

Saccharomyces cerevisiae

Alicia Gonzalez y Lourdes Valenzuela

*Departamento De Genetica Molecular, Instituto De Fisiologia Celular.
Universidad Nacional Autonoma De Mexico. Apartado Postal 70-242.
Mexico D.F. C.P. 04510*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*: un modelo de estudio desde hace más de cien años

Levadura es un nombre genérico que agrupa a una variedad de hongos, incluyendo tanto especies patógenas para plantas y animales, como especies no solamente inocuas sino de gran utilidad. De hecho, las levaduras constituyen el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad. Algunas especies de levaduras del género *Saccharomyces* son capaces de llevar a cabo el proceso de fermentación, propiedad que se ha explotado desde hace muchos años en la producción de pan y de bebidas alcohólicas, y que a su vez ha inspirado un sinnúmero de obras de arte que ensalzan al Dios del vino y a aquellos que disfrutaban su consumo (**Fig. 1**). Desde el punto de vista científico, el estudio de las levaduras como modelo biológico ha contribuido de manera muy importante a elucidar los procesos básicos de la fisiología celular.

Dentro del género *Saccharomyces*, la especie *cerevisiae* constituye la levadura y el microorganismo eucariote más estudiado (**Fig. 2**). Este organismo se conoce también como la levadura de panadería, ya que es necesario agregarla a la masa que se utiliza para preparar el pan para que este esponje o levante; de hecho el término levadura proviene del latín *levare*, que significa levantar.

En 1897, los hermanos Hans y Edward Buchner obtuvieron extractos libres de células moliendo levadura para pan con granos de arena, a los cuales adicionaron grandes cantidades de azúcar de caña para evitar su posible contaminación. Para su sorpresa, encontraron que el azúcar se fermentaba rápidamente: por primera vez se había descubierto un modelo para el estudio de la fermentación alcohólica en un sistema carente de células. Este descubrimiento atrajo la atención de los bioquímicos, que decidieron analizar cada uno de los pasos que conducían a la producción de etanol y bióxido de carbono a partir de la glucosa. Este trabajo implicó el esfuerzo de muchos científicos y dio como resultado el descubrimiento y descripción del metabolismo del carbono; algunas de las vías metabólicas que conocemos actualmente, llevan los nombres de los científicos que participaron en este trabajo, como Embden y Meyerhof. La vía metabólica que permite la utilización de glucosa fue la primera ruta metabólica descrita, y la metodología empleada para lograrlo se utilizó para el estudio posterior de otras vías que constituyen el metabolismo celular.

Así, desde fines del siglo XIX se reconocieron algunas de las ventajas que ofrece el uso de la levadura de pan, *Saccharomyces cerevisiae*, como modelo biológico en la investigación: por un lado, la facilidad con la que se obtienen grandes cantidades de este microorganismo; y por otro, el hecho de que *S. cerevisiae* posee un ciclo de vida que al incluir una fase sexual (**Fig. 3**), permite abordar estudios con las herramientas que provee la genética formal.

Otra característica de esta levadura es el tamaño de su genoma, que por ser pequeño facilitó su secuenciación; y muchas otras virtudes que se han ido haciendo evidentes conforme se han desarrollado nuevos enfoques y métodos de estudio.

El genoma de *S. cerevisiae*: una aventura fascinante

El genoma nuclear. La levadura *S. cerevisiae* posee un genoma pequeño, solamente una cuantas veces mayor que el de *Escherichia. coli* y 200 veces menor que el de células de mamífero (**Fig. 4**), esto simplifica de manera importante el análisis genético y molecular del mismo. Por ejemplo, una biblioteca genómica de levadura completa puede quedar contenida en unos cuantos miles de plásmidos o fagos, en tanto que para contener una biblioteca completa de células de mamífero se requerirían cerca de un millón de partículas. Este hecho propició que se llevara a cabo una de las aventuras más emocionantes de nuestro tiempo, y el proyecto de mayor magnitud de la biología molecular moderna: la secuenciación completa de un genoma eucariote. La secuencia completa de este genoma se dio a conocer el 24 de abril de 1996 y constituyó el resultado de un enorme esfuerzo en el que participaron más de 600 científicos de 96 laboratorios, en un programa mundial encabezado por André Goffeau. Doce millones de bases fueron secuenciadas en un verdadero esfuerzo internacional, que involucró laboratorios europeos, americanos, canadienses y japoneses. Aún cuando la secuencia completa del genoma de la levadura representa solamente una fracción pequeña de la información que se encuentra actualmente en las bases de datos, ha constituido un recurso de gran valor para el análisis de la función y arquitectura genómica. Así mismo, esta experiencia facilitó y propició el desarrollo de proyectos involucrados en la secuenciación de genomas de una variedad de organismos eucariotes, incluyendo el proyecto del genoma humano (6).

Una levadura haploide contiene 16 cromosomas variando en tamaño de 200 a 2200 Kb, en los cuales como resultado del análisis de la secuencia del genoma, se localizaron un total de 6183 marcos de lectura abiertos (ORF, open reading frame) y se predijo que de éstos, 5800 correspondían a genes que codificaban para proteínas (**Fig. 5**) (6). A diferencia de los genomas de organismos multicelulares, el genoma de la levadura es muy compacto, dado que el 72% de la secuencia corresponde a secuencias codificantes. El tamaño promedio de los genes de levadura es de 1.45 kb, o 483 codones, y solamente el 3.8% de los ORFs contienen intrones. Aproximadamente el 30% de los genes se han caracterizado experimentalmente; y del 70% restante, cuya función no se conoce, aproximadamente la mitad contiene al menos un motivo de algún tipo de proteínas ya caracterizadas, o corresponden a genes que codifican para proteínas estructuralmente relacionadas con productos génicos ya caracterizados en levadura o en otros organismos (**Fig. 6**) (20). El ARN ribosomal se encuentra codificado por 120 copias repetidas y arregladas en tandem en el cromosoma, en tanto que existen 262 genes que codifican para ARNs de transferencia, 80 de los cuales poseen intrones. Los cromosomas contienen elementos móviles, retrotransposones, que varían en número y posición en las diferentes cepas de *S. cerevisiae*, aún cuando la mayoría de las cepas de laboratorio poseen aproximadamente 30 elementos (6).

