

# Caracterización Molecular de Nuevos Substratos de la CDK Pho85

Natalia Ricco Pacheco

Dipòsit Legal: B. 20716-2013

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Universitat Internacional de Catalunya  
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

# Caracterización molecular de nuevos substratos de la CDK Pho85

Natalia Ricco Pacheco

2013





# Caracterización molecular de nuevos substratos de la CDK Pho85

Natalia Ricco Pacheco

Memoria presentada para optar al título de doctor por la  
Universitat Internacional de Catalunya.

Barcelona, 2013

Trabajo dirigido por el Dr. Josep Clotet Erra del área de  
Ciencias Básicas de la Universitat Internacional de Catalunya.

Programa de Doctorado en Investigación en Salud de la  
Universitat Internacional de Catalunya

---

Dr. Josep Clotet Erra

Director de tesis

---

Natalia Ricco Pacheco

Doctoranda



*A Carlos, mi compañero del camino.*

*A mis padres, quienes me enseñaron el camino.*



*When you make the finding yourself –even if you are the last person  
on Earth to see the light– you will never forget it*

Carl Sagan





## AGRADECIMIENTOS

---



La experiencia de realizar la tesis doctoral ha sido similar a una larga excursión: un camino con diferentes etapas (algunas más llanas y otras más escarpadas), que como resultado del esfuerzo e ilusión invertidos, he logrado completar. La superación de este camino no habría sido posible sin la participación de diferentes caminantes que, o bien han seguido la misma ruta o bien hemos coincidido en alguna intersección, pero que de una manera u otra me han ayudado, alentado y acompañado.

Son muchas las personas a las que debo agradecer e intentaré no olvidarme de nadie, pero me gustaría comenzar por Pep, mi director de tesis, agradeciéndole haberme dado la oportunidad de formar parte de un proyecto tan cargado de sentimientos y responsabilidades, como es el nacimiento de un nuevo grupo de investigación: no ha sido tarea fácil pero lo has conseguido y te agradezco ser parte de su historia. También agradezco la confianza depositada en todo lo referente a la docencia, un campo del cual también me has enseñado mucho y que algún día espero poder defender como tú.

Los momentazos de mi querido *yeast group* también se merecen todo mi agradecimiento. A la ya Dra. Pocoyo, gracias por invitarme a formar parte de tu día a día, no solamente en la rutina del laboratorio (que contigo, poco tenían de rutina) sino también por abrirme la puerta de tu vida personal. Resulta difícil cuantificar las confianzas a altas horas de la noche en el lab, entre western y western, pero más difícil es darles un valor, porque no tienen precio. Gracias también a Sarakatunga y su amplio repertorio de sonidos animales que muchas sonrisas me han robado, aunque no tantas como los ensayos para nuestro gran estreno bailando Single Ladies... sinceramente, creo que tenemos futuro. Gracias también a mi alumno más aventajado en el máster, Lo Samu.... un chico un tanto tímido que llegó a un grupo nuevo con tres chicas como compañeras y a pesar de no saber si sobreviviría a tanta hormona femenina, decidió quedarse... un valiente!, contigo también he vivido grandes momentos (momento Samu post café, imperdible!) y te los agradezco. Desde no hace mucho, llegó sangre nueva y crecimos en todos los aspectos: a Oriol, el benjamín del grupo, gracias por compartir tu

## AGRADECIMIENTOS

tiempo “libre” con nosotros y por acompañarnos tanto en los experimentos del laboratorio como fuera de él: da igual si se trata de bailoteo o de excursiones por la nieve, siempre has estado al pie del cañón. Eli, mi dulce y guapa Eli, gracias por tener siempre ese buen humor y por la intensa charla a la vuelta de Planoles. A Bobby, gracias por soportar con esa clase que te cambiamos el nombre con tanta frecuencia y a Eva por ser mi compañera de pronunciación... ya no me siento tan sola cuando digo “sielo” y por fin alguien entiende que el gofio sea tan rico! Dado el poquito tiempo que lleváis aquí, no hemos compartido muchas experiencias, pero me es suficiente para ver que esto promete, y mucho! Y finalmente, JJ, no sabes cuánto significa para mí tenerte entre nosotros, me viste nacer como investigadora y ahora formamos parte de la misma familia: gracias por tu tiempo y tus sabios consejos.

Pero este despacho es muy grande, más personas me han arropado en este camino y de todos he aprendido algo. Me quedo con la fuerza y la energía de Esther, que además de darlo todo en la poyata y en las aulas, te sobran fuerzas para dar aún más en tu casa, gracias también por compartir un poquito a Laia con nosotros y hacernos partícipes de tu vida. De Patri desde que la conocí quise imitar su sentido de la perfección, tanto con las libretas como en su día a día, gracias por los buenos momentos y los paseos por Oviedo. Mi lado artístico despertó de la mano de Tania con la que creamos nuestro gran hit “La fuente se apagó”... todo esto después de atacar al Panettone aquella noche de invierno en el lab, gracias por amenizar aquellos días interminables. Monicot, mi compañera de escritorio durante tus últimos meses aquí, tu eres auténtica y es algo que recuerdo siempre que me pongo esa bufanda tan calentita que me regalaste, gracias por ese incansable espíritu marchoso. Alex, mi otro vecino de escritorio, no ver tus montañas de papeles y no tener a quien pedirle que saque punta a mis lápices me tiene traumatizada, gracias por todas las charlas de todos estos años. Todos vosotros ya no estáis en el lab, pero os puedo asegurar que en cada rincón aparece algo, de forma física (una nota, un dibujo, una etiqueta) o en forma de recuerdo (disfraces, bailes, carreras en sillas) que me permite

## AGRADECIMIENTOS

teneros siempre presentes. Otras personas formaron parte del camino y aún siguen aquí: Aspi, una gran persona a la que quiero mucho y de la que espero se me haya pegado un poquito de “arte” a la hora de bailar, tú también eres una de las personas más auténticas que he conocido y espero que nunca cambies. Giorgi, mi gran maestro de catalán que con tanta paciencia me ayudas a pronunciar o me aclaras muchos conceptos políticos que no sabía ni que existían, gracias por tu tiempo y por las ganas que pones en todo lo que haces. A ti Aloa, podría agradecerte las cenas en tu casa, las noches de fiesta en el cangrejo o la dedicación en los videos de tesis.... pero me voy a quedar con la lección de vida que nos diste hace poco más de un año y el concepto de que una actitud positiva mueve montañas! Te agradezco también que aquel momento importante de mi vida en Peralada, fuese tu punto de motivación hacia la recuperación. No me quiero olvidar tampoco de tu Jordi y su inestimable apoyo logístico en la elaboración de videos. A la entendida en plantas que brillan, Arantxa, gracias por tu implicación en todos y cada uno de los proyectos que hemos decidido llevar adelante.... te has encargado desde hacer calçots hasta la compra de material indispensable para la supervivencia de los becarios (nevera, máquina de café, regalitos) sin olvidar de la confección de un vestido de princesa para una que yo se.... y por supuesto, gracias por hacer partícipe de todo a Kimet, que no ha dudado en alegrar todas nuestras veladas y se ha convertido en uno más del lab. Maca, gracias por ser tan dulce: tu cantarín “buenos días ricura” ayudan a cualquiera a comenzar el día con una sonrisa. Y si a esto le sumamos el interés y la preocupación de la buenaza de MC para que salga a hacer café, hacen que cualquier atisbo de mal humor, se vaya volando. Además MC, sabes que esa actitud cándida y positiva me recuerda a una persona que tengo muy lejos y que echo de menos... gracias por cuidarme así!. Xavi, gracias por los pastelitos noruegos y por tu buen humor y Rut, ¿qué sería de mí sin una compañera para contestar el teléfono del despacho?. A las técnico de laboratorio más divertidas y especiales que he conocido, las “Martas”. Marta P, gracias por esa actitud arrolladora que hace que dejes huella allá por donde pasas, tu ayuda en el laboratorio es inestimable. Marta G, mi Martot querido, como solía decirte por aquella época: “sos la número uno”.

## AGRADECIMIENTOS

Gracias por abrir tu corazón y dejarme hacer lo mismo contigo, gracias por los sinceros y sensatos consejos, las clases de catalán, las invitaciones a desayunar y los súper bailoteos. Tampoco puedo dejar de agradecer a los “Manolitos” de las DPSSC: Maher, el Manolo Mayor, siempre dispuesto a compartir un café y una buena charla y sus Manolines: Carlos y Ester gracias por estar siempre con nosotros y ser parte del lab aunque estéis en la otra punta de la UIC. Marc y Dani, aunque ya no estáis aquí os llevo en el corazón y os recuerdo como a los “peques de odonto”.

Gracias también a los estudiantes-becarios que habéis pasado por el lab: Jordi, el primero de todos, gracias por estar siempre dispuesto a mantener las reservas de puntas a tope. Dani “Lo Becari” gracias por las profundas y filosóficas charlas acerca del amor y los objetivos de la vida. Y Pedrito, gracias por tu gran ayuda en los quehaceres del laboratorio y por hacerme partícipe de tus logros como persona: fuiste uno de mis primeros alumnos y me encanta poder ver los escalones que subes con tanto esfuerzo, estoy segura de que llegarás muy lejos y me enorgullece.

Mil gracias también al personal de la UIC cuyo trabajo nos facilita el día a día: Edu y Alfonso, los informáticos que rápidamente vienen a socorrernos cuando los ordenadores deciden hacer huelga o perdemos un archivo valiosísimo. El equipo de seguridad: Fran, Emi, Cristian y David muchas gracias por estar siempre disponibles para abrir y cerrar el laboratorio y por estar tan pendientes de nuestro bienestar. A Súper Encarna por venir a socorrernos cuando hay “accidentes acuáticos”, a Antonio, Miguel y Estefano por el mantenimiento del laboratorio y finalmente, también resta agradecer su trabajo a las secretarias más guapas, Nati y Asun.

También agradezco a Nuria y Agustín, los otros jefes del departamento con los que tantos bombones y pastas hemos compartido, además de seminarios, excursiones de *boletaires* y alguna que otra calçotada con partida de Trivial incluida.

## AGRADECIMIENTOS

Afortunadamente, durante estos años he podido hacer más cosas a parte de experimentos: la docencia ha ocupado parte de mis días y no puedo dejar de agradecer en primer lugar, a todos y cada uno de los alumnos con los que llevo compartiendo parte de mi tiempo desde el 2008. Agradezco vuestro interés e ilusión... muchas de las sensaciones que me habéis transmitido han dado sentido a cada clase preparada y me han ayudado a crecer. A parte de los alumnos y relacionado con la docencia, no puedo dejar de agradecer a Albert, por haberme iniciado en el arte de la coordinación de cursos y por su atención en nuestras charlas docentes y de la vida. Tampoco me olvido de aquellas personitas escondidas en el decanato y que tantos consejos y ayuda me habéis proporcionado: Bea, María, Marta y Carlos... gracias!

Fuera del laboratorio, quiero agradecer a dos grandísimas personas que han estado siempre pendientes de la evolución de este camino: a mi amiga Sylvia-Endje, por acompañarme, comprenderme y alentarme a pesar de la distancia y a Raquel, porque he encontrado en ti una persona que de verdad me entiende!... gracias por nuestras comidas de *tupper* y por estar siempre dispuesta a prestarme tu ayuda en todo.

Son muchas las buenas experiencias que me ha regalado esta tesis, pero sin lugar a dudas, una de las mejores ha sido conocerte a ti, Elena. Una de las mejores personas que me he encontrado en este camino: sincera, leal y transparente. De todo lo que hemos compartido, agradezco haber entrado en tu vida, haber conocido al buenazo de Xavi y ser oficialmente la tita bióloga de la pequeña y guapísima Júlia. Solo por conoceros, este camino ha valido la pena, os quiero.

Completar un camino puede resultar más o menos complicado, pero desde luego no habría podido seguirlo sin los pilares emocionales que representa mi familia, aquellos seres que aunque no entiendan muy bien por qué estudias tantos años, que significa eso de publicar o por qué las horas de trabajo no van relacionadas al sueldo, te escuchan y te alientan a perseguir aquello que forma parte de tus sueños. Mari Carmen y Antonio mis fieles e incondicionales fans, sin la ayuda de los cuales me habría costado muchísimo llegar hasta aquí, muchas, pero muchas

## AGRADECIMIENTOS



gracias por creer en mí. Gracias también al resto de la familia García por todos los momentos divertidos y emotivos que hemos vivido, sin los cuales nada de esto tendría sentido. A mis hermanos Claudio, Miguel y Paula gracias por vuestro interés en aquello que sabéis me hace tanta ilusión: vuestra curiosidad por aquello a lo que tanto esfuerzo dedico, me impulsa. A mi lejana en lo geográfico pero cercana en lo sentimental hermana Carla, gracias por tus bases en el inglés, idioma que tanto aplico actualmente y por el ejemplo a seguir en el idioma de la vida: hablar desde el corazón, una lengua que me ha permitido llegar lejos en muchos aspectos. Y a todos y cada uno de mis sobrinos, gracias por ser mi tesoro, pensar en vosotros me da fuerzas esos días en los que las cosas cuestan un poquito más.

A mis padres, además de todo mi agradecimiento, dedico esta tesis, porque sin los valores que se han esforzado en transmitirme, no habría conseguido llegar hasta aquí. Creo que nunca seré capaz de poder agradecer y devolver tanto cariño, tanto respeto por mis decisiones y sobre todo tanto amor y dedicación. Seguramente no sois conscientes de la importancia de vuestras acciones porque os sale del corazón, pero es algo que me ha hecho sentir segura frente a cada paso. Os debo todo, espero que os sintáis orgullosos de este trabajo.

Y ya para acabar, Carlos, mi permanente e incondicional compañero de camino, a ti tengo tantas cosas que agradecer, que ni las páginas de una enciclopedia de veinte tomos me alcanzarían. Gracias por el apoyo moral y logístico que me has dado a la hora de llevar adelante este proyecto: no todas las parejas comprenden la dedicación a este trabajo y tú además de entenderlo, me has apoyado, haciendo que Pho85 fuese tan tuyo como mío. Gracias por tus consejos cuando las cosas no iban bien, por tus ánimos cuando mejoraban y por tu confianza cuando el resultado era desconocido. Gracias por caminar a mi lado ayudándome sin condiciones a lograr este objetivo, a cumplir este sueño. T'estimo.

A todos y cada uno de vosotros: Gracias.

*Natalia.-*

## AGRADECIMIENTOS

## INDICE

---



<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	23
1. PRESENTACIÓN.....	25
2. EL CICLO CELULAR.....	27
3. MAQUINARIA DEL CICLO CELULAR .....	30
3.1 Proteína quinasa dependiente de ciclina (CDK).....	30
3.2 CDC28:.....	33
3.2.1 Ciclinas de Cdc28 .....	33
3.2.2 Cln3, una ciclina especial. ....	35
3.2.3 Activadores e inhibidores de Cdc28.....	38
3.3 PHO85:.....	39
3.3.1 Ciclinas de Pho85 .....	39
3.3.2 Activadores e inhibidores de Pho85 .....	40
3.3.3 Funciones de Pho85.....	41
3.3.4 Homólogo de Pho85 en mamíferos .....	46
4. SISTEMAS DE DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS .....	48
4.1 Tipos de E3.....	51
4.1.2 Complejo SCF y APC .....	51
4.1.3 HECT E3 ligasas.....	52
4.1.4 RING E3 ligasas: .....	53
<b>HIPÓTESIS</b> .....	57
<b>OBJETIVOS</b> .....	61
<b>CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA REGULACIÓN DE PHO85 SOBRE CLN3</b> .....	65
<b>RESULTADOS</b> .....	69
1. FOSFORILACIÓN <i>IN VITRO</i> DE CLN3.....	71
2. CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS DE FOSFORILACIÓN.....	73
3. ANÁLISIS DE INTERACCIÓN <i>IN VIVO</i> DE PHO80 Y CLN3 .....	77

4. ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN <i>IN VIVO</i> DE CLN3 .....	78
5. ANÁLISIS DE RELEVANCIA FISIOLÓGICA DE S449 Y T520 .....	80
6. EFECTO DE S449 Y T520 EN EL CICLO CELULAR.....	82
DISCUSIÓN.....	85
CONCLUSIONES .....	95
<b>CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA REGULACIÓN DE PHO85 SOBRE DMA1 .....</b>	<b>99</b>
RESULTADOS.....	103
1. DETECCIÓN SUBSTRATOS ESPECÍFICOS DE PHO85-PCL1... ..	105
2. FOSFORILACIÓN <i>IN VITRO</i> DE DMA1 Y RSP5 .....	109
3. ESPECIFICIDAD DE FOSFORILACIÓN SOBRE DMA1 .....	111
4. FOSFORILACIÓN <i>IN VITRO</i> DE DMA2.....	112
5. CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS DE FOSFORILACIÓN... ..	112
6. ENSAYO DE AUTOUBIQUITINACIÓN <i>IN VITRO</i> DE DMA1... ..	114
7. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE DMA1 EN FUNCIÓN DE SU ESTADO DE FOSFORILACIÓN .....	118
8. ESTUDIO DE LA RELEVANCIA DE S9 Y T14 SOBRE LA ACTIVIDAD LIGASA DE DMA1.....	119
9. ANÁLISIS INTERACCIÓN <i>IN VIVO</i> ENTRE PHO85 Y DMA1 ... ..	121
10. ANÁLISIS DE FOSFORILACIÓN <i>IN VIVO</i> DE DMA1 .....	122
11. CANTIDAD DE DMA1 EN <i>pho85Δ</i> Y <i>pcl1Δpcl2Δ</i> .....	124
12. FUTURAS PERSPECTIVAS .....	127
DISCUSIÓN.....	131
CONCLUSIONES .....	141
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>145</b>
1. BIOLOGÍA MOLECULAR: DNA .....	147
1.1 OBSERVACIÓN DEL DNA.....	147
1.2 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.....	147
1.3 SECUENCIACIÓN DEL DNA.....	147

1.4 VECTORES PLASMÍDICOS .....	148
1.5 ESTRATEGIAS DE CLONACIÓN .....	150
1.6 ANÁLISIS DE COLONIAS OBTENIDAS POR CLONACIÓN...	151
1.7 CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS .....	152
1.8 ESTRATEGIAS ESPECIALES.....	154
2 BIOLOGÍA MOLECULAR: PROTEÍNAS .....	156
2.1 SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS .....	156
2.2 WESTERN BLOT. TRANSFERENCIA.....	156
2.3 WESTERN BLOT CON GELES PHOSTAG.....	158
2.4 ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL.....	159
2.5 ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	160
2.6 ENSAYO DE FOSFORILACIÓN <i>IN VITRO</i> .....	160
2.8 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A TAP.....	162
2.9 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A GST.....	162
2.10 CO-INMUNOPRECIPITACIÓN.....	163
3. MICROBIOLOGÍA: BACTERIA .....	165
3.1 CEPAS .....	165
3.2 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS.....	166
3.3 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A GST.....	166
4. MICROBIOLOGÍA: LEVADURA .....	167
4.1 CEPAS .....	167
4.2 CONDICIONES DE CRECIMIENTO .....	167
4.3 SINCRONIZACIÓN POR PRIVACIÓN DE FOSFATOS .....	168
4.4 SINCRONIZACIÓN CON $\alpha$ -FACTOR .....	168
4.5 CITOMETRÍA DE FLUJO .....	168
4.6 TRANSFORMACIÓN .....	168
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	171
RESUMEN EN INGLÉS .....	195
ANEXOS.....	205

ESPECTROS DE PROTEÓMICA: UBIQUITINACIÓN DE DMA1 .....	207
PUBLICACIONES.....	213

## INDICE

## INTRODUCCIÓN

---





## 1. PRESENTACIÓN

A lo largo del tiempo, las levaduras se han utilizado como organismo modelo en el campo de la investigación biomédica. Han permitido el estudio de funciones génicas individuales, así como la interacción de diversos genes y la estructuración de complejas vías de señalización. Gracias a esto han contribuido al entendimiento de la biología básica en otros eucariotas y en diversas enfermedades humanas.

Las levaduras disponen de una serie de ventajas que las vuelven idóneas como herramienta de laboratorio ya que son fáciles de cultivar, fáciles de manipular genéticamente (Botstein, Fink 1988) y se dispone de toda su información genómica, puesto que fue el primer organismo eucariota secuenciado (Dujon 1996). Además, una gran parte de sus genes se conservan en humanos, estando muchos de ellos, implicados en la regulación del ciclo celular (Foury 1997), por esta razón la levadura es uno de los mejores modelos para investigar cómo funciona la maquinaria de este proceso tan complejo como relevante.

Así, no es posible comenzar esta tesis doctoral sin una breve presentación del modelo de estudio empleado.

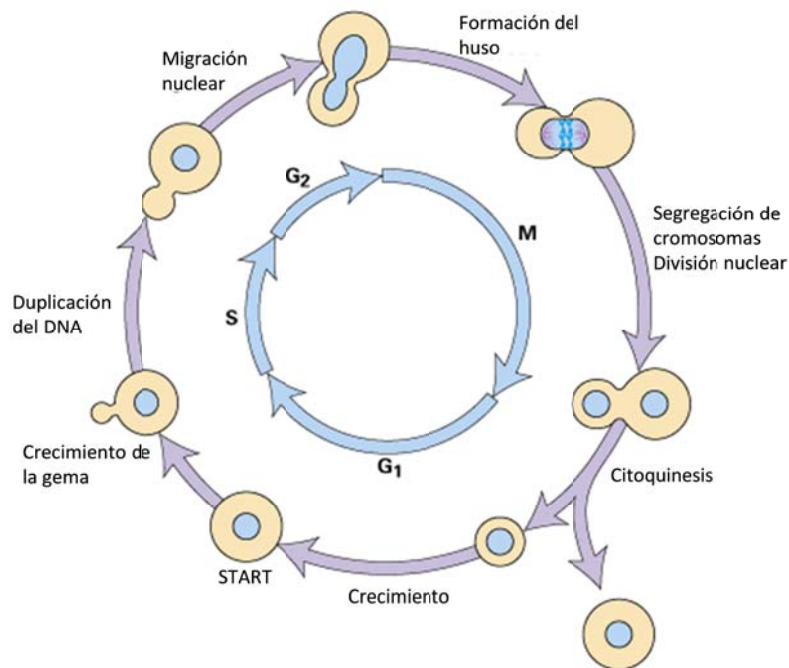
La levadura es un microorganismo eucariota que pertenece al reino de los hongos y que vive como saprófito en material animal o vegetal. Se trata de un organismo unicelular que depende exclusivamente de las condiciones del medio en el cual crece, por esta razón los mecanismos que han desarrollado para percibir los cambios en el ambiente, son sumamente importantes para generar una respuesta adecuada y garantizar la viabilidad celular. En particular, *Saccharomyces cerevisiae* crece preferentemente en frutas, flores y otros substratos ricos en azúcar. Usan diversos azúcares como fuente de carbono (glucosa, maltosa, fructosa, sacarosa, rafinosa), de hecho, en los experimentos realizados por Louis Pasteur en la década de 1860 se catalogó a esta levadura como la catalizadora de la fermentación y se pudo identificar los primeros enzimas, lo cual contribuyó al desarrollo de la bioquímica experimental.

Estos organismos también pueden usar fuentes de carbono no fermentables, como acetato, etanol o glicerol.

En su ambiente natural, las células de *S. cerevisiae* están expuestas a una gran variabilidad respecto a la cantidad de nutrientes, temperatura, pH, radiación, disponibilidad de oxígeno y agua (Hohmann 2002) pero esto no representa un gran problema, ya que pueden tolerar un amplio rango de condiciones ambientales. Incluso toleran las altas presiones osmóticas, ya que pueden crecer y fermentar en presencia de concentraciones de azúcar de 3M. Las concentraciones de etanol superiores al 20% también son compatibles con la vida de *S. cerevisiae* (Hohmann, Mager 1997). Esta gran variedad de condiciones que es capaz de tolerar, requiere diferentes estados fisiológicos en pro de maximizar la supervivencia celular. Así, disponen de mecanismos de señalización que aseguran la detección y respuesta a diversas situaciones, como cambios en el pH (Ariño 2010), temperatura (Jenkins 2003), disponibilidad de nutrientes (Dann, Thomas 2006) , presión osmótica (de Nadal et al. 2002) o presencia de células haploides (Dohlman, Slessareva 2006). La mayoría de estos mecanismos se mantienen en organismos pluricelulares y están implicados en diversas patologías.

La elegancia de los experimentos desarrollados en *S. cerevisiae* ha contribuido sustancialmente al conocimiento científico en las últimas décadas. Pero no es suficiente y sigue siendo necesario un soporte en el que diseñar nuevas aproximaciones moleculares que permitan comprender cómo funcionan los complejos engranajes de la vida. Por ello este pequeño gran organismo modelo, todavía tiene mucho que contar...

*S. cerevisiae* se divide por un proceso que es poco común en eucariotas, conocido como gemación (*budding* en inglés). Este, es un mecanismo de reproducción asexual asimétrico, donde la célula madre produce una pequeña gema o protuberancia, que crece y recibe el material genético duplicado, para finalmente separarse y convertirse en la célula hija. Así, la serie de eventos coordinados y secuenciales que se dan en el ciclo, darán lugar a la formación de dos células de diferente tamaño pero genéticamente idénticas (Figura 1).



**Figura 1.** Ciclo celular de *S. cerevisiae*. Se representa la evolución de la morfología en las diferentes etapas del ciclo, así como los principales eventos asociados a su progresión. Adaptada de Johns Hopkins University.

En los eucariotas, entre cada división celular todos los componentes esenciales de la célula tienen que ser duplicados. Los procesos de crecimiento celular, duplicación y separación del DNA ocurren en diferentes fases muy bien caracterizadas: el DNA y otros componentes se

duplican en la fase S (Síntesis), mientras que la segregación se da en la fase M del ciclo (Mitosis).

Estas fases, están separadas por dos períodos conocidos en inglés como *Gap* (agujero). Antiguamente se creía, que representaban fases de descanso antes de que la duplicación y división del material genético tuviesen lugar, pero más adelante se descubrió que los eventos que se producen en fase  $G_1$  (Gap1) y  $G_2$  (Gap2) son esenciales para la supervivencia celular.

Muchos de los aspectos relacionados con el ciclo celular se conocen gracias a estudios de células que contienen mutaciones letales condicionales (mutantes CDC, “*cell division cycle*”, Broach et al. 1991). Dentro de este conjunto de mutantes, se han identificado algunos que son necesarios en el final de la fase  $G_1$  y que bajo condiciones restrictivas, no pueden continuar con el ciclo. Este momento crítico al final de  $G_1$  es considerado como uno de los mayores eventos que controla el ciclo y es conocido como START (Johnston et al. 1977) , un punto de no retorno a partir del cual las células que han alcanzado un tamaño mínimo y viven en un medio con disponibilidad de nutrientes, se comprometen a completar la ronda de división celular (Dungrawala et al. 2012, Hall et al. 1998). START está compuesto por múltiples señales que conforman una señal de retroalimentación positiva, la cual produce la transcripción simultánea de aproximadamente 200 genes y asegura que las células no puedan volver hacia atrás, garantizando el progreso entre fases en una única dirección (Skotheim et al. 2008).

Es en este punto cuando la célula decide su destino entre las diferentes opciones de desarrollo: por un lado puede empezar una nueva ronda de división celular, otra opción (sólo válida para células haploides) es responder a la presencia de feromonas y activar el proceso de conjugación (MacKay 1978, Houser et al. 2012). En determinadas condiciones la célula también puede comenzar crecimiento pseudohifal (Gimeno et al. 1992) Y finalmente, si las condiciones celulares o ambientales no son las adecuadas, la célula entrará en fase de quiescencia o  $G_0$ . En presencia de estímulos específicos, las células en  $G_0$  pueden

volver a  $G_1$ , para comenzar una nueva ronda de división celular (De Virgilio 2012). Cuando las células no disponen de los mecanismos que promueven la entrada a  $G_0$  sufren estrés replicativo, lo cual produce inestabilidad genómica y disminuye su esperanza de vida cronológica (Weinberger et al. 2007).

Acabada la fase  $G_1$ , las células entran en fase S en la cual el DNA se replica dando lugar a dos cromátidas hermanas idénticas, momento en el que la gema comienza a crecer. La manera en la que la gema crece es importante: en fase S el crecimiento es apical y polarizado, mientras que en la siguiente fase,  $G_2$ , el crecimiento pasa a ser isótropico (Howell, Lew 2012).  $G_2$  es la fase en la que la célula prepara la maquinaria necesaria para la fase M y comprueba que el material genético se haya duplicado correctamente. Cuando las células entran en M, se observa que el DNA se condensa durante la profase, se alinea con el huso mitótico en metafase, se separa en dos en anafase y se descondensa en telofase. En *S. cerevisiae*, a diferencia de otros eucariotas, la mitosis se caracteriza por ser cerrada, ya que la membrana nuclear no desaparece. Este proceso concluye con la citoquinesis o separación celular (Byers 1981).

La regulación de cada punto del ciclo celular es imprescindible para garantizar la correcta proliferación ya que las alteraciones asociadas a este proceso, pueden tener consecuencias drásticas para los organismos, siendo la causa de enfermedades como el cáncer (Maddika et al. 2007). Para asegurar la correcta progresión, la célula debe superar una serie de puntos de control (*checkpoints*) que le impedirán avanzar o ralentizarán su paso por el ciclo hasta que se repare el error. Estos *checkpoints* actúan modulando las principales moléculas de la maquinaria del ciclo celular.

### 3. MAQUINARIA DEL CICLO CELULAR

#### 3.1 Proteína quinasa dependiente de ciclina (CDK)

Las CDK son proteína quinasas dependientes de ciclina, un tipo de enzima que transfiere grupos fosfato desde moléculas de alta energía como el ATP, hacia substratos específicos, en un proceso conocido como fosforilación. Estos enzimas fosforilan residuos de Ser o Thr seguidos de Pro (S/T-P).

*S. cerevisiae* posee seis CDKs, cuya actividad depende de la unión a subunidades proteicas conocidas como ciclinas. Esta unión cambia la conformación de la subunidad catalítica de la CDK, permitiendo que el ATP pueda activar el complejo. La subunidad catalítica es generalmente identificada gracias a la presencia de una secuencia canónica, compartida por otros miembros de esta familia: un dominio particular cerca del extremo N-terminal de la proteína, conocido como motivo PSTAIRE (Jeffrey et al. 1995).

Experimentos bioquímicos y genéticos han descrito a las CDKs y a sus ciclinas, como piezas clave en la regulación del ciclo celular. Una fosforilación por parte de otras quinasas conocidas como CAK (CDK-Activating Kinase) y la unión de la ciclina, activan a la CDK y dirigen la actividad de ésta hacia un substrato en concreto (Miller, Cross 2001).

Una vez la CDK está activada y unida a su ciclina correspondiente, el mecanismo de control de la actividad de este enzima es complejo y refinado ya que puede ser inhibido mediante mecanismos de fosforilación, o mediante la unión de subunidades inhibitorias, conocidas como CKI (CDK-Inhibitor).

Las oscilaciones observadas en la actividad de las CDKs en el ciclo celular, están controladas por la degradación periódica de sus moduladores positivos, las ciclinas, y también por el control sobre sus reguladores negativos, las CKIs. Para conseguir estas fluctuaciones, tanto ciclinas como CKIs son reconocidas por sistemas de ubiquitinación específicos (Mendenhall 1993) que degradan las proteínas a través del proteasoma.

El genoma de levaduras codifica 23 ciclinas, las cuales fueron inicialmente descubiertas como proteínas que aparecen y desaparecen de manera sincrónica en cada ciclo. Tienen la habilidad de unirse a diferentes CDKs y son reconocidas por la presencia de un dominio conservado conocido como caja de ciclina, región necesaria para la unión y activación de la CDK (Evans et al. 1983, Kobayashi et al. 1992). Estas ciclinas regulan seis CDKs: Cdc28, Pho85, Kin28, Srb10/Cdk8, Sgv1/Bur1 y Ctk1 (Liu, Kipreos 2000, ver Tabla 1).

Dos de estas CDKs, Cdc28 y Pho85, son activadas por grandes familias de ciclinas, mientras que las otras se asocian con una única ciclina y tienen funciones relacionadas con la maquinaria transcripcional y expresión génica, mediante la regulación de la RNA polimerasa II y factores de transcripción (Andrews, Measday 1998).

El ciclo celular de *S cerevisiae* se encuentra regulado por Cdc28 y Pho85, quinasas que se tratarán en profundidad en los siguientes apartados.



CDK	CICLINA	FUNCIÓN
Cdc28	Cln1, Cln2, Cln3	Esenciales para START: duplicación del corpúsculo polar, gemación y crecimiento polarizado, proteólisis de Sic1, activación de transcripción en G <sub>1</sub> , adquisición de resistencia a feromona.
	Clb5, Clb6	Replicación del DNA.
	Clb1, Clb2, Clb3, Clb4	Esencial para mitosis: ensamblaje del huso, inactivación de transcripción de CLN, supresión de crecimiento polarizado de la gema, represión de SBF.
Pho85	Pcl1, Pcl2, Clg1	Necesarias para START en ausencia de Cln1 y Cln2. Morfogénesis.
	Pcl9	Regulador negativo de Whi5.
	Pho80	Regulador negativo de la captación de fosfatos: inhibe la localización nuclear de Pho4.
	Pcl5	Regulador negativo de la biosíntesis de aminoácidos mediante Gcn4.
	Pcl6, Pcl7	Regulador positivo de la segregación de cromosomas: activa a Glc8.
	Pcl8, Pcl10	Regulador negativo de la glucógeno sintasa 2 (Gsy2).
	Kin28	Ccl1
Srb10	Srb11	Regulador de transcripción.
Ctk1	Ctk2	Regulador de transcripción.
Sgv1	Bur2	Regulador de transcripción.

Tabla 1: CDKs y ciclinas de *S. cerevisiae*. Se han resumido las funciones de las seis CDKs de *S. cerevisiae*. La mayoría de ellas se comentarán con más detalle en los siguientes apartados.

### 3.2 CDC28:

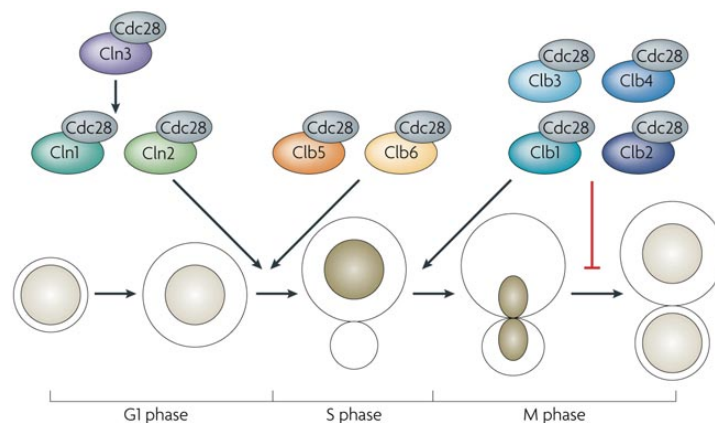
Cdc28, descrita originalmente como un mutante condicional que bloquea el ciclo en START, fue rápidamente identificada como el principal coordinador del ciclo celular de *S. cerevisiae* en condiciones normales (Hartwell 1973). La actividad y especificidad de Cdc28 está controlada debido a su unión con diferentes ciclinas e inhibidores, específicos de cada fase (Figura 2).

#### 3.2.1 Ciclinas de Cdc28

Las ciclinas de Cdc28 están clasificadas en dos grupos: las ciclinas de G<sub>1</sub> conocidas como Cln1, Cln2 y Cln3, regulan eventos en el intervalo entre la citoquinesis y la replicación del DNA. Las ciclinas tipo B: Clb1, Clb2, Clb3, Clb4, Clb5 y Clb6 son necesarias para la replicación, la progresión por fase G<sub>2</sub> y el paso por mitosis. Todas las ciclinas experimentan ondas de síntesis y destrucción en condiciones normales (revisado en Mendenhall, Hodge 1998, Uhlmann et al. 2011).

Cln1 y Cln2 comparten un 57% de homología y se unen a Cdc28, activándolo concretamente en START (Levine et al. 1998). Las deleciones individuales de estos genes no tienen grandes efectos en el ciclo celular, pero el doble mutante *cln1Δcln2Δ* crece más lento, tiene morfología aberrante y retrasa el comienzo de la síntesis de DNA (Dirick et al. 1995) debido a que la CKI de fase S, Sic1, no se degrada a tiempo. En condiciones normales, el complejo Cdc28-Cln2 fosforila a Sic1, marcándolo para su destrucción (Schwob et al. 1994). A parte de las funciones en START, Cln1 y Cln2 son capaces de reprimir la transcripción inducible por feromonas, una función que no comparten con Cln3 (Oehlen, Cross 1994). Dependiendo de la localización de estas ciclinas, pueden promover unas acciones u otras: así es como Cln2 en el núcleo promueve la transcripción de genes asociados a START, mientras que en el cuello de la levadura promueve una gemación eficiente (Skotheim et al. 2008).

Las ciclinas tipo B forman una familia de seis proteínas subdivididas en 3 pares, clasificadas según la homología de sus secuencias y el patrón de transcripción al que están sometidas. El primer par en aparecer es el formado por Clb5 y Clb6 las cuales son producidas en START (junto a Cln1 y Cln2) pero se mantienen inhibidas por Sic1 hasta que se alcanza el final de G<sub>1</sub>, ya que su rol principal es iniciar la fase S en el momento oportuno (Schwob, Nasmyth 1993), fosforilando los componentes del complejo pre replicativo para permitir la apertura de los orígenes de replicación (Dahmann et al. 1995, Tanaka et al. 2007). Por otra parte, también inhiben el complejo Cdc28-Clns para evitar el retorno a fase G<sub>1</sub> (Basco et al. 1995). El segundo par de ciclinas, formado por Clb3 y Clb4 aparece en la fase S y contribuye a la replicación del DNA y al ensamblaje del huso mitótico, aunque no son esenciales (Richardson et al. 1992). La última onda de ciclinas tipo B aparece antes de anafase y genera dos ciclinas homólogas conocidas como Clb1 y Clb2 las cuales promueven el crecimiento isotrópico de la gema, la separación de cromosomas e inhiben los eventos específicos de G<sub>1</sub>. Clb2 es el mayor responsable de la actividad de Cdc28 en fase M (Amon et al. 1993).



**Figura 2: Especificidad de ciclinas en el control del ciclo celular.** Las ciclinas de G<sub>1</sub> promueven el crecimiento de la gema, la duplicación del corpúsculo polar y la activación de las ciclinas B. Las ciclinas de fase S, activan la replicación del DNA y las de fase M promueven la formación del huso y el inicio de esta fase, inhibiendo la salida de M y la división celular. Después de la citoquinesis, se separa la célula hija de la madre y el ciclo vuelve a comenzar (Bloom, Cross 2007).

### 3.2.2 Cln3, una ciclina especial.

Sin lugar a dudas, Cln3 es la ciclina más inusual de Cdc28. Comparte solamente un 25% de homología con Cln1 y Cln2 (Nash et al. 1988) y hasta hace poco se creía que sus niveles no experimentan una onda de transcripción cíclica como el resto de ciclinas. Hace unos años solo podía observarse un pequeño aumento en la cantidad de Cln3 en el límite M/G<sub>1</sub> (Tyers et al. 1993). Pero una publicación reciente ha demostrado que los niveles de Cln3 se elevan considerablemente en fase M, poco tiempo después de la expresión de Clb2 y persiste hasta fase G<sub>1</sub> donde vuelve a ser degradada (Landry et al. 2012).

La ciclina Cln3 es poco abundante y muy inestable (Tyers et al. 1993, Yaglom et al. 1995) y sus niveles responden rápidamente a cambios nutricionales mediante diferentes mecanismos regulatorios, permitiendo a la célula ajustar la proliferación al ambiente cambiante. (Hall et al. 1998). Como la transcripción de Cln3 es constante en el ciclo celular (Nash et al. 1988a), la regulación de la actividad del complejo Cdc28-Cln3 se lleva a cabo mediante mecanismos post-traduccionales (Tyers et al. 1992, Gallego et al. 1997).

La señal de degradación de Cln3 tiene una región PEST, que son secuencias ricas en prolina (P), glutamato (E), serina (S) y treonina (T) y están presentes en diferentes proteínas de vida media corta (Rogers et al. 1986).

Diversas señales de estrés, incluida la estimulación con feromona y la parada del ciclo en ausencia de nitrógeno, pueden retrasar la progresión G<sub>1</sub>/S promoviendo la fosforilación de las secuencias PEST de Cln3, favoreciendo la degradación de esta proteína a través del proteasoma. Los residuos de la región PEST de Cln3 son fosforilados por Cdc28-Cln3 mediante autofosforilación en *cis* (Landry et al. 2012), de modo que Cln3 es regulado negativamente mediante la misma maquinaria de ciclo que él mismo activa. Se ha demostrado que el enzima conjugadora de ubiquitinas (E2) Cdc34, está implicada en esta degradación (Yaglom et al. 1995), además se cree que las FBP (*F-Box Protein*) Cdc4 y Grr1 también lo están ya que ambas proteínas reconocen residuos fosforilados

del extremo C-terminal de Cln3 (Landry et al. 2012). Otra publicación reciente ha propuesto también a la RING E3 ligasa Dma1, como reguladora de los niveles de Cln3 (Menoyo et al. 2013).

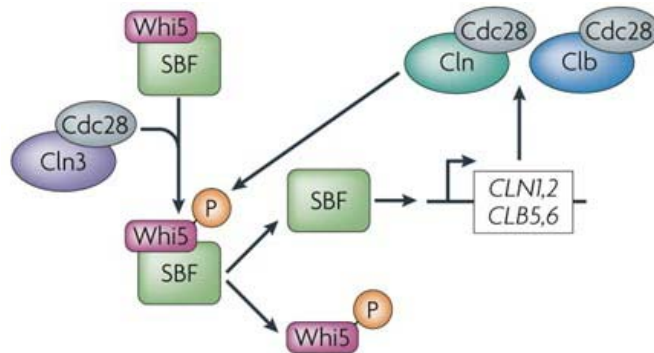
La mayoría de Cln3 es retenido en el citoplasma, unido al retículo endoplasmático (RE) y es específicamente liberado de éste en fase G<sub>1</sub> tardía. La interacción de Cln3 con el RE es modulada por la chaperona Ydj1, que se une a través del dominio J<sub>i</sub> de Cln3 facilitando su liberación de este orgánulo y permitiendo que se acumule en el núcleo en G<sub>1</sub> (Vergés et al. 2007). La chaperona Ssa1 también está mediando en este proceso ya que secuestra a Cln3 y lo acumula en el RE al principio de la fase G<sub>1</sub>. En G<sub>1</sub> tardía, Ydj1 desplaza a Cln3 y permite su translocación al núcleo, para desencadenar el programa de START (Vergés et al. 2007). Recientemente se ha visto que la unión de Cln3 a Ssa1 promueve su degradación en respuesta a la ausencia de nitrógeno, arrojando a las células en fase G<sub>1</sub> (Truman et al. 2012).

Por otra parte, Cln3 contiene una señal de localización nuclear (NLS, *Nuclear Signal Localization*) en el extremo C-terminal que garantiza su importación hacia el núcleo (Edgington, Futcher 2001) una vez ha sido liberado del RE, así, cuando se alcanza un nivel mínimo de Cln3 dentro de este orgánulo es cuando pueden comenzar los eventos necesarios para atravesar START.

La razón por la que Cln3 es el principal activador de START (Stuart, Wittenberg 1995) es la activación de dos factores de transcripción heterodiméricos conocidos como SBF y MBF (Koch et al. 1996). El complejo SBF (*Swi4 cell cycle box Binding Factor*) está formado por las proteínas Swi6 y Swi4 mientras que el complejo MBF (*Mlu1 cell cycle box Binding Factor*) contiene las proteínas Swi6 y Mbp1. Swi4 y Mbp1 son factores de transcripción que se unen al DNA mientras que Swi6 es una proteína activadora que ayuda a ambos factores en su función. SBF se encarga de potenciar la transcripción de genes implicados en morfogénesis, además de *CLN1* y *CLN2*, mientras que MBF se encarga de potenciar la transcripción de aquellos genes necesarios para la

replicación del DNA además de *CLB5* y *CLB6* (Sherlock, Rosamond 1993, de Bruin et al. 2004, Vergés et al. 2007)

La activación de los factores de transcripción explicados, se da gracias a que el complejo Cdc28-Cln3 fosforila al inhibidor Whi5, que dentro del núcleo se encuentra inhibiendo a SBF y MBF pero en respuesta a esta fosforilación sale hacia el citoplasma, liberando a estos complejos y permitiendo de esta manera, que comience la ola de transcripción de START (Figura 3). Una vez iniciados los eventos de START, Cdc28-Cln1 y Cdc28-Cln2 activan aún más la transcripción de SBF y MBF potenciando la retroalimentación positiva comentada previamente (Wittenberg, Reed 2005). Como es de esperar, la sobreexpresión de Whi5 en células *cln3Δ* resulta en pérdida de viabilidad (Costanzo et al. 2004).



**Figura 3: Especificidad de ciclinas en el control del ciclo celular.** El represor de transcripción, Whi5, inhibe la actividad del factor de transcripción SBF. La fosforilación de Whi5 por Cln3-Cdc28 induce la exportación nuclear de Whi5 y activa a SBF, el cual induce la transcripción de *CLN1*, *CLN2*, *CLB5* y *CLB6*. Cln-Cdc28 y Clb-Cdc28 fosforilan a Whi5 desencadenando un bucle de retroalimentación positiva (Bloom, Cross 2007).

### 3.2.3 Activadores e inhibidores de Cdc28

Un paso necesario en la activación de Cdc28 es la fosforilación en Thr169 (Espinoza et al. 1996) llevada a cabo por Cak1, la cual es esencial en la progresión del ciclo celular (Thuret et al. 1996). Una segunda fosforilación resulta en la inhibición de su actividad. Concretamente, la quinasa Swe1 se expresa en fase S-G<sub>2</sub> y fosforila a Cdc28 en Tyr19 (Lim et al. 1996). Swe1 reconoce específicamente los complejos de Cdc28 con Clb1 y Clb2, siendo uno de los principales mecanismos a través del cual se controla la entrada en fase M, aunque el tamaño crítico no se haya alcanzado (Kellogg 2003) o la morfogénesis de la gema no se haya completado con éxito (Lew 2003).

La presencia de otras proteínas también pueden inhibir a Cdc28. Sic1 es un potente inhibidor de Cdc28-Clb que excluye al sustrato del sitio activo. Regula el comienzo de fase S manteniendo inhibidos los complejos Cdc28-Clb5 y Cdc28-Clb6 durante la fase G<sub>1</sub>. Los niveles de Sic1 son máximos cuando comienza G<sub>1</sub>, pero en fase G<sub>1</sub> tardía es fosforilado y etiquetado para ser destruido mediante ubiquitinación (Hao et al. 2007). Sic1 también es importante para inhibir a Clb2, permitiendo la degradación del huso mitótico y la salida de fase M (Mendenhall 1993).

También hay otros inhibidores que juegan un papel importante en situaciones específicas, como en la conjugación de células haploides. Far1 es un inhibidor específico de Cdc28-Cln2 que actúa bajo el control de la ruta activada por feromonas. La activación de Far1 reprime el programa de transcripción específico de START, causando inhibición en la actividad Cln-Cdc28 y resultando en una parada en G<sub>1</sub> (Peter, Herskowitz 1994), lo cual permite que la reproducción sexual comience.

### 3.3 PHO85:

Pho85 es una CDK multifuncional que regula la progresión por G<sub>1</sub>, polaridad de las células, citoesqueleto de actina, metabolismo de los fosfatos y del glucógeno y señalización de cambios en el ambiente (Carroll, O'Shea 2002). A pesar de estos roles, Pho85 no es esencial para la viabilidad celular en condiciones de laboratorio.

Pho85 se asocia con 10 ciclinas llamadas Pcls (*Pho85 Cyclins*) pero solo algunas de ellas tienen un perfil de expresión periódico (Mendenhall, Hodge 1998).

#### 3.3.1 Ciclinas de Pho85

Las Pcls se han dividido en dos subfamilias de acuerdo a la similitud de su secuencia en la región correspondiente a la caja de ciclina. Las ciclinas de la familia Pho80 tienen un rol muy importante en la regulación del metabolismo y la detección de cambios en el ambiente, esta familia está formada por Pcl8, Pcl10, Pho80, Pcl6 y Pcl7. Las 5 ciclinas restantes pertenecen a la subfamilia de Pcl1,2 e incluyen Pcl1, Pcl2, Pcl9, Clg1 y Pcl5 (Measday et al. 1997).

Los genes codificados por *PCL1*, *PCL2* y *PCL9*, son específicamente expresados en fase G<sub>1</sub>: *PCL2* y *PCL9* se expresan entre el final de la fase M y el principio de G<sub>1</sub>, mientras que *PCL1* se expresa al final de fase G<sub>1</sub>, siguiendo el mismo patrón de expresión que *CLN1* y *CLN2* (Measday et al. 1997). Consistente con el momento de la expresión de estos genes, Pcl9 tiene un rol en G<sub>1</sub> temprano mientras que Pcl1 y Pcl2 tienen un rol redundante en la fase G<sub>1</sub> tardía. Pcl5, al igual que los miembros de la familia Pho80, actúa en la detección de nutrientes (Aviram et al. 2008). La expresión de *PCL7* tiene su pico de expresión máxima en fase S (Lee et al. 2000), siendo el único miembro de la subfamilia Pho80 cuya expresión depende del ciclo celular.

Al igual que se ha observado con otras CDKs, la unión con diferentes subunidades de ciclina es el principal mecanismo de regulación de la



actividad de Pho85 que además de activarle le dirige hacia substratos específicos: Pho85-Pcl10 fosforila específicamente a Gsy2 (Huang et al. 1998) mientras que Pho4 es fosforilado únicamente por Pho85-Pho80 (O'Neill et al. 1996).

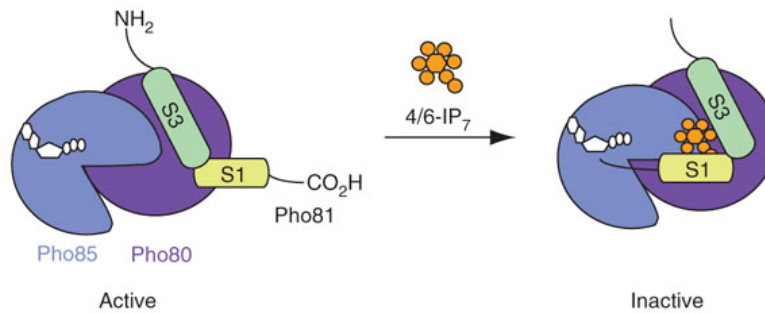
La mayoría de las moléculas de Pho85 se presentan como un monómero, pero se ha visto que una porción de Pho85 se presenta como fracciones de alto peso molecular, lo cual significa que se encuentra asociado a sus ciclinas, con sus substratos o con ambos. Cuando una de las ciclinas de Pho85 es sobreexpresada, gran parte de la fracción monomérica es secuestrada, sugiriendo de esta manera que las ciclinas son el factor limitante mientras que las moléculas de Pho85 libre están en exceso (Wilson et al. 1999).

De acuerdo con la diversidad de funciones que cumple Pho85 en las células, su delección resulta en un amplio espectro de defectos. La pérdida de una ciclina en particular o la combinación de ciclinas reproducen algunos aspectos del fenotipo de un *pho85Δ*. Así, un *pho80Δ* tiene una expresión constitutiva de genes dependientes de parada por fosfatos (Huang et al. 2002) Las células con Pcl8 o Pcl10 delecionados tienen altos niveles de acumulación de glucógeno (Huang et al. 1998) En contraste, la delección de miembros de la subfamilia de ciclinas Pcl1,2 reproducen muchos aspectos del fenotipo relacionado con el ciclo celular, que sufren las células *pho85Δ* (Tennyson et al. 1998, Espinoza et al. 1994). Esto indica que Pho85 unido a sus diferentes ciclinas, puede desempeñar diversos roles que mantienen la homeostasis celular.

### 3.3.2 Activadores e inhibidores de Pho85

Al contrario que con Cdc28, Pho85 no necesita ser activado por ninguna CAK, pero sí que es modulado por cambios alostéricos mediante la interacción con otras proteínas o CKIs (Nishizawa et al. 1999b). El inhibidor de Pho85 que se conoce hasta el momento está codificado por el gen *PHO81* que inhibe específicamente el complejo Pho85-Pho80. Esta proteína necesita la presencia del metabolito myo -

D - inositol - heptaquisfosfato (IP7) generado por Vip1 durante la falta de fosfatos, para cambiar su conformación alostérica e inhibir al complejo Pho85- Pho80. Pho81 también es fosforilado por Pho85 y esta regulación es esencial para su actividad como inhibidor (Waters et al. 2004). Otra función de Pho81 es inhibir al complejo Pho85-Pcl5, aunque los mecanismos moleculares de esta inhibición se desconocen por el momento (Bömeke et al. 2006).



**Figura 4. Modelo de inhibición de Pho85 en ausencia de  $PO_4^{2-}$ .** La región S3 de Pho81 se une constitutivamente a Pho85/Pho80, en presencia de IP7 (el cual aparece cuando hay poca concentración de fosfatos) se produce un cambio conformacional y el fragmento S1 ocluye el sitio de interacción de Pho85 con Pho4, sin afectar la unión de ATP (molécula blanca). Extraído de Lee et al. 2008.

### 3.3.3 Funciones de Pho85

**Metabolismo del fosfato:** La mayoría de roles de Pho85 se encargan de señalar el estado nutricional del medio en el que se está desarrollando la levadura y en muchos de los casos, mantienen inactivas actividades que son necesarias solo bajo condiciones específicas. Pho4 es el sustrato de Pho85 mejor caracterizado, es un factor de transcripción que activa la expresión de genes relacionados con el metabolismo de los fosfatos y con la función vacuolar. Cuando el fosfato inorgánico es abundante, el complejo Pho85-Pho80 es activo y fosforila a Pho4, manteniéndole fuera del núcleo de modo que los genes responsables de captación de fosfatos, no se expresan (Kaffman et al. 1994, O'Neill et al. 1996). La ciclina Pho80, también es fosforilada por Pho85 y parece que esta modificación

la activa (Waters et al. 2004). Cuando hay déficit de fosfatos en el medio, el inhibidor Pho81 cambia su conformación inhibiendo al complejo Pho85-Pho80, de modo que Pho4 hipofosforilado es capaz de ser translocado y mantenerse en el núcleo, donde iniciará la transcripción de transportadores de fosfatos que facilitarán la entrada del mismo a la célula (Kaffman et al. 1994).

A parte de los genes de la ruta PHO, Pho4 también activa a los genes *VTC1*, 2, 3 y 4, responsables de la acumulación de polifosfatos en la vacuola y de su funcionamiento (Ogawa et al. 2000).

**Ciclo celular:** Diversos experimentos revelan un rol de Pho85 regulando START ya que, la inhibición simultánea de Cdc28 y Pho85 (pero no la inhibición de estas quinasas por separado) inactiva la expresión de proteínas específicas del final de la fase G<sub>1</sub>, incluidas *CLN2* y *PCL1*. Esto sugiere un substrato común que es fosforilado por ambas quinasas para regular la transcripción de G<sub>1</sub>. Se ha demostrado que el complejo formado por Pho85-Pcl9 está fosforilando al inhibidor *Whi5* (Huang et al. 2009), en el mismo sentido en el que lo fosforila Cdc28-Cln3: para enviarlo al citoplasma y permitir la transcripción de genes asociados a SBF y MBF.

Otro substrato afectado por Pho85 es el factor de transcripción *Swi5*, implicado en la transcripción de genes relacionados con la transición de fase M a fase G<sub>1</sub>, incluyendo *PCL2*, *PCL9* y *SIC1* (Measday et al. 2000). La actividad de *Swi5* es dependiente de la fase del ciclo celular, su expresión se induce en fase G<sub>2</sub> pero no es hasta el final de anafase cuando es translocado al núcleo (Moll et al. 1991). Se cree que la fosforilación por Pho85, retiene a *Swi5* en el citoplasma (Measday et al. 2000).

*Ace2* también es un factor de transcripción implicado en la transición M-G<sub>1</sub> y actúa de la misma manera que *Swi5*, algunos genes son activados por ambos factores de transcripción y otros son específicos de cada uno de ellos (McBride et al. 1999). *Ace2* induce la expresión de genes que codifican para enzimas encargadas de digerir el septo que conecta la

célula madre con la hija (Dohrmann et al. 1992) e inhibe la expresión de *CLN3* entre otros (Di Talia et al. 2009). Aunque no se ha podido identificar una fosforilación directa de Pho85 sobre Ace2, se ha visto que el secuestro citoplasmático de este factor de transcripción es dependiente de Pho85.

Los sustratos descritos hasta el momento no explican por completo el rol que Pho85 parece estar ejerciendo en  $G_1$  y teniendo en cuenta la versatilidad de esta quinasa, da la impresión de que aún quedan por describir muchas interacciones moleculares asociadas a  $G_1$ .

**Crecimiento polarizado:** Pcl1 y Pcl2, parecen tener roles redundantes con Cln1 y Cln2 al final de fase  $G_1$ . La cepa *cln1Δcln2Δpcl1Δpcl2Δ* no es viable, es amorfa y tiene un cuello muy alargado. Las células que no tienen estas ciclinas son capaces de ejecutar algunos aspectos de la transición  $G_1$ -S, como la replicación del DNA y del corpúsculo polar, pero quedan paradas en  $G_2$  debido a la puesta en marcha del *checkpoint* de morfogénesis (Moffat, Andrews 2004).

En  $G_1$ , cuando la célula pasa por START, selecciona el sitio en el que se formará la gema, hacia donde convergerán los cables de actina. El crecimiento de esta estructura es un proceso que está muy bien regulado: el producto de *CDC24* y *CDC42* se encarga de establecer y mantener la polaridad, dirigiendo el crecimiento de los filamentos de actina hacia la zona donde emergerá la gema (Pruyne, Bretscher 2000). Por otro lado, las septinas Cdc3, Cdc10, Cdc11, Cdc12 y Shs1 ensamblan filamentos en forma de anillo en la periferia del futuro cuello que conectará la célula madre con la hija (Casamayor, Snyder 2003).

Muchos de los sustratos relacionados con esta función, son compartidos por Cdc28 y Pho85, como por ejemplo, Cdc24 y Cdc42. (Moffat, Andrews 2004, Sopko et al. 2007). Los sustratos específicos de Pho85 aún tienen que ser investigados, pero ya se conocen algunos, como Rvs167, una proteína del citoesqueleto de actina, fosforilada por Pho85-Pcl1 (Lee et al. 1998, Friesen et al. 2003) o Bni4, una proteína

adaptadora del anillo de septinas que ha sido descrita como sustrato fosforilado por Pho85 unido a Pcl1 y Pcl2 (Zou et al. 2009).

**Metabolismo del calcio:** Pho85-Pho80 regula negativamente la localización nuclear de otro factor de transcripción llamado Crz1, el cual es análogo al factor de transcripción NFATc de mamíferos (Cyert 2003). Ambos son activados por calcineurina, una fosfatasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  que en condiciones de estrés provoca una cascada de señalización para desarrollar programas de expresión génica y promover la supervivencia celular. En ausencia de Pho85, la disfunción de la vacuola y la hiperactivación de Crz1, podrían estar contribuyendo a que las células *pho85Δ* sean sensibles a altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ .

**Señalización de aminoácidos y fuentes de carbono:** Otras ciclinas dirigen a Pho85 para regular negativamente sustratos que señalizan cambios en el ambiente. Gcn4 es un factor de transcripción que activa los genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos y que en presencia de cantidades abundantes de aminoácidos es fosforilado por Pho85-Pcl5, lo cual inhibe su actividad. Cuando la cantidad de aminoácidos disminuye, hay poca cantidad de Pcl5 y como consecuencia Gcn4 se encuentra hipofosforilada. Al ser más estable, se transloca al núcleo y comienza la transcripción de genes relacionados con este metabolismo (Shemer et al. 2002). Otro sustrato, Gsy2, también es fosforilado e inactivado por Pho85-Pcl8 y Pho85-Pcl10 previniendo la acumulación de glucógeno en la fase logarítmica cuando no es necesario (Huang et al. 1998).

**Fase S:** Las células eucariotas que en  $G_1$  sufren roturas de doble cadena, inician una respuesta que retrasa el ciclo celular gracias a que la quinasa Rad53 previene la acumulación de Clns en fase  $G_1$ . Como consecuencia, la fosforilación de Sic1 por parte de Cln-Cdc28 no se da y el ciclo permanece parado en esta fase (Germain et al. 1997).

Pho85 es necesaria para volver a la progresión del ciclo celular después de activar esta parada transitoria (Wysocki et al. 2006), ya que por un lado, unido a Pho80 fosforila al factor de transcripción Swi5

reteniéndolo en el citoplasma (Measday et al. 2000) y como Swi5 es el responsable de activar la transcripción de Sic1, se generará menos inhibidor. Por otro lado, unido a Pcl1 fosforila directamente a Sic1, etiquetándolo para su posterior proteólisis por el proteasoma (Nishizawa et al. 1998).

