

## **EL CICLO CELULAR DE LAS LEVADURAS: ¿UN BUEN MODELO EUCARIOTICO?**

Enrique Herrero, Martí Aldea  
y Carme Gallego

Departamento de Ciencias Médicas Básicas  
Universidad de Lleida

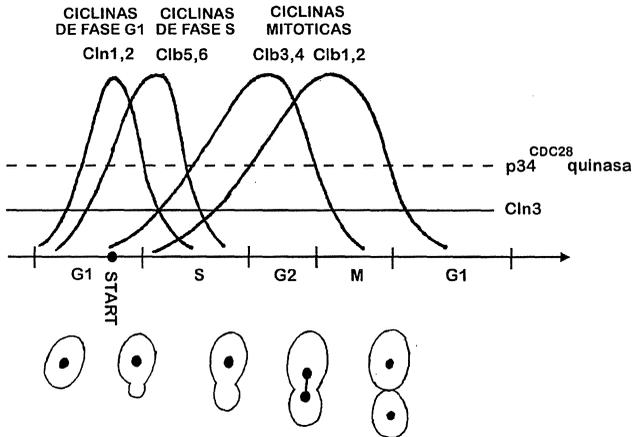
La proliferación celular continuada requiere la duplicación de todos los constituyentes de la célula, seguida de la segregación de los mismos a las células hijas, durante el periodo que media entre dos divisiones sucesivas. El conjunto de estos procesos es lo que denominamos ciclo celular, precisamente por su carácter periódico a lo largo del tiempo en células que se están multiplicando de manera continua y no están sometidas a procesos específicos de diferenciación. Entre otros procesos esenciales, las células deben asegurar la correcta duplicación del material cromosómico y su distribución equitativa entre las células hijas, así como que ambos hechos tengan lugar en el momento del ciclo adecuado y en el orden correcto y con la misma frecuencia con que las células doblan su masa. De ahí que deba haber una interrelación temporal de los distintos estadios del ciclo celular. En las células procariotas, la regulación del ciclo celular es relativamente simple debido, además de a la simplicidad estructural de las mismas, a (i) el carácter generalmente monocromosómico de los organismos procariotas, y (ii) la existencia de un único origen de replicación por cromosoma. La relación temporal entre origen de replicación cromosómica y septación en bacterias, junto con una adecuada topología del crecimiento celular, evita la necesidad de circuitos complejos de regulación del ciclo celular procariota, a la vez que permite la solapación de ciclos de división sucesivos en una misma célula (Helmstetter, 1996).

En contraste, las células eucariotas (sean haploides o diploides) deben asegurar la duplicación simultánea a lo largo de cada ciclo de su conjunto de cromosomas (siempre más de uno), con varios orígenes de replicación por cromosoma, y la segregación ordenada de los mismos durante la mitosis. Muchas de dichas células deben ser, además, susceptibles de recibir señales externas (factores de crecimiento, feromonas sexuales, etc.) y de responder específicamente a ellas a nivel de estadios concretos del ciclo celular induciendo

procesos de diferenciación, de apoptosis, etc. Así, diversas vías de transmisión de señales externas tendrán como blanco de actuación proteínas reguladoras del ciclo. Se entiende que el ciclo celular eucariota sea funcionalmente mucho más complejo que el procariota, requiriendo una complicada trama de mecanismos reguladores del orden temporal de los sucesivos eventos del mismo, así como diversos puntos de control a lo largo del ciclo que interrumpan éste en caso de que algún proceso se haya desarrollado inadecuadamente. Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* están siendo utilizadas en años recientes como un modelo para el estudio del ciclo celular eucariota, fundamentalmente por su potencialidad para el análisis genético. Ello permite diseñar ya hoy en día un esquema relativamente detallado del ciclo celular de las levaduras que sirve como base para estudios en células eucariotas superiores, a la vez que permite extraer conclusiones acerca de la evolución de los mecanismos de control del ciclo. En los próximos apartados, el ciclo de *S. cerevisiae* nos servirá como modelo para extraer generalizaciones sobre los elementos reguladores del ciclo celular de los eucariotas.

## **1. EL CICLO CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae*: UNA "MÁQUINA" FUNCIONANDO A BASE DE COMPLEJOS PROTEÍNA QUINASA-CICLINAS**

