

# Temas de actualidad

## Paul Nurse y el Laboratorio de Ciclo Celular

**Mercedes Pardo Calvo**

Cell Cycle Laboratory. Imperial Cancer Research Fund. Londres, Reino Unido

E-mail: M.Pardo@icrf.icnet.uk

El premio Nobel de Medicina y Fisiología 2001 ha sido concedido a los Drs. Leland Hartwell, Paul Nurse y Tim Hunt por sus descubrimientos de los reguladores clave del ciclo celular, es decir, del mecanismo que controla la división celular.

Hartwell, director del Fred Hutchison Cancer Research Centre (Seattle), estableció las bases para el uso de levaduras como organismos modelo en el estudio del ciclo celular, realizando los primeros experimentos en los que empleó la levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae*. Descubrió un gen al que denominó *CDC28*, que constituye unos de los puntos de control del ciclo en este organismo, regulando la entrada en el siguiente ciclo celular. Utilizando la llamada levadura de fisión, *Schizosaccharomyces pombe*, Paul Nurse identificó el gen *cdc2*, que codifica una proteína quinasa esencial para la progresión del ciclo celular. Pero no sólo esto. Durante años la investigación en organismos modelo fue puesta en entredicho. Nurse descubrió asimismo que existía un gen humano homólogo a *cdc2*, y demostró que era capaz de complementar el defecto ocasionado por la falta de *cdc2* en la levadura. *Cdc2/CDK* (quinasa dependiente de ciclina) era por tanto una proteína clave para la progresión del ciclo celular. Además Paul identificó varias proteínas más que controlan la velocidad y coordinación del ciclo celular. El trabajo de Paul Nurse no sólo identificó el mecanismo básico de regulación del ciclo celular, sino que además estableció que éste es común a todos los organismos eucariotas, desde la levadura al hombre. Por su parte, Tim Hunt, trabajando en otro organismo modelo, los huevos de erizo de mar, descubrió otras moléculas de vital importancia, unas proteínas cuyos niveles varían a lo largo del ciclo celular, por lo que las denominó ciclinas. La importancia de este descubrimiento radica en que las ciclinas son necesarias para la actividad de la CDK, y por tanto son reguladores clave del ciclo celular.

Paul Nurse es Director General del Imperial Cancer Research Fund (Londres), una institución benéfica dedicada a la investigación sobre el cáncer, además de llevar su propio grupo de investigación en el Laboratorio de Ciclo Celular, en el

citado instituto. Aquí es donde actualmente estoy realizando una estancia post-doctoral. La noticia del premio Nobel no nos sorprendió a ninguno en el laboratorio. De hecho, el año pasado a mediados de Octubre nos pasábamos el día "enganchados" a Internet en la página oficial de los Nobel, ansiosos por ver aparecer su nombre. Paradójicamente, este año se nos había olvidado...

### **S. pombe como organismo modelo.**

El laboratorio de Ciclo Celular trabaja en dos líneas de investigación claramente diferenciadas, pero a su vez íntimamente relacionadas: ciclo celular y morfología. Los objetivos principales son identificar los controles espaciales y temporales que operan en el ciclo celular eucariota, y elucidar su mecanismo molecular. Para ello se emplea como organismo modelo *S. pombe*, por su fácil manipulación genética, así como su similitud con células eucariotas superiores.

La levadura de fisión es un organismo unicelular eucariota. Presenta una morfología cilíndrica, mide de 8 a 15  $\mu\text{m}$ , y mantiene un diámetro constante de 3-4  $\mu\text{m}$  a lo largo del ciclo celular, de manera que el crecimiento se produce principalmente como consecuencia del alargamiento de las células por los extremos en una línea recta, de forma extremadamente polarizada. Además las células sufren varias transiciones morfológicas a lo largo del ciclo celular. Inmediatamente después de la división celular la célula comienza creciendo de forma monopolar únicamente por el extremo antiguo, es decir, el existente antes de la división. Cuando la célula alcanza un tamaño determinado, empieza a crecer también por el extremo formado tras la división, estableciéndose así un crecimiento bipolar. A este proceso se le ha denominado NETO (*New End Take Off*). El crecimiento se interrumpe durante la división nuclear, e inmediatamente después de ésta se produce la formación de un septo en el centro de la célula, que provoca la división celular por fisión binaria (de ahí el nombre de levadura de fisión), dando lugar a dos células hijas exactamente iguales. Estas transiciones

