

BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR DEL ESTRÉS MICROBIANO: LOS CILIADOS COMO MODELO.

Juan Carlos Gutiérrez y Ana Martín-González

Dpto. Microbiología-III. Facultad de Biología. José Antonio Novais, 2. Universidad Complutense (UCM). 28040 Madrid.

El departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid tiene una larga trayectoria en la utilización de protozoos ciliados como modelos microbianos. Dicha trayectoria se inició con el Prof. Dimas Fernández-Galiano (hacia 1961), manteniéndose activa desde entonces. El grupo que actualmente se denomina "Estrés microbiano y contaminación ambiental", surge a raíz de la incorporación del Dr. Juan Carlos Gutiérrez, tras obtener una plaza de profesor titular de universidad, allá por el año 1987. Desde entonces, han pasado por nuestro grupo numerosos estudiantes que han llevado a cabo sus trabajos de tesis y obtenido el grado de doctor, para luego completar su formación científica fuera de nuestro país o en otras instituciones nacionales. Algunos de ellos han logrado, posteriormente, una posición estable como profesor universitario. Como reflejo de la propia vida, el número de miembros del grupo ha cambiado a lo largo del tiempo, y su aspecto actual se muestra en la fotografía adjunta. Desde el inicio, el grupo ha sido dirigido por los profesores Juan Carlos Gutiérrez y Ana Martín-González.

Uno de los mecanismos que presentan los microorganismos para solventar el problema de la ausencia de nutrientes (estrés nutricional), es llevar a cabo un complejo proceso de diferenciación celular (esporulación / enquistamiento) que culmina con la aparición de un estado criptobiótico o quiescente (espora / quiste) en el cual puede permanecer en él de manera indefinida, hasta la aparición de condiciones óptimas (nutrientes) para volver al ciclo crecimiento-división. Una de las líneas de investigación que nuestro grupo ha desarrollado durante una primera etapa (aproximadamente 9 años), ha sido el estudio del proceso de enquistamiento en ciliados. Los avances obtenidos por el grupo sobre este proceso de diferenciación microbiana le han proporcionado reconocimiento internacional y ser un grupo de referencia sobre el tema.

Las contribuciones más importantes que el grupo ha ofrecido a la comunidad de ciliatólogos sobre este tema las podemos resumir en los siguientes puntos: 1- El establecimiento de una cinética del proceso de enquistamiento, utilizando como marcador el grado de maduración de la pared quística, tras usar anticuerpos anti-pared. 2- Un modelo de cinética de aparición de precursores de pared quística y ensamblaje de las diferentes capas que la forman. 3- Una mayor profundización en el conocimiento de la composición bioquímica y molecular de los constituyentes de la pared quística, destacándose la detección y estudio de manoproteínas y la

considerable riqueza de residuos de glicina en las proteínas que la componen. 4- El análisis de la condensación cromatínica-macronuclear que tiene lugar durante el enquistamiento, destacándose la detección de formación de cristales poligonales de cromatina, lo que constituye uno de los modelos de condensación cromatínica eucariota *in vivo* menos conocido, al igual que el aislamiento y análisis de un ADNc codificante de una proteína con una caja HMG (high mobility group) involucrada en la condensación del ADN. 5- La obtención y análisis de genotecas de expresión a partir de quistes maduros y poblaciones prequísticas, cuyo análisis nos ha permitido conocer y corroborar muchos de los elementos moleculares y rutas metabólicas involucradas en el proceso de enquistamiento. Los quistes maduros guardan en su citoplasma moléculas de ARNm, ya derivados de transcripciones prequísticas o bien potencialmente útiles en el proceso de exquistamiento. 6- La elaboración de un modelo integrado del proceso de enquistamiento en ciliados, confeccionado a partir de todos los aspectos analizados tanto por el grupo como por otros autores.