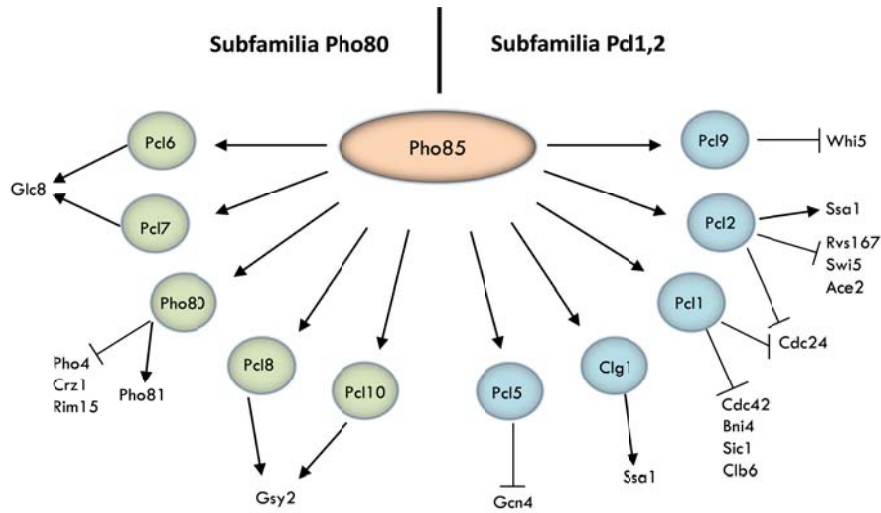
Otro rol en fase S (compartido con Cdc28), consiste en degradar a Clb6 (Jackson et al, 2006), la ciclina que entre otras funciones dirige a Cdc28 para fosforilar a Swi6 y enviarlo fuera del núcleo (Geymonat et al. 2004). Esta fosforilación se da en la transición  $G_1$ -S.

**Fase M:** La correcta segregación de los cromosomas en fase M es esencial para garantizar la estabilidad genética. La subunidad catalítica de la fosfatasa Glc7, es un regulador importante que modula las interacciones entre los microtúbulos y el cinetocoro (Sassoon et al. 1999). La función de Glc7 en la segregación de cromosomas está regulada por Glc8, el cual funciona como activador (Nigavekar et al. 2002). Una de las funciones de Glc8 es promover la correcta unión de los cromosomas al huso mitótico, para lo cual tiene que ser activado mediante la fosforilación de Pho85-Pcl6 y Pho85-Pcl7 en Thr118. *PCL7* tiene un pico de expresión en fase S y se cree que es para garantizar que Glc8 está activado en fase M. Pcl8 y Pcl10 también son ciclinas candidatas para dirigir esta fosforilación (Tan et al. 2003).

**Fase  $G_0$ :** La entrada y la salida de  $G_0$  tiene que ser cuidadosamente regulada: actividades específicas de la fase estacionaria deben ser inducidas cuando las células son sometidas a alguna carencia de nutrientes y reprimidas cuando los nutrientes vuelven a estar disponibles. Numerosos estudios indican que Pho85 controla negativamente la expresión de aquellos genes que son inducidos bajo condiciones limitantes de glucosa antes de entrar en  $G_0$  (DeRisi et al. 1997, Nishizawa et al. 2004).

La mayoría de la expresión génica específica de  $G_0$  está regulada por la quinasa Rim15, la cual funciona como un regulador clave, induciendo parada del ciclo celular, síntesis de glucógeno y trehalosa, entre otras

(Pedruzzi et al. 2003). Durante la fase de crecimiento logarítmico, Pho85-Pho80 fosforila a Rim15 secuestrándolo en el citoplasma mediante las proteínas Bmh1 y Bmh2, manteniendo el programa controlado por G<sub>0</sub>, inactivo (Yang et al. 2010).



**Figura 5. Substratos de Pho85.** Se representan las familias de ciclinas de Pho85 y los substratos descritos hasta el momento.

### 3.3.4 Homólogo de Pho85 en mamíferos

Pho85 comparte similitud tanto en su estructura como en la regulación de su actividad, con Cdk5 de mamíferos, de hecho, se ha visto que Cdk5 de ratón puede revertir en gran parte el fenotipo observado en células *pho85Δ*, además de que coimmunoprecipita con las ciclinas de Pho85 (Nishizawa et al. 1999a).

Dada la gran cantidad de funciones de Pho85, ésta ha sido etiquetada como la quinasa multifuncional de *S. cerevisiae* (Huang et al. 2007) y curiosamente ocurre algo similar con Cdk5 que fue inicialmente descrita como una quinasa específica del sistema nervioso (Tsai et al. 1994) ya que controla la arquitectura y dinámica del citoesqueleto de neuronas,

crecimiento axónico, señalización dopaminérgica, migración, crecimiento de dendritas y otras (revisado en Su, Tsai 2011). Pero más adelante se pudo observar su actividad en múltiples tejidos no neuronales (Dhavan, Tsai 2001) donde ejecuta actividades relacionadas con el control de la apoptosis, angiogénesis, adhesión/migración celular y regeneración de tejidos (revisadas en Liebl et al. 2011). Así, la gran cantidad de funciones que desempeña Cdk5, ha permitido que sea conocida como un inspector multifuncional (Lalioi et al. 2010), siendo esta molécula importante en diferentes contextos fisiológicos y patofisiológicos en humanos.

Se cree que en cada tipo celular habrán diferentes substratos que son regulados por esta quinasa, por ello es importante conocer los roles específicos y su modo de acción frente a las diferentes proteínas que se unen a ella.



#### 4. SISTEMAS DE DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS

Una de las modificaciones post traduccionales más complejas en eucariotas, es el enlace covalente de una proteína a otra. Las ubiquitinas son los modificadores proteicos más habituales, se trata de pequeñas moléculas de 76 aminoácidos codificadas por cuatro genes en *S. cerevisiae* (*UBI1 - UBI4*), que producen poliproteínas a partir de las cuales se obtiene la ubiquitina madura.

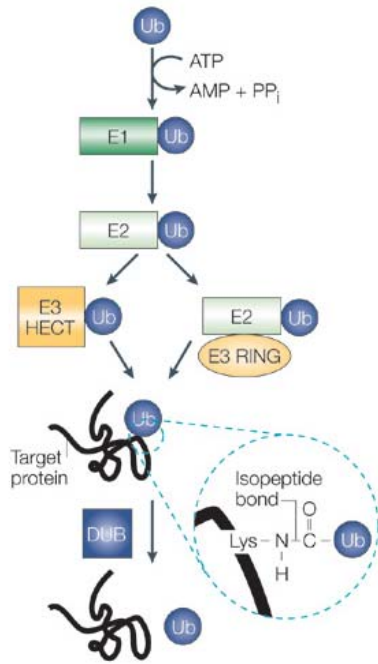
La compleja cascada de ubiquitinación necesita de la acción secuencial de tres actividades enzimáticas (Figura 6):

1) La enzima activadora de ubiquitina (UBA, *UBiquitin Activating*) o E1 activa la molécula de ubiquitina dando como resultado un enlace tioéster de alta energía entre la Cys del centro activo de la E1 y la ubiquitina.

2) La ubiquitina activada es transferida mediante una reacción de trans-tiolación a la Cys de una de las múltiples enzimas conjugadoras de ubiquitinas (UBC, *ubiquitin conjugating*) o E2.

3) En la mayoría de los casos, un factor adicional es necesario para la formación del enlace entre la proteína diana y la ubiquitina. Las ubiquitin ligasas (E3) son responsables de la selectividad ya que facilitan el reconocimiento de la proteína diana por la E2 (Hochstrasser 1996).

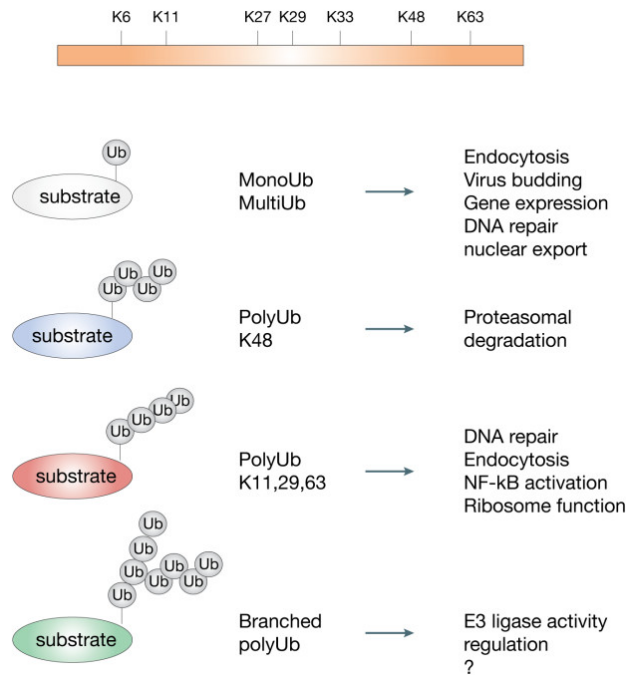
Los complejos obtenidos mediante este tipo de reacciones, normalmente son reconocidos y procesados por la subunidad 26S del proteasoma, el cual ha sido descrito como un complejo enzimático con actividad isopeptidasa, conservado en todas las especies (Coux 2003). La acción opuesta a la ubiquitinación es llevada a cabo por las enzimas desubiquitinadoras (DUB, *DeUBiquitylating enzyme*, Wilkinson 1997).



**Figura 6. Reacciones bioquímicas de ubiquitinación.** La cascada de ubiquitinación implica la acción de E1, E2 y E3 que consumiendo una molécula de ATP, acaban ubiquitinando a la proteína diana. DUB = enzima desubiquitinadora (Extraído de Hicke et al. 2005)

Los substratos pueden ser modificados por una única molécula de ubiquitina en un sitio o en varios (mono-ubiquitinación y múltiple-mono-ubiquitinación, respectivamente) o pueden ser etiquetados con cadenas de múltiples ubiquitinas (poli-ubiquitinación). La ubiquitinación puede ocurrir a través de cualquiera de las siete Lys de la molécula de ubiquitina (Clague, Urbé 2010). En función de la Lys que esté implicada en el enlace, las consecuencias serán diferentes (Figura 7): por ejemplo, el heterodímero Ubc13/Mms2 actúa como una E2, formando cadenas de poliubiquitinas entre una Lys de la proteína diana, con la Lys63 de la molécula de ubiquitina. Se ha observado que estas cadenas de ubiquitinas unidas a Lys63 tienen múltiples funciones, ya que intervienen en la regulación de la transcripción (Laine et al. 2006), traducción (Spence et al. 2000), activación de quinasas (Deng et al. 2000), endocitosis (Kee et al. 2005) y reparación del DNA (Brusky et al. 2000). Por otra parte, Ubc4, otra importante E2 de *S cerevisiae*, forma cadenas de poliubiquitina entre la proteína diana y la Lys48 de la ubiquitina, con el objetivo de etiquetar las proteínas de vida media corta

y dirigirlas al proteasoma (Chuang, Madura 2005). A pesar de esta generalización, Ubc4 puede formar cadenas de poliubiquitina mediante uniones con la Lys63 de la molécula de ubiquitina y también puede monoubiquitinar proteínas con el objetivo de endocitar receptores de la membrana plasmática (Hicke 1999).



**Figura 7. Efecto de Lys implicadas en la reacción.** Representación esquemática de las diferentes modificaciones y sus roles funcionales. El símbolo “ ? “ indica funciones desconocidas. (Extraído de Woelk et al. 2007)

Estos ejemplos demuestran la complejidad del mecanismo de ubiquitinación y la amplia gama de posibles combinaciones que pueden darse a la hora de decidir el destino de una proteína.

En *S. cerevisiae* se conoce tan solo una E1, 16 E2 y aproximadamente 80 E3 (Singh et al. 2012). Muchas E3 forman superfamilias de proteínas que funcionan formando complejos (como el complejo SCF o el complejo APC) mientras que otras pueden actuar en solitario. Dado su amplio número y variedad, las E3 son las piezas que agregan variabilidad al sistema de ubiquitinación.

## 4.1 Tipos de E3

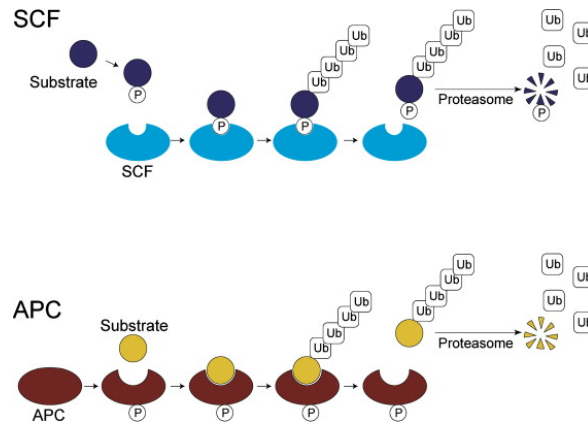
### 4.1.2 Complejo SCF y APC

Es un complejo proteico con actividad ubiquitin ligasa. El núcleo de este complejo contiene 3 subunidades de las cuales se desprende su nombre: Skp1, Cdc53 y proteínas F-Box. Mediante este sistema, se obtienen sustratos poliubiquitinados que son posteriormente degradados por el proteasoma. Las proteínas F-Box sirven como subunidades adaptadoras que reclutan sustratos específicos para ser ubiquitinados, *S. cerevisiae* codifica para 11 proteínas F-Box, los cuales contienen repeticiones de Trp-Asp localizadas en el dominio N-terminal y son muy ricas en diferentes dominios (Kipreos, Pagano 2000).

Los complejos SCF generalmente reconocen sustratos que han sido previamente fosforilados en epítomos específicos (Deshaies 1999). Dentro de las principales dianas del complejo SCF se encuentran reguladores del ciclo celular como ciclinas de fase G<sub>1</sub>, CKI, factores asociados a la replicación del DNA y factores de transcripción que promueven la progresión del ciclo. También ubiquitina sustratos que no tienen función en el ciclo como reguladores del citoesqueleto, receptores de membrana y factores de transcripción (Kipreos, Pagano 2000). El complejo SCF garantiza la transición G<sub>1</sub>/S regulando específicamente a los sustratos que han sido fosforilados (Willems et al. 2004). Si la fosforilación de los sustratos no funciona, la E3 no es capaz de reconocer la señal de destrucción (degrón) y el sustrato se acumula, como ocurre con Sic1 en células *pho85Δ* (Nishizawa et al. 1998)

Otras fases del ciclo celular también están reguladas por complejos con actividad ubiquitin ligasa, como los eventos relacionados con la separación de cromátides hermanas en anafase y la salida de mitosis, los cuales están regulados por el complejo multiproteico conocido como APC/C (*A*naphase *P*romoting *C*omplex/*C*yclosome) que en combinación con las E2 Ubc10 o Ubc4 regulan la fase M, afectando la actividad de las CDKs mitóticas (Murray 2004). Contrariamente a SCF, APC/C, es fosforilado y activado cuando las células entran en mitosis, y representa

un ejemplo de maquinaria de ubiquitinación regulada por el ciclo celular (Barford 2011).



**Figura 8. Regulación de la destrucción de proteínas mediante sistema SCF y APC.** Ambos complejos de E3 facilitan la transferencia de ubiquitinas desde el sitio activo de la E2 al sustrato, el cual es etiquetado para ser destruido por el proteasoma. SCF es activo durante todo el ciclo celular y es la fosforilación de sus sustratos lo que inicia el proceso de ubiquitinación. En contraposición, APC reconoce directamente los sustratos y su actividad es regulada en el ciclo celular por fosforilación (Murray 2004).

#### 4.1.3 HECT E3 ligasas

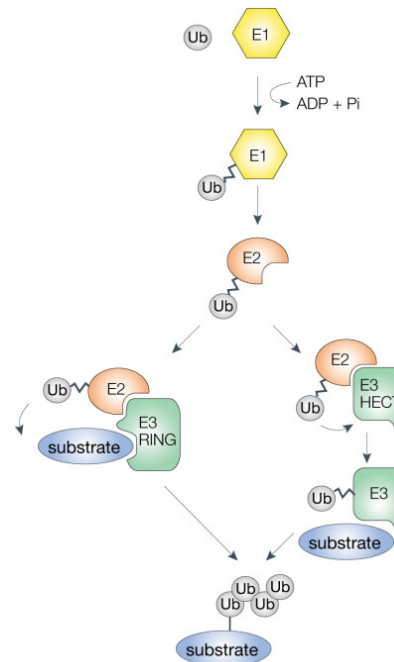
La familia de E3 ligasas homólogas al extremo C-terminal de E6AP (HECT, *H*omologous to the *E*6AP *C*arboxyl *T*erminus; Rotin, Kumar 2009), contienen un dominio C-terminal similar al encontrado por primera vez en la proteína E6 del virus del papiloma humano. Este dominio contiene una Cys en su sitio activo que se une mediante enlace tioéster a la molécula de ubiquitina. El dominio HECT es bi-lobulado, uno de sus lóbulos interacciona con la E2 y el otro contiene el sitio activo unido a la ubiquitina. Un ejemplo muy estudiado en *S. cerevisiae* es Rsp5, implicada en la ubiquitinación de diversos sustratos, importantes en procesos tales como la herencia mitocondrial, el remodelamiento de cromatina y la activación de factores de transcripción. También tiene un rol muy activo en la endocitosis de numerosos transportadores ubicados en la

membrana plasmática y debido a su acción sobre los filamentos de actina, se ha visto que afecta al transporte intracelular (Kim et al. 2011a).

#### 4.1.4 RING E3 ligasas:

La gran mayoría de E3 ligasas pertenecen al grupo de E3 con dominio RING (*Really Interesting New Gene*) las cuales median la transferencia directa de la molécula de ubiquitina desde la E2 hacia el sustrato. El dominio RING coordina dos átomos de  $Zn^{2+}$  y consiste en una serie de Cys e His, específicamente espaciadas, que facilitan la ubiquitinación dependiente de E2 (Lorick et al. 1999). Este dominio sirve como una plataforma que pone en contacto a la E2 y al sustrato, pero a diferencia del dominio HECT, no se une a la ubiquitina (Figura 9). Los miembros de esta familia pueden funcionar como monómeros, dímeros o complejos con múltiples subunidades.

**Figura 9. Cascada de ubiquitinación dependiente de HECT y RING.** Representación esquemática del proceso de ubiquitinación para RING y HECT E3 ligasas. En el caso de RING no hay interacción entre la ubiquitina y la E3, mientras que en ubiquitinaciones por HECT, la molécula de ubiquitina se une a la E3 (Extraído de Woelk et al. 2007)



Dma1 es un ejemplo de E3 con dominio RING en su estructura. Se le ha atribuido un importante papel en la regulación tanto del correcto posicionamiento de las septinas en el cuello, como de la cantidad Swe1 en *S. cerevisiae* (Raspelli et al. 2011). En *S. pombe* previene la formación del septo y la salida prematura de mitosis cuando el huso mitótico está afectado (Murone, Simanis 1996), mientras que dos proteínas de

humanos son posibles homólogos de Dma1: Chfr es una proteína supresora de tumores que retrasa el ciclo celular cuando el ensamblaje de microtúbulos se encuentra afectado (Scolnick, Halazonetis 2000) y Rnf8 de localización nuclear, que entre otras funciones se encarga de interaccionar con el receptor del retinoide X (un miembro de la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas), para activarlo (Takano et al. 2004).

*S. cerevisiae* codifica una proteína que comparte un 58% de homología con Dma1, llamada Dma2. Esta proteína tiene una redundancia funcional con Dma1 ya que el posicionamiento incorrecto de las septinas en el cuello, solo se observa cuando se suprimen ambos genes (Fraschini et al. 2004). Ambas proteínas, además de compartir el dominio RING (Joazeiro, Weissman 2000), comparten un dominio FHA (*ForkHead Associated domain*), el cual está presente en proteínas encargadas de la reparación del DNA o relacionadas con algún tipo de *checkpoint*, ya que tienen la capacidad de unir proteínas con Thr fosforiladas y actuar sobre ellas (Durocher et al. 2000). El genoma humano contiene 23 genes con dominio FHA y 258 genes con dominio RING, pero solamente los homólogos de Dma1 y Dma2 contienen ambos dominios (Brooks et al. 2008). Esto podría estar indicando que el dominio FHA ayuda a unir proteínas cuyas Thr fosforiladas son una señal de degradación, para su posterior ubiquitinación dependiente de RING.

La presencia del dominio FHA implica que la función de una o varias proteína quinasas, podrían encontrarse *upstream* en la cascada de regulación de estas E3. De hecho, se ha comprobado que en *S. cerevisiae* las mutaciones puntuales en el dominio FHA de Dma1 producen pérdida de función (Bieganowski et al. 2004), así como pérdida de asociación con el corpúsculo polar y el sitio en el que se producirá la división (Guertin et al. 2002). En el caso de Chfr humana, la supresión del dominio FHA, elimina el *checkpoint* que controla (Scolnick, Halazonetis 2000). En el caso de Rnf8 el dominio FHA es necesario para la correcta localización nuclear de esta proteína (Mailand et al. 2007).

Es importante conocer la regulación de estas moléculas ya que hasta el momento se desconoce cómo se lleva a cabo este proceso, solamente se dispone de evidencias que demuestran una actividad de autoubiquitinación *in vitro* (Loring et al. 2008), lo cual indica que esta E3 podría estar ejecutando su propia regulación, pero hasta el momento son los únicos detalles de los que se dispone respecto a su control.

Conocer los mecanismos *upstream* responsables de desencadenar este proceso podría ayudar a conocer con más detalle los mecanismos moleculares de esta regulación y su relevancia en la fisiología de las células.





## HIPÓTESIS

---



Teniendo en cuenta la información expuesta anteriormente, es evidente que Pho85 es una quinasa multifactorial que puede actuar fosforilando a una gran diversidad de sustratos, algunos son específicos de sus funciones mientras que otros son compartidos con otras quinastas.

Los experimentos de esta tesis doctoral van dirigidos a comprobar dos hipótesis diferentes relacionadas con esta CDK:

- ✓ Hipótesis I: Pho85 interacciona con la ciclina Cln3 y la regula.

Los experimentos realizados se exponen en el capítulo I de este manuscrito.

- ✓ Hipótesis II: Pho85 interacciona con la RING E3 ligasa Dma1 y la regula.

Los experimentos realizados se exponen en el capítulo II de este manuscrito.

Atendiendo a la naturaleza de la hipótesis, los objetivos que se presentarán en el siguiente capítulo, también se han dividido en dos bloques.



## OBJETIVOS

---



## CAPÍTULO I

El objetivo general de este capítulo es demostrar que Cln3 es un sustrato de la quinasa Pho85. Dicho objetivo se divide en los siguientes objetivos parciales:

- Demostrar la fosforilación *in vitro* de Pho85 sobre Cln3.
- Caracterizar los residuos de Cln3 fosforilados por Pho85.
- Demostrar si existe interacción física entre Cln3 y Pho85.
- Comprobar que Pho85 fosforila a Cln3 *in vivo*.
- Estudiar los efectos fisiológicos de la fosforilación de Cln3 por Pho85.

## CAPÍTULO II

El objetivo general de este capítulo es demostrar que Dma1 es un sustrato de la quinasa Pho85. Dicho objetivo se divide en los siguientes objetivos parciales:

- Encontrar nuevos sustratos que estén unidos a los complejos de Pho85-Pcl1.
- Demostrar la fosforilación *in vitro* de Pho85-Pcl1 sobre las E3 ligasas Dma1, Dma2 y Rsp5.
- Caracterizar los residuos de Dma1 fosforilados por Pho85.
- Demostrar los efectos de la fosforilación de sobre la actividad de Dma1
- Demostrar si existe interacción física entre Dma1 y Pho85.
- Comprobar que Pho85 fosforila a Dma1 *in vivo*.
- Buscar un sistema que permita el estudio de la relevancia de esta fosforilación, *in vivo*.





**CAPÍTULO I:**  

---

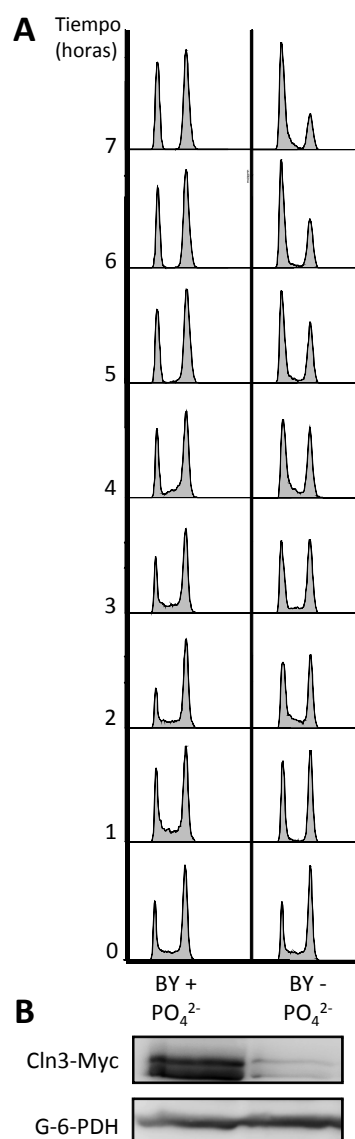
**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA  
REGULACIÓN DE PHO85 SOBRE CLN3**



## JUSTIFICACIÓN

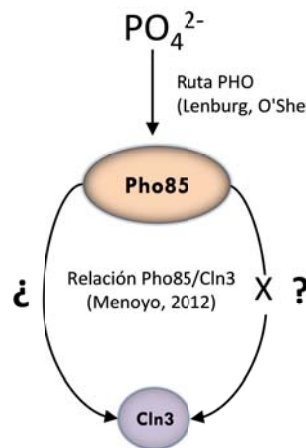
La ciclina Cln3 es un activador crítico de START, cuya sobreexpresión provoca células de menor tamaño que progresan rápidamente por el ciclo celular, mientras que su delección induce un mayor tamaño de las células y retrasa el ciclo de éstas (Cross 1988, Nash et al. 1988b), actualmente se cuenta con numerosa información acerca del importante papel de Cln3 en la regulación de START, unida a la CDK Cdc28. (Wang et al. 2009).

Estudios previos realizados en este grupo han descrito una nueva relación molecular que ha permitido darle un enfoque novedoso a la función de Cln3: se ha observado que una deficiencia de fosfatos en el medio, modifica la estabilidad de Cln3 e induce una parada en la fase  $G_1$  del ciclo celular (Figura 10). Esta disminución, también se observó en aquellas cepas donde Pho85, uno de los principales reguladores del metabolismo del fosfato, tenía inhibida su actividad quinasa (Menoyo et al. 2013).



**Figura 10 (A) Parada del ciclo celular en respuesta a la ausencia de fosfatos.** Células en crecimiento exponencial en medio mínimo completo se transfirieron a un medio con fosfatos (BY +  $PO_4^{2-}$ ) y sin él (BY -  $PO_4^{2-}$ ). Después de 7 horas, las células sin fuente de fosfatos paran su ciclo en fase  $G_1$ . **(B) Cantidad de Cln3-Myc en respuesta a la ausencia de fosfatos.** Análisis por western blot de células en fase exponencial, en presencia/ausencia de fosfatos reflejan diferentes cantidades de Cln3. Adaptadas de Menoyo et al. 2013.

Pho85 es una CDK multifuncional, que presenta una elevada promiscuidad molecular, ya que es dirigida a un gran número de sustratos mediante la unión a 10 ciclinas diferentes. Cln3 podría ser uno de estos sustratos ya que resultados previos publicados por este grupo indican una clara interacción génica entre Cln3 y el complejo Pho85-Pho80 (Menoyo et al. 2012). Pero las evidencias moleculares que demuestran si esta interacción es directa, necesarias para considerar a Cln3 un sustrato *bona fide* de Pho85, aún debían ser caracterizadas (Figura 11).



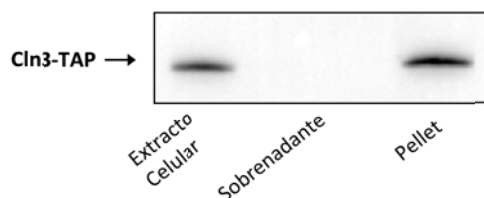
**Figura 11 Modelo de trabajo.** Los símbolos ¿ ? indican el objetivo principal del capítulo de esta tesis

## RESULTADOS

---



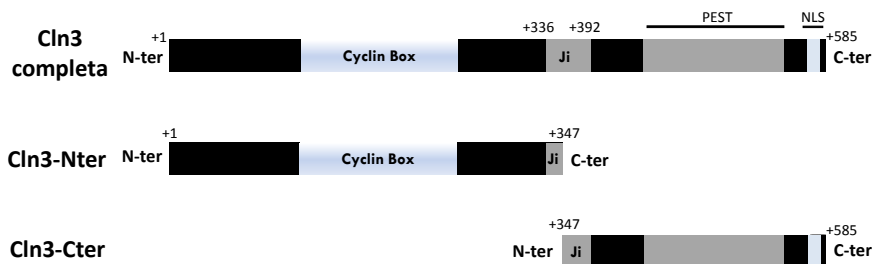
Para estudiar si Pho85 fosforila a Cln3, se clonó Cln3 en plásmido pGEX6P1 con el objetivo de expresar la proteína en *E.coli* para su posterior purificación. Se detectó que la proteína completa resulta tóxica y es letal en este sistema, dando como resultado niveles de expresión muy pobres. Debido a esta serie de problemas, se intentó purificar Cln3-TAP a partir de cepas salvajes BY4741, pero el hecho de que la proteína se encuentre estrechamente asociada a membranas del retículo endoplasmático (Vergés et al. 2007), provoca su precipitación hacia la fracción particulada de los extractos celulares y resulta casi imposible obtener cantidades suficientes para realizar ensayos *in vitro* (Figura 12).



**Figura 12** Detección de Cln3 en purificación por TAP. Muestras de los diferentes pasos de la purificación de Cln3 se separaron por SDS-PAGE. La detección se realizó con  $\alpha$ -PAP.

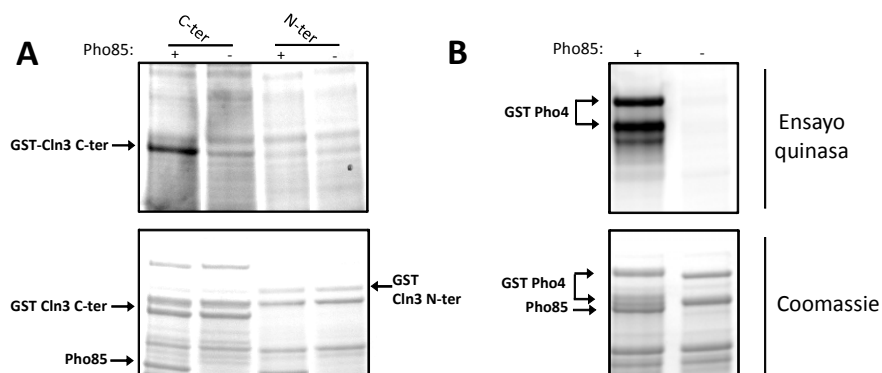
Para solventar esta dificultad técnica, finalmente se decidió volver al sistema de expresión en *E. coli* y clonar diferentes fragmentos de Cln3 en plásmido pGEX6P1, con el objetivo de detectar aquel que no resultase tóxico. Para disponer de todas las regiones de Cln3 en el ensayo *in vitro*, se decidió clonar Cln3 en dos fracciones: la fracción N-terminal (Cln3 N-ter) contiene los primeros 347 aminoácidos, dentro de los cuales se encuentra la caja de ciclina. La fracción C-terminal (Cln3-Cter) contiene la mayoría del dominio Ydj y todas las secuencias PEST, abarca desde el aminoácido 347 hasta el final de la proteína (Figura 13).





**Figura 13 Estructura de Cln3.** Se representa la región de unión a CDK (*Cyclin Box*), la región de unión a Ydj1 (Ji), la región rica en PEST y la señal de localización nuclear (NLS).

El resultado del ensayo reveló que el fragmento Cln3 N-ter no es fosforilado por el complejo Pho85-Pho80 mientras que el fragmento Cln3 C-ter presenta una clara banda de fosforilación (Figura 14A). Como control positivo de la reacción se utilizó Pho4, un sustrato descrito como diana de fosforilación de Pho85-Pho80 (Kaffman et al. 1994 Figura 14B).

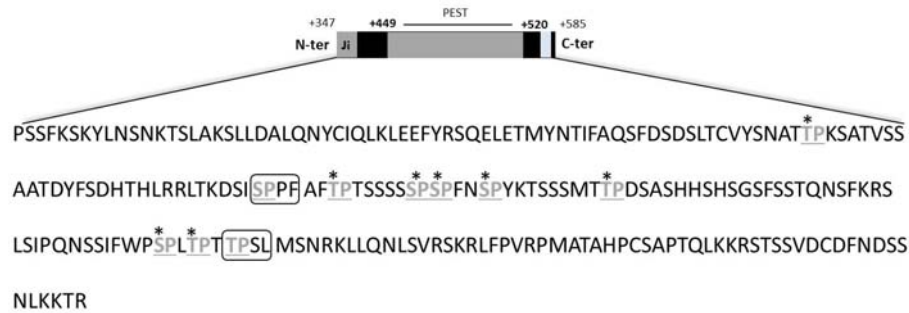


**Figura 14 (A) Fosforilación *in vitro* de fragmentos de Cln3.** La reacción se realizó en presencia/ausencia de Pho85. Todos los carriles cuentan con GST-Pho80 y GST- Cln3, los carriles sin Pho85 son los controles negativos de cada reacción. **(B) Fosforilación *in vitro* de Pho4.** La fosforilación de GST-Pho4 recombinante se utilizó como control positivo. Se utilizaron las mismas condiciones que en (A). La carga de cada carril en A y B se valoró con azul de Coomassie.

## 2. CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS DE FOSFORILACIÓN

Sabiendo que la fosforilación se da en el fragmento Cln3 C-ter, el siguiente objetivo se centró en caracterizarla, estudiando los residuos que podrían estar implicados en esta reacción.

El fragmento de Cln3-Cter clonado contiene los 10 residuos de SP/TP de la región PEST (Figura 15) de los cuales solo dos de ellos contienen la secuencia consenso S/T-P-X-J, descrita como diana específica del complejo Pho85-Pho80 (O'Neill et al. 1996), el residuo X se refiere a cualquier aminoácido, mientras que el residuo J hace referencia a un aminoácido hidrofóbico. Curiosamente, estos residuos están flanqueando la región rica en PEST, y resulta interesante destacar que dentro de esta zona se encuentra la Ser-468, la cual ha sido propuesta como diana de fosforilación de Cdc28, para facilitar la degradación de Cln3 (Yaglom et al. 1995)



**Figura 15 Secuencia del fragmento Cln3-Cter.** Se indican los residuos de SP/TP presentes en el fragmento. Los residuos con recuadro (Ser449 y Thr520) contienen la secuencia consenso de fosforilación descrita para Pho85/Pho80. Los residuos con asterisco son posibles dianas de Cdc28.

Para comprobar si S449 y T520 son diana de Pho85-Pho80, estos residuos se sustituyeron por Ala mediante mutagénesis dirigida. Los resultados demuestran una fuerte reducción en la fosforilación del fragmento mutante respecto al salvaje (Figura 16). También se ensayaron las sustituciones de Ser449 y Thr520 por Asp, para descartar que la reducción se diese por cambios conformacionales de Cln3.

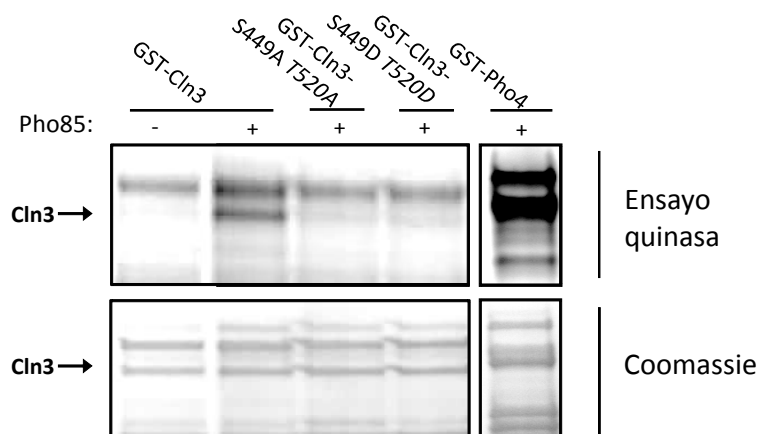
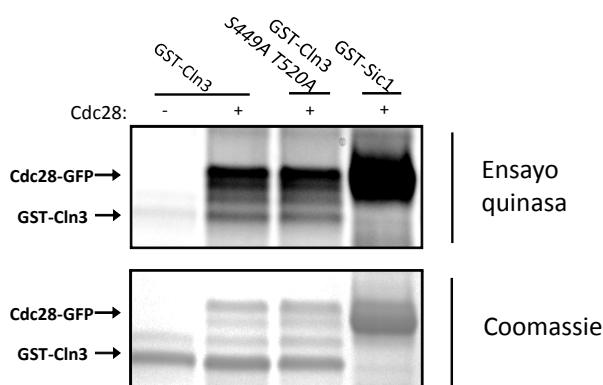


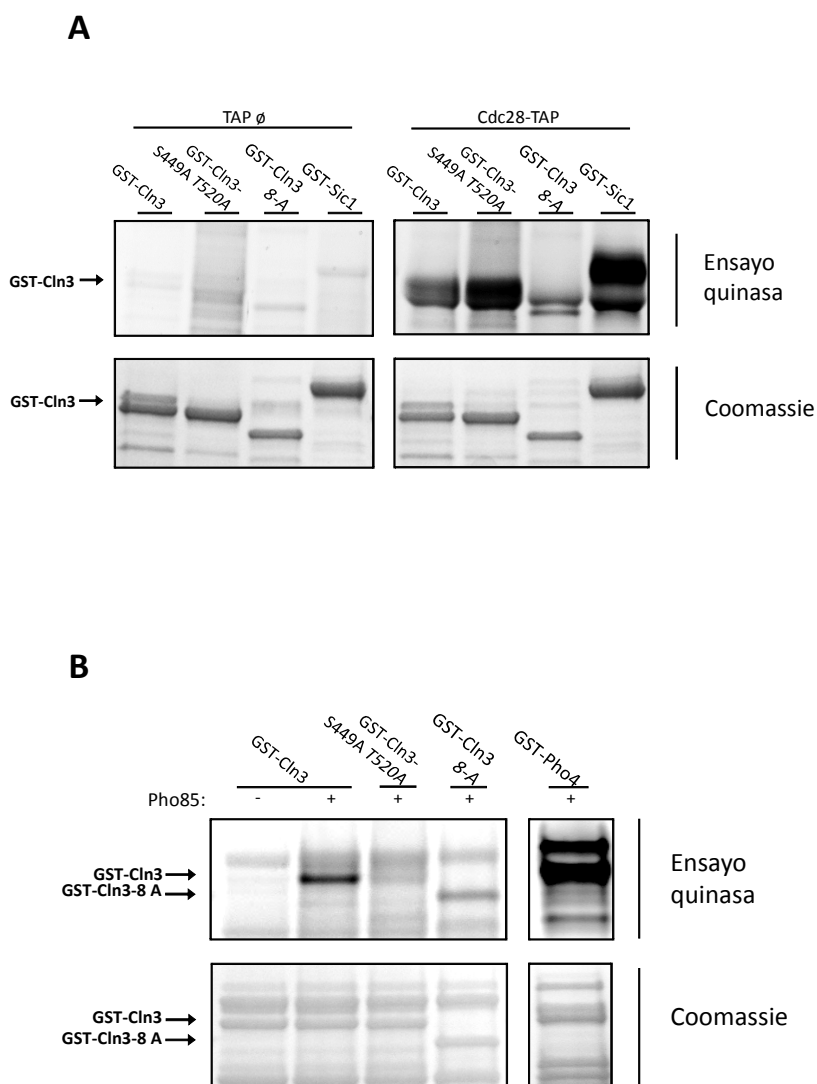
Figura 16 **Ensayo de fosforilación de fragmentos de Cln3 C-ter no fosforilables.** GST-Cln3-C-ter, GST-Cln3-C-ter S449A/T520A y GST-Cln3-C-ter S449D/T520D fueron ensayados en presencia de Pho85 recombinante. Como control negativo se utilizó la reacción de Cln3-Cter sin Pho85. Todos los carriles cuentan con Pho80-GST. Pho4 fue ensayada como control positivo.

Experimentos *in vivo* demuestran que la acción de Cdc28 y Pho85 sobre Cln3 es opuesta: mientras que la fosforilación por Cdc28 parece desestabilizar la proteína (Yaglom et al. 1995, Landry et al. 2012), la de Pho85 parece estabilizarla (Menoyo et al. 2013). Por ello es de esperar que, fosforilaciones con efectos biológicos diferentes, tengan como diana residuos de fosforilación diferentes. Se ensayó Cdc28 purificado a partir de levadura, sobre el fragmento de Cln3 salvaje y mutante (Cln3-S449A/T520A) y se observó que existe la misma actividad de fosforilación sobre ambos (Figura 17), lo cual indica que Ser449 y Thr520 podrían no ser dianas directas de Cdc28. Para estas reacciones se utilizó Sic1 como control positivo (Barberis et al. 2005).



**Figura 17** Fosforilación de GST-Cln3 salvaje y *S449A/T520A* por Cdc28-GFP. Cdc28-GFP purificada de levadura se incubó con GST-Cln3 y GST-Cln3 *S449A/T520A* en presencia de ATP. Como control positivo se utilizó GST-Sic1 purificada de *E. coli*.

Una vez comprobado que Ser449 y Thr520 son residuos fosforilados específicamente por Pho85, se quiso comprobar si los ocho residuos restantes son diana de Cdc28, ya que son similares a la secuencia consenso propuesta para esta CDK: S/TPXK/R (Songyang et al. 1994, Holmes, Solomon 1996). Siguiendo la misma estrategia que en el apartado anterior, se generó una construcción con estos 8 residuos mutados a Ala (8-Ala) y se comprobó que Cdc28 no es capaz de fosforilarlo (Figura 18-A) mientras que Pho85 sí presenta actividad frente a este fragmento (Figura 18-B).



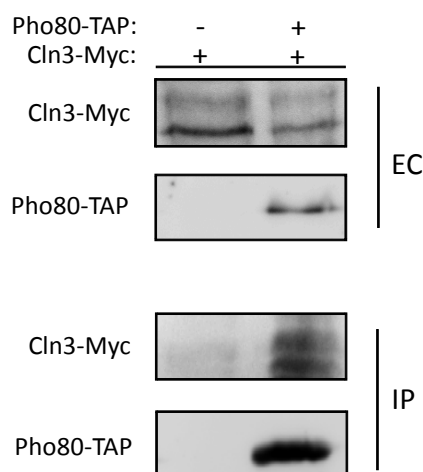
**Figura 18 (A) Fosforilación de GST-Cln3 salvaje y 8-A por Cdc28-TAP.** Fosforilación de GST-Cln3, GST-Cln3 S449A/T520A y GST-Cln3 8-A por Cdc28-TAP purificada de levadura, 8-Ala es más pequeño que los otros fragmentos. Como control negativo se usó extracto de purificación de una cepa BY4741 salvaje (TAP  $\emptyset$ ). GST-Sic1 es el control positivo. **(B) Fosforilación de GST-Cln3 salvaje y 8-A por Pho85/Pho80.** El ensayo se realizó en las mismas condiciones que los ensayos anteriores. Pho4 es el control positivo de esta reacción.

### 3. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN *IN VIVO* DE PHO80 Y CLN3

Después de comprobar que hay una relación *in vitro* específica entre el complejo Pho85-Pho80 y Cln3, se decidió estudiar si coinmunoprecipitan *in vivo*. Evidencias previas del grupo (Menoyo, 2012) confirman que existe interacción con la CDK.

Con este experimento se pretende confirmar si esta interacción se da a través de Pho80.

Como se puede observar en la figura 19, Cln3-MYC está presente solo cuando Pho80-TAP se ha unido selectivamente a la resina, indicando que existe interacción *in vivo* entre ambas proteínas.



**Figura 19. Inmunoprecipitación de Pho80-TAP y Cln3-MYC.** EC: extracto celular. IP: inmunoprecipitación. Extractos celulares de cepas Cln3-MYC con Pho80 etiquetado con TAP (+) y sin etiquetar se purificaron con IgG agarosa. La detección se realizó con anticuerpos específicos con MYC y TAP.

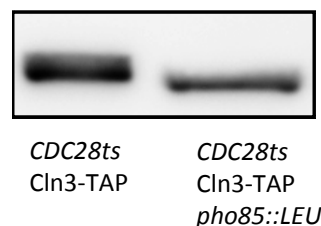
#### 4. ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN *IN VIVO* DE CLN3

Una vez observada la fosforilación *in vitro* y la interacción *in vivo*, los esfuerzos se centraron en comprobar si Pho85 está fosforilando *in vivo* a Cln3.

La bibliografía describe que la vida media de Cln3 es corta y se ha visto que esto es debido a la fosforilación de Cdc28 sobre la zona PEST (Yaglom et al. 1995, Landry et al. 2012). Con el propósito de aumentar la vida media de Cln3 y visualizar mejor la proteína, se utilizó una cepa termosensible con Cdc28 inhibible a 37°C. Esta estrategia sirve al mismo tiempo, para eliminar las fosforilaciones de Cdc28 sobre Cln3 y estudiar las realizadas por Pho85.

Mediante SDS-PAGE convencional no fue posible detectar ningún cambio en la movilidad electroforética de Cln3, por ello, se decidió agregar Phostag a los geles. En este caso se pudo observar diferencias entre Cln3-TAP de cepas salvajes y *pho85Δ* (Figura 20).

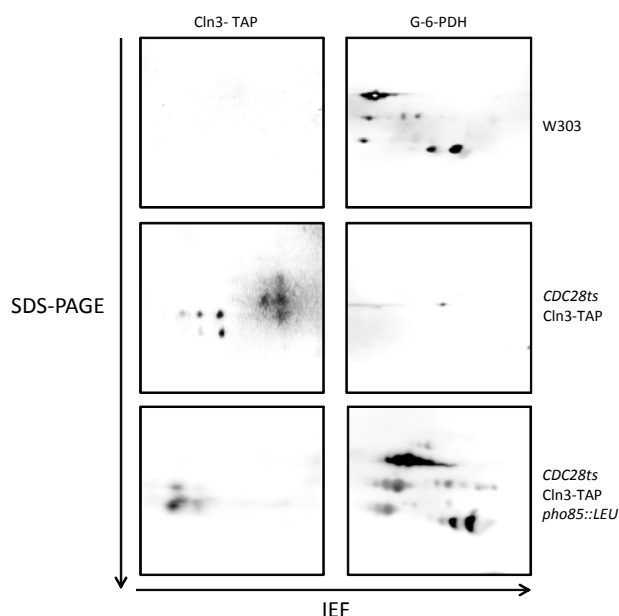
**Figura 20 Electroforesis SDS-PAGE con Phostag.** Cdc28<sup>ts</sup> Cln3-TAP +/- Pho85 se separaron en gel de acrilamida con 25 mM de Phostag (NARD Institute). La detección de se realizó con anticuerpo  $\alpha$ -PAP.



Como este resultado no fue reproducible, se sometieron las mismas cepas a electroforesis bidimensional y el resultado aparte de ser consistente con el gel Phostag, pudo reproducirse en dos experimentos independientes (Figura 21).

Los puntos observados en el panel de la izquierda de la figura 21 se obtuvieron mediante exposición con  $\alpha$ -PAP y corresponden a poblaciones específicas de Cln3-TAP ya que en la cepa sin etiquetar,

desaparecen. En la cepa mutante se observan menos poblaciones de Cln3-TAP, debido probablemente a la ausencia de Pho85. El panel de la derecha corresponde a la señal de G-6-PDH y enseña una mayor carga de extracto celular, tanto en la cepa salvaje sin marcar (W303), como en la cepa *pho85::LEU*. En el primer caso, el objetivo es comprobar que realmente el anticuerpo no produce señales inespecíficas que podrían confundir la interpretación de las poblaciones. En el segundo caso, se ha cargado cuatro veces más cantidad de proteína que en la cepa salvaje ya que las células *pho85::LEU* tienen menos cantidad de Cln3. De esta manera se puede afirmar que cuando una población se deja de ver, es debido a que hay alguna diferencia en las modificaciones post traduccionales, y no porque haya una menor cantidad de proteína.



**Figura 21 Electroforesis bidimensional.** Cepas W303, *CDC28ts CLN3-TAP* y *CDC28ts CLN3-TAP pho85::LEU* se separaron por punto isoeléctrico en tiras de pH de 3-10 y posteriormente por peso molecular mediante SDS-PAGE. G-6-PDH se utilizó como control de carga.

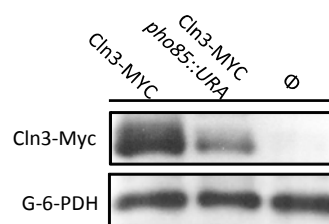


### 5. ANÁLISIS DE LA RELEVANCIA FISIOLÓGICA DE S449 Y T520

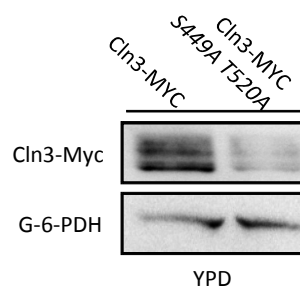
Se ha observado que Pho85 regula la cantidad de Cln3 (Figura 22 y Menoyo et al. 2013).

En base a estas evidencias, se planteó la hipótesis de que la fosforilación en S449 y T520 estabilizaría a Cln3. Para comprobarlo se clonó *CLN3-MYC-S449A/T520A* en plásmidos pRS416 que fueron posteriormente transformados en levaduras.

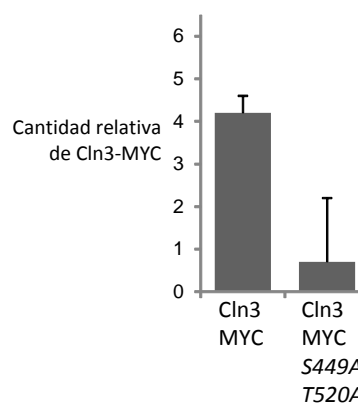
Tal y como predice este modelo, en la figura 23 se observa una reducción importante en la cantidad Cln3 no fosforilable por Pho85, incluso cuando las células tienen el complejo Pho85-Pho80 completamente activo ya que han crecido en medio rico en fosfatos (YPD).



**Figura 22 Cantidad de Cln3-MYC.** Western blot de Cln3-MYC genómico de cepas salvaje y *pho85::URA* a partir de cultivos en fase exponencial. Se utilizó una cepa con Cln3 sin marcar ( $\emptyset$ ) como control de la especificidad de la señal.



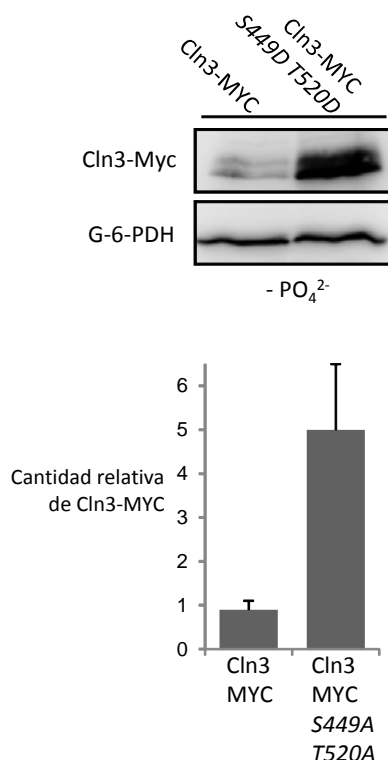
**Figura 23 Cantidad de Cln3-MYC y Cln3-MYC S449A/T520A.** Células BY4741 salvajes se transformaron Cln3-MYC o Cln3-MYC S449A/T520A clonados en plásmido centromérico y crecieron 4 hs en medio rico (YPD). En el panel inferior se presenta la cuantificación y la desviación estándar de 3 experimentos independientes.



Del mismo modo, se esperaría observar la situación inversa cuando S449 y T520 son sustituidos por Asp, ya que mediante esta estrategia se simula una fosforilación constitutiva de Cln3.

En la figura 24 se observa que los niveles de Cln3 se estabilizan, incluso cuando la vía PHO está inactivada, ya que las células crecen en medio sin fosfatos.

Estos resultados indican que la fosforilación de S449 y T520 es un mecanismo importante para la estabilización de Cln3.



**Figura 24** Cantidad de Cln3-MYC y Cln3-MYC *S449D/T520D*. Células BY4741 salvajes se transformaron con plásmido centromérico clonado con Cln3-MYC o Cln3-MYC *S449D/T520D* y se cultivaron en medio mínimo sin fosfatos. En el panel inferior se presenta la cuantificación y la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

## 6. EFECTO DE S449 Y T520 EN EL CICLO CELULAR

Llegados a este punto, este trabajo propone que la parada en  $G_1$  causada por privación de fosfatos podría ser explicada con un modelo simple: debido a la reducción en la vida media de Cln3, las células paradas no pueden alcanzar la cantidad mínima de Cln3, necesaria para ejecutar el programa de START.

Pero ¿realmente esta hipótesis tiene lógica?, esta pregunta surge de la observación de que las cepas *cln3Δ* son viables, presentando simplemente un modesto retraso en la progresión por  $G_1$ . Así, en este contexto, la regulación de Cln3 no parece ser indispensable. No obstante, partiendo de la base de que las cepas salvajes deben progresar bajo diferentes condiciones en cuanto a la disponibilidad de nutrientes, se postuló que Pho85 debe ser fundamental controlando los constantes arrestos y reentradas al ciclo a los que las células están sujetas bajo condiciones naturales.

Para comprobar esta hipótesis se sincronizaron células en  $G_1$  mediante privación de fosfatos y posteriormente se liberaron en medio rico. Se observó que el tiempo de reentrada en el ciclo es corregido en aquellas cepas *cln3Δ* que integran la construcción Cln3-MYC salvaje, mientras que aquellas células con Cln3 no fosforilable, siguen retrasando su progresión por  $G_1$  (Figura 25-A), debido probablemente, a las diferencias en la cantidad de Cln3 que hay entre ambas cepas (Figura 25-B)

Así pues, se observa que la fosforilación de los residuos S449 y T520 es esencial para la correcta reentrada al ciclo.

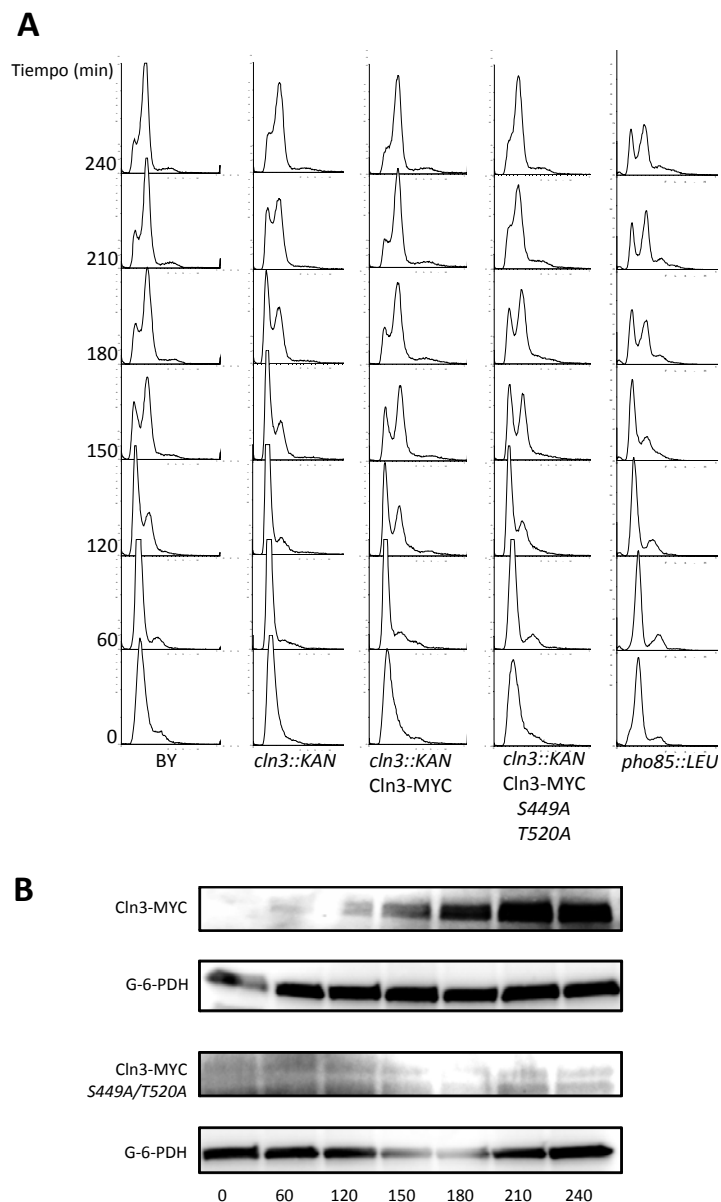


Figura 25 (A) Parada de fosfatos de cepas *cln3Δ* transformadas con diferentes versiones de Cln3. Las cepas se sincronizaron en fase G<sub>1</sub> con protocolo de privación de fosfatos. Una vez resuspendidas en YPD (tiempo 0) comenzó el muestreo a los tiempos indicados para citometría. (B) Cantidad de proteína en parada de fosfatos de cepas mutantes transformadas con diferentes versiones de Cln3. Las muestras también fueron analizadas por western blot para detectar la cantidad de proteína en los tiempos indicados.



## DISCUSIÓN

---



En su ambiente natural, las levaduras pasan la mayor parte del tiempo en un estado de quiescencia reversible, que es inducido principalmente debido a limitación de nutrientes esenciales (Lillie, Pringle 1980). Hace tiempo que se dispone de estos datos, no obstante, los mecanismos moleculares que permiten a los sensores de nutrientes controlar el ciclo celular, aún se desconocen.

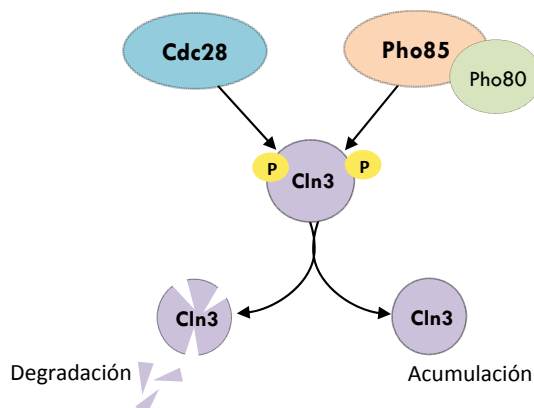
La ciclina Cln3 es un buen candidato como modulador del ciclo en respuesta a la disponibilidad de nutrientes ya que debido a su importante papel como activador del programa START (Ferrezuelo et al. 2010), la disminución de su cantidad afecta a la capacidad de las células de atravesar G<sub>1</sub>. Con los experimentos descritos en este trabajo, se propone que la modulación de la estabilidad de Cln3 mediante fosforilación, es uno de los puntos a través del cual Pho85 regula el ciclo celular en respuesta a la disponibilidad de fosfatos.

El uso de la fosforilación como mecanismo de control de proteínas tiene muchas ventajas, ya que es un cambio rápido y fácilmente reversible con el que se puede modular el plegamiento, la afinidad por el sustrato, la estabilidad y la actividad de la proteína fosforilada (Krebs, Beavo 1979, Fraschini et al. 2012). Conocer que Pho85 fosforila a Cln3 no aporta tanta información como saber que los residuos afectados están en el extremo C-terminal (Figura 14): a partir de esta información y teniendo en cuenta lo que ya se conoce sobre las zonas PEST (Yaglom et al. 1995, Landry et al. 2012), se podría pensar que esta fosforilación desvela un mecanismo redundante para inducir la degradación de Cln3, que situaría a Pho85 al nivel de Cdc28 en lo que se refiere al control de esta importante ciclina.

Pero sorprendentemente las células *pho85Δ* tienen menos cantidad de Cln3 que las células salvajes (Figura 22), indicando una acción opuesta a la descrita para Cdc28. De los sustratos que Cdc28 y Pho85 comparten (Su et al. 2012, Zou et al. 2009, Jackson et al. 2006, Nishizawa et al. 1998) en todos los casos se produce la misma consecuencia por parte de ambas quinasas, de esta manera Cln3 es el primer sustrato *bona fide*



sobre el cual ambas quinasas están ejerciendo funciones opuestas (Figura 26).



**Figura 26. Modelo del fenotipo de fosforilación sobre Cln3.** El modelo de trabajo propone diferentes consecuencias sobre la estabilidad de Cln3, en función de la CDK que los fosforila.

A partir de esta información resulta imprescindible caracterizar la fosforilación, ya que es necesario saber si los efectos biológicos de ambas quinasas pueden ser explicados por una afinidad diferente sobre los residuos de SP/TP presentes en Cln3.