**Mercedes Pardo** es Licenciada y Doctora en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid (2000). Realizó su Tesis Doctoral sobre Biología Molecular de *Saccharomyces cerevisiae* en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia (UCM), bajo la dirección de los Dres. César Nombela y Concepción Gil.



Durante su periodo predoctoral trabajó también en el laboratorio del Dr. H. Bussey (Department of Biology, McGill University, Montreal, Canadá), sobre la pared celular de levaduras, y en el laboratorio del Dr. W. Blackstock (Cell Mapping Project, Medicines Research Centre, GlaxoWellcome, Stevenage, Reino Unido), en el marco de una colaboración para la identificación de proteínas de pared de levaduras mediante espectrometría de masas.

Actualmente es becaria post-doctoral (Fundación Ramón Areces) en el laboratorio del Dr. Paul Nurse, trabajando en morfogénesis en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*; más concretamente en la relación entre los citoesqueletos de actina y tubulina durante la citoquinesis.

cíclicas vienen acompañadas de cambios drásticos en los citoesqueletos de actina y tubulina. Debido a la regularidad de su forma, *S. pombe* constituye un sistema modelo muy atractivo para el estudio de procesos relacionados con la morfogénesis o establecimiento de la forma y polaridad.

Por otra parte, *S. pombe* resulta también un sistema modelo extremadamente útil para el estudio genético del ciclo celular. Debido a las características de su crecimiento, observando simplemente el tamaño celular, Paul Nurse aisló en los años 70 varios mutantes con defectos en la progresión del ciclo celular. Muchos de éstos son mutantes termosensibles incapaces de llevar a cabo la división celular. Si las células son incapaces de realizar la mitosis, al llegar a este punto se detiene el ciclo celular. Sin embargo, el crecimiento continúa, originándose así células extremadamente alargadas (a estos mutantes los denominó *cdc*). Por el contrario, si las células carecen de algún regulador del ciclo celular y éste se acelera, la división celular se produce de forma prematura, dando lugar a células de pequeño tamaño (estos mutantes fueron aislados en Escocia, y denominados *wee* - pequeño en escocés). Ambos tipos de células pueden ser identificadas mediante examen visual de las placas donde están creciendo. Estos mutantes permitieron la identificación de genes necesarios para la progresión del ciclo celular o su regulación. La belleza de estos

estudios es el hecho de que los aspectos básicos de la regulación del ciclo celular están muy conservados desde las levaduras a los seres humanos, y por tanto, el estudio de estos controles en organismos modelo como la levadura *S. pombe*, de fácil manipulación genética, han demostrado ser muy informativos sobre los controles análogos en células humanas, y continuarán siéndolo.

Hay que resaltar además que recientemente se ha completado también la secuenciación de su genoma, lo cual facilitará aún más los estudios en este organismo.

### Ciclo celular eucariótico.

**E**n concreto, el trabajo sobre controles temporales del ciclo celular está enfocado en tres tipos de controles: (1) la regulación del comienzo de la fase S del ciclo celular, durante la cual se produce la replicación del DNA; (2) los puntos de control que aseguran la estabilidad genómica; y (3) los controles que actúan durante la meiosis.