El genoma no-nuclear. El ADN mitocondrial también puede considerarse parte del genoma de la levadura. Este ADN codifica para los componentes de la maquinaria traduccional de la mitocondria y aproximadamente el 15 % de las proteínas mitocondriales. Existen mutantes que carecen de ADN mitocondrial, estas se denominan \square^0 y carecen de los polipéptidos que se sintetizan en los ribosomas mitocondriales. Estas mutantes son incapaces de llevar a cabo el metabolismo respiratorio, pero son viables y capaces de fermentar sustratos como la glucosa (2).

El plásmido circular 2 μ , se encuentra presente en la mayoría de las cepas de *S. cerevisiae*, hasta la fecha no se ha encontrado una función para este plásmido salvo su propia replicación, y cepas carentes del mismo no presentan ningún fenotipo (22).

Prácticamente todas las cepas de *S. cerevisiae* contienen virus de ARN de doble cadena, que constituyen el 0.1% del total de ácidos nucleicos; de éstos el más estudiado es el M, que codifica para una toxina.

Los caracteres presentes en el genoma nuclear, segregan de manera Mendeliana, en tanto que la segregación de los caracteres presentes en el ADN mitocondrial o en algún otro elemento no-nuclear presentan un patrón de segregación no Mendeliano.

Ciclo de vida: una herramienta excepcional

Uno de los aspectos más relevantes de la biología de *S. cerevisiae*, es su ciclo de vida.

Ciclo de vida vegetativo.

Durante la fase vegetativa, la levadura se divide por gemación. La célula hija inicia su crecimiento formando una yema en la célula madre, posteriormente ocurre la división nuclear, la síntesis de la pared y finalmente la separación de las dos células. Este ciclo puede ocurrir en cultivos de células diploides o haploides, y por tanto se puede experimentar con cultivos estables haploides o diploides (**Fig. 3**) (22). Desde el punto de vista genético, el ciclo de vida vegetativo permite el aislamiento de mutantes recesivos en un fondo haploide, y el estudio de complementación de fenotipos en cepas diploides. Es decir, debido a que un organismo haploide solamente posee una dosis de cromosomas, los efectos de dominancia-recesividad generalmente no obscurecen la expresión genética, y por tanto el fenotipo es un reflejo directo del genotipo. Por otro lado, si nos interesa estudiar las relaciones de dominancia y recesividad entre dos alelos, mediante pruebas de complementación, fácilmente se puede construir la cepa diploide apropiada.

Durante muchos años se consideró que a diferencia de los hongos denominados filamentosos, *S. cerevisiae* era incapaz de formar hifas o filamentos y que su crecimiento vegetativo, a través de la gemación, únicamente resultaba en la formación de células esféricas denominadas levaduras. Recientemente se encontró un fenómeno que sorprendió a la comunidad científica dedicada al estudio de esta levadura: *Saccharomyces*, el organismo levaduriforme por antonomasia, era capaz de formar hifas! (pseudohifas) (**Fig. 7**) (9). Existen hongos como *Mucor rouxii*, capaces de crecer formando filamentos o formando células levaduriformes, la posibilidad de cambiar de fase se conoce como dimorfismo y existen cascadas de señales responsables de cambiar y mantener cada uno de los dos tipos de crecimiento.

Por medio de receptores anclados a la membrana celular, las levaduras pueden responder a la presencia de moléculas que actúan como señales en una condición fisiológica determinada, estas señales se transducen por un sistema de señalización en el que participan cinasas denominadas “proteín-cinasas mitogénicamente activadas” (MAPK) (17). Por ejemplo, si un cultivo de levaduras se expone a alta o baja osmolaridad, la presencia de una alta o baja concentración sal en el medio de cultivo constituye una señal, que al interaccionar con un receptor específico, pasa a través de una serie de moléculas intermediarias hasta modificar un

determinado regulador transcripcional, que ahora es capaz de activar o reprimir la expresión de un gen o grupos de genes (17). Esto le permite a la célula transcribir de manera selectiva un grupo de genes específicos, cuya traducción resultará en la síntesis de los productos que le permitan contender de manera eficiente con la condición fisiológica en la que se encuentra, y por tanto mantener la viabilidad, esporular, crecer en forma de filamentos, etc. Así se han descrito en *S. cerevisiae* distintas cascadas que responden a estímulos ambientales diferentes y específicos (**Fig. 8**). Como se observa en la **Figura 8**, la señal específica que desata el funcionamiento de una cascada en particular no se conoce en todos los casos. El hallazgo del crecimiento pseudohifal de *S. cerevisiae* resultó en el estudio de una cascada de señalización cuyo funcionamiento determina el crecimiento levaduriforme o pseudohifal, y los resultados obtenidos al estudiar la cascada de *S. cerevisiae* permitieron una mejor comprensión de los sistemas que operan en hongos dimórficos.