El rendimiento de esta línea se traduce en unos 40 trabajos publicados (contando a partir de la creación del grupo) en revistas internacionales de la especialidad, de los cuales 8 son revisiones. Estos trabajos fueron financiados por 6 proyectos de investigación procedentes de diversas entidades, uno de los cuales fue un proyecto europeo, cuya coordinación estuvo a cargo de nuestro grupo.

La segunda línea, igualmente ligada al estrés celular, que nuestro grupo ha desarrollado simultáneamente con la primera (durante unos años) y que continúa hasta la actualidad, nace de una colaboración en un proyecto ("Desarrollo de técnicas analíticas para microorganismos y metales pesados en lodos") que se desarrolla entre 1997-99. A partir de este proyecto, iniciamos una nueva línea sobre el estudio molecular y celular de la respuesta estrés desencadenada por la presencia de metales pesados en protozoos ciliados, y más concretamente en el ciliado-modelo *Tetrahymena thermophila*. Las principales contribuciones que el grupo ha aportado a la comunidad científica sobre este tema se podrían resumir en los siguientes puntos: 1- Aplicación de la citometría de flujo en los ensayos de ecotoxicidad de metales en diversas especies de protozoos aislados de ecosistemas acuáticos o edáficos. 2- Identificación, utilizando diferentes fluoróforos, de la existencia de bioacumulación de metales en diferentes especies de ciliados, como mecanismo de resistencia a estos agentes tóxicos. 3- Detección y estudio de la existencia de estrés oxidativo inducido por metales en protozoos ciliados. 4- Aislamiento, caracterización y análisis de la expresión de genes que codifican metalotioneínas (MTs) en especies del género *Tetrahymena*. Nuestro grupo ha contribuido con la identificación de 5 nuevos genes que codifican tanto CdMTs (MTs que unen preferentemente Cd^{2+}) como CuMTs (MTs que unen preferentemente Cu^+). 5- Creación de dos subfamilias de MTs en ciliados con valor taxonómico y filogenético, e introducción de un modelo que podría explicar, en base a su estricta estructura modular y submodular, la historia evolutiva de estas proteínas altamente conservadas. 6- Existencia de procesamiento postranscripcional del ARNm codificante para la MT TtheMTT5, que determina su posible localización intracelular

dependiendo del proceso celular en la que está involucrada (conjugación, respuesta a estrés inducido por metales, etc). 7- Desarrollo de biosensores celulares basados en la utilización de los promotores de MTs (*TheMTT5* y *TheMTT1*) fusionados con la luciferasa como gen reportero. Estos biosensores, tras su validación usando muestras naturales acuáticas o edáficas, han resultado ser los más sensibles para la detección de determinados metales respecto de aquellos elaborados con células procariontas o eucariotas. La patente nacional de ambos biosensores está actualmente tramitándose. 8- Un análisis cuantitativo (qRT-PCR), bajo muy diversas condiciones de estrés (incluyendo metales), de la expresión de genes codificantes de glutation-S-transferasas (GSTs), lo que nos ha revelado que estos genes (un total de 63 isoformas en *T. thermophila*) se conducen como "ecoparálogos" que responden diferencialmente a diversas condiciones de estrés. 9- El descubrimiento en un protozoo de vida libre como *T. thermophila* de la existencia de tripanotion (N^1, N^8 -bis(glutationil)-espermidina = $T(SH)_2$). Molécula antioxidante descubierta en 1985 en protozoos parásitos (tripanosomátidos), y que se creía exclusiva de este grupo de protozoos parásitos que presentan un metabolismo tiólico muy particular, y en los cuales el glutation (GSH) está ausente. Aunque la coexistencia de ambos tipos tiólicos (GSH y $T(SH)_2$) se ha descrito en otros dos protistas; *Euglena gracilis* (flagelado fotosintético) y la ameba potencialmente patógena *Naegleria fowleri*, esta es la primera vez en que se detecta y analiza la actividad tripanotion sintetasa en un protozoo ciliado no parásito. 10- Caracterización y análisis de la expresión de un gen codificante de Fitoquelatin sintasa (FQS) en *T. thermophila* que no sintetiza fitoquelatinas, estando más bien involucrado en la hidrólisis del GSH. 11- Los metales pesados inducen apoptosis en *T. thermophila*, y este proceso apoptótico es muy similar al que ocurre en mamíferos, el cual incluye; degradación parcial de ADN-macronuclear con formación de cuerpos apoptóticos macronucleares, cambios drásticos a nivel de membrana con liberación de fosfatidilserina, liberación de Ca^{2+} mitocondrial y alteraciones en su potencial de membrana, activación de caspasas (iniciadoras y ejecutora), expresión de metacaspasas y endonucleasas-G. La obtención de cepas "knockout" en ambos genes *EndoG1* y *EndoG2* han mostrado la necesidad de ambas enzimas en la degradación controlada de ADN-macronuclear, durante la apoptosis inducida por metal.