El ciclo de división mitótica de *S. cerevisiae* consta de una fase de replicación del DNA (S) y de otra de segregación cromosómica o mitosis (M) separadas por dos fases  $G_1$  (entre M del ciclo previo y S) y  $G_2$  (entre S y M), finalizando con la separación citoplásmica o citoquinesis (Figura 1) (Futcher, 1990; Forsburg y Nurse, 1991). A diferencia de otras células eucariotas, y debido a que las células se dividen mediante gemación, esta división no es exactamente simétrica, generándose una célula hija de menor tamaño que la célula madre. Mientras que esta última puede iniciar inmediatamente un nuevo ciclo de división, la célula hija debe crecer hasta alcanzar un tamaño crítico antes de iniciar su primer proceso de gemación. En base a criterios morfológicos y genéticos, se ha definido un punto clave en la fase  $G_1$ , denominado Start (equivalente al "restriction point" de células superiores), a partir del cual las células inician la emergencia de la yema al mismo tiempo que preparan la maquinaria para la replicación y posterior segregación cromosómica. Start también es el punto del ciclo en el que confluyen señales externas (feromonas sexuales, estado nutricional del medio, etc.) y las células "deciden" si continuar el ciclo de división o entrar en un estado de reposo en forma de células no gemadas (a menudo denominado fase  $G_0$ ).

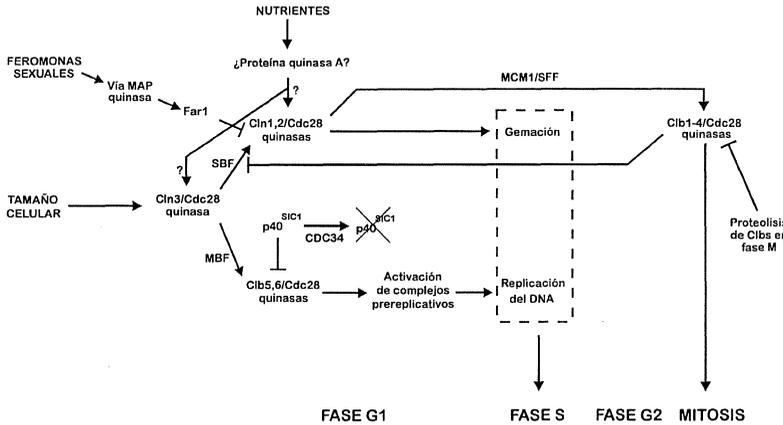


**Figura 1.-** Ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Se indica la evolución de la morfología celular a lo largo del mismo, paralelamente a la fluctuación (en términos relativos) de los diferentes tipos de ciclinas en las sucesivas fases del ciclo. Los niveles de la proteína quinasa p34 producto del gen *CDC28*, que se mantienen constantes, se indican mediante una línea a trazos.

El desarrollo del ciclo se asegura por la aparición periódica de ciclinas, moléculas cuya abundancia oscila en los sucesivos estadios del ciclo celular y que actúan como subunidades activadoras de proteína quinasas (CDKs, por "cyclin-dependent kinases"), que al fosforilar diversos sustratos proteicos permiten el avance a lo largo del ciclo (Lew y Reed, 1992). Cada asociación ciclina específica-CDK posee capacidad de fosforilar sustratos concretos. Las ciclinas contienen señales moleculares (secuencias específicas de aminoácidos) que aseguran su destrucción mediante proteólisis mediada por ubiquitina, y en consecuencia la inactivación de la correspondiente CDK una vez cumplida su función. Se puede entender el ciclo celular, pues, como una máquina de función continua gracias a las sucesivas asociaciones ciclina-CDK.

*S. cerevisiae* contiene una única CDK, la proteína p34 producto del gen *CDC28*. Su nivel permanece constante a lo largo del ciclo, siendo activada al unirse a diversas ciclinas que se van sintetizando sucesivamente (Figura 1) (Nasmyth, 1993, Koch y Nasmyth, 1994). Según el estadio del ciclo en que se sintetizan, se las describe como ciclinas de fase G<sub>1</sub> (Cln1-3, necesarias para iniciar el ciclo a nivel de G<sub>1</sub>), ciclinas de fase S (Clb5 y Clb6, necesarias para la replicación cromosómica) y ciclinas mitóticas (Clb1-4, necesarias para la mitosis). Cln3 es una excepción entre ellas en cuanto a que sus niveles permanecen constantes a lo largo del ciclo. Las ciclinas Clb1-6 forman parte de la familia de ciclinas de tipo B, junto con un grupo de ciclinas de eucariotas superiores (véase más adelante). En cambio, las ciclinas Cln1-3 constituyen una familia diferente, con homología muy limitada con las otras ciclinas tanto de levaduras como de eucariotas superiores.

La Figura 2 muestra los mecanismos reguladores del ciclo en *S. cerevisiae*. Sin entrar en una descripción pormenorizada, a continuación se comentan los aspectos más relevantes de los mismos.



**Figura 2.-** Esquema de los mecanismos que regulan la cronología de los diferentes estadios del ciclo celular en *S. cerevisiae*. Vease el texto para más detalles.

