

Charla

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



Rocío Cánovas Martínez (1), Antonio J. Pérez Pulido (1) y Rafael R. Daga (1,*)

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

Palabras clave: beta-tubulina; taxol; *schizosaccharomyces pombe*; fármacos anticancerígenos; modelización de estructura.

RESUMEN

Motivación: La levadura *Schizosaccharomyces pombe* es un excelente organismo modelo para estudiar el ciclo celular y usarse en ensayos relativamente rápidos y económicos para buscar nuevos fármacos antitumorales. Uno de ellos, el Taxol, se une a la beta tubulina alterando la dinámica de los microtúbulos. Desafortunadamente, la beta tubulina que expresa *S. pombe* no es diana del Taxol (Das et al., 2012). Este proyecto tiene como objetivo optimizar a *S. pombe* para la búsqueda de compuestos antiproliferativos. Se expresarán en esta levadura tubulinas humanas (Leandro-García et al., 2010) y se analizarán mediante modelización molecular los cambios necesarios en la beta tubulina de *S. pombe* para hacerla diana del Taxol.

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 UniProt y se utilizó la herramienta Swiss-Model para modelizar las estructuras 3D de las tubulinas. Finalmente se compararon los modelos obtenidos con la herramienta 3D Dali, visualizando los resultados con el programa RasMol. Todo ello permitió analizar las diferencias existentes entre las beta tubulinas humanas y de *S. pombe*.

Resultados: En el laboratorio se construyó el doble mutante *nda2* y *nda3*, letal a baja temperatura, para expresar las tubulinas humanas y ensayar su funcionalidad. Se adquirieron los clones de cDNA de los genes humanos y los plásmidos con ambas tubulinas se comprobaron mediante análisis de digestión. Se diseñaron los cebadores para subclonar ambos genes en un vector de expresión de *S. pombe*. Gracias a los análisis de estructura del sitio de unión del Taxol, se demostró 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).

Conclusiones: Se ha generado un doble mutante de *S. pombe* en el que expresar y ensayar la funcionalidad de las tubulinas humanas. 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.

BIBLIOGRAFIA

- D Das, L. et al. (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.
- Gupta, M. L. et al. (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.
- Leandro-García, L. et al. (2010). Tumoral and tissue-specific expression of the major human beta-tubulin isoforms. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, 67(4), 214–23.
- Umesono, K. et al. (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.