Esta segunda línea (actualmente en progreso) ha rendido (desde su inicio, 1999) un total de 20 artículos publicados en revistas internacionales, de los cuales 3 son revisiones. Estos trabajos se han financiado con 8 proyectos concedidos por diversas entidades.

A lo largo de todos estos años hemos establecido colaboraciones y/o proyectos conjuntos con diversos grupos, nacionales e internacionales, entre los primeros cabe destacar la colaboración con los siguientes investigadores; Dra. C. Ascaso (Instituto de Ciencias Medioambientales, CSIC), Dr. LM Ruiz-Pérez (Instituto de Parasitología y Biomedicina, CSIC), Dra. S. Atrian (Universidad de Barcelona), Dr. E. Torres (Universidad de la Coruña), entre otros. Y entre los segundos, destacamos a los siguientes investigadores; Dr. E. Orias (Universidad de California, EEUU), Dr. AP. Turkewitz (Universidad de Chicago, EEUU), Dr. D. Chalker (Universidad de

Washington, EEUU), Dr. S. Ottonello (Universidad de Parma, Italia), Dra. G. Sergejeva (Instituto de Citología, Rusia), Dr. A. Viarengo (Universidad de Alessandria, Italia), entre otros.

Simultáneamente a las dos principales líneas de investigación, antes descritas, el grupo ha llevado a cabo, de forma puntual, otros proyectos o actividades, tales como; protozoos del suelo (colpodidos) como bioindicadores de desertización, microfósiles de protistas incluidos en ámbar del Cretácico inferior, secuenciación masiva de minicromosomas del genoma-macronuclear de ciliados esticotricos.

Como hemos mostrado en este breve resumen sobre la actividad de nuestro grupo, estamos abiertos a la elaboración de proyectos conjuntos y colaboraciones con todos aquellos grupos de microbiólogos que trabajen con protistas o que estén interesados en algunos de los aspectos (incluyendo técnicas) o líneas en que el grupo trabaja.