Ciclo de vida sexual

S. cerevisiae posee dos tipos sexuales: a y α , determinados por un par de alelos heterocigos: *MATa* y *MAT α* . Si se cultiva una mezcla de dos cepas haploides en las que una de las dos cepas sea *MATa* y la otra *MAT α* , se formarán células diploides *MATa/MAT α* . Esto no ocurre si las dos cepas cultivadas poseen el mismo tipo sexual; los diploides pueden mantenerse como tales o pueden esporular si se cultivan en condiciones de limitación de nutrientes. Durante la esporulación, (**Fig. 9**) la célula diploide se divide por meiosis (**Fig. 9 y 10**) dando lugar a cuatro células haploides, las cuales quedan contenidas dentro de un saco denominado asca. Las ascas poseen una pared gruesa que debe ser abierta para que se liberen los productos haploides, esto puede lograrse utilizando un microscopio y un micromanipulador (**Fig. 11 y 12**), que permiten al experimentador recuperar de manera independiente cada uno de los cuatro productos haploides contenidos en cada una de las ascas (**Fig. 11 y 12**). Cada una de las cuatro esporas se coloca sobre una caja de Petri con medio de cultivo, una vez que estas crecen y forman una colonia, se pueden transferir a cajas conteniendo los medios de cultivo pertinentes que permitan determinar el fenotipo de cada una de las cuatro esporas (**Fig. 11 y 12**). Si cruzamos un padre *MATa*, portador de todos los genes silvestres necesarios para sintetizar uracilo y que por lo tanto será *URA⁺*, y un padre *MAT α* portador de una mutación que altere a uno de los genes implicados en la síntesis de uracilo y que por lo tanto posea un fenotipo *ura⁻*, al analizar el fenotipo de cada una de las esporas haploides que se encuentran dentro de una asca, necesariamente recuperaremos dos clonas protótrofas, capaces de sintetizar uracilo y que por lo tanto son *URA⁺* y dos células auxótrofas, incapaces de sintetizar este compuesto y que por lo tanto son *ura⁻* (**Fig. 11**). De esta forma se estudia la segregación de los caracteres genéticos de las cepas padres utilizadas para producir los diploides.

Como se muestra en la **Figura 10**, durante la profase de la meiosis, los cromosomas homólogos se aparean y es en esta fase que puede ocurrir la recombinación. En el ejemplo que se muestra en la **Figura 10**, uno de los padres (P1) es portador de los genes silvestres *CAIE*, en tanto que el otro (P2), es portador de los genes mutados *caie*, el diploide formado será portador de una dosis de genes silvestres y una dosis de genes mutados *CAIE/caie*. Si durante la meiosis no ocurre recombinación, dos de los cuatro productos haploides serán portadores de la combinación *CAIE* aportada por el padre P1, en tanto que los otros dos productos

serán portadores de la combinación *caie* aportada por el padre P2. Si ocurre recombinación, se generarán dos productos haploides recombinantes; es decir esporas haploides portadoras de combinaciones nuevas no presentes en los padres: *CaIe* y *CAiE*, en tanto que cada uno de los otros dos productos llevarán en cada caso la combinación *CAIE* del padre P1 o la combinación *caie* del padre P2.

Solamente los hongos Ascomycetos y algunas algas poseen la capacidad de formar ascas, y por tanto son los únicos organismos en los que se pueden analizar de manera independiente los productos de una sola meiosis.

Consideremos lo siguiente: cuando se estudia la segregación de dos caracteres en un diploide, por ejemplo *MATa* y *MAT□* al encontrar en una muestra al azar el mismo número de clonas haploides *a* y *□* atribuimos este hecho a la segregación de los cromosomas homólogos portadores de *a* y *□*, en meiosis individuales; ésta es una inferencia que es difícil demostrar de manera directa en la mayoría de los organismos eucariotes. Sin embargo, gracias al análisis de tétradas se demostró de manera directa e inequívoca que la segregación ocurre. Así mismo, el análisis de tétradas permitió proponer el modelo heteroduplex del ADN, que explica cómo ocurre el proceso de entrecruzamiento que da lugar a la obtención de recombinantes durante la meiosis.

En resumen, la disección de tétradas (**Fig. 11**) provee un método directo de análisis genético de meiosis individuales, lo que permite estudiar procesos que no son asequibles utilizando productos meióticos al azar, como la recombinación y la segregación genética (11).

Aunado al hecho de que *S. cerevisiae* es un organismo no patógeno, las características arriba descritas hicieron de esta levadura el modelo biológico favorito de una buena parte de la comunidad científica del área. Así durante años se obtuvieron mutantes, se describieron vías metabólicas, se mapearon genes, y se hicieron estudios de microscopía antes que en ningún otro microorganismo. Sin embargo, con la llegada de la ingeniería genética y las nuevas técnicas de biología molecular, por un momento pareció que *S. cerevisiae* se quedaba atrás, ya que no existía un protocolo que permitiera introducir ADN exógeno a esta levadura. Sin embargo en 1978 un grupo dirigido por Gerald Fink (12) publicó en 1980 el primer reporte de un protocolo que permitió introducir ADN en este organismo y *S. cerevisiae* entró con paso firme al concierto de la biología molecular.

¡La levadura se transforma!: manipulación del genoma “*in vitro*”.

La transformación es un proceso por medio del cual moléculas del ADN desnudo pueden ser introducidas a una célula. La adquisición de este ADN resulta en un cambio heredable. Por ejemplo, si nosotros tenemos una célula alterada en un gen que codifica para una de las enzimas implicadas en la biosíntesis de uracilo, y por tanto es una mutante *ura⁻* auxotrofa para uracilo, si logramos introducir dentro de esta mutante la secuencia silvestre del gen mutado de manera permanente, la cepa se transformará en *URA⁺* y por tanto será protótrofa para uracilo.