**(i) Papel de las ciclinas G<sub>1</sub> en la regulación del ciclo (Dirick et al., 1995)**

Existe una jerarquía funcional entre las tres ciclinas G<sub>1</sub>, de modo que Cln3 es la que actúa inicialmente induciendo un nuevo ciclo después de la división previa. En contraste con las otras ciclinas, la expresión del gen *CLN3* es constante a lo largo del ciclo celular y la vida media de la proteína Cln3 es muy corta (menor de 10 minutos). Ambos hechos aseguran que la cantidad de ciclina Cln3 aumente proporcionalmente a la biomasa celular, hasta alcanzar una cantidad crítica capaz de activar por un lado la expresión de los genes *CLN1* y *CLN2* y por otro la de *CLB5* y *CLB6*. La activación de p34 (que alternativamente denominaremos Cdc28) marcaría, a su vez, el advenimiento de Start. La expresión de *CLN1* y *CLN2* depende del factor transcripcional SBF, formado por una subunidad activadora Swi6 y otra Swi4 reconocedora de secuencias específicas SCB (consenso CACGAAA) presentes en los promotores de *CLN1* y *CLN2*. La subunidad Swi6 es común al factor MBF, que reconoce (a través de la subunidad Mbp1 de unión a DNA) secuencias específicas MCB (consenso ACGCGTNA) en los promotores de *CLB5* y *CLB6*. Es interesante remarcar que el factor MBF es también responsable de la expresión de genes que codifican para enzimas directamente implicadas en la replicación del DNA (timidilato sintetasa, subunidad catalítica de la DNA polimerasa I, DNA ligasa, etc.). La hipótesis más plausible (pero no demostrada) es que la fosforilación de los

factores SBF y MBF por el complejo Cln3/Cdc28 activaría dichos factores y conduciría a un aumento en la expresión de las correspondientes ciclinas regulables por SBF y MBF. Cln1 y Cln2, al activar Cdc28, son esenciales para la gemación, mientras que Clb5 y Clb6 específicamente fosforilarían sustratos esenciales para la replicación cromosómica.

**(ii) Inhibidores de ciclinas-quinasas aseguran el orden adecuado de eventos (Schwob et al., 1994)**

Puesto que existe una diferenciación funcional de las ciclinas Cln respecto de Clb5 y Clb6, se entiende que para un desarrollo correcto del ciclo, Clb5-6 sólo deberían actuar (promoviendo la fase S) una vez que la célula posee niveles suficientes de Cln1-2 (promoviendo la emergencia de la yema). En otras palabras, debe existir un orden temporal de actuación de las ciclinas Cln previo a Clb5-6. El que esto sea así viene asegurado por la existencia de un inhibidor de los complejos Cdc28-Clb5 y Cdc28-Clb6, denominado p40 y producto del gen *SIC1*. p40 aparece al final de la mitosis y desaparece al comienzo de la fase S. Se ha demostrado que las ciclinas Cln1-2 son responsables de tal desaparición, al fosforilar p40 e inducir su proteólisis mediada por ubiquitina (el gen *CDC34*, que codifica el enzima que conjuga ubiquitina, es esencial para la degradación de p40). Por tanto, p40 sólo desaparece, y consiguientemente los complejos Cdc28-Clb5,6 presintetizados se activan, cuando se alcanzan niveles suficientes de actividad Cdc28-Cln1,2 quinasa. Aunque no se ha probado específicamente, se ha sugerido que p40 también regularía la actividad quinasa mediada por las ciclinas Clb mitóticas, asegurando que ésta no aparezca antes de la fase S.

**(iii) Cada origen de replicación cromosómica funciona una única vez en cada ciclo celular (Piatti et al., 1996; Wuarin y Nurse, 1996)**

Para asegurar que las dos células eucariotas resultantes de una división mitótica reciban todo el complemento de cromosomas con la ploidía intacta, es necesario que tenga lugar una única fase S por ciclo y que cada segmento cromosómico dependiente de un origen de replicación dado se duplique una sola vez por ciclo. La proteína Cdc6 de *S. cerevisiae*, que se sintetiza al final de la mitosis y es degradada pasada la fase S, es esencial para ello. Durante la fase G<sub>1</sub>, Cdc6 forma, junto con la proteína Mcm1 y otras, complejos prereplicativos no funcionales en las regiones de los orígenes de replicación. La activación de estos complejos prereplicativos requiere la fosforilación (mediada por Cdc28-Clb5,6) de Cdc6 y/o otras proteínas de los complejos. En cambio, las moléculas Cdc6 libres fosforiladas por la misma actividad quinasa devendrían incapaces de formar nuevos complejos replicativos activos. Este hecho, junto con que el complejo asociado a un origen de replicación sería degradado una vez hubiese permitido iniciar un proceso replicativo a partir de dicho origen, aseguraría que cada origen de replicación funcionase una sola vez durante cada ciclo. La formación de nuevos complejos prereplicativos (y por tanto el funcionamiento cíclico continuado de la "máquina" celular de duplicación cromosómica)

requeriría (i) la destrucción de la actividad Clb/Cdc28 quinasa preexistente, y (ii) la síntesis, entre otros componentes del complejo, de nueva proteína Cdc6 susceptible de unirse a los orígenes de replicación.