Hasta el momento se desconoce con detalle los residuos fosforilados por Cdc28, aunque se ha demostrado que las diferentes fosforilaciones del extremo C-terminal son epítopos reconocidos por las proteínas F-box Cdc4 y Grr1 (Landry et al. 2012), la misma región en la que se encuentran los residuos fosforilados por Pho85. Es importante destacar que aunque las CDKs son consideradas como Ser-Thr quinasas, se ha visto que los residuos adyacentes a SP/TP definen la secuencia consenso de fosforilación para cada quinasas. De este modo, Cdc28 tienen más afinidad por aminoácidos cargados positivamente en la tercera posición del sitio aceptor de fosfatos y normalmente fosforila residuos contenidos en la secuencia S/TPXK/R (Holmes, Solomon 1996, Songyang et al. 1994), por otro lado, Pho85 unido a Pho80 tiene afinidad por residuos SP/TP flanqueados por aminoácidos hidrofóbicos cuya secuencia

## DISCUSIÓN

consenso es: S/TPXI/L (O'Neill et al. 1996). Así, de los 10 residuos de SP/TP que están en la región C-terminal de Cln3 (más específicamente, en la región rica en PEST) solo dos de ellos están rodeados por la secuencia canónica para Pho85-Pho80. En los experimentos de esta tesis se demuestra que Pho85-Pho80 tienen afinidad por Ser449 y Thr520, ya que cuando estos residuos son mutados a Ala o Asp, se pierde la fosforilación (Figura 16) mientras que Cdc28 sigue fosforilando al residuo mutado a Ala (Figuras 17 y 18).

Estas observaciones, unidas al resultado de la figura 18-A en el que se demuestra que Cdc28 no puede fosforilar al fragmento 8-Ala, refuerzan la especificidad de fosforilación de Pho85 que se propone en este trabajo y concuerda con las observaciones en las que se demuestra que más de un residuo de la zona PEST de Cln3 está implicado en el reconocimiento por parte de las proteínas F-box (Landry et al. 2012). Por otro lado, con estos experimentos no se puede descartar que otros residuos sean diana de Pho85 (aunque no dispongan de la secuencia canónica) ya que la fosforilación de Pho85 sobre el fragmento 8-Ala no recupera los niveles de fosforilación del fragmento sin mutar (Fig 18-B). A pesar de esto, las evidencias son suficientemente convincentes para describir a S449 y T520 como dianas específicas del complejo Pho85-Pho80.

Pero, aunque las dianas de Pho85 y Cdc28 sean diferentes, los residuos fosforilados por Pho85-Pho80 siguen estando en la zona PEST y no deja de sorprender que los efectos biológicos sean tan opuestos. Si se observa con detalle esta región, se advierte que los residuos de Pho85-Pho80 están flanqueando a aquellos para los cuales se ha visto una implicación de Cdc28. Esto abre la puerta a muchas interpretaciones que han de ser comprobadas, pero esta fosforilación podría estar modificando el extremo C-terminal de la proteína produciendo diferentes efectos: por un lado, Cdc28 podría dejar de reconocer los residuos de la zona PEST de modo que sin fosforilación no habrá reconocimiento por parte de las proteínas F-Box y la proteólisis no podría ser llevada a cabo. Por otro lado, es posible que Cdc28 fosforile a Cln3 a la par que Pho85, pero la

fosforilación de todos los residuos podría producir un cambio conformacional en la proteína de modo que nuevamente los epítomos no podrían ser reconocidos por Cdc4 y Grr1. Al margen del mecanismo específico, se trata del primer sustrato en común entre Cdc28 y Pho85 que es fosforilado con efectos opuestos. Este tipo de situaciones no es extraña en la fisiología de las células ya que la quinasa Hog1, que también señala condiciones del medio externo, fosforila a la CKI Sic1 produciendo su estabilización en contra de la fosforilación por Cdc28, que lo degrada (Escoté et al. 2004).

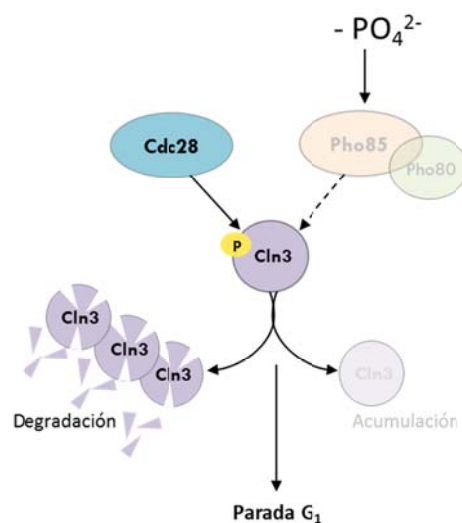
Resulta imprescindible destacar que todas las evidencias *in vitro* comentadas, cobran fuerza gracias a las observaciones en primer lugar, de la coimmunoprecipitación de Cln3 y Pho80 (Figura 19) que indica que existe una unión específica con la ciclina *in vivo* y en segundo lugar por las diferencias en la movilidad electroforética de Cln3 en cepas salvaje y *pho85Δ*, que indican la presencia de una fosforilación *in vivo* (Figuras 20 y 21).

La relevancia biológica de la interacción observada en los experimentos de esta tesis se pone de manifiesto cuando se analiza la cantidad de Cln3 en función del estado de fosforilación: los experimentos demuestran que *in vivo*, Cln3 es menos estable cuando no puede ser fosforilado por Pho85 (Figura 23) tal y como se esperaba por los ensayos de fosforilación mientras que ocurre lo contrario cuando se emula la fosforilación mediante la sustitución por Asp (Figura 24).

Con estas evidencias, la parada en G<sub>1</sub> causada por la deficiencia de fosfatos en el medio (Figura 25-A) se podría explicar de la siguiente manera: la falta de fosfatos inactiva al complejo Pho85-Pho80, el cual deja de fosforilar a Cln3. Debido a esto, se da una reducción en la vida media de esta ciclina y las células paran el ciclo porque no pueden alcanzar los niveles mínimos para activar START y progresar por G<sub>1</sub>. Este modelo explica los retrasos de las cepas *cln3Δ* y *pho85Δ* y la recuperación del fenotipo salvaje cuando las células son transformadas con Cln3-MYC. Es importante destacar que el hecho de no observar un perfil de citometría idéntico entre la cepa transformada con Cln3 no fosforilable y

## DISCUSIÓN

la cepa *cln3Δ* o *pho85Δ*, indica que este mecanismo no es el único que regula la reentrada en el ciclo, aunque hayan grandes diferencias en los niveles de expresión de Cln3 (Figura 25-B).



**Figura 27. Modelo del fenotipo de fosforilación sobre Cln3, en ausencia de fosfatos.** El complejo Pho85-Pho80 se inactiva frente a la escasez de fosfatos y Cln3 es fosforilado únicamente por Cdc28, dando como consecuencia una mayor degradación en esta situación.

La parada en respuesta a la escasez de fosfatos podría ser importante para evitar una disminución en la viabilidad de las células, ya que se ha visto que aquellas que no establecen ni mantienen una correcta parada en  $G_1$  sufren estrés replicativo, lo que conlleva a una viabilidad inferior (Weinberger et al. 2007). Por otra parte, Pho85 parece ser importante para reemprender el ciclo celular cuando los niveles de fosfatos son recuperados, ya que en esta situación el complejo Pho85-Pho80 se activa, comienza a fosforilar nuevamente a Cln3 y el incremento en la cantidad de esta ciclina permite que el programa de START vuelva a disiparse y las células comiencen a ciclar otra vez. Existen mecanismos que en esencia son similares (aunque regulan a sus sustratos de manera opuesta) que implican a Pho85 unido a Pho80 y Pcl5, los cuales inhiben a Pho4 (O'Neill et al. 1996) y participan en la degradación de Gcn4 (Meimoun et al. 2000) respectivamente, manteniendo las funciones de la célula en

presencia de nutrientes. Cuando Pho85 se inactiva frente a la falta de fosfatos o de aminoácidos (Lee et al. 2008, Bömeke et al. 2006), deja de fosforilar a estos factores de transcripción y otros mecanismos se ponen en marcha, como la síntesis de transportadores de fosfatos de alta afinidad o enzimas necesarias para la síntesis de aminoácidos. En el caso de la ciclina, la cantidad de Cln3, es recuperada sin problemas en cepas con Cln3 salvaje y no en aquellas con Cln3 no fosforilable por Pho85 (Figura 25-B).

La idea de Pho85 como intermediario en la respuesta del ciclo a la disponibilidad de nutrientes, también fue propuesta en un trabajo recientemente publicado (Truman et al. 2012) en el que se describe que en ausencia de nitrógeno, Pho85 unido a Pcl2 y Clg1 fosforila a la chaperona Ssa1, que se une a Cln3 y promueve su degradación. Aunque esta vía sigue un mecanismo diferente al de los fosfatos, nuevamente Pho85 está garantizando la parada del ciclo celular en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, usando a Cln3 como pieza reguladora de este proceso. En el caso de los fosfatos, la ausencia de fosforilación por parte del complejo Pho85-Pho80 es la que desestabiliza a Cln3 y para el ciclo. En el caso de nitrógeno, la fosforilación de Ssa1 por Pho85, promueve la inactivación de Cln3 con la misma consecuencia que para la falta de fosfatos: una parada en fase G<sub>1</sub>.

Es interesante destacar que al menos a nivel transcripcional, Pho80 y Pho85 no se ven afectados por la disponibilidad de nitrógeno en el medio (Hardwick et al. 1999). Así, en ausencia de N<sub>2</sub>, Pho85 unido a diferentes ciclinas parece estar ejerciendo funciones diferentes sobre el control del ciclo celular, porque por un lado fosforila a Ssa1 promoviendo la destrucción de Cln3, mientras que por el otro, podría fosforilar directamente a Cln3 promoviendo su estabilidad. Este es un punto que todavía tiene que ser aclarado, pero se podría especular que la regulación del ciclo en respuesta a nutrientes no es una cuestión de todo o nada, sino un delicado balance entre potenciar más una fosforilación frente a la otra (Jiménez et al. 2013). En condiciones normales, Pho85-Pho80 fosforila a Cln3 y ayuda a mantener los niveles de esta ciclina.

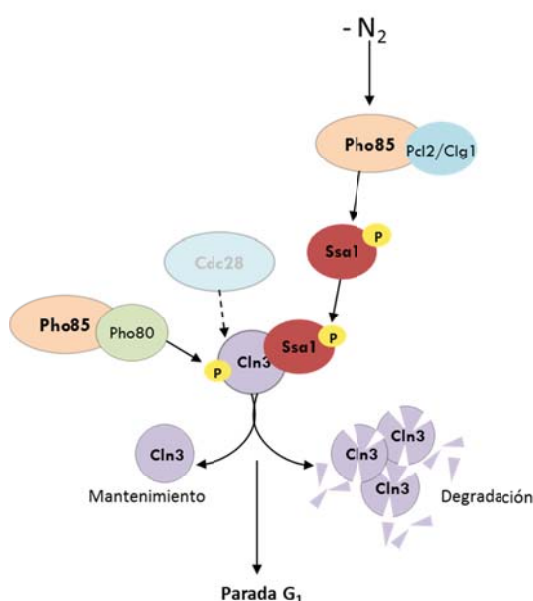
## DISCUSIÓN

Cuando no hay nitrógeno, Pho85-Pcl2/Clg1 empieza a fosforilar a Ssa1 secuestrando a Cln3 y promoviendo su degradación. Aquellas moléculas de Cln3 que no son secuestradas por Ssa1 podrían seguir siendo fosforiladas por Pho85-Pho80. El balance entre ambas fosforilaciones por Pho85 podría estar dando una cantidad neta de Cln3 que, junto con otros mecanismos (como la inactivación de Rim15, Yang et al. 2010) no sea suficiente para que la célula siga ciclando.

Entonces, ¿qué sentido tendría mantener activa la fosforilación con Pho80? Es posible que esta fosforilación esté garantizando una reentrada correcta en el ciclo, ya que podría estar manteniendo unos niveles basales mínimos de Cln3, que permanecen disponibles para cuando la cantidad de nitrógeno en el medio vuelve a ser adecuada y las células deciden volver a ciclar (Figura 28).

De esta manera, la ambigüedad de los efectos de Pho85 sobre Cln3 ofrece a las células una flexibilidad molecular, que les permitiría adaptarse rápidamente a las nuevas condiciones a las que constantemente son sometidas en su medio natural, pudiendo equilibrar la balanza hacia el lado que beneficie el correcto funcionamiento de su fisiología.

**Figura 28. Modelo del fenotipo de fosforilación sobre Cln3, en ausencia de nitrógeno.** Pho85-Pcl2/Clg1 se activa frente a la escasez de nitrógeno y fosforila a Ssa1, que se une a Cln3 y promueve su degradación (Truman et al. 2012). Pho85-Pho80 fosforila a Cln3, lo cual podría ayudar a mantener unos niveles mínimos en la célula. Cdc28 se mantiene inactivo en esta situación (Gallego et al. 1997).



Teniendo en cuenta la maquinaria del ciclo de mamíferos, en la estructura del homólogo de Cln3 (ciclina D) también se puede apreciar una región PEST en el extremo C-terminal de la proteína (Bates et al. 1994) y un residuo de Thr (T286) que promueve la exportación nuclear y la degradación de esta ciclina (Alt et al. 2000). Analizando la secuencia de Ciclina D se puede advertir que antes de T286 hay dos residuos de fosforilación que podrían ser candidatos para ejercer un papel similar a la fosforilación de Pho85 sobre Cln3 promoviendo el mantenimiento de esta proteína.

Ciclina D se encarga de integrar señales mitogénicas y de diferenciación con la maquinaria del ciclo celular (Musgrove 2006) y su desregulación encabeza el desajuste molecular que se observa en diferentes tipos de cáncer (revisiones en Musgrove et al. 2011, Hanahan, Weinberg 2011). Dado que se encuentra sobreexpresada en un gran número de neoplasmas malignos, su potencialidad como diana terapéutica es indiscutible. Por ello, conocer los detalles de su regulación permitirá el diseño de futuras terapias que permitan aumentar la degradación de esta proteína en el momento en el que la proliferación celular deja de estar regulada. En este contexto, si se confirmasen las fosforilaciones descritas en este trabajo, en el modelo de mamíferos, sería posible alterar la vida media de ciclina D mediante la privación de fosfatos de las células u otros mecanismos relacionados con la quinasa que lo fosforila.

La correcta regulación de ciclina D, es un mecanismo que desde levaduras a humanos necesita ser estrictamente controlado mediante una serie de interacciones moleculares que contribuyen a que las células dispongan de estas piezas moleculares en el momento y en el lugar adecuado. Describir esta serie de reacciones nos permitirá algún día, entender y afrontar este complicado mecanismo celular.

## DISCUSIÓN

## CONCLUSIONES

---





Los experimentos presentados en este capítulo han permitido elaborar las siguientes conclusiones generales:

- 1) La ciclina Cln3 es un sustrato de la CDK Pho85. Esto queda demostrado mediante experimentos *in vivo* e *in vitro*.
- 2) De los diez posibles residuos de fosforilación ubicados en la región PEST de Cln3, solamente dos de ellos (S449 y T520) son fosforilados específicamente por Pho85.
- 3) La fosforilación de Pho85 sobre los dos residuos de Cln3 descritos anteriormente, estabiliza a la proteína y repercute en la progresión de las células a través del ciclo.



## CAPÍTULO II:

---

### CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA REGULACIÓN DE PHO85 SOBRE DMA1



## JUSTIFICACIÓN

Los mecanismos encargados de controlar la progresión del ciclo celular, cuentan con las CDKs como pieza molecular clave para garantizar el correcto funcionamiento de este proceso (Mendenhall, Hodge 1998, Measday et al. 1994)

El rol de las CDKs de *S. cerevisiae* está muy bien caracterizado, siendo Cdc28 asociada a sus ciclinas, esencial en la regulación del ciclo celular. Por otra parte, Pho85 asociado a ciclinas de G<sub>1</sub> actúa regulando el ciclo (Measday et al. 1994) y aunque no es esencial para la viabilidad celular, aquellas células que no disponen de este gen tienen múltiples problemas: desde morfología anormal hasta retraso en el ciclo celular, pasando también por una acumulación de glucógeno (Carroll, O'Shea 2002) y sensibilidad a diversos componentes químicos (Huang et al. 2002). Por esta razón, mientras que Cdc28 es conocida como la CDK esencial de *S. cerevisiae*, Pho85 lo es como la CDK multifuncional que controla diferentes vías moleculares de este organismo. La definición no es errónea, ya que Pho85-Pcl1 comparte un gran número de sustratos con Cdc28: Sic1 es fosforilado por ambas quinasas para ser destruido (Nishizawa et al. 1998), ocurre lo mismo con Clb6 (Jackson et al. 2006), mientras que en el caso de Bni4 (Zou et al. 2009, Holt et al. 2009) la fosforilación garantiza su correcta localización.

Por ello, los experimentos expuestos en este capítulo se centran en encontrar nuevos sustratos que únicamente estén siendo afectados por los complejos de Pho85-Pcl1, para así poder averiguar las funciones específicas de esta quinasa en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular. Mediante experimentos de proteómica se buscarán interacciones con este complejo y finalmente se caracterizará la relación molecular de uno de ellos.



## RESULTADOS

---





## 1. DETECCIÓN DE SUBSTRATOS ESPECÍFICOS DE PHO85-PCL1

Se ha descrito que el papel de Pho85 en el ciclo celular se centra principalmente en fase G<sub>1</sub> (Huang et al. 2007). Para detectar los substratos relacionados con el ciclo que solo estén afectados por Pho85, se decidió purificar las ciclinas Pcl1 y Cln2 y estudiar las proteínas que son halladas en la purificación de Pcl1, descartando aquellas que también sean purificadas con Cln2. Así, se purificó Pcl1-TAP y Cln2-TAP a partir de cultivos en crecimiento exponencial de cepas BY4741. Posteriormente las ciclinas purificadas se analizaron mediante espectrometría de masas para detectar las proteínas que bajan unidas a cada una de ellas (Tabla 2).

PURIFICACIÓN	DETECCIÓN
Pcl1-TAP	AME1, ATG29, CDC3, DMA1, EF1A, GFD1, GSP1, GUD, HMS1, MAG2, MNE1, PABP, PCL1, PHO85, PSP2, RSP5, SEC4, SHS1, UBI4, URA7.
Cln2-TAP	ACE2, ACM1, ATP3, BEM3, BUD2, BUD3, CDC25, CDC28, CDC4, CDC48, DIG1, FAR1, GRR1, RGA1, SIC1, SIN3, SKP1, STE20, ZDS1.

Tabla 2. Proteínas purificadas con Cln2-TAP y Pcl1-TAP. Cln2-TAP y Pcl1-TAP fueron purificadas a partir de cultivo asincrónico mediante cromatografía de afinidad con bolas de IgG-agarosa. La purificación fue analizada por espectrometría de masas.

Una vez comprobado que los substratos purificados con Pcl1-TAP no están presentes en la purificación con Cln2-TAP, se procedió a analizar el resultado, que reveló la presencia de proteínas relacionadas con el mantenimiento del anillo de septinas (Cdc3, Shs1, Dma1), autofagia (Atg29, Rab4) traducción y *splicing* (Ef1a, Psp2, Pab1) entre otras (Tabla 3).

GEN	SIGNIFICADO	FUNCIÓN PROTEICA
<i>AME1</i>	Associated with Microtubules and Essential	Proteína esencial del cinetocoro, asociada a microtúbulos y corpúsculo polar.
<i>ATG29</i>	AuTophagy related	Recluta otras proteínas asociadas a autofagia hacia la estructura autofagosómica.
<i>CDC3</i>	Cell Division Cycle	Componente del anillo de septinas necesario para citoquinesis.
<i>DMA1</i>	Defective in Mitotic Arrest	Ubiquitin ligasa (E3) controla la posición del anillo de septinas. Junto con Dma2 regula la localización de Elm1 en el cuello.
<i>EF1A</i>	Translation Elongation Factor	Factor de elongación de la traducción. Participa en la reacción de unión del amino acil tRNA a los ribosomas.
<i>GFD1</i>	Good For Dbp5p	Función desconocida. Suprime la mutación de Dbp5.
<i>GSP1</i>	Genetic Suppressor of Prp20-1	Ran GTPasa, mantiene la organización nuclear, procesamiento de RNA y transporte.
<i>GUD1</i>	GUanine Deaminase	Enzima catabólico de la ruta de guanina. Produce xantina y amonio.
<i>HMS1</i>	High-copy Mep Suppressor	Su sobreexpresión causa crecimiento hiperfilamentoso.
<i>MAG2</i>	3-MethylAdenine DNA Glycosylase	Proteína citoplasmática de función desconocida. Similar a la proteína humana con dominio RING Rnf10.

<i>MNE1</i>	~	Proteína de la matriz mitocondrial implicada en el <i>splicing</i> de COX1
<i>PAB1</i>	Poly(A) Binding protein	Implicado en el control de la longitud de la cola poli-A.
<i>PCL1</i>	Pho85 CycLin	Ciclina implicada en la regulación del crecimiento polarizado, morfogénesis y progresión por el ciclo celular.
<i>PHO85</i>	PHOsphate metabolism	Quinasa dependiente de ciclina implicada en la regulación de la respuesta celular a condiciones ambientales.
<i>PSP2</i>	Polymerase SuPpressor	Proteína citoplasmática rica en Asn con motivos RGG. Posible rol en <i>splicing</i> de mRNA mitocondrial.
<i>RSP5</i>	Reverses Spt-Phenotype	Ubiquitin ligasa (E3) implicada en respuesta a estrés térmico, transcripción, endocitosis y estabilidad ribosómica.
<i>SEC4</i>	SECreatory	GTPasa esencial para secreción de vesículas y autofagia.
<i>SHS1</i>	Seventh Homolog of Septin	Componente del anillo de septinas necesario para citoquinesis.
<i>UBI4</i>	Ubiquitin	Ubiquitina. Marca a las proteínas para ser degradadas selectivamente por la subunidad 26S del proteasoma.
<i>URA7</i>	URAcil requiring	Cataliza la transferencia de ATP desde la glutamina al UTP, formando CTP, paso final de la síntesis <i>de novo</i> de pirimidinas.

Tabla 3. Proteínas purificadas con Pcl1-TAP.

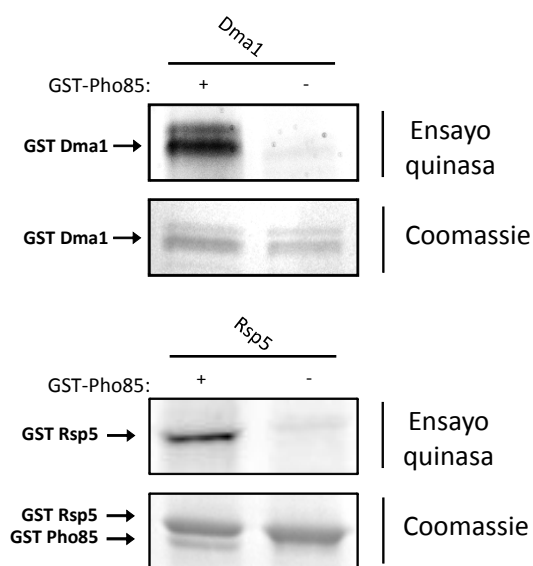
En el grupo de proteínas purificadas con Pcl1, dos de ellas llamaron especialmente la atención por el papel que desempeñan en la célula: Dma1 y Rsp5, conocidas por su función como ubiquitin ligasas (E3). Debido a la gran cantidad y a las diferentes clases de E3 que existen en todos los organismos, las ubiquitin ligasas son de los factores implicados en la cascada de ubiquitinación, que más se desconoce. En células humanas, las ubiquitin ligasas están implicadas en un gran número de patologías, lo cual las vuelve idóneas para ser utilizadas como dianas terapéuticas. A medida que avanzan las investigaciones, se descubre que la complejidad del sistema de ubiquitinación es cada vez mayor y el número de preguntas relacionadas con este tipo de enzimas, aumentan día a día. Por ello, los esfuerzos se han centrado en caracterizar la relación molecular que existe entre Pho85 y las E3 ligasas que precipitaron con Pcl1, las cuales podrían estar siendo afectadas de manera cíclica, en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular.

## 2. FOSFORILACIÓN *IN VITRO* DE DMA1 Y RSP5

Tal y como se ha revisado en la introducción, la ubiquitinación específica de las proteínas es un mecanismo que depende de la acción secuencial de enzimas activadoras (E1), enzimas conjugadoras (E2) y enzimas ligadoras o ligasas (E3), las cuales permiten que la molécula de ubiquitina se active y pueda ser unida covalentemente a sus substratos.

Resulta interesante pensar que dos piezas de la maquinaria de ubiquitinación, están siendo reguladas en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular específicamente por la CDK Pho85.

El hecho de que sean purificadas junto a Pcl1 no significa que tenga que haber una fosforilación directa hacia estos substratos. Por ello se diseñaron ensayos de fosforilación *in vitro* mediante los cuales se comprobó que Pho85 unido a Pcl1, los está fosforilando (Figura 29).

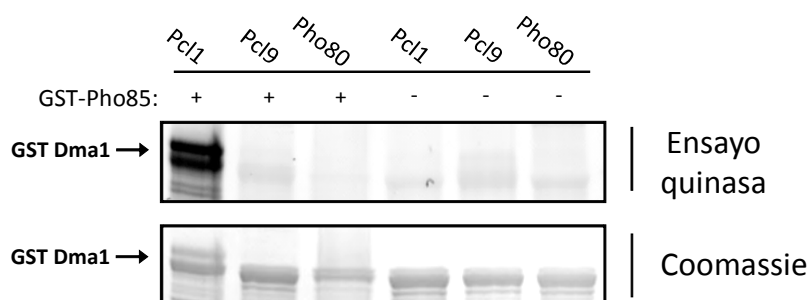


**Figura 29** Fosforilación *in vitro* de Dma1 y Rsp5. GST-Dma1 y GST-Rsp5 se incubaron con GST-Pcl1 y ATP en presencia (+) o ausencia (-) de Pho85. Las bandas de fosforilación se tiñeron con ProQ Diamond. La cantidad de proteína en cada ensayo se evaluó mediante tinción con azul de Coomassie.

Frente a este resultado preliminar, con los experimentos presentados en este capítulo se intentará caracterizar la interacción molecular que existe entre el complejo Pho85-Pcl1 y Dma1. La caracterización molecular de la fosforilación de Rsp5 está siendo analizada por otros investigadores de este grupo.

### 3. ESPECIFICIDAD DE FOSFORILACIÓN SOBRE DMA1

Con el objetivo de confirmar que la fosforilación es específica del complejo Pho85-Pcl1 se diseñó un ensayo *in vitro* donde se enfrentaron diferentes ciclinas a Dma1 (Figura 30). El resultado demuestra que Dma1 es fosforilada únicamente en presencia de Pcl1 y no con Pcl9, otra ciclina implicada en ciclo celular. Pho80, ciclina responsable del control sobre el metabolismo de los fosfatos, tampoco es capaz de fosforilar a Dma1 en las condiciones ensayadas.

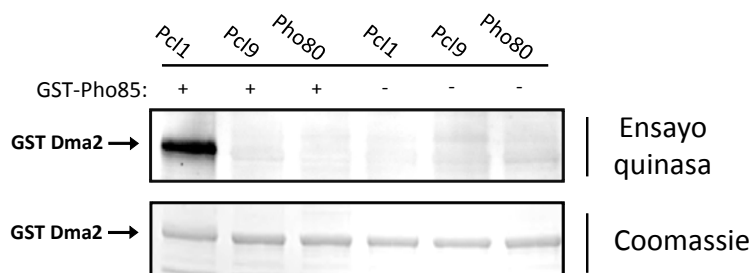


**Figura 30** Ensayo de fosforilación de Dma1. GST-Dma1 se incubó con GST-Pcl1, GST-Pcl9 y GST-Pho80 en presencia (+) o ausencia (-) de GST-Pho85 y con ATP en todos los casos. La cantidad de proteína en cada ensayo se evaluó mediante tinción con azul de Coomassie.



#### 4. FOSFORILACIÓN *IN VITRO* DE DMA2

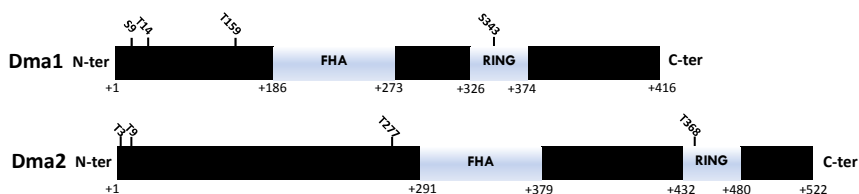
Dma1 y Dma2 comparten en su estructura la mayoría de posibles residuos fosforilables, por esta razón es factible pensar que, aunque Dma2 no fue encontrada en la precipitación de Pcl1-TAP, también podría ser fosforilada por Pho85. Tal y como se esperaba, las observaciones para Dma1 de la figura 30, se han repetido en el caso de Dma2 (Figura 31).



**Figura 31 Fosforilación de Dma2.** GST-Dma2 se incubó con GST-Pcl1, GST-Pcl9 y GST-Pho80 en presencia (+) o ausencia (-) de GST-Pho85 y con ATP en todos los casos. La cantidad de proteína en cada ensayo se evaluó mediante tinción con azul de Coomassie.

#### 5. CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS DE FOSFORILACIÓN

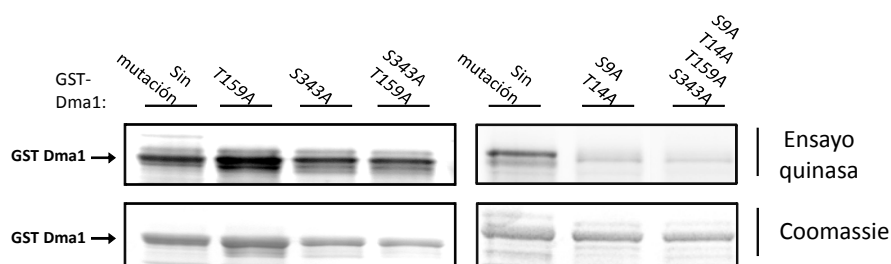
Aprovechando la homología de Dma1 y Dma2 (Figura 32) y el hecho de que ambas se fosforilan por Pcl1, se analizaron los residuos fosforilables de las dos proteínas, para intentar obtener algún indicio sobre cuáles pueden ser los residuos implicados.



**Figura 32 Estructura de Dma1 y Dma2.** Se representan los dominios FHA y RING, así como los residuos SP/TP conservados.

En la estructura tanto de Dma1 como de Dma2, es posible observar que la región RING contiene un residuo fosforilable. También se repite el patrón con el residuo de Dma1 Thr159 y la Thr277 de Dma2, ya que ambos se encuentran justo antes del dominio FHA. Otra similitud son los dos residuos ubicados en la porción N-terminal de ambas proteínas, bastante cercanos unos de otros. Teniendo en cuenta estos datos, se examinó la fosforilación sobre construcciones mutantes de Dma1, donde estos residuos fueron reemplazados por Ala.

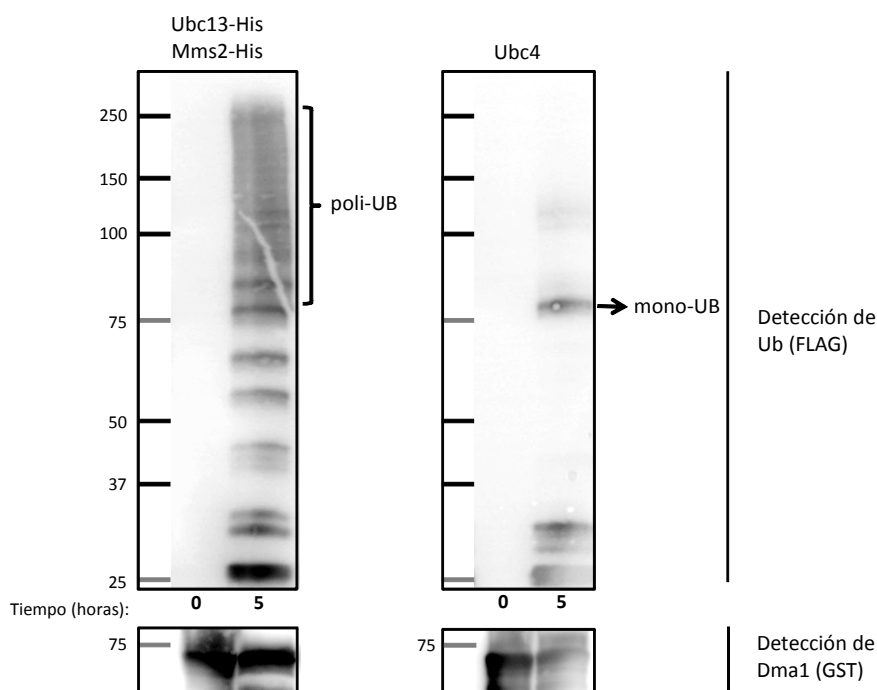
El resultado permite concluir que los residuos de la porción N-terminal, Ser9 y Thr14, están implicados en esta fosforilación *in vitro* (Figura 33). Como el objeto de este estudio se centra en caracterizar la interacción molecular con Dma1, Dma2 solo se ha utilizado como ayuda para escoger estratégicamente los residuos que se someterían a mutagénesis dirigida.



**Figura 33 Fosforilación de Dma1 salvaje y mutante.** Las diferentes construcciones mutantes de Dma1 se purificaron de *E. coli* y se incubaron con GST-Pho85, GST-Pcl1 y ATP. Las bandas fosforiladas se observaron por tinción con ProQ Diamond y la cantidad de proteína se observó por tinción del gel con azul de Coomassie.

## 6. ENSAYO DE AUTOUBIQUITINACIÓN *IN VITRO* DE DMA1

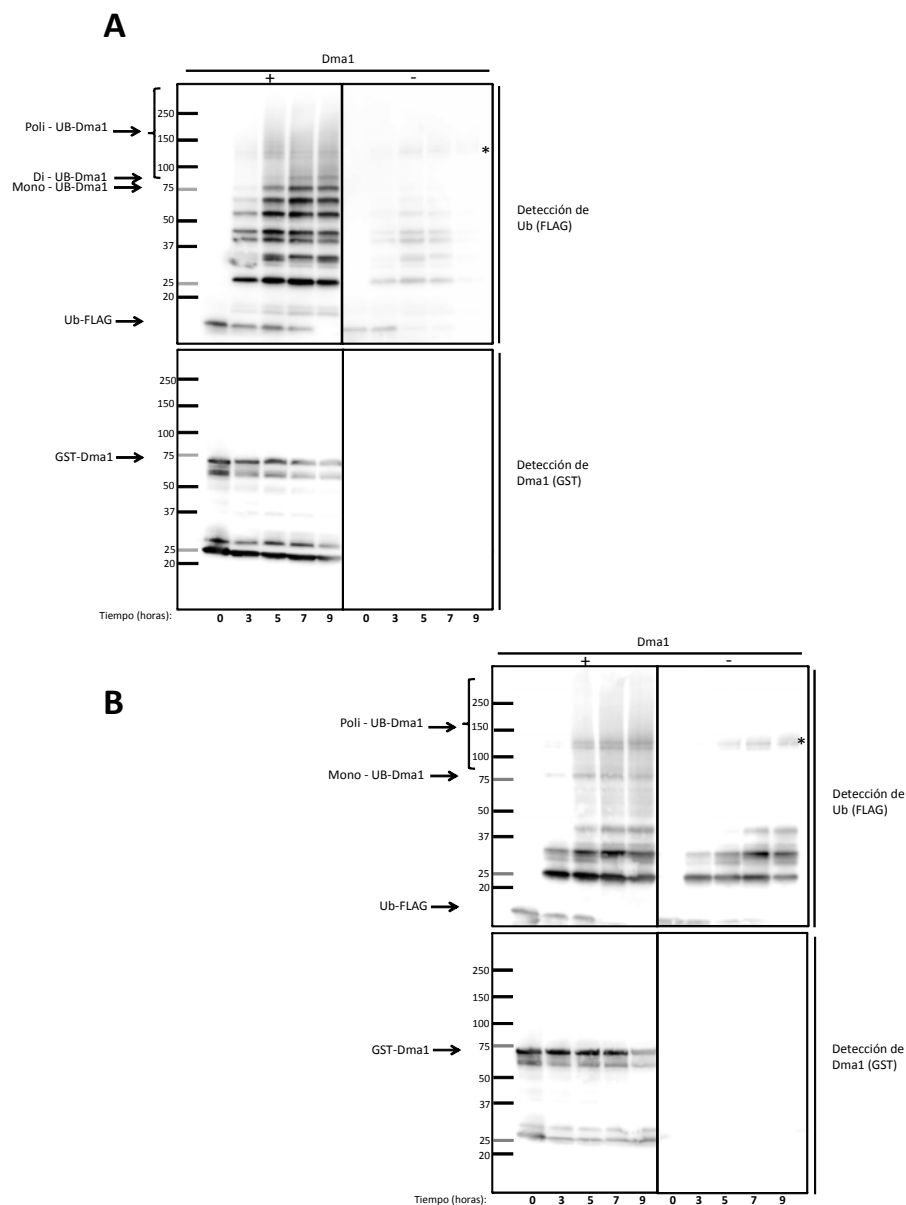
En 2008, Loring y colaboradores describieron mediante experimentos *in vitro*, que Dma1 tiene actividad autoubiquitinadora en presencia de dos E2 diferentes: Ubc4 y Ubc13/Mms2 (Loring et al. 2008). Teniendo en cuenta que en aquel momento no se había descrito ningún sustrato de Dma1, todos los esfuerzos se volcaron en reproducir en este laboratorio, los ensayos *in vitro* que demuestran esta autoubiquitinación, para así, poder estudiarla en función del estado de fosforilación de Dma1. Una vez puesto a punto el protocolo, los resultados de autoubiquitinación *in vitro* pudieron repetirse y se observó una señal de poliubiquitinación en presencia del dímero Ubc13/Mms2 y una señal de monoubiquitinación y débil poliubiquitinación por parte de Ubc4 (Figura 34).



**Figura 34** Ensayo de autoubiquitinación de Dma1 GST-Dma1, Uba1-His (E1) y las correspondientes E2 indicadas encima de cada panel, se incubaron durante 5 horas en presencia de ATP y ubiquitina-FLAG. El panel superior indica el resultado de la inmunodetección con  $\alpha$ -FLAG y el inferior la señal de GST-Dma1. Tiempo 0 corresponde a la reacción sin ATP.

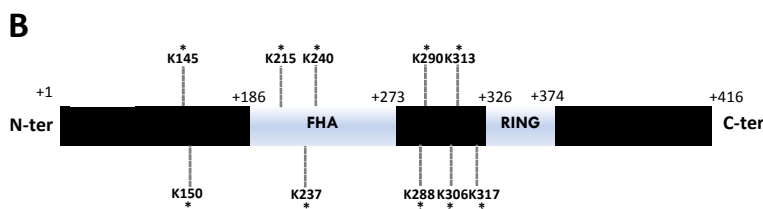
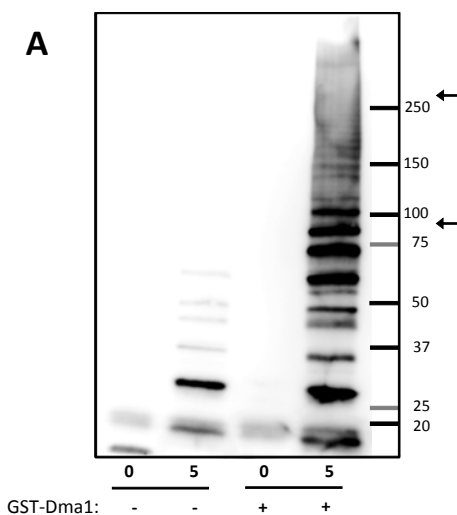
Las bandas de ubiquitinación se reconocen mediante la detección de las moléculas de ubiquitina con anticuerpo  $\alpha$ -FLAG. Una de las dificultades técnicas de este experimento, surgió cuando estas mismas bandas se intentaban detectar con anticuerpo  $\alpha$ -GST, para indicar que la ubiquitinación observada correspondía específicamente a Dma1 y descartar de esta manera un artefacto asociado a la técnica, como podría ser la ubiquitinación inespecífica de cualquier proteína del sistema enzimático o el efecto de alguna proteína inespecífica purificada de *E. coli*.

Con  $\alpha$ -GST era posible detectar la porción de Dma1 no ubiquitinado, a la altura correspondiente a su peso molecular pero a pesar de que los controles negativos indicaban que esta ubiquitinación era dependiente de Dma1 (Figura 35), las pruebas con  $\alpha$ -GST de diferentes casas comerciales, seguían sin detectar las poblaciones de Dma1 superiores a su peso molecular.



**Figura 35** Ensayo de autoubiquitinación en presencia/ausencia de Dma1 (A) Corresponde a la reacción con Ubc13/Mms2 y (B) con Ubc4. Las condiciones del ensayo son como en el apartado anterior pero se han obtenido muestras a tiempo 3, 5, 7 y 9 horas para observar el aumento en la señal de ubiquitinación. En el panel superior de cada apartado se representa la detección de ubiquitinas con  $\alpha$ -FLAG. La sección (+) contiene la reacción con todos los componentes del sistema enzimático. La porción (-) contiene todo menos Dma1. En el panel inferior de cada apartado se representa el resultado del  $\alpha$ -GST. El \* indica una banda inespecífica que se observa en todas las reacciones. A la izquierda de cada imagen se indica el valor en kDa del marcador de peso molecular

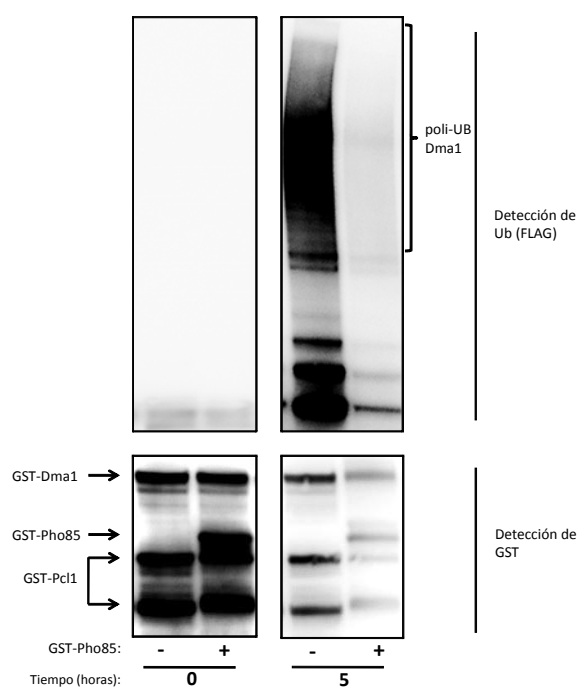
Probablemente la cantidad de proteína poliubiquitinada es inferior al límite de detección del anticuerpo GST, dando como resultado la ausencia de señal. Para confirmar la procedencia de la ubiquitinación detectada con  $\alpha$ -FLAG, se analizó por espectrometría de masas la fracción de señal que, de acuerdo a los resultados previos, parecía corresponder a Dma1 ubiquitinado. Se examinó el ensayo correspondiente al dímero Ubc13/Mms2. La señal entre flechas de la figura 36-A, corresponde a la fracción del gel que se envió al servicio de proteómica, cuyos resultados indican que efectivamente, esta fracción corresponde a Dma1 ubiquitinado. Las ubiquitininas que se han detectado, se unen mediante las Lys de Dma1 que se indican en la figura 36-B. Los espectros de cada una de ellas se encuentran en el anexo de este manuscrito.



**Figura 36 (A) Ensayo de autoubiquitinación de Dma1 para espectrometría de masas.** Se incubó Uba1-His (E1), Ubc13-His/Mms2-His (E2), ubiquitina-FLAG y ATP en presencia (+) y ausencia (-) de Dma1-GST durante 5 horas. Parte de la reacción se analizó por western blot con  $\alpha$ -FLAG y se decidió correr en gel de acrilamida el resto para recortar la región indicada y enviar al servicio de proteómica. **(B) Lys ubiquitinadas en Dma1.** El resultado de espectrometría de masas reveló que Dma1 está ubiquitinado en las Lys señaladas en este esquema con \*. Con \*\* se indican las Lys ubiquitinadas, que también fueron descritas en Loring et al. 2008).

## 7. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE DMA1 EN FUNCIÓN DE SU ESTADO DE FOSFORILACIÓN

Una vez comprobado que la señal de ubiquitinación corresponde a Dma1, se procedió a analizar cómo puede estar afectando la fosforilación de Pho85 sobre la actividad autoubiquitinadora de esta proteína. Para llevar a cabo este experimento, se agregaron Pho85 y Pcl1 a la reacción de ubiquitinación. Dado que esta reacción requiere ATP (al igual que la de fosforilación) y que la composición del tampón de ubiquitinación es similar al de fosforilación, se supone que ambas reacciones se darán a la vez. En estas condiciones, se observa una clara disminución de la actividad de autoubiquitinación de Dma1, cuando Pho85 está presente (Figura 37).



**Figura 37** Ensayo de autoubiquitinación de Dma1 en presencia de Pho85 y Pcl1. GST-Dma1 se incubó con Uba1-His (E1), Ubc13-His/Mms2-His (E2), GST-Pcl1, ubiquitina-FLAG y ATP en presencia (+) y ausencia (-) de GST-Pho85 durante 5 horas. El panel de la izquierda enseña el tiempo 0 (antes de agregar ATP) y el de la derecha la ubiquitinación después de 5 horas de reacción.

8. ESTUDIO DE LA RELEVANCIA DE S9 Y T14 SOBRE LA ACTIVIDAD LIGASA DE DMA1

Para describir la relevancia de la fosforilación de S9 y T14 sobre la actividad de Dma1, se utilizaron mutantes no fosforilables. Primero se realizó, un ensayo de fosforilación y posteriormente el producto de esta reacción se utilizó en un ensayo de ubiquitinación. La figura 38-A demuestra que la versión con Dma1 fosforilado (Dma1-P, primer carril, t5) se ubiquitina menos, mientras que la versión no fosforilable se ubiquitina con la misma intensidad que los controles negativos (siguientes carriles, t5). En la figura 38-B se puede comprobar la diferencia de fosforilación entre Dma1 salvaje y Dma1 S9AT14A, así como los controles negativos.

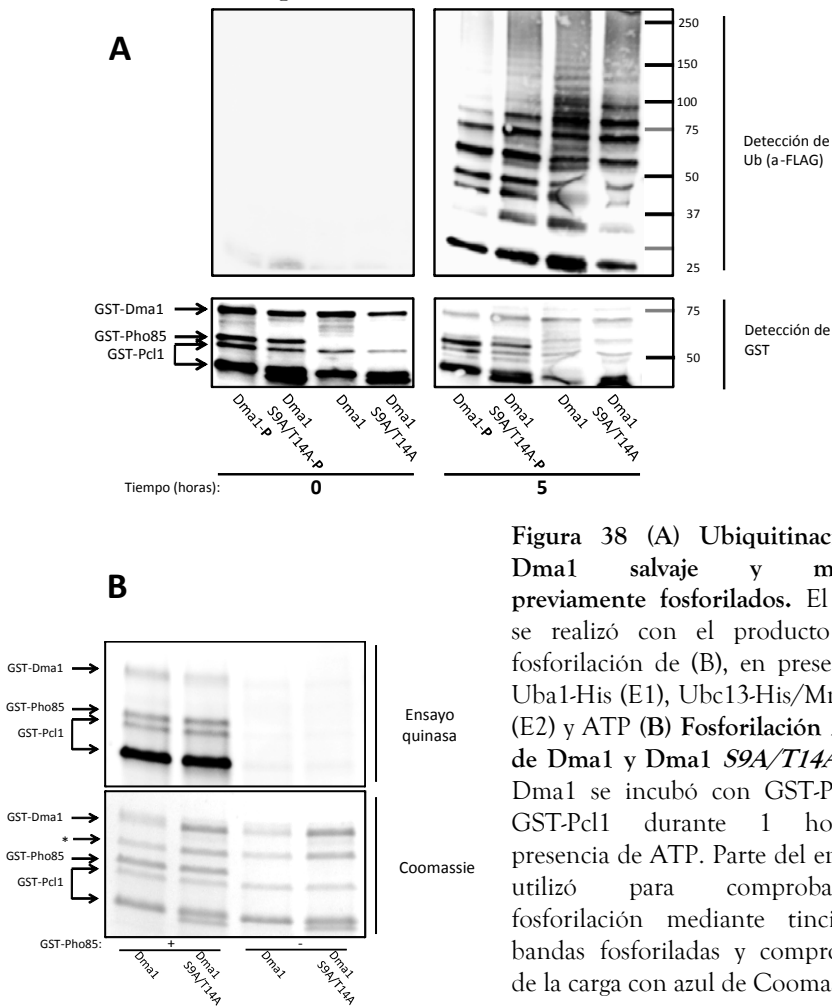
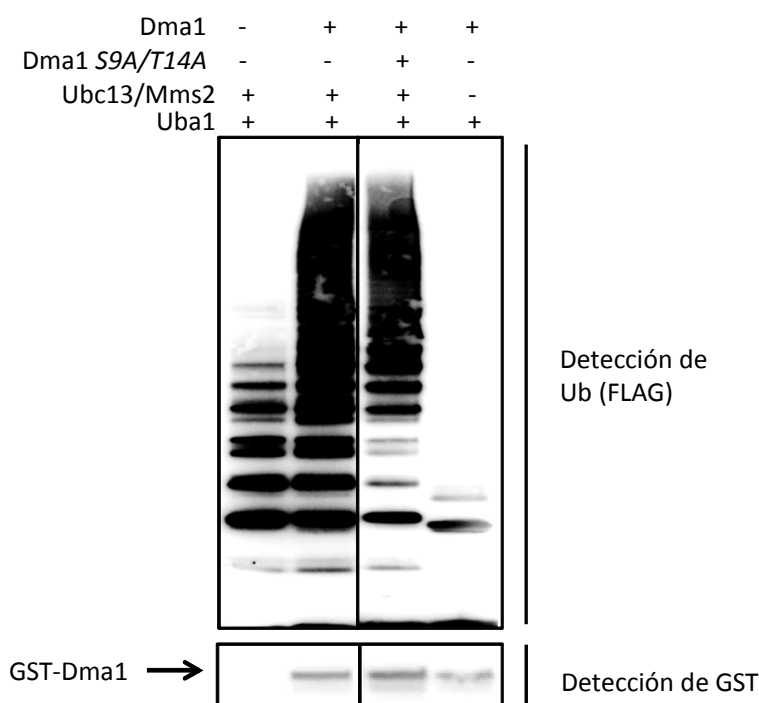


Figura 38 (A) Ubiquitinación de Dma1 salvaje y mutante, previamente fosforilados. El ensayo se realizó con el producto de la fosforilación de (B), en presencia de Uba1-His (E1), Ubc13-His/Mms2-His (E2) y ATP (B) Fosforilación *in vitro* de Dma1 y Dma1 S9A/T14A. GST-Dma1 se incubó con GST-Pho85 y GST-Pcl1 durante 1 hora en presencia de ATP. Parte del ensayo se utilizó para comprobar la fosforilación mediante tinción de bandas fosforiladas y comprobación de la carga con azul de Coomassie.



En la figura 38-A, se puede observar que la construcción de Dma1 salvaje y la construcción mutante, se ubiquitinan casi al mismo nivel cuando no están fosforiladas (carriles 3 y 4 de tiempo 5). De esta manera, parece que la sustitución por Ala, no está modificando su actividad. Para confirmar que la presencia del complejo quinasa/ciclina no está alterando el equilibrio de esta delicada reacción, se realizó un ensayo de ubiquitinación convencional (sin Pho85 ni Pcl1) y se observó que el nivel de ubiquitinación es similar con ambas construcciones (Figura 39) confirmando que los resultados del apartado anterior vienen dados por las diferencias en la fosforilación de Dma1 y no debido a la presencia de Pho85 y Pcl1 o por problemas derivados de la sustitución de residuos, sobre la actividad de Dma1.



**Figura 39** Ensayo de ubiquitinación estándar con Dma1 salvaje y mutante. GST-Dma1 y GST-Dma1 *S9A/T14A* se incubaron con Uba1-His (E1), Ubc13-His/Mms2-His (E2), ubiquitina-FLAG y ATP durante 5 horas. Como control negativo se ensayó la E2 sin la E3 (primer carril) y la E3 sin la E2 (cuarto carril). El panel superior enseña la inmunodetección con  $\alpha$ -FLAG y el inferior con  $\alpha$ -GST.

9. ANÁLISIS DE INTERACCIÓN *IN VIVO* ENTRE PHO85 Y DMA1

Una vez caracterizada esta interacción molecular *in vitro*, se procedió a estudiar si también hay interacción *in vivo*. Los resultados de la purificación con Pcl1-TAP indican que hay interacción con Pcl1, pero es importante conocer si esta coimmunoprecipitación es positiva también en el caso en el que se precipite la CDK, ya que esto indicaría con más fuerza, que la fosforilación que se observa *in vitro*, podría ser también observada *in vivo*. Para comprobar esta interacción, se transformó la cepa Dma1-TAP con plásmido pEKG vacío y pEKG PHO85-GAL-GST y Pho85 se inmunoprecipitó con bolas de glutatión-sefarosa. El producto de la inmunoprecipitación solo presentó señal para Dma1-TAP en la cepa transformada con Pho85-GST, indicando que ambos están interaccionando *in vivo* (Figura 40).

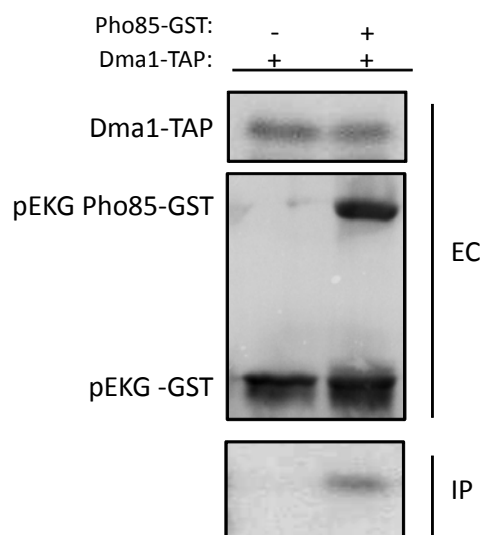


Figura 40 Coimmunoprecipitación de GST-Pho85 y Dma1-TAP. EC: extracto celular. IP: inmunoprecipitación. Después de la extracción de proteínas, los extractos se incubaron durante 4 horas con resina de glutatión-sefarosa. La detección de proteínas se realizó con anticuerpos específicos.

## 10. ANÁLISIS DE FOSFORILACIÓN *IN VIVO* DE DMA1

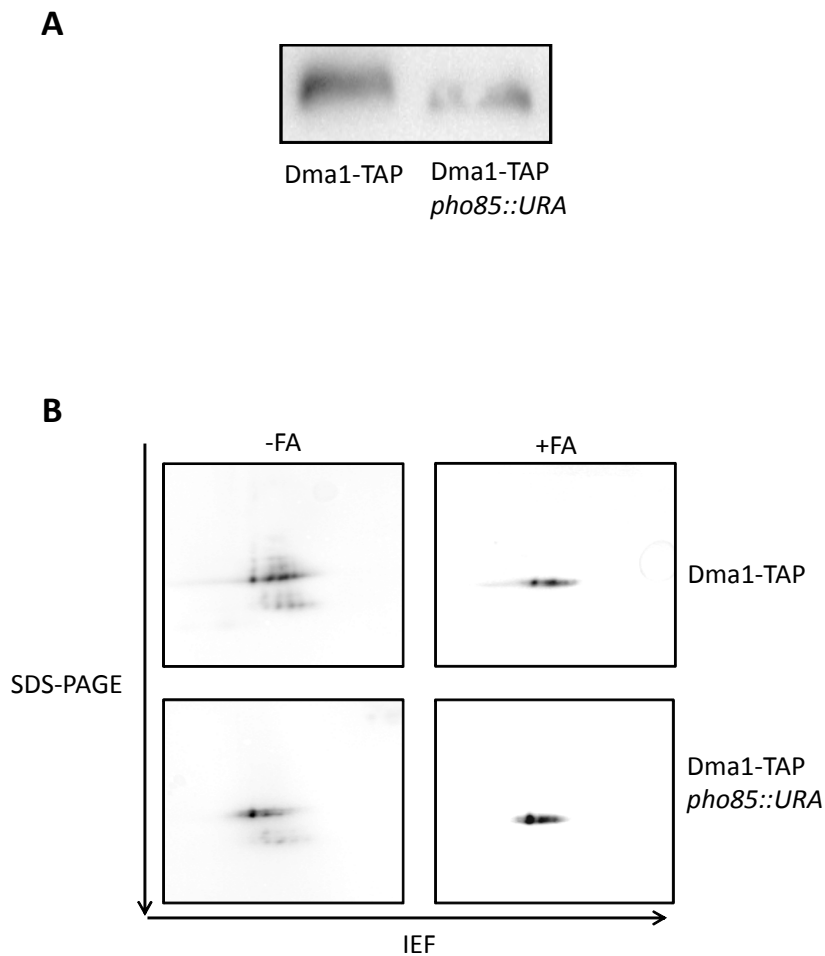
Para confirmar que Dma1 es un sustrato *in vivo* de Pho85-Pcl1, se analizó el cambio de movilidad electroforética.

Debido a que no se observan diferencias en geles convencionales, se agregó el compuesto Phostag y en tres experimentos independientes pudo observarse un pequeño cambio en la movilidad electroforética de Dma1, que depende de la presencia de Pho85 (Figura 41-A).

El mismo resultado se obtuvo mediante electroforesis bidimensional, donde purificando Dma1-TAP a partir de cepa salvaje y *pho85::URA* se pudo apreciar que el patrón electroforético de las poblaciones de Dma1, es diferente (Figura 41-B).

Para confirmar que se trata específicamente de una fosforilación, las proteínas purificadas se sometieron a tratamiento con fosfatasa alcalina (FA). En la figura 41-B se puede observar que las proteínas purificadas de cepas salvajes, después del tratamiento con fosfatasa alcalina adquieren el mismo patrón que el de las cepas *pho85::URA*, mientras que las proteínas de cepas mutantes permanecen iguales después del tratamiento.

Así, estos resultados indican que Dma1 es un sustrato de Pho85.



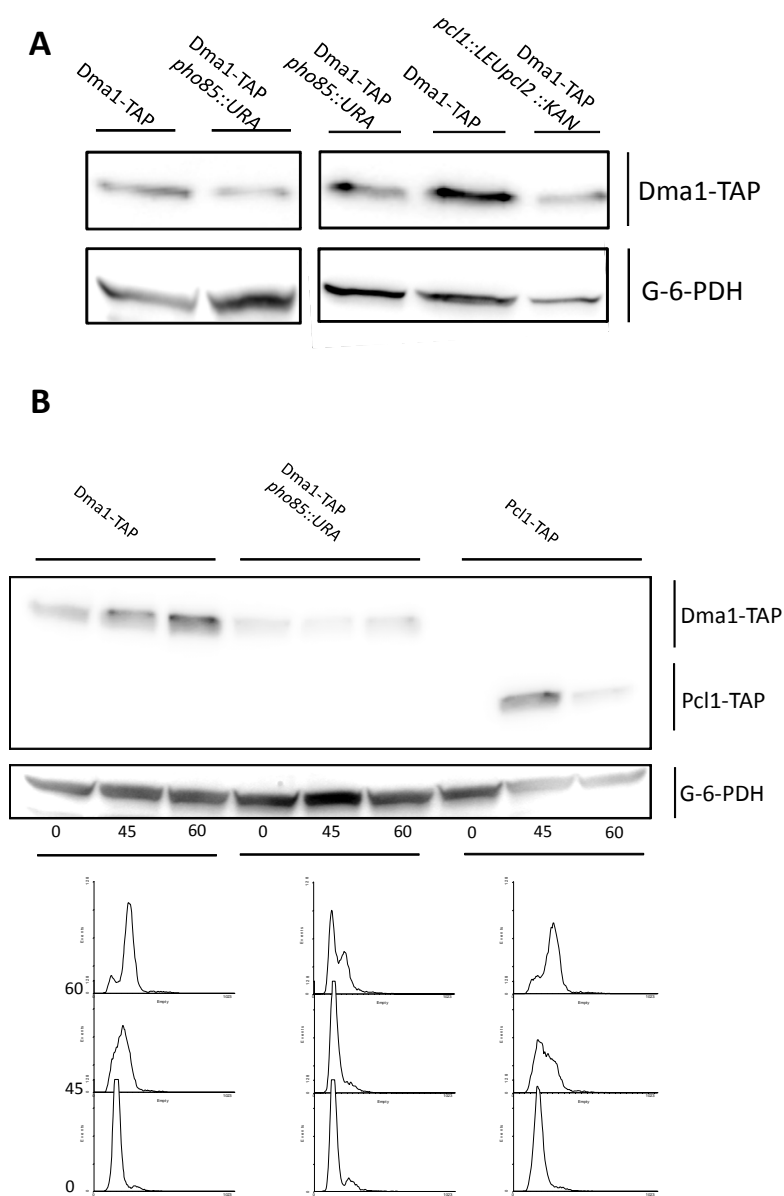
**Figura 41 (A) Fosforilación *in vivo* de Dma1-TAP.** Extractos de células de cepa salvaje y *pho85::URA* con marcaje genómico Dma1-TAP, se analizaron mediante SDS-PAGE Phostag. En estos experimentos, no es posible observar el control de carga ya que para obtener este resultado, el tiempo de electroforesis es muy extenso y se pierden las proteínas utilizadas con este fin. **(B) Tratamiento con fosfatasa alcalina de la fosforilación *in vivo* de Dma1-TAP.** Dma1-TAP fue purificada con resina de IgG-agarosa a partir de cepas salvaje y *pho85::URA*. Una parte del producto purificado se trató con fosfatasa alcalina (+FA) y la otra siguió el mismo proceso sin la enzima (-FA). Seguidamente, el producto se sometió a isoelectroenfoque (IEF) en tiras de pH de 3-10 y finalmente las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE. La detección se realizó con  $\alpha$ -PAP. Se cargó el doble de producto de la cepa *pho85::URA*

**11. CANTIDAD DE DMA1 EN *pho85Δ* Y *pcl1Δpcl2Δ***

Los resultados *in vitro* indican que la fosforilación de Pho85-Pcl1 sobre Dma1, reduce su actividad autoubiquitinadora en presencia de la E2 Ubc13/Mms2. Una hipótesis que se desprende de estos resultados, es que la reducción en la autoubiquitinación de Dma1 podría traducirse en una menor destrucción de Dma1 cuando las células progresan por G<sub>1</sub>.