Para poder transformar a un organismo se requieren protocolos que destruyan la pared celular y permeabilicen la membrana de tal forma que se puedan introducir fragmentos del ADN. Así mismo se necesitan vehículos o vectores que se puedan replicar establemente o recombinarse con el ADN cromosomal dentro del organismo. Finalmente se requieren marcadores genéticos, es decir, genes que confieran resistencia a antibióticos o que determinen la síntesis de un aminoácido o nucleótido. Estos marcadores se utilizan para identificar aquellas células que

recibieron ADN exógeno. Por ejemplo, si usamos como marcador la resistencia a geneticina, en una caja de medio de cultivo conteniendo este antibiótico solo crecerán aquellas colonias originadas por células que recibieron el gen que confiere resistencia a geneticina. Así mismo, si nuestro marcador es el gen *URA3* que codifica para una enzima de la biosíntesis de uracilo, y transformamos una mutante *ura3⁻* auxótrofa de uracilo, aquellas células que reciban el gen *URA3* generarán colonias capaces de crecer aún en ausencia de uracilo (**Fig. 13**). Los genes que se utilizan como marcadores genéticos deben quedar incluidos dentro de los plásmidos que se utilizarán para transformar a la levadura. El primer plásmido que se construyó para transformar levadura, se denominó pY*leu10* y era portador del gen *LEU2* de levadura y se utilizó para transformar una mutante incapaz de sintetizar leucina, *leu2⁻* (12). Los primeros marcadores que se utilizaron para transformar a la levadura fueron *LEU2*, *URA3* e (histidina) *HIS3*, y se obtuvieron preparando bibliotecas de *S. cerevisiae* en vectores propios para *E. coli*. Estas bibliotecas se utilizaron para complementar funcionalmente mutantes de *E. coli* en las diferentes vías biosintéticas. Por ejemplo, el gen *LEU2* de levadura que codifica para la enzima α -isopropilmalato deshidrogenasa de la biosíntesis de leucina, puede complementar mutantes *leuB* de *E. coli*, deficientes en la misma enzima (**Fig. 14**). Una vez clonado el gen *LEU2* de levadura, éste pudo ser utilizado para complementar levaduras *leu2⁻* que son incapaces de crecer en medios carentes del aminoácido leucina. Plásmidos portadores del gen *LEU2* pudieron ser introducidos en la levadura utilizando protocolos de transformación; así, cuando las células de levadura *leu2⁻* se ponían en contacto con una preparación de ADN de plásmidos portadores del gen *LEU2*, solamente aquellas células que adquirían este gen eran capaces de crecer en ausencia de leucina. Evidentemente, cualquier otro gen o genes presentes en el plásmido portador de *LEU2* eran adquiridos simultáneamente (11).

La construcción de plásmidos apropiados para transformar a *S. cerevisiae* ha jugado un papel crucial en el desarrollo de las técnicas de ADN recombinante aplicables a este organismo. Una de las características más importantes de estos vectores es la capacidad de replicarse tanto en la levadura como en *E. coli*, de manera que se puedan propagar en ésta bacteria y posteriormente puedan ser reintroducidos en la levadura para ser analizados. Por tanto, estos vectores deben contener orígenes de replicación tanto de *E. coli* como de levadura, además de marcadores genéticos que se puedan utilizar para seleccionar las poblaciones pertinentes, tanto de bacterias como de levaduras. El marcador bacteriano más frecuentemente utilizado para preparar estos vectores es el gen que confiere resistencia a ampicilina y el origen de replicación es el que se encuentra en los vectores bacterianos utilizados en la mayoría de los laboratorios que se dedican al estudio de organismos procariotes. Por lo que respecta a los orígenes de replicación que permiten mantener los vectores en levadura, se han construido plásmidos portadores de dos diferentes tipos de orígenes de replicación dependiendo del número de copias del plásmido que se desee mantener (**Fig. 15**). Los vectores que carecen de origen de replicación se denominan integrativos, ya que éstos sólo podrán permanecer en la levadura cuando recombinen, y por tanto queden permanentemente integrados en algún cromosoma. Aquellos plásmidos portadores del origen de replicación presente en el plásmido 2 μ de levadura mantienen alrededor de 12 copias, y aquellos portadores de una región de replicación autónoma (ARS) y de una región centromérica (CEN) se mantendrán sin integrarse y en una sola copia (11).

La construcción de vectores o vehículos apropiados para clonación, aunado al hecho de que la levadura posee un genoma pequeño, permitió la clonación de

genes de levadura por complementación. Se construyeron bibliotecas genómicas portadoras de fragmentos de ADN de tamaños que permitían suponer que en la colección de fragmentos estaría representado el genoma completo de este organismo. Una mutante que tenga un fenotipo claro, por ejemplo auxotrofia por algún aminoácido y por tanto sea incapaz de crecer en ausencia del mismo, al transformarse con la biblioteca y sembrarse sobre cajas de agar en ausencia del aminoácido requerido, resultará en el crecimiento de colonias de aquellas células que han adquirido una copia silvestre del gen en cuestión. A partir de esta colonia se puede preparar un cultivo y extraer el ADN plasmídico para realizar la caracterización del gen clonado. Así se han clonado y estudiado un buen número de genes.

