

***Dictyostelium discoideum*, UNA AMEBA PECULIAR**

MARÍA GALARDI-CASTILLA¹ Y LEANDRO SASTRE^{1,2}

¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas (CSIC-UAM)

² Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras

Dirección para la correspondencia: Leandro Sastre. Instituto de Investigaciones Biomédicas (CSIC-UAM). C/ Arturo Duperier, 4. 28029 Madrid. Tel.: 915 854 437. Correo electrónico: lsastre@iib.uam.es.

RESUM

Dictyostelium discoideum és una ameba unicel·lular, encara que també presenta una etapa de desenvolupament multicel·lular en el seu cicle biològic. Aquest organisme ha estat utilitzat com un sistema model des de fa més de quaranta anys a causa de la seva similitud funcional amb les cèl·lules de mamífer. A més, mostra molts avantatges experimentals per a estudis de biologia i bioquímica de la cèl·lula. És genèticament manejable i molt accessible per a la manipulació experimental. Les cèl·lules de *D. discoideum* són molt mòbils i s'han utilitzat àmpliament en estudis del citosquelet cel·lular, la motilitat cel·lular i la migració quimiotàctica. El desenvolupament multicel·lular és relativament simple i ha estat un terreny fèrtil per a l'estudi de l'agregació, la diferenciació cel·lular, la morfogènesi i les vies genètiques i de senyalització que regulen aquests processos. A més, les cèl·lules de *D. discoideum* són cada vegada més utilitzades per a l'estudi de les malalties humanes. Per exemple, la interacció de cèl·lules amb bacteris patògens, el mecanisme d'acció de diferents drogues, la resistència als medicaments o les bases moleculars de les malalties humanes han estat recentment analitzats en aquest organisme model.

Paraules clau: *Dictyostelium*, desenvolupament, diferenciació, motilitat, model de malaltia.

***Dictyostelium discoideum*, A SINGULAR AMOEBA**

SUMMARY

Dictyostelium discoideum is a unicellular amoeba although it also presents a stage of multi-cellular development in its biological cycle. This organism has been used as a model system for over 40 years given its functional similarity to mammalian cells. In addition,

it shows many experimental advantages for biochemical and cell biology studies. It is genetically tractable and highly accessible for experimental manipulation. *D. discoideum* cells are highly motile and have been extensively used in studies of the cellular cytoskeleton, cell motility and chemotactic migration. Multi-cellular development is relatively simple and has been a fertile ground for the study of aggregation, cell differentiation, morphogenesis, and the genetic and signalling pathways that regulate these processes. In addition *D. discoideum* cells are being increasingly used for the study of human disease. For example, cell interaction with bacterial pathogens, the mechanism of action of different drugs, drug resistance or the molecular basis of human diseases have been recently studied using this model organism.

Key words: *Dictyostelium*, development, differentiation, motility, disease models.

INTRODUCCIÓN

Las amebas que pertenecen a la especie *Dictyostelium discoideum* son pequeñas células (10-20 μm de diámetro) que viven en el suelo de los bosques, alimentándose de bacterias. ¿Por qué constituyen estos humildes microorganismos uno de los doce sistemas modelo elegidos por el Instituto de Salud de Estados Unidos (NIH) para estudiar la salud humana? A lo largo de este breve artículo trataremos de ofrecer algunas respuestas a esta pregunta.

Probablemente la principal razón por la que este organismo captó la atención de los científicos fue su ciclo biológico. Como acabamos de mencionar, estas amebas viven en el suelo como individuos aislados, reproduciéndose por división binaria. Sin embargo, estos ambientes son muy variables y sufren notables fluctuaciones, por lo que periódicamente existen fuertes descensos en la población de bacterias. Las amebas del género *Dictyostelium*, y de otros próximos, son capaces de responder a estas situaciones de ayuno de forma muy peculiar. Cientos de miles de amebas se juntan y comienzan un proceso de desarrollo en el que se comportan como un solo organismo, resumido en la figura 1. Este pseudo-organismo, en principio una masa amorfa de células, se transforma en tan solo 24 h

en un cuerpo fructífero formado por un disco basal del que surge un tallo coronado por una pequeña esfera, o *soro*. La mayor parte de las amebas iniciales (aproximadamente el 80 %) quedan dentro del *soro*, donde forman esporas. El resto de las células se sacrifican para formar el disco basal y el tallo, constituidos por células muertas. Las esporas pueden permanecer en este estado de latencia varias semanas, y únicamente germinan, dando lugar a nuevas amebas, cuando las condiciones ambientales son favorables. El comportamiento descrito ha motivado que a estos organismos se les conozca como amebas sociales. El peculiar ciclo biológico llamó fuertemente la atención de varios científicos a partir de los años treinta del anterior siglo, incluyendo a Albert Einstein, que quedó maravillado al ver una película del desarrollo de este organismo a principios de los años cincuenta —se puede encontrar una descripción general del proceso del desarrollo en las revisiones de Thomason *et al.* (1999), Annesley y Fisher (2009) y Maeda (2005).

Sin embargo, la asombrosa singularidad del ciclo biológico no justifica por si mismo el uso de esta ameba como organismo modelo. Existen varias razones de mayor peso. La principal, que sirve de soporte a todas las demás, es la similitud que existe entre estas amebas y nuestras propias células.

las. El genoma de *D. discoideum* fue secuenciado en el año 2005 (Eichinger *et al.*, 2005). Es un genoma compacto que codifica aproximadamente 12.500 proteínas, muchas de ellas con gran similitud con proteínas humanas. Existen 746 dominios funcionales conservados entre humanos y *D. discoideum*, implicados en proliferación, adhesión, motilidad o diferenciación celular, rutas de transducción de señales y procesos básicos como la replicación del DNA, la transcripción o la traducción. A lo largo del capítulo iremos viendo ejemplos concretos de esta conservación funcional de proteínas y procesos celulares.

Haciendo un pequeño inciso cabe indicar que el establecimiento de la secuencia del genoma aportó también datos sólidos sobre la posición evolutiva de estos organismos. La comparación de la secuencia de 5.279 proteínas de *D. discoideum* con las

de otras diecisiete especies permitió establecer que dentro del grupo común de los eucariotas fueron divergiendo, primero, las plantas, luego los dictiostélidos (grupo al que pertenece *D. discoideum*) y finalmente se separaron hongos y animales. Los dictiostélidos constituyen, por lo tanto, un grupo independiente de plantas, hongos y animales, y están igualmente distante de todos ellos desde un punto de vista evolutivo.