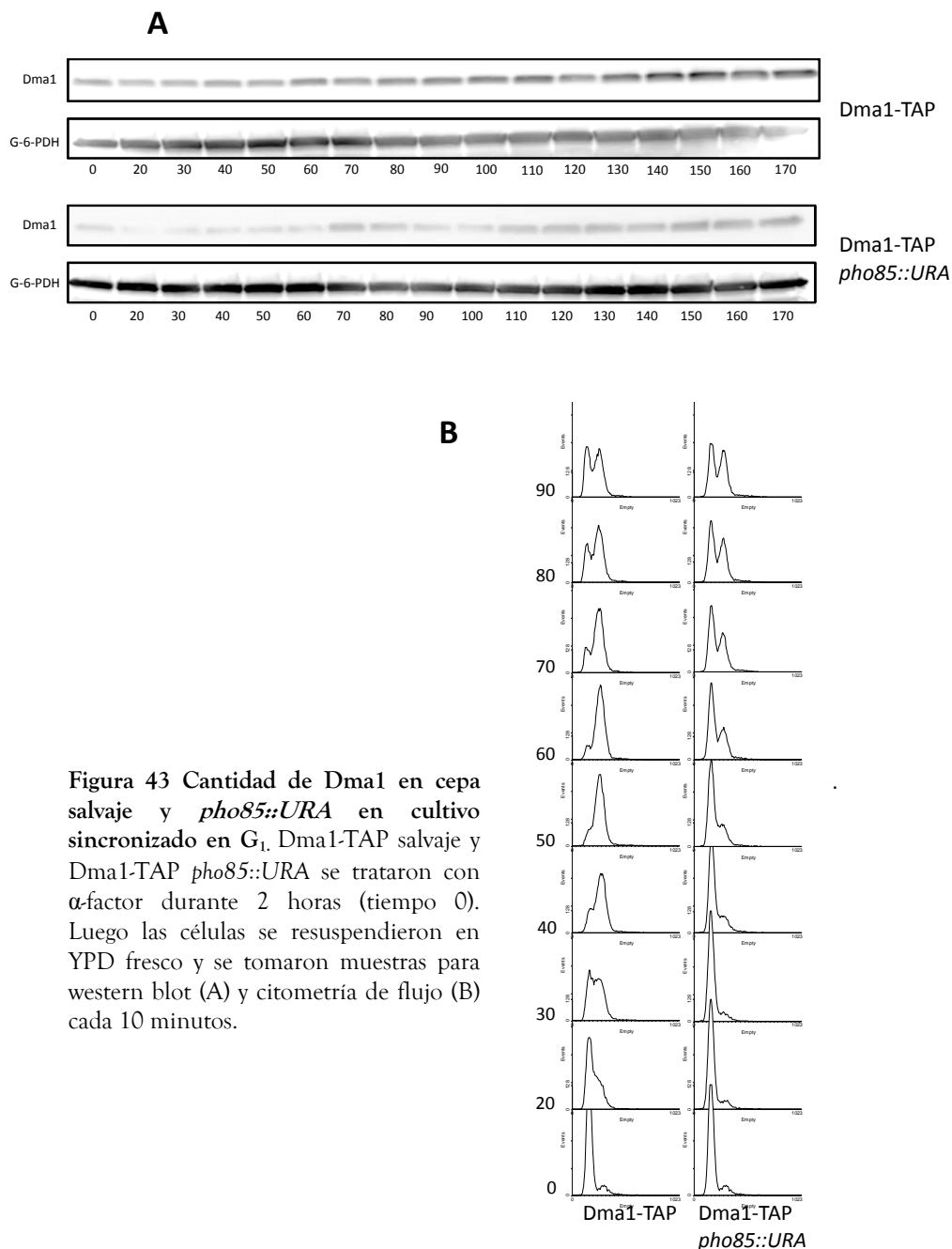
En cultivos de células en fase exponencial, se comprueba que tanto *pho85::URA* y como *pcl1::LEUpcl2::KAN* tiene menos cantidad de Dma1-TAP cuando se compara con la cepa salvaje (Figura 42-A). La diferencia es sutil, posiblemente porque en fase exponencial no todas las células están en G<sub>1</sub> y el efecto se ve enmascarado. Por esta razón, se decidió sincronizar las células con  $\alpha$ -factor para seguir la cantidad de Dma1 cuando progresan en el ciclo. También se siguió la cantidad de Pcl1, para observar el momento del ciclo en el que alcanza su cantidad máxima, y ver si es posible establecer alguna relación.

En estas condiciones, las diferencias entre una cepa salvaje y una *pho85::URA* son mucho mayores (Figura 42-B), y es posible observar un aumento progresivo en la cantidad de Dma1 de la cepa salvaje. El máximo aumento de Dma1 coincide cuando Pcl1 disminuye su cantidad.



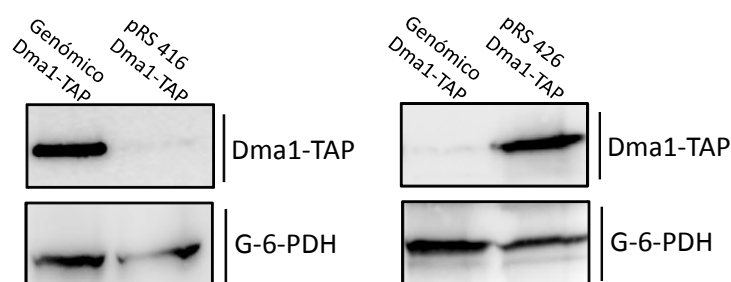
**Figura 42 (A) Cantidad de Dma1 en cepa salvaje y mutante en cultivo exponencial.** Mediante SDS-PAGE se analizaron extractos de células asincrónicas de cepa salvaje, *pho85::URA* y *pcl1::LEUpcl2::KAN* con etiqueta genómica Dma1-TAP. **(B) Cantidad de Dma1 en cepa salvaje y *pho85::URA* en cultivo sincronizado en G<sub>1</sub>.** Dma1-TAP salvaje, Dma1-TAP *pho85::URA* y Pcl1-TAP se trataron con  $\alpha$ -factor durante 2 horas (tiempo 0). Luego las células se resuspendieron en YPD fresco y se tomaron los puntos 45 y 60 minutos. En el panel superior se enseña la cantidad de proteína, en el panel inferior la progresión de las células en el ciclo analizado por citometría de flujo.

Se decidió hacer un muestreo más prolongado para ver si existe un comportamiento cíclico de Dma1. En la figura 43 se puede observar que las diferencias entre células salvajes y *pho85::URA* se mantienen en la progresión de este experimento.



## 12. FUTURAS PERSPECTIVAS

Con la caracterización molecular obtenida en este trabajo, a partir de ahora los esfuerzos se centrarán en diseñar experimentos que puedan aclarar la importancia de estas evidencias observadas. Resulta imprescindible, conocer cuales procesos fisiológicos estarán afectados si el mecanismo descrito no funciona y lo relevante que resulta para las células la existencia de estas relaciones moleculares. Para ello, como primer paso se planificó introducir los residuos no fosforilables Ser9 y Thr14 en plásmidos pRS, para posteriormente transformar en paralelo plásmidos con la proteína salvaje y la proteína mutada en cepas *dma1::LEUdma2::KAN*, con el objetivo de estudiar, en primera instancia, si los residuos no fosforilables afectan a la cantidad de proteína. El problema surgió cuando se observó que los niveles de expresión del sistema plasmídico escogido, no eran similares a los de la cepa salvaje (Figura 44) ya que, por un lado, Dma1 en plásmidos centrómericos (pRS 416) daba unos niveles de proteína bastante inferiores a los obtenidos a partir de la información genómica. Por otro lado, el sistema multicopia (pRS 426) daba unos niveles muy superiores a los obtenidos a partir del genoma.



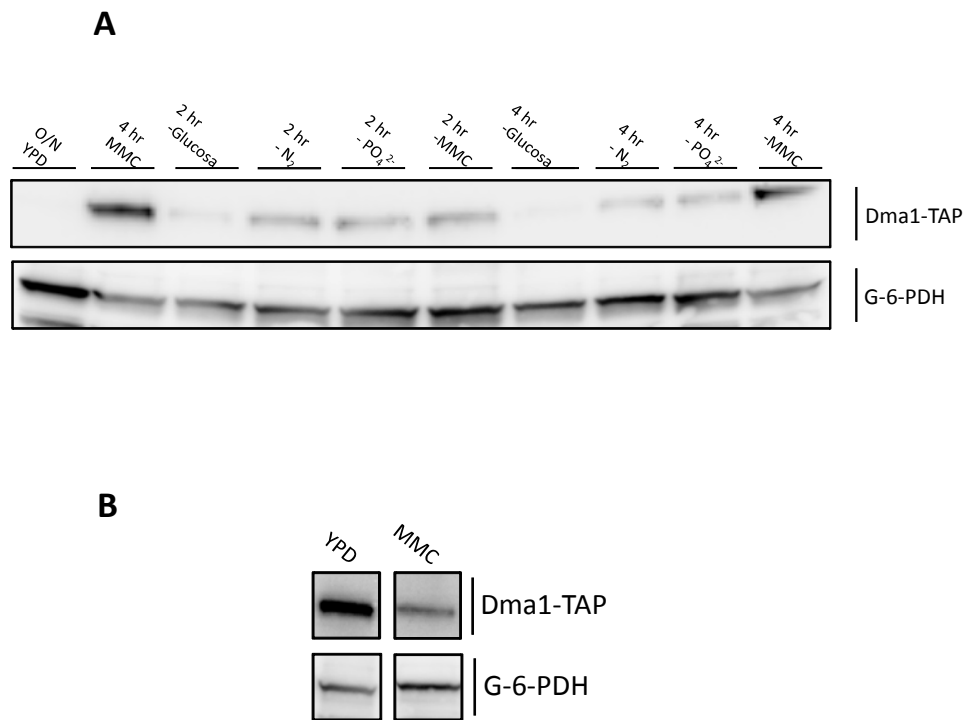
**Figura 44** Cantidad de Dma-TAP clonado en plásmidos pRS. Cepas con Dma1-TAP genómico y Dma1-TAP clonado en plásmido multicopia (pRS426, panel de la izquierda) o en plásmido centromérico (pRS416, panel de la derecha) crecieron exponencialmente durante 2 horas en YPD y fueron tratadas para visualizar la cantidad de proteína mediante western blot.



Actualmente, se está trabajando con el objetivo de poder insertar en el genoma las mutaciones de Dma1 mediante la técnica propuesta por Storici y colaboradores conocida como *delitto perfetto* (Storici et al. 2001) para así, poder trabajar con cantidades fisiológicas de Dma1 obtenidas a partir de su propio promotor y evitar en la medida de lo posible, artefactos asociados a la cantidad de proteína.

Una vez conseguidos los mutantes, se analizará la cantidad de Dma1 en función del estado de fosforilación y se intentará encontrar un fenotipo en el que la disponibilidad de estos residuos resulte imprescindible. Dichos fenotipos podrían asociarse a los ya descritos, como la incorrecta localización de las septinas en el cuello de la levadura (Fraschini et al. 2004), la incorrecta localización de Elm1 también en el cuello (Merlini et al. 2012), la cantidad de Swe1 en respuesta a estrés replicativo (Raspelli et al. 2011) o la correcta destrucción de Pcl1 (Hernandez-Ortega et al. 2012). No se descarta, explorar nuevos fenotipos provocados por la falta de Dma1. Está descrito que Dma1 está afectado por nutrientes (Bieganowski et al. 2004) y los puntos de control de nutrientes en el ciclo, se encuentran en fase G<sub>1</sub> (De Virgilio 2012), con lo que no se descarta un posible efecto de la fosforilación en este control, de hecho, evidencias preliminares indican que en ausencia de glucosa, es cuando hay menos Dma1, lo mismo ocurre cuando el cultivo está saturado (Figura 45A). Por el contrario, cuando se comparan cultivos en fase exponencial creciendo en medio rico y en medio mínimo, se ve que Dma1 está disminuido en este último (Figura 45B).

Estas evidencias previas plantean muchas preguntas y podrían estar indicando un posible campo de trabajo que permita esclarecer la función de Dma1 en una fase tan llena de barreras y controles de calidad, como es la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular.



**Figura 45 (A) Cantidad de Dma1 cultivado en diferentes medios.** Células Dma1-TAP crecidas toda la noche en YPD (carril 1), crecieron exponencialmente durante 4 horas en MMC (carril 2) y se resuspendieron en medio sin glucosa, sin  $N_2$  y sin  $PO_4^{2-}$  durante 4 horas. Se recogió muestra a las 2 horas (carriles 3 - 6) y a las 4 horas (carriles 7-10). **(B) Cantidad de Dma1 en YPD y MMC.** Células con Dma1-TAP crecieron exponencialmente en YPD y MMC durante 2 horas. Las muestras se analizaron mediante western blot. A pesar de presentar los carriles separados, las muestras corrieron en el mismo gel y fueron reveladas en la misma membrana.



## DISCUSIÓN

---



La búsqueda de sustratos específicos de Pho85 relacionados concretamente con la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, arrojó una serie de proteínas candidatas de las cuales se desprenderán futuras investigaciones. Como es de esperar en este tipo de experimentos, no siempre los resultados reflejan de manera estricta las interacciones. Las proteínas que sirven como ejemplo son Sic1 y Shs1 (Tabla 1). Sic1 se encontró solamente en la purificación de Cln2-TAP, pero está descrito que Pcl1 también lo fosforila (Nishizawa et al. 1998). Por otro lado, Shs1 es fosforilado tanto por Pho85 como por Cdc28 (Egelhofer et al. 2008) pero solo fue encontrado en la purificación de Pcl1. Otro caso es el de Cdc3, componente del anillo de septinas necesario para citoquinesis (Chapman et al. 2000) que se ha encontrado solamente en la precipitación de Pcl1 aunque en la bibliografía se describe como sustrato de Cln2 (Tang, Reed 2002). La presencia de falsos negativos no quita credibilidad a estos resultados, sino que indica limitaciones del sistema ya que probablemente se han perdido algunas interacciones.

Respecto al resto de proteínas, para algunas se ha descrito algún tipo de interacción (genética o bioquímica) con Pho85 en otros estudios a gran escala: Gsp1, Mag2, Rsp5 (Ptacek et al. 2005), Ame1 y Dma1 (Dephoure et al. 2005). Del resto de proteínas (Atg29, Ef1A, Gfd1, Gud1, Pab1, Psp2 y Sec4) su posible interacción solo ha sido descrita en este experimento. Teniendo en cuenta que estas interacciones han de ser interpretadas con cautela, se puede observar que cumplen funciones muy diversas, desde autofagia hasta metabolismo pasando por transcripción, sin olvidar proteínas de las que aún su función se desconoce (Tabla 2) representando todas ellas un campo que permanece abierto para una futura comprobación y posterior análisis.

Como se ha comentado en la justificación de esta tesis, de todos estos sustratos se decidió analizar las E3 ligasas por su relevancia en la homeostasis celular, su conservación en mamíferos y su implicación en diferentes patologías. La proteína Chfr, el posible homólogo de Dma1 en humanos, fue descrita por primera vez en el año 2000 (Scolnick, Halazonetis 2000) y aunque no se disponen muchos datos sobre su

regulación, se sabe que está disminuido en muchos tipos de tumores, sobretodo en cáncer de pulmón, cervix, colon y gástrico (Privette, Petty 2008).

Es interesante tener en cuenta que la bibliografía describe a la maquinaria de ubiquitinación como a un regulador del ciclo celular (revisado en DeSalle, Pagano 2001), ya que destruyendo las ciclinas, controla la actividad de las CDKs. Pero las evidencias de este trabajo proponen lo contrario: sería la maquinaria de ciclo quien controla la ubiquitinación, al menos en el caso de Dma1.

La estructura tridimensional del dominio FHA de Chfr, sugiere que esta proteína es capaz de reconocer proteínas fosforiladas (Stavrídi et al. 2002) y dada la alta homología del dominio FHA de Dma1 con el de Chfr (Brooks et al. 2008) es posible que Dma1 actúe también como una fosfoproteína. Teniendo en cuenta que Pho85 fosforila a Pcl1 (Hernandez-Ortega et al. 2012), la unión de Pcl1 y Dma1 podría ser una cuestión de afinidad de la E3 por Pcl1 fosforilada, pero el ensayo de fosforilación *in vitro* confirma que hay actividad por parte del complejo Pho85/Pcl1 sobre Dma1 (Figura 29) y que esta actividad es específica, ya que cuando se prueban otras ciclinas la fosforilación no se observa (Figura 30). Esto último es importante ya que Pho85 es por definición, una quinasa muy activa y no necesita CAK para ser activada (Nishizawa et al. 1999b), lo cual podría generar un falso positivo en los experimentos *in vitro* y fosforilar sin ninguna especificidad. Dma2, el homólogo estructural de Dma1, es fosforilado con la misma especificidad (Figura 31), tal y como se esperaba debido al parecido de sus secuencias y a la redundancia de funciones en la célula (Fraschini et al. 2004).

Dado que un gran número de proteínas del genoma de *S. cerevisiae* contiene dianas SP/TP, la cantidad de sustratos que *in vitro* son fosforilados por Pho85 puede ser elevada. Sin embargo, los sustratos de Pho85 de los cuales se ha demostrado su relevancia *in vivo*, es menor. Por ejemplo, la fosforilación *in vitro* de Pho4 puede darse por los complejos Pho85-Pho80 (Kaffman et al. 1994), Pho85-Pcl1 (Espinoza et al. 1994),

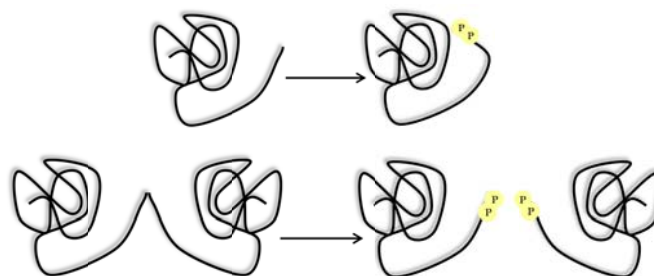
Pho85-Pcl2 (Measday et al. 1994) y Pho85-Pcl7 (Lee et al. 2000), pero solamente Pho85-Pho80 puede fosforilarla *in vivo* (Byrne et al. 2004). En este contexto, la fosforilación e interacción *in vivo* demostrada en este trabajo (Figuras 40 y 41) han resultado esenciales.

A partir de este resultado, resulta tentador pensar que esta fosforilación esté influyendo en la actividad ligasa de Dma1. Se comprobó que la fosforilación de Dma1 reduce la actividad ligasa *in vitro* y cuando los dos residuos ubicados en el extremo N-terminal no son fosforilados, se reestablece la autoubiquitinación (Figura 38). Esta observación resultó sorprendente ya que *a priori*, los residuos candidatos que parecían tener más probabilidad de estar afectados son los que se encuentran en la región responsable de la actividad de ubiquitinación (RING) o en la de unión a proteínas fosforiladas (FHA).

Esto puede ser interpretado de diversas maneras, por un lado existe la posibilidad de que la sustitución de S9 y T14 por aminoácidos no fosforilables afecte a su actividad ligasa, pero los carriles 3 y 4 de la figura 38 y la figura 39 demuestran que esto no ocurre. Otra opción es que la fosforilación en N-terminal esté produciendo un cambio conformacional en la proteína que lo aproxime al extremo RING e influya sobre la actividad ligasa de Dma1 (Figura 46-A) lamentablemente no se dispone de la estructura cristalográfica de esta proteína y no es posible saber si el extremo N-terminal podría estar influyendo en otras regiones. Por otro lado, se sabe que en *S. pombe*, la actividad ubiquitinadora de Dma1 necesita una dimerización previa para ser activada (Johnson et al. 2012), si esto también ocurre en *S. cerevisiae*, es posible que la fosforilación en N-terminal esté impidiendo la dimerización entre ambas proteínas (Figura 46-B).

Es importante destacar que las 5 isoformas de Chfr que existen en humanos, tienen un residuo de SP en la posición +10, lo cual podría indicar que esta fosforilación se conserva en la escala evolutiva.





**Figura 46** Posible efecto de la fosforilación de Pho85. (A) Sobre el dominio RING. El cambio conformacional podría acercar el extremo N-ter a la región RING y con ello, podría afectar a la actividad ligasa de Dma1. (B) En la dimerización de Dma1. La fosforilación podría estar impidiendo la dimerización de ambas proteínas.

Respecto a la relevancia que estas reacciones bioquímicas pueden estar teniendo en la biología de las células, la inmunodetección de Dma1 de la figura 42 confirma que tanto en un *pho85Δ* como en un *pcl1Δpcl2Δ* hay menos cantidad de proteína, reforzando la idea de que la fosforilación de Pho85-Pcl1 está contribuyendo en cierta medida, a mantener la cantidad de Dma1 mediante la reducción de su actividad de autoubiquitinación. Las diferencias son mayores cuando las células son sincronizadas en G<sub>1</sub>, esto podría ser debido a que el efecto realmente depende de la fase del ciclo en la que se encuentre y al estar todas las células sincronizadas, las diferencias son más fáciles de observar. Tanto en el caso de la cepa salvaje como en la mutante, se observa que a medida que progresa el ciclo, los niveles de Dma1 aumentan, pero la diferencia entre ambas cepas se mantiene a lo largo del muestreo (Figura 43).

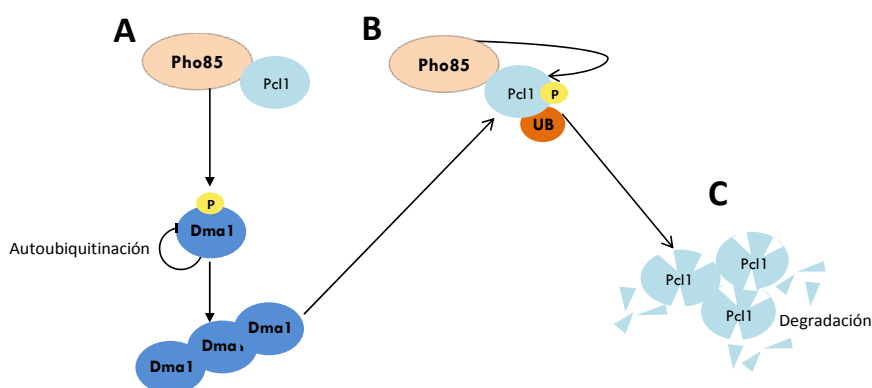
Los resultados de esta tesis junto a los recientemente publicados por este grupo (Hernandez-Ortega et al. 2012) indican que debe existir una compleja relación entre Dma1 y Pcl1. Por un lado, los resultados de esta tesis indican que la fosforilación del complejo Pho85-Pcl1 está inhibiendo la actividad de Dma1 lo cual puede explicar el hecho de que haya menos proteína en las cepas mutantes anteriormente comentadas. Por otro lado, se ha descrito que Dma1 inhibe a Pcl1, lo cual da sentido a la observación de la figura 42-B donde la cantidad de Pcl1 cae cuando Dma1 aumenta. Esto sugiere que podría estar dándose un bucle de regulación negativa entre Dma1 y Pcl1. Dentro de esta presunción no se

entiende cómo es posible que si la fosforilación inhibe la actividad ligasa de Dma1, pueda seguir ubiquitinando a Pcl1.

El modelo que se propone (y que evidentemente, ha de ser comprobado) para dar sentido a esta doble interacción se resume en la figura 47 y se explica de la siguiente manera: Dma1 mantiene unos niveles relativamente constantes a lo largo del ciclo (Figura 43). Cuando las células se comprometen a dividirse y atraviesan START, comienza la ola de transcripción de las diferentes ciclinas. En el momento en el que Pcl1 aparece dirige a Pho85 para fosforilar a Dma1. Esta fosforilación, estaría disminuyendo su actividad de autoubiquitinación pero no de ubiquitinación hacia otros sustratos, de modo que Dma1 se estabilizaría y ubiquitinaría a Pcl1, por ello en la figura 42 se observa que la desaparición de Pcl1 coincide con el aumento de Dma1. Esta hipótesis es válida en caso de que la autoubiquitinación de Dma1 se de en *trans*, donde la fosforilación estaría impidiendo la interacción entre ambos monómeros pero no con otros sustratos. En este caso, un mutante no fosforilable vería reducidas sus cantidades lo cual acabaría repercutiendo sobre Pcl1, el cual se acumularía.

Estos resultados son apoyados por el hecho de que en mamíferos, Chfr controla sus niveles mediante autoubiquitinación (Bothos et al. 2003) y recientemente se ha visto que ésta actividad depende de la fase del ciclo que las células están atravesando (Kim et al. 2011b). La fosforilación de Chfr se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* (Shtivelman 2003) y se ha vinculado su estado de fosforilación con la actividad de ubiquitinación (Kim et al. 2011b).

En caso de comprobarse el modelo propuesto, es la propia ciclina la que promueve la estabilidad de su E3 para garantizar su correcta destrucción. Evidentemente, este no parece ser el único sistema que esté controlando la cantidad de Dma1 ya que cuando Pcl1 o Pho85 desaparecen sigue habiendo proteína, permitiendo que en las células siempre haya una cantidad mínima. Esto indica otras funciones de Dma1 cuya regulación no depende de Pho85.



**Figura 47. Modelo del fenotipo de fosforilación sobre Dma1.** A) El complejo Pho85-Pcl1 fosforila a Dma1 inhibiendo su actividad de autoubiquitinación. B) Además, Pho85 fosforila a Pcl1 habilitándolo para ser ubiquitinado por Dma1 C) Esta ubiquitinación facilita la degradación de Pcl1. (Hernandez-Ortega et al. 2012). El mecanismo de control propuesto garantiza el mantenimiento de la cantidad de Dma1 necesaria para la destrucción de Pcl1 en el momento indicado.

Aunque se sabe que Chfr es fosforilado, hasta el momento se desconoce quién lo está haciendo y aquí es donde radica la relevancia de este trabajo ya que, Chfr es una proteína supresora de tumores que retrasa el ciclo celular en respuesta a ciertas drogas que afectan la estabilidad de los microtúbulos (Scolnick, D.M., Halazonetis, T.D., 2000). A pesar de que Chfr se expresa de manera ubicua en los tejidos normales, en diversos tipos de tumores la cantidad de esta proteína se reduce drásticamente (Privette, L.M.; Petty, E.M., 2008). Conocer los mecanismos moleculares que promueven la estabilidad de este oncosupresor, podría dirigir el rumbo de las investigaciones en la búsqueda de dianas que estabilicen a Chfr con el fin de garantizar una correcta división celular y evitar así una proliferación descontrolada.

Tampoco se puede descartar que el efecto de la fosforilación de Dma1 sea traducido en un cambio de localización subcelular de la E3, afectando de esta manera a otro tipo de sustratos. Se ha descrito que un posible sustrato de Dma1 es Elm1, una proteína quinasa indispensable para el correcto posicionamiento de las septinas (Merlini et al. 2012). Sería interesante poder observar si la fosforilación de Dma1 interfiere en

este fenotipo, ya que podría estar garantizando que el anillo de septinas pueda posicionarse correctamente, coordinando el ciclo celular con el crecimiento de la gema. Se ha intentado observar si la presencia de Pho85 interfiere en el posicionamiento de Dma1 pero lamentablemente, con el sistema utilizado en este laboratorio y con la cantidad de Dma1 que se detecta por western blot, no se ha podido detectar una localización celular específica tanto en presencia como en ausencia de Pho85.

Otro fenotipo interesante que también está relacionado con el proceso de morfogénesis, es la posible ubiquitinación de Swe1 por parte de Dma1 que favorece su destrucción (Raspelli et al. 2011). Las células *chn1,2Δpcl1,2Δ* tienen problemas para generar gemas y la fosforilación inhibitoria de Swe1 sobre el residuo de Tyr19 de Cdc28 es constante en esta cepa (Moffat, Andrews 2004), por otro lado, Swe1 se acumula en células *dma1,2Δ* donde también aparece morfología aberrante (Raspelli et al. 2011), esto induce a pensar que la fosforilación de Pcl1, además de garantizar el mantenimiento de Dma1 para su propia destrucción, podría estar garantizándolo también para que la morfogénesis celular se dé correctamente.

Lo que parece estar claro es que Dma1 podría estar implicado en el control de nutrientes ya que su cantidad se ve afectada por la falta de glucosa, también se observan diferencias cuando las células crecen exponencialmente en YPD o en MMC (Figura 45). De hecho, se ha sugerido que la relevancia de Pcl1 podría estar en condiciones donde la disponibilidad de nutrientes disminuye y se ha observado que tanto la cantidad como la vida media de Pcl1, aumentan (Hernandez-Ortega et al. 2012). Si esta situación está relacionada con la fosforilación de Dma1 por Pho85, es de esperar que la E3 esté menos fosforilada y por ello su cantidad se vea disminuida.

Así, podría considerarse a Dma1 como un nexo entre la señalización de ausencia de glucosa y regulación o bien del ciclo celular (a través de Pcl1) o bien del control de morfogénesis (a través de Pcl1, Elm1 o Swe1),

ajustando de esta manera, la fisiología de la célula a las cambiantes condiciones del medio.

## CONCLUSIONES

---



Los experimentos presentados en este capítulo han permitido elaborar las siguientes conclusiones generales:

- 1) Las E3 ligasas Dma1, Dma2 y Rsp5 son nuevos sustratos *in vitro* del complejo Pho85-Pcl1.
- 2) La fosforilación de Pho85 sobre Dma1 se da en residuos de la región N-terminal, conservados en Dma2 así como en Chfr, el homólogo de Dma1 en mamíferos.
- 3) La fosforilación de Pho85 sobre los dos residuos de Dma1 descritos anteriormente, inhibe la actividad de Dma1 *in vitro*.





## MATERIAL Y MÉTODOS

---



## 1. BIOLOGÍA MOLECULAR: DNA

### 1.1 OBSERVACIÓN DEL DNA

Los geles se preparan con agarosa (Pronadisa ref. 8008) disuelta en tampón de electroforesis TAE 1X suplementado con 0,5 µg/mL de bromuro de etidio (Genaxis, ref. GX12420). Las muestras se cargan con tampón de carga para DNA y se separan a 75–100 V.

- TAE 1X: 40 mM Tris-acetato pH 8.3, 1 mM EDTA.
- Tampón de carga para DNA 10X: 0,42% azul de bromofenol, 0,42% cianol xileno FF, 50% Glicerol en agua destilada.

### 1.2 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

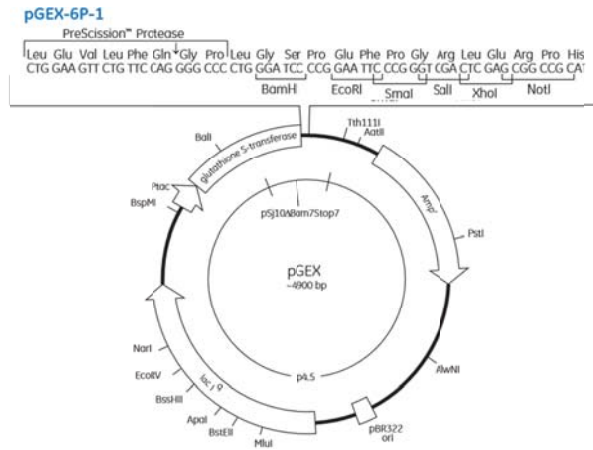
Las mutagénesis dirigidas se realizan con el kit *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis* (Ref 200524, Agilent Technologies). Mediante oligonucleótidos de 40 pb que contienen el cambio puntual deseado y polimerasa *Pfu* se realiza la PCR sobre un molde de DNA de doble cadena. El producto es posteriormente digerido con *DpnI* para eliminar las cadenas parentales metiladas que no se han mutado y los productos híbridos (hemimetilados) que contienen una cadena mutada y la otra sin mutar. Finalmente, el producto digerido se transforma en competentes de *E. coli* DH5α para su posterior purificación y análisis por secuenciación.

### 1.3 SECUENCIACIÓN DEL DNA

El DNA que posteriormente se secuenciará, se purifica con el kit *Minipreps DNA purification System* (Promega, A1330) mediante el cual se obtiene aproximadamente 3–5 µg de DNA por mL del cultivo bacteriano original. Para secuenciar el DNA, se utiliza el kit *ABI® PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se analizan en el analizador *ABI PRISM 3700 DNA Analyzer* (Applied Biosystem) en el servicio científico técnico de la Universitat de Barcelona.

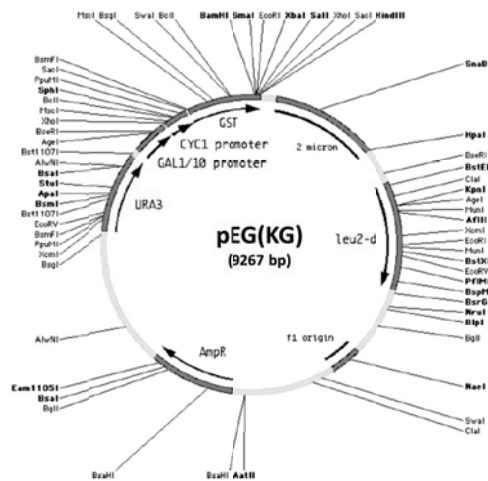
## 1.4 VECTORES PLASMÍDICOS

**pGEX 6P1:** el vector pGEX-6P-1 es un vector de fusión a GST de aproximadamente 4.9 kbp que permite la expresión en bacterias y posterior purificación de grandes cantidades de la proteína deseada. Este plásmido también codifica para una secuencia de reconocimiento para el corte específico mediante proteasa PreScission, entre el dominio GST y el MCS (Multi Clonning Site) para así, poder remover la etiqueta cuando sea necesario. Contiene un gen que otorga resistencia a ampicilina.

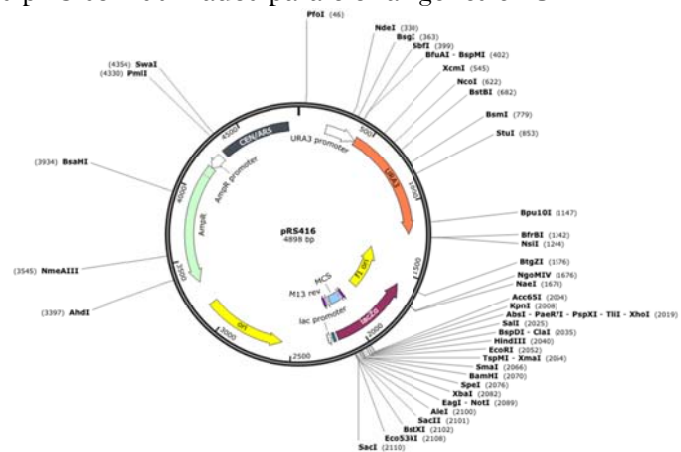


para expresar  
extraído de

**pEG (KG):** tiene aproximadamente 10 kbp y se utiliza para la expresión de proteínas fusionadas a GST bajo control de promotor inducible por galactosa, *GAL10*. Contiene resistencia a ampicilina para ser seleccionado en *E. coli*. También contiene el gen de levadura *URA3*, para selección nutricional (Mitchell et al. 1993).

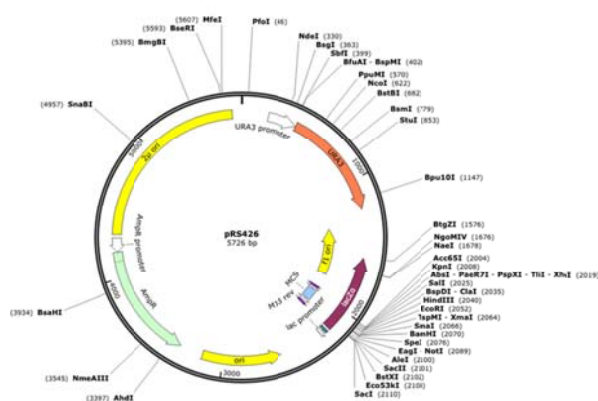


**pRS416:** la serie de vectores pRS son utilizados para clonar genes en *S. cerevisiae*, también son capaces de replicar en *E. coli*. Son YCp ya que contienen un centrómero que permite la replicación autónoma del plásmido. 416 contiene el gen de selección auxotrófica *URA3*.



**Figura 50:** Mapa del vector pRS416. El plásmido contiene los marcadores *URA3* y un MCS a continuación del origen de replicación. Obtenido de SnapGene.

**pRS426:** el vector pRS426 tiene los mismos marcadores que el pRS416 con la diferencia de que se trata de plásmidos episomales (YEp) de alto número de copias (2 $\mu$ ).



**Figura 51:** Mapa del vector pRS416. El plásmido contiene los marcadores *URA3* y un MCS a continuación del origen de replicación. Obtenido de SnapGene.

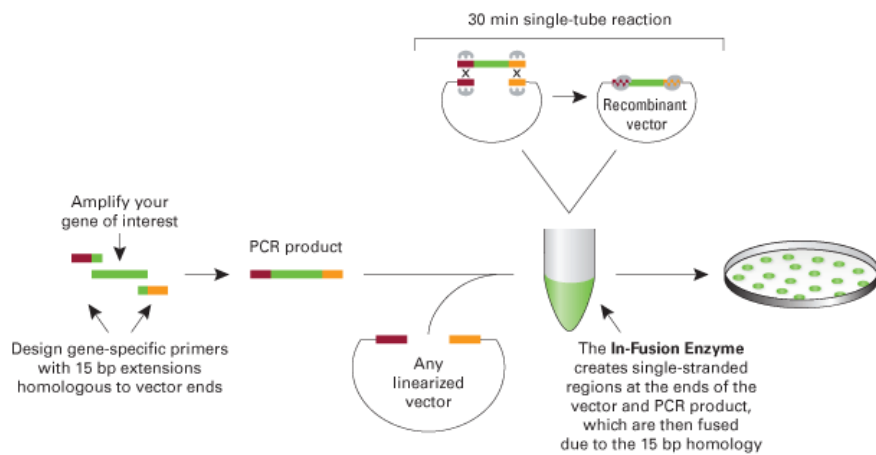
## 1.5 ESTRATEGIAS DE CLONACIÓN

### *Por ligación.*

Las construcciones 1-12 (ver tabla 4) se obtuvieron por ligación. Después de realizar una restricción del plásmido con el/los enzima/s de restricción apropiados, se mezclan entre 200-600 ng de plásmido e inserto. Posteriormente se agrega buffer de ligación y ligasa T4 (Thermo Scientific, ref. EL-0014) y se deja 5 horas en baño de agua a 18°C. Finalmente, 5 µL de la ligación se transforman en *E. coli* DH5α.

### *Por recombinación*

Las construcciones 13 y 14 (ver tabla 4) se obtuvieron mediante clonación por recombinación. Se genera el inserto mediante PCR a partir de DNA genómico o plasmídico, con oligos diseñados para introducir colas de recombinación de aproximadamente 15 pb que recombinaran con el MCS del plásmido. El inserto se analiza y purifica a partir de geles de agarosa con *QIAquick Gel Extraction kit* (QUIAGEN, ref. 28706). Posteriormente se realiza la restricción del plásmido con los enzimas adecuados para que recombine con el inserto previamente generado. El plásmido se analiza y purifica con el mismo kit que el inserto. Para clonar el fragmento, se mezclan 10-200 ng tanto de vector como de plásmido y se incuba la mezcla a 50°C durante 15-30 minutos en presencia de recombinasa y buffer (Clontech In-Fusion kit HD ref. 639649). Finalmente, se transforma 5 µL de ligación en *E. coli* DH5α.



**Figura 52:** Estrategia de clonación por recombinación. Imagen obtenida de OpenWetWare.

### 1.6 ANÁLISIS DE COLONIAS OBTENIDAS POR CLONACIÓN

Después de transformar el producto de la clonación, las colonias resultantes crecen en LB líquido con el antibiótico apropiado para cada caso. Cuando el cultivo está saturado, se purifican los plásmidos con *GenElute Miniprep Kit* (Sigma ref. NA0160-1KT) y se analizan mediante restricción y/o secuenciación.



## 1.7 CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS

Se generaron diferentes construcciones plasmídicas para atender a objetivos específicos. Las construcciones obtenidas se detallan a continuación:

Nº	Construcción plasmídica	Inserto (fragmento subclonado en pb)	Primer For (5' → 3') + (enzima de restricción)	Primer Rev (5' → 3') + (enzima de restricción)	Selección
1	pGEX-Cln3	CLN3 (+1 a +1711)	<u>Cln3 F7</u> ( <i>Bam</i> HI) GCGGGATCCATGG CCATATTGAAGGAT AC	<u>Cln3 R7</u> ( <i>Bam</i> HI) GCGGGATCCTCAG CGAGTTTTCTTGAG G	Amp
2	pGEX-Cln3-Nter	CLN3 N-ter (+1 a +1038)	<u>Cln3 F7</u> ( <i>Bam</i> HI) GCGGGATCCATGG CCATATTGAAGGAT AC	<u>Cln3 R17</u> ( <i>Bam</i> HI) CGAGGATCCTTACA GATTGATATTTTCC CAAAG	Amp
3	pGEX-Cln3-Cter	CLN3 C-ter (+1038 a +1711)	<u>Cln3 F19</u> ( <i>Bam</i> HI) CGAGGATCCGCAA CATTGACTCCTAC ATC	<u>Cln3 R7</u> ( <i>Bam</i> HI) GCGGGATCCTCAG CGAGTTTTCTTGAG G	Amp
4	pGEX-Pho85	PHO85 (+1 a +971)	<u>Pho85 F4</u> ( <i>Bam</i> HI) GCGGGATCCATGT CTTCTTCTTCACAG TA	<u>Pho85 F6</u> ( <i>Bam</i> HI) GCGGGATCCTTATG AAGCGTGGTGGTA GT	Amp
5	pGEX-Pho80	PHO80 (+1 a +882)	<u>Pho80 F1</u> ( <i>Bam</i> HI) GCGGGATCCATGG AAAGCACATCAGG AGA	<u>Pho80 R1</u> ( <i>Bam</i> HI) GCGGGATCCTTAAT CTGGCTTTGATCGC T	Amp
6	pGEX-Pcl1	PCL1 (+1 a +840)	<u>Pcl1 F3</u> ( <i>Bam</i> HI) GCGGGATCCATGT GTGAATACAGCAA GGC	<u>Pcl1 R3</u> ( <i>Bam</i> HI) GCGGGATCCTTAAA ACCCATGTTGACTC A	Amp
7	pGEX-Pcl9	PCL9 (+1 a +915)	<u>Pcl9 R1</u> GCGGGATCCATGA TTTCTGACTACGAT GC	<u>Pcl9 F1</u> GCGGGATCCTTTTG CTTGAAAAACGATG	Amp
8	pGEX-Cln3-8Ala	CLN3-8Ala (+380 a +585). (Conda)	( <i>Bam</i> HI)	( <i>Bam</i> HI)	Amp

9	pGEX-Dma1	DMA1 (+1 a +1254)	<u>Dma1 F1</u> ( <i>Bam</i> HI) GCGGGATCCATGT CTACTAATACTGTT CCC	<u>Dma1 R1</u> ( <i>Bam</i> HI) GCGGGATCCTCAAT CTACTAGGCGAACA C	Amp
10	pGEX-Dma2	Dma2	<u>Dma2 F1</u> ( <i>Bgl</i> II) GCGAGATCTATGTA CACGCCTATCCCT GC	<u>Dma2 R1</u> ( <i>Bgl</i> II) GCGAGATCTTTAAG GATGGCTATCAACA TC	Amp
11	pGEX-Rsp5	RSP5 (+1 a +2401)	<u>Rsp5 F1</u> ( <i>Bam</i> HI) CAGGGGCCCTGG GATCCATGCCTTCA TCCATATCCGTC	<u>Rsp5 R1</u> ( <i>Hind</i> III) GAGTCGACCCGGG AATTCTATTCTTG ACCAAACCCATG	Amp
12	pGEX-Pho4	PHO4 (+1 a +1939)	<u>Pho4 F1</u> ( <i>Bam</i> HI) GCGGGATCCATGG GCCGTACAACCTTCT GA	<u>Pho4 R1</u> ( <i>Bam</i> HI) GCGGGATCCTCAC GTGCTCACGTTCTG C	Amp
13	pRS416- Cln3-MYC	CLN3 (-1115 a +585) MYC (+1 a +300)	<u>Cln3 F29</u> ( <i>Bam</i> HI) CGCGGATCCCTGA CAGAGACACCCGT AGAG <u>Cln3 F19</u> ( <i>Bam</i> HI) CGAGGATCCGCAA CATTGACTCCTAC ATC	<u>Cln3 R17</u> ( <i>Bam</i> HI) CGAGGATCCTTACA GATTGATATTTTCC CAAAG <u>Cln3 R6</u> ( <i>Bam</i> HI) TTGATCCACACTTA GTATTAAGATACGT CTGTGAAGGATGC CTCGAGGCCAGAA GAC	Ura, Kan
14	pRS416- Dma1-TAP	DMA1 (-140 a +1251) TAP (+1 a +558)	<u>Dma1 F9</u> ( <i>Spe</i> I) CGGGGATCCACT AGTCACATTGCACT AGAGTGTGC	TAP R5 ( <i>Not</i> I) ACCGCGGTGGCGG CCGCTCACTGATGA TTCGCGTCTA	Ura
15	pRS426- Dma1-TAP	DMA1(-140 a +1251)	<u>Dma1 F9</u> ( <i>Spe</i> I)	TAP R5 ( <i>Not</i> I) ACCGCGGTGGCGG CCGCTCACTGATGA TTCGCGTCTA	Ura

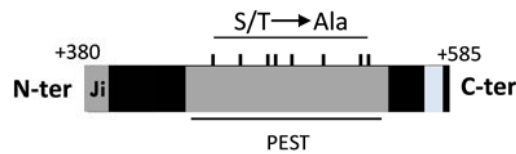
**Tabla 4:** Construcciones clonadas para el desarrollo de esta tesis. Las estrategias específicas de clonación se detallan en el punto 1.8.

## 1.8 ESTRATEGIAS ESPECIALES

Las siguientes construcciones siguieron una estrategia diferente a las habitualmente empleadas:

- Plásmido 8: pGEX-Cln3-Cter-8ALA

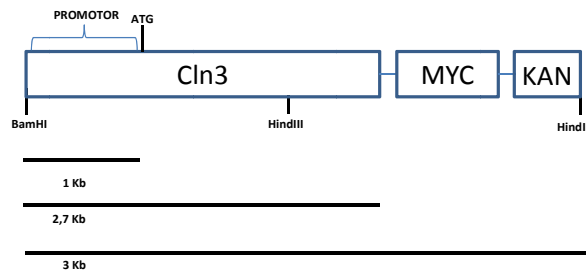
Se envió a sintetizar a laboratorios Conda, la secuencia de Cln3-Cter con dianas *EcoRI* para clonar en plásmidos pGEX-6P, con 8 sustituciones en residuos de Ser o Thr por Ala.



**Figura 53:** Fragmento de Cln3 con 8 sustituciones de Ser/Thr por Ala. El fragmento fue clonado por *EcoRI* en plásmido pGEX-6P1.

- Plásmido 12: pRS 416 Cln3-9MYC-KAN

Esta construcción se clonó en plásmidos pRS mediante estrategia por doble PCR.



**Figura 54:** Estrategia de clonación de Cln3 en plásmidos pRS. Mediante clonación por ligación, primero se insertó el fragmento comprendido entre las dianas BamHI y HindIII y posteriormente el fragmento entre dianas HindIII.

• Construcciones con mutaciones puntuales.

Nº	CONSTRUCCIÓN PLASMÍDICA	PRIMER FOR (5' → 3')	PRIMER REV (5' → 3')
16	pGEX-Cln3-Cter S449A/ T520A	<u>Cln3 F22</u> (S449) GGTTGACCAAAGATAGCAT TGCTCCACCATTTCCTTC ACTCC <u>Cln3 F23</u> (T520) AAGCCCACTAACTCCCACC GCCCATCTCTAATGTCAA ATAG	<u>Cln3 R22</u> (S449) GGAGTGAAGGCAAATGGTGG AGCAATGCTATCTTTGGTCAA CC <u>Cln3 R23</u> (T520) CTATTGACATTAGAGATGG GGCGGTGGGAGTTAGTGGG CTT
17	pGEX-Cln3-Cter S449D/T520D	<u>Cln3 F12</u> (S449) GGTTGACCAAAGATAGCAT TGACCCACCATTTCCTTC ACTCC <u>Cln3 F13</u> (T520) AAGCCCACTAACTCCCACC GACCCATCTCTAATGTCAA ATAG	<u>Cln3 R12</u> (S449) GGAGTGAAGGCAAATGGTGG GTCAATGCTATCTTTGGTCAA CC <u>Cln3 F13</u> (T520) CTATTGACATTAGAGATGG GTCGGTGGGAGTTAGTGGG TT
18	pRS416-Cln3-MYC S449A/ T520A	<u>Cln3 F22</u> <u>Cln3 F23</u>	<u>Cln3 R22</u> <u>Cln3 R23</u>
19	pRS416-Cln3-MYC S449D/ T520D	<u>Cln3 F12</u> <u>Cln3 F13</u>	<u>Cln3 R12</u> <u>Cln3 R13</u>
20	pGEX-Dma1 S9A/T14A	<u>Dma1 F10</u> CTACTAATACTGTTCCCTC AGCTCCCCCAAACCAGGC GCCACCTGCTGCTTCTGGC A	<u>Dma1 R10</u> TGCCAGAAGCAGCAGGTGGC GCCTGGTTTGGGGGAGCTGA GGAACAGTATTAGTAG
21	pGEX-Dma1 S343A	<u>Dma1 F7</u> CCTTGCCAAGCCATTTTAA TAGCACCATGTGCCATAG TTGG	<u>Dma1 R7</u> CCAACATGGGCACATGGTG CTATAAAAATGGCTTGGCAA GG
22	pGEX-Dma1 T159A	<u>Dma1 Fm1</u> GGGCTTTTCAGCATTAGGC TAGCCCCGTTTATAGATAC	<u>Dma1 Rm1</u> TGAAGTATCTATAAACGGGG CTAGCCTAATGCTGAAAAGC
23	pGEX- Dma1T159A/S343A	<u>Dma1 F7</u> <u>Dma1 Fm1</u>	<u>Dma1 R7</u> <u>Dma1 Rm1</u>
24	pGEX-Dma1 S9A/T14A/T159A/S 343A	<u>Dma1 F10</u> <u>Dma1 F7</u> , <u>Dma1 Fm1</u>	<u>Dma1 R10</u> <u>Dma1 R7</u> , <u>Dma1 Rm1</u>

**Tabla 5:** Construcciones conseguidas mediante mutagénesis dirigida a partir de los plásmidos de la tabla 2.

### 2.1 SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE. Se utilizaron diferentes porcentajes de acrilamida en función del peso molecular de la proteína analizada. En caso de no continuar con la inmunodetección, al final de la electroforesis los geles fueron teñidos con BioSafe Coomassie (BioRad, ref. 161-0786) para evaluar el contenido de proteínas de la muestra.

### 2.2 WESTERN BLOT. TRANSFERENCIA

Para detectar proteínas específicas, éstas se transfieren a membrana Immobilon PVDF (Millipore, ref. IPVH 00010). Para las proteínas estudiadas, la transferencia se realizó a 300 mA durante 2 horas. Posteriormente la membrana se incubó con solución de bloqueo durante una hora y luego se incubó con el anticuerpo deseado durante el tiempo determinado por el fabricante.

- *Tampón de electroforesis:* 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8.3
- *Tampón de transferencia:* 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 8.3

#### **Incubación con anticuerpos.**

La incubación del anticuerpo primario se realiza durante toda la noche para  $\alpha$ -MYC y durante 1 hora a 4 °C en el resto de casos. Al finalizar la incubación, la membrana se lava 3 veces durante 10 minutos con TBS-T y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario. Para limpiar la membrana de esta última exposición, se lava 3 veces durante diez minutos con TBS-T.

*TBS-T:* 5 mM Tris, 15 mM NaCl, 0,01% Tween, pH 7.4

ANTICUERPO	REFERENCIA	CONCENTRACIÓN	SECUNDARIO
$\alpha$ -Myc	Ascite	1:100	$\alpha$ -mouse 1:30.000
$\alpha$ -PAP	Sigma (P1291)	1:4000	-
$\alpha$ -FLAG	Sigma (F3165)	1:500	$\alpha$ -mouse 1:30.000
$\alpha$ -GST	GE Healthcare (27-4577-01)	1:1000	$\alpha$ -goat 1:25.000
$\alpha$ -G-6-PDH	Sigma (A9521)	1:500	$\alpha$ -rabbit 1:30.000

**Tabla 6: Detalle de los anticuerpos utilizados.** Se representa la concentración y referencia de anticuerpos primarios. Todos los anticuerpos secundarios son de la casa comercial Jackson Immuno Research.

### Captura de imágenes

Las membranas recién lavadas se exponen a *Luminata Forte Western HRP substrate* (Millipore WBLUF0500). Las imágenes se capturan con el transiluminador GBox (Syngene) y se visualizan con el programa GeneSnap (Syngene)

### Redetección de membranas

Para realizar sucesivas inmunodetecciones en la misma membrana, los anticuerpos se eliminan mediante solución de *stripping* (Thermo Scientific ref. P21059). La membrana se incuba con la solución durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente se lava durante 5 minutos y se vuelve a incubar con la solución de bloqueo para continuar con la nueva inmunodetección.

### 2.3 WESTERN BLOT CON GELES PHOSTAG

El western blot con Phos-tag (NARD Institute, ref. AAL-107) ayuda a incrementar las diferencias entre proteínas en función del estado de fosforilación de las mismas. Phos-tag es un componente que se agrega en la preparación del gel de acrilamida, cuya estructura une iones de  $Mn^{2+}$ , también agregados al gel. En la electroforesis de proteínas, las cargas negativas de los fosfatos ganan afinidad por el  $Mn^{2+}$  y su movilidad es retrasada comparada con aquellas poblaciones de proteínas que no están fosforiladas.

La cantidad de Phos-tag que se agrega al gel puede variar entre 10–100  $\mu M$ . Para los geles de Cln3 se usó Phos-tag a una concentración de 25  $\mu M$  mientras que para Dma1 se usó a 50  $\mu M$ .

La cantidad de proteína que se carga en cada pocillo ha de ser similar para poder comparar su estado de fosforilación. En el caso de Cln3 se cargó una cantidad de proteína 4 veces superior para los extractos que provenían de *pho85 $\Delta$*  mientras que en el caso de Dma1, se cargó el doble de extracto de la cepa mutante.

La electroforesis se realizó a 4 °C y a 100–120 V para controlar que todas las muestras migren a la misma velocidad y el frente permanezca recto en todo momento.

Antes de montar la transferencia, el gel se lava 10 minutos con buffer de transferencia +1mM EDTA y 10 minutos más con buffer de transferencia. El EDTA quela los iones de  $Mn^{2+}$  y permite que las proteínas puedan ser transferidas. El resto de pasos son los mismos que para un western blot convencional.

## 2.4 ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

Esta técnica separa las proteínas primero por punto isoeléctrico y después por peso molecular, ofreciendo una mayor resolución de bandas que en geles convencionales no pueden distinguirse. En este trabajo se utilizó para observar fosforilaciones *in vivo* ya que, en función de las fosforilaciones de la proteína, se generarán poblaciones con diferentes puntos isoeléctricos que variarán su migración en la primera dimensión.

### **Preparación de la muestra.**

A partir de un cultivo ON se siembran 20-50 mL de cultivo exponencial a  $OD_{660} = 0,5$ . Se deja crecer 3 horas y se agrega TCA 20%. Después de 10 minutos, se centrifuga 2 minutos a  $4.000 \times g$ . Se descarta el sobrenadante y se limpia el TCA de las células con acetona fría al 90%. Finalmente, se resuspende en tampón UTC.

### **Isoelectroenfoque.**

Para separar a las muestras por punto isoeléctrico se agrega a la muestra resuspendida en UTC DTT 100 mM, anfolitos (GE Healthcare ref. 17-6000-87) y azul de bromofenol. Se carga la muestra en tiras de isoelectroenfoque (BioRad 163-2099) y se somete al programa de enfoque apropiado para la tira, recomendado en las instrucciones del fabricante.

### **SDS-PAGE.**

Una vez finalizado el programa de isoelectroenfoque, se limpian las tiras con solución de equilibrado primero con DTT y finalmente con IAA y se realiza la segunda dimensión en geles de agarosa al 7,5% (BioRAD Criterion TGX Gels ref. 567-1081). Los siguientes pasos fueron iguales que para un western blot convencional.

- *Tampón UTC*: urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 2%
- *Tampón de equilibrado*: Tris-HCl pH 8.8 50 mM, urea 6M, glicerol 30%, SDS 2%



## 2.5 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas se utilizó tanto para detectar las proteínas que bajan unidas a substratos purificados mediante TAP (Tandem Affinity Purification) como para detectar proteínas ubiquitinadas en los ensayos de ubiquitinación. En el caso de la purificación por TAP el producto se separa por SDS-PAGE en gel al 10%, se realiza un coomassie coloidal (Invitrogen ref. LC6025) y se recorta la banda de purificación, extremando las precauciones para no contaminar la muestra con queratinas. En el caso de la detección de ubiquitinas, los ensayos de ubiquitinación *in vitro* se separan mediante SDS-PAGE en geles de acrilamida al 7% y la región correspondiente a proteínas ubiquitinadas se recorta del gel. Las muestras se envían al servicio de proteómica de la UPF donde son reducidas, alquiladas, tripsinizadas y analizadas mediante el espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher) acoplado a EasyLC (Thermo Fisher). Los datos se interpretan con el programa Proteome Discoverer (Thermo Fisher).

## 2.6 ENSAYO DE FOSFORILACIÓN IN VITRO

Los ensayos de fosforilación *in vitro* se realizan tal y como se describe en Jeffery et al. 2001. En la mayoría de ensayos se utilizaron proteínas recombinantes etiquetadas con GST, aunque en algunos también se utilizó Cdc28-TAP y Cdc28-GFP purificadas de levadura. En los ensayos de Cln3, es imprescindible eliminar el GST de Pho85 con proteasa PreScission (GE-Healthcare 27-0843-01). La reacción de fosforilación se carga en geles de acrilamida con SDS y se somete a 150 V. Una vez escapado el frente, las bandas fosforiladas se tiñen con *Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain Kit* (Thermo ref. P33310/P33301). Las bandas se visualizan con luz UV. Después de la detección de bandas fosforiladas, el gel se tiñe con BioSafe Coomassie para detectar la cantidad de proteína cargada.

## 2.7 ENSAYO DE UBIQUITINACIÓN *IN VITRO*

Se mezclan todos los componentes (tabla 7) y se mantienen durante 5 horas a 37°C. El tiempo 0 de la reacción contiene todos los componentes de la mezcla menos el ATP. Las muestras se calientan durante 5 minutos a 80°C y posteriormente se cargan 30 µL de reacción en geles de acrilamida con SDS. La electroforesis se realiza a 120-150 V y se transfieren las proteínas a membranas de PVDF a 60 mA durante 16 horas. La membrana se bloquea con leche en polvo desnatada al 5% durante 1 hora y se realizó la inmunodetección con  $\alpha$ -FLAG. Posteriormente se realiza una redetección con  $\alpha$ -GST.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN(mM)	PROCEDENCIA
E1 (Ube1 levadura)	0,02	Boston Biochem, ref E-301
E2 (His <sub>6x</sub> -Ubc13, humana)	0,3	Boston Biochem, ref E-660
E2 (His <sub>6x</sub> -Mms2, humana)	0,3	Boston Biochem, ref E-662
E2 (GST-Ubc4 levadura)	0,34	B. Crosas Lab
E3 (GST-Dma1 levadura)	0,14	Este estudio
FLAG-Ub	0,015	Sigma, ref U5382
Solución de ATP	0,5	

**Tabla 7: componentes del ensayo de ubiquitinación.** Se representa la concentración y referencia de cada componente.

- *Tampón de ubiquitinación:* 25 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 0,24 mM DTT, Inhibidores de proteasas (5µg/mL Pepstatina, 0,5 mM Benzamidina, 1mM PMSF) e inhibidores de fosfatasa (0,5 mM NaPPi, 1,25 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 5 mM NaF, 1 mM Ortovanadato de sodio).