Uno de los métodos más utilizados para caracterizar la función de un gen es la obtención de mutantes; y en levadura, la obtención de mutantes en las que el gen de nuestro interés ha sido interrumpido con una secuencia foránea ha sido de gran utilidad. La interrupción completa de un gen, permite determinar la función del mismo (11). El procedimiento más utilizado se basa en el uso de un fragmento lineal de ADN que contiene un marcador genético, por ejemplo *URA3*, flanqueado a ambos lados por secuencias del gen que deseamos interrumpir; estos extremos son altamente recombinogénicos y debido a que en *S. cerevisiae* la frecuencia de recombinación homóloga es muy alta, el fragmento lineal de ADN se inserta en medio de nuestro gen resultando en la interrupción y, por lo tanto, en la inactivación del mismo (**Fig. 16**). Este procedimiento se ha utilizado exitosamente para generar todo tipo de mutantes, con la ventaja de que las mismas tienen exactamente el mismo fondo genético que la cepa padre. Cuando se trate de obtener mutantes interrumpidas en genes cuya anulación pudiera resultar letal, la interrupción génica debe hacerse en un diploide y por disección de tétradas recuperar las cuatro esporas. Si efectivamente la interrupción del gen en cuestión resulta letal, dos de las cuatro esporas del asca no serán viables. Esta constituye una prueba definitiva que demuestra que el gen que se está estudiando es indispensable.

La primer acetilasa de histonas: nuevas herramientas para el estudio de la expresión genética

Los cromosomas eucariotes están constituidos por fibras de ADN y una variedad de estudios han demostrado que cada cromosoma está constituido por una sola doble cadena de ADN (7). Debido a la longitud de los cromosomas, desde hace mucho tiempo se postuló que debería existir un sistema de empaquetamiento muy eficiente. La mezcla de materiales de los que se componen los cromosomas se denomina cromatina y está constituida por ADN y proteínas. Cuando la cromatina se extrae y se trata con concentraciones crecientes de sal se pueden observar, bajo el microscopio electrónico, diferentes grados de compactación. A concentraciones bajas de sal se observa una estructura de 10nm de diámetro que semeja un collar de perlas; dado que el hilo presente entre perla y perla puede ser digerido con ADNsas, se puede concluir que se trata de ADN. Las perlas del collar se denominan nucleosomas (**Fig. 17**), y se ha demostrado que consisten de proteínas llamadas histonas y de ADN. Las histonas se encuentran constituidas por octámeros conteniendo dos moléculas de cada una de las siguientes histonas: H2A, H2B, H3 y H4; y el ADN se encuentra enrollado alrededor del octámero (**Fig. 17**). Cuando se utiliza una mayor concentración de sal para extraer la cromatina, se identifica una estructura llamada solenoide, que tiene 30 nm de diámetro y cuya conformación se mantiene por medio

de la histona H1 (**Fig. 18**). A su vez, los solenoides se organizan en asas que se encuentran ancladas a un andamiaje, por medio de secuencias de ADN denominadas regiones de unión al andamiaje (**Fig. 19**) (7). Es evidente, que la organización nucleosomal del ADN constituye una barrera física que debe ser vulnerada para que el aparato transcripcional pueda interactuar con el ADN.

En organismos eucariotes, el proceso de transcripción y su regulación implica la participación de un gran número de moléculas, que incluyen nucleosomas, polimerasas, factores generales de transcripción y el aparato regulatorio. Recientemente, se ha encontrado que los coactivadores y correpresores transcripcionales funcionan modificando enzimáticamente a las histonas, lo que resulta en un reposicionamiento de los nucleosomas que determina el acceso de los factores transcripcionales a los promotores. Es decir, el enrollamiento del ADN alrededor del octámero de histonas es actualmente considerado como el punto más importante de la regulación transcripcional. Los nucleosomas son capaces de reprimir la transcripción a través de tres mecanismos específicos: a) bloqueando los sitios de unión al ADN de los activadores, represores, ARN polimerasa, etc, b) las cadenas de nucleosomas pueden formar estructuras muy compactas (superestructura), reprimiendo la transcripción de dominios cromosomales completos, y c) en la heterocromatina, la interacción de los nucleosomas con otras proteínas cromosomales puede reprimir la transcripción de manera hereditaria (15).

Al examinar los elementos que constituyen el complejo transcripcional, se hace evidente el hecho de que la estructura nucleosomal constituye una verdadera barrera que necesariamente dificulta la interacción con el aparato transcripcional. El complejo de inicio de la síntesis de ARN en levadura está constituido por la holoenzima (formada por la enzima ARN polimerasa II asociada al mediador) y por los factores generales TFII (TFII-A, TFII-B, TFII-D, TFII-F, TFII-E y TFII-H). El factor general TFII-D está formado por las proteínas TAFs y la proteína TBP, siendo ésta última la que reconoce una secuencia específica denominada caja TATA. El ensamble del complejo de inicio de la transcripción comienza al unirse TBP a la caja TATA, seguido de los TFII y de la holoenzima (13, 18). La afinidad del complejo arriba descrito por las secuencias promotoras generalmente es pobre, y se requiere de la acción de los activadores transcripcionales para aumentar la afinidad del complejo por una secuencia específica y por tanto aumentar la transcripción de un gen o grupo de genes. La existencia de diferentes tipos de activadores se demostró por medio de la obtención de mutantes y por ensayos de unión a ADN. Así se encontró que hay activadores específicos para grupos de genes y que éstos solamente son capaces de ejercer su efecto activador en determinadas condiciones fisiológicas. Por ejemplo, el activador transcripcional codificado por el gen *GLN3*, que activa la transcripción de los genes cuyos productos se encargan del catabolismo de fuentes pobres de nitrógeno, únicamente es translocado al núcleo en éstas condiciones (1); de tal manera que cuando la levadura se cultiva en fuentes ricas de nitrógeno, *GLN3* no participa en la transcripción ya que no se encuentra en el núcleo. Las proteínas activadoras son modulares y poseen dos regiones indispensables para su función: la zona de unión al ADN y la de activación de la transcripción. En 1992 (8) se reportó por primera vez la existencia de moléculas que se denominaron coactivadores, que estimulaban la transcripción pero no a través de unirse al ADN A sino estimulando la acción positiva de los activadores. El primer coactivador que se describió fue el codificado por el gen *GCN5* de *S. cerevisiae* (8). Poco tiempo después se encontraron los genes homólogos a *GCN5* de una variedad de organismos eucariotes incluyendo el humano, y se encontró que el producto de este gen se encuentra formando parte de