La segunda razón que ha favorecido el uso de *D. discoideum* como sistema modelo es la facilidad con la que puede ser cultivado en el laboratorio. Las amebas pueden crecer en placas de agar en las que se ha extendido un lecho de bacterias, habitualmente *Klebsiella aerogenes* o *Escherichia coli*. Al crecer las amebas se van comiendo a las bacterias, originando zonas libres de bacterias, denominadas *placas de lisis*. Esta forma de cultivo permite obtener poblaciones clonales de amebas, puesto que todas las células presentes en una placa de lisis proceden de un única ameba original. Por otro lado, las amebas del centro de cada placa, donde ya se han agotado las bacterias, comienzan el proceso de formación del cuerpo fructífero, pudiéndose observar las estructuras formadas a los 4 o 5 días de cultivo, como se muestra en la figura 2. Además, algunas cepas han sido adaptadas a crecer también en suspensión en medios líquidos de composición muy similar a la de los medios de cultivo de bacterias y levaduras. A estas cepas se las denomina *axénicas* y ofrecen la posibilidad de obtener grandes cantidades de células de forma económica y rápida. Las amebas se duplican cada 3 h creciendo sobre bacterias y cada 10 h en medio líquido. Cuando se crecen las amebas en suspensión también es fácil inducir el proceso de desarrollo retirando el medio nutritivo y resuspendiendo las células en tampones que no contengan

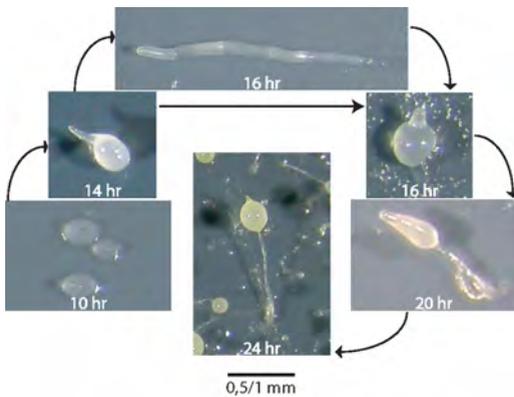


FIGURA 1. Ciclo biológico de *D. discoideum*. Las diferentes estructuras formadas una vez que han agregado las células se muestran de izquierda a derecha, girando en el sentido de las agujas de un reloj. El tiempo necesario para formar cada una de las estructuras está indicado en la parte inferior de cada fotografía. La estructura mostrada en la foto superior, *slug*, puede formarse o no, dependiendo de las condiciones ambientales. El segmento mostrado en la parte inferior corresponde a un tamaño de 1 mm en la fotografía tomada a las 24 h y de 0,5 mm en las demás fotografías.

ningún elemento nutritivo. Las células se extienden sobre placas de agar o filtros de nitrocelulosa para observar las estructuras formadas durante el proceso de desarrollo.

La tercera razón que ha llevado a utilizar *D. discoideum* como sistema modelo es la facilidad que ofrece para la manipulación experimental. El genoma de *D. discoideum* es relativamente pequeño, 33,8 Mb. Este tamaño se sitúa entre los de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (13 Mb) y la mosca *Drosophila melanogaster* (180 Mb), siendo todos ellos mucho menores que el genoma humano (2.917 Mb). La diferencia en el tamaño del genoma no se refleja en el número de genes estimado: 12.500 para *D. discoideum*, 5.538 para *S. cerevisiae*, 13.676 para *D. melanogaster* y unos 30.000 en humanos. Lo que indica es que el genoma de *D. discoideum* es muy compacto, los genes están muy próximos entre sí, las regiones intergénicas son pequeñas (típicamente menores de 2 kb) y los genes tienen pocos intrones (1-2) y de pequeño tamaño (146 pb de

media). En la práctica es más fácil trabajar con los genes de *D. discoideum* que con los de otros organismos, que tienen un genoma mucho más complejo. En este mismo sentido, una ventaja relevante de trabajar con este organismo es que las células son haploides en las fases de crecimiento y desarrollo, lo que facilita mucho la generación de cepas mutantes. La mayor parte de los organismos poseen células diploides durante casi todo su ciclo biológico, siendo haploides únicamente los gametos. En los procesos de mutagénesis de las células diploides se originan heterocigotos, con un alelo mutado y el otro silvestre, siendo necesario realizar cruces para obtener células mutadas en los dos alelos. En el caso de *D. discoideum* solo hay un alelo para cada gen, por lo que la generación de mutantes es directa. Un vez que se ha mutado un gen la célula muestra un fenotipo mutante, sin necesidad de ningún paso adicional. Por esta razón se han desarrollado protocolos rápidos, sencillos y relativamente eficientes para generar mutantes en este organismo. Se puede generar mutantes de genes concretos, previamente seleccionados, por procesos de recombinación homóloga, que ocurre de forma bastante frecuente en *D. discoideum*. También existen protocolos para generar mutantes al azar, bien sea utilizando productos mutagénicos (mutagénesis química) o, mucho más frecuentemente, por inserción al azar de un plásmido. Este método, denominado REMI (*restriction-enzyme mediated integration*) consiste en transformar simultáneamente las células con un plásmido cortado con un enzima de restricción y el propio enzima de restricción. Dentro de la célula el enzima corta el DNA genómico al azar de forma que el plásmido es capaz de introducirse en el hueco generado. Si el sitio en el que cortó el enzima está dentro de la parte codificante o reguladora de un gen se pro-

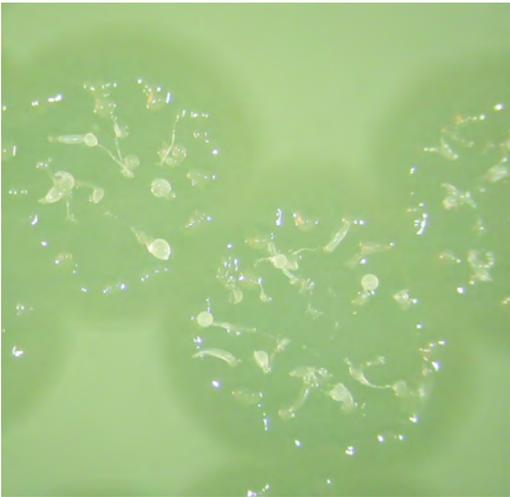


FIGURA 2. Colonias de *D. discoideum* creciendo sobre un césped de bacterias. En el interior de las placas de lisis pueden observarse cuerpos fructíferos en distintas fases de desarrollo.

duce una cepa mutante que expresa una proteína truncada o que no la expresa en absoluto. La ventaja del procedimiento de inserción del plásmido sobre otras formas de mutagénesis es que es mucho más fácil identificar el gen mutado y caracterizar la mutación producida.

Los métodos de introducción de material genético en las células de *D. discoideum* (transfección) también están bien desarrollados. Las células pueden ser transfectadas fácilmente, por ejemplo, por electroporación. Además se han desarrollado numerosos vectores plasmídicos que permiten la expresión de los genes transfectados. Se dispone de promotores que permiten dirigir la expresión de estos genes tanto en el tiempo (de forma constitutiva o regulable) como en el espacio (determinadas fases del proceso de desarrollo y distintas regiones de las estructuras, como veremos más adelante). Estos vectores permiten expresar proteínas de *D. discoideum* o de otros organismos para estudiar su función. También se pueden utilizar para llevar a cabo experimentos de complementación de mutantes o de búsqueda de genes supresores de mutaciones. Otra utilidad de estos vectores es la expresión de RNA interferentes que permitan silenciar la expresión de algún gen determinado, entre otras muchas aplicaciones.

Las técnicas de biología celular y bioquímica también están bien desarrolladas en *D. discoideum*. Se han puesto a punto protocolos de microscopía óptica y electrónica e inmunohistoquímica que permiten la identificación y tinción de estructuras celulares. Existen marcadores de orgánulos celulares y anticuerpos específicos de bastantes proteínas. También se han desarrollado técnicas para el aislamiento de componentes celulares y la purificación de proteínas. En los últimos años se han puesto a punto también los análisis de proteómica. El acce-

so a todos estos protocolos y reactivos, incluyendo vectores y secuencias de DNA, está muy bien organizado a través de un banco de datos denominado DictyBase (<http://dictybase.org>), que ofrece un servicio inapreciable a la comunidad de científicos que trabajan con este organismo.

La última ventaja que queremos mencionar es la variedad de procesos biológicos que se pueden estudiar usando *D. discoideum* como modelo. En este organismo pueden realizarse, por ejemplo, estudios de proliferación, motilidad celular, quimiotaxis, fagocitosis, adhesión celular, determinación celular, diferenciación, morfogénesis, así como de rutas de señalización celular y regulación transcripcional implicadas en estos procesos. En los próximos apartados describiremos algunos ejemplos del uso de *D. discoideum* en el estudio de algunos de estos procesos. Mencionaremos también ejemplos de posibles aplicaciones al estudio de las bases moleculares de procesos patológicos humanos.