- *Solución de ATP*: 10 mM Tris-HCl pH 8.8, 0,005 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM ATP

## 2.8 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A TAP

Las proteínas etiquetadas con TAP se purifican a partir de 2 litros de cultivo crecido en YPD a OD<sub>660</sub>= 1. Después de centrifugar el cultivo, los pellets se resuspenden en tampón TAP y se procede a la rotura mecánica con bolas de vidrio (Sartorius, BBI-8541701) durante 6 ciclos a fuerza 5. Los cultivos se centrifugan durante 10 minutos a 12.000 x g y 4 °C. Se recupera el sobrenadante y se centrifuga a 12.000 x g durante 1 hora a 4 °C. El sobrenadante se incuba durante 1 hora 4 °C con bolas de IgG sefarosa (GE Healthcare 17-0969-01) previamente lavadas con tampón TAP 4 veces. Las bolas se lavan en columna Mobicol (MoBiTec M10025 y M2135) con 10 mililitros de tampón TAP y se resuspendieron en el volumen deseado de tampón TAP con 0,1 mM de DTT.

Las proteínas fusionadas a GFP siguen el mismo protocolo con la diferencia de que se utiliza resina GFP-TRAP\_A (Chromotex, ref. gta-20) y los lavados se realizan con concentrador de partículas magnéticas Dyna-Mag-2 (Invitrogen, ref. 123-21D)

- *Tampón TAP*: 0,1 M NaCl, 50 mM Tris HCl pH 7.5, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,15% NP-40.

## 2.9 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A GST

Las células centrifugadas se resuspenden en tampón de lisis frío y se sonicar durante 6 ciclos de 30 segundos cada uno a amplitud 100% en sonicador dr Hielscher. El extracto de proteínas se clarifica mediante centrifugación a 4000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Las bolas de glutatión sefarosa se lavan 4 veces con tampón de lisis frío. El sobrenadante obtenido por centrifugación se incuba con las bolas de

sefarosa durante 1 hora a 4°C. Posteriormente, las bolas se limpian con tampón de lavado 4 veces y se eluyen con tampón de elución en rotor a 4°C. Se valora la cantidad de proteína purificada mediante coomassie.

- *Tampón de lisis*: STET 1X, 0,1% β-mercaptoetanol, 1 mM PMSF, 2 mg/mL Pepstatina, 2 mg/mL Leupeptina.
- *Tampón de equilibrado*: 70 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM DTT
- *Tampón de elución*: 120 mM Tris HCl pH 8.8, 50 mM DTT, 15 mM L-glutación reducido

## 2.10 CO-INMUNOPRECIPITACIÓN

### **GST Pho85 y Dma1-TAP**

Cultivos de levaduras crecen exponencialmente durante 4 horas en medio mínimo completo con 2% de rafinosa. La expresión de Pho85 se indujo durante 4 horas mediante galactosa al 2%. Se centrifuga un volumen de 500 mL de células a  $OD_{660} = 1,2$  y se resuspende en 5 mL de buffer A frío, en presencia de DTT, inhibidores de proteasas y fosfatasa. Las células se rompen con bolas de vidrio en Fast Prep24 (Qbiogene) 6 veces durante 30 segundos a fuerza 5. Los lisados se centrifugan durante 1 hora a 4°C y  $12.000 \times g$ . La cantidad de proteína total se cuantifica mediante ensayo de Bradford (BioRad 163-2099). Se incubaron 3 mg de extracto crudo durante 4 horas a 4°C con 200 μL de bolas de glutación sefarosa (GE Healthcare 17-0756-05). Después de lavar el buffer las proteínas unidas a las bolas se resuspenden en 30 μL de tampón de carga para proteínas y se hierve a 95°C durante 5 minutos. Las muestras se cargan en geles de acrilamida con SDS para su posterior análisis.

### Pho80-TAP y Cln3-MYC

Cultivos de 500 mL de levaduras en fase exponencial ( $OD_{600} = 0,7$ ) se centrifugan y resuspenden en 5 mL de buffer A frío. El protocolo continua como el explicado en el punto anterior pero la incubación de los extractos crudos se realiza con 150  $\mu$ L de bolas de IgG sefarosa (GE Healthcare 17-0969-01).

- *Buffer A*: 50 mM Tris -HCl pH 8.0, 15 mM EDTA, 15 mM EGTA, 0,1% Tritón X-100, inhibidores de proteasas (2 mg/mL Pepstatina, 2 mg/mL Leupeptina, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidina), inhibidores de fosfatasas (10 mM ortovanadato de sodio, 25 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 1 mM NaPPi y 10 mM NaF) y 2 mM DTT.

### 3. MICROBIOLOGÍA: BACTERIA

Las cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) usadas en este estudio fueron: BL21 para expresión bacteriana de proteínas recombinantes (cepa sin proteasas) y DH5 $\alpha$  para la purificación de plásmidos. Las cepas crecieron en LB líquido o LB-agar. Para los medios se utilizaron medios de Pronadisa (Luria Broth Cat. 1551.00 y Luria Agar Cat. 1552.00 respectivamente) con el antibiótico necesario para la selección de plásmido.

- BL21: *E. coli* B F, ompT, hsdS( $r_B$ ,  $m_B$ ), gal, dcm
- DH5 $\alpha$ : F/endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG  $\Phi$ 80 $\Delta$ lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF) U169, hsdR17( $r_K$ ,  $m_K$ ),  $\lambda$

#### 3.1 CEPAS

CÓDIGO	CEPA	GENOTIPO	FUENTE
pJC1179	BL-21	pGEX6P1-CLN3(desde codón inicio hasta 1038)	
pJC1154	BL-21	pGEX6P1-CLN3(desde nucleótido 1038 hasta codón STOP)	Euroscarf
pJC1158	BL-21	pGEX6P1-PHO85	Euroscarf
pJC1191	BL-21	pGEX6P1-PHO4	Este estudio
pJC1456	BL-21	pGEX6P1-CLN3 (desde nucleótido 1038 hasta codón STOP) S449A/T520A	Este estudio
pJC1448	BL-21	pGEX6P1-CLN3 (desde nucleótido 1038 hasta codón STOP) S449D/T520D	Este estudio
pJC1449	BL-21	pGEX6P1-CLN3 (desde nucleótido 1159 hasta codón STOP) T420A/S455A/S462A/S466A/S468A/T478A/S514A/T517A	Este estudio
pJC1228	BL-21	pGEX6P1-SIC1	Este estudio
pJC1237	BL-21	pGEX6P1-PCL1	Este estudio
pJC1267	BL-21	pGEX6P1-PCL9	Este estudio
pJC1169	BL-21	pGEX6P1-PHO80	Este estudio
pJC1226	BL-21	pGEX6P1-DMA1	Este estudio
pJC1214.2	BL-21	pGEX6P1-DMA2	Este estudio
pJC1256	BL-21	pGEX6P1-DMA1 S343A	Este estudio
pJC1293	BL-21	pGEX6P1-DMA1 S343A/T144A	Este estudio

pJC1198	BL-21	pGEX6P1-DMA1 T144A	Este estudio
pJC1298	BL-21	pGEX6P1-DMA1 S9A/T14A/S343A/T144A	Este estudio
pJC1280	DH5 $\alpha$	pRS416-CLN3-MYC	Este estudio
pJC1065	DH5 $\alpha$	pEG(KG)-PHO85	Este estudio
pJC1284.1	DH5 $\alpha$	pRS416-DMA1-TAP-HIS3	Este estudio
pJC1295	DH5 $\alpha$	pRS426-DMA1-TAP-HIS3	Este estudio

Tabla 8: cepas bacterianas utilizadas en esta tesis

### 3.2 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS

Luego de preparar las células competentes con protocolo de CaCl<sub>2</sub> las células se dejan 30 minutos en hielo en presencia de 5  $\mu$ L del DNA que interesa transformar. Posteriormente se realiza un *heat shock* de 1' 15" y se agrega 500  $\mu$ L de SOC. Se incuba a 37 °C durante 1 hora y se plaquea en placas de LB con la resistencia apropiada.

### 3.3 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A GST

Células de *E. coli* BL21 se cultivan en LB con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina hasta crecimiento exponencial. La expresión de GST fusionado a la proteína de interés se induce con IPTG 0,5 mM. El cultivo se incuba a 25 °C durante 4-6 horas y posteriormente las células son recogidas por centrifugación.

## 4. MICROBIOLOGÍA: LEVADURA

### 4.1 CEPAS

CÓDIGO	FONDO	GENOTIPO	FUENTE
YPC736	BY	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ200 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
YNR008	W303-1a	MATa <i>ura3-52 trp1Δ2 leu2-3,112his3-11 ade2-1 can1-100</i>	Euroscarf
YNR194	W303	MATa <i>cdc28ts CLN3-TAP-HIS3</i>	Este estudio
YNR195	W303	MATa <i>cdc28ts CLN3-TAP-HIS3 pho85Δ::LEU2</i>	Este estudio
YNR055	BY4741	MATa <i>CLN3-MYC-KanMX4</i>	Este estudio
YNR056	BY4741	MATa <i>CLN3-MYC-KanMX4 pho85Δ::URA3</i>	Este estudio
YPC631	BY4741	MATa <i>cln3Δ::KanMX4</i>	Este estudio
YNR197	BY4741	MATa <i>cln3Δ::KanMX4 pRS416-CLN3-MYC-KanMX4</i>	Este estudio
YNR198	BY4741	MATa <i>cln3Δ::KanMX4 pRS416-CLN3-MYC(S449A/T520A)</i>	Este estudio
YAM078	BY4741	MATa <i>pho85Δ::LEU2</i>	Este estudio
YSH087	BY4741	MATa <i>CLN2-TAP-KanMX4</i>	Este estudio
YAM047	BY4741	MATa <i>PCL1-TAP-HIS3</i>	Este estudio
YNR068	BY4741	MATa <i>DMA1-TAP-HIS3 pE(KG)-URAGAL-GST-PHO85</i>	Este estudio
YPC708	BY4741	MATa <i>DMA1-TAP-HIS3</i>	Este estudio
YAM38	BY4741	MATa <i>DMA1-TAP-HIS3 pho85Δ::URA</i>	Este estudio
YNR205	BY4741	MATa <i>pcl1Δ::LEU2 pcl2Δ::KanMX4 DMA1-TAP-HIS3</i>	Este estudio

Tabla 8: cepas de levaduras utilizadas en esta tesis

### 4.2 CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Las células crecen en medio YPD (1% yeast extract, 2% peptona y 2% de glucosa) o en medio SD (0,67% yeast nitrogen base, 2% glucosa) con los aminoácidos apropiados para suplementar las auxotrofías. Los medios se preparan tal y como está descrito en Gallego et al. 1997.

Para sincronizar a las células por privación de fosfatos, se utilizó *yeast nitrogen base* sin fosfatos (MP Biomedical ref. 4027-812) y se siguieron las recomendaciones del fabricante para su preparación.



#### 4.3 SINCRONIZACIÓN POR PRIVACIÓN DE FOSFATOS

Se siembran las células a  $OD_{660} = 0,3$  en medio SD completo, después de 16 horas se centrifugan 2 minutos a  $2000 \times g$  y se resuspenden en medio SD. Se resuspende la cantidad apropiada para dejar el cultivo a  $OD_{660} = 0,1$  y se deja 40 horas a  $30^{\circ}C$  y 200 rpm. Posteriormente se centrifugan y se resuspenden en YPD incubado previamente a  $30^{\circ}$  durante dos horas.

#### 4.4 SINCRONIZACIÓN CON $\alpha$ -FACTOR

Después de un cultivo O/N las células se siembran en YPD a  $OD_{660} = 0,5$ . Pasadas 2 horas se agrega  $\alpha$ -factor durante dos horas. Una vez comprobada que las células están arrestadas observando su morfología en microscopio de contraste de fases (Leica DMIRB), el cultivo se centrifuga a  $2000 \times g$  durante dos minutos. En la primera centrifugación se elimina el medio y se resuspenden las células en YPD sin  $\alpha$ -factor. El cultivo vuelve a centrifugarse para eliminar por completo el  $\alpha$ -factor y posteriormente comienza el muestreo.

#### 4.5 CITOMETRÍA DE FLUJO

Para el análisis por citometría de flujo las células se fijan en etanol al 70% y se tratan toda la noche con RNAsa A (QIAGEN ref. 19101) a  $30^{\circ}C$ . Al día siguiente se tiñen con yoduro de propidio y se analizan un total de 10.000 células en citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson). La población de  $G_1$  y  $G_2$  se cuantifica para cada muestra con el programa WinMDI 2.9.

#### 4.6 TRANSFORMACIÓN

Las transformaciones con plásmidos y productos de PCR se realiza con el método de transformación con acetato de litio. Se resuspenden  $1-2 \times 10^8$  células en solución LiAc/TE y se agrega  $3,5 \mu g/\mu L$  de células de

DNA de esperma de salmón desnaturalizado con 50% de solución PEG. Las células se incuban a 30 °C durante 30 minutos y se someten a choque térmico 15 minutos a 42°C. Finalmente se resuspenden en agua destilada autoclavada y se plaquean en medio SD en ausencia del aminoácido deseado. En los casos en los que la resistencia sea genética, las células se plaquean primero en placas de YPD y al día siguiente se realizan réplicas en placas de genética.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---



- Alt, J., Cleveland, J., Hannink, M., & Diehl, J. (2000). **Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation.***14(24)*, 3102-3114.
- Amon, A., Tyers, M., Futcher, B., & Nasmyth, K. (1993). **Mechanisms that help the yeast cell cycle clock tick: G2 cyclins transcriptionally activate G2 cyclins and repress G1 cyclins.***74(6)*, 993-1007.
- Andrews, B., & Measday, V. (1998). **The cyclin family of budding yeast: Abundant use of a good idea.***14(2)*, 66-72.
- Ariño, J. (2010). **Integrative responses to high pH stress in *S. cerevisiae*.***14(5)*, 517-523.
- Aviram, S., Simon, E., Gildor, T., Glaser, F., & Kornitzer, D. (2008). **Autophosphorylation-induced degradation of the Pho85 cyclin Pcl5 is essential for response to amino acid limitation.***28(22)*, 6858-6869.
- Barberis, M., De Gioia, L., Ruzzene, M., Sarno, S., Coccetti, P., Fantucci, P., . . . Alberghina, L. (2005). **The yeast cyclin-dependent kinase inhibitor Sic1 and mammalian p27Kip1 are functional homologues with a structurally conserved inhibitory domain.***15(6)*, 639-647.
- Barford, D. (2011). **Structural insights into anaphase-promoting complex function and mechanism.***366(1584)*, 3605-3624.
- Basco, R., Segal, M., & Reed, S. (1995). **Negative regulation of G1 and G2 by S-phase cyclins of *saccharomyces cerevisiae*.***15(9)*, 5030-5042.
- Bates, S., Parry, D., Bonetta, L., Vousden, K., Dickson, C., & Peters, G. (1994). **Absence of cyclin D/cdk complexes in cells lacking functional retinoblastoma protein.***9(6)*, 1633-1640.
- Bieganowski, P., Shilinski, K., Tsihchlis, P., & Brenner, C. (2004). **Cdc123 and checkpoint forkhead associated with RING proteins**

control the cell cycle by controlling eIF2gamma abundance..279(43), 44656-44666.

Bloom, J., & Cross, F. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control.8, 149-160. doi: 10.1038/nrm2105

Bömeke, K., Pries, R., Korte, V., Scholz, E., Herzog, B., Schulze, F., & Braus, G. (2006). **Yeast Gcn4p stabilization is initiated by the dissociation of the nuclear Pho85p/Pcl5p complex.**17(7), 2952-2962.

Bothos, J., Summers, M., Venere, M., Scolnick, D., & Halazonetis, T. (2003). **The chfr mitotic checkpoint protein functions with Ubc13-Mms2 to form Lys63-linked polyubiquitin chains.**22(46), 7101-7107.

Botstein, D., & Fink, G. (1988). **Yeast: An experimental organism for modern biology.**240(4858), 1439-1443.

Broach, J., Pringle, J., & Jones, E. (1991). The molecular and cellular biology of the yeast *saccharomyces cerevisiae*.1 *Genome Dynamics, Protein Synthesis and Energetics*

Brooks, L. 3., Heimsath, E. J., Loring, G., & Brenner, C. (2008). **FHA-RING ubiquitin ligases in cell division cycle control.**65(21), 3458-3466.

Brusky, J., Zhu, Y., & Xiao, W. (2000). **UBC13, a DNA-damage-inducible gene, is a member of the error-free postreplication repair pathway in *saccharomyces cerevisiae*.**37(3), 168-174.

Byers, B. (1981). Cytology of the yeast life cycle., 59-96.

Byrne, M., Miller, N., Springer, M., & O'Shea, E. (2004). **A distal, high-affinity binding site on the cyclin-CDK substrate Pho4 is important for its phosphorylation and regulation.**335(1), 57-70.

Carroll, A., & O'Shea, E. (2002). **Pho85 and signaling environmental conditions.**27(2), 87-93.

- Casamayor, A., & Snyder, M. (2003). Molecular dissection of a yeast septin: Distinct domains are required for septin interaction, localization, and function. *23*(8), 2762-2777.
- Chapman, M., Dolan, M., & Margulis, L. (2000). **Centrioles and kinetosomes: Form, function, and evolution.** *75*(4), 409-729.
- Chuang, S., & Madura, K. (2005). **Saccharomyces cerevisiae ubiquitinating enzyme Ubc4 binds the proteasome in the presence of translationally damaged proteins.** *171*(4), 1477-1484.
- Clague, M., & Urbé, S. (2010). **Ubiquitin: Same molecule, different degradation pathways.** *143*(5), 682-685. doi: 10.1016/j.cell.2010.11.012.
- Costanzo, M., Nishikawa, J., Tang, X., Millman, J., Schub, O., Breitkreuz, K., . . . Tyers, M. (2004). **CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast.** *117*(7), 899-913.
- Coux, O. (2003). **An interaction map of proteasome subunits.** *31*(2), 465-469.
- Cross, F. (1988). DAF1, a mutante gene affecting cell size control, pheromone arrest , and cell cycle kinetics of saccharomyces cerevisiae. *8*, 4675-4684.
- Cross, F. (1995). **Transcriptional regulation by a cyclin-cdk.** *11*(6), 209-211.
- Cyert, M. (2003). **Calcineurin signaling in saccharomyces cerevisiae: How yeast go crazy in response to stress.** *311*(4), 1143-1150.
- Dahmann, C., Diffley, J., & Nasmyth, K. (1995). **S-phase-promoting cyclin-dependent kinases prevent re-replication by inhibiting the transition of replication origins to a pre-replicative state.** *5*(11), 1257-1269.
- Dann, S., & Thomas, G. (2006). **The amino acid sensitive TOR pathway from yeast to mammals.** *580*(12), 2821-2829.



- de Bruin, R., McDonald, W., Kalashnikova, T., & Yates, J. 3rd. Wittenberg, C. (2004). **Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5.***117(7)*, 887-898.
- de Nadal, E., Alepuz, P., & Posas, F. (2002). **Dealing with osmostress through MAP kinase activation.***3(8)*, 735-740.
- De Virgilio, C. (2012). **The essence of yeast quiescence.***36(2)*, 306-339.
- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., . . . Chen, Z. (2000). **Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain.***103(2)*, 351-361.
- Dephoure, N., Howson, R., Blethrow, J., Shokat, K., & O'Shea, E. (2005). **Combining chemical genetics and proteomics to identify protein kinase substrates.***102(50)*, 17940-17945.
- DeRisi, J., Iyer, V., & Brown, P. (1997). **Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale.***278(5338)*, 680-686.
- DeSalle, L., & Pagano, M. (2001). **Regulation of the G1 to S transition by the ubiquitin pathway.***490(3)*, 179-189.
- Deshaies, R. (1997). **Phosphorylation and proteolysis: Partners in the regulation of cell division in budding yeast.***7(1)*, 7-16.
- Deshaies, R. (1999). **SCF and cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases.***(15)*, 435-467.
- Dhavan, R., & Tsai, L. (2001). **A decade of CDK5.***2(10)*, 749-759.
- Di Talia, S., Wang, H., Skotheim, J., Rosebrock, A., Futcher, B., & Cross, F. (2009). **Daughter-specific transcription factors regulate cell size control in budding yeast.***7(10)* doi: 10.1371/journal.pbio.1000221

- Dirick, L., Böhm, T., & Nasmyth, K. (1995). **Roles and regulation of *cln-Cdc28* kinases at the start of the cell cycle of *saccharomyces cerevisiae*.** *14*(19), 4803-4813.
- Dohlman, H., & Slessareva, J. (2006). **Pheromone signaling pathways in yeast.** *2006*(364)
- Dohrmann, P., Butler, G., Tamai, K., Dorland, S., Greene, J., Thiele, D., & Stillman, D. (1992). **Parallel pathways of gene regulation: Homologous regulators SWI5 and ACE2 differentially control transcription of HO and chitinase.** *6*(1), 93-104.
- Dujon, B. (1996). **The yeast genome project: What did we learn?** *12*(7), 263-270.
- Dungrawala, H., Hua, H., Wright, J., Abraham, L., Kasemsri, T., McDowell, A., . . . Schneider, B. (2012). **Identification of new cell size control genes in *S. cerevisiae*.** *7*(1), 24. doi: 10.1186/1747-1028-7-24.
- Durocher, D., Smerdon, S., Yaffe, M., & Jackson, S. (2000). **The FHA domain in DNA repair and checkpoint signaling.** *65*, 423-431.
- Edgington, N., & Futcher, B. (2001). **Relationship between the function and the location of G1 cyclins in *S. cerevisiae*.** *114*(24), 4599-4611.
- Egelhofer, T., Villén, J., McCusker, D., Gygi, S., & Kellogg, D. (2008). **The septins function in G1 pathways that influence the pattern of cell growth in budding yeast.** *3*(4), e2022. doi: 10.1371/journal.pone.0002022.
- Escoté, X., Zapater, M., Clotet, J., & Posas, F. (2004). **Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1.** *6*(10), 997-1002.
- Espinoza, F., Farrell, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Morgan, D. (1996). **A cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) in budding yeast unrelated to vertebrate CAK.** *273*(5282), 1714-1717.

- Espinoza, F., Ogas, J., Herskowitz, I., & Morgan, D. (1994). Cell cycle control by a complex of the cyclin HCS26 (PCL1) and the kinase PHO85..266(5189), 1388-1391.
- Evans, T., Rosenthal, E., Youngblom, J., Distel, D., & Hunt, T. (1983). Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division.33(2), 389-396.
- Ferrezuelo, F., Colomina, N., Fitcher, B., & Aldea, M. (2010). The transcriptional network activated by Cln3 cyclin at the G1-to-S transition of the yeast cell cycle..11(6) doi: 10.1186/gb-2010-11-6-r67
- Foury, F. (1997). Human genetic diseases: A cross-talk between man and yeast..195(1), 1-10.
- Fraschini, R., Bilotta, D., Lucchini, G., & Piatti, S. (2004). Functional characterization of Dma1 and Dma2, the budding yeast homologues of schizosaccharomyces pombe Dma1 and human chfr..15(8), 3796-3810.
- Fraschini, R., Raspelli, E., & Cassani, C. (2012). Protein phosphorylation is an important tool to change the fate of key players in the control of cell cycle progression in saccharomyces cerevisiae. *Protein phosphorylation in human health* (pp. 377-394) InTech. doi: 10.5772/2944
- Friesen, H., Murphy, K., Breikreutz, A., Tyers, M., & Andrews, B. (2003). Regulation of the yeast amphiphysin homologue Rvs167p by phosphorylation..14(7), 3027-3040.
- Gallego, C., Gari, E., Colomina, N., Herrero, E., & Aldea, M. (1997). The Cln3 cyclin is down-regulated by translational repression and degradation during the G1 arrest caused by nitrogen deprivation in budding yeast..16(23), 7196-7206.
- Germain, D., Hendley, J., & Fitcher, B. (1997). DNA damage inhibits proteolysis of the B-type cyclin Clb5 in S. cerevisiae..110(15), 1813-1820.

- Geymonat, M., Spanos, A., Wells, G., Smerdon, S., & Sedgwick, S. (2004). **Clb6/Cdc28 and Cdc14 regulate phosphorylation status and cellular localization of Swi6.***24(6)*, 2277-2285.
- Gimeno, C., Ljungdahl, P., Styles, C., & Fink, G. (1992). **Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: Regulation by starvation and RAS.***68(6)*, 1077-1090.
- Golias, C., Charalabopoulos, A., & Charalabopoulos, K. (2004). **Cell proliferation and cell cycle control: A mini review.***58(12)*, 1134-1141.
- Guertin, D., Venkatram, S., Gould, K., & McCollum, D. (2002). **Dma1 prevents mitotic exit and cytokinesis by inhibiting the septation initiation network (SIN).***3(6)*, 779-790.
- Hall, D., Markwardt, D., Parviz, F., & Heideman, W. (1998). **Regulation of the Cln3-Cdc28 kinase by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*.***17(15)*, 4370-4378.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. (2011). **Hallmarks of cancer: The next generation.***144(5)*, 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hao, B., Oehlmann, S., Sowa, M., Harper, J., & Pavletich, N. (2007). **Structure of a Fbw7-Skp1-cyclin E complex: Multisite-phosphorylated substrate recognition by SCF ubiquitin ligases.***26(1)*, 131-143.
- Hardwick, J., Kuruvilla, F., Tong, J., Shamji, A., & Schreiber, S. (1999). **Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the tor proteins.***96(26)*, 14866-14870.
- Hartwell, L. (1973). **Three additional genes required for deoxyribonucleic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*.***115(3)*, 966-974.
- Hernandez-Ortega, S., Bru, S., Ricco, N., Ramirez, S., Casals, N., Jimenez, J., . . . Clotet, J. (2012). **Defective in mitotic arrest 1**

- (Dma1) ubiquitin ligase controls G1 cyclin degradation.**..288(7), 4704-4714.
- Hicke, L. (1999). **Gettin' down with ubiquitin: Turning off cell-surface receptors, transporters and channels.**..9(3), 107-112.
- Hicke, L., Schubert, H., & Hill, C. (2005). **Ubiquitin-binding domains.**..6(8), 610-621.
- Hochstrasser, M. (1996). **Ubiquitin-dependent protein degradation.**..30, 405-439.
- Hohmann, S. (2002). **Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts.**..66(2), 300-372.
- Hohmann, S., & Mager, W. (1997). **Yeast stress responses.**
- Holmes, J., & Solomon, M. (1996). **A predictive scale for evaluating cyclin-dependent kinase substrates. A comparison of p34cdc2 and p33cdk2.**..271(41), 25240-25246.
- Holt, L., Tuch, B., Villén, J., Johnson, A., Gygi, S., & Morgan, D. (2009). **Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution.**..325(5948) doi: 10.1126/science.1172867.
- Houser, J., Ford, E., Nagiec, M., Errede, B., & Elston, T. (2012). **Positive roles for negative regulators in the mating response of yeast.**..8(586) doi: doi: 10.1038/msb.2012.18.
- Howell, A., & Lew, D. (2012). **Morphogenesis and the cell cycle.**..190(1), 55-77.
- Huang, D., Friesen, H., & Andrews, B. (2007). **Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast.**..63(2), 304-314.
- Huang, D., Kaluarachchi, S., van Dyk, D., Friesen, H., Sopko, R., Ye, W., . . . Andrews, B. (2009). **Dual regulation by pairs of cyclin-dependent protein kinases and histone deacetylases controls G1**

transcription in budding yeast..7(9) doi:  
10.1371/journal.pbio.1000188.

Huang, D., Moffat, J., & Andrews, B. (2002). **Dissection of a complex phenotype by functional genomics reveals roles for the yeast cyclin-dependent protein kinase Pho85 in stress adaptation and cell integrity.**.22(14), 5076-5088.

Huang, D., Moffat, J., Wilson, W., Moore, L., Cheng, C., Roach, P., & Andrews, B. (1998). **Cyclin partners determine Pho85 protein kinase substrate specificity *in vitro* and *in vivo*: Control of glycogen biosynthesis by Pcl8 and Pcl10.**.18(6), 3289-3299.

Jackson, L., Reed, S., & Haase, S. (2006). **Distinct mechanisms control the stability of the related S-phase cyclins Clb5 and Clb6.**.26(6), 2456-2466.

Jeffery, D., Springer, M., King, D., & O'Shea, E. (2001). **Multi-site phosphorylation of Pho4 by the cyclin-CDK Pho80-Pho85 is semi-processive with site preference.**.306(5), 997-1010.

Jeffrey, P., Russo, A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massagué, J., & Pavletich, N. (1995). **Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex.**.376(6538), 313-320.

Jenkins, G. (2003). **The emerging role for sphingolipids in the eukaryotic heat shock response.**.60(4), 701-710.

Jiménez, J., Truman, A., Menoyo, S., Kron, S., & Clotet, J. (2013). **The yin and yang of cyclin control by nutrients.**.12(6), [Epub ahead of print].

Jin, H., Xu, C., Lim, H., Park, S., Shin, J., Chung, Y., . . . Cho, M. (2009). **High dietary inorganic phosphate increases lung tumorigenesis and alters akt signaling.**.179(1), 59-68. doi:  
10.1164/rccm.200802-306OC

Joazeiro, C., & Weissman, A. (2000). **RING finger proteins: Mediators of ubiquitin ligase activity.**.102(5), 549-552.

- Johnson, A., Collier, S., Ohi, M., & Gould, K. (2012). **Fission yeast Dma1 requires RING domain dimerization for its ubiquitin ligase activity and mitotic checkpoint function.***287(31)*, 25741-25748. doi: 10.1074/jbc.M112.349712
- Johnston, G., Pringle, J., & Hartwell, L. (1977). **Coordination of growth with cell division in the yeast *saccharomyces cerevisiae*.***105(1)*, 79-98.
- Kaffman, A., Herskowitz, I., Tjian, R., & O'Shea, E. (1994). Phosphorylation of the transcription factor PHO4 by a cyclin-CDK complex, PHO80-PHO85., 1153-1156.
- Kee, Y., Lyon, N., & Huibregtse, J. (2005). **The Rsp5 ubiquitin ligase is coupled to and antagonized by the Ubp2 deubiquitinating enzyme.***24(13)*, 2414-2424.
- Kellogg, D. (2003). **Wee1-dependent mechanisms required for coordination of cell growth and cell division.***116(24)*, 4883-4890.
- Kim, H., Steffen, A., Oldham, M., Chen, J., & Huibregtse, J. (2011). **Structure and function of a HECT domain ubiquitin-binding site.***12(4)*, 334-341.
- Kim, J., Park, Y., Park, S., Cho, H., Kang, D., & Cho, H. (2011). **The auto-ubiquitylation of E3 ubiquitin-protein ligase chfr at G2 phase is required for accumulation of polo-like kinase 1 and mitotic entry in mammalian cells.***286(35)*, 30615-30623. doi: 10.1074/jbc.M111.231803
- Kimata, M., Michigami, T., Tachikawa, K., Okada, T., Koshimizu, T., Yamazaki, M., . . . Ozono, K. (2010). **Signaling of extracellular inorganic phosphate up-regulates cyclin D1 expression in proliferating chondrocytes via the Na<sup>+</sup>/Pi cotransporter pit-1 and Raf/MEK/ERK pathway.***47(5)*, 938-947. doi: 10.1016/j.bone.2010.08.006.
- Kinoshita, E., Takahashi, M., Takeda, H., Shiro, M., & Koike, T. (2004). **Recognition of phosphate monoester dianion by an alkoxide-bridged dinuclear zinc(II) complex.***8*, 1189-1193.

- Kipreos, E., & Pagano, M. (2000). **The F-box protein family.***1*(5)
- Kobayashi, H., Stewart, E., Poon, R., Adamczewski, J., Gannon, J., & Hunt, T. (1992). **Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits.***3*(11), 1279-1294.
- Koch, C., Schleiffer, A., Ammerer, G., & Nasmyth, K. (1996). **Switching transcription on and off during the yeast cell cycle: Cln/Cdc28 kinases activate bound transcription factor SBF (Swi4/Swi6) at start, whereas Clb/Cdc28 kinases displace it from the promoter in G2.***10*(2), 129-141.
- Krebs, E., & Beavo, J. (1979). **Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes.***(48)*, 923-959.
- Laine, A., Topisirovic, I., Zhai, D., Reed, J., Borden, K., & Ronai, Z. (2006). **Regulation of p53 localization and activity by Ubc13.***26*(23), 8901-8913.
- Lalioti, V., Pulido, D., & Sandoval, I. (2010). **Cdk5, the multifunctional surveyor.***9*(2), 284-311.
- Landry, B., Doyle, J., Toczyski, D., & Benanti, J. (2012). **F-box protein specificity for g1 cyclins is dictated by subcellular localization.***8*(7), e1002851. doi: 10.1371/journal.pgen.1002851
- Lee, J., Colwill, K., Aneliunas, V., Tennyson, C., Moore, L., Ho, Y., & Andrews, B. (1998). **Interaction of yeast Rvs167 and Pho85 cyclin-dependent kinase complexes may link the cell cycle to the actin cytoskeleton.***8*(24), 1310-1321.
- Lee, M., O'Regan, S., Moreau, J., Johnson, A., Johnston, L., & Goding, C. (2000). **Regulation of the Pcl7-Pho85 cyclin-cdk complex by Pho81.***38*(2), 411-422.
- Lee, Y., Huang, K., Quioco, F., & O'Shea, E. (2008). **Molecular basis of cyclin-CDK-CKI regulation by reversible binding of an inositol pyrophosphate.***4*(1), 25-32.



- Lenburg, M., & O'Shea, E. (1996). Signaling phosphate starvation..31(10), 383-387.
- Levine, K., Oehlen, L., & Cross, F. (1998). Isolation and characterization of new alleles of the cyclin-dependent kinase gene CDC28 with cyclin-specific functional and biochemical defects..18(1), 290-302.
- Lew, D. (2003). The morphogenesis checkpoint: How yeast cells watch their figures..15(6), 648-653.
- Liebl, J., Fürst, R., Vollmar, A., & Zahler, S. (2011). Twice switched at birth: Cell cycle-independent roles of the "neuron-specific" cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) in non-neuronal cells..23(11), 1698-1707.
- Lillie, S. H., & Pringle, J. (1980). Reserve carbohydrate metabolism in *saccharomyces cerevisiae*: Responses to nutrient limitation..143(3), 1384-1394.
- Lim, H., Goh, P., & Surana, U. (1996). Spindle pole body separation in *saccharomyces cerevisiae* requires dephosphorylation of the tyrosine 19 residue of Cdc28..16(11), 6385-6397.
- Liu, J., & Kipreos, E. (2000). Evolution of cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK-activating kinases (CAKs): Differential conservation of CAKs in yeast and metazoa..17(7), 1061-1074.
- Lorick, K., Jensen, J., Fang, S., Ong, A., Hatakeyama, S., & Weissman, A. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination..96(20), 11364-11369.
- Loring, G., Christensen, K., Gerber, S., & Brenner, C. (2008). Yeast *chfr* homologs retard cell cycle at G1 and G2/M via Ubc4 and Ubc13/Mms2-dependent ubiquitination..7(1), 96-105.
- MacKay, V. (1978). Mating-type specific pheromones as mediators of sexual conjugation in yeast..(35), 243-259.

- Maddika, S., Ande, S., Panigrahi, S., Paranjothy, T., Weglarczyk, K., Zuse, A., . . . Los, M. (2007). **Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: Implications for cancer therapy.***10*(1-2), 13 - 29.
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Faustrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C., & Lukas, J. (2007). **RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins.***131*(5), 887-900.
- Mazanka, E., & Weiss, E. (2010). Sequential counteracting kinases restrict an asymmetric gene expression program to early G1.*21*(16), 2809-2820.
- Mazanka, E., & Weiss, E. (2010). **Sequential counteracting kinases restrict an asymmetric gene expression program to early G1.***21*(16), 2809-2820. doi: 10.1091/mbc.E10-02-0174.
- McBride, H., Yu, Y., & Stillman, D. (1999). **Distinct regions of the Swi5 and Ace2 transcription factors are required for specific gene activation.***274*(30), 21029-21036.
- Measday, V., McBride, H., Moffat, J., Stillman, D., & Andrews, B. (2000). **Interactions between Pho85 cyclin-dependent kinase complexes and the Swi5 transcription factor in budding yeast.***35*(4), 825-834.
- Measday, V., Moore, L., Ogas, J., Tyers, M., & Andrews, B. (1994). **The PCL2 (ORFD)-PHO85 cyclin-dependent kinase complex: A cell cycle regulator in yeast.***266*, 1391-1395.
- Measday, V., Moore, L., Retnakaran, R., Lee, J., Donoviel, M., Neiman, A., & Andrews, B. (1997). **A family of cyclin-like proteins that interact with the Pho85 cyclin-dependent kinase.***17*(3), 1212.
- Meimoun, A., Holtzman, T., Weissman, Z., McBride, H., Stillman, D., Fink, G., & Kornitzer, D. (2000). **Degradation of the transcription factor Gcn4 requires the kinase Pho85 and the SCF(CDC4) ubiquitin-ligase complex.***11*(3), 915-927.

- Mendenhall, M. (1993). **An inhibitor of p34CDC28 protein kinase activity from *saccharomyces cerevisiae***.*259(5092)*, 216-219.
- Mendenhall, M., & Hodge, A. (1998). **Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *saccharomyces cerevisiae***.*62*, 1192-1243.
- Menoyo, S., Ricco, N., Bru, S., Hernández-Ortega, S., Escoté, X., Aldea, M., & Clotet, J. (2013). Phosphate - activated CDK stabilizes G1 cyclin to trigger cell cycle entry.
- Merlini, L., Fraschini, R., Boettcher, B., Barral, Y., Lucchini, G., & Piatti, S. (2012). **Budding yeast dma proteins control septin dynamics and the spindle position checkpoint by promoting the recruitment of the Elm1 kinase to the bud neck**.*8(4)*
- Miller, M., & Cross, F. (2001). **Cyclin specificity: How many wheels do you need on a unicycle?**.*114(10)*, 1811-1820.
- Mitchell, D., Marshall, T., & Deschenes, R. (1993). **Vectors for the inducible overexpression of glutathione S-transferase fusion proteins in yeast**.*9(7)*, 715-722.
- Moffat, J., & Andrews, B. (2004). **Late-G1 cyclin-CDK activity is essential for control of cell morphogenesis in budding yeast**.*6(1)*, 59-66.
- Moll, T., Dirick, L., Auer, H., Bonkovsky, J., & Nasmyth, K. (1992). **SWI6 is a regulatory subunit of two different cell cycle START-dependent transcription factors in *saccharomyces cerevisiae***.*16*, 87-96.
- Moll, T., Tebb, G., Surana, U., Robitsch, H., & Nasmyth, K. (1991). **The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SWI5**.*66(4)*, 743-758.
- Murone, M., & Simanis, V. (1996). **The fission yeast *dma1* gene is a component of the spindle assembly checkpoint, required to**

- prevent septum formation and premature exit from mitosis if spindle function is compromised..15(3), 6605-6616.
- Murray, A. W. (2004). Recycling the cell cycle: Cyclins revisited.116(2), 221-234.
- Musgrove, E. (2006). **Cyclins: Roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation..24(1), 13-19.**
- Musgrove, E., Caldon, C., Barraclough, J., Stone, A., & Sutherland, R. (2011). **Cyclin D as a therapeutic target in cancer..11(8), 558-572.** doi: doi: 10.1038/nrc3090.
- Nash, R., Tokiwa, G., Anand, S., Erickson, K., & Futcher, A. (1988). **The WHI1+ gene of saccharomyces cerevisiae tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog..7(13), 4335-4346.**
- Nigavekar, S., Tan, Y., & Cannon, J. (2002). **Glc8 is a glucose-repressible activator of Glc7 protein phosphatase-1..404(1), 71-79.**
- Nishizawa, M., Kanaya, Y., & Toh-E, A. (1999). **Mouse cyclin-dependent kinase (cdk) 5 is a functional homologue of a yeast cdk, pho85 kinase..274(48), 33859-33862.**
- Nishizawa, M., Katou, Y., Shirahige, K., & Toh-e, A. (2004). **Yeast Pho85 kinase is required for proper gene expression during the diauxic shift..21(11), 903-918.**
- Nishizawa, M., Kawasumi, M., Fujino, M., & Toh-e, A. (1998). **Phosphorylation of sic1, a cyclin-dependent kinase (cdk) inhibitor, by cdk including Pho85 kinase is required for its prompt degradation..9(9), 2393-2405.**
- Nishizawa, M., Suzuki, K., Fujino, M., Oguchi, T., & Toh-e, A. (1999). **The Pho85 kinase, a member of the yeast cyclin-dependent kinase (cdk) family, has a regulation mechanism different from cdks functioning throughout the cell cycle..4(11), 627-642.**

- Oehlen, L., & Cross, F. (1994). G1 cyclins CLN1 and CLN2 repress the mating factor response pathway at start in the yeast cell cycle..8(9), 1058-1070.
- Ogawa, N., DeRisi, J., & Brown, P. (2000). New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis..11(12), 4309-4321.
- O'Neill, E., Kaffman, A., Jolly, E., & O'Shea, E. (1996). Regulation of PHO4 nuclear localization by the PHO80-PHO85 cyclin-CDK complex..271, 209-212.
- Pedruzzi, I., Dubouloz, F., Cameroni, E., Wanke, V., Roosen, J., Winderickx, J., & De Virgilio, C. (2003). TOR and PKA signaling pathways converge on the protein kinase Rim15 to control entry into G0..12(6), 1607-1613.
- Peter, M., & Herskowitz, I. (1994). Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-cln by Far1..265(5176), 1228-1231.
- Peters, J. (2002). The anaphase-promoting complex: Proteolysis in mitosis and beyond..9(5), 931-943.
- Piatti, S., Böhm, T., Cocker, J., Diffley, J., & Nasmyth, K. (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..10(12), 1516-1531.
- Pierce, B., & Wendland, B. (2009). Sequence of the yeast protein expression plasmid pEG(KT).26(6), 349-353. doi: 10.1002/yea.1667
- Privette, L., & Petty, E. (2008). CHFR: A novel mitotic checkpoint protein and regulator of tumorigenesis..1(2), 57-64.
- Pruyne, D., & Bretscher, A. (2000). Polarization of cell growth in yeast..113(4), 571-585.

- Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., . . . Snyder, M. (2005). **Global analysis of protein phosphorylation in yeast.** *438(7068)*, 679-684.
- RasPELLI, E., Cassani, C., Lucchini, G., & Frascini, R. (2011). **Budding yeast Dma1 and Dma2 participate in regulation of Swe1 levels and localization.** *22(13)*, 2185-2197.
- Richardson, H., Lew, D., Henze, M., Sugimoto, K., & Reed, S. (1992). **Cyclin-B homologs in saccharomyces cerevisiae function in S phase and in G2.** *6(11)*, 2021-2034.
- Rogers, S., Wells, R., & Rechsteiner, M. (1986). **Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: The PEST hypothesis.** *234(4774)*, 364-368.
- Rotin, D., & Kumar, S. (2009). **Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases.** *10(6)*, 398-409. doi: 10.1038/nrm2690
- Salama, S., Hendricks, K., & Thorner, J. (1994). **G1 cyclin degradation: The PEST motif of yeast Cln2 is necessary, but not sufficient, for rapid protein turnover.** *14(2)*, 7953-7966.
- Sassoon, I., Severin, F., Andrews, P., Taba, M., Kaplan, K., Ashford, A., . . . Hyman, A. (1999). **Regulation of saccharomyces cerevisiae kinetochores by the type 1 phosphatase Glc7p.** *13(5)*, 545-555.
- Schwob, E., Böhm, T., Mendenhall, M., & Nasmyth, K. (1994). **The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in S. cerevisiae.** *79(2)*, 233-244.
- Schwob, E., & Nasmyth, K. (1993). **CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in saccharomyces cerevisiae.** *7(7A)*, 1160-1175.
- Scolnick, D., & Halazonetis, T. (2000). **Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase.** *406(6794)*, 430-435.

- Shemer, R., Meimoun, A., Holtzman, T., & Kornitzer, D. (2002). **Regulation of the transcription factor Gcn4 by Pho85 cyclin PCL5.** *22(15)*, 5395-5404.
- Sherlock, G., & Rosamond, J. (1993). Starting to cycle: G1 controls regulating cell division in budding yeast. *139(11)*, 2531-2541.
- Shtivelman, E. (2003). **Promotion of mitosis by activated protein kinase B after DNA damage involves polo-like kinase 1 and checkpoint protein CHFR.** *1(13)*, 959-969.
- Singh, R., Gonzalez, M., Kabbaj, M., & Gunjan, A. (2012). **Novel E3 ubiquitin ligases that regulate histone protein levels in the budding yeast saccharomyces cerevisiae.** *7(5)* doi: 10.1371/journal.pone.0036295
- Skotheim, J., Di Talia, S., Siggia, E., & Cross, F. (2008). **Positive feedback of G1 cyclins ensures coherent cell cycle entry.** *454(7202)*, 291-296. doi: 10.1038/nature07118
- Smets, B., Ghillebert, R., De Snijder, P., Binda, M., Swinnen, E., De Virgilio, C., & Winderickx, J. (2010). Life in the midst of scarcity: Adaptations to nutrient availability in saccharomyces cerevisiae., 1-32.
- Songyang, Z., Blechner, S., Hoagland, N., Hoekstra, M., Piwnica-Worms, H., & Cantley, L. (1994). **Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases.** *4(11)*, 973-982.
- Sopko, R., Huang, D., Smith, J., Figeys, D., & Andrews, B. (2007). Activation of the Cdc42p GTPase by cyclin-dependent protein kinases in budding yeast. *26(21)*, 4487-4500.
- Spence, J., Gali, R., Dittmar, G., Sherman, F., Karin, M., & Finley, D. (2000). **Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain.** *102(1)*, 67-76.

- Stathopoulos, A., & Cyert, M. (1997). **Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast.***11(24)*, 3432.
- Stavridi, E., Huyen, Y., Loreto, I., Scolnick, D., Halazonetis, T., Pavletich, N., & Jeffrey, P. (2002). **Crystal structure of the FHA domain of the chfr mitotic checkpoint protein and its complex with tungstate.***10(7)*, 891-899.
- Storici, F., Lewis, L., & Resnick, M. (2001). **In vivo site-directed mutagenesis using oligonucleotides.***19(8)*, 773-776.
- Stuart, D., & Wittenberg, C. (1995). **CLN3, not positive feedback, determines the timing of CLN2 transcription in cycling cells.***9(22)*, 2780-2794.
- Su, S., & Tsai, L. (2011). **Cyclin-dependent kinases in brain development and disease.***(27)*, 465-491. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154023
- Su, W., Han, G., Casciano, J., & Carman, G. (2012). Protein kinase A-mediated phosphorylation of Pah1p phosphatidate phosphatase functions in conjunction with the Pho85p-Pho80p and Cdc28p-cyclin B kinases to regulate lipid synthesis in yeast.*287(40)*, 33364-33376.
- Takano, Y., Adachi, S., Okuno, M., Muto, Y., Yoshioka, T., Matsushima-Nishiwaki, R., . . . Okano, Y. (2004). **The RING finger protein, RNF8, interacts with retinoid X receptor alpha and enhances its transcription-stimulating activity.***279(18)*, 18926-18934.
- Tan, Y., Morcos, P., & Cannon, J. (2003). **Pho85 phosphorylates the Glc7 protein phosphatase regulator Glc8 in vivo.***278(1)*, 147-153.
- Tanaka, S., Umemori, T., Hirai, K., Muramatsu, S., Kamimura, Y., & Araki, H. (2007). **CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast.***445(7125)*, 328-332.



- Tang, C., & Reed, S. (2002). **Phosphorylation of the septin cdc3 in g1 by the cdc28 kinase is essential for efficient septin ring disassembly.***1*(1), 42-49.
- Tennyson, C., Lee, J., & Andrews, B. (1998). **A role for the Pcl9-Pho85 cyclin-cdk complex at the M/G1 boundary in saccharomyces cerevisiae.***28*(1), 69-79.
- Thuret, J., Valay, J., Faye, G., & Mann, C. (1996). **Civ1 (CAK in vivo), a novel cdk-activating kinase.***86*(4), 565-576.
- Toh-e, A., Tanaka, K., Uesono, Y., & Wickner, R. (1988). **PHO85, a negative regulator of the PHO system, is a homolog of the protein kinase gene, CDC28, of saccharomyces cerevisiae.***214*(1), 162-164.
- Truman, A., Kristjansdottir, K., Wolfgeher, D., Hasin, N., Polier, S., Zhang, H., . . . Kron, S. (2012). **CDK-dependent Hsp70 phosphorylation controls G1 cyclin abundance and cell-cycle progression.***151*(6), 1308-1318. doi: 10.1016/j.cell.2012.10.051.
- Tsai, L., Delalle, I., Caviness, V. J., Chae, T., & Harlow, E. (1994). **p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5.***371*(6496), 419-423.
- Tyers, M., & Jorgensen, P. (2000). **Proteolysis and the cell cycle: With this RING I do thee destroy.***10*(1), 54-64.
- Tyers, M., Tokiwa, G., & Futcher, B. (1993). **Comparison of the saccharomyces cerevisiae G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins.***12*(5), 1955-1968.
- Tyers, M., Tokiwa, G., Nash, R., & Futcher, B. (1992). **The Cln3-Cdc28 kinase complex of S. cerevisiae is regulated by proteolysis and phosphorylation.***11*(5), 1773-1784.
- Uhlmann, F., Bouchoux, C., & López-Avilés, S. (2011). **A quantitative model for cyclin-dependent kinase control of the cell cycle: Revisited.***366*(1584), 3572-3583. doi: 10.1098/rstb.2011.0082

- Vergés, E., Colomina, N., Garí, E., Gallego, C., & Aldea M. (2007). **Cyclin Cln3 is retained at the ER and released by the J chaperone Ydj1 in late G1 to trigger cell cycle entry.** *26*, 649-662.
- Wang, H., Carey, L., Cai, Y., Wijnen, H., & Futcher, B. (2009). **Recruitment of Cln3 cyclin to promoters controls cell cycle entry via histone deacetylase and other targets.** *7*
- Waters, N., Knight, J., Creasy, C., & Bergman, L. (2004). **The yeast Pho80-Pho85 cyclin-CDK complex has multiple substrates.** *.46(1)*, 1-9.
- Weinberger, M., Feng, L., Paul, A., Smith, D. J., Hontz, R., Smith, J., . . . Burhans, W. (2007). **DNA replication stress is a determinant of chronological lifespan in budding yeast.** *.2(8)*, e748.
- Wilkinson, K. (1997). **Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes.** *.11(14)*, 1245-1256.
- Willems, A., Schwab, M., & Tyers, M. (2004). **A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin.** *.1695((1-3))*, 133-170.
- Wilson, W., Mahrenholz, A., & Roach, P. (1999). **Substrate targeting of the yeast cyclin-dependent kinase Pho85p by the cyclin Pcl10p.** *.19(10)*, 7020-7030.
- Wittenberg, C., & Reed, S. (2005). **Cell cycle-dependent transcription in yeast: Promoters, transcription factors, and transcriptomes.** *.24(17)*
- Woelk, T., Sigismund, S., Penengo, L., & Polo, S. (2007). **The ubiquitination code: A signalling problem.** *.2(11)* doi: 10.1186/1747-1028-2-11
- Wysocki, R., Javaheri, A., Kristjansdottir, K., Sha, F., & Kron, S. (2006). **CDK Pho85 targets CDK inhibitor Sic1 to relieve yeast G1 checkpoint arrest after DNA damage.** *.13(10)*, 908-914.

- Yaglom, J., Linskens, M., Sadis, S., Rubin, D., Futcher, B., & Finley, D. (1995). **p34Cdc28-mediated control of Cln3 cyclin degradation.***2*, 731-741.
- Yang, Z., Geng, J., Yen, W., Wang, K., & Klionsky, D. (2010). **Positive or negative roles of different cyclin-dependent kinase Pho85-cyclin complexes orchestrate induction of autophagy in saccharomyces cerevisiae.***38(2)*, 250-264.
- Zou, J., Friesen, H., Larson, J., Huang, D., Cox, M., Tatchell, K., & Andrews, B. (2009). Regulation of cell polarity through phosphorylation of Bni4 by Pho85 G1 cyclin-dependent kinases in *saccharomyces cerevisiae*.*20(14)*, 3259-3250. doi: 10.1091/mbc.E08-12-1255
- Zou, J., Friesen, H., Larson, J., Huang, D., Cox, M., Tatchell, K., & Andrews, B. (2009). **Regulation of cell polarity through phosphorylation of Bni4 by Pho85 G1 cyclin-dependent kinases in *saccharomyces cerevisiae*.***20(14)*, 3239-3250. doi: 10.1091/mbc.E08-12-1255

Tesis doctorales citadas:

- Menoyo S. (2012) **Nutrient availability regulates cell cycle through a Pho85 CDK-dependent control of Cln3 cyclin stability.** Universitat Internacional de Catalunya.

## RESUMEN EN INGLÉS

---



Along the time, yeasts have been used as a model organism in the field of biomedical research. They have allowed the study of individual gene functions and the structuring of complex signaling pathways. With this, they contribute to the understanding of eukaryotic basic biology and many human diseases.

Yeasts have a number of advantages that make them suitable as a laboratory tool because they are easy to grow, easy to be genetically manipulated (Botstein, Fink 1988) and all their genomic information is available, since it was the first eukaryotic organism sequenced (Dujon 1996). Moreover, a large part of their genes are conserved in human, with many of them involved in cell cycle regulation (Foury 1997), therefore the yeast is one of the best models to investigate how the molecular machinery of cell cycle is working.

*S. cerevisiae* is divided by a process that is rare in eukaryotes, known as budding. This is an asymmetric mechanism of asexual reproduction, where a mother cell produces a small bud that grows and receives the genetic material that was previously duplicated, to finally be separated and become a daughter cell. Thus, the series of sequential and coordinated events which occur in the cycle, as a result this will end up in the formation of two cells of different size but genetically identical. Many aspects of the cell cycle are known through studies of cells containing conditional lethal mutations (mutants CDC, "cell division cycle") (Broach et al. 1991). Within this set of mutants, some have been identified as necessary elements at the end of G<sub>1</sub> phase. This critical moment at the end of G<sub>1</sub> is regarded as one of the major events that controls the cycle and is known as START (Johnston et al. 1977), a non-return point from which the cells have reached a minimum size and living in an environment with nutrient availability, undertake to complete the round of cell division (Dungrawala et al., 2012, Hall et al. 1998).

The regulation of each point of the cell cycle is essential to ensure proper proliferation since alterations associated with this process can have drastic consequences for organisms, being the cause of diseases such as

cancer (Maddika et al. 2007). To ensure proper progression, the cell must overcome a series of checkpoints that will prevent or slow down the cycle until the function is impaired.

This thesis has been divided into two parts because two different issues want to be addressed: firstly, it was necessary to characterize the molecular interaction of a substrate shared by Cdc28 and Pho85. Secondly, the efforts were focused to search and describe new specific substrates of Pho85.

### **Chapter I: Characterization of the molecular interaction between Pho85 and Cln3.**

The cyclin Cln3 is a critical activator of START, whose overexpression leads to smaller cells that fastly progress through the cell cycle, while its deletion induces a larger cell size and delays its cell cycle (Cross, 1988, Nash et al. 1988b), actually there is a lot of information about the important role of Cln3 regulating START, coupled with the CDK Cdc28 (Wang et al. 2009).

Previous studies of this research group have described a novel molecular link that describes a new function for Cln3: a deficiency of phosphate in the way it modifies the stability of Cln3 and induces a stop in G<sub>1</sub> phase of the cell cycle. This decrease was also observed in those strains where Pho85, one of the main regulators of phosphate metabolism, lacks its kinase activity (Menoyo et al. 2013).

Pho85 is a multifunctional CDK that presents a high molecular promiscuity because it is directed to a large number of substrates by its binding with 10 different cyclins (O'Shea, 2008). Previous results of this group show a clear genetic interaction between the complex Pho85-Pho80 and Cln3 (Menoyo et al. 2013). But the molecular evidence demonstrating whether this interaction is direct, that is necessary to consider Cln3 as a *bona fide* substrate of Pho85, needs to be characterized.

Cln3 is a good candidate as a cycle modulator in response to the availability of nutrients. Due to its important role as an activator of START (Ferrezuelo et al. 2010), the decrease of its amount affects the capacity of cells to pass G<sub>1</sub>. With the experiments described in this work, we propose that the modulation of Cln3 stability by direct phosphorylation, is one of the points through which Pho85 regulates the cell cycle in response to the absence of phosphate.

The use of phosphorylation as a mechanism to control proteins has many advantages, since it is faster and an easily reversible change with which is possible to modulate substrate affinity, stability and activity of the phosphorylated protein (Krebs , Beavo 1979, Fraschini et al. 2012). Knowing that Pho85 phosphorylates Cln3 does not provide too much information as to know that the affected residues are placed at the C-terminus region of the protein where Cln3 degradation region (known as PEST region) is placed: from this information and taking into account what is already known about the PEST regions (Yaglom et al . 1995, Landry et al. 2012),it is possible to think that this phosphorylation reveals a redundant mechanism to induce degradation of Cln3, which would place both kinases at the same level in regard to the control of Cln3. Surprisingly, Cln3 from a *pho85Δ* strain is less stable when is compared with Cln3 from wild type cells pointing to an opposite mechanism between Pho85 and Cdc28.

Of the 10 SP/TP residue that are present in the C-terminal region of Cln3 (more specifically, inside the PEST-rich region) only two of them are surrounded by the canonical sequence that has been described for Pho85-Pho80 (O'Neill et al. 1996). In the experiments presented in this work, we have shown that Pho85-Pho80 has specificity for Ser449 and Thr520, since when these residues are mutated to Ala or Asp, phosphorylation is lost while Cdc28 is still able to phosphorylate the mutated Cln3 proteins.

These observations, together with the result of Figure 18-A which shows that Cdc28 cannot phosphorylate 8-Ala fragment, reinforces the specificity of Pho85 phosphorylation proposed in this work and is



consistent with the previous observations from a different research group that shows that more than one residue of Cln3 PEST area are involved in the recognition of the F-box protein (Landry et al. 2012). Moreover, with these experiments other residues cannot be excluded as Pho85 target (even if they do not contain the canonical sequence described for Pho85) because the phosphorylation of Pho85 on 8-Ala fragment does not retrieve the same phosphorylation levels compared with wild type fragment. Despite this, the evidence is compelling enough to describe S449 and T520 as specific targets of the Pho85-Pho80 complex.

*In vitro* evidences discussed before, are more reliable with the observation of the experiments done *in vivo*: first of all, co-immunoprecipitation of Cln3 and Pho80 indicates that both proteins are interacting *in vivo* and secondly the differences in electrophoretic mobility of Cln3 from wild type and *pho85Δ* strains, indicates that the presence of an *in vivo* phosphorylation. Also, cells *cln3Δ* transformed with wild type or non phosphorylatable version of Cln3 have a different exit from phosphate starvation, being the non phosphorylatable version, slower.

In the structure of Cln3 mammalian homologue (cyclin D), is possible to observe that this protein also has a PEST region at the C-terminus part of the protein (Bates et al. 1994) and a residue of Thr (T286) that promotes nuclear export and degradation of this cyclin (Alt et al. 2000). Analyzing the sequence of Cyclin D can be noted that before T286 phosphorylation are two residues that could be candidates to perform a similar role to Pho85 phosphorylation on Cln3, promoting the maintenance of this protein.

Proper regulation of cyclin D, is a mechanism that from yeast to humans needs to be strictly regulated by a series of molecular interactions that are contributing to the cells to dispose these molecular components at time and in the right place. Describing this series of reactions will help us to understand and address this complicated cellular mechanism.

## Chapter II: Description of new substrates for Pho85. Characterization of the molecular interaction between Pho85 and Dma1.

CDKs are molecular keys pieces to ensure the proper functioning of the correct cell cycle progression (Mendenhall, Hodge 1998, Measday et al. 1994). The role of CDKs in *S. cerevisiae* is well characterized, being Cdc28 associated with its cyclins, essential in cell cycle regulation. Moreover, Pho85 associated with its own G<sub>1</sub> cyclins also acts regulating the cell cycle (Measday et al. 1994). Even Pho85 is not essential for cell viability, cells without this gene have many problems from delayed G<sub>1</sub> phase until abnormal morphology, as well as glycogen accumulation (Carroll, O'Shea 2002) and sensitivity to various chemical components (Huang et al. 2002). Thus, Pho85 CDK controls different molecular pathways of this organism sharing many substrates with Cdc28: Sic1 is phosphorylated by both kinases to be destroyed (Nishizawa et al. 1998), as well as Clb6 (Jackson et al. 2006), while in the case of Bni4 (Zou et al. 2009, Holt et al. 2009) phosphorylation ensures proper localization.

Two G<sub>1</sub> cyclins implicated in G<sub>1</sub> progression and morphogenesis, Cln2 and Pcl1 were fused with TAP tag and were purified and analyzed by mass spectrometry in order to know which proteins are pulldowned with each cyclin (table 2). The work presented is focused in Dma1, a protein that specifically interacts with Pcl1 and is an E3 ligase, a key component of the ubiquitylation machinery.

