

Construcción génica para detectar compuestos antifúngicos y antitumorales

Breve descripción

Se ha desarrollado una construcción génica con genes provenientes de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, con la que se pueden detectar compuestos antifúngicos y antitumorales, en virtud de su capacidad de alterar la pared celular de los hongos o de inhibir componentes implicados en la señalización a través de la ruta de MAPKs encargada del mantenimiento de la integridad celular (CWI).

La construcción génica incluye el gen *MKK1* de *Saccharomyces cerevisiae* en el que una mutación puntual da lugar a un cambio en el aminoácido 386 de la proteína (serina por prolina), creando una forma hiperactiva de la proteína (*Mkk1^{S386P}*). Este gen está regulado por el promotor de un gen inducible por el factor de transcripción Rlm1 de la ruta de integridad celular (activada por agresiones a la pared celular), en concreto el gen *pYKL161C (MLP1)* (que presenta una elevada inducción transcripcional en respuesta a daño en la pared y a estímulos que activan la ruta CWI) y la secuencia de terminación de la transcripción del gen *ADH1* (Figura 1).

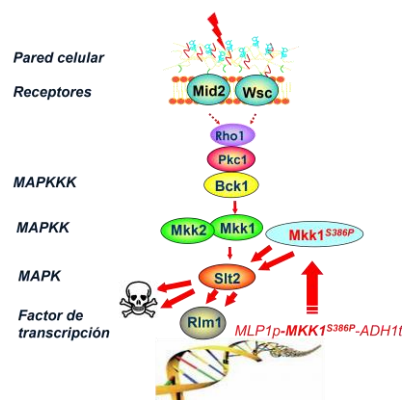


Figura 1. Esquema ilustrativo de la forma de operar del circuito genético de amplificación y retroalimentación de la ruta CWI mediada por la MAPK Slt2 en la levadura *S. cerevisiae*. Se muestran los distintos componentes que participan en esta ruta de respuesta a estrés sobre la pared celular y la composición de la construcción génica de la invención.

Dicha construcción génica amplifica la respuesta a señales que activan la ruta de integridad celular, aunque sean débiles, e implica la creación de un circuito de retroalimentación positiva cuya estimulación conduce a la muerte celular. Al inducir letalidad, esta herramienta permite la fácil puesta a punto de sistemas de rastreo de compuestos de una manera sencilla, específica, sensible y fácil de manipular.

La tecnología se encuadra dentro del sector de la industria farmacéutica-biotecnológica, dentro de los programas de cribado farmacológico para la búsqueda de compuestos con actividad antifúngica, modificadora de la señalización mediada por MAPKs o antitumoral. Esta tecnología está protegida mediante una patente nacional ([ES2530292B2](#)), concedida con examen previo, y de la que se ha solicitado su extensión internacional (PCT/ES 2015/000166).

¿Cómo funciona?

La construcción génica puede ser incorporada en un vector o en el propio genoma de *S. cerevisiae* y sobre los transformantes que la portan se podrían realizar los ensayos para detectar compuestos con actividad antifúngica o antitumoral. Si dichas sustancias estimulan la ruta de integridad celular, se producirá la activación de la cascada de quinasas hasta Slt2. Se originará la fosforilación y activación de Rlm1, la inducción del promotor *YKL161C* y la expresión del alelo hiperactivo (Figura 1). Se generará un circuito de amplificación y de retroalimentación positiva siempre y cuando se mantenga el estímulo, lo que dará lugar a una respuesta excesiva que conduce a la muerte de la célula a bajas concentraciones de cualquier agente que altere la pared celular (Figura 2). Esto otorga a la construcción génica una gran hipersensibilidad a los estímulos que activan la ruta CWI.