**(iv) Las ciclinas mitóticas inhiben la expresión de las ciclinas G<sub>1</sub>**  
**(Koch et al., 1996)**

Como se indicó anteriormente, la expresión de los genes *CLN1* y *CLN2* (y el consiguiente aumento de los niveles de las respectivas ciclinas) requiere la activación del complejo transcripcional SBF (Swi4/Swi6) por la actividad Cln3/Cdc28 quinasa. Sobre este control positivo de SBF basado en último término en los niveles de Cln3 (que serían independientes de la "historia" de los ciclos previos), se superpone un control negativo dependiente de las ciclinas mitóticas. Así, se ha demostrado recientemente que los complejos Cdc28-Clb mitóticas interaccionan con la subunidad Swi4 impidiendo que ésta forme complejos SBF. Sólo cuando las ciclinas mitóticas son destruídas al final de la mitosis, Swi4 queda libre para participar en complejos SBF activables por Cln3. Este doble control negativo/positivo sobre SBF (y por tanto sobre la síntesis de ciclinas G<sub>1</sub>) asegura que sólo se inicie un nuevo ciclo cuando se dan dos condiciones a la vez: (i) la finalización de la mitosis previa, y (ii) la adquisición de un tamaño celular crítico.

**(v) Las ciclinas G<sub>1</sub> se requieren para la adquisición de niveles elevados de ciclinas mitóticas (Amon et al., 1994; Maher et al., 1995; Seufert et al., 1995)**

La expresión de las ciclinas mitóticas depende de factores transcripcionales diferentes a los requeridos para la expresión de las demás ciclinas. En el caso de Clb2, se ha demostrado que depende de la proteína Mcm1, un factor multifuncional implicado también en el cambio de tipo sexual en *S. cerevisiae*, la biosíntesis de arginina, etc., al reconocer secuencias concretas presentes en los genes involucrados. Mcm1 es el equivalente en levadura al factor de respuesta al suero (SRF) en células humanas. La especificidad en cada caso viene dada por factores adicionales formando complejos ternarios con Mcm1 y con el DNA. En el caso de *CLB2*, se cree que el factor adicional es la proteína SFF, que también conferiría periodicidad a la expresión de otros genes de fase G<sub>2</sub>-M. ¿Cómo se interrelaciona la expresión de las ciclinas mitóticas con la de las demás ciclinas? Aunque no se puede dar una respuesta taxativa, parece ser que la propia acumulación de complejos Clb-Cdc28 al final de la mitosis activa la proteólisis específica de las Clbs, que se mantiene activa durante la fase G<sub>1</sub> hasta que la propia acumulación de ciclinas G<sub>1</sub> (a su vez dependiente de la existencia de bajos niveles de ciclinas mitóticas, ver punto iv) induciría la destrucción de la maquinaria proteolítica y en consecuencia la nueva acumulación de ciclinas mitóticas. Así se cerraría el círculo por el cual las ciclinas G<sub>1</sub> y las ciclinas mitóticas serían totalmente

interdependientes entre sí para que su oscilación periódica mantuviese el ciclo celular en funcionamiento continuo. El "input" de información externa (crecimiento de biomasa celular en función del medio) vendría a través de Cln3.

## 2. DIVERSAS SEÑALES EXTERNAS DETIENEN EL CICLO CELULAR DE LAS LEVADURAS EN LA FASE $G_1$

Las ciclinas Cln1 y Cln2 constituyen el blanco de acción último de señales externas que causan la interrupción del ciclo celular de *S. cerevisiae* a nivel de  $G_1$ . El ejemplo mejor conocido es la vía de transmisión de la señal inducida por las feromonas sexuales (Kurjan, 1993; Herskowitz, 1995). Las células haploides de *S. cerevisiae* (tipo sexual  $\alpha$  o  $\alpha$ ) son estimuladas a conjugarse con células de tipo sexual opuesto cuando feromonas sexuales (factor  $\alpha$  o  $\alpha$ ) secretadas por aquellas interaccionan con receptores de la superficie de éstas. Dicha interacción constituye una señal que activa una vía de transmisión de la misma, resultando en la detención del ciclo a nivel de fase  $G_1$ , esto es, en forma de células no gemadas con dotación cromosómica 1N. Esta es condición imprescindible para que dos células de tipo opuesto en dicho estado conjuguen entre sí para formar un cigoto. Además de los cambios a nivel del ciclo, las feromonas inducen cambios en la polaridad del crecimiento celular que resultan en la emisión de prolongaciones hacia las células de tipo sexual opuesto. El elemento central de la vía de transmisión es una cascada de MAP quinasas (Ste11, Ste7 y Fus3, acopladas estéricamente por la proteína Ste5). Fus3 es homóloga a MAP quinasas de mamíferos, y una vez activada por fosforilación es capaz, a su vez, de fosforilar la proteína Far1. Al igual que la antes citada p40, Far1 actúa (en su forma fosforilada) como inhibidor de complejos ciclina-quinasa, en este caso de los complejos Cdc28-Cln1,2 al interaccionar directamente con éstos, lo que conduce a la parada del ciclo en  $G_1$ .

