



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO: *Saccharomyces cerevisiae* como modelo  
para el estudio de la enfermedad de Alzheimer.**

Autor: Marta Valenti Sanguino

Tutor: Dra. María Molina Martín

Convocatoria: Junio 2018

## RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es la enfermedad neurodegenerativa más frecuente en la población actual. Se caracteriza por la aparición en el sistema nervioso central de placas neuríticas seniles extracelulares (compuestas por agregados del péptido  $\beta$ -amiloide) y ovillos neurofibrilares intracelulares (compuestos por la proteína tau hiperfosforilada), debiendo existir una relación entre ambos. Para poder llegar a comprender esta enfermedad es necesario desarrollar nuevas herramientas de estudio y una de ellas es la creación de modelos de la misma en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* mediante técnicas de sobreexpresión, delección, mutación o expresión heteróloga de las proteínas relacionadas con esta enfermedad. Estos modelos son especialmente interesantes por tratarse de sistemas *in vivo* eucarióticos, pero al mismo tiempo fáciles de manipular. En este trabajo se han resumido los principales modelos creados para el estudio de la cascada  $\beta$ -amiloide y la proteína tau en *S. cerevisiae*, prestando atención a la información aportada por cada uno de ellos. Se han discutido las ventajas y limitaciones de esta nueva aproximación y sus posibles aplicaciones futuras.

## INTRODUCCIÓN

### 1. La enfermedad de Alzheimer: mecanismos moleculares

La enfermedad de Alzheimer es la enfermedad neurodegenerativa más frecuente en la población actualmente [1]. Solo el 5% de los casos de Alzhéimer son de inicio precoz (<65 años) y se relacionan con causas genéticas, por lo que deben de existir otros factores ambientales que expliquen la enfermedad. De hecho, existe correlación entre Alzheimer y factores de riesgo vascular (diabetes mellitus, hipertensión, aterosclerosis, etc.) puesto que pueden desencadenar situaciones de hipoxia que pueden iniciar o acelerar la cascada neurodegenerativa [2]. También se está explorando la posibilidad de que se produzcan pequeñas alteraciones genéticas que por sí solas no explican la enfermedad pero que combinadas pueden desencadenarla [3].

El cambio histológico característico de esta enfermedad a nivel del sistema nervioso central (SNC) es la aparición de placas neuríticas seniles extracelulares (SPs) y ovillos neurofibrilares intracelulares (NFTs) (figura 1). Estos agregados proteicos empiezan a desarrollarse en la corteza entorrinal, responsable de la memoria y la orientación. Posteriormente afectan al hipocampo y amígdala, responsables de la memoria y el aprendizaje, para finalmente extenderse a las áreas de

asociación de la corteza cerebral. Todo ello lleva a una pérdida progresiva de neuronas y sinapsis, y una grave atrofia cerebral. El primer síntoma en manifestarse suele ser la pérdida de memoria, seguido de desorientación espacial y temporal junto con problemas en el lenguaje y cambios en la personalidad [3].

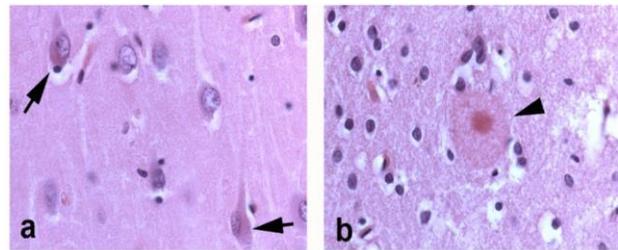


Figura 1. Las flechas de la imagen A señalan los ovillos neurofibrilares. La flecha de la imagen B señala una placa neurítica senil. En ambos casos los cortes han sido teñidos con hematoxilina-eosina [4].

Mediante análisis bioquímicos se ha determinado que el principal componente de las SPs es el péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), mientras los NFTs están formados fundamentalmente por la proteína tau hiperfosforilada [5]. También se ha detectado la presencia del péptido  $A\beta$  en cuerpos multivesiculares, lisosomas y otras vesículas [6]. Esto sugiere que es posible que el péptido  $A\beta$  se acumule en el interior celular formando fibras insolubles. Estas finalmente acaban desencadenando la muerte celular, tras lo cual son liberadas al espacio extracelular [2].

### a. Péptido $\beta$ -amiloide

El péptido  $A\beta$  se forma a partir de un precursor conocido como proteína precursora amiloide (APP). Se trata de una proteína transmembrana de tipo I cuya síntesis tiene lugar en el retículo endoplásmico (RE). Tras una serie de modificaciones postraduccionales de N- y O-glicosilación, es transportada a través del aparato de Golgi (AG) hasta la membrana donde queda anclada. Desde ahí sufre una endocitosis mediada por clatrina para ser degradada por los lisosomas, el proteasoma o volver al RE [2]. La APP tiene funciones tróficas para las neuronas y participa en el transporte de iones, la adhesión y migración celular [7].

La APP puede ser procesada por dos posibles rutas: la ruta no amiloidogénica y la ruta amiloidogénica (figura 2). La primera ruta interviene en el procesamiento de la APP anclada a la membrana. En primer lugar sufre un corte por una  $\alpha$ -secretasa, entre las que destaca ADAM10, generando un péptido soluble ( $sAPP\alpha$ ) y un fragmento que queda anclado a la membrana (C83). Posteriormente C83 es procesado por la  $\gamma$ -secretasa (complejo formado por 4 proteínas: presenilina 1 o 2 (PS 1/2 – con actividad proteasa), Nct, PEN2 y APH-1) dando lugar al péptido p3 sin función conocida. La segunda ruta participa en el procesamiento de la APP internalizada en endosomas, ya que el corte es llevado a cabo en este caso por una  $\beta$ -secretasa, entre las que destaca BACE1, cuya actividad requiere de un pH ácido. Igual que en el caso anterior, tras el corte se genera un péptido

soluble (sAPP $\beta$ ) y un fragmento anclado a la membrana (C99). Sobre este actúa el complejo de la  $\gamma$ -secretasa, formando en este caso el péptido A $\beta$  [2][7]. Posteriormente este es degradado por una serie de proteasas, entre las que destaca la neprilisina (NEP), aunque las células de la glía también parecen ser fundamentales su aclaramiento [3]. En los pacientes con Alzheimer precoz se observa un aumento de la producción de péptido A $\beta$ . Sin embargo, en los casos de Alzheimer tardío no se ha visto este aumento de la producción, por lo que debe existir un fallo en su degradación/aclaramiento que explique su acúmulo en el SNC [8].

