

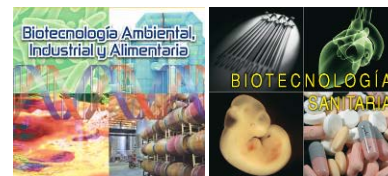
Artículo

Optimización de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* para su uso en la búsqueda de compuestos antitumorales

Rocío Cánovas Martínez¹, Antonio J. Pérez Pulido¹ y Rafael R. Daga^{1,*}

¹Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de Olavide/JA/CSIC, Carretera de Utrera Km1, 41013 Sevilla, España

Palabras clave: Beta-tubulina, *Schizosaccharomyces pombe*, modelización de estructura 3D



RESUMEN

La desregulación del ciclo celular puede dar lugar a enfermedades como el cáncer. La levadura *Schizosaccharomyces pombe* es un organismo modelo que puede usarse para el estudio del ciclo celular y la búsqueda de nuevos fármacos antitumorales. Desgraciadamente, los microtúbulos de la levadura no son sensibles a algunas drogas muy utilizadas como el Taxol. El objetivo de este estudio es optimizar a *S. pombe* para poder expresar en ella tubulinas humanas en lugar de las endógenas así como analizar mediante modelización molecular los cambios necesarios para hacer a *S. pombe* sensible. De esta forma podríamos utilizar esta levadura para hacer búsquedas masivas de nuevos compuestos anticancerígenos.

1. INTRODUCCIÓN

La división celular es esencial para el crecimiento y desarrollo de los organismos pero su desregulación puede dar lugar a graves enfermedades como el cáncer. En el proceso de división celular los microtúbulos, formados por heterodímeros de alfa y beta tubulina, juegan un papel fundamental. Estos dímeros forman el huso mitótico, estructura fundamental de la célula que se encarga de la segregación de los cromosomas durante la mitosis. Los microtúbulos se caracterizan por su inestabilidad dinámica, ya que están constantemente polimerizándose y despolimerizándose con la finalidad de atrapar correctamente a los cromosomas antes de separar a las cromátidas hermanas. Para regular y comprobar que esta acción es llevada a cabo de manera correcta existen unos mecanismos de seguridad denominados *checkpoints*. Uno de ellos, el *Spindle Assembly Checkpoint* (SAC) es el encargado principal de inhibir la separación de las cromátidas hasta que todos los cromosomas son capturados correctamente. Cuando ocurre algún problema durante la división y se mantiene un bloqueo durante un largo tiempo la célula entra en apoptosis (Musacchio & Salmon, 2007).

La levadura *Schizosaccharomyces pombe* es un organismo modelo adecuado para estudiar el ciclo celular y puede usarse en ensayos genéticos, bioquímicos y celulares relativamente rápidos y económicos, además de para buscar nuevos fármacos antitumorales. Así mismo posee unos mecanismos de control del ciclo celular y de respuesta a estrés que son muy similares a los de las células de mamíferos (Nurse, Ciclo, & Cancer, 2001).

Existen multitud de medicamentos y drogas antitumorales que pueden actuar sobre los microtúbulos. Algunos fármacos desestabilizan a los microtúbulos mientras que otros actúan estabilizándolos, y uno de los fármacos más usados es el Taxol.

Este fármaco se une a la beta tubulina y la estabiliza, alterando la dinámica de los microtúbulos y la estructura del huso mitótico, lo que desencadena la eliminación de las células tumorales por apoptosis (Xiao et al., 2006). Desafortunadamente, la beta tubulina que expresa *S. pombe* no es diana del Taxol (Das et al., 2012). Para acabar con el cáncer y lograr un tratamiento personalizado, efectivo, eficaz, sin efectos secundarios y que no desarrolle ninguna resistencia es imprescindible continuar investigando y buscar nuevos fármacos.