Sin embargo, el papel de Far1 como inhibidor de CDKs probablemente no se limite a la respuesta a feromonas sexuales, puesto que en un ciclo celular normal su nivel oscila con un máximo al comienzo de  $G_1$ , desapareciendo en fase  $G_1$  avanzada y en fase S; esta oscilación es consecuencia tanto de una regulación transcripcional como de una regulación postranscripcional por fosforilación y proteólisis. Así, Far1 sería un regulador negativo de la actividad quinasa mediada por Cln1 y Cln2, lo que se añadiría a los mecanismos descritos en apartados previos para mantener dicha actividad a niveles bajos excepto en aquella ventana del ciclo celular en que es imprescindible. Lo que hacen las feromonas sexuales es inducir constitutivamente la inhibición del ciclo por Far1.

Aún cuando los mecanismos estén peor caracterizados que en el caso de las feromonas sexuales, el estado nutricional del medio también regula el desarrollo del ciclo celular a nivel de fase  $G_1$  (Werner-Washburne *et al.*, 1993). Así, las células de levadura que han entrado en la fase estacionaria del crecimiento poblacional o que han sido privadas de nutrientes esenciales (fuente de nitrógeno, azufre, fósforo, hierro, etc.) detienen su crecimiento

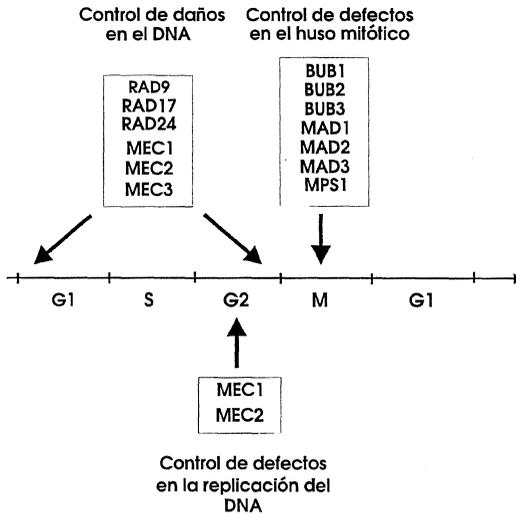
uniformemente en forma de células no gemadas con un nivel indetectable de ciclinas  $G_1$ . El hecho de que mutantes con niveles constitutivamente elevados de proteína quinasa A no respondan del modo citado a la carencia de nutrientes permite implicar esta enzima (cuya actividad, por otra parte, es regulada por la vía Ras a través del AMP cíclico) en la respuesta indicada. Diversos resultados de nuestro grupo conducen a afirmar que las ciclinas  $G_1$  son blanco de acción de la señal de falta de nutrientes. Así, (i) la expresión ectópica de ciclinas  $G_1$  en células carentes de fuente de nitrógeno permite que las células gemen en estas condiciones, y (ii) la vida media de las ciclinas  $G_1$  en condiciones de falta de nitrógeno es significativamente menor que en células con niveles normales de nutrientes.

En determinadas condiciones (presencia de fuente respirable de carbono junto a falta de otros nutrientes) las células diploides de *S. cerevisiae* obligadas a detenerse en  $G_1$  inician un programa diferente de desarrollo, con un ciclo de división meiótica que conduce a la formación de esporas haploides.

### **3. LAS CÉLULAS EUCARIOTAS POSEEN FUNCIONES QUE CONTROLAN EL DESARROLLO CORRECTO DEL CICLO DE DIVISIÓN**

Hartwell y Weinert (1988) propusieron, a partir de datos genéticos obtenidos con células de levadura, el concepto de "punto de control" del ciclo (checkpoint) como aquel punto(s) en el que la célula es capaz de detectar errores en el desarrollo previo del ciclo y detener éste hasta corregir los errores. De este modo, la célula asegura que las células hijas resultantes de la división mitótica no hereden defectos en el material genético (resultantes de una incorrecta replicación o segregación cromosómica o de la acción de agentes físicos o químicos externos) que podrían ser letales para ella.