UTILIZACIÓN DE *Dictyostelium discoideum* COMO SISTEMA MODELO EN INVESTIGACIÓN BÁSICA

Motilidad celular y quimiotaxis

Una de las características que más diferencian a *D. discoideum* de otros modelos eucariotas sencillos, como pueden ser las levaduras, es su capacidad de movimiento. Las amebas de *D. discoideum* están en continuo movimiento. Durante la fase de crecimiento se mueven para buscar bacterias, a las que ingieren a través de un proceso de fagocitosis. En condiciones de ayuno las células necesitan moverse para reunirse y formar agregados. Además, las células continúan moviéndose dentro de los agre-

gados y esta movilidad es necesaria para la formación del cuerpo fructífero, como veremos más adelante. En todos estos casos la dirección del movimiento está regulada por procesos de quimiotaxis. Es decir, las células se mueven hacia los lugares donde se está segregando un determinado compuesto químico. Podríamos decir que se orientan por el olfato. Cuando buscan alimento el compuesto que las guía es ácido fólico, que es segregado por las bacterias. Durante el proceso de agregación el compuesto es AMP cíclico (cAMP), que es segregado por algunas células que sirven de promotoras del proceso de agregación, atrayendo a las demás.

La motilidad celular y la quimiotaxis también son procesos básicos en el desarrollo embrionario y en el funcionamiento de algunas células humanas. El paralelismo más evidente es la similitud que existe entre la captura y fagocitosis de las bacterias invasoras por los macrófagos de nuestro sistema inmunitario y el proceso de alimentación de *D. discoideum*. Los macrófagos también localizan y persiguen a las bacterias por quimiotaxis. Durante el proceso de desarrollo embrionario existen también muchas etapas en las que las células migran de una región del embrión a otra. Posiblemente el ejemplo más temprano y de mayor trascendencia sea la migración de las células del mesodermo durante el proceso de gastrulación. Las células mesodérmicas se originan en la parte central del embrión y migran por debajo de las células ectodérmicas, ocupando toda la superficie embrionaria y generando el mesodermo. Otro ejemplo muy llamativo es la migración de las células de la cresta neural. Estas células se originan en la parte dorsal del embrión, en la parte posterior de lo que será nuestra columna vertebral, y migran hacia la parte ventral, diseminándose por todo el embrión. Las

células derivadas de la cresta neural dan origen a estructuras muy importantes del embrión; por ejemplo, gran parte de la cara, parte del corazón o la totalidad de las células pigmentadas de la piel, los melanocitos. Muchos de estos procesos de migración celular que tienen lugar durante el desarrollo también están dirigidos por quimiotaxis hacia sustancias segregadas en determinadas zonas del embrión.

Los estudios de motilidad celular realizados en *D. discoideum* han sido, y siguen siendo, pioneros en este área de investigación —véase, por ejemplo las revisiones de Bozzaro *et al.* (2004) y King e Insall (2009). Muchos de los trabajos se han centrado en el proceso de agregación inducido por ayuno, que vamos a describir brevemente. Cuando las células de *D. discoideum* se encuentran en condiciones de ayuno comienzan un proceso de cambio en el programa de expresión génica. Dejan de expresar genes necesarios para proliferar y empiezan a expresar otros necesarios para la formación del cuerpo fructífero. Entre los primeros genes de diferenciación que se expresan están los necesarios para sintetizar cAMP y para segregarlo fuera de la célula. Este proceso no ocurre de forma simultánea en todas las células y algunas empiezan a segregarlo antes que las demás. Cada una de estas células se convierte en un centro de agregación hacia donde van a migrar las células que se encuentran en las proximidades, atraídas por el cAMP. La cantidad de cAMP segregado por estas células es muy pequeña pero la señal puede llegar a células situadas a varios milímetros porque existe un proceso de amplificación. La presencia de cAMP extracelular es detectada por las células a través de su unión a unos receptores específicos, y se inicia una cadena de transducción de señales dentro de la célula que pone en marcha varias respuestas. Una

de ellas es la producción y secreción de nuevo cAMP, amplificando la señal. Otra es la inducción del movimiento celular, como veremos más adelante. La tercera respuesta, que tarda más en manifestarse, es la inducción del proceso de adaptación al cAMP. Cuando una célula lleva varios segundos en presencia de cAMP deja de responder a este estímulo hasta unos minutos después (periodo refractario). Este efecto es muy importante para que la señal se transmita de forma centrífuga, es decir, desde el centro de agregación hacia las regiones más alejadas. Imaginemos que una primera célula emite cAMP y les llega la señal a las células vecinas. Estas emiten más cAMP, pero, gracias a la adaptación, la primera célula emisora ya no responde al cAMP. Únicamente responden las células que están al lado opuesto de la primera célula, transmitiendo la señal de dentro hacia fuera; de la primera célula a la segunda, de esta a la tercera y así sucesivamente, como una onda de las que se forman al tirar una piedra al agua. Esta señalización es, además, periódica. Aproximadamente 7 min después de emitir la primera señal de cAMP la primera célula es capaz de volver a segregar el compuesto, empezando una nueva onda de señalización. De esta forma se originan una serie de ondas de señalización durante unas 4 h.

¿Por qué se mueven las células hacia los centros de agregación al recibir estas señales? La respuesta fenomenológica es sencilla. Imaginemos una célula aislada hacia la que avanza la onda de cAMP. La región de la célula donde antes se detecta el cAMP se convierte en el frente de avance. Allí se forma un pseudópodo que se extiende hacia la onda de cAMP, se fija en el sustrato y al contraerse arrastra a la célula en esa dirección. Cuando pasa la onda de cAMP la célula pierde la orientación, pero al llegar la siguiente onda vuelve a avanzar otro poco

en la misma dirección. Este proceso continúa, onda tras onda, hasta que las células convergen en el centro de agregación.

Desentrañar los mecanismos por los que ocurre este proceso esta llevando años de trabajo a varios de los mejores grupos que trabajan en este sistema. La capacidad de manipulación genética de *D. discoideum* ha sido de gran ayuda en este desafío. Uno de los abordajes más productivos ha sido generar de forma aleatoria miles de mutantes y seleccionar aquellos que no son capaces de formar agregados. La selección puede hacerse observando los clones de células creciendo sobre bacterias, puesto que las células que no agregan no forman ningún tipo de estructuras. La falta de agregación puede deberse a alteraciones en diversos procesos. Por ejemplo, puede ser que las células no produzcan cAMP o no sean capaces de detectar el cAMP extracelular y, por lo tanto, no generen o no reciban la señal de agregar. Pero también existen otros mutantes que generan y detectan las señales pero no son capaces de moverse en respuesta a las mismas. El estudio de este tipo de mutantes ha generado muchísima información sobre la quimiotaxis y, en general, la motilidad celular.

Las ondas de cAMP no suponen situaciones de todo o nada sino que la concentración del compuesto va aumentando al aproximarse la onda, llega a un máximo y luego vuelve a descender. Es decir, se originan gradientes de concentración de cAMP tanto en el espacio, a lo largo de la longitud de la célula, como en el tiempo. La célula responde a estos gradientes polarizándose, estableciendo una región anterior, que es la primera que detecta el aumento en los niveles de cAMP y la que está en presencia de niveles más altos de este compuesto hasta la llegada del pico de la onda, y una posterior. El extremo posterior es el que detecta más tarde el aumento de

nivel de cAMP y que está en presencia de niveles menores hasta el paso del pico. Las células son capaces de detectar gradientes muy pequeños con diferencias de hasta un 2 % de concentración de cAMP entre la parte anterior y la posterior. Aún es un enigma cómo puede hacerlo.