dos complejos multiproteicos denominados ADA y SAGA (10). ¿De qué manera estimulan la transcripción estos complejos? Uno de los hallazgos más interesantes en este campo fue el descubrimiento de que el producto de *GCN5* era una acetilasa de histonas, este hecho confirmó lo que siempre se había supuesto: la estructura de la cromatina tenía un papel fundamental en la activación transcripcional (23). La acetilación de las histonas ocurre en las secuencias laterales o colas, que no forman parte del centro del nucleosoma, y por tanto, la acetilación de éstas contribuye a desestabilizar la interacción entre el ADN y las histonas, es decir, la superestructura de la cromatina. De manera casi simultánea se encontraron y describieron genes que codificaban para desacetilasas de histonas y se propuso que la acetilación de las histonas aliviaba la represión, en tanto que la desacetilación la restablecía (23). Aún cuando la importancia de la acetilación-desacetilación es evidente, ésta no es suficiente para activar la transcripción ya que no compromete la estructura central de los nucleosomas; es decir, la dificultad para que la polimerasa y los factores transcripcionales se unan a un ADN repleto de nucleosomas debe aliviarse por mecanismos alternativos. Así se han encontrado complejos multiproteicos ATP-dependientes que remodelan la estructura de la cromatina, por ejemplo, los miembros del complejo SWI/SNF modifican la estructura de la parte central de los nucleosomas, en tanto que los complejos ISWI modifican la localización de los nucleosomas (25) (**Fig. 20**). De esta manera, la acetilación y el remodelamiento de la cromatina juegan papeles diferentes, pero entre ambos determinan cambios de la estructura nucleosomal que son indispensables para que ocurra la activación transcripcional. Uno de los campos más apasionantes que se está abordando actualmente en el estudio de la regulación transcripcional consiste en determinar de qué manera y quién recluta a todos los complejos que deben llegar al promotor para activar la transcripción (4) (**Fig. 21**).

La levadura al servicio de la comunidad: sistema de doble híbrido, cromosomas artificiales, expresión de proteínas heterólogas.

Sistema del doble híbrido. La facilidad con la que se puede estudiar el genoma de la levadura y la cantidad de manipulaciones genéticas y metodología disponible en este sistema han llevado al desarrollo de métodos para analizar ADN y proteínas no sólo de la levadura sino de otros organismos. Un ejemplo de lo antes dicho es el desarrollo del sistema del doble híbrido (24). El producto codificado por el gen *GLN3* es un activador transcripcional que posee dos dominios funcionales independientes: el dominio de unión a ADN y el dominio de activación. Por lo tanto, si fusionamos una proteína (Gen1p) al dominio de activación y otra (Gen2p) al dominio de unión a ADN es posible probar si éstas dos proteínas interactúan dentro de la célula (**Fig. 22**). Es decir, si las proteínas Gen1p y Gen2p se asocian dentro de la levadura, necesariamente se ensamblará el activador *GLN3*, y por tanto será capaz de activar la transcripción de los genes cuya expresión dependa del mismo, por ejemplo *GAPI*. Esto se facilita aún más ya que es posible utilizar el promotor de *GAPI* para preparar un gen artificial que lleva el promotor de *GAPI* y la secuencia codificante del gen de la β -galactosidasa; así al activarse la transcripción de *GAPI*, por acción de *GLN3* o del híbrido Gen1p-Gen2p, se producirá la enzima β -galactosidasa cuya actividad puede determinarse usando un ensayo que resulta en la tinción azul de las células que están produciendo β -galactosidasa (**Fig. 23**).

El sistema de dos híbridos ha tenido tres aplicaciones fundamentales: a) probar la interacción de un par de proteínas, que utilizando otros criterios, se

sospecha que interaccionan, b) definir el dominio o los aminoácidos que juegan un papel importante en la interacción de dos proteínas, que se sabe que interactúan, y c) tamizar bibliotecas para detectar proteínas que interaccionen con una proteína dada. El sistema de dos híbridos se ha utilizado exitosamente para identificar grupos de proteínas que interaccionan en levadura y en células de mamífero. Algunos ejemplos de proteínas que interaccionan con otras, que se han descubierto con el sistema de dos híbridos, en células de mamíferos incluyen a Jun y Fos, la proteína-quinasa Raf, y otras oncoproteínas (24).

Cromosomas artificiales

La caracterización molecular de genomas eucariotes requiere de la posibilidad de clonar fragmentos muy grandes de ADN, esto no puede llevarse a cabo en los vectores convencionales porque éstos sólo admiten fragmentos pequeños de ADN. Por este motivo, los fragmentos de 200 a 800 Kb, se deben clonar en vectores especiales llamados Cromosomas Artificiales de Levadura (YACs) (**Fig. 15**) y fragmentos menores de 100 a 200 Kb se clonan en Cromosomas Bacterianos Artificiales (BACs).