Como en el caso de las funciones implicadas en el desarrollo normal del ciclo celular eucariota, la manipulación genética factible en levaduras hace que sea en estos organismos donde se haya avanzado más en el conocimiento de las funciones implicadas en los puntos de control del ciclo (Murray, 1995). A nivel teórico se puede establecer que cada punto de control requiere tres componentes: un sistema detector del defecto, una vía que transmita la correspondiente señal y un componente de la maquinaria del ciclo celular que reciba la señal y detenga éste. En paralelo, la célula debe poseer los mecanismos reparadores (constitutivos o inducibles) de los errores en el material genético. En función de los estadios del ciclo implicados, hasta el momento se puede hablar de tres puntos de control en *S. cerevisiae*: (i) control de daños en el DNA (a nivel de fases  $G_1$  y  $G_2$ ), (ii) control de errores en la replicación que puedan conducir a una replicación incompleta (en fase  $G_2$ ), y (iii) control de defectos en el ensamblaje del huso mitótico (en fase M) (Figura 3).

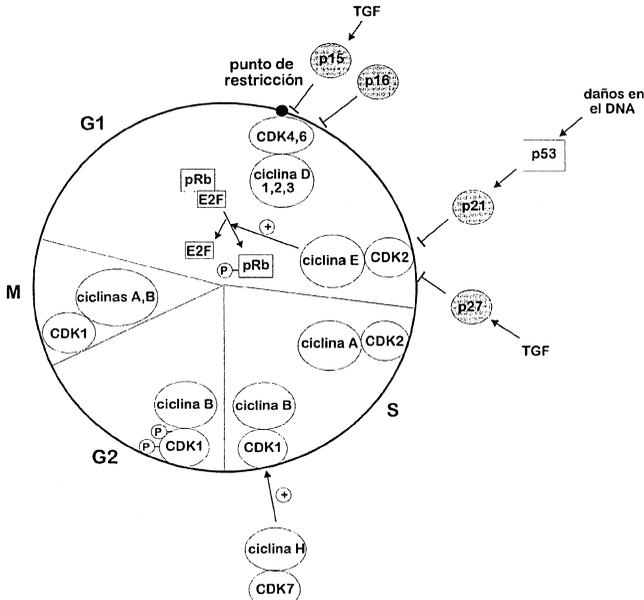


**Figura 3.-** Genes implicados en el control de las alteraciones producidas durante el desarrollo del ciclo celular en *S. cerevisiae*. Los productos de dichos genes causan la detención del ciclo celular en los estadios indicados en respuesta a: (a) daños en el DNA, (b) replicación incompleta del DNA durante la fase S, o (c) defectos en el ensamblaje del huso mitótico durante la fase M

Se han definido una serie de genes implicados en cada uno de los tres puntos, mutaciones en los cuales conducen en ciertos casos a defectos irreversibles para la célula (Murray, 1995). Algunas funciones genéticas participan en más de un punto de control a la vez. Sin embargo, aun falta una caracterización detallada del orden de actuación de los genes y de las vías de señalización implicadas.

#### 4. LOS EUCARIOTAS SUPERIORES UTILIZAN LOS MISMOS ELEMENTOS QUE LAS LEVADURAS PARA REGULAR SU CICLO CELULAR

De la descripción de la regulación del ciclo celular en *S. cerevisiae* se deduce que los elementos esenciales son las CDKs, las ciclinas asociadas a éstas y proteínas inhibidoras de la actividad de los complejos ciclina-CDK (CKIs). Estos mismos elementos participan en la regulación del ciclo en eucariotas superiores, aun cuando con ciertas particularidades que reflejan la mayor complejidad de las células de metazoos en la respuesta a estímulos externos que afectan a la proliferación celular (Draetta, 1994; Sherr, 1994; Morgan, 1995) (Figura 4).



**Figura 4.-** Esquema del ciclo celular en eucariotas superiores. Los inhibidores de los complejos ciclina-CDK se indican en sombreado. Vease el texto para más detalles.

En primer lugar, se han descrito hasta el momento siete CDKs diferentes en células humanas. Las esenciales serían CDK1 (también denominada Cdc2, homóloga estructural y funcionalmente a la Cdc28 de *S. cerevisiae* y a la Cdc2 de *Schizosaccharomyces pombe*), CDK2 y CDK4-6, actuando respectivamente en las fases G<sub>2</sub>-M, G<sub>1</sub>-S y G<sub>1</sub> temprana. Además de su activación por las correspondientes ciclinas y su inhibición por CKIs, las CDKs de eucariotas superiores están sometidas a un control por fosforilación (este tipo de control es también importante en *Schiz. pombe* pero hasta el momento no se ha revelado esencial en *S. cerevisiae*). Mientras que la fosforilación de residuos conservados de Thr (en posición 160 o 161 en las CDKs humanas) activa éstas, la fosforilación de dos residuos de Thr y Tyr cerca del extremo N-terminal las inactiva. Recientemente, se ha demostrado que la fosforilación en Thr 160/161 requiere a su vez una actividad quinasa dependiente de ciclina (complejo CDK7-ciclina H, en el cual la actividad CDK7 necesita que un residuo Thr170 esté fosforilado ¿por qué otra quinasa?). ¿Cómo se relaciona la activación de las CDKs por las ciclinas con la activación por fosforilación? Parece ser que la interacción entre la molécula de CDK y la de ciclina produce un cambio conformacional que facilitarí­a el acceso de la correspondiente quinasa al residuo de Thr de la CDK. Debe quedar claro, no obstante, que el papel de la ciclina no se limita a lo anterior, puesto que además (y esencialmente) confiere especificidad de sustratos fosforilables.

