerzos a lo largo del ese cuarto de siglo, también han contribuido a propiciar metodologías para el manejo experimental, con el que hoy se abordan cuestiones esenciales de esta especie. Aparte de nuestras aportaciones al conocimiento de diversos aspectos de la Biología y Patogenicidad de esta especie, hemos desarrollado vectores de clonación (46), genotecas que han sido utilizadas por numerosos investigadores y procedimientos de interrupción de genes (78), en estas células pertenecientes a estirpes diploides.

En la patogenicidad de cualquier microbio, resultan fundamentales los componentes de estructuras externas de la célula, es decir de la pared celular, la forma en que se integran y sus capacidades para interactuar con el sistema inmunitario del hospedador, en su sentido más amplio. Para analizarlos en *C. albicans* tiene importancia su relación con la especie modelo por excelencia, *S. cerevisiae*, que es no patógena ni capaz de crecer en forma de hifas, aunque lo pueda hacer emitiendo prolongaciones pseudohifales. Ambas especies proceden de un ancestro común y la divergencia evolutiva se estima producida hace unos 150 millones de años. La comparación entre detalles biológicos de ambas especies a nivel molecular suele resultar productiva, como

forma de analizar aspectos de la patogenicidad de *C. albicans*, de la que *S. cerevisiae* básicamente carece.

Comparaciones de este tipo suelen ser útiles a la hora de plantear conclusiones que permitan discriminar observaciones relevantes. Por ejemplo, en ambas levaduras se produce una activación del ciclo metabólico del glioxalato como consecuencia de fagocitosis por macrófagos (65), lo que significa que esta activación metabólica puede ser fundamental, pero no suficiente, para la virulencia de *Candida*. Por el contrario, se demuestra que determinantes genéticos que codifican proteínas inductoras de adhesividad celular, conocidos en *S. cerevisiae* por inducir floculación, se configuran en *Candida* en genes homólogos, cuyas características y expresión permiten a la célula fijarse a los tejidos del hospedador infectado (120). Se trata de un buen ejemplo de adhesinas, como factores de virulencia, con un diseño similar a los de otra especie no patógena, pero que en *Candida* han evolucionado para conferirle capacidad de adhesión a los tejidos del hospedador. Ciertos genes son, por tanto, la base de adaptaciones muy distintas.

Infección oportunista

Como comensal, *C. albicans* se aloja en superficies cutáneas y mucocutáneas del organismo humano formando parte de la flora normal de muchas personas, o llegando a colonizar estas cavidades con mayor intensidad. Sin embargo, esta situación puede dar paso a un proceso de infección oportunista cuando el agente infeccioso rompe ese equilibrio, por ser capaz de superar las barreras que oponen las defensas del hospedador (innatas o adquiridas). La infección oportunista sucede en circunstancias de desequilibrio en la *Microbiota* del organismo, por ejemplo, en neonatos cuando la flora bacteriana no llega a establecerse con normalidad, o en personas sometidas a intensos tratamientos antibióticos que desplazan y alteran la composición de esa *Microbiota* bacteriana. La alteración de la colonización microbiana del organismo supone, por tanto una opción clara para el predominio y la invasión por parte de esta especie de hongo, causando, entre otras, infecciones de la cavidad oral con mayor o menor

grado de afectación. También puede suceder por otras causas iatrogénicas, como las terapias inmunosupresoras o citotóxicas.

El acceso de *C. albicans* al torrente sanguíneo puede suponer la aparición de infección sistémica grave con la posible diseminación hematógena a cualquier órgano. Los catéteres son origen de infecciones sistémicas lo que les convierte en factores de riesgo importantes. *Candida*, y en especial *C. albicans*, se suele situar como la cuarta causa de infección nosocomial del torrente sanguíneo en los países desarrollados, lo que conlleva un importante grado de morbilidad y mortalidad, con los consiguientes costes de todo tipo. La enfermedad de base que frecuentemente acompaña al proceso complica el tratamiento y determina un pronóstico nada halagüeño.

Modelo experimental

C. albicans ha cobrado una notable importancia como modelo experimental para aspectos fundamentales de la biología de los hongos microscópicos, en buena medida por el rédito que suponía poder estudiar en esta especie las bases de la patogenicidad. Desde el análisis basado en procesos de recombinación mitótica (organismo diploide) hasta el aislamiento, caracterización, delección o interrupción (sencilla o doble) de genes de *C. albicans* (38), (78), y su reintroducción en la células como forma de profundizar en el conocimiento de esta especie a nivel molecular, se ha progresado notablemente en la experimentación con este organismo.

Nuestro grupo de investigación ha estado muy implicado en todo este proceso de desarrollo y aplicación de herramientas experimentales (vectores, genotecas, etc) que han hecho de *C. albicans* un atractivo modelo de estudio. La secuenciación del genoma completo de *C. albicans* ha sido fruto de una intensa cooperación internacional. La dotación genética diploide de esta especie es de unas 32 Mpb (16 Mpb en contenido haploide) distribuidos en 8 cromosomas dobles. El ensamblaje y la correspondiente anotación de datos resultante de esta secuenciación genómica se materializa en archivos de datos como <http://www-stanford.edu/group/candida/index.html>, así como

otras muchas bases de datos con información sobre genes y proteínas. La disponibilidad del genoma permite abordar estudios de tipo global como los análisis transcriptómicos con arrays de DNA y estrategias similares.

La secuenciación del genoma de *C. albicans* revela por un lado su similitud con *S. cerevisiae*, así como los aspectos más específicos de este organismo con un hábitat y unas pautas de desarrollo muy distintas. También ha puesto de manifiesto, en toda su extensión algo que ya se conocía del estudio individual de muchos genes. Las estirpes que se vienen aislando son altamente heterocigóticas, ya que en muchos casos los dos alelos de cada gen son distintos. Todo esto tiene notables implicaciones evolutivas, así como las frecuentes reorganizaciones cromosómicas que se pueden detectar en las diferentes estirpes (119).

Patogenicidad y virulencia

El carácter patógeno de un microorganismo se materializa en su capacidad para ser virulento cuando afecta al correspondiente hospedador. A pesar de los intentos clásicos de considerar la patogenicidad como el atributo que tienen algunos microbios, y la virulencia como el grado en que las estirpes concretas se materializa su poder patógeno, a través de los factores que la hacen posible, ha llegado un momento en que ambos términos se confunden, usándose indistintamente con mucha frecuencia. Lejos de especies microbianas patógenas clásicas, como las bacterias exotóxicas, que deben su virulencia fundamentalmente a una toxina determinante de su patogenicidad, en *C. albicans* se han identificado un conjunto elevado de factores de virulencia potenciales.

La posibilidad de deletar genes y analizar sus consecuencias en cuanto a la pérdida o reducción de virulencia, en modelos de infección experimental, ha permitido identificar más de 50 productos génicos que se requieren para el normal desarrollo de esta levadura en modelos de infección experimental (48). Este conjunto incluye desde proteínas con capacidad de fijación y actuación sobre el hospedador (adhesinas, enzimas hidrolíticas) hasta factores de transcripción o enzimas metabólicas (76). Se trata por tanto de un conjunto de datos e información tan vasto

que requiere una sistematización y acuerdos terminológicos que faciliten la aplicación consensuada de criterios por parte de la comunidad científica.

En una reunión científica reciente sobre “*Candida and Candidosis*” (American Society for Microbiology, Tampa, Florida, Febrero 2002) se trató de unificar la terminología, a través de un debate tras la realización de una encuesta por parte de un panel del que formó parte el autor. Sin llegar a conclusiones que gozaran de la aprobación general, se propuso reservar el término “factor de virulencia” para las moléculas que actúan directamente sobre el hospedador y “regulador de virulencia” para las que afectan o controlan la expresión o función de factores de virulencia. Las moléculas requeridas para el funcionamiento (metabolismo, biosíntesis) de células microbianas, pero que no actúan sobre el hospedador ni participan en rutas que regulan a las que actúan, no deben catalogarse como factores de virulencia (83). El intento de lograr esta precisión conceptual resulta importante, para las consideraciones que hacemos en este trabajo, en el que se aborda la articulación de respuestas celulares, en una cadena de reacciones.

La superficie celular, interfase entre patógeno y hospedador

La organización general de la pared celular de *C. albicans* responde a patrones muy similares a los de *S. cerevisiae*, si bien el número de proteínas puede variar (55). Sobre una matriz flexible, tridimensional, de 1,3- β -glucano ramificado, unido a 1,6- β -glucano y quitina, se unen covalentemente dos clases de proteínas (generalmente conocidas como Cell Wall Proteins, CWPs). La primera y más abundante está unida a 1,6- β -glucano a través de restos de glicofosfatidilinositol (GPI), habiéndose identificado unas 104 posibles proteínas de este tipo en *C. albicans* (27). La otra clase de proteínas, designada como PIR (“proteins with internal repeats”) se une directamente a 1,3- β -glucano, existe en un número más reducido aun no determinado en *C. albicans*. Los dos grupos de proteínas anteriores son portadoras de péptidos señal en su extremo N-terminal que dirige su exportación a tra-

vés de la clásicamente conocida ruta que implica al retículo endoplasmático y al aparato de Golgi. El genoma de esta especie declara hasta 130 genes que codifican proteínas típicas de pared celular, aunque lo normal sea detectar una cantidad mucho menor de estas proteínas en la pared celular en situaciones concretas del desarrollo (26). Algo revelador de los procesos de regulación, que incluyen importantes cambios morfogénéticos como la transición de levadura a hifa.

También en esta especie, la complejidad de los componentes proteicos que integran la pared celular se ha revelado como mucho mayor, al poderse aislar a partir de paredes celulares obtenidas por fraccionamiento celular, otro conjunto de proteínas que carecen de péptido señal, por lo que resulta más difícil entender su capacidad de acceder a través de membrana a la superficie celular. Tal como señalamos para la levadura (ver anteriormente), también en *C. albicans* aparecen estas proteínas asociadas a la pared celular. Entre estas están enzimas glucolíticas, chaperonas y otras proteínas como factores de alargamiento de la síntesis proteica, que interactúan con los ribosomas, así como otros componentes de más difícil adscripción (94). A pesar de las dificultades de interpretación de estos hallazgos, la realidad de los fenómenos implicados se confirma cada vez más de múltiples formas, como es la generalización de la presencia de algunas de estas proteínas glucolíticas en la pared de las bacterias o la demostración de que en levaduras, algunas de estas proteínas como la enolasa y fosfoglicerato quinasa, son portadoras de extremos N-terminales capaces de dirigir la exportación de otras proteínas citoplasmáticas al medio externo (87). Estas observaciones, confirmadas por otras estrategias (117), son objeto de análisis y experimentación adicional y reclaman interpretaciones basadas en la existencia de mecanismos de secreción alternativa (distintos del canónico que utiliza el péptido señal) así como la existencia de proteínas con doble o múltiple función (*moonlighting proteins*) (50), (80).

En el conjunto de la superficie celular, así como en las proteínas que la célula segrega al exterior, radican las claves de una interacción determinante tanto de las relaciones de comensalismo como de patogenicidad que la especie con el organismo

humano. Si las adhesinas codificadas por los genes *ALS* juegan un papel decisivo en la fijación del microbio a las células del hospedador (120), algunas enzimas exocelulares como las aspartil-proteasas (48) o lipasas pueden propiciar la diseminación del mismo por los tejidos. Notable importancia tiene también la integrina Int1, algunas proteínas específicas de la superficie de hifas como Hwp1 (112) o las glicoproteínas Phr1 y Phr2 (42), (25) que se expresan de forma muy regulada.

También existen indicaciones de que algunas de las proteínas de superficie que carecen de péptido señal, pueden interactuar con el hospedador. Así, enzimas glucolíticas y chaperonas tienen capacidad de fijación a componentes del hospedador (23). Además, nuestras observaciones sobre su capacidad como antígenos, estamos convencidos de que justifican un análisis detallado de estas cuestiones desde el punto de vista de sus aplicaciones. Algunas de ellas desencadenan una respuesta inmunitaria en el ratón, aportando una protección frente a la infección (36). Igualmente, hemos podido constatar la existencia de niveles elevados de anticuerpos en enfermos de candidiasis sistémica (92) que resultan significativamente elevados. Así ocurre con anticuerpos anti-enolasa, junto con los dirigidos frente a otras proteínas de secreción típicas de la pared celular. Análisis estadísticos apropiados han puesto de manifiesto que esta respuesta puede ser indicativa del estado de protección del enfermo y de las perspectivas de evolución de la infección (93). Actualmente trabajamos en la puesta a punto de algunos métodos serológicos, basados en estas proteínas, al objeto de perfeccionar el diagnóstico y el pronóstico de infecciones tan graves como las candidiasis sistémicas.

Es fundamental considerar estas proteínas si se ha de profundizar en las modificaciones y cambios en todo este conjunto de polipéptidos ligada a modificaciones de la pared celular. En definitiva, el progreso de *C. albicans* desde comensal a patógeno implica capacidad de interactuar de forma positiva con el hospedador, como sucede con los receptores de hifas que reconocen cadherina de la célula animal y facilitan la endocitosis (91) o la protección que parece existir en las formas filamentosas frente a la fagocitosis por macrófagos que destruyen las formas levaduriformes.

Transmisión de señales controlada por MAP-quinasas en *C. albicans*: percepción de estrés y respuestas frente al hospedador

En nuestro departamento también se lleva a cabo una minuciosa disección de las rutas de MAP-quinasas de *C. albicans*, algo a lo que ya hemos aludido y que es responsabilidad fundamental del Profesor Jesús Pla. El diseño de los circuitos de transmisión de señales de esta levadura dimórfica, tal como se muestra en la Figura 4, es muy similar al de *S. cerevisiae* en sus aspectos fundamentales. Sin embargo, el análisis de su funcionalidad revela igualmente que la adaptación de este organismo es distinta, puesto que de manera natural utiliza como hábitat el organismo humano y de algunos animales, por tanto vive a la temperatura propia de los animales de sangre caliente. Como ya indicamos, desde que clonamos el gen *MKC1*, codificante de una MAP-quinasa altamente homóloga de *Slt2* de *S. cerevisiae*, pudimos observar que la manifestación de los efectos de la eliminación de este gen, cuando se aplicaba un choque térmico a las células, requería temperaturas más altas. En cualquier caso, la estirpe delecionada de las dos copias del gen *MKC1*, mostraba una capacidad patógena disminuida.