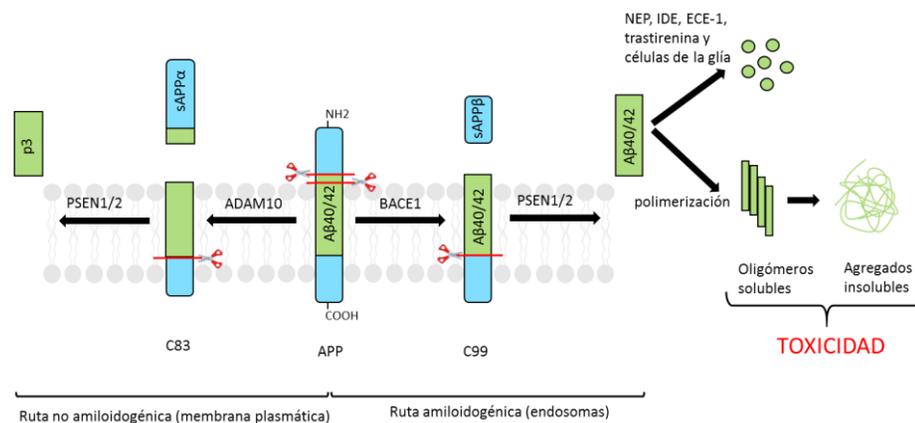


Figura 2. Procesamiento de APP a través de las rutas amiloidogénica y no amiloidogénica

El péptido A $\beta$  es un péptido hidrofóbico con un tamaño entre 39 y 43 aminoácidos, aunque las isoformas más frecuentes son tanto la A $\beta$ 40 como A $\beta$ 42 [2][9]. Es característico en los pacientes con Alzheimer el incremento de la producción del péptido A $\beta$ 42 respecto al A $\beta$ 40, siendo el primero más hidrofóbico. Esto favorece que sea capaz de asociarse consigo mismo produciendo primero oligómeros solubles y finalmente agregados insolubles [1]. Los daños originados por el péptido A $\beta$  son múltiples: estrés oxidativo, apoptosis neuronal, alteraciones de la homeostasis del calcio, alteraciones en el potencial de membrana y activación de la microglía e inflamación [10].

No existe correlación entre la carga total de placas amiloides del paciente y la gravedad de su enfermedad. Por este motivo, se sospecha que las formas prefibrilares solubles del péptido A $\beta$  pueden ser las verdaderas responsables de su toxicidad, mientras que los agregados insolubles pueden ser un mecanismo para reducir la toxicidad al transformar las especies reactivas en otras más inertes, además de ser responsables del proceso inflamatorio [3]. Esto mismo ocurre con la proteína tau, aunque en este caso sí hay correlación entre la carga total de ovillos neurofibrilares y la gravedad de la enfermedad [11].

El Alzheimer precoz se relaciona con mutaciones en el gen que codifica para APP, así como mutaciones en los genes que codifican para PS1 y 2 [9]. En el caso del Alzheimer tardío los únicos factores genéticos que se han relacionado con este son la apolipoproteína E (APOE), concretamente el alelo  $\epsilon 4$ , y la proteína de ensamblaje de clatrina y fosfatidilinositol (PICALM), aunque los mecanismos moleculares todavía no están claros [2][12].

## b. Proteína tau

La principal función de la proteína tau es estabilizar los microtúbulos mediante la unión a través de su extremo C-terminal a la tubulina, permitiendo el transporte de orgánulos (especialmente mitocondrias) a los axones neuronales. Concretamente la unión se produce a través de 4 secuencias repetidas codificadas por los exones 9-12 de este gen. De forma natural se puede producir una deleción del exón 10 dando lugar a las isoformas 4R y 3R de tau en proporción 1:1 [2][3]. Además de lo anterior, la proteína tau es capaz de interactuar con la membrana plasmática y con diferentes proteínas que están involucradas en la señalización celular a través de su extremo N-terminal. Esto implica que la proteína tau puede ser un sustrato de estas proteínas, regular su actividad o bien ambas cosas a la vez. [11].

La proteína tau presenta un total de más de 40 epítotos de fosforilación [3]. Esto es importante porque en pacientes con Alzheimer la proteína tau se encuentra hiperfosforilada, lo que da lugar *in vitro* a un cambio conformacional de la proteína que desencadena primero la formación de oligómeros solubles y posteriormente ovillos [13]. Todo ello lleva a una disminución de la afinidad por la tubulina y una desestabilización de los microtúbulos (figura 3). Finalmente se bloquea el transporte intracelular de mitocondrias y otros orgánulos hacia los axones neuronales, se produce un fallo en el funcionamiento mitocondrial, estrés oxidativo, falta de ATP en las terminaciones sinápticas y pérdida de sinapsis [2]. La hiperfosforilación de tau también puede afectar a la interacción con las proteínas de membrana y contribuir a sus efectos tóxicos sobre la célula [11].

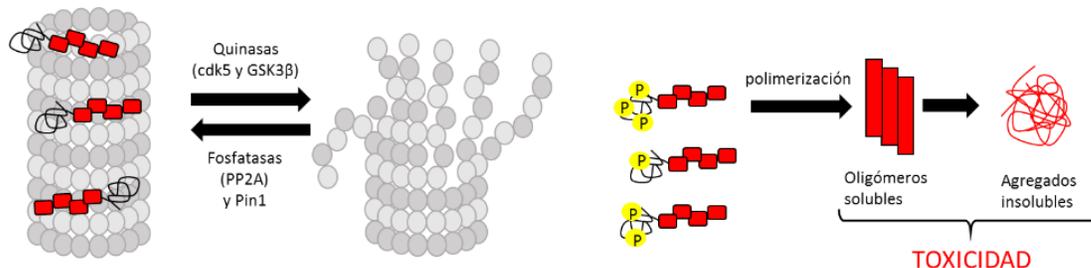


Figura 3. Hiperfosforilación de la proteína tau, desestabilización de los microtúbulos y formación de los ovillos neurofibrilares.

Se sospecha que esta hiperfosforilación puede ser debida a un desequilibrio entre una serie de quinasas y fosfatasa que tienen actividad sobre esta proteína. Entre las quinasas destacan especialmente dos: quinasas dependientes de ciclina 5 (cdk5) y glucógeno sintasa quinasas 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), aunque actualmente no se conoce exactamente su contribución a la enfermedad de Alzheimer. Entre las fosfatasas destaca la fosfatasa 2A (PP2A). Tanto el incremento de la actividad de las quinasas como la disminución de la actividad de las fosfatasas puede llevar a la formación de estos agregados proteicos. Además, la peptidil-prolil cis-trans isomerasa (Pin1) regula la fosforilación de tau porque es capaz de unirse con la proteína cuando está fosforilada en los diferentes motivos Ser/Thr-Pro, isomeriza el enlace de los residuos de Thr/Ser con la prolina contigua de cis a trans y facilita la defosforilación por PP2A [14]. En el Alzheimer los niveles de Pin1 están disminuidos, impidiendo la acción de PP2A [11]. Independientemente de lo anterior, la proteína tau sufre otros tipos de modificaciones postraduccionales que pueden afectar a su funcionamiento y tendencia a formar agregados [15].