Dentro de la regulación de la fase S del ciclo celular, el interés del laboratorio está centrado en la proteína Cdc18. Esta proteína es esencial para el comienzo de la fase de replicación del DNA. Por otra parte, niveles elevados de la misma son capaces de inducir este proceso haciendo caso omiso de los controles que aseguran que únicamente se produzca una fase S en cada ciclo celular. El mecanismo mediante el cual Cdc18 ejerce este efecto consiste en la activación de los orígenes de replicación de forma reiterada. Cdt1 es un factor que promueve esta característica de Cdc18. Ambas proteínas se asocian físicamente, y son necesarias para la asociación de Cdc21, parte del complejo que recluta a la maquinaria de replicación, con la cromatina en la fase G1 previa a la síntesis de DNA. Tanto Cdc18 como Cdt1 están conservadas en metazoos y plantas, lo cual sugiere que su papel regulador del comienzo de la fase S está conservado en organismos eucariotas multicelulares.

Los puntos de control (*checkpoints*) del ciclo celular aseguran que los distintos eventos de éste ocurran de forma ordenada, con el fin de mantener la integridad genómica. Los puntos de control de la replicación del DNA y del daño del DNA impiden la segregación del material genético cuando se inhibe la replicación o cuando se producen daños en el DNA. Los mecanismos moleculares que subyacen estos controles también están conservados en todos los eucariotas. Cuando se detecta un bloqueo en la replicación del DNA o daño en el mismo, se detiene la progresión del ciclo celular justo antes de la mitosis mediante la inhibición de

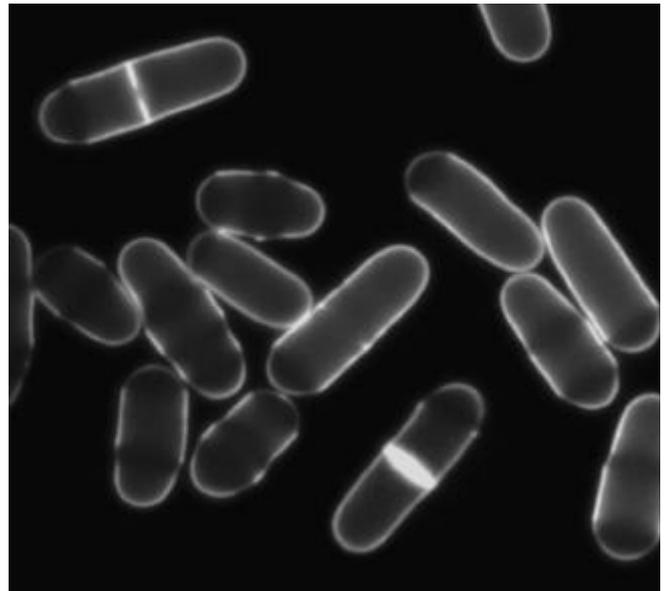
la quinasa dependiente de ciclina CDK, con el fin de dar tiempo a reparar los daños.

Los puntos de control que actúan sobre la meiosis no están tan bien caracterizados como los que operan durante el ciclo mitótico. El empleo de la levadura de fisión tiene aquí una ventaja importantísima, ya que es el único sistema eucariota en el que es posible conseguir una meiosis sincrónica. Utilizando este sistema, se ha puesto de manifiesto que durante la meiosis opera un punto de control de la replicación del DNA. Si se inhibe la fase S premeiótica, se produce una parada del ciclo celular en la meiosis I, que requiere de las proteínas Rad (que también operan en el punto de control mitótico), y de la proteína quinasa Cds1. Esta parada actúa de forma similar al punto de control mitótico análogo. Sin embargo, existe además un segundo punto de parada, durante la meiosis I, en el cual la actividad CDK es elevada y se forma el huso meiótico. Este segundo punto puede reflejar un control correspondiente a procesos específicamente relacionados con la meiosis, como la recombinación o el emparejamiento de cromosomas homólogos.