Pero, a la luz de las consideraciones anteriormente expresadas, si se ha de profundizar en las rutas de transmisión de señales como factores de virulencia, se requiere un análisis más detallado de su funcionamiento global, así como de sus interacciones. Se trata de plantear estrategias para valorar la forma en que estas vías señalizadoras articulan una respuesta frente al estrés que el hongo sufre en el ambiente del hospedador. Además, no será lo mismo la situación de comensal, en la que el patógeno se mantiene controlado, que aquellas en las que se desarrolla hasta el punto de producir infección. Cada vez conocemos más de esta interacción, en la que el hospedador reconoce al patógeno y el patógeno es capaz de percibirlo y articular una respuesta para superar las líneas defensivas del hospedador, mediante el funcionamiento de sus sistema de percepción de estímulos y transmisión de señales (108).

Se ha puesto de manifiesto con claridad que la funcionalidad de las rutas de MAP quinasas es importante para la patogenicidad

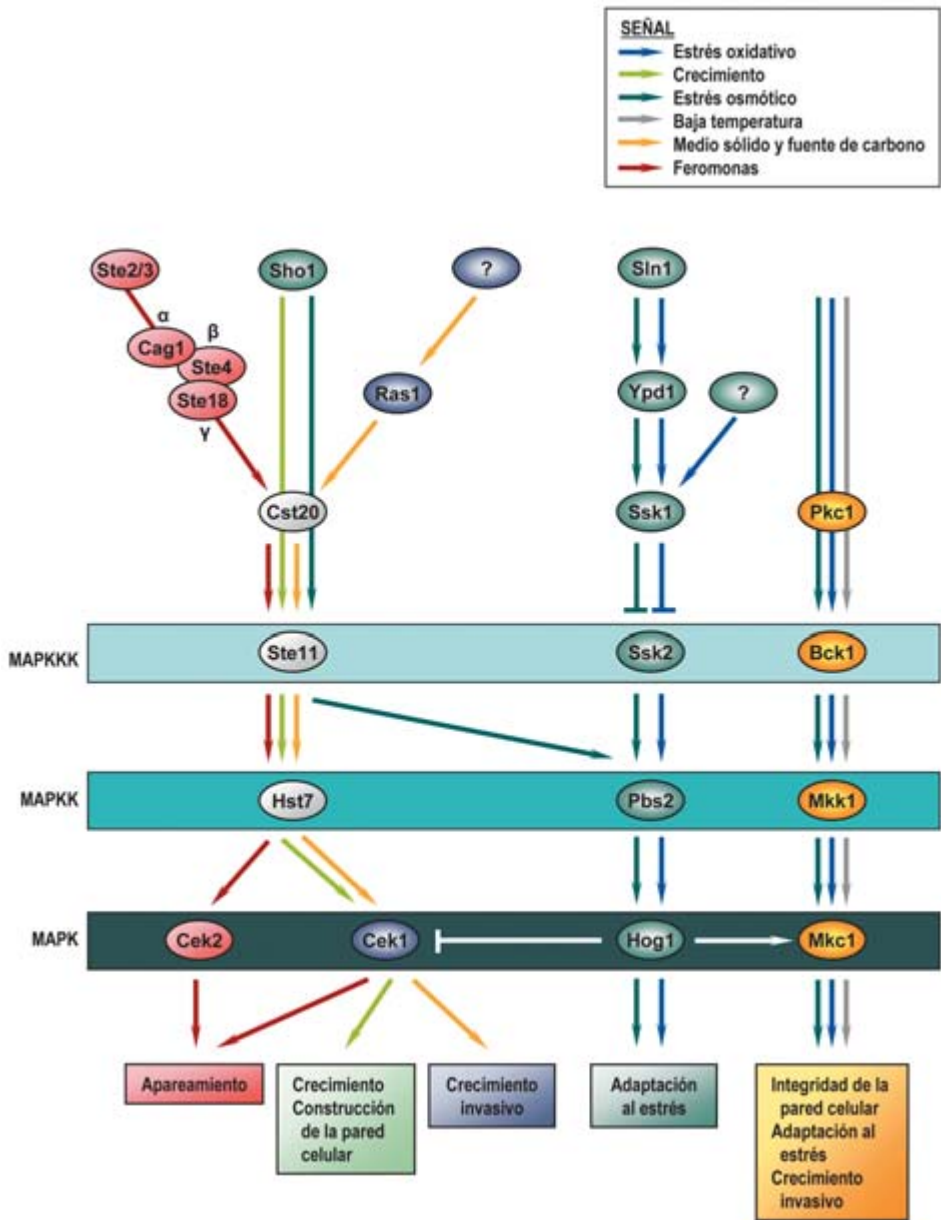


FIGURA 4. Esquema que reúne la información disponible acerca de las rutas de señalización de *C. albicans*, el flujo de señales y las interrelaciones entre ellas. (Adaptada de: Alonso-Monge, R. Román, E. Nombela, C y Pla, J. *Microbiology* 152, 905. 2006)

dad de *C. albicans* (77), así como la de otras especies infecciosas como *Cryptococcus neoformans* (24), (12). Sin embargo, es preciso profundizar en qué aspectos o etapas del proceso, tales como la adhesión, colonización, diseminación, etc. son las que precisan de la funcionalidad de las vías de transmisión de señales y las respuestas correspondientes. La disponibilidad de estirpes afectadas en distintos genes, y el manejo de sistemas de infección experimental en animales, permite obtener algunas observaciones relevantes que resumimos a continuación:

- *Integridad celular.* Las deficiencias que conlleva la pérdida de la MAPK Mkc1, en *C. albicans*, suponen según indicamos efectos claros en la pared celular especialmente en situaciones de estrés. Ello puede explicar la pérdida de virulencia por deficiencias en la glucosilación de proteínas de la pared celular, la afectación de la síntesis de cadenas de manosa y en concreto de proteínas como los receptores tipo Toll (79), incluso el que la afectación de la manosilación active la propia ruta de IC (14). Igualmente, el glucano es un componente fundamental para la integridad de la pared celular (121) como cabía esperar, y además también parece proteger al patógeno frente al sistema inmunitario. Así mismo, la integridad celular es requerida para la multiplicación a 37°C así como la resistencia a otros tipos de estrés como el estrés oxidativo, algo que el agente infeccioso ha de afrontar tras la fagocitosis. La reducción de la patogenicidad por la pérdida de función de la ruta de IC, se puede también explicar por la dificultad acrecentada para crecer superando las barreras del hospedador. Nuestro grupo también ha descrito mutantes de *C. albicans*, viables pero notablemente afectados en la integridad de pared celular por carecer de proteínas ancladas mediante GPI como la Ecm33 (70).
- Algunas observaciones que demuestran que, también en *C. albicans*, existe una relación entre la ruta de IC y la de *alta osmolaridad-glicerol*, controlada por la MAPK HOG1 (2), son especialmente sugerentes. Ya que muestran que la función de Hog1 es requerida para la activación de Mkc1 (75). Pruebas más directas de la importancia de esta vía de se-

ñalización para la virulencia se derivan de la demostración de que su deficiencia determina una mayor sensibilidad a la muerte provocada por los fagocitos en *C. albicans* (9).

- La importancia de la formación de hifas en *C. albicans*, ha sido de los aspectos tradicionalmente más considerados desde el punto de vista de la patogenicidad de esta especie. Su carácter dimórfico, que supone crecimiento oval o desarrollo en formas de hifas (significativamente inducido por suero sanguíneo) ha llevado a pensar que esta forma filamentososa era la esencial para el poder patógeno. Es indudable que facilita la penetración en los tejidos, y la supervivencia en los fagocitos. En coherencia, estirpes privadas de la capacidad de formar micelio pierden la virulencia (63), pero igualmente se reduce la virulencia en estirpes que crecen permanentemente en hifas, lo que da idea de que el poder patógeno requiere un agente infeccioso sin alteraciones. El fenómeno del dimorfismo es de notable complejidad desde el punto de vista de las vías de transducción de señales. Es necesaria la funcionalidad de una ruta no controlada por MAP quinasas, aunque muy conocida, como la de Proteína Quinasa A (PKA) y cAMP, así como una ruta centrada en la MAPK Cek1, bastante menos conocida. Análisis diversos de la funcionalidad de ambas concluyen en sus efectos de activación de los factores de transcripción Efg1 y Cph1, y la alteraciones de la virulencia en mutantes en estas funciones revelan su relevancia (108).

Quedan muchos aspectos por analizar acerca de la relevancia de las vías señalizadoras en el poder patógeno de los hongos. La posibilidad de aprovechar este conocimiento para la ansiada búsqueda de nuevas dianas para antifúngicos, es real puesto que aun cuando vías similares son operativas en la especie humana, hay especificidades y diferencias que permiten confiar en el logro de suficiente especificidad.

La nueva estrategia que adicionalmente nos interesa en nuestro grupo para abordar el análisis detallado de la interacción patógeno-hospedador, mediante estrategias de escala genómicas y proteómicas, aporte también claves de esta interacción. El aná-

lisis genómico y proteómico, por ejemplo, de los efectos desencadenados tanto en las células del patógeno como en los macrófagos, como consecuencia de la fagocitosis (71), (35), pone de manifiesto los profundos cambios que tienen lugar, en toda su globalidad. Hasta 132 proteínas de la levadura se expresan de forma diferencial como consecuencia de la interacción con el macrófago, en rápida respuesta adaptativa al ambiente del fagosoma. Globalmente, se reduce el metabolismo carbonado normal, mientras que se incrementa la síntesis de ácidos grasos y ciclos como el del glioxalato y el del ácido tricarbóxico. El procesamiento de los datos permite elaborar un modelo preliminar sobre la muerte de las células del patógeno, inducida por el macrófago, que ilustra la interconexión de citoesqueleto de actina, la mitocondria y los procesos de autofagia en la regulación de la apoptosis.

En definitiva, los análisis de la transmisión de señales en hongos patógenos aportan algunas claves sobre la regulación global de procesos celulares, resultantes de la adaptación del patógeno a una forma de vida en la que ha de superar a las defensas del hospedador. La activación de rutas de señalización, conducen a una serie de cambios globales en los patrones de expresión de genes, debe seguir aportando claves para controlar la infección y en su caso combatirla adecuadamente.

GLOBALIZACIÓN Y REPROGRAMACIÓN DE SISTEMAS

La existencia de un conjunto de redes y circuitos de señalización, en los microorganismos eucarióticos, es demostrativa de cómo la comunicación intracelular sirve para la percepción de cambios en el medio ambiente, al objeto de articular las respuestas adaptativas pertinentes. Es fascinante constatar cómo en organismos unicelulares —o en organismos pluricelulares sencillos, sin diferenciación— se integran un conjunto de funciones, que suponen un buen compendio del conjunto de las capacidades básicas de los seres vivos. La unidad de los procesos biológicos se estableció con claridad desde la consolidación de la Biología Molecular. Hay un sustrato básico común a todos los organismos celulares, sus procesos bioquímicos responden a unos

patrones comunes, que les permiten organizarse en células, capaces de mantenerse, de reproducirse y de evolucionar. Estas formulaciones son el verdadero paradigma de la Biología actual, que en buena medida, desde hace más de medio siglo, viene progresando para conocer lo específico de cada uno, dentro de ese patrón común a todos los vivientes. Porque, otro paradigma es el de la diversificación, la vida es diversa en posibilidades.

Como la vida microbiana —desde las células más elementales hasta aquellas que alcanzan el máximo de complejidad— es un reflejo de todas esas posibilidades, los sistemas microbianos son la base para estudiar muchos aspectos de los fenómenos implicados. El excelente tratado “The Microbe”, de reciente publicación¹⁰, comienza resumiendo la vida de los microorganismos, como algo que consiste en ser de pequeño tamaño y tener un pasado que se remonta a etapas muy ancestrales de la evolución; es formar parte de colectividades enormes en las que hay grandes multitudes de individuos y ser capaces de crecer y persistir; es colonizar cualquier nicho ecológico del planeta pero también hacerlo habitable, mediante el reciclaje de materiales o la renovación del oxígeno, entre otros; es, por tanto, conformar el planeta y ser capaces de encontrar formas variadas de vivir; es, en fin, cooperar en tareas complejas, pues los microbios también actúan colectivamente, tienen procedimientos para escrutar si se alcanza el quórum suficiente para generar estructuras complejas, como las biopelículas de células microbianas, esenciales para llevar a cabo muchas actividades microbianas.

Naturalmente, todas estas propiedades se pueden predicar de la vida microbiana en general, no de la de individuos concretos. Pero, como resumen de lo que venimos señalando, la vida microbiana es compendio de muchas posibilidades biológicas y, por tanto, material de trabajo imprescindible para conocerlas. La versión actual de lo que se formuló como la unidad de los procesos bioquímicos, se puede reformular como la globalización de los sistemas, un término concordante con otras realidades, sociales y económicas, que definen el mundo actual. El modelo de

¹⁰ The Microbe. M. Schaechter, J.L. Ingraham y F.C. Neidhart. ASM Press. Washington DC. 2006

estructura del ADN, de Watson y Crick, aportó el primer esquema globalizador, las pautas de programación son comunes en los vivientes. El manejo experimental de componentes biológicos aislados, proteínas, ácidos nucleicos, demostraba materialmente esos patrones de funcionamiento. Me resulta fascinante contemplar cómo las aproximaciones científicas a los fenómenos de la vida son siempre cíclicas. De lo general, la consideración de los organismos como tales y su fisiología, se pasó al estudio de sus componentes aislados¹¹, macro- y micromoléculas. Pues bien, ahora estamos de nuevo en un camino integrador; las nuevas estrategias de escala —las ‘ómicas— nos llevan a manejar globalmente los componentes biológicos, entendiendo su integración en la célula, en donde no están nunca aislados, sino interactuando entre sí.