### **c. Relación entre proteína tau y péptido A $\beta$**

Hay diferentes teorías para tratar de explicar la relación entre la proteína tau y el péptido  $\beta$ -amiloide, pero la que ha cobrado más fuerza actualmente es que la acumulación del péptido A $\beta$  precede a la formación de los ovillos neurofibrilares y que este péptido es el responsable precisamente de inducir la formación de los agregados de la proteína tau porque estimula su fosforilación [11]. Aunque no se conoce bien la ruta, la interacción entre ambas proteínas se puede producir a través del receptor de glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) o a través de SIRT1 (deacetilasa) y AMPK (quinasas), dos enzimas cuya actividad está interconectada y depende del estado energético de la célula [15].

## **2. Las levaduras como modelo de la enfermedad de Alzheimer**

Se espera que el aumento de la esperanza de vida conduzca a un aumento de la prevalencia de la enfermedad de Alzheimer y, por ello, es fundamental llegar a comprender esta enfermedad [8]. Con este fin se han desarrollado numerosos modelos en levaduras, especialmente en *Saccharomyces cerevisiae*.

Pese a que *S. cerevisiae* carece de un sistema nervioso y es un sistema unicelular, es muy interesante para el estudio de las enfermedades humanas por varios motivos. El primero es que se

disponen de técnicas de manipulación genética sencillas que permiten estudiar los efectos de la sobreexpresión, localización, delección o mutación de los homólogos en levadura de las proteínas implicadas en estas enfermedades. Las técnicas que implican la utilización de células de mamífero u organismos pluricelulares son más complejas, caras y muchas veces entran en conflicto con la ética [8][13][15]. El segundo es que su genoma está secuenciado y anotado, gracias a lo cual se ha podido comprobar que el 31% de los genes humanos tienen homólogo en esta levadura y otro 30% tienen dominios comunes [13]. También comparten procesos biológicos como el remodelado de proteínas, tráfico intracelular, respuesta al estrés, etc. Son sistemas eucarióticos, con los mismos compartimentos y orgánulos celulares que las células de mamífero [13]. El tercero es que son modelos mucho más sencillos, en los que se evita la existencia de rutas o proteínas con funciones redundantes que dan lugar a falsos positivos y respuestas inespecíficas [9]. Finalmente, son útiles en el descubrimiento de nuevos posibles fármacos y dianas terapéuticas por tratarse de sistemas *in vivo* que permiten crear un entorno más parecido al natural [9].

Según todo lo anterior, las levaduras son útiles para el estudio de proteínas humanas que tienen homólogo en levadura simplemente mediante técnicas de sobreexpresión, delección o mutación de dichas proteínas. Sin embargo, en aquellos casos en los que no exista una proteína homóloga siguen siendo útiles a través de las técnicas de expresión heteróloga, dando lugar a las “levaduras humanizadas” [16].

## OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

- Conocer las aportaciones realizadas por los diferentes modelos existentes del Alzheimer en *S. cerevisiae* en relación con la cascada  $\beta$ -amiloide y la proteína tau.
- Identificar proteínas implicadas en el Alzheimer con homólogo en esta levadura.
- Determinar las ventajas/limitaciones de esta aproximación para el estudio del Alzheimer.
- Estudiar el impacto y posibles aplicaciones futuras de estos modelos de la enfermedad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la elaboración de este trabajo se ha llevado una búsqueda bibliográfica a través de PubMed y la biblioteca de la Universidad Complutense de Madrid. También se ha obtenido información sobre estructuras, dominios y funciones de proteínas, tanto humanas como de levaduras, a través de

Uniprot y *Saccharomyces Genome Database* (SGD). Finalmente para el estudio de proteínas homólogas se han llevado a cabo un análisis mediante el programa BLAST del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Modelos de estudio de la cascada $\beta$ -amiloide en *S. cerevisiae* (figura 4)

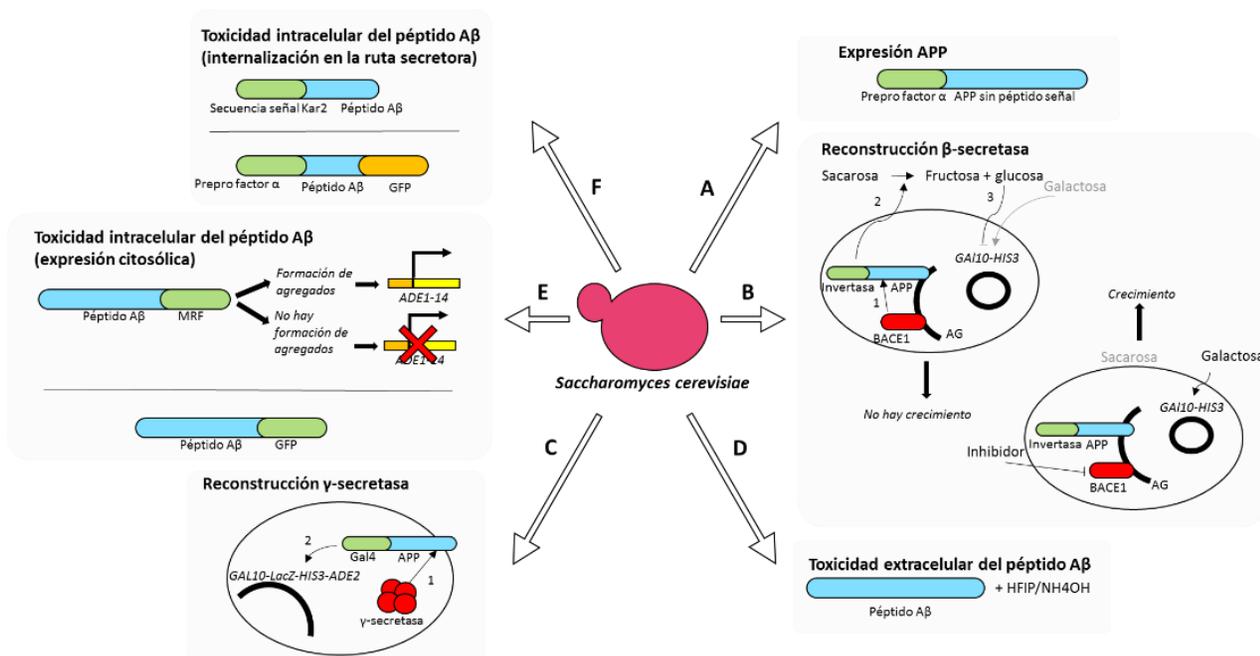


Figura 4. Principales modelos de estudio de la cascada  $\beta$ -amiloide en *S. cerevisiae*

**Expresión de la APP (figura 4A):** Los primeros estudios se centraron en la expresión de la APP humana en levaduras con el objetivo de determinar si existían en este tipo de células secretasas similares a las presentes en neuronas. Descubrieron que las aspartil proteasas de la familia de las Yapsinas (Yps1/Yap3, Yps2/Mkc7p y Yps3) eran capaces de cortar la APP en el mismo punto en que lo hace la  $\alpha$ -secretasa de mamíferos, pese a no tener funciones ni estructura homólogas. Este proceso tenía lugar a nivel del AG y membrana plasmática. No se detectaron proteasas con actividad  $\gamma$ - o  $\beta$ -secretasa. [17][18][19]. Por otro lado, se estudiaron las modificaciones postraduccionales de glicosilación que sufre esta proteína. A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, en levaduras solo se detectaron modificaciones por O-manosilación llevadas a cabo fundamentalmente por la manosiltransferasa Pmt4 a nivel del AG. Cuando esta enzima se elimina se observa que se ve favorecida la agregación de la APP y se ve dificultado su transporte celular, llevando a una disminución la actividad de las Yps sobre la misma [19].