Se conoce algo más de las características de las regiones anterior y posterior. En la región anterior la unión de cAMP a sus receptores activa una serie de rutas de señalización, como indicamos anteriormente. Se han caracterizado algunas que activan la polimerización de actina en esta región, lo que lleva a la formación del pseudópodo. Por ejemplo, la activación del receptor de cAMP produce la disociación de proteínas G heterotriméricas, liberando las subunidades γ , que a su vez activan otras proteínas. Una de ellas es una quinasa que fosforila el fosfolípido PIP2, para dar lugar a la forma PIP3. Este compuesto se acumula en la cara interna de la membrana celular, en la parte anterior de la célula, donde sirve de punto de anclaje a una serie de proteínas que contienen el dominio PH (*pleckstrin homology*); entre ellas se encuentran algunas que inducen la polimerización de actina. Otras proteínas que se activan en la parte anterior de la célula y que favorecen la formación de pseudópodos son la fosfolipasa A2 y la proteína quinasa TORC2, pero su papel en el proceso es poco conocido.

Mientras en la región anterior se favorece la formación de un pseudópodo, en la región posterior se desencadena el proceso contrario. La unión de cAMP a su receptor en la región anterior también induce la activación del enzima guanilato ciclasa, que sintetiza GMP cíclico (cGMP). Este compuesto difunde por la célula y en la región posterior induce la polimerización de miosina en la zona subyacente a la membrana celular. La capa de miosina impide la for-

mación de pseudópodos en las zonas posteriores y laterales de la célula, que la conducirían en otras direcciones, además de favorecer la contracción de la región posterior, potenciando el avance de la célula hacia el gradiente. Estas rutas se describen con mucho mayor detalle en dos revisiones recientes: Dormann y Weijer, (2006) y King e Insall (2009). Hay que indicar que posteriormente se ha demostrado que las rutas de señalización y los mecanismos de motilidad celular identificados en *D. discoideum* son importantes también en la movilidad de células animales como los neutrófilos.

Análisis de la diferenciación celular y el desarrollo

Conocer como se forma un ser vivo a partir de una célula es uno de los temas más fascinantes que ha ocupado a los científicos en el último siglo. Se intenta comprender como se forman los distintos tipos celulares y como se organizan para formar tejidos, órganos y aparatos. En gran medida seguimos sin tener respuestas satisfactorias a estas preguntas debido, fundamentalmente, a la complejidad del proceso. En el desarrollo embrionario hay que conjugar procesos de proliferación celular, migración, adhesión de unas células con otras y con el sustrato, diferenciación de tipos celulares y muerte celular. Todos estos procesos tienen que estar coordinados en el tiempo y en el espacio para llegar a formar estructuras ordenadas en el lugar y momentos precisos. Por este motivo los estudios de desarrollo son enormemente difíciles en animales. Se forman más de un centenar de tipos celulares distintos, que involucran a miles de millones de células que forman estructuras muy complejas.

D. discoideum aporta una sencillez mucho mayor para realizar estos estudios.

Solo se forman dos tipos básicos de células diferentes, las que forman las estructuras de soporte, a las que se denomina genéricamente *células tallo*, y las esporas. El número de células implicado también es mucho menor, unas 100.000, y la estructura formada relativamente sencilla. Sin embargo, los procesos básicos utilizados son los mismos descritos para los embriones de mamíferos. La necesidad de coordinación entre estos procesos para formar estructuras finales proporcionadas y del tamaño adecuado también es similar. La mayor diferencia está en el proceso de proliferación celular. Los embriones animales proceden de una única célula que se va dividiendo y proliferando de forma simultánea a los procesos de diferenciación y desarrollo. En el caso de *D. discoideum* el proceso comienza por la agregación de muchas células diferentes que prácticamente dejan de dividirse, por lo que diferenciación y morfogénesis ocurren en ausencia de proliferación celular. Por otro lado, los estudios en *D. discoideum* permiten utilizar las mismas armas genéticas y bioquímicas que mencionamos anteriormente para el estudio de la migración celular.

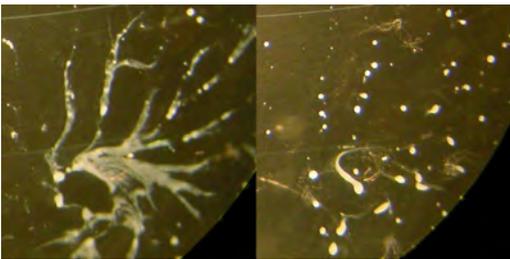


FIGURA 3. Formación de agregados celulares. En la fotografía de la izquierda puede observarse las hileras de células que van migrando hacia el centro de agregación, situado en la región izquierda, al mismo tiempo que se van uniendo unas con otras. La fotografía de la derecha muestra el mismo campo unas horas después, cuando los haces de células se fragmentan formando agregados.

A continuación explicaremos brevemente como continúa la formación del cuerpo fructífero, una vez que se han agregado las células, para dar una idea de las aportaciones que pueden hacerse utilizando este sistema. Como indicamos anteriormente, cuando las células han agotado el alimento comienzan a agregarse. A lo largo del proceso las células se van uniendo entre sí, formando corrientes de células (conocidas como *streams*), que van confluyendo en el centro emisor de cAMP para formar agregados (*mounds*) (véase la figura 3). Las células del agregado segregan una matriz extracelular que contiene al agregado y lo aísla del exterior. El siguiente paso es la especificación de parte de las células para iniciar el proceso de diferenciación a células del tallo (células pretallo), mientras que el resto comienza el proceso de diferenciación a esporas (células preespora). No se conoce por qué eligen rutas diferentes, aunque se piensa que depende de la fase del ciclo celular en que se encuentran las células al comenzar el proceso de agregación. La especificación de estos dos tipos celulares no es definitiva y pueden cambiar de uno a otro tipo en etapas posteriores del desarrollo siguiendo programas homeostáticos dirigidos a mantener siempre la misma proporción de células tallo (20 %) y esporas (80 %). Las células pretallo y preespora se pueden identificar porque expresan genes específicos de cada tipo celular. Por ejemplo, las células pretallo expresan genes que codifican proteínas de la matriz extracelular, tales como *EcmA* y *B* (*Ecm*: *extracellular matrix*). Las células preespora expresan genes que codifican proteínas componentes de la cubierta de la espora, tales como *scpA*, *B*, *C* o *D* (*scp*: *spore coat protein*) o *psaA* (*prespore gene A*). La expresión de estos genes se puede visualizar fácilmente usando genes reporteros. Para ello se construyen vectores plasmídicos en los que se

sitúa el promotor del gen que se quiere seguir (por ejemplo, *ecmB* o *psaA*) controlando la expresión de un gen fácilmente detectable (gen reportero). Se suele usar como reportero el gen *lacZ*, que codifica β -galactosidasa. Las células de *D. discoideum* no poseen este gen. Por tanto, toda la actividad que podamos detectar proviene del gen *lacZ* transfectado en las células. La actividad β -galactosidasa se detecta fácilmente suministrando a las células un sustrato del enzima (X-Gal) que forma un precipitado azul al ser hidrolizado. Lo más importante de esta técnica es que únicamente las células que expresan el gen que estamos estudiando, cuyo promotor hemos incorporado al vector, expresan β -galactosidasa y únicamente ellas se tiñen de azul. Por ejemplo, si utilizamos un promotor de un gen pretallo (*ecmB*) se ponen azules las células pretallo, y si utilizamos un promotor de un gen específico de células preespora (*psaA*) serán estas las que se pongan azules (véase la figura 4).