Además de un mayor número de CDKs, los eucariotas superiores también poseen un mayor número de tipos de ciclinas. Las ciclinas tipo D (D1, D2, D3) pueden considerarse como las equivalentes funcionales de las Clns de levadura (aún cuando el nivel de homología sea muy bajo), asociándose con CDK4 y CDK6. Existen evidencias de que los complejos ciclina D-CDK4,6 (actuando a nivel del punto de restricción del ciclo) son los receptores de señales inducidas por factores de crecimiento. En un estadio más avanzado de G<sub>1</sub> actúa la ciclina E asociada a CDK2. El papel esencial de esta actividad es la fosforilación de pRb (proteína del retinoblastoma), que en su forma no fosforilada forma complejo con el factor transcripcional heterodimérico E2F-DP1, bloqueando la actividad de éste último. Puesto que E2F-DP1 es esencial para la expresión de genes de fase S, la fosforilación de pRb por ciclina E-CDK2 conduce a la célula a la fase S. Ya en fase S, entra en acción la ciclina A asociada a CDK2. La entrada en mitosis requiere la acción de la quinasa CDK1 asociada a ciclina B. Esta última es la que muestra un más elevado grado de homología con las ciclinas de levadura, en concreto con las Clbs. La homología de los complejos ciclina B-CDK1 de células superiores con los complejos Clb-Cdc28 de levadura (considerablemente mayor que la de otros complejos ciclina-CDKs) ha llevado a sugerir que en células eucarióticas primitivas la regulación del ciclo ocurriría a nivel de entrada en mitosis, siendo la regulación a nivel de Start/punto de restricción una adquisición evolutiva posterior.

Cuatro son las CKIs caracterizadas hasta el momento en células humanas. Las CKIs p15 y p16 inhiben la actividad de los complejos ciclina D-CDK4,6, mientras que p21 y p27 inhiben la de los complejos ciclina E-CDK2 y probablemente también ciclina A-CDK2. Estas CKIs reciben señales externas, induciendo la detención del ciclo en respuesta a las mismas. Así, p15 y p27 median la detención de la proliferación celular por acción de TGF $\beta$ . p21 (también denominado WAF1, SDI1 o CIP1) es un elemento esencial en el punto de control en G<sub>1</sub> en respuesta a daños en el DNA. La presencia de lesiones en éste activan la proteína p53, que actúa como activador transcripcional del gen que codifica p21. El aumento consiguiente en los niveles de p21 inhibe la actividad quinasa de ciclina E-CDK2 sobre pRb, por lo que detiene el crecimiento en G<sub>1</sub>, impidiendo que las células dupliquen el DNA dañado y por tanto establezcan posibles mutaciones. La detención del crecimiento puede ser transitoria hasta que las células reparan los daños, o alternativamente las células pueden entrar en un proceso apoptótico, lo que explica el papel mediador de p53-p21 en la apoptosis.

El modelo de ciclo celular descrito ayuda a comprender que muchos de los elementos citados estén implicados en procesos de transformación celular (Hunter y Pines, 1994; Harper y Elledge, 1996). Entre los casos más significativos están pRb y p53 como supresores de tumores; un número muy significativo de líneas tumorales poseen mutaciones inactivadoras de los respectivos genes. Respecto de los elementos internos del ciclo, se han descrito alteraciones que conducen a la sobreexpresión de ciclinas D, A y E con actividad transformante, así como líneas tumorales con mutaciones inactivadoras de las CKIs p16 y p21. Por otra parte, diversos virus tumorales DNA utilizan la disregulación de elementos del ciclo como estrategia para la inmortalización

celular (Jansen-Dürr, 1996). De entre los oncovirus humanos los ejemplos más significativos son los papilomavirus (HPV) con alto potencial oncogénico y el virus Epstein-Barr (EBV). El tipo 16 de HPV emplea paralelamente las proteínas víricas E7 para inactivar pRb y E6 para inactivar p53 y suprimir la apoptosis de las células infectadas. La estrategia de EBV es diferente, activando la expresión del gen de la ciclina D2. Resulta comprensible que los oncovirus con genoma de DNA hayan coevolucionado con las células eucariotas hospedadoras en su capacidad para interactuar con los mecanismos reguladores del ciclo en respuesta a señales externas y así asegurarse unas condiciones intracelulares óptimas para su multiplicación.