**Reconstrucción de la  $\beta$ -secretasa (figura 4B):** Con el objetivo de estudiar la actividad de la  $\beta$ -secretasa BACE1 en levaduras Lüthi *et al.* [9] crearon un modelo basado en 3 construcciones. La primera estaba formada por la invertasa Suc2 de levaduras, que permite hidrolizar la sacarosa a glucosa + fructosa, seguida de un fragmento de la secuencia de APP que incluía los puntos de corte por las diferentes secretasas. La segunda estaba formada por un fragmento de BACE1 que incluía sus dos sitios catalíticos, fusionada con la secuencia señal de Suc2 y un fragmento de APP para permitir su co-localización en la célula con la primera construcción. La tercera estaba formada por el gen *HIS3* regulado por el promotor *GAL10*, que se induce en presencia de galactosa y se reprime en presencia de glucosa. Cuando estas construcciones se co-expresaban en una cepa de *S. cerevisiae* adecuada, utilizando un medio de cultivo con sacarosa y galactosa como únicas fuentes de carbono y sin histidina, BACE1 producía la hidrólisis de la fusión Suc2-APP a nivel del RE y AG. Se liberaba la invertasa al exterior celular, se producía la hidrólisis de la sacarosa a glucosa + fructosa y esa glucosa evitaba la expresión del gen *HIS3*, impidiendo el crecimiento de la levadura. Cuando BACE1 se inhibía, no se libera la invertasa, no se hidroliza la sacarosa y la galactosa del medio favorecía la expresión del gen *HIS3*, permitiendo que las células pudieran crecer. Con este sistema se perseguían dos objetivos: estudiar la actividad de BACE1 y servir de base para la búsqueda de nuevos compuestos inhibidores de su actividad. Respecto al primero se comprobó que para que BACE1 pueda actuar son necesarios sus dos dominios catalíticos. En cuanto al segundo, se demostró que este sistema tenía como ventajas una alta especificidad, una respuesta dosis-dependiente y además permitía la búsqueda de nuevos fármacos en un entorno natural, en el que BACE1 se encuentra anclada a la membrana [9][20].

**Reconstrucción de la  $\gamma$ -secretasa (figura 4C):** Edbauer *et al.* estudiaron el complejo de la  $\gamma$ -secretasa basándose en un ensayo desarrollado anteriormente para estudiar la actividad de proteasas cuyos sustratos se encuentran anclados a las membranas [21]. Construyeron una proteína reportera formada por un fragmento de APP, que incluía su dominio transmembrana, y por el factor transcripcional Gal4. Cuando esta construcción se co-expresaba con la  $\gamma$ -secretasa se producía el corte de APP en el dominio transmembranal y se liberaba Gal4. Este se traslocaba al núcleo y ahí provocaba la expresión del gen *lacZ* como marcador situado bajo el promotor *GAL10*. Mediante este sistema comprobaron que los 4 componentes de la  $\gamma$ -secretasa (PS1, Nct, APH-1 y PEN2) son necesarios para que el complejo funcione correctamente [22]. Posteriormente centraron sus estudios en la función del motivo <sup>122</sup>GXXXG<sup>126</sup> de APH-1, importante para la formación de un

complejo ternario con PS1 y Nct. Mientras que la mutación de este motivo en células de mamífero provocaba la pérdida de la función de la  $\gamma$ -secretasa, en células de levadura esta actividad no se perdía porque la sobreexpresión de PS1 y Nct permitía que ambas interaccionasen sin la participación de APH-1 [23].

Futai *et al.* [24] modificaron el sistema anterior para que los genes *HIS3* y *ADE2* también estuvieran bajo el control del promotor *GAL10*, impidiendo el crecimiento de la levadura en medios selectivos sin histidina ni adenina si no se activaba este promotor. Utilizaron este modelo para el estudio de las mutaciones en PS1, lo que les llevó a descubrir dobles mutantes (todos compartían la mutación S438P en un dominio transmembranal) que eran capaces de crecer en ausencia de Nct. Esto podía deberse a un cambio conformacional en PS1 que afectase al transporte del sustrato al sitio catalítico o a la unión con los demás componentes del complejo  $\gamma$ -secretasa [24]. Por otro lado, determinaron que la actividad enzimática de PS1 y PS2 es similar entre sí, pero PS2 tiene una menor afinidad por los demás componentes del complejo  $\gamma$ -secretasa y se une mayoritariamente a la forma inmadura no glicosilada de Nct, lo lleva a una menor actividad enzimática [25].

**Toxicidad extracelular del péptido A $\beta$  (figura 4D):** los grupos de investigación que han estudiado los efectos que produce sobre las levaduras la incorporación del péptido A $\beta$  al medio de cultivo han obtenido resultados opuestos en función de la forma en la que se hubiera sido preparada la suspensión de este péptido. Cuando se llevaba a cabo un tratamiento previo con 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (HFIP) se observaba desde el primer momento la formación de oligómeros y al cabo de 24h fibras. El péptido A $\beta$  tenía un efecto tóxico para las células cuando se encontraba en forma de oligómeros, pero no cuando se encontraba en forma de fibras. Parece que el HFIP provoca un cambio en la conformación del péptido A $\beta$  responsable de conferirle una mayor facilidad para formar agregados e interaccionar con la pared celular. En cambio, cuando se llevaba a cabo un tratamiento previo con NH<sub>4</sub>OH solo se observaban formas monoméricas inicialmente, aunque a las 24h se habían formado oligómeros. Además aquí el péptido A $\beta$  estimulaba el crecimiento de las levaduras [10][26].

**Toxicidad intracelular del péptido A $\beta$  (figura 4E y 4F):** Aunque la mayor parte del péptido A $\beta$  se localiza en el exterior celular, es interesante estudiar sus efectos intracelulares porque también se acumula a este nivel. No es posible estudiar la expresión directa del péptido A $\beta$  porque no se

consiguen niveles de suficientes de esta proteína, probablemente porque es degradado por *S. cerevisiae* más rápidamente de lo que se produce [27].