De hecho, uno de los aspectos que se revelan como más espectaculares, de la “revolución genómica” del último lustro, es el haber puesto de manifiesto que el mundo microbiano ocupa una posición central, como matriz genética y bioquímica de toda la diversidad biológica de la Biosfera. Desde las clásicas aproximaciones reduccionistas, hemos pasado a los progresos de los últimos quince años, basados en las tecnologías de escala (Genómica, Proteómica, y el resto de las ómicas), que resultan de estrategias pluridisciplinarias, y que han situado a la Biología Microbiana en la vanguardia de las estrategias novedosas.

La síntesis de datos parciales, obtenidos en gran escala, nos acerca al conocimiento global del microbio y su relación con el ambiente, incluso nos permite explorar más allá de las especies conocidas (cultivables) a través de su rastro genético —metagenómica—. Como indicábamos la diversidad de especies microbianas es dos órdenes de magnitud superior que lo hasta ahora supuesto, con una perspectiva evolutiva mucho más rica y precisa. Pero, igualmente cabe abordar la aludida función colectiva de los mi-

¹¹ Para mi maestro, Severo Ochoa, las claves de su trabajo fueron siempre el aislamiento de proteínas en el tubo de ensayo. Solo proteínas puras, manejadas en condiciones que pudieran mimetizar su comportamiento en la célula, podían aportar respuestas claras acerca de los fenómenos biológicos. Era preciso manejar la proteína pura, ya fuera una enzima capaz de catalizar una reacción química con un sustrato de pequeño tamaño molecular, o un factor biosintético cuya función fuera interactuar con el ribosoma.

robios, que se ejerce a través de actividades como el escrutinio de quórum o la generación de biopelículas. En definitiva, es posible promover el conocimiento de propiedades emergentes de los sistemas microbianos a través del análisis detallado, en gran escala, de las propiedades e interacciones de sus componentes (genes, proteínas, otras macromoléculas, orgánulos, moléculas pequeñas), de acuerdo con lo que posibilitan las nuevas tecnologías. Todo ello es el objetivo de la Microbiología de Sistemas que fundamenta los estudios microbianos propios del siglo actual.

La fosforilación de proteínas, un elemento clave de la señalización

Las vías señalizadoras de los microorganismos constituyen sistemas integrados, de componentes celulares, que se coordinan para aportar funciones propias de la vida de las células. La globalización de estos sistemas significa que con unos esquemas de organización, basados en una serie de componentes básicos, se pueden construir sistemas específicos, tanto en la recepción de estímulos como en la producción de respuestas. Y, todo ello, adaptado a distintos tipos de células que reflejan la biodiversidad.

Señales en bacterias

Las consideraciones abordadas hasta ahora se han referido a microorganismos eucarióticos, en los que se concentra nuestro interés investigador. Pero, las bacterias no son excepción en ningún caso; al igual que los anteriores han de sobrevivir en ambientes con frecuencia hostiles, desde ambientes extremos —pH, temperatura, potencial redox, osmolaridad, escasez de nutrientes, agentes tóxicos— hasta la agresión de las defensas inmunitarias. Las bacterias no escapan a esa idea de que estamos considerando sistemas globalizados, en muchos de los detalles de su organización. A pesar de su mayor simplicidad, aun queda mucho por conocer sobre la organización de sus señales y respuestas. No obstante, sí cabe señalar que la percepción de la situación ambiental se produce también a través de sistemas de quinasas, de dos o de múltiples componentes.

Los sistemas de dos componentes, los más sencillos, se basan en una proteína quinasa con capacidad de autofosforilación en histidina, como respuesta al estímulo que reconoce; la señal se transmite transfiriendo el grupo fosfato a un efector con capacidad de actuar a nivel genético, el cual se fija al ADN para regular los genes encargados de la respuesta. Pero, existen también sistemas bacterianos más complejos, en los que el sensor transmite la señal a través de un sistema múltiple de varios efectores reguladores, para articular una respuesta génica. Los sistemas génicos bacterianos, controlados por fosfotransferasas, incluyen desde los que regulan procesos metabólicos hasta los que modulan la fijación de nitrógeno o la virulencia.

La clásica investigación bacteriana, que puso en evidencia la existencia de unidades de control genético, tan básicas como los operones (grupos de genes agrupados, con una regulación común), continúa revelando la existencia de circuitos más complejos, con una organización supra-operón. Entre ellos, los llamados regulones —varios operones distribuidos, con una regulación coordinada— y los modulones —grupos de operones independientes, sometidos a una regulación común, aunque se integren en diferentes regulones—. Los efectos de la transmisión de señales tienen, por tanto, un sustrato de complejos circuitos regulatorios sobre el que operar.

Las señales en hongos y mamíferos

Al detallar algunos fenómenos relativos a la ruta de señalización de integridad celular de levaduras, no hemos podido reflejar toda la complejidad de las vías de señalización propias de los hongos. La percepción y transmisión de señales en estos organismos hongos es mucho mayor de la que ilustran las descripciones anteriores. Si recorremos toda la escala de organismos de este grupo, encontramos que los hongos, de alguna manera, poseen casi todos los sentidos que usa la especie humana (13). Hay mecanismos de detección de gases, luz, productos químicos, superficies, gravedad, campos eléctricos, etc. Igualmente, se reconocen en grupo, en cuanto a número (escrutinio de quórum), a través de determinadas sustancias específicas. Por supuesto,

como hemos señalado, reconocen y reaccionan ante la temperatura elevada, la alta y baja osmolaridad y las agresiones en contra de la pared celular, es decir los más diversos tipos de estrés incluyendo el estrés oxidativo. La reproducción sexual en los hongos se produce también a través del reconocimiento de células entre sí, como pertenecientes a tipos sexuales opuestos, en aquellas especies en que hay procesos de sexualidad. La gama de reacciones ante una notable variedad de situaciones nutricionales es también muy rica.

Las cascadas de fosforilación para la transmisión de señales de los hongos, controladas por MAP quinasas, suponen una red que tiene un reflejo bastante claro en las células de mamíferos, si bien en estas últimas la complejidad es aun mayor. Una reciente comparación sistemática (99) permite establecer una perspectiva clara de lo que va de las rutas de señalización de MAPK, descritas y caracterizadas, en la levadura y en células de mamíferos. La existencia de unos patrones de globalización resulta evidente con arreglo a los siguientes aspectos:

Receptores, activación de señales y respuestas

El mantenimiento de un patrón general de organización es verdaderamente notable. Las vías de señalización de MAPKs, constan en todos los casos de un sistema de sensor o sensores que capta señales del exterior y las transmite a través de factores estimuladores de proteínas G con actividad GTPasa. Las cinco rutas existentes en *S. cerevisiae* se activan, respectivamente, por feromona sexual (ruta de apareamiento de la MAPK Fus3); por limitación de nutrientes y, en parte, estrés de pared celular (ruta de crecimiento invasivo y formación de pseudohifas, controlada por la MAPK Kss1); por alta osmolaridad (ruta de alta osmolaridad-glicerol, controlada por Hog1); por agresión a la pared celular (ruta de integridad celular, controlada por Slt2); y por privación de nitrógeno y carbono, que activa el proceso meiótico y conduce a esporulación (controlada por Smk1).

En las células de mamíferos, con un esquema general de organización muy similar al anterior, las cascadas de MAPKs son

activadas por muy diversos estímulos, en general de tipo bioquímico, como hormonas, factores de crecimiento, citoquinas e interleucinas e inmunomoduladores en general, pero también algunos tipos de estrés físico como el shock hiperosmótico. La señal es inicialmente transmitida a través del sistema de activación de proteínas G, para finalmente desencadenar respuestas celulares relacionadas con el crecimiento y la diferenciación celular. Entre ellas, pueden estar la proliferación, la formación de tumores, la diferenciación, la apoptosis, la motilidad celular o la supervivencia y osmorregulación. En cuanto a las MAPKs que controlan estas rutas, se ha descrito hasta cinco familias, con un total de al menos once integrantes, que se designan con nombres igualmente arbitrarios, aunque alusivos a datos que posibilitaron su identificación inicial. Designaciones como ERK1 y 2, ERK3 y 4, ERK5 (esta resulta ser la más homóloga a Slr2), las isoenzimas p38 (con tres integrantes) y las quinasas de Jun denominadas JNK1,2 y 3. Son un ejemplo de la variedad de MAPKs existentes en el organismo animal, algunas de las cuales se han implicado en enfermedades y se utilizan como dianas farmacológicas.

Soportes para incorporar los bloques de quinasas que integran el módulo de fosforilación

Tanto en un tipo de organismos como en los otros, la activación final de la MAPK tiene lugar a través de un proceso en el que participan otras dos, las MAPKKK y MAPKK. Las exigencias del proceso determinan que estas tres quinasas integrantes del módulo, se incorporen a un andamiaje que es aportado por otra proteína, lo que debe constituir una de las formas de asegurar el control del proceso. En la levadura, la forma más característica que adopta esta función es la que ejerce la MAKK Pbs2, la cual tiene una doble capacidad, la de su propia función fosforilante, como integrante del módulo de triple quinasas, y la de aportar el mencionado soporte para incorporar la MAKKK y la MAPK. En las células de mamíferos, la cantidad de posibilidades para esta opción es tal que alcanza a más de una docena de esquemas posibles.

Utilización de componentes comunes

Otro aspecto fundamental es con frecuencia la utilización de componentes comunes en los procesos de transmisión de señal. Es un fenómeno que apenas se empieza a conocer, como hemos señalado por ejemplo para la ruta de integridad celular y la cooperación de componentes de la de alta osmolaridad en su respuesta frente a determinados estímulos. De nuevo, la red de interrelaciones en las rutas de células de mamíferos es notablemente más grande, con situaciones de activación cruzada, modulación mutua de factores de transcripción y activaciones de rutas distintas a través de los mismos receptores.

Naturaleza combinatoria de las vías de transmisión de señales

Del conocimiento existente hasta el momento, se podría inferir que las redes de transmisión de señales, y de articulación de respuestas celulares, suponen un conjunto muy complejo organizado a partir de la combinación de unos pocos elementos básicos. La reacción fundamental, fosforilación de proteínas, se prodiga de muchas maneras en la propagación del estímulo. Los receptores responden todos ellos a una estructura en la que comparten la posibilidad de englobarse en la membrana. Los mecanismos de transmisión inicial son igualmente muy similares, para rutas de reacciones muy distintas en sus efectos finales. La utilización, incluso, de elementos comunes no impide la especificidad de la respuesta. Es evidente que la naturaleza ha utilizado una serie de características básicas, ya bien conocidas de las proteínas, para crear un número indefinido de posibilidades de actuación que conduzcan a las respuestas adecuadas. Entre estas características están su capacidad para reconocer sustratos, con arreglo a reacciones de reconocimiento propias de la cinética enzimática clásica; posibilidades de reconocimiento cooperativo (alostérico), de manera que la actividad pueda ser regulada de forma más rápida, sin recurrir a cinéticas de saturación; las opciones que, en definitiva, controlan el reconocimiento entre proteínas y moléculas pequeñas, o entre proteínas y macromoléculas, incluidas otras proteínas.

Pero, desde el punto de vista de los sistemas biológicos, cabe preguntarse cómo es posible combinar una serie reducida de elementos básicos para generar una gran variedad de mecanismos dotados de aspectos específicos. En concreto, surgen preguntas como qué ventajas pueden tener las rutas de transmisión de componentes múltiples, frente a las sencillas en las que un solo efector activado por el receptor de la señal, actúa directamente a nivel del núcleo para regular la actividad de los genes. Esta última posibilidad no es exclusiva de las bacterias, también en células de eucarióticas se da la activación, por ejemplo, de receptores del factor de crecimiento $TGF\beta$, que directamente actúan sobre factores de transcripción (11), o, la activación directa de Proteína Kinasa A por cAMP, para que la subunidad catalítica pueda transportarse al núcleo regulando un factor de transcripción (72).

Los análisis de gran escala, genómicos, proteómicos, etc. así como la elaboración de los datos que proporcionan, comienzan a permitir aportar algunas respuestas. A través de la integración de datos y procesos de simulación, conducen a explicar las propiedades emergentes de estos sistemas considerados de manera integrada, una vez analizado con detalle el funcionamiento individual de sus componentes específicos.

Algunas elaboraciones recientes (20) abren una vía para explicar dos aspectos relevantes sobre las rutas de transmisión de señales integradas por elementos múltiples, como las que hemos venido considerando en este trabajo. Uno es en qué medida las rutas de múltiples pasos pueden tener alguna ventaja frente a las de un solo paso, el otro es cómo es posible asegurar la especificidad de funcionamiento, de cada una de ellas, dada la similitud en su diseño, incluso la posibilidad de compartir elementos comunes.

Las vías de un solo componente requieren estímulos de intensidad elevada, tienen una capacidad de amplificación baja, su activación es gradual y difícilmente filtran el ruido de fondo, las señales menos claras que puedan perturbar. Por el contrario, el diseño de las rutas de componentes múltiples, como las de quinasas MAP, asegura una respuesta optimizada para reconocer

estímulos de baja intensidad, así como provocar una amplificación notable, una activación a la manera de un interruptor (encendido o apagado) y filtrar con precisión el ruido de fondo.