### Morfogénesis en *S. pombe*.

El mantenimiento de la forma y la polaridad celular es una de las funciones básicas en Biología. Uno de los objetivos del Laboratorio de Ciclo Celular es el estudio de aspectos espaciales del ciclo celular, dirigido a la identificación de los factores responsables de la morfogénesis celular, y cómo éstos varían a lo largo del ciclo celular. Dentro del marco particular del ICRF, la utilidad de estos estudios en relación con el cáncer radica en la migración celular que se produce durante la metástasis, que requiere que las células sufran cambios de forma. Así pues, un mayor conocimiento de los factores que afectan a la morfogénesis puede ayudar a comprender mejor el control de este proceso.

Debido a la regularidad y especial morfología de la levadura de fisión, ésta ha sido empleada para la identificación de factores morfogénéticos, lo cual puede hacerse directamente mediante examen visual. Si las células pierden la capacidad de crecer en línea recta, es decir, no localizan la maquinaria de crecimiento en los extremos celulares, sino en un punto próximo a éstos, se producen células curvas. En casos extremos, si la maquinaria se aleja más de los extremos, se forma una ramificación. Por otra parte, la pérdida completa de la polaridad da lugar a un crecimiento de la célula en toda su superficie, provocando células



Tinción de la pared celular y el septo de *S. pombe* con calcoflúor.

redondeadas. En el laboratorio se han aislado mutantes que presentan todas estas morfologías, que han sido denominados de acuerdo a ellas: *ban* ("banana", células curvadas), *tea* (literalmente T, células ramificadas) y *orb* (células esféricas). Estos mutantes han permitido la identificación de genes necesarios para el mantenimiento de la morfología y polaridad celular.

Actualmente, en el laboratorio se está trabajando en varios de los genes *tea* y *orb*. Tea1 es una proteína que se localiza en los extremos celulares, incluso en células que crecen de forma monopolar, es decir, sólo por un extremo. Ello sugiere que Tea1 es un marcador de la geometría celular que define los extremos de la célula. Tea1 requiere de los microtúbulos para su localización, y además, en su ausencia los microtúbulos son anormalmente largos, curvándose en los extremos celulares, lo cual sugiere que la presencia de Tea1 en éstos puede ser necesaria para el reconocimiento de los mismos por los microtúbulos. En células que carecen de Tea2, una quinesina o proteína motora de microtúbulos, Tea1 no se localiza correctamente en los extremos celulares. Esto puede indicar que Tea2 es el medio de transporte de Tea1. Otro de los factores morfológicos caracterizados en el laboratorio es Tip1, cuya falta también da lugar a células ramificadas. Tip1 es una proteína de la familia CLIP-170, que se localiza en los extremos de los microtúbulos y regula su estabilidad. Así, Tip1 forma parte de un sistema que guía a los microtúbulos a lo largo del eje longitudinal de la célula, asegurando un crecimiento de las mismas en línea recta.

Trabajar en este laboratorio está resultando una experiencia muy positiva. La inquietud científica que se respira aquí crea una atmósfera de trabajo ideal, pero además el buen ambiente en el laboratorio hace que sea un placer investigar aquí. Y del jefe, ¡qué voy a decir! Paul Nurse es un científico brillantísimo, posee una mente privilegiada y una creatividad extraordinaria, además de una personalidad encantadora y arrolladora. Por último, y alguno que lo haya escuchado afirmará con la cabeza al leer esto, Paul Nurse es un gran orador, que hace que escuchar sus charlas sea una experiencia muy entretenida y didáctica. Como él suele decir, “al fin y al cabo, es sólo teatro...” (¡y quién mejor para ello que un doble casi exacto de Robin Williams!).

## Referencias

1. Brunner D. y Nurse P. (2000) New concepts in fission yeast morphogenesis. *Phil Trans R Soc Lond B* 355:873-7
2. Hayles J. y Nurse P. (2001) A journey into space. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(9):647-56
3. Murakami H. y Nurse P. (2000) DNA replication and damage checkpoints and meiotic cell cycle controls in the fission and budding yeast. *Biochem J* 349:1-12
4. Nurse P. (1997) Regulation of the eukaryotic cell cycle. *Eur J Cancer* 33(7):1002-4
5. Nurse P. (2000) A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 100(1):71-8