Bagriantsev *et al.* [28] expresaron el factor de terminación de la traducción Sup35p sustituyendo su dominio N-terminal por el péptido A $\beta$ 42 (A $\beta$ -MRF) en células que presentaban una mutación sin sentido en el gen *ADE1*. De esta forma, cuando se formasen agregados de A $\beta$ -MRF la levadura sería capaz de crecer en medios sin adenina porque no se detendría la traducción en el codon de stop prematuro, mientras que cuando A $\beta$ -MRF estuviera libre no habría crecimiento. Mediante este sistema se demostró, en primer lugar, que el péptido A $\beta$ 42 es capaz de formar oligómeros en el citoplasma de células de levadura, aunque no se detectó la formación de fibras de mayor tamaño [28]. Sin embargo, hay que considerar que esta sistema presenta una limitación, puesto que no es capaz de distinguir entre la capacidad para formar agregados de la isoforma A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42, porque la isoforma A $\beta$ 40 ya reestablece por completo la capacidad de agregación de A $\beta$ -MRF [27]. En segundo lugar, se confirmó la importancia de los residuos en posición 19, 20 y 31 para la interacción entre monómeros del péptido A $\beta$ 42 y la formación de agregados, aunque se seguía observando cierto crecimiento porque estos 3 residuos solo abarcan 2 de las 4 zonas importantes para estas interacciones [28]. En tercer lugar, identificaron dos proteínas que podrían influir en la agregación del péptido A $\beta$ : la chaperona Hsp104, que parece que actúa evitando la degradación de los oligómeros y monómeros de A $\beta$ -MRF [28], y YAP1802 (homólogo de PICALM), cuya sobreexpresión reducía los niveles de oligómeros [29]. Finalmente, cabe resaltar que este modelo ha sido empleado para poner a punto un *screening* a gran escala de inhibidores de la oligomerización del péptido A $\beta$  con éxito, ya que se obtienen respuestas dosis-dependiente y permite descartar compuestos tóxicos con los que no se observa crecimiento en medios tanto con como sin adenina. Se puede utilizar para buscar fármacos que actúen a nivel de las primeras etapas de oligomerización pero no sobre la formación de fibras, que hasta pueden resultar beneficiosas [30]. Así se descubrió que algunos fármacos utilizados actualmente para tratar otras patologías, especialmente el tamoxifeno y la minociclina, pueden ser útiles con este fin [29].

Numerosos autores han estudiado la agregación del péptido A $\beta$  fusionado a GFP. Es interesante que la intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional al tamaño del *linker* entre el péptido A $\beta$  y GFP e inversamente proporcional a la tendencia a formar agregados [31], lo que permite a los autores jugar con estos dos parámetros según el objetivo de su estudio. Caine *et al.*

observaron que la proteína fusión se localizaba en el citoplasma asociada a lípidos, producía una ligera disminución del crecimiento e inducía una respuesta de choque térmico, probablemente causada por el estrés oxidativo [32]. Macreadie *et al.* aplicaron este sistema a la búsqueda de compuestos capaces de inhibir la agregación del péptido A $\beta$ , basándose precisamente en el aumento de la fluorescencia que se observa cuando se produce una menor agregación. Gracias a ello descubrieron que el folato es capaz de inhibir este proceso, lo que respalda la idea de que el déficit de ácido fólico es un factor de riesgo para el desarrollo de Alzheimer y esto puede estar relacionado con sus propiedades antioxidantes [33]. Nair *et al.* confirmaron que en este sistema la isoforma A $\beta$ 42 tiene una mayor tendencia a formar agregados que la isoforma A $\beta$ 40, pero lo más interesante fue que utilizaron esta fusión para enfrentarla a una colección de mutantes de delección de *S. cerevisiae* con el objetivo de conocer que rutas celulares afectaban a la agregación del péptido A $\beta$ . Los 4 procesos con mayor influencia fueron el funcionamiento mitocondrial, el metabolismo de fosfolípidos, la regulación de transcripción/traducción y la biosíntesis de inositol. Casi el 50% de los genes identificados tenían homólogo en humanos [31]. Esto refuerza la idea de que existe una conexión entre Alzheimer y el metabolismo lipídico, la APOE y las balsas lipídicas de la membrana.

Dado que la expresión del péptido A $\beta$  en el citoplasma casi no produce efectos tóxicos, algunos autores han recurrido a la utilización de la secuencia señal de Kar2 [34] o del factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae* [6] para introducir a esta proteína en la ruta secretora, a imitación de lo que ocurre en las neuronas. De esta forma la proteína de fusión se dirige al RE (donde se elimina la secuencia señal), al AG y finalmente a la membrana plasmática. Desde ahí es liberada al espacio periplásmico y vuelve a ser endocitado por la célula. Por todo ello, no se detecta la presencia de este péptido en el medio de cultivo [6]. Con este sistema observaron que el efecto tóxico era mayor que cuando esta proteína se expresaba en el citoplasma y existía una mayor tendencia a formar agregados, especialmente en el caso del péptido A $\beta$ 42 [34], y que se reducía el crecimiento en la fase exponencial y la viabilidad en la fase estacionaria [1]. Estos efectos tóxicos se relacionaban con daños a nivel de la función mitocondrial, disminuyendo la actividad del complejo IV de la cadena respiratoria y aumentando la actividad del complejo III, llevando a una mayor producción de ROS y un incremento de la actividad de las defensas antioxidantes, especialmente de la catalasa peroxisomal (Cta1). Cuando se eliminan las enzimas antioxidantes aumentaba el efecto tóxico del péptido A $\beta$  pero no los niveles de fibras amiloides, de lo que se deduce que el estrés oxidativo es

consecuencia de la presencia del péptido A $\beta$  y no al revés [35]. Por otro lado, la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico ponía en marcha la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR – respuesta de estrés del retículo endoplásmico) regulada por Ire1. Esto provocaba una disminución de la transcripción de todos los genes implicados en la síntesis de proteínas, frente a un aumento de aquellos implicados en su eliminación o cambio conformacional [36]. Todo ello, unido a la inhibición del proteasoma [1] y el aumento generalizado de la síntesis de lípidos, puede activar los mecanismos de apoptosis y conducir a la muerte celular [36].

Este modelo ha sido empleado para enfrentarlo a una colección de sobreexpresión de *S. cerevisiae*, gracias a lo cual se identificaron 12 genes con homólogo en humanos que influían en la toxicidad del péptido A $\beta$ , de los cuales 3 estaban vinculados con la endocitosis mediada por clatrina y el citoesqueleto (posible punto de conexión con la proteína tau) [34]. De entre ellos destaca *YAP1802* porque Treusch *et al.* [34] determinaron que su sobreexpresión revertía los efectos tóxicos del péptido A $\beta$ , mientras que D'Angelo *et al.* [6] observaron el efecto contrario. Estas diferencias pueden deberse a que el primer grupo integró varias copias de la construcción en tándem en el genoma, mientras que en el segundo usó un vector multicopia. También pueden relacionarse con el hecho de que en el segundo grupo la construcción estaba fusionada a GFP y esto puede alterar la distribución y plegamiento de la proteína. [6].