Utilizando esta técnica se ha podido ver que las células pretallo y preespora se diferencian independientemente unas de otras y aparecen distribuidas al azar en los agregados, entremezcladas. Las células en el agregado continúan moviéndose en círculos pero, poco a poco, las células pretallo van uniéndose entre sí y migrando hacia la parte central y superior del agregado. Al acumularse las células pretallo se forma, en esta zona, una pequeña prominencia, que se denomina *tip*, mientras que las células preespora quedan en la región inferior (véase las figuras 4a y b). Esta estructura va alargándose progresivamente hacia arriba adquiriendo una forma de dedo, por lo que se le llama *finger*, aunque sigue dividida en las dos mismas zonas (véase las figuras 4c y d).

La estructura en la fase de *finger* puede dar lugar a una forma migratoria. En este

caso el *finger* se tumba en el sustrato y comienza a moverse como si fuera una pequeña babosa, por lo que se le denomina *slug*. En esta estructura una parte de las células pretallo ocupan la parte anterior, que encabeza el movimiento, y las células preespora la parte posterior (véase las figuras 4e y f). El movimiento de los *slugs* está dirigido por fototaxis y termotaxis, de forma que se dirige hacia la luz y hacia temperaturas más elevadas, lo cual les permite migrar hacia las capas superiores de los suelos forestales, quedando los cuerpos fructíferos expuestos al exterior para favorecer la dispersión de las esporas. Es interesante tener en cuenta que el *slug* está constituido por células independientes que se mueven continuamente en su interior, a pesar de lo cual se comporta como un seudoorganismo, por lo que esta estructura sigue siendo objeto de numerosos estudios.

Una vez que el *slug* llega a un lugar idóneo para continuar el desarrollo vuelve a la posición erecta, típica de *finger*, con las células pretallo en la parte superior (véase la figura 4g). Comienza entonces la fase de formación del cuerpo fructífero, conocida como culminación. Algunas células pretallo migran hacia el sustrato, a través de la masa de células preespora dirigiéndose hacia un grupo de células pretallo que formarán el pie de la estructura (véase la figura 4h). Una vez iniciado, el proceso es continuo, de forma que casi todas las células pretallo van incorporándose progresivamente y se forma una columna de células apoyadas en el sustrato. Estas células se van diferenciando según se incorporan a la columna, se alargan verticalmente, segregan una capa rígida de celulosa y, finalmente, mueren. La elongación del tallo va elevando la masa de células preespora (véase las figuras 4i, j y k), mantenidas en la parte superior del tallo por unas estructuras de soporte, como pequeñas copas,

formadas por células pretallo, y que se sitúan por encima y debajo de la masa de cé-

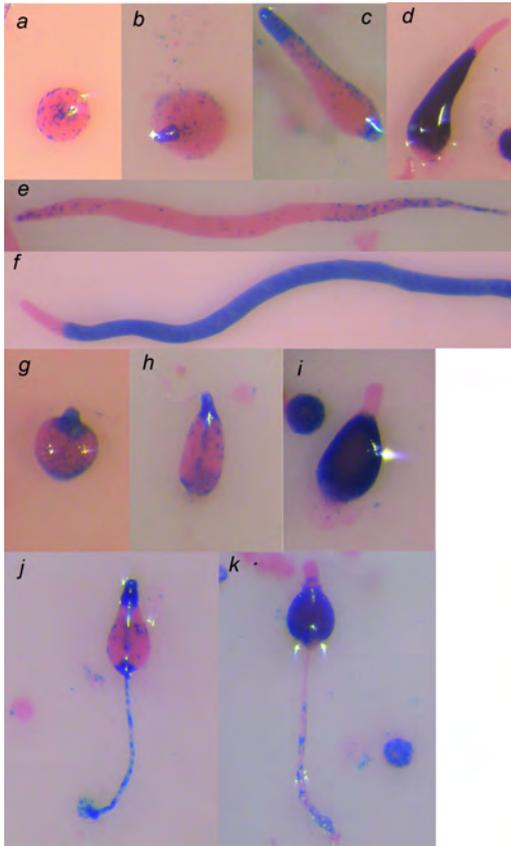


FIGURA 4. Evolución de las poblaciones de células pretallo y preespora a lo largo del proceso de desarrollo. En las distintas fotografías se muestra la localización de los dos grupos de células a lo largo del desarrollo. En un caso se muestran estructuras derivadas de células que expresan el gen *lacZ* bajo el control del promotor del gen *ecmB*, específico de células pretallo (paneles a, b, c, e, g, h, j). El resto de las estructuras provienen de células que expresan el gen *lacZ* bajo el control del promotor del gen *psaA*, específico de células preespora (paneles d, f, i, k). La expresión de *lacZ* se detecta por la formación de un precipitado azul al hidrolizarse el sustrato X-Gal. Posteriormente las estructuras se han teñido con eosina para facilitar la visualización de las células que no expresan *lacZ*. Se muestran estructuras correspondiente a los estados de agregados (a, b), *finger* (c, d), *slug* (e, f), inicio de la culminación (g, h, i) y culminación avanzada (j, k).

lulas preespora (por ello estas estructuras son denominadas *upper cup* y *lower cup*) (véase la figura 4j). Una vez formado el tallo las células preespora se diferencian a esporas. El proceso de diferenciación supone la síntesis de una cubierta exterior, formada por celulosa y proteínas, que es impermeable, que aísla a las esporas del exterior. Las esporas sufren además un proceso de desecación y entran en una fase de letargo, con escasa actividad metabólica, en la que pueden permanecer varias semanas. Las esporas pueden ser dispersadas por el viento o arrastradas por distintos animales, diseminándose por el medio ambiente. En el caso de que caigan en un lugar adecuado germinan, comenzando un nuevo ciclo biológico.

El proceso de desarrollo se ha podido analizar molecularmente y se han identificado múltiples genes necesarios para sus distintas etapas. Se han identificado, por ejemplo, mutantes deficientes en la formación del tallo o de las esporas, cepas que no forman *slugs* u otras en las que estos migran indefinidamente. Existen también cepas que tienen alterada la duración del proceso. La duración habitual es de 24 h pero hay cepas que realizan el proceso en varias horas menos y otras que llegan a tardar hasta 48 h. La caracterización de estos mutantes está permitiendo estudiar los mecanismos que regulan el proceso de desarrollo. A ello también está contribuyendo el uso de métodos de análisis masivos de niveles de expresión génica (microchips de DNA), que permiten conocer los genes que se inducen o reprimen en cada etapa del desarrollo y en los distintos mutantes generados.

En los últimos años se ha progresado en el estudio de diversos aspectos del proceso de desarrollo —revisado recientemente por Siu *et al.* (2004), Maeda (2005), Strmecik *et al.* (2005) y Williams (2006). Por poner

algunos ejemplos hablaremos brevemente sobre los procesos de comunicación intercelular que coordinan el desarrollo. El primer ejemplo está relacionado con la regulación del tamaño de los agregados y, por lo tanto, del cuerpo fructífero. ¿Por qué no se forman agregados de más de 100.000 células ni siquiera cuando los cultivos son muy densos? Se ha observado que al principio del proceso de agregación las células segregan proteínas que limitan el tamaño de los agregados. Se las denomina *factor contador de células (cell-counting factor)*. Este factor se va acumulando en el medio en cantidad proporcional al número de células presentes. Cuando la concentración es elevada se une a las células disminuyendo su capacidad de adhesión y aumentando su motilidad. De esta manera desestabiliza los *streams* haciendo que si hay muchas células se rompan en varios trozos, formando varios agregados, más pequeños, en lugar de uno solo (véase la figura 3).