Los YACs se desarrollaron a partir de plásmidos lineales denominados YLp, y contienen: a) secuencias de ADN que funcionan como telómeros (TEL) “*in vivo*”, orígenes de replicación (ARSs) y segmentos centroméricos (CEN). Ahora bien, la manipulación de los YLp se dificulta ya que no poseen orígenes de replicación para *E. coli*, y por tanto se desarrollaron los YACs que contienen orígenes de replicación que permiten que éstos se repliquen en *E. coli*. El tipo más común de vectores YAC que se pueden propagar en esta bacteria contienen secuencias teloméricas en orientación invertida, que flanquean un fragmento de ADN de levadura portador del gen *HIS3*. Después de su amplificación en *E. coli*, y antes de transformar a la levadura, el plásmido se digiere con la enzima de restricción que permite la escisión de *HIS3* y genera una forma lineal “*in vitro*”, ésta forma se puede ligar a fragmentos mayores de 100 kb de ADN heterólogo. El desarrollo de este tipo de vectores permite clonar fragmentos muy grandes de ADN, lo cual ha sido de particular importancia para el análisis y secuenciación de genomas de eucariotes superiores, incluyendo el genoma humano (3).

Expresión de genes heterólogos

Aún cuando la bacteria *E. coli* constituye un magnífico sistema para la expresión de genes heterólogos, la levadura también ha jugado un papel importante en el desarrollo de los sistemas de expresión heteróloga. A continuación se mencionan algunas de las características del sistema de levadura: a) a diferencia de lo que ocurre en *E. coli*, las proteínas producidas en la levadura carecen de endotoxinas, b) en algunos casos, los productos producidos en la levadura poseen mayor actividad biológica que los expresados en *E. coli*, c) la levadura es capaz de llevar a cabo modificaciones post-traduccionales como la miristilación, la acetilación de extremos amino terminales, y el procesamiento proteolítico, indispensables para que el producto posea actividad biológica, y d) las proteínas heterólogas secretadas por cepas de levadura especialmente diseñadas son fácilmente recuperadas del medio de cultivo. Vale la pena mencionar que la primera vacuna humana aprobada obtenida por las técnicas de ADN recombinante, y el primer producto para uso alimenticio, la renina, fueron producidos en levadura (14, 19).

El análisis funcional del genoma de la levadura provee nuevas herramientas para el estudio de la genómica.

Análisis global de la transcripción: El transcriptoma. *S. cerevisiae* fue el primer eucariote cuyo genoma fue secuenciado en su totalidad; aún cuando esta tarea implicó un esfuerzo enorme, el verdadero reto consiste ahora en determinar el papel biológico de cada uno de los cerca de 6000 genes de esta levadura, y por supuesto, el mecanismo de acción que utiliza cada proteína para llevar a cabo procesos celulares específicos. Esta tarea tendrá que ser llevada a cabo para cada uno de los genomas que se han ido secuenciando (16), y por lo tanto, un grupo importante de científicos que coordinaron el proyecto del genoma de *S. cerevisiae* diseñaron estrategias que permiten estudiar los patrones de expresión genética de cada uno de los genes, y la función de cada uno de sus productos, a escala genómica (26).

Una estrategia que se ha utilizado para asignar una función a un ORF dado, es la de estudiar su secuencia y tratar de predecir, en base a comparaciones con secuencias de otros genes, cual podría ser su función. Sin embargo existen genes cuya función no se conoce, a pesar de que se han estudiado por décadas y se han hecho estudios genéticos exhaustivos, y cuando se analiza su secuencia ésta no presenta una homología significativa con secuencias previamente identificadas, y por tanto no es posible asignarles una función utilizando este criterio. En otros casos, aún cuando algunos ORFs tengan homología significativa con secuencias encontradas en las bases de datos, ésto no es suficiente para determinar el papel real de dicha proteína. Una estrategia que se ha desarrollado ha sido el estudio de la expresión de todos los ORFs de levadura de manera eficiente y sistemática (5). Para este efecto, se cuenta con la colección completa de todos los ORFs que constituyen el genoma de la levadura. Por medio de un robot se coloca, de manera ordenada, una pequeña gota de cada uno de los ORFs sobre una laminilla de vidrio (**Fig. 24 y 25**), esto constituye lo que se denomina un arreglo de genes (array o microarray). Estos arreglos se utilizan para llevar a cabo hibridizaciones con una variedad de productos marcados, por ejemplo, cADN obtenido de ARN mensajero extraído de células crecidas en diferentes condiciones. Así, si nosotros obtenemos cADN a partir del ARN mensajero de células de levadura cultivadas de manera independiente en medio rico y en medio rico adicionado de NaCl 1M, y marcamos cada uno de los dos cADNs con diferentes pseudocolores, podremos hibridizar nuestra laminilla con una mezcla de ambas poblaciones de cADN. La laminilla posteriormente se lee por medio de un microscopio de fluorescencia acoplado a una computadora apropiada, lo que nos permitirá generar una imagen (**Fig. 23 y 24**). El análisis de los colores y su intensidad nos permitirá determinar cuáles de los 5800 ORFs incrementan o disminuyen su expresión cuando las levaduras se encuentran en presencia de sal. Así se ha iniciado el estudio de la función de genes cuya secuencia no presentaba homología con genes conocidos, y por ende era imposible asignarles una función (16).

Estudio de el conjunto de proteínas presentes en la célula en una condición dada: El Proteoma.

Uno de los paradigmas más importantes de la biología es el que establece que el ADN se transcribe a ARN, el cual se traduce, generándose todas las proteínas que están presentes en los diferentes momentos del ciclo celular. Son las proteínas las responsables de mantener el funcionamiento de la célula, y es por ello que el

estudio simultáneo de todo el juego de proteínas presentes en los diferentes momentos de la célula ha resultado de gran interés; la disciplina que se ocupa de este estudio se denomina proteómica. De manera general, las nuevas metodologías que se han desarrollado permiten el uso de geles para separar cada una de las proteínas presentes en la célula en una condición determinada, generándose una imagen como la que se muestra en la **Figura 26**, posteriormente, haciendo uso de la espectroscopía de masas podemos conocer la composición de aminoácidos, que aunado a los datos de carga y tamaño proporcionados por el análisis de las imágenes de los geles, nos permitirá proponer un número pequeño de ORFs que pudieran presuntamente codificar para cada una de las proteínas (21).