Por otro lado, este modelo también ha sido utilizado para la búsqueda de compuestos que disminuyan la toxicidad del péptido A $\beta$ . Se obtuvieron resultados prometedores con las 8-hidroxiquinolinas, especialmente el clioquinol. Se trata de un quelante de fuerza media que sustraía los metales complejados con las fibras del péptido A $\beta$ , las desestabilizaba y facilitaba su degradación, normalizando el tráfico endocítico [37]. El tamoxifeno y la minociclina que habían dado buenos resultados con el modelo A $\beta$ -MRF, reducían la toxicidad del péptido A $\beta$  también en este modelo [29].

## 2. Modelos de estudio de la proteína tau en *S. cerevisiae* (figura 5)

Los modelos de estudio de la proteína tau en *S. cerevisiae* en relación con el Alzheimer son mucho menos numerosos que aquellos centrados en la cascada  $\beta$ -amiloide, pese a lo cual han aportado resultados interesantes. La expresión directa de la proteína tau no produce efectos tóxicos para la levadura, independientemente de su nivel de fosforilación [38]. Esto puede deberse a que no es capaz de interactuar con los microtúbulos de la levadura, probablemente por las diferencias

entre las tubulinas de mamífero y levadura [13]. Por tanto, para estudiar la interacción de la proteína tau con los microtúbulos era necesario purificar la proteína producida en levadura y evaluar su interacción *in vitro* con microtúbulos formados por tubulina porcina [39].

Inicialmente se centraron en estudiar la función de las quinasas de levadura Mds1 y Pho85 (homólogos de GSK3 $\beta$  y Cdk5 humanas respectivamente) a través de mutantes de delección. La delección de *MDS1* llevaba una disminución de la fosforilación en dos fosfoepitopos: AD2 (S396/S404 - típico sitio de fosforilación de GSK3 $\beta$ ) y

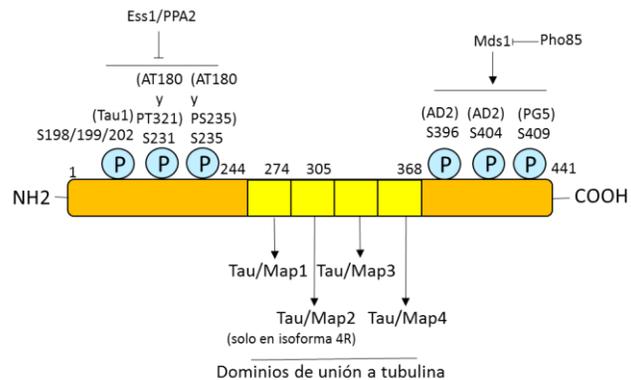


Figura 5. Epitopos de fosforilación de la proteína tau

PG5 (S409 - típico sitio de fosforilación de la proteína-quinasa A PKA), lo que sugiere que Mds1 actúa de forma directa sobre AD2 e indirecta sobre PG5, probablemente fosforilando a PKA. En cambio, la delección de *PHO85* provocaba un aumento de la fosforilación en PG5 principalmente y AD2 en menor medida, por lo que es probable que esta quinasa regule negativamente a Mds1 [38][39]. Con el objetivo de profundizar en mayor medida en la función del residuo S409 se llevó a cabo una mutación del mismo a alanina, de forma que no podía ser fosforilado, y a glutamato, que imitaba al grupo fosfato. Se concluyó que la fosforilación de este residuo juega un papel importante en la agregación de tau y el bloqueo de la unión a los microtúbulos. Además la fosforilación en S396/S404 era dependiente de la fosforilación previa en S409 [40].

Se confirmó que la hiperfosforilación de tau es responsable de un cambio conformacional en la proteína que lleva a una menor afinidad por la unión a microtúbulos y la formación de agregados proteicos. Concretamente los agregados de tau se formaban sobre la superficie de los microtúbulos y alteraba la distancia entre ellos, lo que explicaría los problemas de transporte en los axones neuronales causados por esta proteína. Además se comparó la capacidad de agregación y fosforilación de las isoformas 3R y 4R. Mientras que los niveles de fosforilación de ambas isoformas eran similares, la isoforma 4R tenía una mayor tendencia a formar agregados que la 3R. Esto implica que el segundo dominio de unión a microtúbulos puede ser importante en los procesos de agregación [38][39].

Por otro lado, se estudiaron los efectos del estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial sobre la agregación de la proteína tau tratando las células con sulfato ferroso, delecionando *SOD2* (gen de la superóxido dismutasa mitocondrial) o delecionando *RIM1* (implicada en la replicación del DNA mitocondrial). En todos los casos se vio favorecida la agregación de tau por una vía independiente a la fosforilación de la proteína, puesto que de hecho disminuía la fosforilación en los fosfoepitopos AD2 y PG5. Ambos mecanismos podrían tener un efecto sinérgico entre sí [40]. Por tanto, se concluye que un posible punto de interacción entre el péptido A $\beta$  y la proteína tau es a través de las mitocondrias.

Los últimos estudios se centraron en la actividad de Ess1 (homólogo de Pin1) sobre tau, a través de un mutante termosensible de esta isomerasa. Su inactivación provocaba un cambio en la distribución de tau, pasando de una distribución difusa en el citoplasma a formar pequeños puntos en la periferia de la célula. Esto iba acompañado de una disminución del crecimiento de la célula, un aumento de la producción de ROS y de los procesos de apoptosis. Todos estos efectos pueden estar causados por una hiperfosforilación de tau en los fosfoepitopos AT180, PT2231, PT235 y Tau1. Sin embargo, en este caso no se observa un aumento de los agregados insolubles. Esto refuerza la idea de que los oligómeros solubles tienen una mayor toxicidad que las fibras insolubles [14].