Este proyecto tiene como objetivo optimizar a *S. pombe* para la búsqueda de compuestos antiproliferativos. Para ello, se expresarán en esta levadura tubulinas humanas en lugar de las endógenas y en una estrategia alternativa se analizarán mediante modelización molecular los cambios necesarios en la beta tubulina de *S. pombe* para hacerla diana del Taxol.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En este proyecto se usaron cepas mutantes en alfa y beta tubulina para generar un doble mutante (Umesono et al., 1983) mediante microdissección de tétradas y poder expresar las tubulinas humanas en este fondo genético. Por otro lado, se obtuvieron las secuencias primarias de aminoácidos desde la base de datos UniProt (Magrane & Consortium, 2011) y se utilizó la herramienta web Swiss-Model (Kopp & Schwede, 2006) para modelizar las estructuras 3D de las tubulinas. Finalmente se compararon los modelos obtenidos usando la herramienta web 3D Dali (Holm & Rosenström, 2010), visualizando los resultados con el programa RasMol. Todo ello permitió analizar las diferencias existentes entre las beta tubulinas humanas y de *S. pombe*.

3. RESULTADOS

3.1 Optimización de *S. pombe*

En el laboratorio se construyó el doble mutante *nda2* y *nda3*, genes que codifican para la alfa y beta tubulina respectivamente. En este doble mutante, letal a baja temperatura, se pueden expresar las tubulinas humanas en lugar de las endógenas y ensayar su funcionalidad. Puesto que las células humanas poseen multitud de isoformas de alfa y beta tubulina, se seleccionó una pareja que formase dímeros de manera natural en células humanas (Leandro-García et al., 2010) y además que la beta tubulina del dímero fuera sensible a Taxol. Para la elección de esta pareja, se realizó un estudio previo de las interacciones entre proteínas con STRING.



Figura 1. Alineamiento múltiple de las beta tubulinas de humano, *S. pombe*, *S. cerevisiae*, vaca y cerdo (obtenido desde la herramienta ‘Align’ de la base de datos UniProt). Se pueden observar los cinco aminoácidos que resultan claves para que el Taxol se una a la proteína en células de mamíferos (recuadrados en naranja). Como podemos observar, en *S. pombe* solamente existen dos posiciones diferentes con respecto a humanos, si lo comparamos con *S. cerevisiae*, en la que los cinco aminoácidos son distintos. El alineamiento contiene las secuencias de vaca y de cerdo porque estas estructuras han sido cristalizadas y actúan como molde para los modelos estructurales de las otras tres. En verde se destaca un motivo aminoacídico de unión a GTP conservado en muchas proteínas y especies, en malva se destacan las regiones que forman estructura secundaria de hélice alfa y en azul las láminas beta.

Se adquirieron los clones de *cDNA* de los genes humanos y los plásmidos con ambas tubulinas se comprobaron mediante análisis de digestión. Además, se diseñaron los cebadores para subclonar ambos genes en un vector de expresión de *S. pombe*.

3.2 Modelización del sitio de unión al Taxol

Gracias a los análisis de estructura del sitio de unión del Taxol, ya ha sido demostrado que la beta tubulina de *S. pombe* posee una mayor similitud con la de humano que otras levaduras como *S. cerevisiae* (Gupta et al., 2003).

Nosotros hemos comparado las secuencias aminoacídicas de la beta-tubulina de cinco especies modelo, dos de las cuales han sido cristalizadas y obtenidas su estructura 3D (Figura 1). A partir de la estructura cristalizada, y usando la herramienta Swiss-Model, se puede obtener un modelo 3D por homología para la beta-tubulina de *S. pombe* con el sitio de unión al Taxol generado y para la correspondiente de humano. Esto nos permitió comparar ambas estructuras, la herramienta 3D Dali, y comprobar la orientación de los aminoácidos que forman el sitio de unión al Taxol (Figura 2),

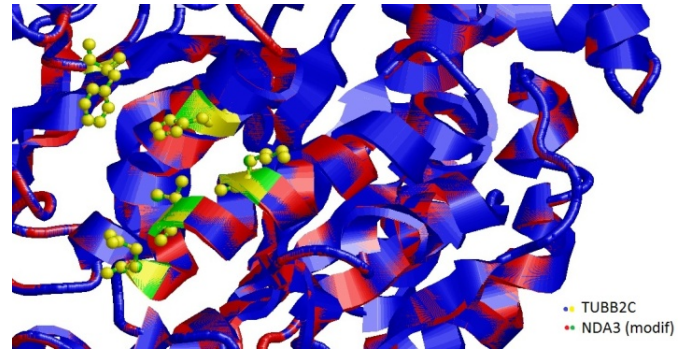


Figura 2. Alineamiento estructural de la beta tubulina de humano (*TUBB2C*) frente al modelo mutado de la beta tubulina de *S. pombe* (*NDA3*). Las cadenas de ambas tubulinas están coloreadas en azul (*TUBB2C*) y rojo (*NDA3*), mientras que los cinco aminoácidos claves aparecen coloreados en amarillo y verde respectivamente. Los cinco aminoácidos clave para la unión del Taxol mantienen la misma orientación espacial.

sugiriéndose que mantienen la misma orientación espacial en ambos modelos, y que por tanto esta unión podría reproducirse en *S. pombe* con sólo cambiar dos aminoácidos correspondientes a las dos primeras posiciones.