Por lo que respecta a la especificidad, tan necesaria en un sistema de redes de señales, que han de activarse de forma diferencial mediante estímulos que son similares, también la multiplicidad de escalones supone una garantía. Entre otras cosas por la posibilidad de establecer múltiples lugares de control del progreso de la señal, algo que realmente ocurre en varios niveles. En cualquier caso, un punto clave está en la propia regulación de la MAPK definitoria del proceso, regulación que puede operar de diversas formas, incluido su propio transporte al núcleo. Pero la regulación por la vía de fosfatasa, capaces de desactivar a la MAPK, representa una opción muy clara. Existen en la levadura todo un conjunto de fosfatasa capaces de regular las MAPKs, incluso algunas participando en una regulación mutua con la propia quinasa (37). Su actividad puede ir más allá de la mera eliminación de grupos fosfato, para producir la inactivación de la proteína quinasa, ya que pueden además llevar a cabo el confinamiento de la propia MAPK, ya sea en el núcleo, ya sea en el citoplasma, protegiendo su función de la activación por vías inadecuadas (68). Ese confinamiento puede ser la base de la especificidad en la activación de algunas rutas de las que se entrecruzan, y a veces comparten tramos y estímulos comunes.

En este sentido, también resultan altamente significativas las observaciones realizadas con células mesenquimales humanas, que constituyen una reserva de células troncales de interés creciente para la Medicina Regenerativa. La especificidad de activación de proteínas por parte de MAPKs está en la base de que dichas células mesenquimales expresen sus capacidades troncales. Así, el tratamiento con factor de crecimiento epidérmico (EGF) induce crecimiento de las células (56) mientras el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) provoca su diferenciación a osteoblastos (49).

La naturaleza combinatoria de las redes de comunicación intracelular es la base del último aspecto que quiero abordar en esta exposición. Me refiero al gran capítulo de la reprogramación

de los sistemas, es decir la posibilidad de modificar su funcionamiento en las células, algo que se puede poner en práctica con diversos propósitos, incluida la explotación biotecnológica de sus capacidades.

Sistemas reprogramables

Reprogramar supone actuar sobre los componentes del sistema para reformar su comportamiento, reorientar los procesos que gobiernan y modificar de esa manera el comportamiento de las células. En la levadura *S. cerevisiae* se realizaron modificaciones génicas prácticamente desde los inicios de la Ingeniería Genética. Entre las primeras modificaciones llevadas a cabo están la interrupción de genes, que permitió delecionar genes concretos y obtener de esa manera las estirpes privadas del gen y por tanto de su función (*knock out strains*), al igual que se ha venido realizando en otros organismos, incluidos mamíferos como el ratón. También se pudo llevar a cabo pronto la expresión de genes heterólogos (genes procedentes de otra especie), en la levadura. De hecho, la producción industrial de vacuna recombinante de la Hepatitis B, uno de los grandes avances de la Biotecnología de vacunas de los años 80, se puso a punto en estirpes de levadura, resolviendo así un problema fundamental de disponibilidad de esta vacuna, que hasta entonces se producía obteniendo el antígeno vacunal a partir de sangre de portadores del virus.

Hay, por tanto, una larga historia de modificación genética de la levadura y de otras especies de hongos, que comenzó por utilizar algunas estirpes simplemente para la expresión de genes y producción abundante de sus proteínas. Las posibilidades del manejo de estos organismos, con arreglo a lo anterior, es decir, eliminación específica de genes y expresión heteróloga, son, a día de hoy, extraordinariamente elevadas. Baste indicar que la secuenciación del genoma de *S. cerevisiae*, con la identificación de todos sus genes, ha permitido crear colecciones de estirpes delecionadas individualmente en todos y cada uno de ellos. Incluso de los genes que son imprescindibles para la viabilidad de la célula, se pueden obtener estirpes en las que se regula su expresión, y por tanto su viabilidad, de manera condicional. Coleccio-

nes similares de mutantes en todos los genes se han obtenido también en otras especies modelo, como *C. albicans*, a pesar de las dificultades inherentes a la interrupción de genes en esta especie diploide. Y por lo que respecta a la expresión heteróloga de genes en la levadura, se han desarrollado procedimientos para la expresión de, materialmente, todo tipo de genes, con el propósito de realizar, por ejemplo, el rastreo de moléculas con potencial acción farmacológica (116).

Sin embargo, los planteamientos de la reprogramación a los que quiero referirme pueden tener mucho mayores alcances, en función del conocimiento desarrollado sobre el funcionamiento de los circuitos regulatorios que constituyen las rutas de transducción de señales. Como se trata de procesos en los que se transmiten señales que generan respuestas, lo que se plantea es modificar la dotación genética correspondiente para redirigir el proceso en la dirección apropiada, sin afectar de manera notable al comportamiento del organismo. En nuestro laboratorio, hace ya años que nos planteamos la modificación de la ruta de integridad celular, para poder efectuar su interrupción de forma controlada y liberar proteínas expresadas (3). Las estirpes de levadura desarrolladas, para uso industrial y de otros tipos, en la producción de proteínas recombinantes, fueron objeto de patente (4).

La reprogramación de circuitos regulatorios puede facilitar un mejor conocimiento de las propiedades de los mismos, como el de los aludidos controles que aseguren la especificidad y fidelidad de transmisión de la señal. Manejando modificaciones en dos rutas básicas de *S. cerevisiae*, la de alta osmolaridad-glicerol (HOG) y la de apareamiento, se ha logrado la reorganización de la transmisión de señal demostrativa de que uno de los controles está precisamente en el andamiaje que incorpora el módulo de básico de las tres quinasas. En la primera de estas rutas, el andamiaje lo constituye la proteína Pbs2, que también actúa como MAPKK, mientras que en la segunda este soporte es función de la proteína Ste5. A través de la supresión de Ste5 y la modificación de Pbs2, para construir un andamiaje híbrido, se logra reprogramar los circuitos, con el resultado de que es la propia feromona sexual la que activa una respuesta de osmoticidad en

la estirpe reprogramada (89). Es posible, por tanto, reconstruir una ruta nueva de estímulo-señal-respuesta, a partir de componentes de la ruta normales. Supone esto que la especificidad radica en determinados aspectos, como es la forma en que algunos componentes se fijan a un soporte. Con ello, el resto de la ruta puede ser reprogramable, por un procedimiento de “cortar y pegar” componentes que ocupen determinados tramos del circuito (98), reconduciendo la señal por una vía distinta.

Esta flexibilidad puede permitir reorientar señales y respuestas prácticamente a la demanda, dirigiendo las funciones de la levadura en las direcciones más insospechadas. Todo ello siempre que los cambios introducidos respeten los mecanismos básicos que son inamovibles, y aporten nuevos componentes para incorporarse a los circuitos. Por ejemplo, la expresión de receptores de células de mamíferos en la levadura, ha permitido incorporar a una estirpe de *S. cerevisiae*, los componentes iniciales del sistema olfatorio de rata, de manera que su activación facilite la expresión de un gen reportero muy utilizado, el de la proteína verde fluorescente. Los investigadores lograron un sistema funcional, que además pudiera activarse con la presencia de 2,4-dinitrotolueno (DNT)¹² (100), un explosivo que es detectado por sistemas de la olfacción en mamíferos.

La incorporación de genes humanos a la levadura, para insertarse en sus vías de señalización, puede aportar sistemas muy definidos de estudio de la funcionalidad de algunos procesos y de los genes que los gobiernan. En nuestro laboratorio se llevan a cabo también esfuerzos en este sentido, en la línea de lo que se ha llamado creación de “levaduras humanizadas”, lo que expresa de forma muy gráfica la incorporación de funciones biológicas humanas a la levadura. El sistema que se ha desarrollado no supone expresar genes ortólogos humanos en *S. cerevisiae*, sino más bien reconstituir en la levadura una ruta de señalización, propia de células humanas, inexistente en la propia levadura. Se trata de la ruta de señalización integrada por fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), fosfatidilinositol-3-fosfatasa (PTEN) y proteína

¹² El DNT ha estado de actualidad en España en tiempos recientes, lo que motivó el interés inmediato de un sector de la prensa por estos resultados de investigación científica.

quinasa B (PKB/c-Akt), que opera en muchos procesos, como la proliferación celular y la apoptosis, generando fosfatidilinositol(3,4,5)-trifosfato (PIP₃). La incorporación de estos tres genes a la célula de levadura permite reconstituir la vía de señalización humana en un sistema unicelular sencillo (102). De hecho, la expresión de la subunidad catalítica de PI3K en niveles altos resulta tóxica para la levadura, debido a la generación del segundo mensajero propio de esta ruta, el PI3P, pero no porque sea tóxico sino porque se hace a costa de su precursor bifosfato (PIP₂) que resulta esencial. Es, por tanto, la depleción de PIP₂ la que determina la letalidad de PI3K, pero se contrarresta por la expresión de PTEN, y no por su potencial gen ortólogo de la levadura, que codifica la proteína Tep1. El sistema se reconstituye, por tanto, con unas condiciones muy controladas y con sus propias exigencias de especificidad. La falta de función de PTEN causa la muerte de la levadura, en un proceso definido por la reorganización de actina, la distorsión del anillo de septinas, con la consiguiente alteración morfogénica, y la activación de Slt2.

Aparte del interés de reconstituir la ruta para su estudio, el sistema se revela como muy útil para estudiar alteraciones de PTEN, un supresor de tumores, lo que ha permitido mapear una serie de mutaciones en este gen, para definir mejor los requerimientos para su función supresora tumoral (7). Se trata de un ejemplo de reprogramación de rutas de señalización en *S. cerevisiae*, que permite modificaciones genéticas de ajustes verdaderamente finos, en la función de rutas de señalización. En este caso, la ruta no sólo es heteróloga, sino que no está representada en la levadura.

Salmonella, ¿patógeno de levadura?

No, no se trata de alarmar con un nuevo proceso infeccioso, de los que emergen de vez en cuando. Me refiero a la utilización de determinadas proteínas de esta bacteria, y de algunas otras, para analizar los efectos de su expresión en la levadura. La disponibilidad de genes de bacterias patógenas, como *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* enteropatógeno, permite abordar un doble aspecto en este sistema. Por un lado se pueden estudiar

aspectos adicionales, no conocidos, del propio funcionamiento de las rutas de señalización; por otro, es posible caracterizar la acción de los factores de virulencia sobre las células del hospedador.

La acción patógena de muchas bacterias se basa con frecuencia en la inyección de proteínas en las células humanas, mediante la acción de sus sistemas de secreción. El sistema de secreción de tipo III, por ejemplo, actúa a modo de jeringa molecular, introduciendo proteínas solubles que entran en contacto con los componentes celulares de la célula hospedadora interfiriendo con sus rutas. La expresión de los genes bacterianos correspondientes, en la célula de *S. cerevisiae*, con frecuencia produce alteraciones citológicas, altamente sugerentes de la forma en que el patógeno bacteriano ejerce su acción patogénica. SopE2 de *Salmonella*, es una proteína con actividad como factor de intercambio de nucleótidos en GTPasas de señalización, como Cdc42 de la levadura. Su expresión en este organismo conduce a una activación de vías de señalización como la de apareamiento (controlada por la MAPK Fus3) y la de crecimiento invasivo pseudomicelial (controlada por Kss1), incluso también actúa sobre la ruta de IC (104). Otro factor de la misma bacteria es SigD, homólogo de las inositol-fosfatasa de mamíferos, que induce polarización como un efecto independiente de su actividad enzimática (1). Parece existir una interacción SigD con la GTPasa Cdc42 de levadura (103). Estos resultados propician nuevas iniciativas basadas en la expresión de Cdc42 humano como forma de analizar la interacción con estos factores bacterianos en levadura.

Las posibilidades del sistema son realmente muy amplias. Hasta ocho efectores de *Escherichia coli* EPEC (enteropatógena) se han podido estudiar mediante aproximaciones de este tipo, incluyendo diversos componentes más o menos conocidos (101). Igualmente, con la dirección de los profesores Rafael Rotger y María Molina, en nuestro departamento se desarrolla otra aproximación más general, como es el uso de genotecas bacterianas para identificar nuevos factores de virulencia. Empleando una genoteca de *S. typhimurium* y otra de *S. typhi*, en un vector de levaduras inducible por galactosa, dado que muchos de los efectores bacterianos son tóxicos cuando se sobre-expre-

san, se pueden seleccionar aquellos clones transformados con la genoteca que son capaces de crecer en glucosa pero no crecen en galactosa. Este tipo de selección está permitiendo, por ejemplo, identificar una proteína de *S. typhi*, capaz de actuar negativamente sobre proteínas G heterotriméticas acopladas a receptores de 7 dominios transmembranales (GPCR). Concretamente actúa como regulador negativo (RGS) de la subunidad G α (Gpa1) de la proteína G de la ruta de feromonas. El sistema de levadura permite también abordar la interacción con una proteína G α humana mediante, su expresión heteróloga en la levadura. Son ejemplos de para qué puede ser útil la levadura, en función de la conservación de las rutas al objeto de estudiar mecanismos moleculares relacionados con enfermedades humanas, en este caso infecciosas.

Reprogramación letal, ¿qué hay de la acción antifúngica?

El funcionamiento adecuado e integral de las rutas de transmisión de señales, en algunas situaciones, es vital para la supervivencia de la célula microbiana. Así lo demuestra la pérdida de viabilidad que tiene lugar por la eliminación de determinados genes, o por la falta de funcionalidad de los mismos o de sus productos. De ahí que la utilización de inhibidores de determinadas funciones esenciales, para interferir con el desarrollo de los microorganismos, pueda ser considerada a la luz de estas consideraciones sobre reprogramación; reprogramar para lograr una acción letal o la detención del crecimiento.