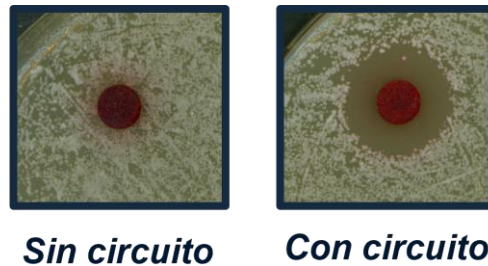


Figura 2. Fotografías ilustrativas de la inhibición del crecimiento que provoca en *S. cerevisiae* un disco impregnado de rojo Congo en células silvestres sin y con el circuito genético de amplificación de la señal.

Se puede utilizar el sistema para identificar los siguientes compuestos:

Compuestos antifúngicos que alteren procesos de la pared celular o que dañen directamente dicha estructura. Estos compuestos estimularían el circuito de amplificación de la ruta CWI provocando la muerte celular. Se podrían detectar mediante sistemas de rastreo HTS (*High Throughput Screening*). También pueden ser identificados compuestos que inhiben componentes de la ruta CWI, evitando que se dispare el mecanismo compensatorio que se activa en condiciones de daño en la pared celular, permitiendo mantener la integridad de dicha estructura esencial. En terapias combinadas, este tipo de compuestos podría potenciar la acción de otros antifúngicos que actúen sobre la pared celular. Como su forma de identificación en el rastreo es por recuperación de la viabilidad celular, se favorece el aislamiento de compuestos con poca toxicidad *per se* sobre la célula eucariota.

Compuestos antitumorales a través del bioensayo descrito anteriormente en el apartado ii. Al comportarse como inhibidores de los componentes de la ruta CWI, los compuestos serían, potencialmente, inhibidores de rutas de MAPKs similares en mamíferos. En este caso la diana no sería específica de hongos y los compuestos podrían tener un efecto antitumoral, dado que las rutas MAPKs son esenciales en la proliferación celular de células eucariotas superiores.

Ventajas competitivas frente a otras investigaciones.

Esta tecnología ofrece una herramienta de manejo muy sencillo y económico para aquellas empresas que busquen antifúngicos o antitumorales. En primer lugar, en relación con los antifúngicos, esta construcción génica permite detectar compuestos que tienen como diana la pared celular de los hongos, diana sobre la que todavía no existen muchos antifúngicos comerciales, frente a los que tampoco han aparecido un gran número de resistencias, lo que sí ha ocurrido en frente a antifúngicos que actúan sobre otras dianas. Al ser una estructura que no está presente en las células humanas, se podrían encontrar antifúngicos con menores efectos secundarios o adversos. Además, al amplificar la respuesta es una herramienta muy sensible, capaz de detectar compuestos con propiedades antifúngicas aún en concentraciones muy bajas.

En relación con los compuestos con actividad antitumoral, la construcción génica podría tener este segundo campo de aplicación, gracias a las similitudes de las MAPKs con el resto de organismos eucarióticos, incluidos los superiores. Por ello, los compuestos identificados como inhibidores de MAPKs en levadura podrían actuar también sobre componentes homólogos presentes en células de mamíferos.

¿Dónde se ha desarrollado?

Esta construcción génica ha sido desarrollada por el grupo de investigación "Transducción de señales en *Saccharomyces cerevisiae*", dentro de Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la UCM, cuyo objetivo es el estudio de las rutas de MAPKs en levadura, principalmente la ruta de integridad de la pared celular (CWI).



Y además...

Además, el Grupo trabaja en otras líneas de investigación. Una, con levaduras humanizadas: utilización del modelo de la levadura para el estudio de la ruta PI3K-PTEN-Akt de mamíferos, o rutas que intervienen en la respuesta inmunitaria innata. Otra, Virulencia bacteriana: Caracterización de proteínas de virulencia bacterianas que interfieren con la señalización, mediante su expresión heteróloga en levadura.

El grupo de investigación está interesado en contactar con empresas que deseen adquirir una licencia de explotación de la patente o colaborar para continuar y extender sus investigaciones.

Responsable de la investigación

Humberto Martín Brieva, humberto@ucm.es

Departamento: **Departamento de Microbiología y Parasitología**

Facultad: **Farmacia**