### **3. Aplicaciones, ventajas y limitaciones de los modelos de la enfermedad de Alzheimer en *S. cerevisiae***

Los modelos de la enfermedad de Alzheimer en *S. cerevisiae* han sido muy útiles para profundizar en los mecanismos moleculares de esta enfermedad. Por ejemplo, han permitido establecer que el estrés oxidativo y daño mitocondrial son consecuencia del acúmulo del péptido A $\beta$  [35] o han ayudado a estudiar las modificaciones por fosforilación de la proteína tau y sus consecuencias sobre la formación de agregados [14][38][39][40]. Pese a que no existen homólogos de la proteína tau ni el péptido A $\beta$  en esta levadura, no ha supuesto un problema gracias a las técnicas de expresión heteróloga. A esto se unen dos factores importantes: muchas de las proteínas que interaccionan con ellos sí tienen homólogo y, por tanto, es posible estudiar como interaccionan con la proteína tau y el péptido A $\beta$  expresados artificialmente; y la mayor parte de las rutas celulares implicadas en la patogénesis del Alzheimer (actividad mitocondrial, estrés oxidativo, tráfico celular etc.) están conservadas en la levadura. Por otro lado, también han podido utilizarse estos modelos

para la búsqueda de nuevos compuestos que podrían utilizarse en el tratamiento de la enfermedad, como inhibidores de la  $\beta$ -secretasa [9][20] o inhibidores de formación de oligómeros del péptido A $\beta$  [29][30]. Por último, han demostrado ser muy útiles en *screenings* de colecciones tanto de sobreexpresión como de delección de genes con el objetivo de identificar aquellos que influyen sobre la toxicidad de las proteínas implicadas en el Alzheimer [31][34].

Sin embargo, este tipo de modelos presentan una serie de limitaciones, algunas de las cuales se deben a las diferencias existentes entre las neuronas y las levaduras. Se trata de sistemas unicelulares mucho más simples que las neuronas, lo que imposibilita estudiar las interacciones entre las células y los efectos sobre la transmisión sináptica. Tampoco existe una respuesta inmune inflamatoria, aunque hay que tener en cuenta que una de las principales consecuencias de la inflamación es el estrés oxidativo y esto sí está conservado en *S. cerevisiae*. Es posible que, de la misma forma que ocurre con el péptido A $\beta$  y la proteína tau, algunas de sus dianas o receptores no estén presentes en la levadura. Esto se puede solventar en cierta medida enfrentando estas proteínas a colecciones de cDNA humano expresadas en *S. cerevisiae*. Las levaduras son microorganismos anaerobios facultativos, lo que implica que no dependen estrictamente de la actividad mitocondrial para crecer a diferencia de las neuronas y es posible que los daños mitocondriales no les afecten en la misma medida. Pueden existir también diferencias en las modificaciones postraduccionales de las proteínas que pueden afectar a su toxicidad o tendencia a formar agregados, como es el caso de la fosforilación de tau. Finalmente el uso de codones, el fondo genético de la levadura o los niveles de expresión de la proteína pueden influir sobre los resultados. Por todo lo anterior, cualquier información obtenida en este tipo de modelos posteriormente debe ser validada en células de mamífero y animales de experimentación.

Aunque prácticamente todos los modelos de la enfermedad de Alzheimer se han desarrollado en *S. cerevisiae*, es posible utilizar otras especies. Por ejemplo, *Schizosaccharomyces pombe* presenta la ventaja de tener una organización del citoesqueleto más similar a la de las células humanas [13], *Pichia pastoris* lleva a cabo modificaciones postraduccionales de las proteínas más parecidas a las humanas [41] y *Kluyveromyces lactis* presenta una mayor dependencia del metabolismo mitocondrial y una menor redundancia de genes porque en la evolución no sufrió una duplicación de su material genético [15].

Estos modelos ya creados pueden seguir utilizándose en un futuro para tratar de extraer más datos de los mismos. Una opción sería enfrentarlos a colecciones de cDNA humano para estudiar posibles proteínas que interaccionan con el péptido A $\beta$  y/o la proteína tau. Otra sería llevar a cabo estudios en la fase estacionaria de crecimiento de la levadura, cuando el metabolismo mitocondrial cobra una mayor importancia. Además se podrían construir nuevos modelos en *S. cerevisiae* u otras especies de levadura para explorar otros aspectos de la enfermedad. Algunos de los más interesantes serían la reconstrucción del procesamiento y transporte intracelular completo de la APP o la co-expresión del péptido A $\beta$  y proteína tau para estudiar su interacción.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se ha comprobado que las aportaciones realizadas por los diferentes modelos existentes de la enfermedad de Alzheimer en *S.cerevisiae* son numerosas y muy relevantes, tanto en relación a los mecanismos moleculares de la enfermedad como en la búsqueda de nuevas dianas y compuestos para su tratamiento. Aunque son más numerosos los estudios realizados en relación con la cascada  $\beta$ -amiloide, los resultados obtenidos de la expresión heteróloga de la proteína tau también son importantes. Estos modelos presentan la ventaja de ser sistemas *in vivo* de tipo eucariótico, en los que muchas de las rutas celulares y proteínas que intervienen en la patogénesis del Alzheimer están conservados. Pese a ello, los resultados obtenidos deben ser verificados en células de mamífero y animales de experimentación debido a las diferencias existentes entre las levaduras y las neuronas. Se trata en cualquier caso de una herramienta reciente, que todavía puede aportar mucha más información.

## REFERENCIAS

1. Chen X, Petranovic D. Amyloid- $\beta$  peptide-induced cytotoxicity and mitochondrial dysfunction in yeast. *FEMS Yeast Res.* 2015;15.
2. Šerý O, Povová J, Mišek I, Pešák L, Janout V. Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. *Folia Neuropathol.* 2013;51:1-9.
3. Ingelsson M, Hyman BT. The Molecular Basis of Alzheimer's Disease. En: Waxman SG. *Molecular Neurology.* 1ª ed. Amsterdam [etc .]: Elsevier Academic Press; 2007. 241-255.
4. Kövari E, Hof PR, Bouras C. The Geneva brain collection. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1225 Suppl 1:E131-46.