En Microbiología el estudio de los antimicrobianos de la más diversa naturaleza tiene una larga tradición y amplitud. Me limitaré aquí a algunos comentarios sobre la acción antifúngica, que son pertinentes en el contexto de la transmisión de señales y las respuestas celulares. De hecho, la utilización terapéutica de antibióticos bactericidas, es decir, causantes de la muerte del microorganismo, en muchos casos no suele basarse en que agente terapéutico tenga una acción letal directa, sino más bien en que interfiera con las funciones de manera que el microbio muere al continuar su desarrollo en condiciones en que éste no puede tener lugar. Es el caso de las penicilinas y los antibióticos β -

lactámicos en general. La interferencia con las funciones de desarrollo de la pared celular bacteriana, provoca en las células en crecimiento una deficiencia en la protección y, por consiguiente, la muerte celular.

La pared celular bacteriana aporta el conjunto de dianas más extenso, para combatir a las bacterias con antibióticos apropiados, de hecho son dianas muy selectivas puesto que en la célula animal no existe una pared celular. Sin embargo, hay otras muchas posibles dianas antibacterianas, ya que desde la síntesis de las proteínas hasta la de los ácidos nucleicos se llevan a cabo por mecanismos claramente diferentes de los que operan para estas funciones en las células eucarióticas. Por el contrario, la biosíntesis de ácidos nucleicos y de proteínas, en los hongos, responde a patrones muy similares a los de la célula animal; de ahí la dificultad de convertir en medicamentos la enorme cantidad de agentes conocidos que interfieren con estos procesos en las células superiores. En cambio, las células de animales carecen de una pared celular, así como de los procesos biosintéticos básicos que la generan en los hongos. La pared celular fúngica, los procesos que determinan su biogénesis, incluida la regulación de los mismos, debe representar ese conjunto de dianas selectivas para potenciales agentes antifúngicos que en algún momento lleguen a la clínica humana.

Desde hace mucho tiempo se ha venido postulando la búsqueda de lo que podían ser las “penicilinas frente a hongos”, como forma de disponer de agentes de la mayor eficacia para combatir las infecciones. De hecho, hace bastantes años que se conocen sustancias con acciones de este tipo, la equinocandina B, por ejemplo, fue descubierta en 1974. Sin embargo, su compleja estructura química, del grupo de los lipopéptidos con elevado peso molecular, no ha facilitado hasta hace poco su desarrollo, ni el de derivados apropiados, como medicamentos antifúngicos.

El panorama de la infecciones fúngicas ha cambiado notablemente en las dos últimas décadas (110). Sin detallar de manera exhaustiva los abundantes datos que se van aportando, cabe señalar, por ejemplo, que las especies del género *Candida* causan cerca del 10% de la infecciones nosocomiales, con una tasa de

mortalidad muy alta, y que en muchos hospitales llegan a ser responsables del 6% del total de los fallecimientos. Otros hongos, como *Aspergillus*, *Cryptococcus*, y algunos otros, también han ido aumentando en su presencia, como amenaza infecciosa de elevada letalidad. Esta situación se debe en buena medida a los grupos de pacientes a los que suele afectar la colonización y eventual infección sistémica por estos hongos. Entre ellos, los inmunosuprimidos, sea por trasplante o por padecimiento de SIDA, muchos de los afectados por tumores, incluso los sometidos a tratamiento antibacteriano intenso, que suprime gran parte de la *Microbiota* del organismo, una barrera natural frente a la colonización por los hongos.

El interés por desarrollar fármacos antifúngicos se ha incrementado lógicamente, y con ello la búsqueda de posibilidades que amplíen el arsenal de agentes de utilización sistémica¹³, hasta hace poco reducido a fármacos activos frente a la membrana citoplasmática, como anfotericina B o diversos azoles. Finalmente, se ha introducido hace poco en la clínica humana el primero de los medicamentos antifúngicos, la caspofungina (31), que actúa frente a la pared celular, materializando así la propuesta racional, de que la pared celular constituye una excelente diana para estos fármacos (59). Se trata de un derivado semisintético de la pneumocandina B, un antibiótico similar a la equinocandina, basado en la modificación de la cadena lipídica de la molécula. De hecho, previamente se habían obtenido otros derivados de este tipo, como la cilofungina, con una excelente acción fungicida, que no llegaron a introducirse en clínica humana por problemas de toxicidad.

Es de hacer notar que el producto original del que deriva la caspofungina, la pneumocandina B (85), fue descubierto en España, en el Centro de Investigación Básica (CIBE) de Merck, Sharp & Dhome, como metabolito producido por un hongo. La clasificación precisa de la estirpe productora ha permitido clasificarlo como *Glarea lozoyensis*, lo que indica su procedencia del río Lozoya, que discurre cercano a la ciudad de Madrid.

¹³ La factura de antifúngicos en muchos hospitales ha llegado a superar la de antibacterianos.

Las equinocandinas interfieren con la formación del glucano de la pared celular de los hongos a los que afectan. Los procesos interferidos tienen que ver con la ruta de señalización de IC, que conlleva la activación de la 1,3- β -glucan sintasa, para la generación del polisacárido. En *S. cerevisiae*, el gen fundamental para esta biosíntesis, *FKS1*, es regulado por la acción de proteína Rho1, la que se activa en las etapas iniciales de la ruta por la proteína activadora Rom1. Rho1 es el activador de Pkc1 que también parece actuar sobre el propio gen *FKS1*. La intensificación de la ruta, en condiciones de estrés de pared celular, el llamado mecanismo compensatorio, conduce a una intensa síntesis de glucano. Existe también redundancia en el equipo biosintético del polisacárido en la levadura; otro gen, *FKS2*, de menor relevancia en la síntesis de glucano, y regulado por la ruta de calcineurina también participa en la generación de una pared celular estable. Las indicaciones acerca de la diana son claras, mutaciones en *FKS1*, confieren resistencia a caspofungina.

La introducción de este antibiótico, que requiere administración endovenosa por no poder absorberse de otra forma, ha permitido abordar infecciones por *Candida* y *Aspergillus*, que constituyen amenazas graves para la vida del enfermo. Otros derivados semisintéticos de equinocandinas, en fase de introducción en clínica, son anidulafungina (41), que deriva de la primera equinocandina descubierta y la micafungina, cuyo precursor original fue identificado en 1990. Como es lógico, se busca perfeccionar las características de los productos en uso, aumentando su acción antifúngica, espectro y otras propiedades. Se puede decir que la terapia antifúngica, con agentes que interfieran con la pared celular, apenas acaba de comenzar.

La búsqueda de antifúngicos debe continuar

La introducción en clínica de antifúngicos con un nuevo modo de acción, revela las posibilidades de esta vía. De lo expuesto hasta ahora se deduce que la generación de la pared celular es un proceso complejo, tanto en sus detalles regulatorios, como en los directamente biosintéticos, muchos de los cuáles están aun por esclarecer. De ahí el que la posibilidad de aprovechar el nuevo

conocimiento, para identificar nuevas dianas sobre las que actuar, impidiendo el desarrollo de la célula fúngica, constituya un afirmación constante en la literatura científica sobre el tema. Los mecanismos regulatorios, basados en quinasas de proteínas o en factores de transcripción, no es fácil que puedan constituir una diana antifúngica selectiva, pues esas funciones están también en la célula animal, aunque no quepa descartar cierta especificidad en los componentes de la célula del hongo. Pero, las proteínas de la pared o las que actúan en la biosíntesis de sus integrantes estructurales, podrían realmente serlo.

La identificación de nuevas dianas para diseñar posibles fármacos frente a ellas, supone la nueva estrategia que ha sustituye a los desarrollos clásicos más empíricos. En éstos se analizaba la acción farmacológica de los más variados productos, naturales o de síntesis, para detectar sustancias activas que sirvieran al menos como cabezas de serie para nuevos derivados.

Pero, la identificación de estas dianas nuevas, especialmente cuando se trata de nuevos antimicrobianos, puede basarse en un cribado múltiple de sustancias que se identifiquen desde el inicio como capaces de actuar con arreglo a un determinado modo de acción. Ese es el principio que incorporamos en la última de las iniciativas científicas de nuestro laboratorio a las que me refiero. Se trata de la construcción de estirpes de *S. cerevisiae* que enfrentadas a las más variadas sustancias, nos puedan informar de si actúan afectando a la formación de su pared celular, sea por la vía que sea. Hemos desarrollado una estirpe de estas características, reprogramando sus mecanismos de transmisión de señales que causan estrés sobre la pared celular. El fundamento de este desarrollo está en la activación de la ruta de IC, que deben ejercer los agentes capaces de interferir, directa o indirectamente, con la generación fisiológica o con el mantenimiento estable de la pared celular de la levadura.

Para generar la estirpe deseada, se ha hecho uso del gen *YKL161C*, un elemento genético identificado en el genoma de la levadura, y para el que no se podido caracterizar ninguna función relevante en la célula. Este gen resulta ser altamente homólogo de *SLT2*, activándose su transcripción en niveles elevados

cuando se desencadena la cascada de reacciones de integridad celular, mediante daños en la pared. Constituye, por tanto, un buen gen reportero de la activación de la ruta de IC. La estirpe se ha construido sustituyendo, en el genoma de la estirpe original, la región correspondiente a la secuencia codificante del gen *YKL161C*, por la secuencia codificante del gen de resistencia al antibiótico aminoglicosídico nourseotricina, en una construcción genética que incluye un módulo de expresión constitutiva del gen *HIS3* procedente del plásmido pFA6a-HISM3, como marcador de selección. Como consecuencia de todo ello, en la cepa recombinante resultante (AT-1), la expresión del gen de resistencia a nourseotricina queda bajo el control del promotor del gen *YKL161C*, mientras que la expresión constitutiva del gen *HIS3* permite el crecimiento de la cepa generada en medio de cultivo carente del aminoácido histidina, lo que posibilita la selección de estirpes recombinantes, que lleven integrada esta construcción. Éstas se pueden diferenciar fácilmente de la estirpe silvestre, portadora de mutación en el gen *HIS3*, e incapaces por tanto de crecer en ausencia del citado aminoácido (Rodríguez-Peña et al. 2007, sometido a publicación).

La comprobación de que el sistema funciona se ha podido efectuar enfrentándolo tanto a antifúngicos y agentes que perturbaban la pared celular, como a otros tipos de inhibidores del hongo como los azoles, lo que demuestra su selectividad que nos ha llevado a solicitar la patente de la estirpe y el procedimiento de utilización (Rodríguez-Peña et al., 2007, patente española en trámite).

COMENTARIOS FINALES: LA AGENDA POST-GENÓMICA

Los avances en las tecnologías de escala propician, no sólo nueva información, sino nuevas estrategias experimentales. La fenomenología biológica se manifiesta en niveles —molecular, celular, organismos, ecosistemas— en los que la comprensión de cada uno de ellos, permite explicar el nivel superior, pero no agota todas sus posibilidades. El nuevo conocimiento trata de integrar una enorme cantidad de datos, en búsqueda de las propiedades emergentes de los sistemas biológicos. Mas que hablar

de una era post-genómica, entiendo que estamos en el desarrollo de una auténtica agenda post-genómica. Apenas se ha comenzado a explotar las posibilidades que el conocimiento de los genomas de todo tipo de organismos puede propiciar, para entender mejor —de manera integrada— las bases de los fenómenos definitorios de los niveles biológicos expresados.

El camino a recorrer es, por tanto, el conocimiento de los sistemas biológicos de forma que se pueda, no sólo definir su funcionamiento, sino predecirlo. Porque la información biológica supone unas pautas de programación que conllevan respuestas a los cambios de todo tipo. Las posibilidades de conocer globalmente genomas, proteomas y metabolomas, así como la forma en que el avance lo ha hecho posible, en poco tiempo, nos entusiasman. Sin embargo, esa integración que persigue la Biología de Sistemas, como forma de llegar a predecir el funcionamiento de células y organismos, sobre un número tan elevado de grados de libertad, se nos antojan aun lejanas, necesitadas incluso del desarrollo de la próxima generación de computadores, que posibiliten el manejo de información en escalas aun mucho mayores que las actuales.

No obstante lo anterior, los pasos que se van dando son realmente firmes, aunque la modelización y predicción esté aún en sus comienzos y se refiera a aspectos parciales. Hay diversas facetas que marcan claramente el camino, como base para un desarrollo importante de esa agenda post-genómica ya en marcha. La primera sigue estando naturalmente en el valor de los modelos de trabajo y experimentación, muchos de ellos procedentes del mundo microbiano. Los organismos unicelulares pueden ser un compendio de las características de los organismos celulares más complejos (82). Ello se debe a que incorporan mecanismos funcionales que les permiten desarrollar procesos de comunicación, homeostasis, organización espacio-temporal de sus integrantes, reproducción, respuesta y adaptación a estímulos externos, etc.

Los abordajes a los que se aspira se emprenden ya en organismos como la levadura, al que tanto nos hemos referido en esta exposición. De las bases de datos post-genómicas de levadura se pueden extraer secuencias definitorias de moléculas y sus propie-

dades bioquímicas; información sobre las proteínas, sus interacciones, co-localizaciones y pautas de expresión conjunta; y todo tipo de datos funcionales basados en la delección de los genes y la regulación por ARN de interferencia. Para desarrollar esos planteamientos integradores, se proponen dos estrategias factibles en levadura (84). Ambas están basadas en la posibilidad de analizar metabolomas, la última y definitiva consecuencia del estado del proteoma de la célula, y, por tanto, la aproximación más directa al fenotipo celular. Una sería el análisis del flujo metabólico como tal, el encadenamiento de los procesos a través de la formación de los metabolitos. La otra, consistiría en analizar los cambios en dicho flujo metabólico, ya sea por variaciones en las condiciones de crecimiento y desarrollo, o la debida a la eliminación específica de genes concretos. Esto último resulta factible gracias a la aludida disponibilidad de colecciones de estirpes carentes de todos y cada uno de los 6000 genes de este organismo.