## 5. CONCLUSIONES

El ciclo celular eucariota se puede considerar, en células no comprometidas en procesos específicos de diferenciación, como una maquinaria funcionando constantemente gracias a la acción de complejos ciclina-CDK sobre sustratos específicos. Las levaduras utilizan una única CDK que se asocia a diversas ciclinas a lo largo del ciclo. En *S. cerevisiae* el control del ciclo ocurre esencialmente a nivel de G<sub>1</sub>, fase en que las células monitorizan la biomasa celular para iniciar un nuevo ciclo y son capaces de recibir señales externas e interrumpir el ciclo en respuesta a ellas. A partir de este punto de control en G<sub>1</sub>, diversos mecanismos interrelacionados de control transcripcional y postraduccional, en los que también intervienen inhibidores de los complejos ciclina-CDK, permiten que se complete el ciclo. Los eucariotas superiores utilizan los mismos elementos de control, aun cuando intervienen diversas CDKs a lo largo del ciclo así como una mayor variedad de ciclinas. Ello conduce a una mayor variedad de combinaciones ciclina-CDK, probablemente reflejo de un mayor número de sustratos fosforilables, y por tanto a una mayor capacidad de recepción de señales externas en diferentes puntos del ciclo y de respuesta específica a las mismas. Esto conlleva también que el control a nivel de G<sub>2</sub> sea tan esencial como el ejercido en fase G<sub>1</sub>.

## 6. REFERENCIAS

- Amon, A.; S. Irniger & K. Nasmyth (1994). Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins the next cycle. *Cell* 77:1037-1050.
- Dirick, L.; T. Böhm & K. Nasmyth (1995). Roles and regulation of the Cln-Cdc28 kinases at the START of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14:4803-4813.
- Draetta, G.F. (1994). Mammalian G<sub>1</sub> cyclins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:842-846.

- Forsburg, S. & P. Nurse (1991). Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:227-2.
- Futcher, A.B. (1990). Yeast cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2:246-251.
- Harper, J.W. & S.J. Elledge (1996). Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6:56-64.
- Hartwell, L.H. & T.A. Weinert (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246:629-634.
- Helmstetter, C.E. (1996). Timing of synthetic activities in the cell cycle. In *Escherichia coli* and *Salmonella: Cellular and Molecular Biology* (F.C. Neidhardt *et al.*, eds.), pp. 1627-1639. ASM Press, Washington, USA.
- Herskowitz, I. (1995). MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* 80:187-197.
- Hunter, T. & J. Pines (1994). Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come to age. *Cell* 79:573:582.
- Jansen-Dürr, P. (1996). How viral oncogenes make the cell cycle. *Trends Genet.* 12:270-275.
- Koch, C. & K. Nasmyth (1994). Cell cycle regulated transcription in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:451-459.
- Koch, C.; A. Schleiffer, G. Ammerer & K. Nashmyth (1996). Switching transcription on and off during the cell cycle: Cln/Cdc28 kinases activate bound transcription factor (Swi4/Swi6) at START, whereas Clb/Cdc28 kinases displace it from the promoter in G2. *Genes Dev.* 10:129-141.
- Kurjan, J. (1993). The pheromone response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* 27:147-179.
- Lew, D.J. & S.I. Reed (1992). A proliferation of cyclins. *Trends Cell Biol.* 2:77-81.
- Maher, M.; F. Cong, D. Kindelberger, K. Nasmyth & S. Dalton (1995). Cell cycle-regulated transcription of the *CLB2* gene is dependent on Mcm1 and a ternary complex factor. *Mol. Cell. Biol.* 15:3129-3137.
- Morgan, D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* 374:131-134.
- Murray, A.W. (1995). The genetics of cell cycle checkpoints. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5:5-11.
- Nasmyth, K. (1993). Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:166-179.

- Piatti, S.; T. Böhm, J.H. Cocker, J.F.X. Diffley & K. Nasmyth (1996). Activation of S-phase-promoting CDKs in late G1 defines a "point of no return" after which Cdc6 synthesis cannot promote DNA replication in yeast. *Genes Dev.* 10:1516-1531
- Schwob, E.; T. Böhm, M.D. Mendenhall & K. Nasmyth (1994). The B-type cyclin inhibitor p40<sup>SIC1</sup> controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* 79:233-244.
- Seufert, W., B. Futcher & S. Jentsch (1995). Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature* 373:78-83.
- Sherr, C.J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79:551-555.
- Werner-Washburne, M., E. Braun, G.C. Johnston & R.A. Singer (1993). Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 57:383-401.
- Wuarin, J. & P. Nurse (1996). Regulating S phase: CDKs, licensing and proteolysis. *Cell* 85: 785-787.