It was decided to analyze the E3 ligase that appear bounded with Pcl1 for their relevance in cellular homeostasis, its conservation in mammals and its implication in various pathologies. A big amount of publications describes that ubiquitination machinery regulates the cell cycle (reviewed in (DeSalle, Pagano, 2001), since it is responsible for the destruction of cyclins thereby controlling the activity of CDKs, but the aim of the next experiments was to know if cell cycle is regulating ubiquitylation machinery. It is essential to know how these enzymes are regulated because a defect in their adjustment could lead to serious problems, such as the case of the MDM2 oncoprotein, an E3 that is overexpressed in many tumor types (Gu et al. 2003).

Dma1 is a RING E3 ubiquitin ligase which has been attributed an important role in regulating the correct positioning of septins in the bud neck, and the amount of the CKI Swe1 in *S. cerevisiae* (Raspelli et al. 2011). In *S. pombe* prevents septum formation and premature exit from mitosis when the mitotic spindle is affected (Murone, Simanis 1996), while two human proteins are possible counterparts of Dma1: Chfr is a tumor suppressor protein that slows the cell cycle when microtubule assembly is affected (Scolnick, Halazonetis 2000) and Rnf8 is a protein located at the nucleus and among other functions, interacts with the retinoid X receptor (a member of the superfamily of steroid hormone receptors), activating it (Takano et al. 2004).

The first approximation was to know if the complex Pho85-Pcl1 is phosphorylating Dma1, but this *in vitro* phosphorylation assays must contemplate that Pho85 is a very active kinase that does not need to be activated by any CAK (Nishizawa et al. 1999b), this could generate a false positive in this kind of experiments. If so, regardless which cyclin is directing this phosphorylation, Pho85 may have activity against Dma1, but the experiment of figure 30 shows that only when Pho85 is bounded to Pcl1 it is able to phosphorylate Dma1. The result is negative when Pcl9 or Pho80 are bounded with Pho85. This further indicates that the phosphorylation appears to be specific from late G<sub>1</sub> phase, since it only occurs in the presence of cyclin that acts at this point. Dma2, the structural homologue of Dma1, is phosphorylated with the same specificity, as expected due to the similarity of their sequences and redundant functions in the cell (Fraschini et al. 2004). The aminoacids placed at the N-terminal part of the protein, Ser9 and Thr14 are responsible of this phosphorylation because when they are mutated to Ala, the phosphorylation signals are reduced.

In order to study if this phosphorylation is affecting Dma1, the read out of autoubiquitylation that was previously described (Loring, 2008) was performed in this laboratory.

To know how Dma1 phosphorylation is affecting autoubiquitylation a phosphorylation assay was done and the reaction was then added in

the ubiquitylation assay. Thus two population of Dma1 with differences in its phosphorylation state are assayed to observe autoubiquitilation activity, the result show that there is a reduction in the activity of Dma1 ubiquitination depending on its phosphorylation, specifically, phosphorylation is reducing this activity. Is important to note that the last two lanes of figure 38-A and figure 39, show that the substitution of S9 and T14 is not generating conformational changes that affect the activity of the protein.

This allows to speculate that *in vivo*, maybe Pcl1 phosphorylation is inhibiting the autoubiquitylation activity of Dma1, acting as a positive signal without which, Dma1 autoubiquitination increase. These results are supported by the fact that in mammals, Chfr is also controlled by autoubiquitination depending on which phase of the cell cycle are passing (Kim et al. 2011b). Also, phosphorylation of Chfr has been demonstrated both *in vitro* and *in vivo* (Shtivelman 2003) and has been linked to its phosphorylation status (Kim et al. 2011b) but who is phosphorylating Chfr is currently unknown.

The immunodetection showed in figure 42 confirms that both *pcl1Δpcl2Δ* or *pho85Δ* have fewer amount of protein, reinforcing the idea that phosphorylation of Pho85 is helping to keep the amount of Dma1 through reduction its autoubiquitination activity. The differences are greater when cells are synchronized in G<sub>1</sub>, this could be because the effect of the phase really depends on the cycle stage and because all the cells are synchronized, the differences are easily observed. Even, it is observed that as the cycle progresses, Dma1 levels increase, but the difference between the two strains is maintained throughout the sampling.

It was expected to observe a relationship between the amount of Pcl1 and Dma1: if phosphorylation serves to decrease the autoubiquitylation of Dma1 and increase its quantity, it is expected that when Pcl1 peaks in G<sub>1</sub>, the same will happens with Dma1. But the experiment of figure 42 does not show that, in fact it seems that the opposite idea is observed: at time 60, when there Dma1 is increased, then Pcl1 is almost completely

degraded. The explanation for this result could be founded in a recent article published by this group in which Dma1 describes as the E3 ligase of Pcl1 (Hernandez-Ortega et al. 2012).

The model of figure 47 describes this dual interaction as follows: Dma1 maintains relatively constant levels throughout the cycle. When cells cross START, starts the transcriptional wave of various cyclins, which needs to be properly destroyed in order to progress in time between phases. Dma1 ensures destruction of Pcl1 (Hernandez-Ortega et al. 2012) when increases the transcription of Pcl1, this generates a mechanism in which the E3 is stabilized by phosphorylation, in order to regulate the amount Pcl1. So, is the cyclin which promotes its own degradation activating its E3.

Obviously, this does not seem to be the only system that is controlling the amount of this E3 because when Pcl1 or Pho85 are no present in cells, Dma1 is still present, allowing cells to reach a minimal amount of this protein. This indicates that modulation of Dma1 amount is not only dependent on Pho85-Pcl1 system. What seems clear is that Dma1 could be involved in nutrient control because its amount is affected in glucose absence, this differences are also observed when cells grow exponentially in YPD or MMC. It has also been described that the relevance of Pcl1 is in the situation of nutrient scarcity, in such situation the amount of Pcl1 increase (Hernandez-Ortega et al. 2012) which is consistent with the observation that Dma1 is reduced in the same situation.

The previous evidences presented in this thesis raises many questions and could indicate a possible field of work to clarify the specific actions that Pho85 is doing in a cell cycle phase so full of barriers and quality control: the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle.

## ANEXOS

---



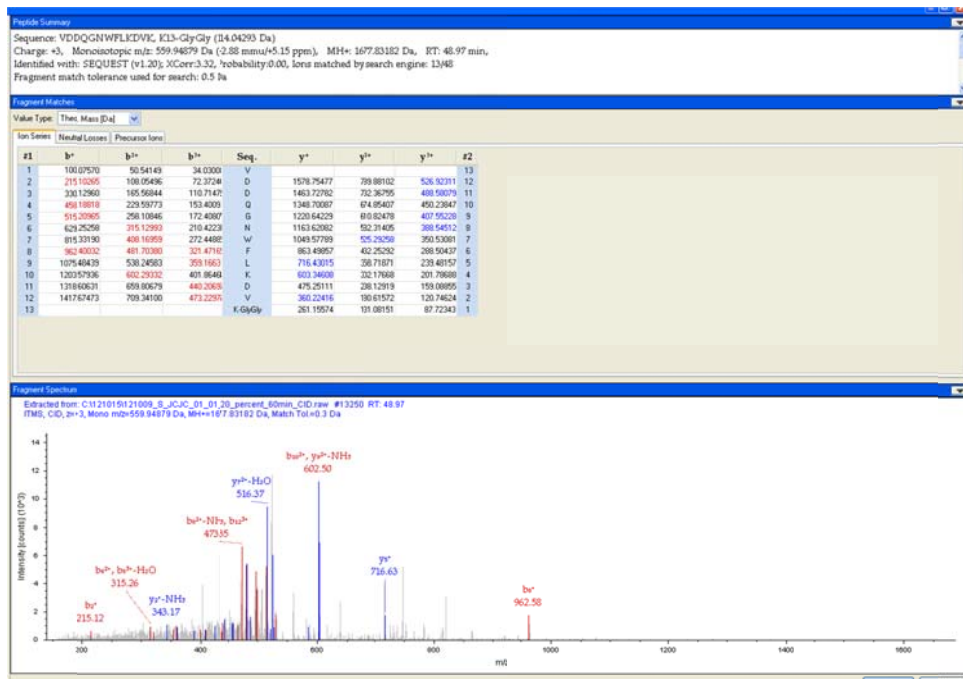
ANEXO I:

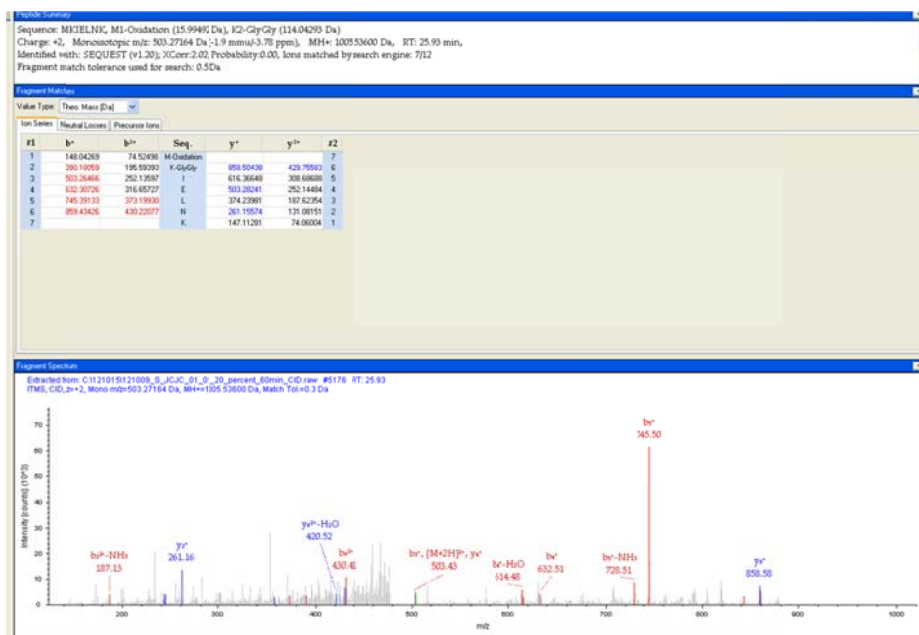
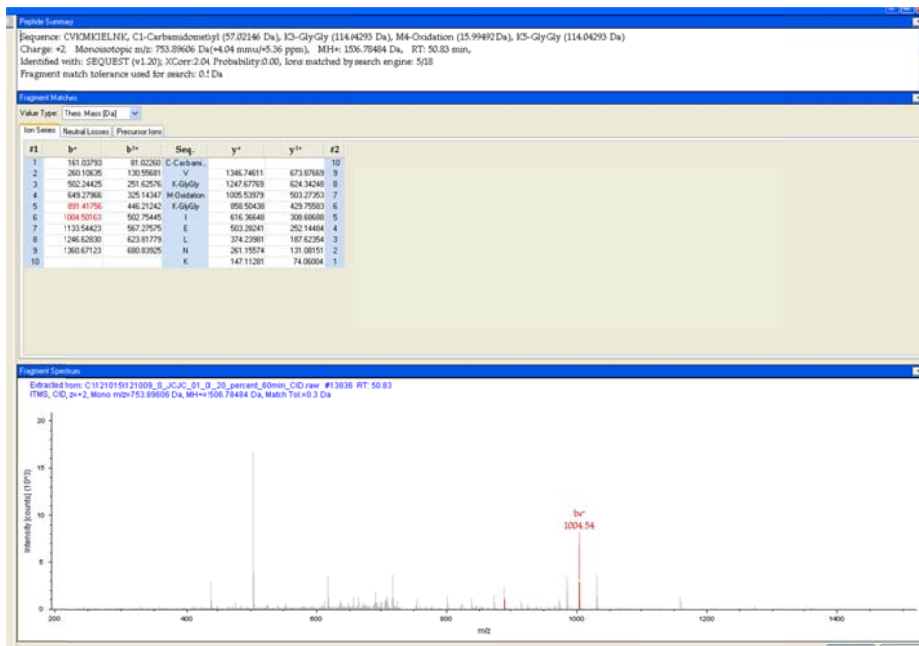
---

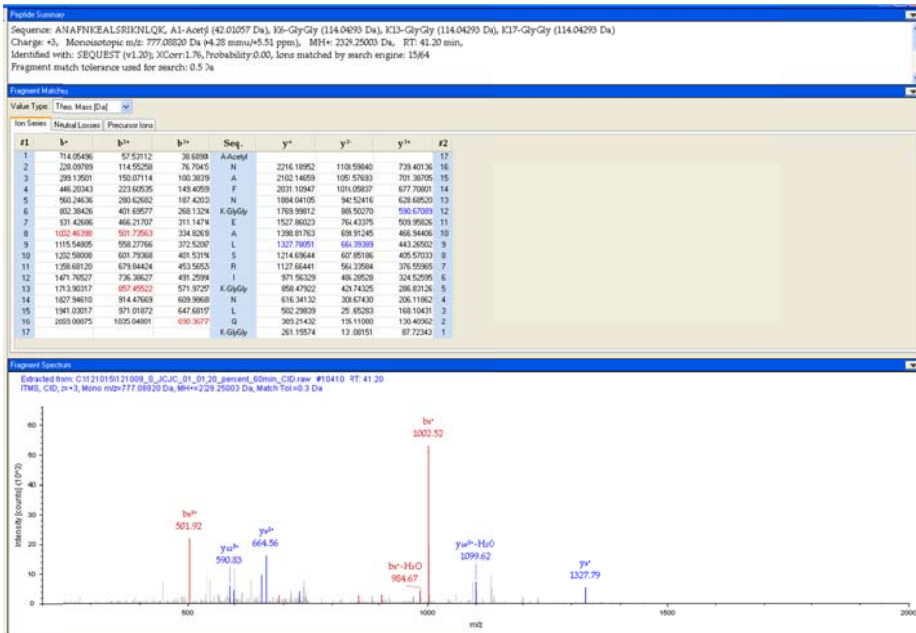
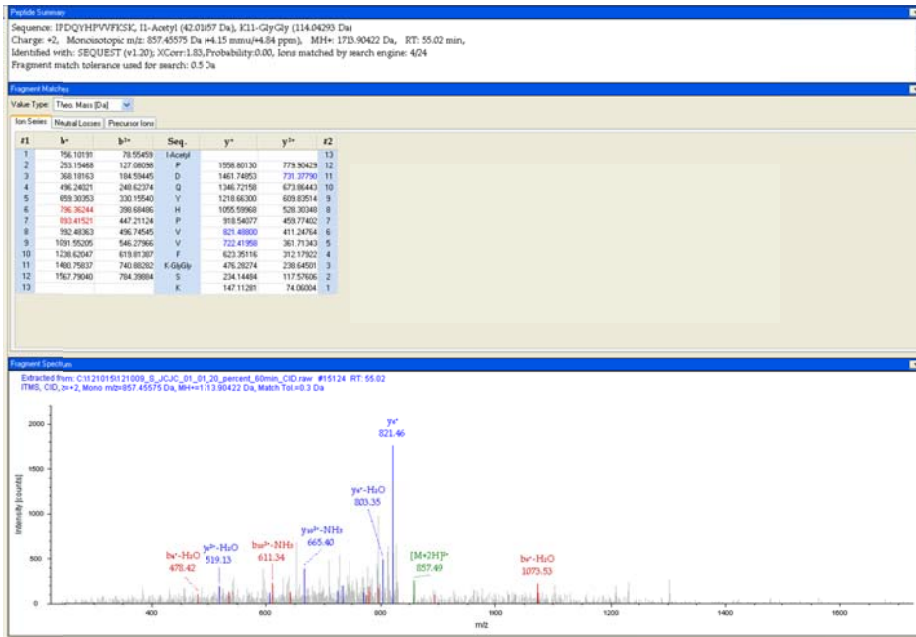
ESPECTROS DE PROTEÓMICA  
UBIQUITINACIÓN DE DMA1

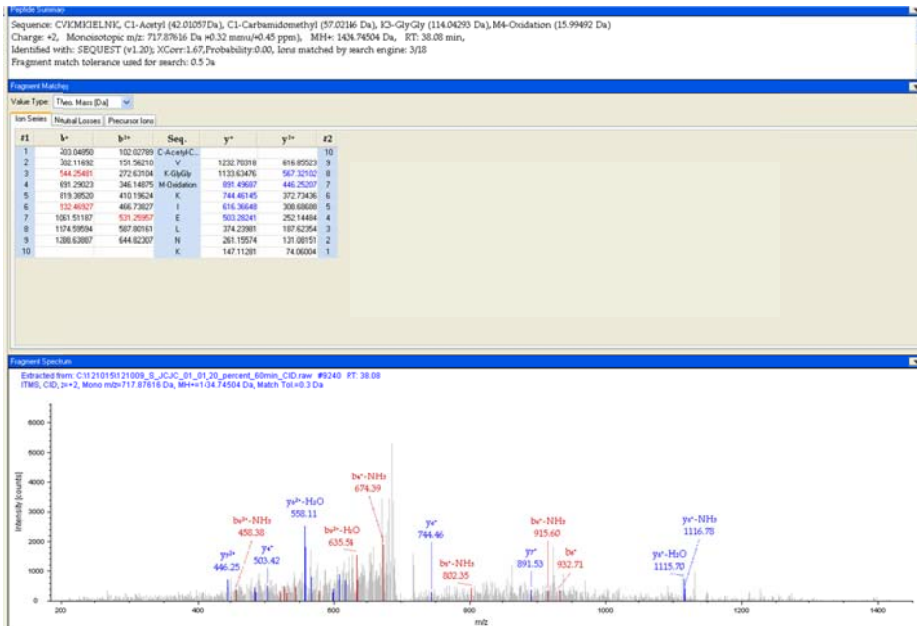
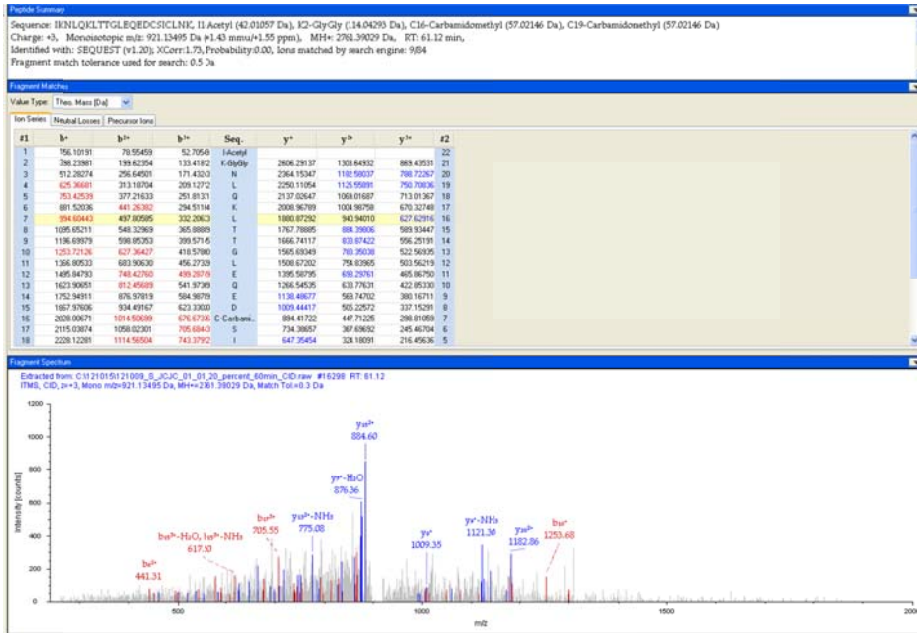


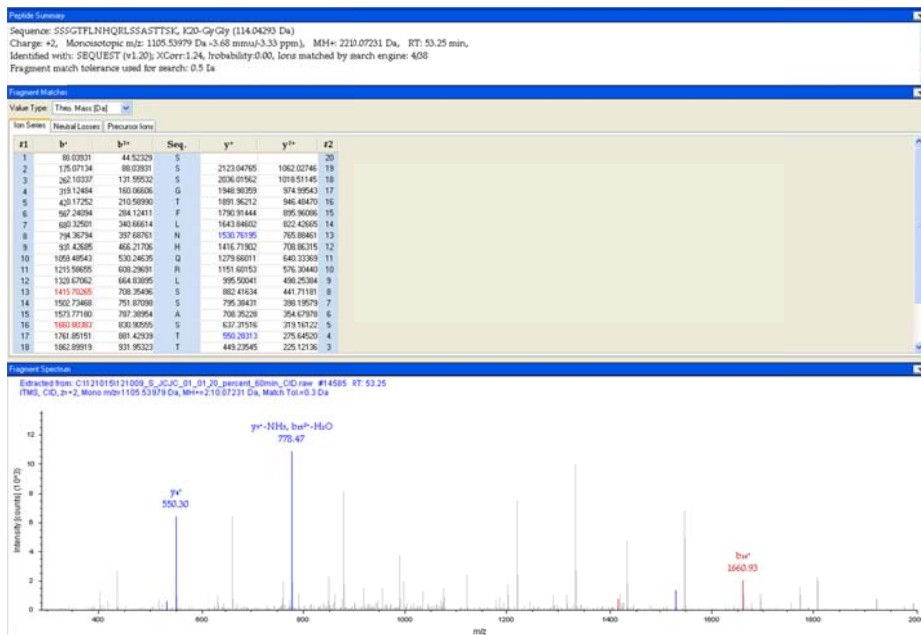
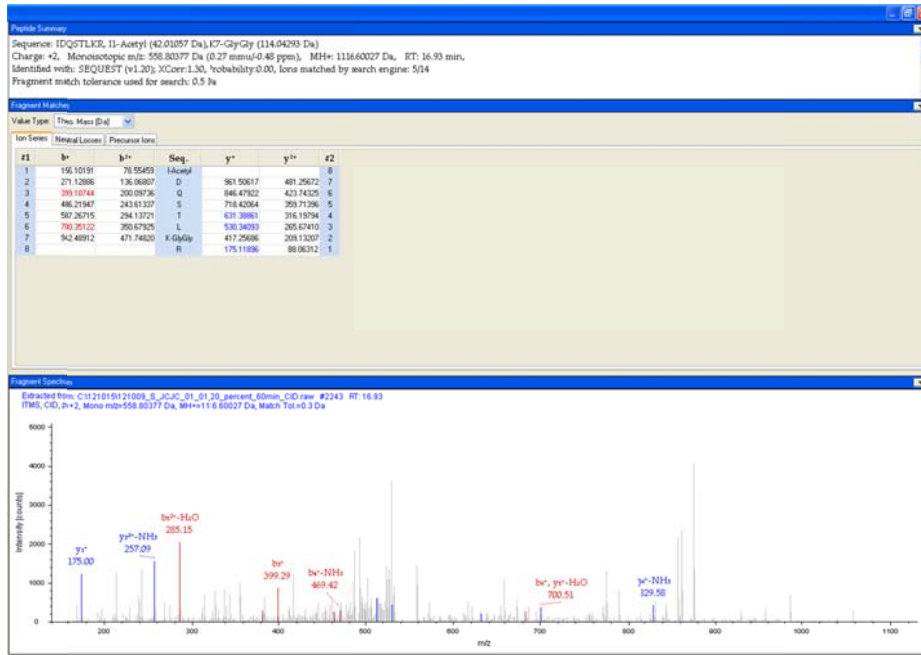
Accession	Score	Coverage	# Unique Peptides	# PSMs	Area	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
YHR115C	134,34	58,17	29	50	3,382E8	416	46,1	6,79











ANEXO II:

---

PUBLICACIONES



## Phosphate-Activated Cyclin-Dependent Kinase Stabilizes G<sub>1</sub> Cyclin To Trigger Cell Cycle Entry

S. Menoyo, N. Ricco, S. Bru, S. Hernández-Ortega, X. Escoté, M. Aldea and J. Clotet  
*Mol. Cell. Biol.* 2013, 33(7):1273. DOI:  
10.1128/MCB.01556-12.  
Published Ahead of Print 22 January 2013.

---

Updated information and services can be found at:  
<http://mcb.asm.org/content/33/7/1273>

---

*These include:*

### REFERENCES

This article cites 49 articles, 16 of which can be accessed free at: <http://mcb.asm.org/content/33/7/1273#ref-list-1>

### CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), [more»](#)

---

---

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>  
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

---



# Phosphate-Activated Cyclin-Dependent Kinase Stabilizes G<sub>1</sub> Cyclin To Trigger Cell Cycle Entry

S. Menoyo,<sup>a</sup> N. Ricco,<sup>a</sup> S. Bru,<sup>a</sup> S. Hernández-Ortega,<sup>a</sup> X. Escoté,<sup>b</sup> M. Aldea,<sup>c</sup> J. Clotet<sup>a</sup>

Departament de Ciències Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Catalunya, Spain<sup>a</sup>; Endocrinology and Diabetes Unit, Joan XXXIII University Hospital, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Catalunya, CIBERDEM, Spain<sup>b</sup>; Institut de Biologia Molecular de Barcelona, CSIC, Barcelona, Catalunya, Spain<sup>c</sup>

**G<sub>1</sub> cyclins, in association with a cyclin-dependent kinase (CDK), are universal activators of the transcriptional G<sub>1</sub>-S machinery during entry into the cell cycle. Regulation of cyclin degradation is crucial for coordinating progression through the cell cycle, but the mechanisms that modulate cyclin stability to control cell cycle entry are still unknown. Here, we show that a lack of phosphate downregulates Cln3 cyclin and leads to G<sub>1</sub> arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. The stability of Cln3 protein is diminished in strains with low activity of Pho85, a phosphate-sensing CDK. Cln3 is an *in vitro* substrate of Pho85, and both proteins interact *in vivo*. More interestingly, cells that carry a *CLN3* allele encoding aspartic acid substitutions at the sites of Pho85 phosphorylation maintain high levels of Cln3 independently of Pho85 activity. Moreover, these cells do not properly arrest in G<sub>1</sub> in the absence of phosphate and they die prematurely. Finally, the activity of Pho85 is essential for accumulating Cln3 and for reentering the cell cycle after phosphate refeeding. Taken together, our data indicate that Cln3 is a molecular target of the Pho85 kinase that is required to modulate cell cycle entry in response to environmental changes in nutrient availability.**

When environmental conditions change, *Saccharomyces cerevisiae*, like other organisms, takes several coordinated decisions about growth, cell division, and maintaining homeostasis. Nutrient status is among the most important environmental conditions that must be accurately sensed and responded to in order to ensure cell survival. In the absence of nutrients, cells arrest in G<sub>1</sub> phase, and this regulation of cell cycle becomes essential in the adaptation process. However, nothing is known about how nutrients impinge on the cell cycle machinery (1).

In budding yeast, the commitment to a new round of cell division takes place in late G<sub>1</sub>, at a point called Start, where transcriptional activation of more than 200 G<sub>1</sub>-specific genes occurs (reviewed in reference 2). This includes the transcription of major cell cycle regulators, including the G<sub>1</sub> cyclins Cln1, Cln2, Clb5, and Clb6, as well as numerous genes with functions related to DNA metabolism, budding, spindle pole body duplication, and cell wall synthesis (3, 4). Many of these transcribed genes are targets of the heterodimeric transcription factors SBF and MBF, each of which contains a Swi6 subunit and a distinct DNA-binding subunit: Swi4 and Mbp1, respectively (5). It is interesting to note that, when SBF and MBF are poised at their target promoters during much of G<sub>1</sub> phase, they cannot activate transcription; rather, they repress it (6, 7). To become activators at Start, they need an upstream element: the Cdc28/Cln3 complex.

Cdc28 is a cyclin-dependent kinase (CDK) that governs all of the cell cycle progression, and Cln3 is a highly unstable cyclin that remains fairly constant throughout the cell cycle (8, 9). When Cdc28 is associated with Cln3 cyclin, it unfolds the activation of transcriptional G<sub>1</sub> machinery, chiefly through two mechanisms: phosphorylation of the Whi5 repressor (and presumably of Swi6) at multiple residues (10–12) and control of the Stb1 dual protein and the histone deacetylases (13). In addition to Cln3, other elements involved in G<sub>1</sub> transcription firing have recently been demonstrated: for example, a positive-feedback mechanism involving Cln1 and Cln2 could reinforce SBF/MBF activation (14). At the end of G<sub>1</sub>, the rise in Cln/Cdc28 activity results in the phosphor-

ylation and targeting for degradation of Sic1, an inhibitor of the S-phase cyclins, thereby enabling robust entry into S-phase (15).

Nutrients are important trophic factors that control the passage through Start by activating several signaling pathways, including the protein kinase A and Snf1 pathways, which positively regulate cell proliferation in response to glucose availability (16), and the TORC1 pathway, which controls the cell cycle according to nitrogen levels (17). Consequently, inactivation of any of three major pathways results in a cell cycle blockade and, in other typical phenotypes, of the G<sub>0</sub>-like growth arrest program, even in the presence of other abundant nutrients. Due to its role as the most upstream activator, Cln3 has emerged as a good target for these pathways. Indeed, it has been demonstrated that this cyclin becomes less stable under nitrogen deprivation, although the mechanism(s) underlying this effect remains obscure (18).

Phosphate is sensed by another signaling pathway, the PHO pathway, which has progressively been uncovered by the O'Shea group (19). The central element of this pathway is another CDK: Pho85, which associates with a family of 10 cyclins, each of which can direct Pho85 to different substrates (for a review, see reference 20). Pho80 is the main cyclin of the PHO pathway, which controls phosphate homeostasis, and Pho81 is the corresponding CDK inhibitor (21). The phosphate sensor that controls this pathway is still unknown; however, a low-P<sub>i</sub> signal is known to be transmitted via certain inositol polyphosphate (IP) species (e.g., heptakisphosphate [IP<sub>7</sub>]), which are synthesized by Vip1 IP<sub>6</sub> kinase. IP<sub>7</sub> appar-

Received 17 November 2012 Returned for modification 30 December 2012

Accepted 11 January 2013

Published ahead of print 22 January 2013

Address correspondence to J. Clotet, jclotet@esc.uic.es.

S.M. and N.R. contributed equally to this work.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/MCB.01556-12

ently interacts noncovalently with the Pho80/Pho85/Pho81 complex and induces additional interactions between Pho81 and Pho80/Pho85, preventing substrates from accessing the active site of the kinase (19, 22). Thus, the ternary complex Pho80/Pho81/Pho85 is active in rich medium but becomes inactive upon phosphate starvation, leading to the migration of unphosphorylated Pho4 transcription factor into the nucleus and enabling the expression or repression of *PHO* genes (21, 23, 24). This transcriptional response ultimately results in maintenance of the internal phosphate levels.

Besides being constitutively associated with Pho80, Pho85 is also bound to other cyclins (e.g., Pcl1, Pcl2, and Pcl9) (20). In fact, the four Pho85 complexes should be considered different enzymes: they recognize different substrates, they are localized in different subcellular regions, and the respective activities of the Pcl1/Pho85, Pcl2/Pho85, and Pcl9/Pho85 complexes are not regulated by external phosphate. When Pho85 is associated with these Pcl cyclins, it cooperates with Cdc28 in specific morphogenic events during the  $G_1$ -S transition.

It is logical to wonder whether Pho80/Pho85 complexes could also help control the cell cycle. Indeed, there is evidence that Pho80/Pho85 phosphorylates and inhibits Rim15, a PAS kinase that promotes the entry into the  $G_0$  program in stationary cells (25), although whether this mechanism is involved in cell cycle-induced arrest is unknown. In addition, it has been demonstrated that Pho80/Pho85 is essential to restart the cell cycle after  $G_1$  arrest due to DNA damage (26), suggesting that the Pho85 activity is essential when Cdc28 activity is absent (20).

Here, we demonstrate that the lack of phosphate leads to downregulation of Cln3 protein levels and to  $G_1$  arrest. Interestingly, neither effect is observed in cells that overexpress Pho85 or in cells that cannot inhibit it (i.e., *vip1* $\Delta$  or *pho81* $\Delta$  cells). In accordance, we also demonstrate that Cln3 is less stable in strains with low Pho85/Pho80 activity and that it is phosphorylated *in vitro* by Pho85/Pho80 complexes at S449 and T520. More interestingly, we report that cells carrying a *CLN3* allele encoding aspartic acid substitutions at these sites maintain high levels of Cln3 independently of Pho85 activity. Accordingly, the nonphosphorylatable alanine mutant displays the same low levels as the *pho85* $\Delta$  mutant. Finally, we show that when nutrient levels drop, downregulation of Cln3 is essential to establish proper  $G_1$  arrest and that once these levels recuperate, activation of Pho85 is essential to restart the cell cycle from the  $G_0$  state. Together, our findings indicate that phosphate levels regulate the amount of Cln3 by controlling Pho85/Pho80 kinase activity.

## MATERIALS AND METHODS

**Strains.** The strains used are indicated in Table 1. The *pho85-as* strain (YAM67, which carries an analog-sensitive allele of *PHO85*) was provided by Erin O'Shea and was used for inhibition of Pho85 in the presence of the inhibitor 1-Na PP1; (4-amino-1-tert-butyl-3-(1'-naphthyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine) kindly provided by K. Shokat as described previously (27). The Pho85 inhibition was confirmed by following the entry of Pho4-green fluorescent protein (GFP) into the nucleus.

**Plasmids.** The plasmids used in this work are listed in Table 2. *CLN3-MYC* was expressed from its own promoter in the centromeric plasmid pRS416; this plasmid expresses *CLN3* at a level similar to the expression of the genomic tagged version. To express *MYC*-tagged mutated versions of *CLN3*, we replaced S449 and T520 with alanine or used the substitutions I448D S449D and T519 T520D to mimic the double-negative charge of the phosphate group. *PHO85* and Pho80 were overexpressed under the control of the *GALI* promoter in the pEG(KG) plasmid. YAM91 carries a

plasmid with *CLN3* hemagglutinin (HA)-tagged protein lacking the PEST sequence of *CLN3* (the *cln3-1-HA* allele). The *CLN2* open reading frame (ORF) was placed under the control of the *Schizosaccharomyces pombe adh1* promoter in YCplac22 (28), resulting in plasmid pCM64. Recombinant proteins were expressed from the pGEX6P1 plasmid. Due to its toxicity in *Escherichia coli* cells, full-length Cln3 could not be expressed, and the C-terminal half of Cln3 (from Met 347 to Arg 580) was cloned into the BamHI site of pGEX6P1 (pJC1154).

**Growth conditions.** Cells were grown in either YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, and 2% glucose) or complete synthetic dextrose (SD) medium (0.67% yeast nitrogen base and 2% glucose) containing amino acids for auxotrophic requirements (15  $\mu$ g/ml leucine, 5  $\mu$ g/ml histidine, and 10  $\mu$ g/ml tryptophan).

Yeast nitrogen base without phosphate was used as recommended by the manufacturer (MP Biomedicals) to prepare SD medium without a phosphate source. Phosphate deprivation experiments were done with cells growing exponentially in SD for 14 to 16 h until they reached an optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ ) of 0.3 to 0.4, at which point the cells were collected by filtration and, after a quick wash, resuspended at the same cellular concentration in prewarmed medium lacking the phosphate source, as previously described (18). The nitrogen deprivation experiment was performed under the same conditions using a yeast nitrogen base without ammonium sulfate (Difco).  $\alpha$ -Factor cell synchrony experiments were done as previously described (29).

**DNA content, cell volume, cell number, and budding index measurements.** Approximately  $1 \times 10^7$  cells were collected and processed as described previously (30). DNA was stained with SYBR green and then analyzed in a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson). Cell number and volume were quantified using a Scepter cell counter (Millipore). Budding was analyzed microscopically by scoring a minimum of 200 cells.

**Immunoblot analysis.** The primary anti-Myc or anti-HA monoclonal antibodies (kindly provided by F. Posas) were used at 1:100 and followed by anti-mouse-horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse secondary antibody (1:20,000), using SuperSignal West Femto chemiluminescent substrate (Thermo Scientific). Anti-glucose-6-phosphate dehydrogenase (anti-G6PDH; Sigma) was used at 1:500.

**Coimmunoprecipitation of PHO85-TAP and CLN3-MYC.** Exponential-phase yeast cells were harvested (500 ml at an  $OD_{600}$  of 0.7) and resuspended in 5 ml of cold extraction buffer A (50 mM Tris, pH 8, 15 mM EDTA, 15 mM EGTA, 0.1% Triton X-100) containing protease inhibitors (2  $\mu$ g/ml each of pepstatin, leupeptin, phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], and benzamide) and phosphatase inhibitors (10 mM sodium orthovanadate and 250 mM  $\beta$ -glycerophosphate). Cells were ruptured by vortexing with glass beads, and the resulting extract was centrifuged at 4°C for 1 h at 12,000 rpm. Amounts of 3 mg of crude extracts were incubated for 2 h at 4°C with 150  $\mu$ l of IgG-Sepharose beads (Amersham Biosciences). After washing with extraction buffer, the proteins bound to the beads were resuspended in 30  $\mu$ l of SDS-PAGE sample buffer, heated at 95°C for 5 min, and loaded onto SDS-PAGE gels.

**Recombinant protein purification.** For expression of glutathione S-transferase (GST) or GST fusion proteins, *Escherichia coli* strain BL21(DE3) (Stratagene) was transformed with the corresponding plasmids. Protein expression was induced with 1 mM isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside for 3 h at 25°C. Cells were collected by centrifugation, resuspended in 600  $\mu$ l of phosphate-buffered saline with 0.1% Triton X-100 (PBS-T) supplemented with a protease inhibitor mixture (Roche Applied Science), and subjected to mechanical rupture. The cell debris was removed by centrifugation, and the supernatants were purified using glutathione-Sepharose column chromatography, as described in the manufacturer's protocol. After incubation for 2 h at 4°C with rotation, the beads were collected by centrifugation (1,000 rpm for 1 min at 4°C) and washed with PBS-T three times. The elution was performed by adding 10 mM glutathione.

**Kinase assays.** Kinase assays were performed essentially as described previously (31). GST-Pho85 and GST-Pho80 were purified from bacteria as described above. A fragment of GST-Cln3 was expressed (plasmid

TABLE 1 Yeast strains used in this study

Strain	Background	Genotype	Source
BY4741	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ200 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
YNR55	BY4741	<i>CLN3-MYC-KanMX</i>	This study
YAM78	BY4741	<i>pho85Δ::LEU2</i>	This study
YAM78	BY4741	<i>pho85Δ::LEU2 CLN3-MYC-KanMX</i>	This study
YAM113	BY4741	<i>pRS416-CLN3-MYC</i>	This study
YAM114	BY4741	<i>pho85Δ::LEU2 pRS416-CLN3-MYC</i>	This study
YAM115	BY4741	<i>pcl1Δ::LEU2 pRS416-CLN3-MYC</i>	This study
YAM119	BY4741	<i>pcl2Δ::KanMX pcl1Δ::LEU2 pRS416-CLN3-MYC</i>	This study
YAM116	BY4741	<i>pcl6Δ::KanMX pRS416-CLN3-MYC</i>	This study
YAM117	BY4741	<i>pcl7Δ::KanMX pRS416-CLN3-MYC</i>	This study
YAM118	BY4741	<i>pcl8Δ::KanMX pRS416-CLN3-MYC</i>	This study
YAM99	BY4741	<i>pcl9Δ::KanMX pRS416-CLN3-MYC</i>	This study
YAM111	BY4741	<i>pho80Δ::LEU2 pRS416-CLN3-MYC</i>	This study
YPC702	BY4741	<i>SWI6-TAP-KanMX</i>	This study
YNR11	BY4741	<i>WHI5-TAP-KanMX</i>	This study
YAM150	BY4741	<i>vip1Δ::KanMX pRS416-CLN3-MYC</i>	This study
YNR82	BY4741	<i>pho81Δ::LEU2 CLN3-MYC-KanMX</i>	This study
YAM63	BY4741	<i>CLN3-MYC-KanMX pEG(KT)-GAL-PHO85</i>	This study
YAM91	BY4741	<i>pRS416-cln3-1-HA</i>	This study
YAM92	BY4741	<i>pho85Δ::LEU2 pRS416-CLN3-1-HA</i>	This study
YAM151	BY4741	<i>ubc4Δ::LEU2 CLN3-MYC-KanMX</i>	This study
YAM142	BY4741	<i>pho85Δ::URA ubc4Δ::LEU2 CLN3-MYC-KanMX</i>	This study
YAM146	BY4741	<i>PHO85-TAP-KanMX pRS416-CLN3-MYC</i>	This study
YNR13	BY4741	<i>PHO85-TAP-KanMX</i>	This study
YAM113	BY4741	<i>pRS416-CLN3-MYC</i>	This study
YAM163	BY4741	<i>pRS416-CLN3-(T520A S449A-MYC)</i>	This study
YAM149	BY4741	<i>pho85Δ::LEU2 pRS416-CLN3-(T519D T520D I448D S449D-MYC)</i>	This study
YAM103	BY4741	<i>pho80Δ::LEU2</i>	This study
YAM45	BY4741	<i>pho81Δ::LEU2</i>	This study
YNR46	BY4741	<i>vip1Δ::KanMX</i>	This study
YPC631	BY4741	<i>cln3Δ::KanMX</i>	This study
YSH10	BY4741	<i>atg1Δ::LEU2 CLN3-MYC-KanMX</i>	This study
YSH11	BY4741	<i>pho85Δ::URA atg1::LEU2 CLN3-MYC-KanMX</i>	This study
YAM67	K699	<i>pho85Δ::LEU2 ADE2 PHO4-GFP trp1::PHO85(F82G)-TRP1</i>	E. O'Shea
YAN32	W303	<i>CLN2-HA-URA3 SIC1-MYC-KanMX CLB5-TAP-LEU2</i>	F. Posas

pJC1154) and purified from bacteria. Cdc28-TAP was purified using IgG Sepharose beads (Sigma). Phosphorylated proteins were detected by using the Pro-Q diamond phosphoprotein gel stain kit (Invitrogen).

**Viability assays.** The viability experiments were done as described in reference 32. Stationary-phase cells were diluted, plated in YPD, and incubated for 2 days.

**RNA isolation and analysis.** Cells were harvested and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Total RNA was isolated by hot phenol extraction and quantified spectrophotometrically. An amount of 2  $\mu\text{g}$  of total RNA was incubated

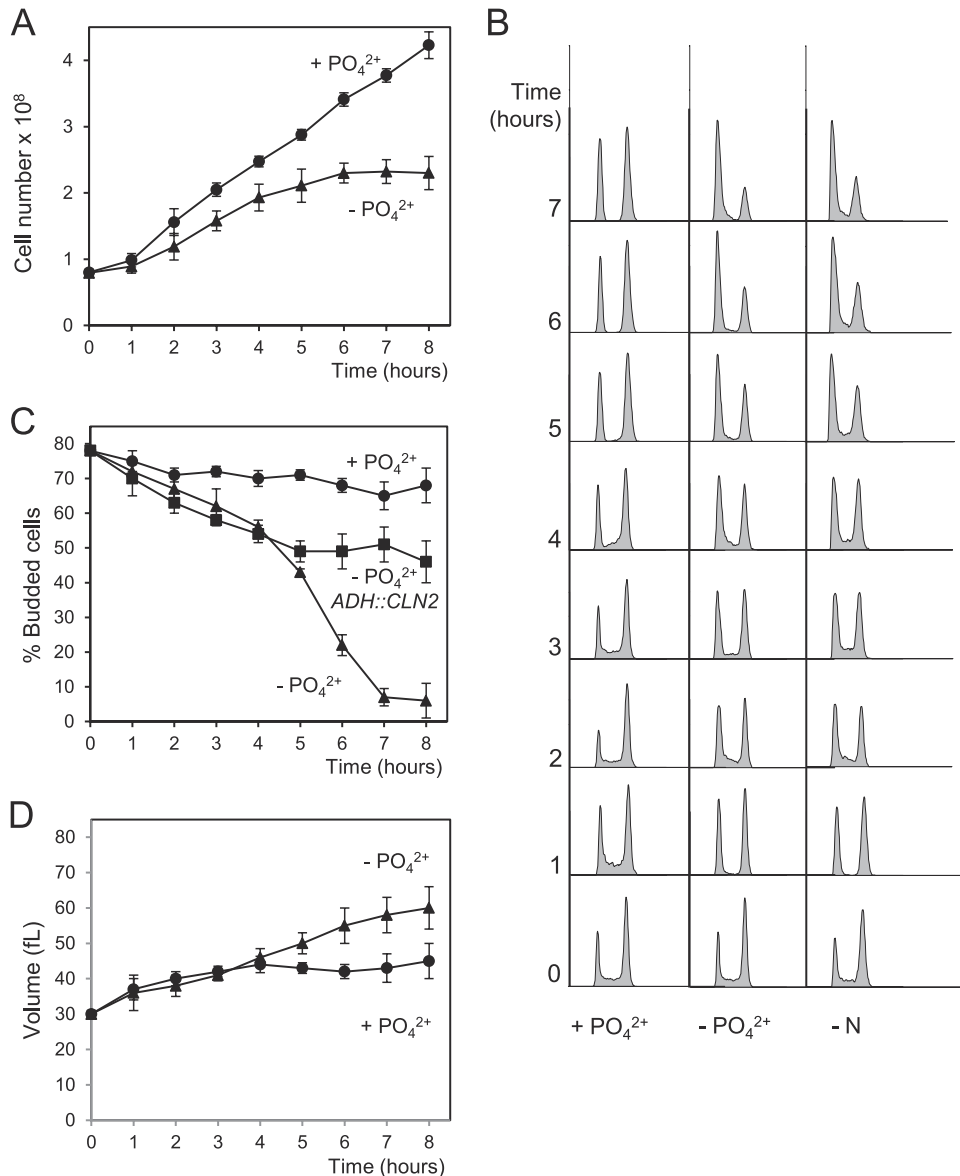
with DNase and reverse transcribed using Quanta qScript cDNA supermix following the manufacturer's instructions. The cDNA was subjected to reverse transcription (RT)-PCR on a C1000 thermal cycler-CFX96 real-time PCR system, and expression was normalized to that of *CDC28*.

## RESULTS

**The  $G_1$  arrest caused by phosphate depletion may involve active mechanisms to downregulate Cdc28-Cln activity.** Nutrients are

TABLE 2 Plasmids used in this study

Name	Relevant characteristics	Reference or source
pCM64	YCplac22- <i>ADHp-CLN2</i>	14
pJC1065	pEG(KG)- <i>PHO85</i> (cloned in BamHI)	This study
pJC1437	pEG(KG)- <i>PHO80</i> (cloned in BamHI)	This study
pJC1280	pRS416- <i>CLN3-MYC</i>	This study
pJC1161	pGEX6P1- <i>PHO80</i> (cloned in BamHI)	This study
pJC1164	pGEX6P1- <i>PHO85</i> (cloned in BamHI)	This study
pJC1154	pGEX6P1- <i>CLN3</i> (from nucleotide 1038 to stop codon)	This study
pJC1448	pGEX6P1- <i>CLN3</i> (from nucleotide 1038 to stop codon) with the 2 putative Pho85 sites (S449 and T520) mutated to Asp	This study
pJC1456	pGEX6P1- <i>CLN3</i> (from nucleotide 1038 to stop codon) with the 2 putative Pho85 sites (S449 and T520) mutated to Ala	This study
pJC1449	pGEX6P1- <i>CLN3</i> (from nucleotide 1159 to stop codon) with the 8 putative Cdc28 sites (T420, S455, S462, S466, S466, T478, S514, and T517) mutated to Ala	This study

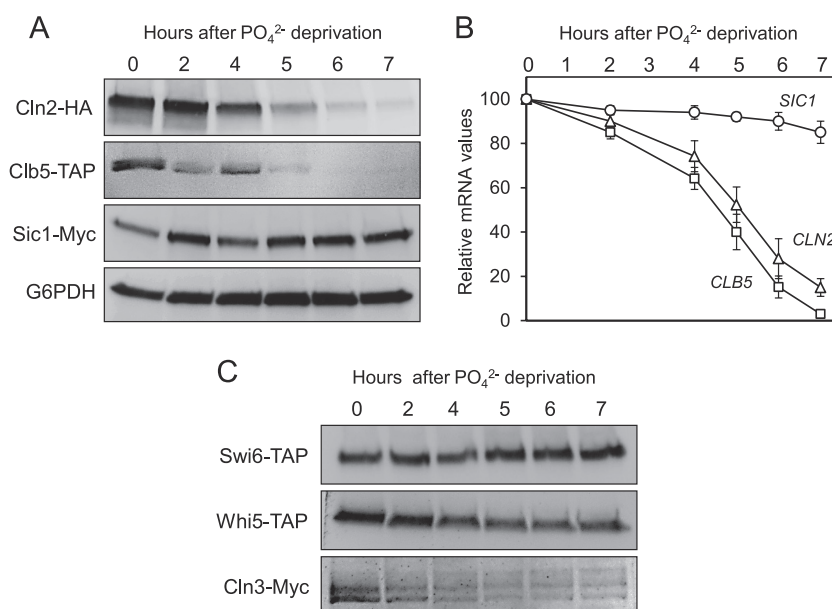


**FIG 1** Phosphate deprivation leads to G<sub>1</sub> arrest. Wild-type cells were grown exponentially in synthetic complete medium. At time zero, cells were harvested and incubated either in the same medium (+PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) or in a medium without phosphate (-PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). At the indicated times, samples were collected and then subjected to several analyses: total cell number (A), DNA content (B), percentage of budding (C), and cell volume (D). (B) The DNA contents of wild-type cells incubated in a medium without a nitrogen source (-N) are shown. (C) The percentages of budding of wild-type cells carrying a centromeric plasmid with the *CLN2* gene expressed from an *ADH* promoter are shown. Data  $\pm$  standard deviations from three independent experiments are shown.

important trophic factors in all organisms. When deprived of a nitrogen or carbon source, yeast cells use accumulated reserves to complete the current cycle and arrest at the following G<sub>1</sub> phase. We sought to determine whether phosphate starvation also provokes G<sub>1</sub> arrest. To this end, we transferred exponentially growing yeast cells from complete medium to a medium lacking a phosphate source. The rate of division declined slowly over the next 3 h (Fig. 1A) and, finally, the cells arrested in G<sub>1</sub>, as indicated by their DNA content and budding index (Fig. 1B and C). Interestingly, the cell cycle arrest was comparable to that observed in the absence of nitrogen (Fig. 1B) and was not merely a consequence of the inability to meet the growth requirements of the G<sub>1</sub>/S transition, as suggested by the fact that the cell volume still increases under phosphate deprivation (Fig. 1D).

Considering that cyclins are fundamental to progression through G<sub>1</sub>, we asked if the arrest caused by phosphate deprivation requires downregulation of the activity of G<sub>1</sub> cyclins. Cells expressing *CLN2* from a constitutive promoter continue to grow in size (not shown) and, more importantly, cells cross Start despite the absence of phosphate, as deduced from the budding index (Fig. 1C). This indicates that the downregulation of Cln activity may be essential in order to achieve a proper G<sub>1</sub> arrest under phosphate-fasting conditions. Taken together, these results strongly suggest that the G<sub>1</sub> arrest caused by phosphate deprivation is mediated by specific mechanisms, some of which involve the downregulation of Cln proteins, and cannot be explained simply as a passive consequence of a growth arrest that would prevent cells from reaching the critical cell mass necessary to bud and to initiate S phase.





**FIG 2** Phosphate deprivation leads to the downregulation of Cln3p. (A) Strain YAN32 (triple tagged: Cln2-HA, Clb5-TAP, and Sic1-Myc) was grown exponentially in synthetic complete medium. At time zero, the cells were harvested and incubated in phosphate ( $PO_4^{2-}$ )-free medium. At the indicated times, samples were recovered and then analyzed for different proteins by immunoblotting using specific antibodies. (B) The wild-type strain was treated and sampled as described in Materials and Methods. Transcripts were analyzed using RT-PCR with specific primers. Data  $\pm$  standard deviations from three independent experiments are shown. (C) Strains YPC702 (*SWI6-TAP*), YNR11 (*WHI5-TAP*), and YNR55 (*CLN3-MYC*) were treated, sampled, and analyzed as described for panel A.

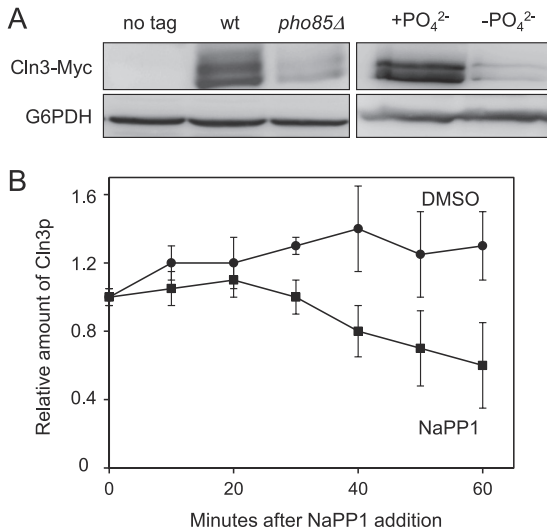
**External phosphate controls the levels of Cln3 protein.** Since constitutive expression of Cln2 could partially reverse the blockade in  $G_1$ , we examined whether the absence of phosphate could affect the levels of proteins controlling the  $G_1/S$  transition. The results in **Figure 2A** clearly show that the protein levels of Cln2 and Clb5 (essential for budding and S-phase entry) decrease after 4 h of growth in phosphate-free medium, whereas the levels of the protein Sic1 (essential for arresting the cell cycle before S phase) remain constant. We then analyzed the mRNA levels of all these genes (**Fig. 2B**), finding that the mRNA of *CLN2* and *CLB5* were also progressively depleted, whereas the transcripts of *SIC1* remained constant. These results suggest that the absence of phosphate may inhibit the transcription of genes required for the  $G_1/S$  transition.

The  $G_1/S$  transcriptional wave is controlled by the SBF and MBF factors, which may be regulated by phosphate levels. As observed from the results in **Figure 2C**, the protein levels of Swi6 are not affected during the first 6 h after phosphate deprivation (nor are those of Swi4 or Mbp1 [not shown]), thereby excluding the possibility that SBF and MBF are controlled at the expression level. Whi5 and Cln3 are known to play a key role in the activation of SBF and MBF complexes in late  $G_1$  (10). The results in **Figure 2C** show that, after 3 h of phosphate depletion, the amount of Cln3 protein decreases rapidly, while the levels of Whi5 repressor remain fairly constant. These results support the idea that phosphate deprivation downregulates SBF and MBF activity as a result of the loss of Cln3. Considering that a triple *cln* mutant cannot undergo the  $G_1/S$  transition unless Sic1 is removed (33), we propose here that the absence of Cln proteins and the sustained presence of Sic1 may explain the  $G_1$  arrest produced by phosphate deprivation in terms of molecular requirements.

**Pho85 activity regulates the levels of Cln3 protein.** It is

known that exogenous phosphate activates Pho85, a CDK that controls the homeostasis of phosphate, and we examined whether this kinase could also be involved in the control of Cln3 cyclin. As reflected in **Figure 3A**, *PHO85*-depleted cells growing exponentially in rich medium exhibit low levels of Cln3 protein. This decrease is very similar to that observed in wild-type cells grown in phosphate-free medium. *PHO85* gene deletion results in a broad spectrum of defects, and it is possible that our *pho85* $\Delta$  laboratory strain bears suppressor mutations that alleviate such defects. To avoid this problem, we took advantage of the *pho85-as* strain, which behaved quite similarly to wild-type cells until the specific inhibitor 1-Na PP1 was added to the culture. As observed by the results in **Figure 3B**, the addition of 1-Na PP1 to the exponentially growing cells results in a progressive depletion of Cln3 relative to the amount in control cells. The localization of Pho4-GFP is a widely used readout to evaluate Pho85 activity (27), and Cln3 starts to decrease at the same time that Pho4-GFP protein enters the nucleus (not shown). The latter result shows a good correlation between Pho85 inactivation and the reduction of Cln3 protein and suggests that Pho85 activity (rather than the physical presence of the protein itself) is a key factor controlling cellular levels of Cln3.

**Upstream elements of the PHO pathway also affect Cln3 protein levels.** Pho85 activity is controlled by external phosphate through an upstream signaling transduction pathway that has been progressively elucidated by several research groups (**Fig. 4A**) (for a review, see reference 34). The *vip1* $\Delta$  and *pho81* $\Delta$  strains are unable to respond to changes in the external concentration of phosphate and therefore, cannot inhibit Pho85 in a deprivation situation. Thus, we hypothesized that these strains could not downregulate Cln3 protein levels in response to depletion of phosphate, which we confirmed experimentally (**Fig. 4B**). Conse-



**FIG 3** Pho85 inactivation leads to downregulation of Cln3. (A) Wild-type (wt) and *pho85Δ* cells were grown exponentially in YPD and then assessed for levels of Cln3-Myc (left), and wild-type cells were grown in synthetic complete medium with (+PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) or without (-PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) phosphate (right). Samples were taken after 6 h, and levels of Cln3-Myc were monitored. (B) Cells from the YAM67 strain were incubated with either 1-Na PP1 (a specific *pho85-as* inhibitor) or drug vehicle (dimethyl sulfoxide [DMSO]). Samples were taken at the indicated times, and Cln3-Myc was analyzed by immunoblotting. Data ± standard deviations from three independent experiments are shown. Cln3p, phosphorylated Cln3.

quently, the overexpression of *PHO80* has the same effect (Fig. 4C) as the absence of the inhibitors. All these results strongly suggest that the phosphate source controls the quantity of Cln3 cyclin by modulating Pho85 activity.

Loss of a particular Pho85 cyclin can phenocopy some aspects of the phenotype of a *pho85Δ* mutant, and we decided to evaluate the levels of Cln3 protein of the different cyclin mutants. As shown by the results in Figure 4D and E, the *pho80Δ* strain is the only one that shows a reduction in the Cln3 content very similar to that observed in *pho85Δ* cells, suggesting that the effect of the CDK could be mediated by the Pho80 cyclin. This result is in agreement with the fact that the Pho80/Pho85 complexes (together with Pcl7/Pho85) are inhibited when deprived of phosphate (35), providing further evidence that such nutrients control the quantity of Cln3 by modulating the activity of Pho85 kinase.

**Pho85 affects Cln3 stability.** Pho85/Pho80 complexes control the transcription of many genes, and we reasoned that these complexes could modulate the transcription of *CLN3* in response to changes in phosphate levels. However, there are no differences in the levels of *CLN3* mRNA in wild-type cells cultured in the presence or absence of phosphate (Fig. 5A).

Likewise, we could not detect any changes in the mRNA levels of *CLN3* when comparing wild-type cells, *pho85Δ* cells, and cells that overexpress *PHO85*. Despite the similar levels of mRNA, we again confirmed the differences in Cln3 protein levels under these new experimental conditions (Fig. 5A). These results suggest that Cln3 must be downregulated by posttranscriptional mechanisms.

Next, we tested whether Pho85 activity affects the stability of Cln3 by studying the levels of Cln3 in cycloheximide-treated cells. In wild-type cells, we estimated a Cln3 half-life of 8 min (data not shown), in accordance with values reported by others (18). Un-

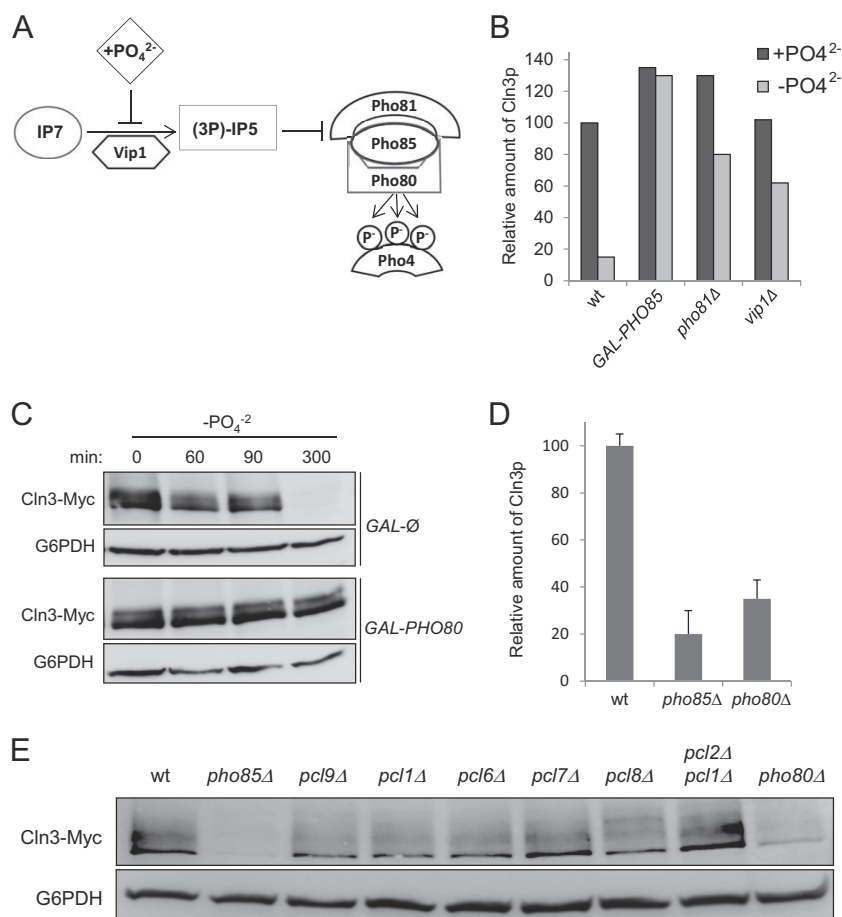
fortunately, we were unable to measure the half-life of Cln3 in the *pho85Δ* strain because of the low levels in these cells. For this reason, we decided to assess the Cln3 stability in the *pho85-as* strain in the presence or absence of the specific inhibitor (Fig. 5B). Under such conditions, the *pho85-as* strain still retains low levels of Pho85 activity but clearly exhibits an apparent reduction in the half-life of Cln3 protein (5.8 min in control cells versus 3.2 min in the presence of the inhibitor). Although this result does not exclude the existence of other regulatory mechanisms (such as the control of the translation of Cln3 mRNA), it strongly suggests that Pho85 activity increases the stability of the cyclin.