En cualquier caso, los abordajes metabolómicos son el objetivo final que materializa las posibilidades de la Genómica Funcional. La determinación de metabolomas, y sus variaciones en distintas circunstancias debe informar de toda la gama de posibilidades fenotípicas, del conocimiento de los “fenomas”, en definitiva. El perfeccionamiento de los análisis metabolómicos está resultando extraordinariamente útil para poner de manifiesto las bases de la complejidad. La complejidad no está en el número de genes; de los 6000 de la levadura se pasa a apenas 25.000 para la especie humana. La diferencia numérica es escasa, mucho menor de lo que se creyó durante mucho tiempo, lo que indica claramente que las bases del diseño de posibilidades biológicas de los organismos se ha de interpretar en otras claves. Los proteomas proporcionan una visión complementaria de este aspecto, ya que la cantidad de proteínas y sus formas que se derivan de un genoma u otro, no son directamente proporcionales al número de genes.

Pues bien, los datos metabolómicos de distintos organismos, indican que en cada caso podemos estar manejando un número más reducido y accesible de componentes, con lo cual profundizar en sus variaciones puede resultar incluso más accesible. El metaboloma de la levadura está integrado por unos 650 metabo-

litos, resultantes de unas 1200 reacciones (33), mientras que el de las bacterias se situaría e niveles parecidos. En cuanto al metaboloma humano, la reconstitución que cabe hacer a partir de los datos genómicos indica que podría suponer del orden de 1100 a 3300 reacciones y de 700 a 2700 metabolitos. Se trata de una estimación baja, puesto que determinaciones experimentales llegan por ejemplo a detectar unos 3000 metabolitos en el suero (53).

En cualquier caso, la reconstitución de las redes metabólicas, a partir de abordajes experimentales y sobre las matrices genómica y proteómica, ha de completar el esquema de posibilidades de abordaje de sistemas biológicos. Son tareas de esa agenda post-genómica que no sólo nos darán claves fundamentales de los sistemas biológicos sino que permitirán modelizar su funcionamiento, para predecirlo. Ni que decir tiene que, en este tipo de iniciativas, está la clave del conocimiento futuro de las bases de la enfermedad —una situación fenotípica consecuencia de alteraciones que pueden ir desde los genes y su regulación, hasta las proteínas productos de los mismos, y los flujos metabólicos a que dan lugar—, así como de los fármacos que puedan ejercer alguna acción sobre todos ellos.

Mientras tanto, la vida microbiana en su versión eucariótica, ha de seguir proporcionando modelos de trabajo y estrategias experimentales para seguir recorriendo el camino del conocimiento científico que nos es dado alcanzar.

He dicho.

Agradecimientos. Mi gratitud a todos los integrantes del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia, se materializa en unas gracias especiales a quienes me han ayudado en la preparación de este texto, los profesores María Molina, Javier Arroyo, Humberto Martín, Víctor J Cid, Concha Gil, Rafael Rotger, Jesús Pla y Federico Navarro. El trabajo generoso y creativo, para el diseño de la Figura 3, de Aída Pitarch merece todo mi agradecimiento. Gracias también a mi secretaria, Ana Cabeza, por su profesionalidad y apoyo constantes.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Aleman A, Rodriguez-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
2. Alonso-Monge R, Navarro-Garcia F, Molero G, Diez-Orejas R, Gustin M, Pla J, Sanchez M, Nombela C. 1999. Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 181:3058-68
3. Alvarez P, Sampedro M, Molina M, Nombela C. 1994. A new system for the release of heterologous proteins from yeast based on mutant strains deficient in cell integrity. *J. Biotechnol.* 38:81-8
4. Alvarez P, Sampedro M, de la Fuente, J M, Molina M, Nombela C. 1997. Procedimiento de liberación de proteínas heterólogas de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Patente española ES2092439. 1997.
5. American Academy of Microbiology. 2004. Microbiology in the 21st century. Where we are and where we are going. American Society for Microbiology,
6. American Academy of Microbiology. 2004. Systems Microbiology: beyond microbial genomics. American Society for Microbiology,
7. Andres-Pons A, Rodriguez-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 tumour suppressor PTEN. *Cancer Research*. In press
8. Andrews PD, Stark MJ. 2000. Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth. *J. Cell Sci.* 113:2685-93
9. Arana DM, Alonso-Monge R, Du C, Calderone R, Pla J. 2007. Differential susceptibility of mitogen-activated protein kinase pathway mutants to oxidative-mediated killing by phagocytes in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Microbiol.* 9:1647-59
10. Arana J. 2001. Materia, Universo, Vida Tecnos. Madrid.
11. Attisano L, Wrana JL. 2002. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science.* 296:1646-7
12. Bahn YS, Kojima K, Cox GM, Heitman J. 2006. A unique fungal two-component system regulates stress responses, drug sensitivity, sexual development, and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Biol. Cell.* 17:3122-35
13. Bahn YS, Xue C, Idnurm A, Rutherford JC, Heitman J, Cardenas ME. 2007. Sensing the environment: lessons from fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* 5:57-69
14. Bates S, MacCallum DM, Bertram G, Munro CA, Hughes HB, Buurman ET, Brown AJ, Odds FC, Gow NA. 2005. *Candida albicans* Pmr1p, a secretory pathway P-type Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase, is required for glycosylation and virulence. *J. Biol. Chem.* 280:23408-15
15. Buehrer BM, Errede B. 1997. Coordination of the mating and cell integrity mitogen-activated protein kinase pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 17:6517-25
16. Cabib E, Blanco N, Grau C, Rodriguez-Pena JM, 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.* 63:921-35
17. Cabib E, Duran A. 1975. Simple and sensitive procedure for screening yeast mutants that lyse at nonpermissive temperatures. *J. Bacteriol.* 124:1604-6
 18. Cajal S. Fundamentos racionales y condiciones técnicas de la investigación biológica. 1896. Discurso de ingreso en la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.
 19. Cenamor R, Galdona J, Molina M, Sánchez M, Nombela C. 1987. Production and secretion of *Saccharomyces cerevisiae* beta-glucanases: difference between protoplasts and periplasmic enzymes. *Journal of General Microbiology* 133:619-28
 20. Chen RE, Thorner J. 2005. Systems biology approaches in cell signaling research. *Genome Biol.* 6:235
 21. Cosano IC, Martin H, Flandez M, Nombela C, Molina M. 2001. Pim1, a MAP kinase involved in cell wall integrity in *Pichia pastoris*. *Mol. Genet. Genomics.* 265:604-14
 22. Costigan C, Gehrung S, Snyder M. 1992. A synthetic lethal screen identifies SLK1, a novel protein kinase homolog implicated in yeast cell morphogenesis and cell growth. *Mol. Cell Biol.* 12:1162-78
 23. Crowe JD, Sievwright IK, Auld GC, Moore NR, Gow NA, Booth NA. 2003. *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Mol. Microbiol.* 47:1637-51
 24. Davidson RC, Nichols CB, Cox GM, Perfect JR, Heitman J. 2003. A MAP kinase cascade composed of cell type specific and non-specific elements controls mating and differentiation of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* 49:469-85
 25. de Bernardis F, Mondello F, Scaravelli G, Pachi A, Girolamo A, Agatensi L, Cassone A. 1999. High aspartyl proteinase production and vaginitis in human immunodeficiency virus-infected women. *J. Clin. Microbiol.* 37:1376-80
 26. De Groot PW, de Boer AD, Cunningham J, Dekker HL, de Jong L, Hellingwerf KJ, de Koster C, Klis FM. 2004. Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. *Eukaryot. Cell.* 3:955-65
 27. De Groot PW, Hellingwerf KJ, Klis FM. 2003. Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast.* 20:781-96
 28. de Nobel H, Ruiz C, Martin H, Morris W, Brul S, Molina M, Klis FM. 2000. Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology.* 146:2121-32
 29. del Rey F, Santos T, Garcia-Acha I, Nombela C. 1980. Synthesis of beta-glucanases during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*: formation of a new, sporulation-specific 1,3-beta-glucanase. *J. Bacteriol.* 143:621-7
 30. Denis V, Cyert MS. 2005. Molecular analysis reveals localization of *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C to sites of polarized growth and Pkc1p targeting to the nucleus and mitotic spindle. *Eukaryot. Cell.* 4:36-45
 31. Denning DW. 2003. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet.* 362:1142-51

32. Diez-Orejas R, Molero G, Navarro-Garcia F, Pla J, Nombela C, Sanchez-Perez M. 1997. Reduced virulence of *Candida albicans* MKC1 mutants: a role for mitogen-activated protein kinase in pathogenesis. *Infect. Immun.* 65:833-7
33. Duarte NC, Herrgard MJ, Palsson BO. 2004. Reconstruction and validation of *Saccharomyces cerevisiae* iND750, a fully compartmentalized genome-scale metabolic model. *Genome Res.* 14:1298-309
34. Duran A, Nombela C. 2004. Fungal cell wall biogenesis: building a dynamic interface with the environment. *Microbiology.* 150:3099-103
35. Fernandez-Arenas E, Cabezon V, Bermejo C, Arroyo J, Nombela C, Diez-Orejas R, Gil C. 2007. Integrated proteomics and genomics strategies bring new insight into *Candida albicans* response upon macrophage interaction. *Mol. Cell Proteomics.* 6:460-78
36. Fernandez-Arenas E, Molero G, Nombela C, Diez-Orejas R, Gil C. 2004. Contribution of the antibodies response induced by a low virulent *Candida albicans* strain in protection against systemic candidiasis. *Proteomics.* 4:1204-15
37. Flandez M, Cosano IC, Nombela C, Martin H, Molina M. 2004. Reciprocal regulation between Slt2 MAPK and isoforms of Msg5 dual-specificity protein phosphatase modulates the yeast cell integrity pathway. *J. Biol. Chem.* 279:11027-34
38. Fonzi WA, Irwin MY. 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics.* 134:717-28
39. Fox D, Smulian AG. 1999. Mitogen-activated protein kinase Mkp1 of *Pneumocystis carinii* complements the slt2Delta defect in the cell integrity pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 34:451-62
40. Garcia R, Bermejo C, Grau C, Perez R, Rodriguez-Pena JM, Francois J, Nombela C, 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.* 279:15183-95
41. Ghannoum MA, D'Angelo M. 2005. Anidulafungin. A potent antifungal that targets *Candida* and *Aspergillus*. In *Infectious Diseases in Clinical Practice*, pp. 165-178.
42. Ghannoum MA, Spellberg B, Saporito-Irwin SM, Fonzi WA. 1995. Reduced virulence of *Candida albicans* PHR1 mutants. *Infect. Immun.* 63:4528-30
43. Gil R, Silva FJ, Pereto J, Moya A. 2004. Determination of the core of a minimal bacterial gene set. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:518-37
44. Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG. 1996. Life with 6000 genes. *Science.* 274:546, 563-46, 567
45. Harrison JC, Bardes ES, Ohya Y, Lew DJ. 2001. A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint. *Nat. Cell Biol.* 3:417-20
46. Herreros E, Garcia-Saez MI, Nombela C, Sanchez M. 1992. A reorganized *Candida albicans* DNA sequence promoting homologous non-integrative genetic transformation. *Mol. Microbiol.* 6:3567-74
47. Hohmann S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:300-72

48. Hube B, Naglik J. 2001. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology*. 147:1997-2005
49. Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR, Pittenger MF. 2000. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 275:9645-52
50. Jeffery CJ. 2003. Multifunctional proteins: examples of gene sharing. *Ann. Med.* 35:28-35
51. Jonak C, Kiegerl S, Ligterink W, Barker PJ, Huskisson NS, Hirt H. 1996. Stress signaling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:11274-9
52. Kapteyn JC, Ram AF, Groos EM, Kollar R, Montijn RC, Van Den EH, Llobell A, Cabib E, Klis FM. 1997. Altered extent of cross-linking of beta1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall beta1,3-glucan content. *J. Bacteriol.* 179:6279-84
53. Kell DB. 2006. Systems biology, metabolic modelling and metabolomics in drug discovery and development. *Drug Discov. Today*. 11:1085-92
54. Kirchrath L, Lorberg A, Schmitz HP, Gengenbacher U, Heinisch JJ. 2000. Comparative genetic and physiological studies of the MAP kinase Mpk1p from *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 300:743-58
55. Klis FM, Mol P, Hellingwerf K, Brul S. 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 26:239-56
56. Kratchmarova I, Blagoev B, Haack-Sorensen M, Kassem M, Mann M. 2005. Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation. *Science*. 308:1472-7
57. Kraus PR, Fox DS, Cox GM, Heitman J. 2003. The *Cryptococcus neoformans* MAP kinase Mpk1 regulates cell integrity in response to antifungal drugs and loss of calcineurin function. *Mol. Microbiol.* 48:1377-87
58. Kuypers MM. 2007. *Microbiology*. Sizing up the uncultivated majority. *Science*. 317:1510-1
59. Latge JP. 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol. Microbiol.* 66:279-90
60. Lee KS, Irie K, Gotoh Y, Watanabe Y, Araki H, Nishida E, Matsumoto K, Levin DE. 1993. A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol. Cell Biol.* 13:3067-75
61. Levin DE. 2005. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69:262-91
62. Levin DE, Fields FO, Kunisawa R, Bishop JM, Thorner J. 1990. A candidate protein kinase C gene, PKC1, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell*. 62:213-24
63. Lo HJ, Kohler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. 1997. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*. 90:939-49
64. Lopez-Villar E, Monteoliva L, Larsen MR, Sachon E, Shabaz M, Pardo M, Pla J, Gil C, Roepstorff P, Nombela C. 2006. Genetic and proteomic