También existen mecanismos para coordinar la diferenciación de las células del tallo y las esporas. En general, se trata de mecanismos de regulación recíproca mediados por sustancias segregadas por un tipo celular y que actúan sobre el otro tipo. Una de estas sustancias es DIF-1 (*differentiation inducing factor 1*), que es segregado por las células preespora al principio del proceso de culminación y que induce la diferenciación de las células del tallo. El proceso recíproco ocurre al final del proceso de culminación y el comienzo de la diferenciación de las esporas. Es conveniente que las esporas no se diferencien antes de que el soro que las contiene haya sido elevado del sustrato por el tallo. El proceso se coordina porque el tallo produce factores peptídicos tales como SDF-1 y SDF-2 (*spore differentiation factors*), que induce la diferenciación de las esporas.

UTILIZACIÓN DE *Dictyostelium discoideum* COMO SISTEMA MODELO EN INVESTIGACIÓN APLICADA

En este apartado mencionaremos algunos ejemplos de campos de investigación aplicada a problemas sanitarios en los que se ha utilizado *D. discoideum*, sin mayor pretensión que dar una visión general de los trabajos realizados. En cada apartado se hace referencia a revisiones recientes en las que se aporta información mucho más detallada del tema específico.

Estudio de la interacción huésped-patógeno

Como hemos mencionado en varias ocasiones, *D. discoideum* vive alimentándose de bacterias. Normalmente las bacterias ingeridas quedan englobadas en fagosomas a los que se fusionan lisosomas, que aportan enzimas capaces de digerirlas para, a continuación, poder absorber los nutrientes generados. Sin embargo, algunas bacterias han desarrollado mecanismos de defensa para sobrevivir a estos ataques. Algunas veces segregan sustancias que matan a la célula predatora. En otras ocasiones son fagocitadas pero logran evitar ser destruidas en el fagosoma e incluso consiguen crear aquí las condiciones adecuadas para reproducirse, convirtiendo al predator en una célula portadora. Esta situación no solo se da en los ecosistemas de suelos forestales sino que es la base de algunas enfermedades infecciosas que nos afectan a los humanos. Quizás uno de los ejemplos más conocidos sean las infecciones por *Legionella pneumophila*, que causa la enfermedad de los legionarios. Esta bacteria crece en asociación con amebas, frecuentemente *Hartmannella vermiformes* o

Acanthamoeba castellani, en ambientes acuosos (por ejemplo, hace pocos años se localizó un brote en torres de refrigeración de hospitales españoles). Las bacterias se reproducen dentro de las amebas pero, si son inhaladas por algún ser humano y son fagocitadas por macrófagos alveolares, también pueden reproducirse dentro de estas células de nuestro sistema inmunitario, causando la correspondiente neumonía.

El hecho de que la ingestión de una bacteria por una célula fagocítica conduzca a la muerte de la bacteria o no, depende de una serie compleja de reacciones, que es lo que se conoce como interacción huésped-patógeno. En los casos estudiados los mecanismos puestos en marcha cuando la bacteria es ingerida por un macrófago humano o por *D. discoideum* son similares. Estas observaciones han motivado una utilización creciente de *D. discoideum* para estudiar las respuestas inducidas por bacterias que provocan enfermedades humanas. Entre ellas tenemos *Mycobacterium tuberculosis* (causante de la tuberculosis), *Salmonella typhimurium* (salmonelosis), *Pseudomonas aeruginosa* (infecciones nosocomiales en pacientes quemados, con fibrosis quística o inmunodeprimidos), *Yersinia pseudotuberculosis* (enfermedades gastrointestinales, placas bubónicas) o *Neisseria meningitidis* (sepsis, meningitis).

El ensayo más sencillo para el que se ha empleado *D. discoideum* consiste en determinar la patogenicidad de las cepas bacterianas. *D. discoideum* puede crecer en placas de cultivo sobre bacterias, como se ha mencionado anteriormente, y el crecimiento se puede observar y cuantificar muy fácilmente por la aparición de placas de lisis. Si las bacterias son patógenas y matan a la célula que las ingiere o crecen en su interior no aparecen placas de lisis. Por lo tanto un ensayo sencillo para ver si una cepa aislada, por ejemplo, en una muestra hos-

pitalaria, es patógena o no, consiste en utilizarla de sustrato para hacer crecer *D. discoideum*. En estos ensayos se ha observado muy buena correlación entre la patogenicidad observada en humanos y en *D. discoideum*.

Sin embargo, la mayor parte de los estudios realizados se han basado en la capacidad de manipulación experimental de *D. discoideum* y en su versatilidad para experimentos de biología celular. Se han obtenido resultados interesantes sobre los mecanismos por los que las bacterias matan a las células huésped caracterizando mutantes de *D. discoideum* que son resistentes a la infección. En algunos casos se han aislado cepas resistentes analizando miles de mutantes generados al azar. La identificación del gen mutado ha permitido iniciar el estudio de nuevos mecanismos de interacción huésped-patógeno. En otros casos se ha utilizado *D. discoideum* para profundizar en el estudio de genes que ya se sospechaba que eran importantes en los mecanismos de patogenicidad. Disponer de cepas mutantes para estos genes permite realizar estudios adicionales y ofrece un modelo experimental para la búsqueda de nuevos tratamientos. La posibilidad de expresar proteínas bacterianas en *D. discoideum*, bien sean silvestres o mutantes, también es muy conveniente para estudiar su función y su posible interacción con proteínas del huésped. Por último, el desarrollo de técnicas de expresión y localización de proteínas en *D. discoideum* y el desarrollo de marcadores de las distintas estructuras celulares está permitiendo estudiar en detalle el proceso de fagocitosis de las bacterias y su evolución dentro de la célula. Este seguimiento se puede realizar en células no modificadas o tras la mutación o sobreexpresión de genes de interés, de manera que se facilita mucho su estudio funcional.

Estos trabajos han sido revisados recientemente por Fajardo *et al.* (2004), Steinert y Heuner (2005), Cosson y Soldati (2008) y Clarke (2010).

Estudio de mecanismos de respuesta y de resistencia a fármacos antitumorales

La resistencia a los fármacos empleados en terapia es uno de los principales problemas que se encuentran en el tratamiento de muchos tumores. Hay determinados tipos de tumores, y pacientes, que no responden a algunas drogas anticancerígenas. En otros muchos casos los tumores responden favorablemente durante un tiempo pero desarrollan mecanismos de resistencia y vuelven a crecer incontroladamente. Dado que el número de fármacos que existe para luchar contra el cáncer es escaso, especialmente para algunos tipos de tumores, es muy importante tratar de superar los mecanismos de resistencia. Para ello es necesario conocer lo mejor posible el mecanismo de acción de los fármacos, la respuesta de la célula ante la administración de los mismos y los mecanismos de resistencia que se inducen en la célula.