PUBLICACIONES RECIENTES SELECCIONADAS

- Gallego, A., Martín-González, A., Ortega, R. & Gutiérrez, J.C. (2007). Flow cytometry assessment of cytotoxicity and reactive oxygen species generation by single and binary mixtures of cadmium, zinc and copper on populations of the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*. *Chemosphere*. 68: 647-661.
- Díaz, S., Amaro, F., Rico, D., Campos, V., Benítez, L., Martín-González, A., Hamilton, E.P., Orias, E. & Gutiérrez, J.C. (2007). *Tetrahymena* metallothioneins fall into two discrete subfamilies. *PloS ONE*. 2(3): e291. doi:10.1371/journal.pone.0000291.
- Martín-González, A., Wierzchos, J., Gutiérrez, J.C., Alonso, J. & Ascaso, C. (2008). Morphological stasis of protists in lower cretaceous amber. *Protist*. 159: 251-257.
- Gutiérrez, J.C., Martín-González, A., Díaz, S., Amaro, F., Ortega, R., Gallego, A. & de Lucas, M.P. (2008). Ciliates as cellular tools to study the eukaryotic cell-heavy metal interactions. En: *Heavy Metal Pollution*. S.E. Brown & W.C. Welton (Eds.). Nova Publishers. (EEUU). ISBN: 978-1-60456-899-8.
- Amaro, F., de Lucas, M.P., Martín-González, A. & Gutiérrez, J.C. (2008). Two new members of the *Tetrahymena* multi-stress-inducible metallothionein family: Characterization and expression analysis of *T. rostrata* Cd/Cu metallothionein genes. *Gene*. 423: 85-91.
- Rico, D., Martín-González, A., Díaz, S., de Lucas, M.P., & Gutiérrez, J.C. (2009). Heavy metals generate reactive oxygen species in terrestrial and aquatic ciliated protozoa. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*. 149: 90-96.
- Martín-González, A., Wierzchos, J., Gutiérrez, J.C., Alonso, J. & Ascaso, C. (2009). Double fossilization in eukaryotic microorganisms from lower cretaceous amber. *BMC Biology*. 7:9 doi: 10.1186/1741-7007-7-9.
- Amaro, F., Ruotolo, R., Martín-González, A., Faccinni, A., Ottonello, S. & Gutiérrez, J.C. (2009). A pseudo-phytochelatin synthase in the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*. 149: 598-604.

Gutiérrez, J.C., Amaro, F. & Martín-González, A. (2009). From heavy metal-binders to biosensors: Ciliate metallothioneins discussed. *BioEssays*. 31: 805-816.

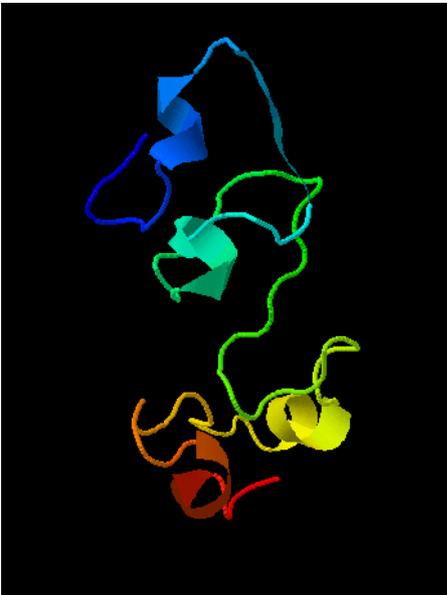
Amaro, F., Turkewitz, A.P., Martín-González, A. & Gutiérrez, J.C. (2011). Whole-cell biosensors for detection of heavy metal ions in environmental samples based on metallothionein promoters from *Tetrahymena thermophila*. *Microbial Biotechnology*. doi:10.1111/j.1751-7915.2011.00252.x.



Miembros actuales del grupo (de izquierda a derecha): Ana Martín-González (Prof. Titular de Universidad), Juan Carlos Gutiérrez (Catedrático), Silvia Díaz (Prof. Ayudante Doctor), Guillermo Rodríguez (alumno interno), Liliana Cubas y Patricia de Francisco (becarias).



Disminución del potencial de membrana mitocondrial (detectado por el fluoróforo JC-1), originado tras la exposición a Cd^{2+} ($1,7 \mu\text{M}$) durante 24h. En la micrografía se muestra una célula de *T. thermophila* en la que las mitocondrias (principalmente localizadas en la periferia celular) muestran fluorescencia verde ($\sim 1.000\times$).



Estructura 3D de la Cd-metallothioneina TtheMTT1 de *T. thermophila*, inferida de la secuencia aminoacídica. La estructura muestra dos regiones globulares (correspondientes a los extremos N- y COOH-terminales) separadas por una región lineal, cuyo conjunto recuerda a la forma "Yo-Yo" típica de las metallothioneinas de otros organismos.