**Pho85 does not control Cln3 stability through regulation of autophagy.** It has been recently described that Pho85 negatively regulates autophagy through diverse mechanisms (36). Autophagy induces the destruction of many proteins under conditions of nutrient deprivation, and we hypothesized that Cln3 could be a likely candidate for destruction. To test this hypothesis, we quantified the Cln3 levels in a *pho85Δ* strain whose autophagy process has been abrogated (the *pho85Δ atg1Δ* strain) and found that the Cln3 protein levels still were clearly decreased (Fig. 5C). This result rules out the possibility that Pho85 controls Cln3 stability through the regulation of autophagy.

**Pho85 affects Cln3 ubiquitin-dependent degradation.** Since Cln3 is constitutively degraded by a ubiquitination-dependent mechanism (9), we decided to test whether Pho85 controls this process. We found 2 pieces of experimental evidence to support this hypothesis: (i) deletion of the PEST region in *CLN3* (the *cln3-1* allele; see the legend to Fig. 6A), which has been shown to prevent ubiquitination, also stabilizes the protein, even in the *pho85Δ* strain (Fig. 5D), and (ii) deletion of the E2 ubiquitin ligase Ubc4, which is important for nutrient homeostasis and is involved in the ubiquitination of Cln3 (9), restores Cln3 levels in the *pho85Δ* strain (Fig. 5E). Therefore, Pho85 may somehow interfere with Cln3 ubiquitination and/or destruction processes. Bearing in mind that Pho85 is a protein kinase, one explanation could be that it phosphorylates Cln3 and thereby interferes with such processes.

**Cln3 is an *in vitro* substrate of Pho80/Pho85.** To test the latter hypothesis, we performed an *in vitro* phosphorylation experiment, for which we needed to obtain full-length Cln3 protein. We tried to purify Cln3 from wild-type yeast cells, but the cyclin is tightly associated with the endoplasmic reticulum (37) and remains with the particulate fraction of the cell extracts, making purification difficult. We also tried to purify it as a recombinant protein, but the expression of the full-length protein was highly toxic to *E. coli* cells, resulting in very poor expression levels. Finally, we expressed and purified a fragment of the recombinant GST-Cln3 protein (from Met347 to Arg580) containing the PEST region. This fragment of Cln3 was specifically phosphorylated by reconstituted Pho85/Pho80 complexes purified from *E. coli* cells (Fig. 6B). In contrast, we observed that the N-terminal half of the Cln3 protein (from Met1 to Met347) was not phosphorylated by Pho85 (not shown).

Pho85 is a proline-directed kinase that preferentially phosphorylates the consensus sequence S/T-P-X-I/L (17), and Cln3 contains two of these sites (Ser449 and Thr520) located precisely at the ends of the PEST region (Fig. 6A). We replaced both of these sites with either alanine or aspartic acid, rendering Cln3 that was no longer phosphorylated by Pho85 (Fig. 6B) and showing S449 and T520 to be the Pho85/Pho80 targets. A typical substrate of Pho85/Pho80, such as Pho4, was included as a control.



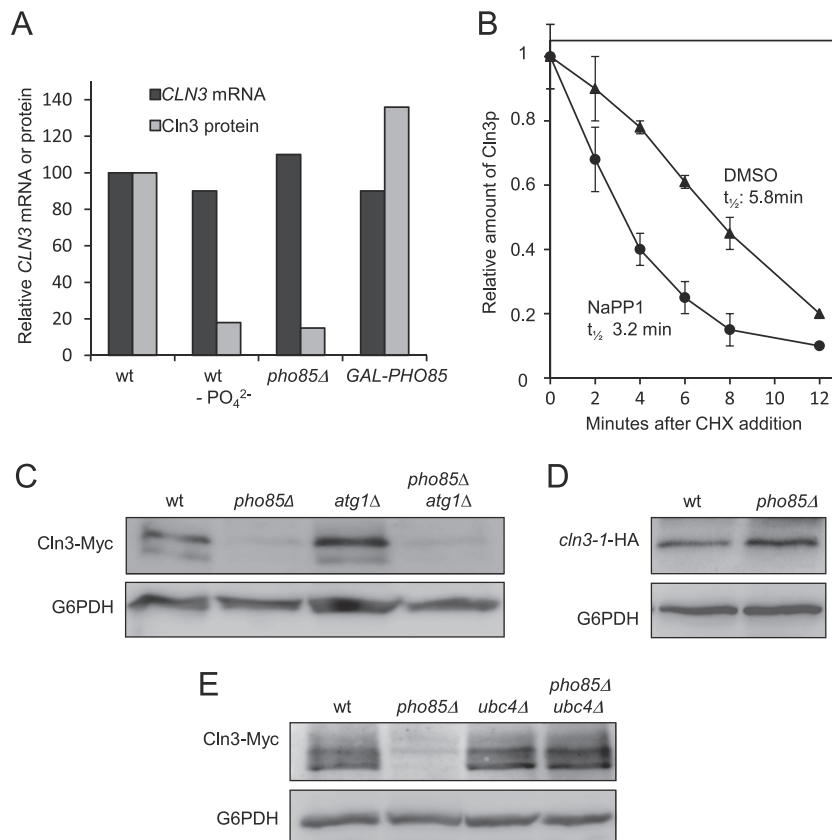
**FIG 4** Phosphate controls cellular levels of Cln3 by modulating the PHO pathway. (A) Schematic of the PHO pathway. During phosphate starvation, Vip1 causes an increase in the levels of inositol heptakisphosphate (IP<sub>7</sub>), which binds to and changes the conformation state of Pho81, leading to the inactivation of Pho85/Pho80 complexes. (B) Relative amounts of Cln3-Myc in different strains. Wild-type (wt), *pho81Δ*, and *vip1Δ* strains were grown in synthetic complete medium with (+PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) or without (−PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) phosphate. After 5 h, the levels of Cln3-Myc were quantified by immunoblotting using monoclonal antibodies. Cells of the *Gal1-PHO85* strain (a wild-type strain that carries a centromeric plasmid with *PHO85* expressed under the *Gal1* promoter) were grown for 5 h in synthetic complete medium with galactose as a carbon source, either with or without phosphate. (C) Pho80 is necessary to maintain high levels of Cln3. As described for panel B, wild-type (*GAL-Ø*) and *GAL1-PHO80* strains were grown in synthetic complete medium in the presence of galactose without phosphate (−PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). Levels of Cln3-Myc were quantified by immunoblotting using monoclonal antibodies. (D) Pho80 is necessary to maintain high levels of Cln3. Quantification of data in panel E (data ± standard deviations from four independent experiments) is shown. (E) Pho80 is necessary to maintain high levels of Cln3. A plasmid with a Cln3-Myc epitope tag was introduced in strains with the indicated mutations for deficiency of the different Pho85 cyclins. After 3 h of exponential growth in YPD, the levels of Cln3-Myc were analyzed by immunoblotting.

It has been suggested that Cdc28 is involved in the down-regulation of Cln3 levels by acting through the CDK consensus phosphorylation sites in the PEST region of Cln3. Therefore, Cln3 phosphorylation by Cdc28 and Pho85 appears to have the opposite effect. We assayed the same Cln3 fragments against Cdc28-TAP immunopurified from yeast cells. The results in Figure 6C show that Cdc28 phosphorylates Cln3 (to a greater extent than Pho85, probably because it phosphorylates Cln3 at more sites in the PEST region). Interestingly, Cdc28 is still able to phosphorylate the S449A T520A *cln3* mutant to the same extent as the wild type (Fig. 6C), indicating a differential site requirement between Cdc28 and Pho85 on Cln3, at least *in vitro*. A typical substrate of Cdc28, such as Sic1, is included as a control.

Because Cln3 and Pho80 interact *in vivo*, as indicated by the results of coimmunoprecipitation experiments (Fig. 7A), we examined whether Cln3 is also an *in vivo* substrate of Pho85.

***In vivo* phosphorylation of S449 and T520 is essential to maintain Cln3 levels.** We verified the *in vivo* Cln3 phosphorylation status by using mobility shift analysis. However, unphosphorylated Cln3 is highly unstable and becomes nearly undetectable by Western blot analysis, making this experiment very challenging. We attempted to identify the shift using a *pho85-as* strain and adding 5 times more yeast extract to the electrophoresis gel, but the levels of Cln3 remained nearly undetectable (data not shown).

We decided to test the *in vivo* effects of phosphorylation by measuring the levels of different mutant versions of Cln3. We expressed Cln3 from its own promoter in a centromeric plasmid, and when we replaced S449 and T520 with alanines, the levels of Cln3 became nearly undetectable (Fig. 7B and C). We also replaced these 2 sites with aspartic acid, to mimic the effect of phosphorylation, predicting that they would restore Cln3 levels to some degree in a strain without Pho85 activity. The results in Figure 7D and E illustrate how in *pho85Δ* cells (or in wild-type



**FIG 5** Pho85 activity increases the half-life of Cln3 protein. (A) Different strains with a genomic tagged version of *CLN3* were sampled and then analyzed for *CLN3* mRNA levels (by RT-PCR) or Cln3-Myc levels (by immunoblotting). Wild-type cells were grown exponentially in synthetic complete medium with (wt) or without (wt -PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) phosphate, *pho85Δ* strain cells were grown in the same complete medium with phosphate, and *GAL-PHO85* cells were grown for 5 h in synthetic complete medium with galactose as a carbon source. (B) YAM67 strain cells were incubated with either 1-Na PP1 (a specific *pho85-as* inhibitor) or drug vehicle (DMSO). Forty minutes later (time zero), cycloheximide (CHX) was added to the cultures (final concentration, 10 μg/ml). At the indicated times, samples were taken and analyzed for Cln3-Myc levels by immunoblotting. Data ± standard deviations from four independent experiments are shown. t<sub>1/2</sub>, half-life. (C) Downregulation of autophagy does not restore the diminished Cln3 levels of *pho85Δ* mutants. Strains of the indicated genotypes were grown exponentially in phosphate-rich medium, and Cln3-Myc was analyzed by immunoblot assay using specific antibodies. (D) Absence of the PEST region restores Cln3 levels in *pho85Δ* cells. Wild-type or *pho85Δ* cells carrying a plasmid with a *cln3-1* allele without the PEST region (41) were grown exponentially in YPD. Cln3-HA levels were measured by immunoblotting. (E) Absence of *UBC4* restores Cln3 levels in a *pho85Δ* strain. Strains of the indicated genotypes carrying a genomic Myc-tagged version of Cln3 were grown exponentially in phosphate-rich medium. Cells were harvested, and Cln3 levels were evaluated by immunoblotting.

cells growing in medium without phosphate), the levels of Cln3 carrying the S449 and T520 aspartic acid substitutions are higher than the levels of wild-type Cln3, suggesting that *in vivo* phosphorylation at these sites is essential for maintaining high levels of Cln3. Overall, these results suggest that the proposed phosphorylation sites are involved in the *in vivo* regulation of Cln3 levels.

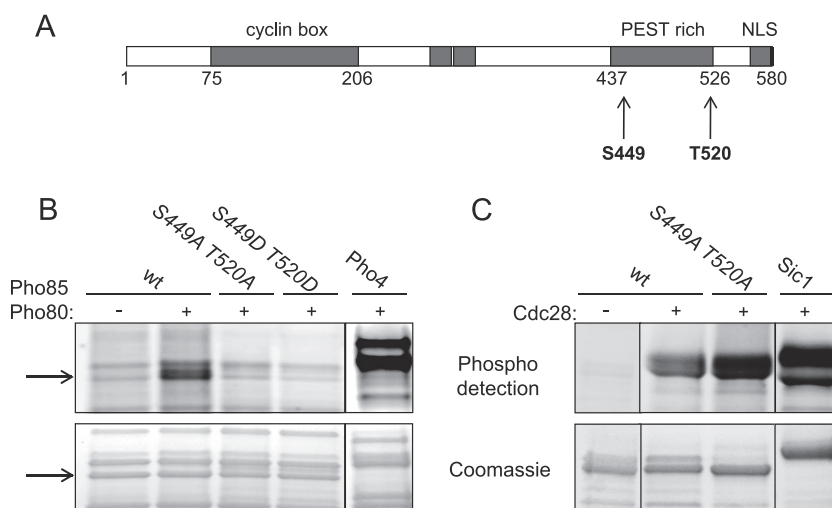
A possible scenario that emerges from all these results (Fig. 8A) is that in the absence of phosphate, Pho85 becomes inactive and Cln3 is no longer phosphorylated, which in turn would interfere with the ubiquitination and/or the destruction of the cyclin. At this point, we sought to test the physiological validity of our proposed model.

**Pho85 inactivation is essential for proper G<sub>1</sub> arrest.** Ectopic expression of Cln3 in G<sub>1</sub>-arrested cells (due to the presence of rapamycin or to nutrient depletion) leads to accidental entry into S phase and to diminished cell viability (38, 39). To ascertain the relevance of these observations to our work, we arrested cells in phosphate-depleted medium, and we found that, as predicted, cells with a hyperactive form of *CLN3* (the *cln3-1* allele) induced a

diminished cell viability which correlated well with an increase in the number of cells that crossed Start, as indicated by the high percentage of budded cells (Fig. 8B). Moreover, as discussed above (Fig. 1), ectopic expression of Cln2 led to a clear increase in the number of budded cells and to a rise in the rate of cell death (not shown). Hence, it seems that downregulation of Cdc28 activity is essential for proper G<sub>1</sub> arrest during phosphate deprivation.

According to our model, overactivation of Pho85 should also be detrimental to cell viability in G<sub>1</sub>-arrested cells, and our results demonstrated that this was indeed the case. As shown by the results in Figure 8B, wild-type cells incubated for 7 days in phosphate-free medium exhibited a viability rate of 55%. In contrast, *vip1Δ* or *pho81Δ* cells (which should retain Pho80/Pho85 activity under the same conditions of deprivation) showed an increase in improperly arrested cells (16 to 18% of budded cells) and a significant loss in viability (a total of 20%). Even more interesting is the fact that cells carrying the Cln3 with the Asp substitutions that mimic Pho85 phosphorylation also have low viability under phosphate-fasting conditions. Together, these results agree with the





**FIG 6** Cln3 is phosphorylated *in vitro* by Pho85/Pho80. (A) Schematic representation of Cln3 with the different functional domains. The PEST region is indicated by shading, and the putative target residues for Pho85 by arrows. NLS, nuclear localization signal. (B) *In vitro* kinase assay of Pho85/Pho80 on Cln3. Recombinant Pho85 and GST-Pho80, purified from bacteria, were incubated with the C-terminal half of Cln3 (also from bacteria) containing the PEST region with the indicated mutations or the wild-type sequence (see Materials and Methods and Table 2). Pho4, a well-known substrate of Pho85/Pho80, was included as a control for the Pho85/Pho80 activity. The arrows indicate Cln3 protein. (C) *In vitro* kinase assay of Cdc28-TAP and the Cln3 mutants with the indicated mutations or the wild-type sequence. IgG-Sepharose beads were used to pull down Cdc28 either from a no-tag strain (–) or the Cdc28-TAP tag strain (+). Sic1 was included as a control for the Cdc28 kinase activity.

notion that, in the absence of phosphate, downregulation of Pho85 activity is essential for decreasing Cln3 levels and for proper  $G_1$  arrest.

**Pho85 activation is essential for proper cell cycle reentry.** It has been proposed that Pho85 activity is essential in situations with no Cdc28 activity, such as those involving cell cycle restart (20). This hypothesis is consistent with our model, which, if true, predicts that cells with low Pho85 activity should have difficulties reentering the cell cycle from  $G_0$ . To test this prediction, we incubated yeast strains in phosphate-free medium and, after 7 h, transferred them to rich medium in order to monitor their growth. The results in Figure 8C show how, after 2 h of incubation in phosphate-rich medium, *pho85* $\Delta$  cells present low levels of Cln3 and consequently remain arrested, while wild-type cells already undergo mitosis. It is interesting to note that the differences between strains are only minor when we compare the ability of cell cycle reentry from  $\alpha$ -factor arrest (Fig. 8D). This finding suggests that the observed delay in cell cycle reentry is specific rather than a general defect of cell cycle regulation.

In summary, these results reinforce the idea that Pho85 activity plays an indispensable role in exiting from  $G_0$  arrest.

## DISCUSSION

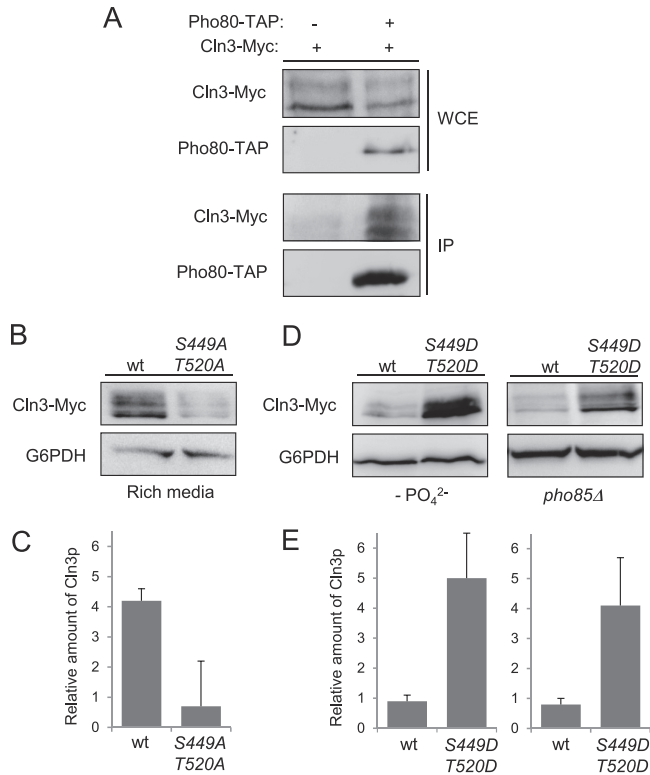
**Phosphate levels regulate cell cycle progression.** So far, there are several lines of evidence implicating glucose and nitrogen as critical elements in cell cycle control and that their absence leads to  $G_1$  arrest. Also, it is known that the absence of phosphate also stops proliferation. At first glance, one might assume that this defect is merely a nonspecific consequence arising from the reduction in the level of a particular metabolite (e.g., ATP). However, there is considerable evidence to confirm that the observed arrest is a controlled process, as follows. (i) Under phosphate-fasting conditions, the cells accumulate as mostly unbudded with 1N DNA content; if they had arrested accidentally, we should have found

cells in various stages of the cycle. (ii) Metabolomic studies have shown that cells growing under phosphate-limiting conditions maintain a relatively constant free energy of ATP hydrolysis (40), suggesting that in the first moments of phosphate deprivation, cells might have enough energy to initiate an adaptive response, such as finishing one round of division until the next  $G_1$  phase. (iii) The volume of arrested cells continues to increase, indicating that they are metabolically active and not in a collapsed state. (iv) Finally, the arrest caused by lack of phosphate can be reversed with an increase in CDK/Cln2 activity. In conclusion, one of the contributions of the present work is to confirm that phosphate regulates Start through the control of  $G_1/S$  transcriptional machinery in *S. cerevisiae*, as suggested some time ago by Johnston et al. (35).

It should be noted that, in our experiments, the cells did not arrest immediately: they gradually accumulated in the  $G_1$  phase, and finally, within approximately 6 h of deprivation, 90% of them had stopped dividing. This gradual response of cultures is probably due to polyphosphate reserves in the cells (41) which serve to buffer the sudden external changes.

**Pho85 affects the stability of Cln3.** The central idea of this work is that phosphate levels dictate Cln3 stability by regulating the activity of the Pho85/Pho80 complex. It is interesting to note that the amounts of other cyclins (e.g., Cln2) are not affected by Pho85 activity (not shown), underscoring the specificity of the described effect.

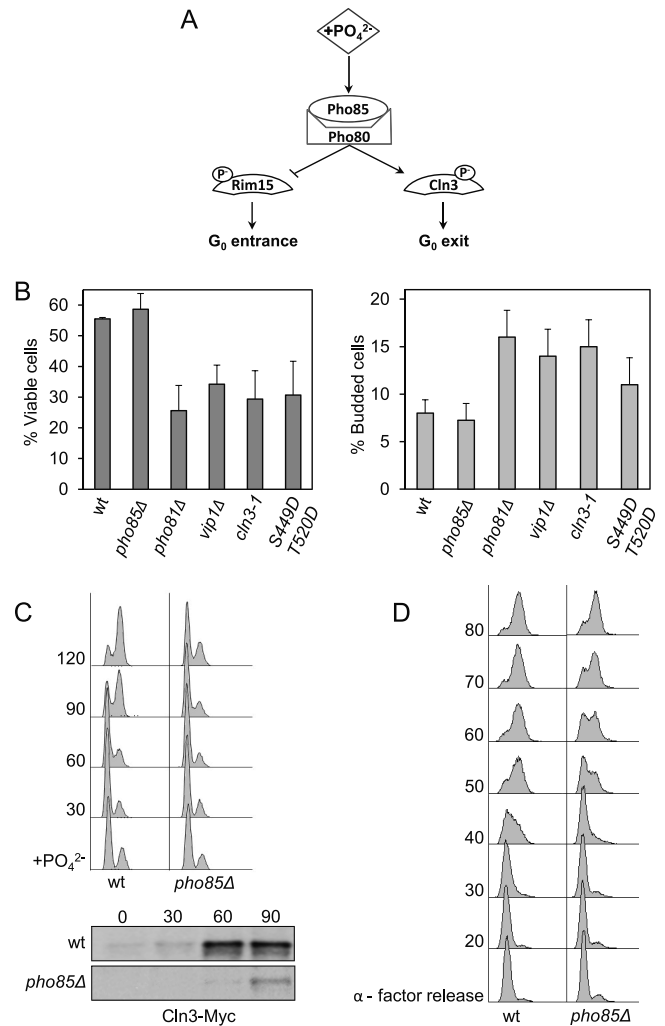
Several studies indicate that Cln3 is downregulated by translational repression under conditions of nutrient deprivation (18, 42, 43). Although we cannot rule out the possibility that phosphate limitation has the same effect, our results show that the critical step targeted by phosphate availability on Cln3 is its stability. An analogous destabilization phenomenon has been described in nitrogen-deprived cells, although its mechanism remains unexplained (18). This same study showed that the half-life of Cln3 was again reduced by half. Thus, the destabilization of Cln3, along



**FIG 7** *In vivo* phosphorylation of S449 and T520 is essential to maintain Cln3 levels. (A) Pho80 and Cln3 interact *in vivo*. Yeast extracts (WCE [whole-cell extracts]) containing untagged Pho80 or Pho80-TAP were pulled down with IgG-Sepharose. Tagged Cln3-Myc (from its chromosomal locus) was detected using specific antibodies (IP [immunoprecipitate]). (B) Alanine replacement of S449 and T520 destabilizes Cln3. Wild-type cells were transformed with a centromeric plasmid bearing a Cln3-Myc or a 2-Ala (S449A T520A) mutant version and grown for 4 h in rich medium. The amount of Cln3 was determined by immunoblotting. (C) Quantification of experiment whose results are shown in panel B. Data  $\pm$  standard deviations of three independent experiments are shown. (D) Aspartic acid replacement of S449 and T520 stabilizes Cln3. Wild-type (in phosphate-deficient medium) or *pho85* $\Delta$  (in phosphate-rich medium) cells bearing a plasmid with different versions of *CLN3* were grown exponentially for 4 h. Cln3 levels were analyzed by immunoblotting. To simplify the nomenclature, S449D means a double substitution of Asp into the Ser 449 and the previous residue to mimic the double-negative charge that represents the phosphate group (see Materials and Methods), and the same is true for T520D. (E) Quantification of experiments whose results are shown in panel D. Data  $\pm$  standard deviations of three independent experiments are shown.

with its possible translational repression, could be a general response of the cell against the limitation of different nutrients. This would limit the activity of the Cln3/Cdc28 complex needed to pass Start in order to slow down the cell cycle and to adapt to the new conditions.

The finding that Cln3 is affected by Pho85/Pho80 activity is relevant for two reasons: on one hand, the Pho85/Pho80 route is shown for the first time to be involved in directly controlling the cell cycle machinery, suggesting coordination between phosphate homeostasis and the cell cycle, and on the other hand, to our knowledge, this is the first reported case of one CDK controlling the activity of another. Interestingly, during the revision process of the manuscript, the group of Kron and collaborators described that Pho85/Pcl2 controlled the amount of Cln3 through the activation of Hsp70 in response to nitrogen, pointing to Pho85 as a



**FIG 8** Pho85 activity is necessary for proper  $G_1$  arrest and cell cycle reentry. (A) Proposed model of Pho85 activity. In phosphate-rich medium, Pho85/Pho80 complexes remain highly active. Under such conditions, Pho85 phosphorylates and inactivates Pho4 and Rim15 (25) and, conversely, activates cyclin Cln3. (B) Proper regulation of Pho85 activity is essential for survival under conditions of phosphate deprivation. Cells were incubated in synthetic complete medium for 7 days, at which point cells were collected and assessed for viability by colony counting (left). The percentage of budding was analyzed by counting no less than 200 cells under the microscope (right). Data  $\pm$  standard deviations from three independent experiments are shown. (C) Pho85 activity is necessary for reentry into the cell cycle after refeeding. Cells transformed with a centromeric plasmid bearing Cln3-Myc were deprived of phosphate for 7 h (time zero) and then refed. At various times, samples were collected and analyzed for DNA content by flow cytometry (top). Times (min) are indicated at left; “+ $PO_4^{2-}$ ” indicates the initiation of refeeding. Cln3 levels were monitored by immunoblotting (bottom) at times (min) indicated above the gel. (D) *pho85* $\Delta$  progresses through  $G_1$ , with a small delay, after  $\alpha$ -factor exit. Wild-type and *pho85* $\Delta$  cells were synchronized with  $\alpha$ -factor for 3 h and then released into fresh medium at 30°C. At various times, samples were collected. Times (min) are indicated at left; “ $\alpha$ -factor release” indicates the time of release following synchronization. Total DNA content was measured as described in Materials and Methods, except that propidium iodide was used instead of SYBR green.

general controller of Cln3 in response to variations in nutrient levels (44).

How does Pho85 affect the stability of the cyclin Cln3? Having excluded the possibility of autophagy, we propose here that Cln3

phosphorylation by Pho85 may somehow hinder the normal degradation of Cln3. This raises the possibility that phosphorylation of Cln3 complicates its recruitment by the ubiquitination system, consequently expanding its lifetime. The idea that phosphorylation may prevent interaction with E3 ligases has already been suggested for other cell cycle-regulated proteins (45).

If Cdc28 and Pho85 have opposite effects on Cln3 stability, then it would be important to determine whether these CDKs phosphorylate different residues. The residues of Cln3 phosphorylated by Cdc28 are currently unknown, although some results point to S468 as one of the most likely candidates (9). However, we have demonstrated that a recombinant fragment of Cln3 that presents S449 and T520 mutated to alanine is still phosphorylated by Cdc28 and is no longer phosphorylated by Pho85 (Fig. 6B and C), indicating that the CDKs phosphorylate different residues of Cln3, at least *in vitro*. It is important to note that, although the consensus sequence for the CDK family is SP or TP, Cdc28 and Pho85 have distinct preferences for the sequence adjacent to these sites. Cdc28 prefers a positively charged lysine or arginine at the third position from the phosphoacceptor site, with the consensus site being S/TPXX/R (46, 47), whereas Pho80-Pho85 has the consensus phosphorylation site sequence SPXI/L (24, 48). Therefore, it is formally plausible that both kinases phosphorylate distinct sites, generating distinct effects. In this regard, it is interesting to note that only 2 of 10 SP/TP sites of the PEST region have the preferred sequence for Pho85 (the hydrophobic residue at +3), and these sites are the same two that appear to be phosphorylated by Pho85. There are other examples of proteins that are phosphorylated at SP/TP with opposite effects, such as Sic1, which must exceed a threshold of CDK phosphorylation in several SP/TP sites to be destroyed, but a single mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphorylation in one specific TP makes the protein stable (45).

**Physiological significance of Cln3 regulation.** The underlying mechanism(s) that enables nutrient sensors to control cell cycle machinery remains unknown. Organisms may need to employ several convergent mechanisms to provoke complete G<sub>1</sub> arrest, making the identification of a single molecular target rather difficult. We propose that modulation of Cln3 stability may be one of many principal targets in cell cycle regulation, at least in terms of the adaptive response to phosphate scarcity (the proposed model is shown in Fig. 8A). Cln3 cyclin is a good candidate because it is the most upstream control point in the cell cycle and because raising its cellular content by either increased transcription or altered protein turnover profoundly affects its capacity to pass through G<sub>1</sub> (9, 49). Thus, the G<sub>1</sub> arrest caused by phosphate deprivation could be explained by a simple model: due to the reduction in the Cln3 half-life, starved cells cannot reach the Cln3 threshold level required to execute the Start program. However, this mechanism might not be important in rich medium, given that *cln3Δ* cells can still progress through the entire cell cycle, albeit with a longer G<sub>1</sub> phase.

According to our model, Cln3 destabilization is crucial during G<sub>1</sub> arrest due to lack of phosphate. This downregulation could be important, for instance, in maintaining silencing of Swi6-dependent transcription in order to avoid the process of wall remodeling during nutrient deprivation (50). Moreover, Burhan's group has demonstrated that establishing and maintaining proper arrest in G<sub>1</sub> is an important cellular response to nutrient deprivation (38); they report that cells that improperly halt at the S phase suffer

replication stress and rapidly lose viability. Furthermore, they clearly demonstrate that ectopic expression of *CLN3* increases the frequency with which nutrient-depleted cells arrest at the beginning of the S phase instead of G<sub>1</sub>. Our results confirm that the presence of a hyperstable Cln3 allele (*cln3-1*) also increases the number of S-phase-arrested cells and decreases cell viability. In this context, we propose that in response to the lack of phosphate, Pho85 inactivation is critical for stopping the cycle at G<sub>1</sub>, avoiding entry into the S phase with low levels of nucleotides. This assumption is clearly supported by evidence showing that mutants with high Pho85 activity (*pho81Δ*, *vip1Δ*, and Gal-*PHO85*) incubated in medium without phosphate (i) maintain high levels of Cln3, (ii) show large numbers of cells that have entered the cell cycle, and (iii) show a decrease in cell viability. Considering that under the same conditions of deprivation, cells with a *CLN3* allele that encodes aspartic acid substitutions also die prematurely, we propose that such cellular defects chiefly derive from sustained and unscheduled phosphorylation of Cln3.

According to our model, Pho85 could also be important for restarting the cell cycle after refeeding. Our findings support this notion; either the absence of Cln3 or low Pho85 activity greatly hinders reentry into the cell cycle. Interestingly, this role for Pho85 in reentry seems to be specific, as reflected in the almost total lack of differences between wild-type cells and *pho85Δ* cells released from alpha factor arrest. These results are consistent with the hypothesis that Pho85 is essential when Cdc28 activity is lacking (20) and reinforce the idea that Pho85 activity is almost dispensable when yeast grows in nutrient-rich medium (although the cells still undergo a longer G<sub>1</sub> phase), but is essential in other situations (e.g., exiting from nutrient-induced G<sub>0</sub> arrest). Since wild yeast should thrive under diverse nutrient conditions (the availability of phosphate and other nutrients often varies widely), we postulate that Pho85 must be fundamental in controlling the constant cell cycle stalls and reentries that a yeast cell is subjected to under natural conditions.

## ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge F. Posas, W. C. Burhans, J. Jiménez, and N. Casals for stimulating discussions, E. O'Shea for providing strains, K. Shokat for the 1-Na PP1 inhibitor, M. Pérez for technical assistance, and O. Mirallas for his collaboration in some of the experiments.

S. Hernández received a postgraduate Junior Faculty fellowship from the UIC and l'Obra Social la Caixa. This work was supported by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación of the Spanish government (BFU 2009-09278).

## REFERENCES

1. De Virgilio C. 2012. The essence of yeast quiescence. *FEMS Microbiol. Rev.* 36:306–339.
2. Wittenberg C, Reed SI. 2005. Cell cycle-dependent transcription in yeast: promoters, transcription factors, and transcriptomes. *Oncogene* 24: 2746–2755.
3. Cho RJ, Campbell MJ, Winzler EA, Steinmetz L, Conway A, Wodicka L, Wolfsberg TG, Gabrielian AE, Landsman D, Lockhart DJ, Davis RW. 1998. A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol. Cell* 2:65–73.
4. Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, Iyer VR, Anders K, Eisen MB, Brown PO, Botstein D, Futcher B. 1998. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol. Biol. Cell* 9:3273–3297.
5. Koch C, Nasmyth K. 1994. Cell cycle regulated transcription in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:451–459.
6. Cosma MP, Panizza S, Nasmyth K. 2001. Cdk1 triggers association of



- RNA polymerase to cell cycle promoters only after recruitment of the mediator by SBF. *Mol. Cell* 7:1213–1220.
7. Koch C, Schleiffer A, Ammerer G, Nasmyth K. 1996. Switching transcription on and off during the yeast cell cycle: Cln/Cdc28 kinases activate bound transcription factor SBF (Swi4/Swi6) at start, whereas Clb/Cdc28 kinases displace it from the promoter in G2. *Genes Dev.* 10:129–141.
  8. Cross FR, Blake CM. 1993. The yeast Cln3 protein is an unstable activator of Cdc28. *Mol. Cell. Biol.* 13:3266–3271.
  9. Yaglom J, Linskens MH, Sadis S, Rubin DM, Futcher B, Finley D. 1995. p34Cdc28-mediated control of Cln3 cyclin degradation. *Mol. Cell. Biol.* 15:731–741.
  10. Costanzo M, Nishikawa JL, Tang X, Millman JS, Schub O, Breitkreuz K, Dewar D, Rupes I, Andrews B, Tyers M. 2004. CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast. *Cell* 117:899–913.
  11. de Bruin RA, McDonald WH, Kalashnikova TI, Yates J, III, Wittenberg C. 2004. Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5. *Cell* 117:887–898.
  12. Wagner MV, Smolka MB, de Bruin RA, Zhou H, Wittenberg C, Dowdy SF. 2009. Whi5 regulation by site specific CDK-phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 4:e4300. doi:10.1371/journal.pone.0004300.
  13. Wang H, Carey LB, Cai Y, Wijnen H, Futcher B. 2009. Recruitment of Cln3 cyclin to promoters controls cell cycle entry via histone deacetylase and other targets. *PLoS Biol.* 7:e1000189. doi:10.1371/journal.pbio.1000189.
  14. Skotheim JM, Di Talia S, Siggia ED, Cross FR. 2008. Positive feedback of G1 cyclins ensures coherent cell cycle entry. *Nature* 454:291–296.
  15. Cross FR, Schroeder L, Bean JM. 2007. Phosphorylation of the Sic1 inhibitor of B-type cyclins in *Saccharomyces cerevisiae* is not essential but contributes to cell cycle robustness. *Genetics* 176:1541–1555.
  16. Gray JV, Petsko GA, Johnston GC, Ringe D, Singer RA, Werner-Washburne M. 2004. “Sleeping beauty”: quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:187–206.
  17. Martin DE, Hall MN. 2005. The expanding TOR signaling network. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:158–166.
  18. Gallego C, Gari E, Colomina N, Herrero E, Aldea M. 1997. The Cln3 cyclin is down-regulated by translational repression and degradation during the G1 arrest caused by nitrogen deprivation in budding yeast. *EMBO J.* 16:7196–7206.
  19. Lee YS, Huang K, Quiocho FA, O’Shea EK. 2008. Molecular basis of cyclin-CDK-CKI regulation by reversible binding of an inositol pyrophosphate. *Nat. Chem. Biol.* 4:25–32.
  20. Huang D, Friesen H, Andrews B. 2007. Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast. *Mol. Microbiol.* 66:303–314.
  21. Schneider KR, Smith RL, O’Shea EK. 1994. Phosphate-regulated inactivation of the kinase PHO80-PHO85 by the CDK inhibitor PHO81. *Science* 266:122–126.
  22. Lee YS, Mulugu S, York JD, O’Shea EK. 2007. Regulation of a cyclin-CDK-CDK inhibitor complex by inositol pyrophosphates. *Science* 316:109–112.
  23. Nishizawa M, Komai T, Katou Y, Shirahige K, Ito T, Toh-E A. 2008. Nutrient-regulated antisense and intragenic RNAs modulate a signal transduction pathway in yeast. *PLoS Biol.* 6:2817–2830.
  24. O’Neill EM, Kaffman A, Jolly ER, O’Shea EK. 1996. Regulation of PHO4 nuclear localization by the PHO80-PHO85 cyclin-CDK complex. *Science* 271:209–212.
  25. Wanke V, Pedruzzi I, Cameroni E, Dubouloz F, De Virgilio C. 2005. Regulation of G0 entry by the Pho80-Pho85 cyclin-CDK complex. *EMBO J.* 24:4271–4278.
  26. Wysocki R, Javaheri A, Kristjansdottir K, Sha F, Kron SJ. 2006. CDK Pho85 targets CDK inhibitor Sic1 to relieve yeast G1 checkpoint arrest after DNA damage. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13:908–914.
  27. Carroll AS, Bishop AC, DeRisi JL, Shokat KM, O’Shea EK. 2001. Chemical inhibition of the Pho85 cyclin-dependent kinase reveals a role in the environmental stress response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:12578–12583.
  28. Gietz RD, Sugino A. 1988. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74:527–534.
  29. Clotet J, Escote X, Adrover MA, Yaakov G, Gari E, Aldea M, de Nadal E, Posas F. 2006. Phosphorylation of Hsl1 by Hog1 leads to a G2 arrest essential for cell survival at high osmolarity. *EMBO J.* 25:2338–2346.
  30. Haase SB, Reed SI. 2002. Improved flow cytometric analysis of the budding yeast cell cycle. *Cell Cycle* 1:132–136.
  31. Hernandez-Ortega S, Bru S, Ricco N, Ramirez S, Casals N, Jimenez J, Isasa M, Crosas B, Clotet J. 21 December 2012. Defective in mitotic arrest 1 (Dma1) ubiquitin ligase controls G1 cyclin degradation. *J. Biol. Chem.* [Epub ahead of print.] doi:10.1074/jbc.M112.426593.
  32. Fabrizio P, Longo VD. 2007. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol. Biol.* 371:89–95.
  33. Schneider BL, Yang QH, Futcher AB. 1996. Linkage of replication to start by the Cdk inhibitor Sic1. *Science* 272:560–562.
  34. Smets B, Ghillebert R, De Snijder P, Binda M, Swinnen E, De Virgilio C, Winderickx J. 2010. Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 56:1–32.
  35. Johnston GC, Pringle JR, Hartwell LH. 1977. Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp. Cell Res.* 105:79–98.
  36. Yang Z, Geng J, Yen WL, Wang K, Klionsky DJ. 2010. Positive or negative roles of different cyclin-dependent kinase Pho85-cyclin complexes orchestrate induction of autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* 38:250–264.
  37. Verges E, Colomina N, Gari E, Gallego C, Aldea M. 2007. Cyclin Cln3 is retained at the ER and released by the J chaperone Ydj1 in late G1 to trigger cell cycle entry. *Mol. Cell* 26:649–662.
  38. Weinberger M, Feng L, Paul A, Smith DL, Jr, Hontz RD, Smith JS, Vujcic M, Singh KK, Huberman JA, Burhans WC. 2007. DNA replication stress is a determinant of chronological lifespan in budding yeast. *PLoS One* 2:e748. doi:10.1371/journal.pone.0000748.
  39. Zinzalla V, Graziola M, Mastriani A, Vanoni M, Alberghina L. 2007. Rapamycin-mediated G1 arrest involves regulation of the Cdk inhibitor Sic1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 63:1482–1494.
  40. Boer VM, Crutchfield CA, Bradley PH, Botstein D, Rabinowitz JD. 2010. Growth-limiting intracellular metabolites in yeast growing under diverse nutrient limitations. *Mol. Biol. Cell* 21:198–211.
  41. Thomas MR, O’Shea EK. 2005. An intracellular phosphate buffer filters transient fluctuations in extracellular phosphate levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:9565–9570.
  42. Hall DD, Markwardt DD, Parviz F, Heideman W. 1998. Regulation of the Cln3-Cdc28 kinase by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17:4370–4378.
  43. Polymenis M, Schmidt EV. 1997. Coupling of cell division to cell growth by translational control of the G1 cyclin CLN3 in yeast. *Genes Dev.* 11:2522–2531.
  44. Truman AW, Kristjansdottir K, Wolfgeher D, Hasin N, Polier S, Zhang H, Perrett S, Prodromou C, Jones GW, Kron SJ. 2012. CDK-dependent Hsp70 phosphorylation controls G1 cyclin abundance and cell-cycle progression. *Cell* 151:1308–1318.
  45. Escote X, Zapater M, Clotet J, Posas F. 2004. Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nat. Cell Biol.* 6:997–1002.
  46. Holmes JK, Solomon MJ. 1996. A predictive scale for evaluating cyclin-dependent kinase substrates. A comparison of p34cdc2 and p33cdk2. *J. Biol. Chem.* 271:25240–25246.
  47. Songyang Z, Lu KP, Kwon YT, Tsai LH, Filhol O, Cochet C, Brickey DA, Soderling TR, Bartleson C, Graves DJ, DeMaggio AJ, Hoekstra MF, Blenis J, Hunter T, Cantley LC. 1996. A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol. Cell. Biol.* 16:6486–6493.
  48. Huang K, Ferrin-O’Connell I, Zhang W, Leonard GA, O’Shea EK, Quiocho FA. 2007. Structure of the Pho85-Pho80 CDK-cyclin complex of the phosphate-responsive signal transduction pathway. *Mol. Cell* 28:614–623.
  49. Nash R, Tokiwa G, Anand S, Erickson K, Futcher AB. 1988. The WHI1+ gene of *Saccharomyces cerevisiae* tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog. *EMBO J.* 7:4335–4346.
  50. Igual JC, Johnson AL, Johnston LH. 1996. Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *EMBO J.* 15:5001–5013.

# Defective in Mitotic Arrest 1 (Dma1) Ubiquitin Ligase Controls G<sub>1</sub> Cyclin Degradation<sup>\*[5]</sup>

Received for publication, October 10, 2012, and in revised form, December 21, 2012. Published, JBC Papers in Press, December 21, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.426593

Sara Hernández-Ortega<sup>†1,2</sup>, Samuel Bru<sup>‡2</sup>, Natalia Ricco<sup>‡</sup>, Sara Ramírez<sup>‡</sup>, Núria Casals<sup>‡</sup>, Javier Jiménez<sup>‡</sup>, Marta Isasa<sup>§</sup>, Bernat Crosas<sup>§</sup>, and Josep Clotet<sup>‡3</sup>

From the <sup>†</sup>Departament de Ciències Bàsiques, Universitat Internacional de Catalunya, 08017 Barcelona and the <sup>§</sup>Departament de Biologia Cel·lular, Institut de Biologia Molecular de Barcelona, CSIC, 08028 Barcelona, Spain

**Background:** Dma ubiquitin ligases control the cell cycle in diverse organisms. In humans, these enzymes act as tumor suppressors that prevent aberrant mitosis.

**Results:** Dma1 targets the cyclin Pcl1 for destruction.

**Conclusion:** Dma1 ubiquitin ligase activity controls stability of G<sub>1</sub> cyclins.

**Significance:** Pcl1 is the second reported substrate for Dma1 enzymes. Uncovering new Dma1 substrates could help to elucidate cellular functions of these enzymes.

Progression through the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle is controlled by diverse cyclin-dependent kinases (CDKs) that might be associated to numerous cyclin isoforms. Given such complexity, regulation of cyclin degradation should be crucial for coordinating progression through the cell cycle. In *Saccharomyces cerevisiae*, SCF is the only E3 ligase known to date to be involved in G<sub>1</sub> cyclin degradation. Here, we report the design of a genetic screening that uncovered Dma1 as another E3 ligase that targets G<sub>1</sub> cyclins in yeast. We show that the cyclin Pcl1 is ubiquitinated *in vitro* and *in vivo* by Dma1, and accordingly, is stabilized in *dma1* mutants. We demonstrate that Pcl1 must be phosphorylated by its own CDK to efficiently interact with Dma1 and undergo degradation. A nonphosphorylatable version of Pcl1 accumulates throughout the cell cycle, demonstrating the physiological relevance of the proposed mechanism. Finally, we present evidence that the levels of Pcl1 and Cln2 are independently controlled in response to nutrient availability. This new previously unknown mechanism for G<sub>1</sub> cyclin degradation that we report here could help elucidate the specific roles of the redundant CDK-cyclin complexes in G<sub>1</sub>.

In all eukaryotic organisms, progression through the G<sub>1</sub> phase of cell cycle is controlled by diverse cyclin-dependent kinases (CDKs)<sup>4</sup> associated to numerous isoforms of cyclins. In budding yeast, the passage through G<sub>1</sub> is mediated by two CDKs: Cdc28, associated to the cyclins Cln1 and Cln2, and Pho85 associated to Pcl1 and Pcl2. These two sets of cyclins are transcribed at the same moment (named START), by the same

transcription factors, and it is assumed to be destroyed by the same ubiquitin ligase system (1).

Pcls-CDK complexes could perform the same redundant functions as Clns complexes. Indeed, a *cln1 cln2 pcl1 pcl2* strain is unviable: it fails to extend a discernible bud, and has a large amorphous shape (2). Moreover, most of the Pho85 substrates involved in G<sub>1</sub> cell cycle progression are also substrates of Cdc28: there is evidence for phosphorylation of Sic1, Swi5, Ash1, Whi5, Rga2, and Clb6 by both Pcl-Pho85 and Cln-Cdc28 (2–7). The question arises as to why cells need Pho85 when Cdc28 alone appears able to execute essential cell cycle functions. Andrews and collaborators (2) have suggested that phosphorylation by Pho85 regulates proteins as Cdc28 does, but under different conditions. For example, in the context of DNA damage, the Pho85-Pcl1 complex is the only one active, and hence, is essential for restarting the cell cycle in G<sub>1</sub> (4). Although, the mechanisms that enable the alternating presence of these cyclins remain unknown, selective ubiquitination and degradation are believed to be involved.

The E3 ubiquitin ligase complexes, anaphase-promoting complex and SCF (Skp1/Cdc53/E-box protein) control the two main cell cycle transitions. The former ubiquitinates Clb cyclins after mitosis (5, 6), and the latter targets Cln1 and Cln2 after G<sub>1</sub> (7). A variety of SCFs exist, each of which has a different F-box protein; in fact, the *Saccharomyces cerevisiae* genome contains at least 17 putative F-box proteins, suggesting that, in eukaryotes, the SCF system could control numerous regulatory processes. Under standard growth conditions (YPD at 30 °C) Cln2 is targeted by the SCF-Grr1 system; the fact that Grr1 also regulates nutrient homeostasis (8) suggests that Grr1 could be the link between nutrient sensing and Cln2 turnover (9). Although Pcls are assumed to be degraded by the same ubiquitin-ligase system, the E3 ligase involved in Pcl1 destruction is unknown.

The specificity of F-box interactions could depend on specific destruction box signals present in their substrates. In this regard, a motif present in the Cln2 sequence has recently been described that enables interaction with Grr1 (10). Moreover, this interaction also depends on previous substrate modifica-

\* This work was supported by Spanish Ministry of Science and Innovation Grant BFU 2009–09278, now known as the Ministry of Economy and Competitiveness.

[5] This article contains supplemental data.

<sup>1</sup> Supported by a post-graduate Junior Faculty fellowship from the Universitat Internacional de Catalunya and l'Obra Social la Caixa.

<sup>2</sup> Both authors contributed equally to this work.

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-935042015; Fax: 34-935042001; E-mail: jclotet@uic.es.

<sup>4</sup> The abbreviations used are: CDK, cyclin-dependent kinase; SCF, Skp1/Cdc53/F box protein; Glu-6-PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase.

tion; for example, the destruction of cyclins usually depends on phosphorylation by its own CDK in specific regions with a high content of Pro, Glu, Ser, and Thr, the so-called *PEST* domains. Indeed, Cln2 mutated at the seven potential Cdc28 phosphorylation sites is highly stabilized and render cells insensitive to nutrient and growth inhibitory signals (11). Hence, it is accepted that the instability of Cln cyclins derives from Cdc28-dependent phosphorylation of the cyclin subunit, which allows the interaction of the SCF-Grr1 in a specific domain of Cln2 (10, 12, 13). A similar model has been proposed for mammalian cells, based on findings reported for G<sub>1</sub> cyclins E and D1 (14–16). This model might also be applied to the other group of G<sub>1</sub> cyclins: the Pcls. However, Pcl1 has neither the Grr1 interaction domain proposed in Cln2, nor any PEST sequence, suggesting that an E3 ligase other than SCF might be involved in Pcl1 targeting.

Yeast contains a high number of E3 ligases, some of which are involved in cell-cycle control. These include Dma1 and Dma2, which belong to a small class of proteins that contain a Forkhead-associated (FHA) domain, as well as a RING domain (for review see Ref. 17), of which there are two in humans: Chfr (Checkpoint protein with FHA and RING domains, (18) and Rnf8 (19). Chfr is a tumor suppressor protein implicated in the antephasis checkpoint (18, 20). During the G<sub>2</sub> phase, Dma1 and Dma2 help control the spindle position checkpoint (21) and Swe1 degradation (22), whereas in G<sub>1</sub>, the two genes control G<sub>1</sub> progression in response to nutrients by an unknown mechanism (23). Moreover, Dma1 and Dma2 have been described to have ubiquitin ligase activity *in vitro* (23) although their physiological targets are unknown.

Herein we demonstrate that Pcl1 is targeted *in vitro* and *in vivo* by Dma1, and not by Grr1. We uncovered a possible Dma1 docking site sequence required for Pcl1 degradation. Also, we determined that degradation of Pcl1 requires phosphorylation at specific residues of its sequence by its own CDK. Finally, we present evidence that Pcl1 levels change in response to nutrient source through Dma1. The novel mechanism for G<sub>1</sub> cyclin degradation that we report here could help to elucidate the specific roles of the redundant CDK-cyclin complexes in G<sub>1</sub>.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Yeast Strains**—The strains used in this study are listed in Table 1.

**Plasmids**—*PCL1-TAP* and its derivative *pcl1 2A* (with Thr<sup>39</sup>-Ala and Ser<sup>43</sup>-Ala substitutions) were expressed from its own promoter in the centromeric plasmid pRS416. The Pcl1, *pcl1 2A*, *pcl1 4A* (with Ser<sup>14</sup>-Ala, Thr<sup>70</sup>-Ala, Ser<sup>117</sup>-Ala, and Ser<sup>198</sup>-Ala substitutions), *pcl1 DDD\** (with Val<sup>31</sup>-Asn and Pro<sup>33</sup>-Asn substitutions), and *pcl1 DDDΔ* (with a gap between amino acids Leu<sup>29</sup> and Asn<sup>36</sup>) were cloned in pGEX6P1 to be expressed in *Escherichia coli*, and cloned in pRS416 to be expressed in *S. cerevisiae*. *PHO85* was cloned in pEG-KG multicopy plasmid to be overexpressed under control of the *GAL1* promoter and cloned in pGEX6P1 to be expressed in *E. coli*. *PCL9* and *DMA1* genes were cloned in centromeric plasmids (pRS416 and pRS426, respectively) and expressed from their own promoters. *DMA1* was expressed in *E. coli* from pGEX6P1. pGEX6P1::Sic1 construction was previously described in Ref. 24.

**TABLE 1**  
Yeast strains used in this study

Strain	Background	Genotype	Source
	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ 200 met15 Δ 0 ura3 Δ 0</i>	Euroscarf
	W303-1a	<i>MATa ura3–52; trp1Δ2 leu2–3,112 his3–11 ade2–1 can1–100</i>	Euroscarf
	BY4741	<i>Das1::KanMX</i>	Euroscarf
	BY4741	<i>Dia2::KanMX</i>	Euroscarf
	BY4741	<i>Mfb1::KanMX</i>	Euroscarf
	BY4741	<i>Rad9::KanMX</i>	Euroscarf
	BY4741	<i>Rcy1::KanMX</i>	Euroscarf
	BY4741	<i>Saf1::KanMX</i>	Euroscarf
	BY4741	<i>Ubc4::KanMX</i>	Euroscarf
	BY4741	<i>Ubc13::KanMX</i>	Euroscarf
	BY4730	<i>Ufo1::KanMX</i>	Euroscarf
	BY4741	<i>ydr131c::KanMX</i>	Euroscarf
	BY4741	<i>ylr224w::KanMX</i>	Euroscarf
	BY4741	<i>ymr258c::KanMX</i>	Euroscarf
	BY4741	<i>ydr306c::KanMX</i>	Euroscarf
	BY4741	<i>ynl31c::KanMX</i>	Euroscarf
	BY4741	<i>ylr352w::KanMX</i>	Euroscarf
YSH75	BY4741	<i>grr1::KanMX</i>	This study
YPC639	BY4741	<i>dma1::KanMX</i>	This study
YPC651	BY4741	<i>dma2::KanMX</i>	This study
YPC748	BY4741	<i>dma1::LEU2 dma2::KanMX</i>	This study
YAM42	BY4741	<i>pho85::URA3</i>	This study
YAM78	BY4741	<i>pho85::LEU2</i>	This study
YSH87	BY4741	<i>CLN2-TAP::KanMX</i>	This study
YSH98	BY4741	<i>CLN2-TAP::KanMX PCL1-TAP::URA3</i>	This study
YPC708	BY4741	<i>DMA1-TAP::HIS3</i>	Euroscarf
YSH82	BY4741	<i>PCL1-TAP::HIS3</i>	Euroscarf
YSH83	BY4741	<i>PCL1-TAP::HIS3 pho85::URA3</i>	This study
YSH5	BY4741	<i>PCL9-TAP::KanMX</i>	This study
YSH12	BY4741	<i>PCL9-TAP::KanMX pho85::URA3</i>	This study
YAN31	W303-1a	<i>SIC1-MYC::TRP1 CLN2-HA::KanMX::NAT</i>	Posas lab
YSH119	W303-1a	<i>SIC1-MYC::TRP1 CLN2-HA::KanMX::NAT PCL1-HA::KAN</i>	This study

**Growth Conditions, Cell Synchronization, and Cytometry Analysis**—Cells were grown in either YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, and 2% glucose) or in complete synthetic dextrose (SD) medium (0.67% yeast nitrogen base and 2% glucose) containing amino acids for auxotrophic requirements (15 mg/ml of leucine, 5 mg/ml of histidine, and 10 mg/ml of tryptophan) supplemented with either 2% dextrose or 2% raffinose (when indicated). Galactose induction was accomplished by initial growth in SC plus raffinose, followed by an addition of 2% galactose.  $\alpha$ -Factor cell synchronization experiments were carried out as previously described (25). Flow cytometry analysis was performed on yeast cells stained with SYBR Green.

**Genetic Screening**—19 strains defective in different ubiquitination systems (indicated in the Table 1) were transformed with a centromeric plasmid carrying *PCL1-HA* and the levels of Pcl1 from exponential growing cells were analyzed.

**Immunoblot Analysis**—Proteins were detected using the following primary antibodies: anti-PAP 1:4,000 (Sigma, P1291), anti-GST 1:1,000 (GE Healthcare, 27-4577-01), anti-HA monoclonal antibody 1:100 (a gift from Posas Lab), anti-ubiquitin 1:1,000 (Cell Signaling, 3936), anti-FLAG M2 1:500 (Sigma, F3165), or anti-Glu-6-PDH 1:500 (Sigma, A9521). The secondary antibodies used were: donkey anti-goat HRP, sheep anti-mouse HRP, and goat anti-rabbit HRP, all at 1:25,000 (all from Jackson laboratories). Immunoblots were developed using Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore) and images were taken with GeneSnap (Syngene) and quantified with GeneTools (Syngene).



## Dma1 Controls Stability of G<sub>1</sub> Cyclins

**RNA Isolation and Analysis**—Cells were harvested and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Total RNA was isolated by hot phenol extraction and quantified spectrophotometrically. 2 mg of total RNA were incubated with DNase and reverse transcribed using Quanta qScript cDNA SuperMix according to the manufacturer's instructions. The cDNA was subjected to RT-PCR on a C1000 thermal cycler CFX96 RT system, and expression was normalized to *CDC28*.

**Inhibition of Proteasome**—Inhibition of proteasome was performed as described (26).

**Protein Stability Assay**—The stability of the proteins was essentially determined as in Ref. 27. Cycloheximide (Sigma, C4859) was used at a final concentration of 10 mg/ml.

**Co-immunoprecipitation of GST-Pho85 and Dma1-TAP from Yeast Extracts**—Yeast cells were grown exponentially for 4 h in SC with 2% raffinose. Gene expression was then induced for 4 h by adding galactose at a final concentration of 2%. Cells were harvested (500 ml,  $A_{660} = 1.2$ ), and resuspended in 5 ml of cold extraction buffer A (50 mM Tris, pH 8, 15 mM EDTA, 15 mM EGTA, and 0.1% Triton X-100) containing protease inhibitors (2 mg/ml of pepstatin, 2 mg/ml of leupeptin, 1 mM PMSE, and 1 mM benzamide), phosphatase inhibitors (10 mM sodium orthovanadate, 25 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM sodium pyrophosphate, and 10 mM sodium fluoride), and 2 mM DTT. Cells were ruptured with glass beads in the FastPrep-24 (Qbiogene, 6 times for 30 s at speed 5) and lysates were clarified by centrifugation at  $4^{\circ}\text{C}$  for 1 h at  $12,000 \times g$  and quantified by the Bradford assay (Bio-Rad Laboratories). 3 mg of crude extracts were incubated for 4 h at  $4^{\circ}\text{C}$  with 200  $\mu\text{l}$  of glutathione-Sepharose beads (GE Healthcare Life Sciences, 17-0756-05). After washing with buffer A, the proteins bound to the beads were resuspended in 30  $\mu\text{l}$  of SDS-PAGE sample buffer, heated at  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min, and loaded onto SDS-PAGE gels.

**In Vitro Binding Assay**—Recombinant versions of GST-Pcl1 were purified as described above. The glutathione-Sepharose beads were incubated with yeast cell extracts at  $4^{\circ}\text{C}$  for 1 h. Beads were washed with buffer A and evaluated by immunoblot analysis.

**In Vitro Ubiquitination Assay**—GST-Dma1 protein ubiquitin (Ub) ligase activity assays were carried out essentially as described (23). The E1 enzyme (Uba1) and the E2 complex (HIS<sub>6x</sub>-Ubc13, HIS<sub>6x</sub>-Mms2) used were from Boston Biochem. The E2 enzyme Ubc4 was purified in our laboratory as a recombinant protein. The E3 GST-Dma1 and the substrate GST-Pcl1 were also purified as described above and N terminally FLAG-tagged using Ub (Sigma, U5382). The reaction was incubated for 5 h at  $37^{\circ}\text{C}$ , and the ubiquitinated species were separated on 4–15% SDS-PAGE gradient gels.

**In Vivo Ubiquitination Assays**—Pcl1 was tagged at the C terminus with HIS<sub>3x</sub>-HA-ProtA and overexpressed from the GAL1 promoter. Tagged proteins were purified using the protocol described in Ref. 28, under fully denatured conditions.

**In Vitro Kinase Assays**—Kinase assays were performed as previously described (29). Phosphorylated proteins were detected using the Pro-Q Diamond phosphoprotein gel stain kit (Invitrogen).

**Phos-tag Gels**—10 to 20  $\mu\text{g}$  of protein from cell extracts were separated in 7% polyacrylamide/SDS gels with 10 mM Phos-tag

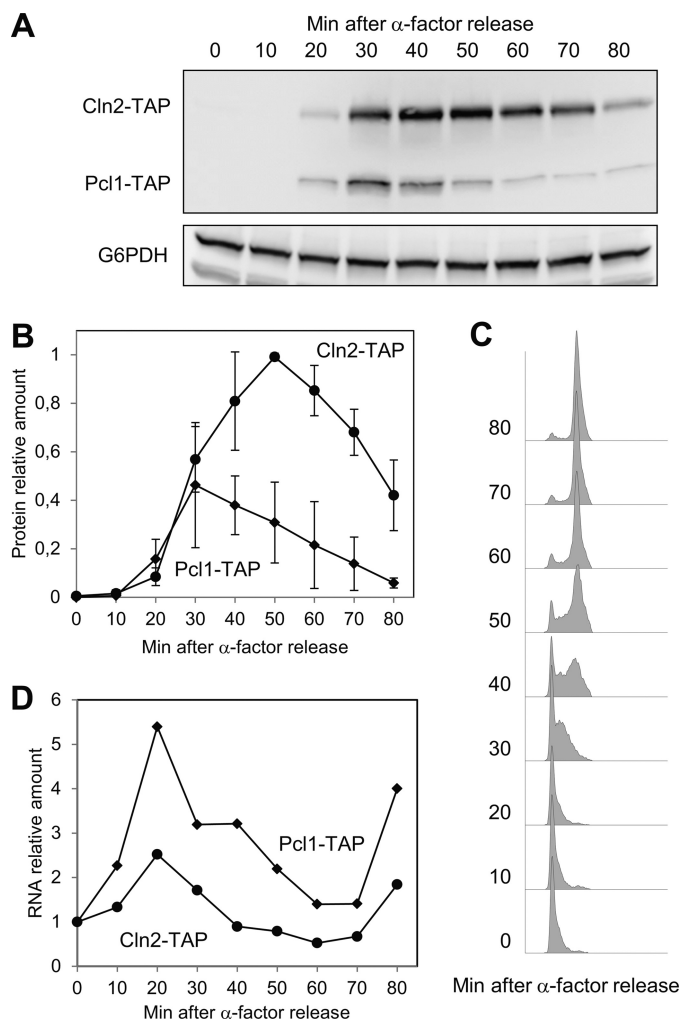
(Wako, 304-93521) plus 20 mM  $\text{MnCl}_2$  according to the manufacturer's instructions.