D. discoideum ha sido utilizado en algunos de estos estudios. El primer ejemplo que queremos mencionar son los estudios realizados sobre los mecanismos de resistencia al cisplatino. Este compuesto es una de las drogas más utilizadas para el tratamiento de tumores sólidos, siendo frecuentes los casos de desarrollo de resistencia. Las células de *D. discoideum* son sensibles al cisplatino, por lo que fueron utilizadas en un ensayo de mutagénesis al azar, seleccionando células que fueran más resistentes a la droga. Se identificaron siete genes implicados en la respuesta al cisplatino que al ser mutados conferirían mayor resistencia a las células. Ninguno de ellos había

sido identificado anteriormente en estudios de resistencia de células tumorales al cisplatino. Uno de ellos, que codifica la enzima esfingosina-1-fosfato liasa, ha sido estudiado en detalle en *D. discoideum*. Los resultados obtenidos han permitido conocer la importancia de las rutas de señalización mediadas por esfingolípidos y ceramidas en la muerte celular inducida por cisplatino, así como en el establecimiento de rutas de resistencia a este fármaco. La importancia de esta ruta ha sido confirmada posteriormente en células tumorales humanas. Estos trabajos han sido revisados recientemente (Alexander *et al.*, 2006).

D. discoideum ha sido empleado también para estudiar la respuesta celular al tratamiento con cisplatino (Driessche *et al.*, 2007). En estos estudios se tratan las células con cisplatino y, a continuación, se comparan los genes expresados en las células antes y después del tratamiento. En este caso se comparó la expresión de 5.669 genes por técnicas de microchips y se encontró que había unos 400 que variaban su nivel de expresión al tratar a las células con cisplatino. Entre estos genes se espera que haya algunos importantes para determinar la sensibilidad a la droga. El estudio más detallado de alguno de ellos se puede realizar generando cepas mutantes, aprovechando la capacidad de recombinación homóloga que tienen las células de *D. discoideum*.

Un tercer procedimiento experimental que se ha utilizado en *D. discoideum* para estudiar el mecanismo de acción de algunas drogas es mediante la sobreexpresión de proteínas. El fundamento del método es pensar que si una droga actúa uniéndose a una proteína podría interferirse su acción sobreexpresando la proteína, que actuaría como una especie de trampa para la droga, provocando cierta resistencia a la misma. En estos experimentos se transfecta una

población grande de células con una colección de vectores que expresan la mayor parte de las proteínas de *D. discoideum*. Cada célula puede incorporar, idealmente, un vector de la colección y, por tanto, expresar una proteína diferente. La colección de células transfectadas se incubó a continuación con la droga para seleccionar las células resistentes. Posteriormente se identifica la proteína que resultó sobreexpresada y se caracteriza su capacidad para inducir resistencia y los mecanismos moleculares implicados. Este abordaje ha sido empleado, por ejemplo, para identificar la proteína con la que interaccionan los aminobifosfonatos, utilizados en el tratamiento de enfermedades que causan reabsorción ósea (Sugden *et al.*, 2005).

D. discoideum también ha sido empleado para estudiar el mecanismo de acción de fármacos utilizados para el tratamiento de enfermedades no oncológicas. Es, por ejemplo, el caso del ácido valproico y el litio, empleados en enfermedades psiquiátricas tales como el trastorno bipolar. Para estudiar el mecanismo de acción del litio se generó una colección de mutantes y se aislaron células resistentes. Una de ellas tenía mutado el gen que codifica una enzima, la prolil oligopeptidasa, asociada con enfermedades psiquiátricas. El estudio de estos mutantes permitió establecer que esta enzima es clave para regular los niveles de inositol(1,4,5)-trifosfato (PIP3) (King *et al.*, 2009). Estos estudios llevaron a proponer que el litio produce un descenso en los niveles de este compuesto. Posteriormente se pudo observar que el ácido valproico también disminuye los niveles de PIP3, tanto en *D. discoideum* como en neuronas humanas. En base a estos resultados se ha utilizado posteriormente *D. discoideum* para ensayar el efecto de compuestos derivados del ácido valproico, buscando fármacos con menores efectos secundarios. Por otro

lado, *D. discoideum* se ha utilizado para estudiar el mecanismo por el que el ácido valproico activa la proteína quinasa Erk-2, reacción importante para el efecto neuroprotector de este compuesto. Los experimentos realizados en *D. discoideum*, utilizando diversos abordajes genéticos, permitieron determinar que el ácido valproico altera la ruta de señalización por cAMP a través de la proteína quinasa A y que esta ruta activa Erk-2. Estudios complementarios permitieron determinar que el litio también aumenta la actividad de Erk-2, en este caso por inhibición de la glucógeno sintetasa quinasa A. Este efecto también se ha observado en el cerebro de ratas tratadas con litio, respaldando el uso de *D. discoideum* como sistema modelo para estudiar el mecanismo de acción de estas drogas. Estos estudios han sido revisados recientemente (Williams *et al.*, 2006).

Estudio de enfermedades hereditarias humanas

Cada día se conocen más enfermedades hereditarias causadas por mutaciones en un único gen. Generalmente aparecen con una frecuencia muy baja en la población, por lo que se las incluye en el grupo de enfermedades raras. Hasta el presente se han descrito unas 3.000 enfermedades de este tipo, que cursan con síntomas enormemente variados. El estudio de estas enfermedades, conocer por qué la mutación del gen origina los defectos morfológicos, funcionales o de comportamiento observados, es muy difícil. Una de las razones es la complejidad de nuestro desarrollo embrionario, puesto que el gen mutado puede actuar en cualquier momento del mismo y los defectos que observamos después del nacimiento pueden haberse generado en un momento desconocido de la gestación.

La sofisticada homeostasis de nuestro organismo también supone una dificultad añadida porque, a veces, los defectos observados en un órgano tienen su origen en otro lugar del organismo donde, por ejemplo, no se produce una señalización correcta. Por estas razones muchos investigadores intentan estudiar los genes mutados en sistemas modelo más sencillos, con la esperanza de poder extrapolar los resultados obtenidos al estudio de los pacientes afectados por la enfermedad.

D. discoideum puede ser un modelo adecuado para el estudio de algunos de estos genes. Por ejemplo, el estudio de 287 genes implicados en enfermedades humanas permitió identificar 33 genes de *D. discoideum* que codifican proteínas muy similares. Los genes homólogos humanos están implicados en enfermedades muy diversas; entre otras, cáncer, enfermedades neurológicas, cardiovasculares o metabólicas. Además, algunos de estos genes no están presentes en otros sistemas modelo como las levaduras. El estudio de estos 33 genes en *D. discoideum* puede aportar datos interesantes que sirvan de referencia para la caracterización de los correspondientes genes humanos y para comprender las bases moleculares de las enfermedades asociadas. Lógicamente, en *D. discoideum* no se puede reproducir la sintomatología de las enfermedades humanas, ni los defectos anatomopatológicos o funcionales observados en humanos, al ser un organismo unicelular. El objetivo es estudiar la función de estos genes dentro de la célula, en qué proceso participan, como se regula su función, con qué otros genes y proteínas interactúan y cuáles son las alteraciones derivadas de su mutación.

En los últimos años se han realizado estudios sobre algunos de estos genes, que pueden darnos una idea sobre los resultados que se pueden esperar —revisados por

Saxe (1999) y Williams *et al.* (2006). El primer ejemplo son los estudios realizados sobre el síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond (SBDS), enfermedad que afecta al comportamiento de los neutrófilos, por lo que los pacientes sufren infecciones frecuentes. Aproximadamente el 70 % de los pacientes presentan mutaciones en el gen SBDS, que codifica una proteína con dominios de unión al RNA. *D. discoideum* tiene un gen que codifica una proteína con un 38 % de identidad y 69 % de similitud a la proteína humana. Se ha podido establecer que la proteína SBDS de *D. discoideum* se localiza en los pseudópodos de amebas migrando en un gradiente de cAMP, implicando directamente a esta proteína en la quimiotaxis y la motilidad celular, aunque aún no se ha podido determinar su mecanismo de acción.