- evidences support the localization of yeast enolase in the cell surface. *Proteomics*. 6 Suppl 1:S107-18.:S107-S118
65. Lorenz MC, Fink GR. 2001. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature*. 412:83-6
 66. Maloy S, Schaechter M. 2006. The era of microbiology: a golden phoenix. *Int. Microbiol.* 9:1-7
 67. Martin H, Arroyo J, Sanchez M, Molina M, Nombela C. 1993. Activity of the yeast MAP kinase homologue Slt2 is critically required for cell integrity at 37 degrees C. *Mol. Gen. Genet.* 241:177-84
 68. Martin H, Flandez M, Nombela C, Molina M. 2005. Protein phosphatases in MAPK signalling: we keep learning from yeast. *Mol. Microbiol.* 58:6-16
 69. Martin H, Rodriguez-Pachon JM, Ruiz C, Nombela C, Molina M. 2000. Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275:1511-9
 70. Martinez-Lopez R, Monteoliva L, Diez-Orejas R, Nombela C, Gil C. 2004. The GPI-anchored protein CaEcm33p is required for cell wall integrity, morphogenesis and virulence in *Candida albicans*. *Microbiology*. 150:3341-54
 71. Martinez-Solano L, Nombela C, Molero G, Gil C. 2006. Differential protein expression of murine macrophages upon interaction with *Candida albicans*. *Proteomics*. 6 Suppl 1:S133-44.:S133-S144
 72. Mayr B, Montminy M. 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:599-609
 73. Mey G, Held K, Scheffer J, Tenberge KB, Tudzynski P. 2002. CPMK2, an SLT2-homologous mitogen-activated protein (MAP) kinase, is essential for pathogenesis of *Claviceps purpurea* on rye: evidence for a second conserved pathogenesis-related MAP kinase cascade in phytopathogenic fungi. *Mol. Microbiol.* 46:305-18
 74. Molina M, Gil C, Pla J, Arroyo J, Nombela C. 2000. Protein localisation approaches for understanding yeast cell wall biogenesis. *Microsc. Res. Tech.* 51:601-12
 75. Navarro-Garcia F, Eisman B, Fiuza SM, Nombela C, Pla J. 2005. The MAP kinase Mkc1p is activated under different stress conditions in *Candida albicans*. *Microbiology*. 151:2737-49
 76. Navarro-Garcia F, Sanchez M, Nombela C, Pla J. 2001. Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:245-68
 77. Navarro-Garcia F, Sanchez M, Pla J, Nombela C. 1995. Functional characterization of the MKC1 gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein kinase homolog related to cell integrity. *Mol. Cell Biol.* 15:2197-206
 78. Negrodo A, Monteoliva L, Gil C, Pla J, Nombela C. 1997. Cloning, analysis and one-step disruption of the ARG5,6 gene of *Candida albicans*. *Microbiology*. 143:297-302
 79. Netea MG, van der Meer JW, Kullberg BJ. 2006. Both TLR2 and TLR4 are involved in the recognition of *Candida albicans*. Reply to "TLR2, but not TLR4, triggers cytokine production by murine cells in response to *Candida albicans* yeasts and hyphae" by Gil and Gozalbo, *Microbes and Infection* 8 (2006) 2823-2824. *Microbes. Infect.* 8:2821-2

80. Nickel W. 2003. The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur. J. Biochem.* 270:2109-19
81. Nombela C, Gil C, Chaffin WL. 2006. Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends Microbiol.* 14:15-21
82. Nurse P. 2003. Systems biology: understanding cells. *Nature.* 424:883
83. Odds FCRHBaNC. 2007. Virulence in *Candida albicans*: views and suggestions from a peer-group workshop. *ASM News* 64:54-5
84. Oliver SG. 2006. From genomes to systems: the path with yeast. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 361:477-82
85. Onishi J, Mainz M, Thompson J, Curotto J, Dreikorn S, Rosenbach M, Douglas C, Abruzzo G, Flattery A, Kong L, Cabello A, Vicente F, Pelaez F, Diez MT, Martin I, Bills G, Giacobbe R, Dombrowski A, Schwartz R, Morris S, Harris G, Tsiouras A, Wilson K, Kurtz MB. 2000. Discovery of novel antifungal (1,3)-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:368-77
86. Orlean P. 1997. Biogenesis of the yeast wall and surface components. In *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces. vol. 3*, ed. JR Pringle, pp. 229-362. Cold Spring Harbor Laboratory Press
87. Pardo M, Monteoliva L, Pla J, Sanchez M, Gil C, Nombela C. 1999. Two-dimensional analysis of proteins secreted by *Saccharomyces cerevisiae* regenerating protoplasts: a novel approach to study the cell wall. *Yeast.* 15:459-72
88. Pardo M, Monteoliva L, Vazquez P, Martinez R, Molero G, Nombela C, Gil C. 2004. PST1 and ECM33 encode two yeast cell surface GPI proteins important for cell wall integrity. *Microbiology.* 150:4157-70
89. Park SH, Zarrinpar A, Lim WA. 2003. Rewiring MAP kinase pathways using alternative scaffold assembly mechanisms. *Science.* 299:1061-4
90. Penn M, Dworkin M. 1976. Robert Koch and two visions of microbiology. *Bacteriol. Rev.* 40:276-83
91. Phan QT, Fratti RA, Prasadarao NV, Edwards JE, Jr., Filler SG. 2005. N-cadherin mediates endocytosis of *Candida albicans* by endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 280:10455-61
92. Pitarch A, Abian J, Carrascal M, Sanchez M, Nombela C, Gil C. 2004. Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies. *Proteomics.* 4:3084-106
93. Pitarch A, Jimenez A, Nombela C, Gil C. 2006. Decoding serological response to *Candida* cell wall immunome into novel diagnostic, prognostic, and therapeutic candidates for systemic candidiasis by proteomic and bioinformatic analyses. *Mol. Cell Proteomics.* 5:79-96
94. Pitarch A, Sanchez M, Nombela C, Gil C. 2002. Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Mol. Cell Proteomics.* 1:967-82
95. Pla J, Gil C, Monteoliva L, Navarro-Garcia F, Sanchez M, Nombela C. 1996. Understanding *Candida albicans* at the molecular level. *Yeast.* 12:1677-702
96. Pokholok DK, Zeitlinger J, Hannett NM, Reynolds DB, Young RA. 2006. Activated signal transduction kinases frequently occupy target genes. *Science.* 313:533-6

97. Popolo L, Gualtieri T, Ragni E. 2001. The yeast cell-wall salvage pathway. *Med. Mycol.* 39 Suppl 1:111-21.:111-21
98. Ptashne M, Gann A. 2003. Signal transduction. Imposing specificity on kinases. *Science.* 299:1025-7
99. Qi M, Elion EA. 2005. MAP kinase pathways. *J. Cell Sci.* 118:3569-72
100. Radhika V, Proikas-Cezanne T, Jayaraman M, Onesime D, Ha JH, Dhanasekaran DN. 2007. Chemical sensing of DNT by engineered olfactory yeast strain. *Nat. Chem. Biol.* 3:325-30
101. Rodriguez-Escudero I, Hardwidge PR, Nombela C, Cid VJ, Finlay BB, Molina M. 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli* type III effectors alter cytoskeletal function and signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 151:2933-45
102. Rodriguez-Escudero I, Roelants FM, Thorner J, Nombela C, Molina M, Cid VJ. 2005. Reconstitution of the mammalian PI3K/PTEN/Akt pathway in yeast. *Biochem. J.* 390:613-23
103. Rodriguez-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
104. Rodriguez-Pachon JM, Martin 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
105. Rodriguez-Pena JM, Cid VJ, Arroyo J, Nombela C. 2000. A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle. *Mol. Cell Biol.* 20:3245-55
106. Rodriguez-Pena JM, Perez-Diaz RM, Alvarez S, Bermejo C, Garcia R, Santiago C, Nombela C, Arroyo J. 2005. The 'yeast cell wall chip' - a tool to analyse the regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 151:2241-9
107. Rodriguez-Pena JM, Rodriguez C, Alvarez A, Nombela C, Arroyo J. 2002. Mechanisms for targeting of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-anchored cell wall protein Crh2p to polarised growth sites. *J. Cell Sci.* 115:2549-58
108. Roman E, Arana DM, Nombela C, Alonso-Monge R, Pla J. 2007. MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *Trends Microbiol.* 15:181-90
109. Santos T, del Rey F, Conde J, Villanueva JR, Nombela C. 1979. *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in exo-1,3-beta-glucanase production. *J. Bacteriol.* 139:333-8
110. Singh N. 2001. Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices. *Clin. Infect. Dis.* 33:1692-6
111. 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
112. Staab JF, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P. 1999. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science.* 283:1535-8

113. The World Health Organization. 2007. *The World Health Report 2007. A safer future. Global public security in the 21st century.* WHO,
114. Toda T, Niwa H, Nemoto T, Dhut S, Eddison M, Matsusaka T, Yanagida M, Hirata D. 1996. The fission yeast *sts5+* gene is required for maintenance of growth polarity and functionally interacts with protein kinase C and an osmosensing MAP-kinase pathway. *J. Cell Sci.* 109:2331-42
115. 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
116. Tucker CL. 2002. High-throughput cell-based assays in yeast. *Drug Discov. Today.* 7:S125-S130
117. Urban C, Xiong X, Sohn K, Schroppel K, Brunner H, Rupp S. 2005. The moonlighting protein Tsa1p is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 57:1318-41
118. van Drogen F, Peter M. 2002. Spa2p functions as a scaffold-like protein to recruit the Mpk1p MAP kinase module to sites of polarized growth. *Curr. Biol.* 12:1698-703
119. van het HM, Rast TJ, Martchenko M, Grindle S, Dignard D, Hogues H, Cuomo C, Berriman M, Scherer S, Magee BB, Whiteway M, Chibana H, Nantel A, Magee PT. 2007. Assembly of the *Candida albicans* genome into sixteen supercontigs aligned on the eight chromosomes. *Genome Biol.* 8:R52
120. Verstrepen KJ, Reynolds TB, Fink GR. 2004. Origins of variation in the fungal cell surface. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:533-40
121. Wheeler RT, Fink GR. 2006. A drug-sensitive genetic network masks fungi from the immune system. *PLoS. Pathog.* 2:e35
122. Wood V, *et al.* The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature.* 415:871-80
123. Xu JR, Staiger CJ, Hamer JE. 1998. Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:12713-8
124. Zarzov P, Mazzoni C, Mann C. 1996. The SLT2(MPK1) MAP kinase is activated during periods of polarized cell growth in yeast. *EMBO J.* 15:83-91

**CONTESTACIÓN DEL EXCELENTÍSIMO
SEÑOR DON JULIO RODRÍGUEZ VILLANUEVA**

Excelentísima Señora Presidenta
Excelentísimos Señores y Señoras Académicos
Señoras y Señores

Iniciaremos esta intervención manifestando nuestra satisfacción por colaborar con la institución en la contestación como académico del ingreso del Prof. César Nombela en esta Real Academia Nacional de Farmacia del Instituto de España.

Satisfacción que se une a la alegría de ver al nuevo académico engrosando las filas y las actividades de esta apreciada institución. Estamos seguros que el nuevo académico, dada su personalidad y preparación, aportará importantes actividades a esta casa y estará siempre dispuesto en base a su decidida voluntad a aportar ideas para el engrandecimiento de esta academia en la que desde su sólida formación científica y cultural, junto a su demostrada capacidad de relaciones públicas a nivel nacional e internacional traerá jornadas sobresalientes a nuestra institución.

Y al introducir al nuevo académico nos parece oportuno recordar el hecho que sería una alegría para su recordado tío el Prof. César González y que creemos que tanto se alegraría de verle incorporarse a la institución. También manifestar la alegría de ver entre nosotros a su esposa Nohelly, con sus hijos educados en un alto nivel cultural y sobre todo, en obras caritativas y científicas. Recordamos especialmente a su hijo César, en los últimos tiempos formándose en la Universidad de Berna, Suiza, y ahora viajando ya a los Estados Unidos, para completar su formación en la Facultad de Medicina de la Universidad de Harvard.

Un tema que siempre nos ha llamado la atención es la capacidad de César Nombela para estar en la vanguardia de las preocupaciones sociales de actualidad, sean de medicina, medio ambiente o sobre temas humanos, como ocurre con frecuencia con los dilemas de la educación o la investigación científica que tan a fondo conoce por vivirlos de lleno en el día a día de las preocupaciones intelectuales y de la auténtica realidad de nuestro país. Así recientemente, el 7 de agosto pasado, nos llamaba la atención un artículo del ABC sobre un tema de tanta actualidad como el Espacio de Educación Superior Europeo, sobre el que tanto se habla y se escribe en la prensa diaria. Precisamente en la mencionada publicación, se refería a cómo se ha de producir el avance del espacio europeo de educación superior, algo que solamente se podrá alcanzar a través de una autonomía creativa que haga de las universidades instituciones autoexigentes, capaces de responder a las necesidades de la sociedad. En este trabajo se comenta la verdadera situación de las Universidades americanas, que César Nombela tan bien conoce por haber practicado la enseñanza y la investigación en ámbitos próximos al Prof. Severo Ochoa en la Universidad de Nueva York.

En otro orden de cosas, también podríamos hablar de la formidable labor desarrollada por nuestro nuevo académico en el área de la Microbiología, desde los tempranos tiempos en que llegado desde Madrid realizaba su fase de formación doctoral en nuestro departamento de Microbiología del Instituto de Microbiología-Bioquímica del CSIC y la Universidad de Salamanca, realizando aportaciones interesantes en el área de las levaduras, hasta impulsar más tarde el desarrollo de uno de los grupos más importantes de la Microbiología en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense, precisamente en el ámbito en el que nosotros iniciábamos nuestra larga e intensa labor allá por los años sesenta del siglo pasado. Además deseamos manifestar que en todo momento contamos con el apoyo y el calor de maestros ilustres siempre recordados en esta Real Academia, como han sido los excelentes profesores de la Facultad de Farmacia y de entre ellos D. Salvador Rivas, los Profesores José María Albareda y D. Lorenzo Vilas, D. Ricardo Montequi, D. Eugenio Selles, sin olvidar al mismo tío de César Nombela, ya mencionado, D. César González y el siempre recordado en esta casa D. Ángel Santos,

que en sus días hicieron tanto para enaltecer la memoria y la historia de nuestra Real Academia.