El análisis del transcriptoma y del proteoma de un organismo como la levadura son dos estrategias extremadamente útiles, que nos permitirán conocer el funcionamiento y el producto de cada uno de los genes que constituyen a la levadura *S. cerevisiae*. Esto sin duda repercutirá en el conocimiento global del funcionamiento de una célula, ya que como hemos mencionado, una de las ventajas del estudio de esta levadura es el hecho de que las células de este organismo eucariote están organizadas de manera similar a las células de otros organismos eucariotes. Así mismo, muchas proteínas de la levadura están relacionadas tanto en su estructura como en su función a sus contrapartes en mamíferos.

En este capítulo hemos revisado las características más importantes de la biología de la levadura, el impacto que su estudio ha tenido en el desarrollo de la fisiología celular y la importancia de los productos que de ella se obtienen, esto último queda magníficamente evidenciado en la **Figura 27**.

Bibliografía

1. **Beck, T., and M. N. Hall.** 1999. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* **402**: 689-692.
2. **Broach, J. R., J. R. Pringle, and E. W. Jones.** (Eds) 1991. *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae*, Vol. 1. Genome Dynamics, Protein Synthesis and Energetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N Y.
3. **Burke, D. T., G. F. Carle, and M. V. Olesen.** 1987. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial yeast chromosome vectors. *Science* **236**: 806-813.
4. **Cosma, M. P., T. Tanaka, and K. Nasmyth.** 1999. Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell* **97**: 299-311
5. **DeRisi, J.L., V.R. Iyer, and P. O. Brown.** 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**: 680-686.
6. **Dujon, B.** 1996. The yeast project: what did we learn. *Trends. Genet.* **7**: 263-270.
7. **Dupraw, E. J.** 1970. *DNA and Chromosomes*. Reihart, P and Winston, F. (eds.). Academic Press New York.
8. **Georgakopolous, T., and G. Tiroos.** 1992. Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription. *EMBO J.* **11**: 4145-4152.
9. **Gimeno, C. J., P. O. Ljungdahl, C. A. Styles, and G. R. Fink.** 1992. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**: 1077-1090.

10. **Guarente, L.** 1995. Transcriptional coactivators in yeast and beyond. *Trends Biochem. Sci.* 20: 517-521.
11. **Guthrie, C., and G. R. Fink.** (Eds). 1991. A guide to yeast genetics and molecular biology in: *Methods in Ezymology* **194**: 1- 495. Academic Press N. Y.
12. **Hinnen, A., J. B. Hicks, and G. R. Fink.** 1978. Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 1929-1933.
13. **Kniskern, P. J., A. Hagopian, D. L. Montgomery, P. Burke, N. R. Dunn, K. J. Hofmann, W. J. Miller and R. W. Ellis.** 1986. Unusually high-level expression of a foreign gene (hepatitis B virus core antigen) in *Saccharomyces cerevisiae*. *GENE* **46**: 135-141.
14. **Jones, E. W., J. R. Pringle, and J. R. Broach.** (Eds). 1992. *The Molecular and Cell Biology of Saccharomyces cerevisiae*, Vol. 2. Gene Expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.
15. **Kornberg, R. D.** 1999. Eukaryotic transcriptional control. *TIGS* **15**: 46-49
16. **Lashkari, D. A., J. L. DeRisi, J.H. McCusker, A. F. Namath, C. Gentile, S. Y. Hwang, P. O. Brown and R. W. Davis.** 1997. Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 13057-13062.
17. **Madhani, H. D. and G. R. Fink.** 1998. The riddle of MAP kinase signaling specificity. *TIGS* **14**: 90-95.
18. **McNeil J. B. and M Smith.** 1986. Transcription initiation of the *Saccharomyces cerevisiae* iso-1-cytochrome c gene. Multiple, independent T-A-T-A sequences. *J. Mol. Biol.* **187**: 363-368.
19. **Mellor, J., M. J. Dobson, N. A. Roberts, M. F. Tuite, J. S. Emtage, S. White, P. A. Patel, A. J. Kingsman and S. M. Kingsman.** 1983. Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *GENE* **24**: 1-14
20. **Mewes, H. W., K. Albermann, M. Bahr, D. Frishmann, A. Gleissner, J. Hani, K. Heumann, K. Kleine, A. Maieri, S. G. Oliver, F. Pfeifer, and A. Zollner.** 1997. Overview of the yeast genome. *Nature* **387**: 7-9.
21. **Pandey, A. and M. Mann.** 2000. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **15**: 837-846.
22. **Pringle, J. R., J. R. Broach, and E. W. Jones.** (Eds). 1993. *The Molecular and Cell Biology of Saccharomyces cerevisiae*, Vol. 3. Cell Cycle and Cell Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.
23. **Strahl, B. D. and C. Allis.** 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**: 41-45.
24. **Walhout, A. J. M., S. J. Boulton and M. Vidal.** 2000. Yeast two-hybrid systems and protein interaction mapping projects for yeast and worm. *YEAST*. **17**: 88-94
25. **Winston, F, and M. Carlson.** 1992. Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *TIGS* **8**: 387-391.
26. **Wodicka, L., H. Dong, M. Mittmann, M. H. Ho and D. J. Lockhart.** 1997. Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Biotech.* **15**: 1359-1367.