Otra enfermedad humana que se ha estudiado en *D. discoideum* es la lisencefalia, un desorden cerebral causado por mutaciones en genes que codifican proteínas asociadas al citoesqueleto, como LIS1. Esta proteína es un regulador de dineína, que es necesaria para el transporte de componentes celulares a lo largo de los microtúbulos. En *D. discoideum* existe una proteína con un 60 % de identidad con LIS1. Se ha podido generar en este organismo un modelo de la enfermedad humana expresando formas de LIS1 de *D. discoideum* que contienen los mismos cambios en la secuencia de aminoácidos encontrados en algunos enfermos. El análisis de estas células ha mostrado que LIS1 es requerida para mantener la integridad del sistema de Golgi y para el funcionamiento correcto del citoesqueleto de tubulina (microtúbulos). Los estudios realizados en *D. discoideum* también han demostrado que LIS1 es un componente del centrosoma y que participa en la regulación de rutas de transducción de señales dependientes de Rho,

que, a su vez, regula la motilidad celular. También permitieron establecer que LIS1 interacciona con otras proteínas asociadas a los microtúbulos y a dineína. Todas estas interacciones podrían justificar los defectos observados en la migración de los precursores neuronales, que son el origen de la enfermedad humana, y abren nuevas posibilidades para su estudio.

Otro tipo de enfermedades de origen genético son las enfermedades mitocondriales, que se originan como consecuencia de mutaciones en los genes contenidos en las mitocondrias, o en genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales. Cada célula contiene centenares de mitocondrias, que se reparten aleatoriamente entre las células hijas en cada mitosis, lo que supone que no todas las mitocondrias de cada célula tengan que ser iguales. Por ejemplo, si surge una mutación en una mitocondria de una célula solo se ven afectadas esta mitocondria y sus descendientes, pero el resto de las mitocondrias de la célula son silvestres. En sucesivas divisiones el número de mitocondrias mutadas y silvestres se va distribuyendo al azar y varía de unas células a otras. Por esta razón, si la mutación provoca un funcionamiento anómalo de la mitocondria el grado de afectación puede variar entre células, según la proporción de mitocondrias afectadas que contengan. Este hecho se refleja en que las enfermedades mitocondriales muestran una sintomatología que puede variar entre distintos pacientes, en diferentes tejidos del mismo paciente o en distintas épocas de su vida. *D. discoideum* también está siendo utilizado como modelo para este tipo de enfermedades. Se han generado cepas mutantes para genes mitocondriales. Además, el aislamiento de distintos clones ha permitido clasificarlos en función de la proporción de mitocondrias mutantes que contienen. También se ha generado cepas en las que

se ha mutado genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales o se ha disminuido su nivel de expresión utilizando RNA interferentes. Todas estas herramientas, junto con el hecho de que las disfunciones mitocondriales son fácilmente identificables en *D. discoideum* por los defectos que causan en la proliferación celular y en el proceso de desarrollo, están haciendo de esta ameba un buen modelo para el estudio de enfermedades mitocondriales. Estos trabajos han sido revisados por P. Fisher (Annesley y Fisher, 2009).

BIBLIOGRAFÍA

- ALEXANDER, S.; MIN, J.; ALEXANDER, H. (2006). «*Dictyostelium discoideum* to human cells: pharmacogenetic studies demonstrate a role for sphingolipids in chemoresistance». *Biochim. Biophys. Acta*, 1760: 301-309.
- ANNESLEY, S. J.; FISHER, P. R. (2009). «*Dictyostelium discoideum*—a model for many reasons». *Mol. Cell Biochem.*, 329: 73-91.
- BOZZARO, S.; FISHER, P. R.; LOOMIS, W.; SATIR, P.; SEGALL, J. E. (2004). «Guenther Gerisch and *Dictyostelium*, the microbial model for ameboid motility and multicellular morphogenesis». *Trends Cell Biol.*, 14: 585-588.
- CLARKE, M. (2010). «Recent insights into host-pathogen interactions from *Dictyostelium*». *Cell Microbiol.*, 12: 283-291.
- COSSON, P.; SOLDATI, T. (2008). «Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria». *Curr. Opin. Microbiol.*, 11: 271-276.
- DORMANN, D.; WEIJER, C. J. (2006). «Imaging of cell migration». *Embo J.*, 25: 3480-3493.
- DRIESSCHE, N. VAN; ALEXANDER, H.; MIN, J.; KUSPA, A.; ALEXANDER, S.; SHAULSKY, G. (2007). «Global transcriptional responses to cisplatin in *Dictyostelium discoideum* identify potential drug targets». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 15406-15411.
- EICHINGER, L.; PACHEBAT, J. A.; GLOCKNER, G.; RAJANDREAM, M.; SUGGANG, R.; BERRIMAN, M.; SONG, J.; OLSEN, R.; SZAFRANSKI, K.; XU, Q. (2005). «The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*». *Nature*, 435: 43-57.
- FAJARDO, M.; SCHLEICHER, M.; NOEGEL, A.; BOZZARO, S.; KILLINGER, S.; HEUNER, K.; HACKER, J.; STEIN-

- ERT, M. (2004). «Calnexin, calreticulin and cytoskeleton-associated proteins modulate uptake and growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*». *Microbiology*, 150: 2825-2835.
- KING, J. S.; INSALL, R. H. (2009). «Chemotaxis: finding the way forward with *Dictyostelium*». *Trends Cell Biol.*, 19: 523-530.
- KING, J. S.; TEO, R.; RYVES, J.; REDDY, J. V.; PETERS, O.; ORABI, B.; HOELLER, O.; WILLIAMS, R. S.; HARWOOD, A. J. (2009). «The mood stabiliser lithium suppresses PIP3 signalling in *Dictyostelium* and human cells». *Dis. Model Mech.*, 2: 306-312.
- MAEDA, Y. (2005). «Regulation of growth and differentiation in *Dictyostelium*». *International Review of Cytology*, 244: 287-332.
- SAXE, C. L. (1999). «Learning from the slime mold: *Dictyostelium* and human disease». *Am. J. Hum. Genet.*, 65: 25-30.
- SIU, C. H.; HARRIS, T. J.; WANG, J.; WONG, E. (2004). «Regulation of cell-cell adhesion during *Dictyostelium* development». *Semin. Cell Dev. Biol.*, 15: 633-641.
- STEINERT, M.; HEUNER, K. (2005). «*Dictyostelium* as host model for pathogenesis». *Cell Microbiol.*, 7: 307-314.
- STRMECKI, L.; GREENE, D. M.; PEARS, C. J. (2005). «Developmental decisions in *Dictyostelium discoideum*». *Dev. Biol.*, 284: 25-36.
- SUGDEN, C. J.; ROPER, J. R.; WILLIAMS, J. G. (2005). «Engineered gene over-expression as a method of drug target identification». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 334: 555-560.
- THOMASON, P.; TRAYNOR, D.; KAY, R. (1999). «Taking the plunge-terminal differentiation in *Dictyostelium*». *Trends Genet.*, 15: 15-19.
- WILLIAMS, J. G. (2006). «Transcriptional regulation of *Dictyostelium* pattern formation». *EMBO Rep.*, 7: 694-698.
- WILLIAMS, R. S.; BOECKELER, K.; GRAF, R.; MULLER-TAUBENBERGER, A.; LI, Z.; ISBERG, R. R.; WESSELS, D.; SOLL, D. R.; ALEXANDER, H.; ALEXANDER, S. (2006). «Towards a molecular understanding of human diseases using *Dictyostelium discoideum*». *Trends Mol. Med.*, 12: 415-424.