Y precisamente considero que es el momento de recordar de forma especial al Prof. José María Albareda, un hombre absolutamente único tanto por su modestia y sencillez como por su capacidad creativa y voluntad de trabajo, todo un ejemplo. Personalmente estimo que no ha habido en el ámbito de la Farmacia y de la Universidad, una persona que haya hecho tanta labor de trascendencia como la realizada por D. José María a quien estimo que tal vez no se le ha reconocido como se merecía en esta Real Academia, ni por supuesto en la Facultad de Farmacia, colaborando en la introducción y desarrollo de nuevos planes de estudio y sobre todo, con las ideas del desarrollo de las Ciencias en España. D. José María no cesaba de crear y desarrollar ideas alentando a los jóvenes hacia la investigación y ofreciéndoles apoyo. Solamente desearía hacer memoria a los académicos y demás personas presentes, de lo que supuso la creación y el desarrollo del CSIC en los años cuarenta y en la actualidad con más de 150 institutos científicos en toda España. Estos centros han contribuido de manera especial a formar científicos sobresalientes que eran proyectados a los centros de investigación y sobre todo, a las Universidades, hacia donde hemos ido docenas de científicos, creo que bien preparados, con frecuencia después de largas estancias en importantes centros europeos y americanos, y que se situaban en los departamentos universitarios y en los institutos del Consejo para trabajar intensamente y contribuir al desarrollo científico español.

Continuando con esta trayectoria y recién celebrado el XX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Microbiología, en la Universidad de Sevilla, en el que recordamos momentos históricos de nuestra traducción de la obra más ampliamente reconocida de la Microbiología mundial “The Microbial World”, el famoso “El Mundo de los Microbios”, de los Profesores Roger Y. Stanier, Doudoroff y Adelberg, que sin duda ha servido para el desarrollo de la moderna Microbiología-Bioquímica, no sólo en los ámbitos españoles sino, sobre todo, en los de Iberoamérica, según hemos podido comprobar personalmente en numerosas y diferentes visitas por aquellos países del otro

lado del Atlántico. Precisamente el Profesor Nombela subrayó muy claramente una vez más su definida trayectoria en los ámbitos internacionales al señalar caminos y pautas desde la misma Presidencia de la Sociedad Española de Microbiología, al conseguir después con amplio apoyo la misma Presidencia de la Federación Europea de Sociedades de Microbiología, en donde la última ejecutoria fue atreverse a organizar el pasado año en Madrid, el Congreso Europeo de la FEMS, en el que colaboró decisivamente todo su grupo precisamente en las amplias instalaciones del Campo de las Naciones. Fue realmente impresionante la elevada concurrencia europea de todos los países a los que la FEMS extiende su ámbito y que prácticamente abarca a toda Europa.

Otro aspecto que merece la pena destacar es lo ocupado que se encuentra César Nombela. Personalmente siempre me lo imagino recibiendo y contestando llamadas telefónicas en el móvil, correspondiendo a los muchos compromisos que mantiene con gran variedad de personas y entidades. No es fácil ver ni imaginar al nuevo académico desocupado. Realmente, es ciertamente sorprendente la gran variedad de llamadas e invitaciones que recibe de ámbitos muy diferentes tanto a nivel nacional como internacional, lo que da una buena idea de las relaciones sociales y científicas que mantiene con personas, instituciones y asociaciones diversas, con las que trata de ampliar y atender en lugares muy diferentes tanto en España como en Europa cuando no en los Estados Unidos o en otros países americanos. Personalmente creo que también merece la pena recordar el papel que hace un par de años desempeñó como representante español en la prestigiosa institución de las Fundaciones Europeas, en las que se ha analizado a fondo la situación de las más prestigiosas fundaciones en las que ha quedado claro el papel desempeñado por la Fundación Wellcome del Reino Unido, con inversiones que superan los 450 millones de euros, muy superior a las bien conocidas de los Estados Unidos, sin olvidar algunas de las de más renombre en nuestro país como es el caso de la Fundación Ramón Areces. Esta institución en la que trabajo, mantiene una proyección nacional más que destacada en ámbitos muy diversos como el apoyo a trabajos de investigación, el fomento de las becas nacionales e internacionales, así como en la organización de sim-

posios y reuniones científicas internacionales, en áreas muy diferentes entre las que sin duda predomina la biomedicina.

En una reciente publicación nuestra titulada “El desarrollo de la Microbiología en España”, en la que se analizan las diferentes etapas del progreso de la especialización en nuestro país, hacemos particular referencia al impulso dado por el Prof. César Nombela a la Sociedad Española de Microbiología, labor que se considera realmente sobresaliente y decisiva. Prácticamente desde que se incorporó a la Junta de Gobierno de la SEM en 1978, su actividad ha sido incansable y ha continuado coronando sus contribuciones con su nombramiento en 1982 como Presidente de la Sociedad.

Un dato que debemos destacar es la promoción de la representación internacional de la SEM a través de la Federación Europea de Sociedades (FEMS) y de la Unión Internacional de Sociedades de Microbiología (IUMS). Durante su época como Presidente de la SEM se inició también el Ciclo de “Cursos de Introducción a la Investigación en Microbiología”, enfocados a atraer e ilusionar por la especialidad a estudiantes brillantes de último año de carrera interesados en la Microbiología y como futura carrera de jóvenes microbiólogos. Esta actividad ha sido apoyada anualmente por la Fundación Ramón Areces y ha constituido un verdadero éxito, siendo posteriormente adoptada por otras sociedades científicas, especialmente por la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, sociedad enormemente activa que actualmente cuenta con más de 3.500 miembros, en su mayor parte, jóvenes científicos.

Por otra parte, en 1995 su equipo publicó un trabajo de revisión en *Microbiological Reviews*, en colaboración con los Dres. Ángel Durán y Francisco del Rey Iglesias del Instituto de Microbiología-Bioquímica del CSIC y Universidad de Salamanca, sobre funciones básicas de traducción de señales en microbios eucarióticos (levaduras) que constituyen la base de la integridad celular.

Tenemos que destacar también que después de ser elegido en 1995 Presidente de la Federación Europea de Sociedades de Microbiología (FEMS), el Prof. César Nombela promovió nuevas

actividades de refuerzo de la cooperación europea en Microbiología, creándose la Oficina Permanente de la FEMS hoy radicada en Holanda.

Años más tarde, como ya hemos mencionado, el Prof. Nombela ha coordinado el equipo que a nivel español ha promovido la organización del II Congreso de la Federación Europea de Sociedades de Microbiología, FEMS 2006, que ha tenido lugar en Madrid en julio del pasado año bajo el lema "Integrating Microbial Knowledge in Humanan Life" y en el que hubo una amplia representación europea.

También nos parece interesante recordar, que hace unos meses y por encargo de la SEM, ha desarrollado una importante conferencia en el Ciclo organizada por el Instituto de España sobre Sociedades Científicas, conferencia que por delegación del presidente y como miembro de la Mesa del Instituto tuvimos el honor de presidir.

Nos interesa también destacar que el profesar César Nombela ha desempeñado con gran éxito el cargo de Presidente del CSIC desarrollando una intensa y gran actividad, reconocida por todos en un acto de despedida del cargo verdaderamente impresionante celebrado en el hall del CSIC bajo la presidencia de la Sra. Birulés, Ministra de Ciencia y Tecnología. Todos los presentes recordarán el largo aplauso y el reconocimiento por la labor desarrollada en el Consejo. Deseo subrayar que durante su mandato desarrolló la idea de visitar todos y cada uno de sus centros por la amplia geografía española.

Podemos añadir que durante su época como Presidente del Consejo, le acompañaron como Vicepresidente y con una extraordinaria colaboración, los profesores Emilio Lora Tamayo, que le sucedió como Presidente del CSIC, y Miguel García Guerrero, Catedrático en la Universidad de Sevilla y hoy Director del Instituto de Bioquímica Vegetal, cargo en el que ha sucedido al Prof. Manuel Losada, recientemente jubilado y académico de honor de esta Real Academia.

Muchas más cosas podríamos mencionar sobre la larga trayectoria científica y cultural recorrida por el Prof. Nombela en

muy diferentes ámbitos de la Ciencia y en la Universidad española de los últimos años, en la que sin duda el nuevo académico ha desplegado un auténtico protagonismo si bien con toda modestia, reconocido hoy aquí al haber contado con el apoyo de muchos de los académicos presentes de esta Real Academia. Por otra parte se puede decir César Nombela como científico y profesor universitario es ampliamente conocido en los ámbitos científicos y sociales más sobresalientes de nuestro país.

Personalmente podemos afirmar que entre el elevado número de colaboradores de nuestro grupo salmantino, que han alcanzado éxitos importantes, tenemos que destacar al nuevo académico ya que además de por su carrera científica se ha diferenciado por su trayectoria educativa y por sus actividades de cierto impacto social. Como ya hemos mencionado la Universidad, la investigación y los temas sobre ética, le han mantenido siempre luchando y poniendo en juego sus conocimientos y sobre todo, sus preocupaciones sociales que inquietan a muchos y adquieren especial atención en momentos determinados como los que ahora vivimos.

Y antes de concluir no quisiera dejar de mencionar lo que posiblemente se puede considerar su “aportación científica fundamental”: Abordando la biogénesis de una estructura compleja, la pared celular de microorganismos eucarióticos, el grupo de César Nombela descubrió el gen denominado *SLT2*, en la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Es un gen con un papel central en los referidos procesos biogénéticos, que codifica una serin-treonin-proteína quinasa de las activadas por mitógenos (“*MAP kinases*”) y define una ruta de señalización en estas células denominada “ruta de integridad celular”. El grupo de Nombela ha introducido en la literatura científica internacional este concepto (“*cell integrity*”) que actualmente constituye la base de las aproximaciones experimentales en diversos laboratorios de Europa, Estados Unidos y Japón. El desarrollo de los aspectos fundamentales y aplicados de esta cuestión, ha llevado a este grupo a ampliar la base de información, basada en aproximaciones genómicas, transcriptómicas y proteómicas. Igualmente ha identificado el gen homólogo (*MKC1*) en una especie patógena, *Candida albicans*, para cuyo estudio a nivel molecular, el grupo de Nombela ha desarrollado materiales básicos como vectores y genotecas comúnmente utilizados en

muchos centros. La proyección aplicada de estos trabajos está en la definición de nuevas dianas de actuación de antimicrobianos, nuevas estrategias diagnósticas de infecciones fúngicas, nuevas aplicaciones a la biotecnología de levaduras (liberación de proteínas homólogas y heterólogas). Del conjunto de publicaciones recogidas el currículum, existe una revisión que consolidaba las bases de la integridad celular y que fue recogida, en la valoración del Instituto de Salud Carlos III, como la publicación de mayor impacto de la Microbiología española entre 1994-2000.

Mencionar por último que desde hace diez años el nuevo académico colabora asiduamente en la prensa general, médica, farmacéutica y económica sobre temas de divulgación científica, bioética, política universitaria y científica siendo el ABC uno de los medios con los que colabora más frecuentemente, aportando trabajos de especial interés.

Otras actividades relevantes y puestos desempeñados nacionales e internacionales, podrían ser mencionados pero no es nuestro deseo alargar más esta interlocución.

Desde el punto de vista científico es necesario subrayar la formidable labor científica desarrollada por el Profesor Cesar Nombela. Analizando su currículum nos parece oportuno destacar el elevado número de trabajos de cierta categoría científica publicados por el nuevo académico y que supera los 143, la gran mayoría aparecidos en revistas internacionales de la máxima categoría y que aparecen como firmantes la mayoría de sus colaboradores departamentales. Trabajos sobre biología molecular de levaduras, en buen número sobre *Candida albicans*, un hongo de la máxima importancia clínica que está ofreciendo excelentes resultados en el área de la bioquímica, si bien otro microorganismo con el que han protagonizado muchas de sus principales aportaciones de laboratorio se desarrolla sobre la levadura más conocida a nivel general el *Saccharomyces cerevisiae* que sin duda ha ocupado la atención principal de su grupo en los últimos años con contribuciones de amplio reconocimiento internacional.

Otro aspecto que nos interesa destacar es la formidable labor desarrollada a niveles internacionales, sobre todo a nivel euro-

peo, en donde sin duda ha adquirido un gran protagonismo en especial en el área de la Microbiología en donde ha alcanzado un buen reconocimiento al ocupar la presidencia de la Sociedad Española de Microbiología, así como de la Federación Europea de Sociedades de Microbiología (FEMS). Nos interesa subrayar que como científico español es miembro del Consejo Editorial del *Journal of General Microbiology*, Vicepresidente primero y luego Presidente de la Federación Europea antes mencionada, de la que debemos resaltar que la FEMS está constituida por 35 sociedades científicas de toda Europa que agrupa a más de 20.000 científicos de este campo. Es a su vez Miembro del Comité Internacional de Bioética de la UNESCO, editor senior de la prestigiosa revista *Microbiology*, evaluador de proyectos de investigación de la Comisión Europea y de agencias de financiación científica de diversos países europeos y de los Estados Unidos.

Nos encontramos en un ámbito principalmente de la farmacia y nos interesa informar que a otros niveles, en la Europa científica e industrial, el Dr. Nombela es Miembro del Comité Consultivo para la Formación de Farmacéuticos de la Unión Europea, Miembro del Comité Científico de Alimentación Humana de la Universidad de la citada Unión. También ha participado en paneles de evaluación de proyectos del área de Biotecnología en convocatorias de la Dirección General de Investigación de la Comisión Europea. Ha sido Miembro de la European Science and Technology Assembly, Miembro del Foro Europeo para la Investigación de Genoma y por último Miembro del grupo de trabajo sobre Fundaciones e Investigación en Europa, creado por la Comisión Europea así como del Grupo NEST (New and Emergency Science and Technology).

Con esta larga intervención deseamos poner fin a la contestación como académico del candidato, con el deseo sincero de dar las gracias a todos los presentes en este acto. He dicho.