4. CONCLUSIONES

Gracias al presente estudio se ha demostrado que es posible optimizar a *S. pombe* para su uso en la búsqueda de nuevos fármacos anticancerígenos. En este trabajo nos centramos en un tipo de beta tubulina sensible a Taxol, una pareja concreta de alfa y beta tubulinas que forma dímeros y una droga específica. En futuros estudios se pueden utilizar otros fármacos y seleccionar diferentes tipos de alfa y beta tubulinas que sean sensibles a distintas drogas. De esta forma, podrían realizarse *screenings* masivos que facilitasen la obtención de drogas antitumorales más eficaces y específicas para cada tipo de cáncer.

Se ha generado un doble mutante de *S. pombe* en el que expresar y ensayar la funcionalidad de las tubulinas humanas. Se ha seleccionado una pareja de alfa y beta tubulinas humanas capaces de formar dímero de manera natural y cuya subunidad beta es sensible al Taxol. Además, el modelo generado mediante herramientas *in silico* predice que modificando tan solo dos aminoácidos de la beta tubulina de *S. pombe* es suficiente para hacerla diana del Taxol y consiguientemente a *S. pombe* sensible al fármaco. Una cepa de levadura sensible a Taxol permitiría estudiar el mecanismo molecular por el que la estabilización de los microtúbulos resulta en la activación del *checkpoint* de mitosis, un proceso esencial para iniciar la apoptosis en células tumorales.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a mis dos tutores, Antonio J. Pérez Pulido y Rafael Rodríguez Daga que me han ayudado, guiado y acompañado durante todo el proceso. Y agradecer también a los compañeros del laboratorio de genética y bioinformática por los consejos prestados y el apoyo en estos últimos meses.

BIBLIOGRAFIA

- Das, L., Bhattacharya, B., & Basu, G. (2012). Rationalization of paclitaxel insensitivity of yeast β -tubulin and human β III-tubulin isotype using principal component analysis. *BMC Research Notes*, 5(1), 395. doi:10.1186/1756-0500-5-395
- Gupta, M. L., Bode, C. J., Georg, G. I., & Himes, R. H. (2003). Understanding tubulin-Taxol interactions: mutations that impart Taxol binding to yeast tubulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(11), 6394–6397.
- Holm, L., & Rosenström, P. (2010). Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Research*, 38(Web Server issue), W545–9. doi:10.1093/nar/gkq366
- Kopp, J., & Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL Repository: new features and functionalities. *Nucleic Acids Research*, 34(Database issue), D315–8. doi:10.1093/nar/gkj056
- Leandro-García, L. J., Leskelä, S., Landa, I., Montero-Conde, C., López-Jiménez, E., Letón, R., ... Rodríguez-Antona, C. (2010). Tumoral and tissue-specific expression of the major human beta-tubulin isotypes. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, 67(4), 214–23. doi:10.1002/cm.20436
- Magrane, M., & Consortium, U. (2011). UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, 2011, bar009. doi:10.1093/database/bar009
- Musacchio, A., & Salmon, E. D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(5), 379–93. doi:10.1038/nrm2163
- Nurse, P., Ciclo, L. De, & Cancer, H. (2001). Paul Nurse y el Laboratorio de Ciclo Celular, 12–15.
- Umesono, K., Toda, T., Hayashi, S., & Yanagida, M. (1983). Cell division cycle genes *nda2* and *nda3* of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* control microtubular organization and sensitivity to anti-mitotic benzimidazole compounds. *Journal of Molecular Biology*, 168(2), 271–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6887245>
- Xiao, H., Verdier-Pinard, P., Fernandez-Fuentes, N., Burd, B., Angeletti, R., Fiser, A., ... Orr, G. a. (2006). Insights into the mechanism of microtubule stabilization by Taxol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(27), 10166–73. doi:10.1073/pnas.0603704103