5. Pérez Arellano JL. Sinisio de castro. Manual de patología general. 7<sup>a</sup> ed. Barcelona: Elsevier; 2013.
6. D'Angelo F, Vignaud H, Di Martino J, Salin B, Devin A, Cullin C *et al.* A yeast model for amyloid- $\beta$  aggregation exemplifies the role of membrane trafficking and PICALM in cytotoxicity. *Dis Model Mech.* 2013;6:206-16.
7. Moosavi B, Mousavi B, Macreadie IG. Yeast Model of Amyloid- $\beta$  and Tau Aggregation in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2015;47:9-16.
8. Bharadwaj P, Martins R, Macreadie I. Yeast as a model for studying Alzheimer's disease. *FEMS Yeast Res.* 2010;10:961-9.
9. Middendorp O, Ortler C, Neumann U, Paganetti P, Lüthi U, Barberis A. Yeast growth selection system for the identification of cell-active inhibitors of beta-secretase. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1674:29-39.
10. Bharadwaj P, Waddington L, Varghese J, Macreadie IG. A new method to measure cellular toxicity of non-fibrillar and fibrillar Alzheimer's A $\beta$  using yeast. *J Alzheimers Dis.* 2008;13:147-50.
11. De Vos A, Anandhakumar J, Van den Brande J, Verduyck M, Franssens V, Winderickx J *et al.* Yeast as a model system to study tau biology. *Int J Alzheimers Dis.* 2011;2011:428970.
12. Xu W, Tan L, Yu JT. The Role of PICALM in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol.* 2015;52:399-413.
13. Fruhmann G, Seynnaeve D, Zheng J, Ven K, Molenberghs S, Wilms T *et al.* Yeast buddies helping to unravel the complexity of neurodegenerative disorders. *Mech Ageing Dev.* 2017;161:288-305.
14. De Vos A, Bynens T, Rosseels J, Coun C, Ring J, Madeo *et al.* The peptidyl prolyl cis/trans isomerase Pin1/Ess1 inhibits phosphorylation and toxicity of tau in a yeast model for Alzheimer's disease. *AIMS Mol Sci.* 2015;2:144-160.
15. Heinisch JJ, Brandt R. Signaling pathways and posttranslational modifications of tau in Alzheimer's disease: the humanization of yeast cells. *Microb Cell.* 2016;3:135-146.
16. Pimentel C, Batista-Nascimento L, Rodrigues-Pousada C, Menezes RA. Oxidative stress in Alzheimer's and Parkinson's diseases: insights from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:132146.
17. Zhang H, Komano H, Fuller RS, Gandy SE, Frail DE. Proteolytic processing and secretion of human beta-amyloid precursor protein in yeast. Evidence for a yeast secretase activity. *J Biol Chem.* 1994;269:27799-802.
18. Zhang W, Espinoza D, Hines V, Innis M, Mehta P, Miller DL. Characterization of beta-

- amyloid peptide precursor processing by the yeast Yap3 and Mkc7 proteases. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1359:110-22.
19. Murakami-Sekimata A, Sato K, Sato K, Takashima A, Nakano A. O-Mannosylation is required for the solubilization of heterologously expressed human beta-amyloid precursor protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells*. 2009;14:205-15.
20. Lüthi U, Schaerer-Brodbeck C, Tanner S, Middendorp O, Edler K, Barberis A. Human beta-secretase activity in yeast detected by a novel cellular growth selection system. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1620:167-78.
21. Steiner H, Pesold B, Haass C. An in vivo assay for the identification of target proteases which cleave membrane-associated substrates. *FEBS Lett*. 1999;463:245-9.
22. Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C. Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol*. 2003;5:486-8.
23. Edbauer D, Kaether C, Steiner H, Haass C. Co-expression of nicastrin and presenilin rescues a loss of function mutant of APH-1. *J Biol Chem*. 2004;279:37311-5.
24. Futai E, Yagishita S, Ishiura S. Nicastrin is dispensable for gamma-secretase protease activity in the presence of specific presenilin mutations. *J Biol Chem*. 2009;284:13013-22.
25. Yonemura Y, Futai E, Yagishita S, Suo S, Tomita T, Iwatsubo T *et al*. Comparison of presenilin 1 and presenilin 2  $\gamma$ -secretase activities using a yeast reconstitution system. *J Biol Chem*. 2011;286:44569-75.
26. Porzoor A1, Caine JM, Macreadie IG. Pretreatment of chemically-synthesized A $\beta$ 42 affects its biological activity in yeast. *Prion*. 2014;8:404-10.
27. von der Haar T, Jossé L, Wright P, Zenthon J, Tuite MF. Development of a novel yeast cell-based system for studying the aggregation of Alzheimer's disease-associated Abeta peptides in vivo. *Neurodegener Dis*. 2007;4:136-47.
28. Bagriantsev S, Liebman S. Modulation of Abeta42 low-n oligomerization using a novel yeast reporter system. *BMC Biol*. 2006;4:32.
29. Park SK, Ratia K, Ba M, Valencik M, Liebman SW. Inhibition of A $\beta$ 42 oligomerization in yeast by a PICALM ortholog and certain FDA approved drugs. *Microb Cell*. 2016;3:53-64.
30. Park SK, Pegan SD, Mesecar AD, Jungbauer LM, LaDu MJ, Liebman SW. Development and validation of a yeast high-throughput screen for inhibitors of A $\beta$ 42 oligomerization. *Dis Model Mech*. 2011;4:822-31.
31. Nair S, Traini M, Dawes IW, Perrone GG. Genome-wide analysis of *Saccharomyces cerevisiae* identifies cellular processes

- affecting intracellular aggregation of Alzheimer's amyloid- $\beta$ 42: importance of lipid homeostasis. *Mol Biol Cell*. 2014;25:2235-49.
32. Caine J, Sankovich S, Antony H, Waddington L, Macreadie P, Varghese J. Alzheimer's Abeta fused to green fluorescent protein induces growth stress and a heat shock response. *FEMS Yeast Res*. 2007;7:1230-6.
33. Macreadie I, Lotfi-Miri M, Mohotti S, Shapira D, Bennett L, Varghese J. Validation of folate in a convenient yeast assay suited for identification of inhibitors of Alzheimer's amyloid-beta aggregation. *J Alzheimers Dis*. 2008;15:391-6.
34. Treusch S, Hamamichi S, Goodman JL, Matlack KE, Chung CY, Baru V *et al*. Functional links between A $\beta$  toxicity, endocytic trafficking, and Alzheimer's disease risk factors in yeast. *Science*. 2011;334:1241-5.
35. França MB, Lima KC, Eleutherio EC. Oxidative Stress and Amyloid Toxicity: Insights From Yeast. *J Cell Biochem*. 2017;118:1442-1452.
36. Chen X, Bisschops MMM, Agarwal NR, Ji B, Shanmugavel KP, Petranovic D. Interplay of Energetics and ER Stress Exacerbates Alzheimer's Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) Toxicity in Yeast. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:232.
37. Matlack KE, Tardiff DF, Narayan P, Hamamichi S, Caldwell KA, Caldwell GA *et al*. Clioquinol promotes the degradation of metal-dependent amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) oligomers to restore endocytosis and ameliorate A $\beta$  toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:4013-8.
38. Vandebroek T, Vanhelmont T, Terwel D, Borghgraef P, Lemaire K, Snauwaert J *et al*. Identification and isolation of a hyperphosphorylated, conformationally changed intermediate of human protein tau expressed in yeast. *Biochemistry*. 2005;44:11466-75.
39. Vandebroek T, Terwel D, Vanhelmont T, Gysemans M, Van Haesendonck C, Engelborghs Y *et al*. Microtubule binding and clustering of human Tau-4R and Tau-P301L proteins isolated from yeast deficient in orthologues of glycogen synthase kinase-3beta or cdk5. *J Biol Chem*. 2006;281:25388-97.
40. Vanhelmont T, Vandebroek T, De Vos A, Terwel D, Lemaire K, Anandhakumar J *et al*. Serine-409 phosphorylation and oxidative damage define aggregation of human protein tau in yeast. *FEMS Yeast Res*. 2010;10:992-1005.
41. Vogl T, Hartner FS, Glieder A. New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol*. 2013;24:1094-101.