**LC-MS/MS Analysis**—*In vitro* ubiquitination reactions were performed as described above and reaction products were separated by SDS-PAGE on a 10% gel. Gel regions corresponding to ubiquitinated proteins were excised from the gel, reduced, alkylated, trypsinized, and analyzed using a LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) coupled to an EasyLC (Thermo Fisher Scientific (Proxeon), Odense, Denmark). Peptides were loaded directly onto the analytical column at 1.5–2  $\mu\text{l}/\text{min}$  using a wash volume of 4 to 5 times injection volume and separated by reversed-phase chromatography using a 12-cm column with an inner diameter of 75  $\mu\text{m}$ , packed with 5- $\mu\text{m}$  C18 particles (Nikkyo Technos Co., Ltd., Japan). Chromatographic gradients started at 97% buffer A and 3% buffer B with a flow rate of 300 nl/min, and gradually increased to 93% buffer A and 7% buffer B in 1 min, and to 65% buffer A/35% buffer B in 60 min. After each analysis, the column was washed for 10 min with 10% buffer A/90% buffer B. Buffer A was 0.1% formic acid in water. Buffer B was 80% acetonitrile + 0.1% formic acid in water.

The mass spectrometer was operated in positive ionization mode with nanospray voltage set at 2.2 kV and source temperature at  $250^{\circ}\text{C}$ . Ultramark 1621 for the FT mass analyzer was used for external calibration prior the analyses. Moreover, an internal calibration was also performed using the background polysiloxane ion signal at  $m/z$  445.1200. The instrument was operated in DDA mode and full MS scans with 1 microscan at a resolution of 60,000 were used over a mass range of  $m/z$  100–2000 with detection in the Orbitrap. Auto gain control was set to  $1\text{E}^6$ , dynamic exclusion (60 s) and charge state filtering disqualifying singly charged peptides was activated. In each cycle of DDA analysis, following each survey scan the top 20 most intense ions with multiple charged ions above a threshold ion count of 5000 were selected for fragmentation at normalized collision energy of 35%. Fragment ion spectra produced via collision-induced dissociation were acquired in the Ion Trap, auto gain control was set to  $5\text{e}^4$ , isolation window of 2.0  $m/z$ , activation time of 0.1 ms, and maximum injection time of 100 ms was used. All data were acquired with Xcalibur software version 2.2.

**Data Analysis**—Raw MS/MS spectra were interpreted with the Proteome Discoverer (version 1.3.0.339, Thermo Fisher Scientific) software suite for peptide identification using Sequest (version 1.20) as the search engine. The data were searched against an in-house generated database containing the 6 proteins present in the *in vitro* assay (Pcl1, Dma1, Ubc13/Mms2, Uba1, and GST). A precursor ion mass tolerance of 7 ppm was applied and up to three missed cleavage sites for trypsin were allowed. The fragment ion mass tolerance was set to 0.5 Da. Oxidation of methionine, ubiquitination (Gly-Gly) in lysine, and protein acetylation at the N-terminal were defined as variable modification; carbamidomethylation on cysteine was set as fixed modification. All spectra were manually validated.

**Statistical Analysis**—Data were expressed as mean  $\pm$  S.D. Statistical significance was determined by Student's test for the difference between two normal groups.  $p > 0.05$  was considered significant.

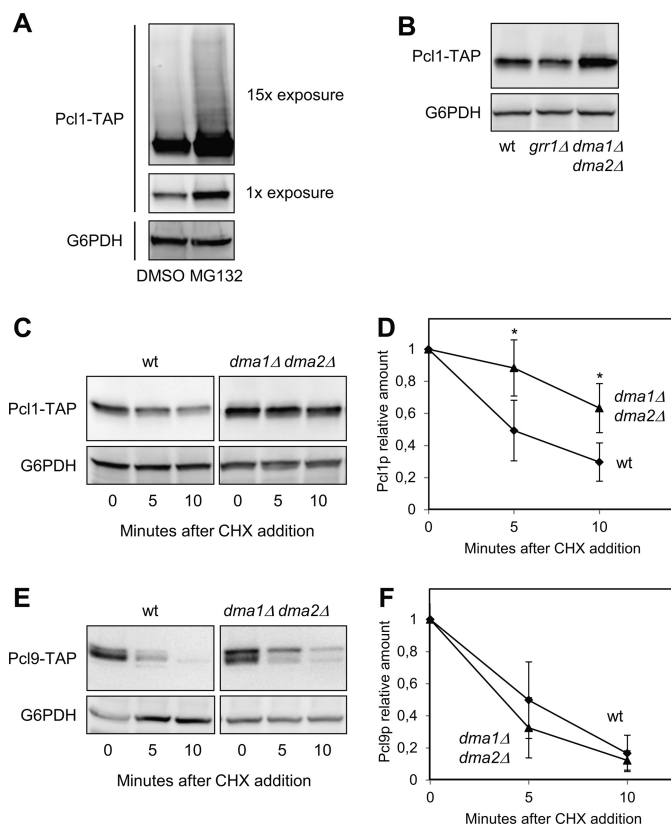


**FIGURE 1. Cln2 and Pcl1 disappear with different kinetics.** Strain YSH98 (double-tagged: *CLN2-TAP* and *PCL1-TAP*) was synchronized at G<sub>1</sub> with  $\alpha$ -factor and released in YPD at time 0. Samples were collected at the indicated times and then subjected to several analyses. *A*, Cln2 and Pcl1 protein levels were analyzed by immunoblotting using monoclonal antibodies against TAP-tag; Glu-6-PDH (*G6PDH*) detection was used as a loading control. *B*, quantification of *panel A*. Data  $\pm$  S.D. from 3 independent experiments are shown. *C*, flow cytometry analysis of DNA content of samples from *panel A*. *D*, RNA levels of Cln2 and Pcl1 of samples from *panel A*. Average from two independent experiments is shown.

**RESULTS**

*Turnover of Cln2 and Pcl1 Are Differently Regulated*—The G<sub>1</sub> cyclins Cln2 and Pcl1 might act in different physiological situations suggesting that their levels could be differently regulated by uncovered mechanisms. Thus, to elucidate these mechanisms, we examined the levels of the two proteins in a synchronous population of cells as they traversed G<sub>1</sub>.

To this end, a double TAP-tagged strain was synchronized in G<sub>1</sub>, and then released into the cell cycle. As described, both cyclins appeared simultaneously at 20 min after release (Fig. 1, *A* and *B*), which was 10 min before the cells enter into S phase (Fig. 1*C*). Surprisingly, however, the two cyclins disappeared with different kinetics (Fig. 1*B*), Pcl1 was degraded faster than Cln2. Interestingly, we observed the same result in a strain in which both genes had been tagged with the shorter tag HA, ruling out the possibility that this effect was due to the presence of a specific tag (not shown).



**FIGURE 2. Pcl1 is more stable in the absence of Dma activity.** *A*, Pcl1 levels increased in the presence of proteasomal inhibitors. Cells of strain YSH82 were incubated with either MG132 (a proteasome inhibitor) or a drug vehicle (DMSO). 60 min later, samples were taken and Pcl1-TAP protein levels were analyzed by immunoblotting using monoclonal antibodies against TAP-tag. Two different exposures of the immunoblot are shown. As in the rest of the panels, Glu-6-PDH (*G6PDH*) detection was used as a loading control. *B*, relative amounts of Pcl1 in wild type, *grr1 $\Delta$* , and *dma1 $\Delta$  dma2 $\Delta$*  strains. Cells were grown exponentially in rich media, and Pcl1-TAP levels were detected by immunoblotting using monoclonal antibodies. *C*, Pcl1 stability measurements. The indicated strains were grown exponentially in rich media and cycloheximide was added to the medium at time 0. Samples were taken at the indicated times and analyzed for Pcl1-TAP levels by immunoblotting using monoclonal antibodies. *D*, quantification of *panel C*. Data  $\pm$  S.D. from 3 independent experiments are shown. \*,  $p > 0.05$  versus WT. *E*, Pcl9 stability measurements were carried out as in *panel C*. *F*, quantification of *panel E*. Data  $\pm$  S.D. from 3 independent experiments are shown.

*CLN2* and *PCL1* are transcribed simultaneously in G<sub>1</sub> by the same transcription factors and with similar profiles. We confirmed that this was also true under our experimental conditions: both genes show the same expression pattern and peak at 30 min after release (Fig. 1*D*), concluding that differences observed in the levels of the two proteins were probably due to post-transcriptional mechanisms. Thus, our finding suggests that the turnover of each cyclin is regulated differently.

*Cln2 and Pcl1 Are Targeted by Different E3 Ligase Systems*—Several cyclins are targeted by specific ubiquitination mechanisms and degraded through the proteasome. To test if this is also true with Pcl1, we measured the amount of cyclin in cells treated with the proteasome inhibitor MG132. As shown in Fig. 2*A*, Pcl1 is accumulated in cells whose proteasome had been inhibited. Moreover, under this condition, ubiquitinated proteins are more stable, and normally appear as a “ladder” of slower-moving species on SDS-PAGE. A prominent ladder of this type of Pcl1 species, indicative of ubiquitination, was observed



## Dma1 Controls Stability of G<sub>1</sub> Cyclins

upon long exposures of Western blots of extracts from cells treated with MG132 (Fig. 2A). This observation is consistent with the idea that Pcl1 should be destroyed by ubiquitination targeting and subsequent proteomic degradation. Thus, we decided to search for the ubiquitin ligase involved in such targeting.

Despite the high degree of similarity between Pcl1 and Cln2 at the protein sequence level, Pcl1 lacks the 200 central amino acids of Cln2, which encompass the putative PEST regions as well as a specific domain that promotes ubiquitination by targeting to the E3 ligase Grr1 (10). The absence of this region discards the possibility that Pcl1 was recognized by Grr1. Indeed, whereas the levels of Cln2 are elevated in the *grr1Δ* strain (9), the levels of Pcl1 remain normal (Fig. 2B).

To discover the E3-ligase of Pcl1, we transformed a centromeric plasmid carrying *PCL1* to a collection of 18 mutants of different ubiquitination systems, with the aim to find an increase in the amount of cyclin in one of the mutants (see "Experimental Procedures"). This type of screening usually yields small differences, but can help to exclude those strains that do not differ with respect to the amount of Pcl1 in wild type cells. We only observed elevated levels of Pcl1 in two strains: *dia1Δ* and *dma1Δ dma2Δ*. Next, we tested the stability of Pcl1 in the *dma1Δ dma2Δ* mutant strain by treating cells with cycloheximide. This sort of experiment allows the determination of a protein half-life independently of the initial mRNA levels. In wild type cells, Pcl1 has a half-life of  $6.1 \pm 0.2$  min (Fig. 2D), and the same result is observed in the single mutants *dma1Δ* or *dma2Δ* (not shown). However, in the double mutant *dma1Δ dma2Δ*, Pcl1 is strongly stabilized (Fig. 2, C and D).

Finally, we tested whether Dma1 and Dma2 are also involved in control of the stability of Pcl9, a cyclin also present in G<sub>1</sub>. As shown in Fig. 2, E and F, Pcl9 protein has an extremely short half-life (around 4 min) that is not significantly affected by the absence of Dma proteins, suggesting that Dma ubiquitin ligases have a specific effect on Pcl1 stability. Together our findings strongly suggest that Cln2 and Pcl1 are targeted by different E3 ligase systems and that Dma1 and -2 may control G<sub>1</sub> processes by regulating the stability of Pcl1.

**Dma1 Interacts with Pcl1 and Targets It for Destruction**—We initially tested the possibility that the E3 ligase Dma1 regulates Pcl1 stability through direct targeting by constructing an affinity system based on the expression of Pcl1 in bacteria as a GST fusion protein. Recombinant GST-Pcl1 was then used to bind the Dma1-TAP present in yeast cell extracts. Using this approach, Dma1 was specifically detected via immunoblot analysis of the material retained by the affinity system, indicating that both proteins interact (Fig. 3A).

We next checked whether Pcl1-Pho85 complexes interact with Dma1 in yeast cells *in vivo*. As shown in Fig. 3B, pull-down of Pho85-GST enables the detection of Dma1, suggesting that Pcl1 and Dma1 proteins also interact *in vivo*.

An *in vitro* autoubiquitination activity of Dma1 and Dma2 has been described (23). We attempted to reconstitute ubiquitination reactions consisting of yeast Uba1, FLAG-tagged Ub, His-tagged E2 enzymes (Msm2 and Ubc13), and full-length GST-Dma1 all purified from *E. coli*. As shown in Fig. 3C, this reconstituted system was already able to form long-chain Ub

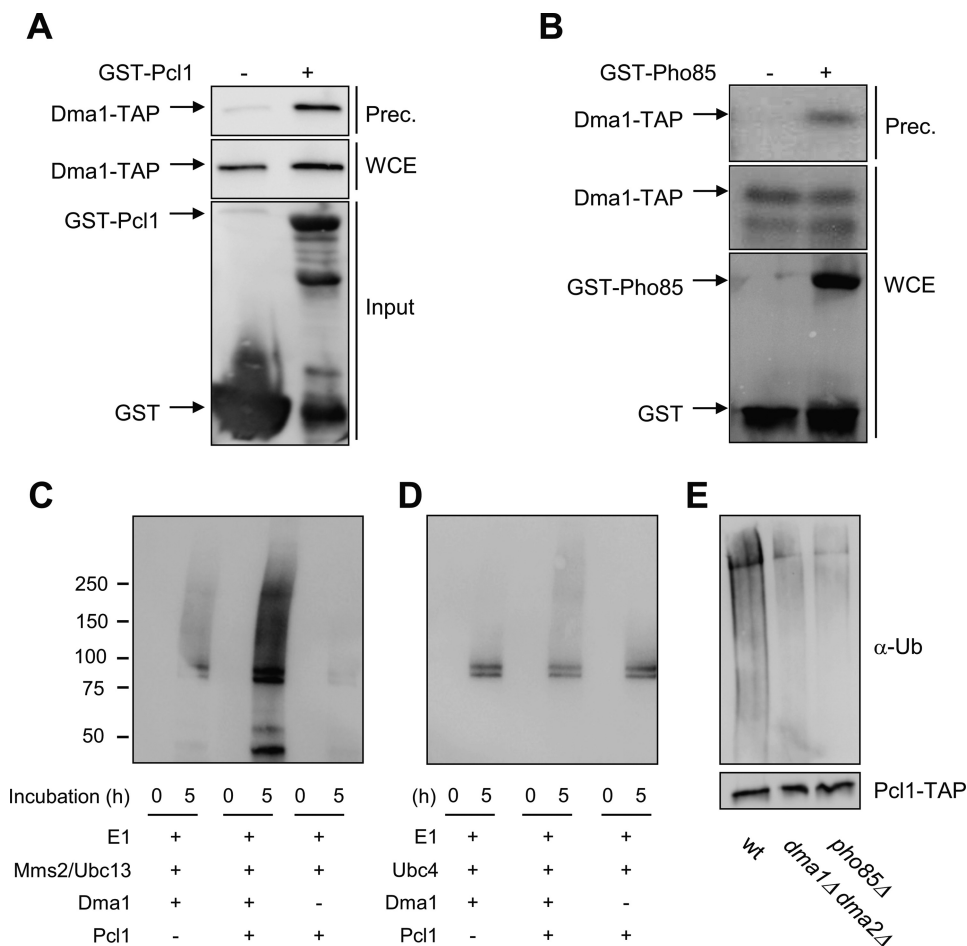
adducts as described (28), indicating that Dma1 was active. Interestingly, when Pcl1 was present, the levels of polyubiquitinated species were far higher, corroborating a Pcl1 ubiquitination that is strictly dependent on the presence of Dma1 associated to Mms2/Ubc13. Ubc4 is another E2 enzyme that promotes Dma1 activity and we wanted to test if such complexes can also ubiquitinate Pcl1. Fig. 3D shows that Pcl1 is also ubiquitinated *in vitro* by the Dma1-Ubc4 complexes, although clearly to a lesser extent.

We carried out the same ubiquitination assay, and after 5 h of incubation the reaction mixture was analyzed by mass spectrometry. The spectra clearly showed that some of the ubiquitinated peptides are coming from Pcl1, pointing out residues Lys-82 and Lys-121 as the ones ubiquitinated in our *in vitro* assay (supplemental data). The experiment and posterior mass spectrometry analysis was done in duplicate.

Finally, we decided to check the *in vivo* ubiquitination status of Pcl1. To this end, Pcl1 was double tagged at its endogenous C terminus with a His<sub>6</sub> and TAP epitopes and then purified from denatured lysates using nickel-nitrilotriacetic acid resin (28). Pcl1 ubiquitination levels were determined by immunoblotting for ubiquitin and, to validate that each protein was indeed purified, the TAP epitope also was blotted for analysis. Through this approach, we found that Pcl1 ubiquitination levels were clearly lower in the *dma1Δ dma2Δ* strain, indicating that Pcl1 ubiquitination *in vivo* depends on the presence of Dma proteins (Fig. 3E). All these results show that Dma1 interacts with Pcl1 and targets it for destruction, a finding that points Pcl1 as the first *bona fide* target of Dma ubiquitin ligases in *S. cerevisiae*.

**A Specific Domain Is Necessary for the Dma1-dependent Pcl1 Destabilization**—As shown above, Dma1 affects the stability of Pcl1, but not the stability of the very closely related cyclin Pcl9, suggesting that Pcl1 has a region that could facilitate the interaction with Dma1. Alignment of Pcl1 and Pcl9 reveals that the two proteins share a high level of sequence conservation, especially in the N-terminal, except for a short region of 20 amino acids. We wondered whether this region could be a docking site for Dma1. Deletion of amino acids 29 to 36 (a region we called the Dma1 Docking Domain (DDD)) greatly stabilizes Pcl1 *in vivo* (Fig. 4, A and B), pointing to this region as an important determinant for Dma1 destabilization. Accordingly, the recombinant *pcl1DDDD* mutant is less ubiquitinated *in vitro* by Dma1 protein (Fig. 4C). It is worth noting that this mutated version of Pcl1 is fully active, as it is still able to allow the phosphorylation of Sic1 (not shown); consequently, we ruled out the possibility that stabilization of the DDD deletion mutant could be due to a general loss of Pcl1 integrity. Also, it is important to stress that the DDD mutants are still phosphorylated by the Pho85 kinase (not shown), excluding the possibility that increased stability comes from the inability to be phosphorylated by the CDK.

High-throughput analyses have revealed proteins associated to Dma1 (30), although the relevance of these interactions remains unknown. Interestingly, several of these proteins contain the DDD motif (including Sid4, a Dma1 substrate in *Schizosaccharomyces pombe* (28)). We performed a ClustalW analysis of the sequence of these proteins, which yielded a consensus sequence for the DDD region: LRVVPS, with the presence of conservative changes in the hydrophobic or charged



**FIGURE 3. Dma1 interacts and ubiquitinates Pcl1.** *A*, binding *in vitro* assay. Recombinant GST-Pcl1 was purified from *E. coli* and incubated with yeast cell extracts of the strain YPC708 (with a genomic TAP-tagged Dma1) for 45 min, and purified with glutathione-Sepharose beads. Samples were analyzed by immunoblot analysis to detect Dma1-TAP proteins. *WCE*, whole cell extract; *Input*, quantity of Pcl1 used in the trapping. *B*, Pcl1-Pho85 complexes co-immunoprecipitate with Dma1 *in vivo*. Yeast extracts from strains containing untagged *PHO85* or GST-*PHO85* and TAP-tagged *DMA1* (from the chromosomal locus) were precipitated with glutathione-Sepharose beads, and then probed using specific antibodies. *C* and *D*, Pcl1 is ubiquitinated *in vitro* by Dma1. Ubiquitination assays were done by *in vitro* reconstitution of E1-E2-Dma1 complexes (see "Experimental Procedures"). *Panel C* shows Dma1 activity associated to the Mms2-Ubc13 E2 complexes. *Panel D* shows Dma1 activity associated to the Ubc4 E2 enzyme. The reaction was started at time 0 by adding ATP. Samples were taken at 0 and 5 h and analyzed for ubiquitination levels by immunoblotting using α-Ub antibody. *E*, Pcl1 is ubiquitinated *in vivo* in a Dma1-dependent manner. The indicated strains carrying a centromeric plasmid with *PCL1*-His<sub>6x</sub>-TAP expressed under the *GAL* promoter was grown for 4 h in synthetic complete medium with galactose as a carbon source. The same amount of immunopurified Pcl1-His was separated by SDS-PAGE gels and visualized by immunoblot using an ubiquitin antibody (*top panels*). To validate the levels of Pcl1, the blot was also analyzed using an α-TAP antibody (*bottom panel*).

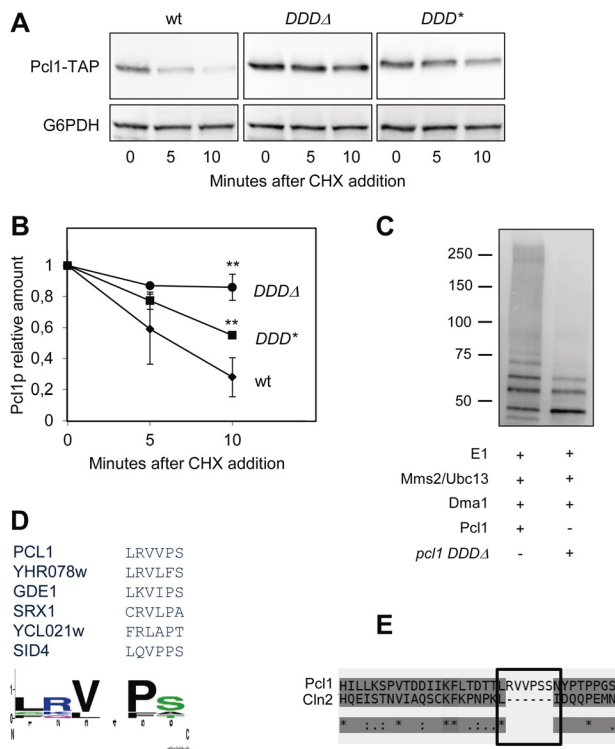
amino acids (Fig. 4*D*). Interestingly, Cln2 do not have this sequence (Fig. 4*E*), in accordance to the fact that this cyclin is not affected by the presence of Dma1 activity (not shown). To test the importance of such a sequence we changed Pro-5 to Asn, and this substitution strongly stabilized Pcl1 (Fig. 4, *A* and *B*), thereby suggesting that the integrity of DDD is important for the stability of the cyclin. We are currently investigating whether this region could be a true docking domain for Dma1.

*Pcl1 Is destabilized by the CDK Pho85*—CDK kinases usually phosphorylate their own cyclins, thereby targeting them for destruction, in a negative feedback loop. Hence, we decided to measure Pcl1 protein levels in the absence of Pho85 activity, finding that these levels are six times greater in *pho85Δ* mutants than in wild type cells (Fig. 5*A*). Furthermore, we observed that the half-life of Pcl1 is increased in the absence of Pho85 (Fig. 5, *B* and *C*) to the same extent as Pcl9 (Fig. 5*D*). Accordingly, Pcl1 is less ubiquitinated *in vivo* in the absence of Pho85 activity (Fig. 3*E*). Together these results show that the CDK Pho85 destabi-

lizes Pcl1 probably through a phosphorylation-dependent mechanism.

*Pcl1 Is Phosphorylated and Targeted for Destruction by Pho85*—We tested this latter possibility by doing *in vitro* phosphorylation experiments using recombinant proteins purified from *E. coli*. Pcl1 has six canonical sites of phosphorylation by Pho85 (Fig. 6*A*) (31). We purified different versions of Pcl1 that carried mutations at these SP/TP sites, and then incubated them with recombinant Pho85 in the presence of ATP. Fig. 6*B* clearly shows that wild type Pcl1 is phosphorylated by Pho85, whereas a mutated version in which Thr<sup>39</sup> and Ser<sup>43</sup> are each replaced with an alanine (the *pcl1-2A* version) is markedly less phosphorylated by Pho85. This result does not exclude phosphorylation of other residues, although clearly to a lower extent. Indeed, a Pcl1 that carries a substitution to alanines in the other four SP/TP sites (the *pcl1-4A* version) is phosphorylated to the same extent as wild type Pcl1. This result indicates that Thr<sup>39</sup> and Ser<sup>43</sup> of Pcl1 are the major sites phosphorylated by Pho85

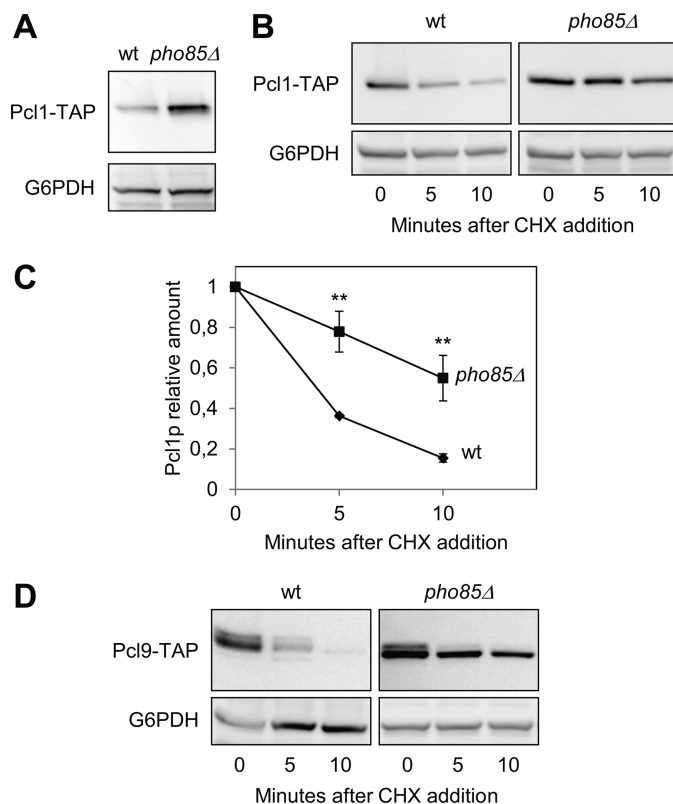
## Dma1 Controls Stability of G<sub>1</sub> Cyclins



**FIGURE 4. Pcl1 has a putative docking site for Dma1.** *A*, the integrity of the DDD region is essential to maintaining Pcl1 instability *in vivo*. Different alleles of Pcl1 were expressed in wild type cells from a centromeric plasmid under its own promoter: Pcl1 wild type, Pcl1 with a deletion in the DDD region (*DDDΔ*), and Pcl1 with mutations V31N and P33N (*DDD\**). All these strains were grown exponentially in rich medium and, at time 0, cycloheximide was added to the medium. Samples were taken at the indicated times and analyzed by immunoblotting using monoclonal antibodies to determine Pcl1-TAP levels. Glu-6-PDH (*G6PDH*) detection was used as a loading control. *B*, quantification of *panel A*. Data  $\pm$  S.D. from 3 independent experiments are shown. \*\*,  $p > 0.01$  versus WT. *C*, *pc11 DDDΔ* is less ubiquitinated *in vitro* than Pcl1. Ubiquitination assays were done by *in vitro* reconstitution of E1-Mms2-Ubc13-Dma1 complexes (see "Experimental Procedures"). The ubiquitination levels of Pcl1 or *pc11 DDDΔ* are shown. The reaction was started at time 0 by addition of ATP and finished at 3 h. Samples were taken and analyzed for ubiquitination levels by immunoblotting using  $\alpha$ -Ub antibody. *D*, proposed consensus DDD sequence. WebLogo3 analysis (50) of the DDD regions present in several Dma-interacting proteins. *E*, T-Coffee alignment between the N-terminal region of cyclins Pcl1 and Cln2. Cln2 presents a gap that exactly matches the proposed DDD region.

*in vitro*. It is interesting to note that these two sites are the nearest to the DDD sequence.

Pcl1 from wild type yeast cells gives a sharp band in standard gel electrophoresis. However, when analyzing extracts in Phos-tag large electrophoresis gels, we distinguished several bands of Pcl1, indicating that such cyclin is phosphorylated *in vivo*. Moreover, the mutant *pc11-2A* show a clear change in lower mobility bands suggesting that the mutant is phosphorylated to a lesser extent *in vivo* (Fig. 6C). More interestingly, the alanine substitution of Thr<sup>39</sup> and Ser<sup>43</sup> leads to strong stabilization of Pcl1 (Fig. 6, *D* and *E*), indicating that *in vivo* phosphorylation of Thr<sup>39</sup> and Ser<sup>43</sup> is essential for destabilizing the cyclin. As described to other cyclins (10), the substitution of these phosphoacceptor sites by glutamic acid does not mimic the phosphorylation effect and does not decrease the stability of Pcl1 (not shown), suggesting that a negative charge at those two Pcl1 residues is not sufficient for the Dma1 destabilization. Finally, we measured the half-life of the *pc11-2A* version in a WT and a

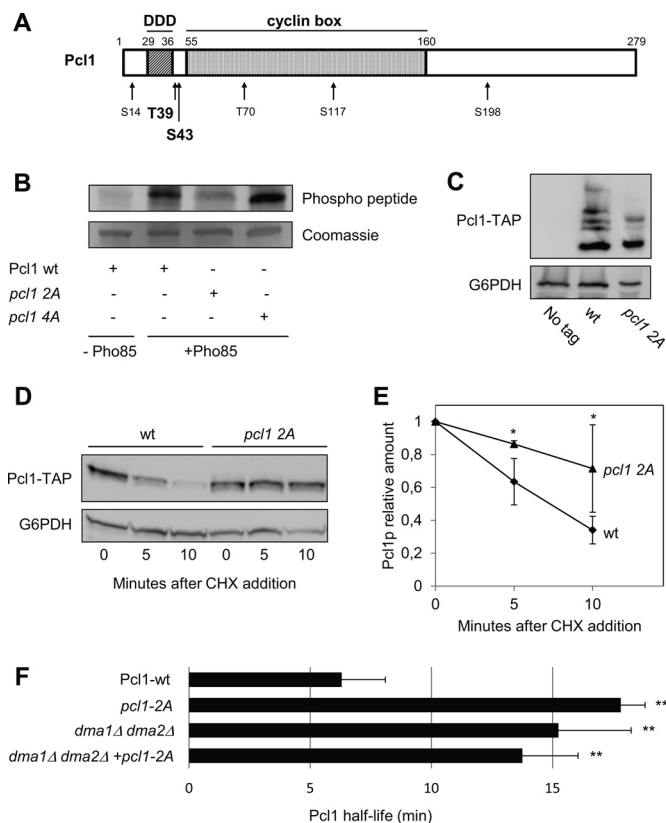


**FIGURE 5. Pcl1 is destabilized by Pho85 activity.** *A*, Pcl1 protein levels are higher in the *pho85Δ* strain. Wild type and *pho85Δ* cells were grown exponentially in YPD, and then Pcl1-TAP levels were determined using immunoblotting with monoclonal antibodies. Glu-6-PDH (*G6PDH*) detection was used as a loading control in each *panel*. *B*, Pcl1 is stabilized in the *pho85Δ* strain. Wild type and *pho85Δ* cells were grown exponentially in rich medium, and cycloheximide was added to the medium at time 0. Samples were taken at the indicated times, and analyzed for Pcl1-TAP levels by immunoblotting using monoclonal antibodies. *C*, quantification of *panel B*. Data  $\pm$  S.D. from 3 independent experiments are shown. \*\*,  $p > 0.01$  versus WT. *D*, Pcl9 stability is also controlled by Pho85. Analyses were carried out as in *panel B*.

*dma1Δ dma2Δ* strain, and *pc11-2A* was not further stabilized (Fig. 6F), indicating that there was no additive effect between Pho85 and the Ub-ligase.

**Pho85 and Dma1 Activities Are Essential for Controlling Pcl1 Levels in the Cell Cycle**—At this point, we propose that during G<sub>1</sub>, Pcl1 is phosphorylated by Pho85 at the closest residues to the DDD sequence, and that this event increases the ubiquitination of Pcl1 by Dma1 (and probably by Dma2), allowing rapid destruction of the cyclin (see a scheme of the proposed model in Fig. 7A). Based on this model, we predicted that cells require both Pho85 and Dma1 activity to down-regulate Pcl1 at the end of G<sub>1</sub>. To test this prediction we tracked the levels of Pcl1 from different strains synchronized in G<sub>1</sub> by  $\alpha$  factor and subsequently released in rich media. In wild type cells, Pcl1 appears 20 min after release and rapidly disappears, being almost completely depleted at 50 min (Fig. 7C). The nonphosphorylatable version of *pc11-2A* is clearly present for longer periods during the cell cycle (Fig. 7B). Similarly, the absence of Dma1/2 proteins also leads to accumulation of Pcl1 beyond the G<sub>1</sub>/S transition. The differences observed cannot be explained by differences in the progression through G<sub>1</sub>, because the three strains enter into G<sub>2</sub> with the same kinetics (Fig. 7B). Thus, we con-

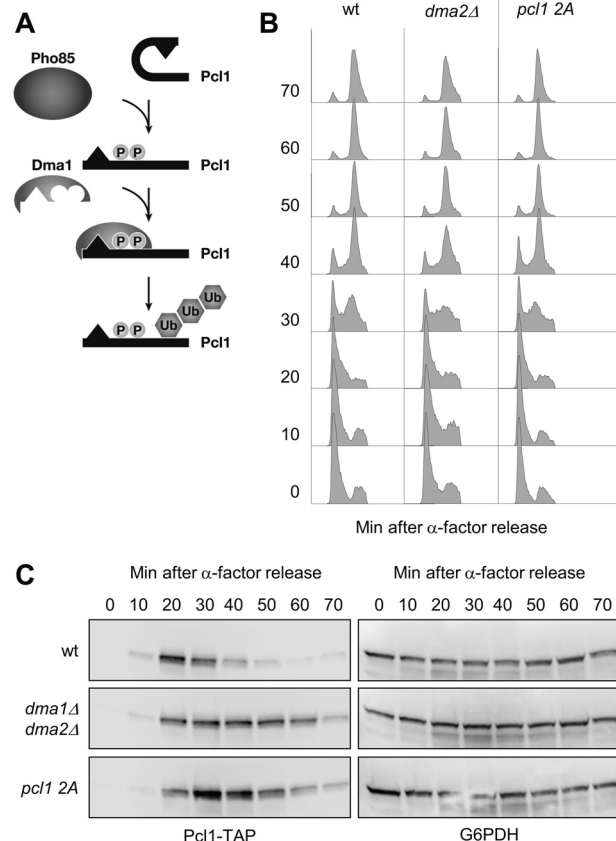




**FIGURE 6. Pcl1 is phosphorylated by Pho85.** *A*, scheme of the Pcl1 protein. Numbers on top indicate the amino acid positions. The DDD (Dma1 Docking Domain) region is located between amino acids 29 and 36. Numbers on bottom refer to the potential CDK-phosphorylation sites. The proposed Pho85-phosphorylation sites are shown in bold type (see below). *B*, Pho85 phosphorylates Pcl1 *in vitro*. Recombinant GST-Pho85 purified from bacteria was incubated with different GST-Pcl1 versions (also purified from bacteria) in the presence of ATP. The 3 Pcl1 versions were: Pcl1 WT, *pcl1 2A* (T39A; S43A), and *pcl1 4A* (S14A; T70A; S117A; S198A). Coomassie staining was used as a loading control. *C*, gel electrophoresis in the presence of 10 mM Phos-tag was carried out to resolve the different phosphorylation populations between Pcl1-TAP and *pcl1 2A*-TAP. Pcl1 levels were analyzed by immunoblotting using monoclonal antibodies. In all panels of the figure, Glu-6-PDH (*G6PDH*) detection was used as a loading control. *D*, nonphosphorylatable versions of Pcl1 are stabilized *in vivo*. Pcl1 WT or *pcl1 2A* were expressed in wild type cells from a centromeric plasmid under its own promoter. Both strains were grown exponentially in rich medium, and cycloheximide was added to the medium at time 0. Samples were taken at the indicated times and analyzed using immunoblotting with monoclonal antibodies to determine Pcl1-TAP levels. *E*, data  $\pm$  S.D. from 3 independent experiments (performed as in panel C) is shown. \*,  $p > 0.05$  versus WT. *F*, Pcl1 half-life is Dma1 and Pho85 dependent. Pcl1-TAP or *pcl1 2A*-TAP were analyzed by Western blot in the noted strains after the addition of cycloheximide (CHX). Data  $\pm$  S.D. from 3 independent experiments are shown. \*\*,  $p > 0.01$  versus WT.

cluded that Pho85 and Dma1 are necessary to control Pcl1 levels during the cell cycle.

**G<sub>1</sub> Cyclin Levels Are Controlled in Response to Nutrients**—An important question arising in this work is: what is the advantage of controlling G<sub>1</sub> cyclins by two different ubiquitination systems? We reasoned that this double control could enable better response to diverse environmental situations. In this regard, Grr1 has been implicated in response to variations in nutrient levels, a finding that links cell cycle control to nutrient availability (9). Dma1 has also been related to nutrient response and G<sub>1</sub> control (32), although the underlying molecular mechanism remains unknown. In this context, we sought to ascertain the behavior of the two cyclins under different nutrient situations.

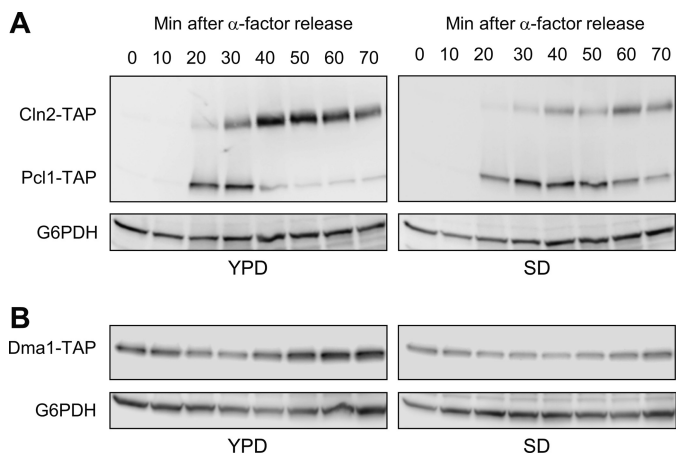


**FIGURE 7. Pho85 and Dma1 activities are essential for controlling Pcl1 levels in the cell cycle.** *A*, proposed model of Pcl1 targeting. Pho85 phosphorylates Pcl1 allowing the recognition by Dma1 that polyubiquitinates and targets Pcl1 for destruction. *B*, the DNA content from cells collected in the experiment shown in C was analyzed by flow cytometry at the indicated time points. *C*, Pcl1 requires Dma1 activity to be destabilized under physiological conditions. Wild type cells carrying a Pcl1 or *pcl1 2A* version expressed from a centromeric plasmid and *dma1Δ dma2Δ* cells expressing Pcl1, were synchronized with  $\alpha$ -factor, and released in rich medium. Samples were collected at the indicated times and then subjected to several analyses. Glu-6-PDH levels were used as a loading control.

To this end, we synchronized yeast cells in G<sub>1</sub>, released them either in rich media (YPD) or in a synthetic complete media (SD), and then followed the levels of Pcl1 and Cln2. In YPD, Cln2 was more abundant than Pcl1; pointing to the relevance of Cln2 in this growing condition (Fig. 8A). However, when the cells are released in SD media, the cyclins seem to have inverted profiles: Pcl1 is more abundant than Cln2. Considering that the two cyclins are transcribed at the same levels under both conditions (not shown), we reasoned that the stability of Cln2 and Pcl1 proteins is differentially affected according to the nutrient status.

It has been predicted that Dma1 levels might be modulated by nutrient conditions (32). Thus, we asked whether the high levels of Pcl1 in SD media could be a consequence of the down-regulation of Dma1 activity. This was indeed the case: Dma1 levels in cells grown in SD were clearly lower than those of cells grown in YPD (Fig. 8B). This result indicates that nutrient status regulates levels of Dma ubiquitin ligases, and suggests that physiological control of Pcl1 depends on Dma1 activity. In summary, we propose here that cyclins Pcl1 and Cln2 are degraded by different mechanisms, and that this differential control

## Dma1 Controls Stability of G<sub>1</sub> Cyclins



**FIGURE 8. G<sub>1</sub> cyclin levels are controlled in response to nutrients.** *A*, Pcl1 levels are controlled in response to nutrients. The strain YSH98 (double tagged: *CLN2-TAP* and *PCL1-TAP*) was synchronized at G<sub>1</sub> with  $\alpha$ -factor. At time 0 the cells were released in either YPD or SD media. Samples were collected at the indicated times, and Cln2 and Pcl1 levels were analyzed by immunoblotting using monoclonal antibodies against TAP-tag. Glu-6-PDH (*G6PDH*) levels were used as a loading control. *B*, Dma1 levels are controlled in response to nutrients. Strain YPC708 was synchronized, sampled, and analyzed as described in *panel A*.

could be essential to ensure correct progression through G<sub>1</sub> in distinct situations of nutrient availability.

## DISCUSSION

There are high number of cyclins that control the G<sub>1</sub> phase of eukaryotic cell cycle (33). Such multiplicity is thought to facilitate cellular adaptation to different physiological situations; accordingly, the levels of different cyclins should be differentially regulated. Here we provide substantial evidence that in *S. cerevisiae*, two redundant cyclins expressed at START by the same transcription factors are post-translational regulated by two different E3 ligase systems.

Our motivation for this work came from our earlier observation that Pcl1 is destroyed at the G<sub>1</sub>/S boundary, unlike Cln2, which persists until the end of the S phase. Based on this result, we suspected that in *S. cerevisiae* different ubiquitination systems might be involved in destroying distinct G<sub>1</sub> cyclins.

**A Novel Function for Dma1: G<sub>1</sub> Cyclin Targeting**—The screening designed in this work enabled us to determine the E3 ligases Dia2, and Dma1/2 as controllers of the Pcl1 levels. Interestingly, absence of Dia2 (the name comes from *Dig into agar*) leads to an invasive growth phenotype (34). It is tempting to speculate that the control of Pcl1, a cyclin involved in morphogenetic events, could be one of the roles of Dia2. Regardless, cycloheximide experiments show that Dia2 activity does not affect Pcl1 stability (not shown), and we propose that the observed effect could be transcriptional. In contrast, we have demonstrated that Dma1 activity does affect Pcl1 stability and that Pcl1 is actually a Dma1 substrate, both *in vitro* and *in vivo*. We think that this result is important for various reasons.

First, the Dma ubiquitin ligases are well conserved across evolution and have been demonstrated to control the cell cycle in diverse organisms: in humans *CHFR* regulates the antepause checkpoint (18); in *S. pombe*, Dma1 controls the SIN, at the end of mitosis (35); and in *S. cerevisiae*, it controls G<sub>2</sub> progression (23). Thus, considering the new G<sub>1</sub> role that we describe here,

the Dma ubiquitin ligases can be considered as general cell-cycle regulators.

Second, although Dma enzymes were discovered 10 years ago, Pcl1 is the first *bona fide* substrate of Dma1 described in *S. cerevisiae*. Dma1 also controls Swe1 and Elm1 localization but the mechanism underlying such regulation is unknown and could be an indirect effect (27, 36). Interestingly, Dma1 affects the functionality of septins (21), Swe1, Elm1, and Pcl1, all of these proteins are located at the bud neck, suggesting that the action of the Dma1 is focused mainly at the bud neck.

**Different E3 Ligases Control G<sub>1</sub> Cyclin Turnover**—The novelty suggested from this work is that the multiplicity of G<sub>1</sub> cyclins is controlled by different E3 ligase systems. To date, SCF was the only E3 involved in the targeting for destruction of several G<sub>1</sub> elements. Indeed, SCF<sub>Cdc4</sub> is required for degradation of CDK inhibitors Sic1, Far1, Cdc6, and Gcn4 (36–38). Furthermore, SCF<sub>Grr1</sub> targets cyclins Cln1 and Cln2 (and probably Cln3) for degradation (7, 39). However, our present findings indicate that at least another E3 ubiquitin ligase helps orchestrate G<sub>1</sub> destruction.

The *in vitro* ubiquitination systems reconstituted in our laboratory have shown that Pcl1 is ubiquitinated by Dma1 to a greater extent when it is associated with the Msm2/Ubc13 dimer than when it is associated to Ubc4. The nature of ubiquitin conjugation by E2-E3 complexes is critical because the outcome of ubiquitination is usually determined by the topology of the conjugate. Ubc13-Msm2 is a heterodimeric E2 ligase that forms Lys<sup>63</sup> chains of polyubiquitin, whereas Ubc4 shows no specificity in ubiquitin lysines and the linkage is usually driven by the ubiquitin ligase (40, 41). Even though Lys<sup>48</sup>-linked polyubiquitination is the usual signal for directing a protein to proteasomal destruction, Lys<sup>63</sup>-linked ubiquitin chains have been reported to be involved in some cases of proteasome-dependent degradation (42, 43). Thus, we postulate here that targeting of Pcl1 for degradation by Dma1 may occur via Ubc4 or Msm2/Ubc13.

**Specificity of Dma1-Pcl1 Interactions**—The specificity of E3 ligase interactions with their substrates probably depends on specific destruction box signals in the latter. In this regard, a short sequence in Cln2 has recently been described as a possible docking site for Grr1 (10). Here we provide preliminary evidence that Dma ubiquitin ligases also might recognize their substrates through a specific sequence, which we have named the DDD. The DDD sequence found in Pcl1 is LRVVPS. However, we must emphasize the fact that, although some amino acids are represented in a greater proportions (see logo of Fig. 4D), the DDD region allows for conservative changes in sequence. In the absence of crystallographic data to confirm our hypothesis, we propose here the sequence L(O)V(J)PS(X)N as a general DDD sequence (where O represents any charged amino acid, J represents any hydrophobic amino acid, and X any amino acid). Interestingly, we searched for this sequence in the yeast proteome and found it in several proteins that control the cell cycle. We are currently investigating if such proteins might be undescribed substrates of Dma1.

**Pcl1 Is Phosphorylated and Targeted for Destruction by Its Own CDK**—Degradation of Pcl1 after self-catalyzed phosphorylation ensures self-limitation of the activity of the Pho85-Pcl1

complex *in vivo*. This is not a surprising result, given that the cyclins Pcl5 and Pcl9 are destabilized by Pho85 activity (Refs. 45 and 46, and this work), and that Cln1 and Cln2 are also targeted by their own CDK, Cdc28. Thus, our results reinforce the idea that phosphorylation is a general mechanism conserved among the CDKs to control the amount of their own cyclins.

We show that Pcl1 is phosphorylated at Thr<sup>39</sup> and Ser<sup>43</sup>. Without excluding other possible residues, we propose that these two residues are the most physiologically relevant to controlling stability of the protein. Indeed, the substitution to alanines of these two residues renders Pcl1 highly stable and, interestingly, the same two residues are found to be the uniquely phosphorylated *in vivo* in a high throughput analysis (44).

The fact that Thr<sup>39</sup> and Ser<sup>43</sup> are the two nearest residues to the DDD suggests that this phosphorylation could somehow facilitate interaction between Pcl1 and Dma1. One possibility is that the DDD is usually hidden in Pcl1, but becomes exposed upon phosphorylation of these residues by Pho85, thereby facilitating the interaction between Pcl1 and the E3 ligase. A similar situation has been described in Cln2 that needs a specific region plus the neighboring phosphorylation to be degraded by the Grr1 (10).

**Multiplicity in Control, Flexibility in Decisions**—The double system of cyclin degradation proposed in this work is probably widespread. For instance, Clb5 and Clb6, which are essential for proper management of S phase, are degraded by anaphase-promoting complex and SCF, respectively (27). Clb5 and Clb6 perform different functions, and accumulation of Clb6 outside of S phase is toxic to cells. However, the G<sub>1</sub> cyclins in *S. cerevisiae* seem to be functionally redundant, which begs the question: are the complexes Cln2-Cdc28 and Pcl1-Pho85 differentially regulated?

Although we cannot definitively answer this question, we have ruminated upon a suggestion that both CDK complexes regulate proteins in the same way but under different conditions (45). This idea is supported by the finding that the G<sub>1</sub> profile of Cln2 and Pcl1 levels depends on nutrient availability. It is striking that Grr1 and Dma1 are also related to the response to changes in nutrient availability (9, 32), and we show here for the first time that Dma1 levels are regulated by nutrient status. Albeit we do not know the mechanism underlying the down-regulation of Dma1, we propose that this process is essential to increase the levels of cyclin Pcl1. Overall, our work supports the notion that the multilayered control of different G<sub>1</sub> CDK-cyclin complexes furnishes cells with the flexibility to adapt to new situations.

**A New Conserved Role for Dma1?**—Protein sequence alignments between Pcl1 from *S. cerevisiae* and its orthologs from other *Saccharomyces* species indicate that the two putative CDK phosphorylation sites and the DDD sequence are extremely conserved. Moreover, the Pcl1 of *Candida* and other, less related yeasts also contain the DDD region. More interestingly still, is the fact that DDD and the neighboring sequence are conserved in the uncharacterized human cyclin I, which is most similar to Pcl1, and also lacks PEST regions (46). These observations suggest that the destruction of Pcl1 at the G<sub>1</sub>/S transition may be conserved through the evolution.

In humans, Dma proteins (named Chfr) play a specific role in the antephasis checkpoint. The significance of *CHFR* function in mitosis is reflected by the finding that this E3 ligase is absent or nonfunctional in several transformed cell lines and tumors (47). The study of *CHFR*-null mice presents the *CHFR* as a tumor suppressor that normally acts to prevent aberrant mitosis (48). Although the final target of Chfr is unknown, several lines of evidence support the idea that Cyclin A may be the initial target of the antephasis checkpoint (49) thus pointing to the possibility that, in mammals, Chfr would also control cyclin stability. Our laboratory is currently seeking to determine which aspects of the mechanism that we present here are conserved in mammals.

**Acknowledgments**—We gratefully acknowledge F. Posas for advice and valuable mentoring of J. Clotet all these years. We also gratefully acknowledge S. Menoyo, B. Andrews, and M. Aldea for stimulating discussions, F. Posas for providing yeast strains, M. Pérez for technical assistance, and O. Mirallas for collaboration in some of the experiments. We also thank Armando Terrero for the execution of the scheme shown in Fig. 7A.

## REFERENCES

- Wittenberg, C., and Reed, S. I. (2005) Cell cycle-dependent transcription in yeast. Promoters, transcription factors, and transcriptomes. *Oncogene* **24**, 2746–2755
- Moffat, J., and Andrews, B. (2004) Late-G<sub>1</sub> cyclin-CDK activity is essential for control of cell morphogenesis in budding yeast. *Nat. Cell Biol.* **6**, 59–66
- Huang, K., Ferrin-O'Connell, I., Zhang, W., Leonard, G. A., O'Shea, E. K., and Quioco, F. A. (2007) Structure of the Pho85-Pho80 CDK-cyclin complex of the phosphate-responsive signal transduction pathway. *Mol. Cell.* **28**, 614–623
- Wysocki, R., Javaheri, A., Kristjansdottir, K., Sha, F., and Kron, S. J. (2006) CDK Pho85 targets CDK inhibitor Sic1 to relieve yeast G<sub>1</sub> checkpoint arrest after DNA damage. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 908–914
- Irniger, S., and Nasmyth, K. (1997) The anaphase-promoting complex is required in G<sub>1</sub> arrested yeast cells to inhibit B-type cyclin accumulation and to prevent uncontrolled entry into S-phase. *J. Cell Sci.* **110**, 1523–1531
- Jacobson, M. D., Gray, S., Yuste-Rojas, M., and Cross, F. R. (2000) Testing cyclin specificity in the exit from mitosis. *Mol. Cell Biol.* **20**, 4483–4493
- Willems, A. R., Lanker, S., Patton, E. E., Craig, K. L., Nason, T. F., Mathias, N., Kobayashi, R., Wittenberg, C., and Tyers, M. (1996) Cdc53 targets phosphorylated G<sub>1</sub> cyclins for degradation by the ubiquitin proteolytic pathway. *Cell.* **86**, 453–463
- Benanti, J. A., Cheung, S. K., Brady, M. C., and Toczyński, D. P. (2007) A proteomic screen reveals SCFGrr1 targets that regulate the glycolytic-gluconeogenic switch. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1184–1191
- Barral, Y., Jentsch, S., and Mann, C. (1995) G<sub>1</sub> cyclin turnover and nutrient uptake are controlled by a common pathway in yeast. *Genes Dev.* **9**, 399–409
- Berset, C., Griac, P., Tempel, R., La Rue, J., Wittenberg, C., and Lanker, S. (2002) Transferable domain in the G<sub>1</sub> cyclin Cln2 sufficient to switch degradation of Sic1 from the E3 ubiquitin ligase SCF(Cdc4) to SCF(Grr1). *Mol. Cell Biol.* **22**, 4463–4476
- Lanker, S., Valdivieso, M. H., and Wittenberg, C. (1996) Rapid degradation of the G<sub>1</sub> cyclin Cln2 induced by CDK-dependent phosphorylation. *Science* **271**, 1597–1601
- Yaglom, J., Linsens, M. H., Sadis, S., Rubin, D. M., Futcher, B., and Finley, D. (1995) p34Cdc28-mediated control of Cln3 cyclin degradation. *Mol. Cell Biol.* **15**, 731–741
- Schneider, B. L., Patton, E. E., Lanker, S., Mendenhall, M. D., Wittenberg, C., Futcher, B., and Tyers, M. (1998) Yeast G<sub>1</sub> cyclins are unstable in G<sub>1</sub>



## Dma1 Controls Stability of G<sub>1</sub> Cyclins

- phase. *Nature* **395**, 86–89
- Clurman, B. E., Sheaff, R. J., Thress, K., Groudine, M., and Roberts, J. M. (1996) Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev.* **10**, 1979–1990
  - Diehl, J. A., Zindy, F., and Sherr, C. J. (1997) Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine 286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* **11**, 957–972
  - Won, K. A., and Reed, S. I. (1996) Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *EMBO J.* **15**, 4182–4193
  - Chin, C. F., and Yeong, F. M. (2010) Safeguarding entry into mitosis. The antephase checkpoint. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 22–32
  - Scolnick, D. M., and Halazonetis, T. D. (2000) Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. *Nature* **406**, 430–435
  - Kolas, N. K., Chapman, J. R., Nakada, S., Ylanko, J., Chahwan, R., Sweeney, F. D., Panier, S., Mendez, M., Wildenhain, J., Thomson, T. M., Pelletier, L., Jackson, S. P., and Durocher, D. (2007) Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science* **318**, 1637–1640
  - Matsusaka, T., and Pines, J. (2004) Chfr acts with the p38 stress kinases to block entry to mitosis in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **166**, 507–516
  - Fraschini, R., Bilotta, D., Lucchini, G., and Piatti, S. (2004) Functional characterization of Dma1 and Dma2, the budding yeast homologues of *Schizosaccharomyces pombe* Dma1 and human Chfr. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3796–3810
  - Raspelli, E., Cassani, C., Lucchini, G., and Fraschini, R. (2011) Budding yeast Dma1 and Dma2 participate in regulation of Swe1 levels and localization. *Mol. Biol. Cell* **22**, 2185–2197
  - Loring, G. L., Christensen, K. C., Gerber, S. A., and Brenner, C. (2008) Yeast Chfr homologs retard cell cycle at G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>/M via Ubc4 and Ubc13/Mms2-dependent ubiquitination. *Cell Cycle* **7**, 96–105
  - Escoté, X., Zapater, M., Clotet, J., and Posas, F. (2004) Hog1 mediates cell-cycle arrest in G<sub>1</sub> phase by the dual targeting of Sic1. *Nat. Cell Biol.* **6**, 997–1002
  - Clotet, J., Escoté, X., Adrover, M. A., Yaakov, G., Garí, E., Aldea, M., de Nadal, E., and Posas, F. (2006) Phosphorylation of Hsl1 by Hog1 leads to a G<sub>2</sub> arrest essential for cell survival at high osmolarity. *EMBO J.* **25**, 2338–2346
  - Liu, C., Apodaca, J., Davis, L. E., and Rao, H. (2007) Proteasome inhibition in wild-type yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells. *BioTechniques* **42**, 158–160, 162
  - Jackson, L. P., Reed, S. I., and Haase, S. B. (2006) Distinct mechanisms control the stability of the related S-phase cyclins Clb5 and Clb6. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2456–2466
  - Johnson, A. E., and Gould, K. L. (2011) Dma1 ubiquitinates the SIN scaffold, Sid4, to impede the mitotic localization of Plp1 kinase. *EMBO J.* **30**, 341–354
  - Jeffery, D. A., Springer, M., King, D. S., and O'Shea, E. K. (2001) Multisite phosphorylation of Pho4 by the cyclin-CDK Pho80-Pho85 is semi-processive with site preference. *J. Mol. Biol.* **306**, 997–1010
  - Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S. L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutlier, K., Yang, L., Wolting, C., Donaldson, I., Schandorff, S., Shewnarane, J., Vo, M., Taggart, J., Goudreaux, M., Muskat, B., Alfarano, C., Dewar, D., Lin, Z., Michalickova, K., Willems, A. R., Sassi, H., Nielsen, P. A., Rasmussen, K. J., Andersen, J. R., Johansen, L. E., Hansen, L. H., Jespersen, H., Podtelejnikov, A., Nielsen, E., Crawford, J., Poulsen, V., Sørensen, B. D., Matthiesen, J., Hendrickson, R. C., Gleeson, F., Pawson, T., Moran, M. F., Durocher, D., Mann, M., Hogue, C. W., Figeys, D., and Tyers, M. (2002) Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**, 180–183
  - O'Neill, E. M., Kaffman, A., Jolly, E. R., and O'Shea, E. K. (1996) Regulation of PHO4 nuclear localization by the PHO80-PHO85 cyclin-CDK complex. *Science* **271**, 209–212
  - Bieganski, P., Shilinski, K., Tschlis, P. N., and Brenner, C. (2004) Cdc123 and checkpoint forkhead associated with RING proteins control the cell cycle by controlling eIF2 $\gamma$  abundance. *J. Biol. Chem.* **279**, 44656–44666
  - Gopinathan, L., Ratnacaram, C. K., and Kaldis, P. (2011) Established and novel Cdk/cyclin complexes regulating the cell cycle and development. *Results Probl. Cell Differ.* **53**, 365–389
  - Palecek, S. P., Parikh, A. S., and Kron, S. J. (2000) Genetic analysis reveals that FLO11 up-regulation and cell polarization independently regulate invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **156**, 1005–1023
  - Guertin, D. A., Venkatram, S., Gould, K. L., and McCollum, D. (2002) Dma1 prevents mitotic exit and cytokinesis by inhibiting the septation initiation network (SIN). *Dev. Cell.* **3**, 779–790
  - Feldman, R. M., Correll, C. C., Kaplan, K. B., and Deshaies, R. J. (1997) A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell.* **91**, 221–230
  - Henchoz, S., Chi, Y., Catarin, B., Herskowitz, I., Deshaies, R. J., and Peter, M. (1997) Phosphorylation- and ubiquitin-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor Far1p in budding yeast. *Genes Dev.* **11**, 3046–3060
  - Drury, L. S., Perkins, G., and Diffley, J. F. (1997) The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast. *EMBO J.* **16**, 5966–5976
  - Li, W. J., Wang, Y. M., Zheng, X. D., Shi, Q. M., Zhang, T. T., Bai, C., Li, D., Sang, J. L., and Wang, Y. (2006) The F-box protein Grr1 regulates the stability of Ccn1, Cln3, and Hof1 and cell morphogenesis in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **62**, 212–226
  - Kim, H. C., and Huijbrechtse, J. M. (2009) Polyubiquitination by HECT E3s and the determinants of chain type specificity. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 3307–3318
  - Rodrigo-Brenni, M. C., Foster, S. A., and Morgan, D. O. (2010) Catalysis of lysine 48-specific ubiquitin chain assembly by residues in E2 and ubiquitin. *Mol. Cell.* **39**, 548–559
  - Kim, H. T., Kim, K. P., Lledias, F., Kisselev, A. F., Scaglione, K. M., Skowyra, D., Gygi, S. P., and Goldberg, A. L. (2007) Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin-protein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages. *J. Biol. Chem.* **282**, 17375–17386
  - Babu, J. R., Geetha, T., and Wooten, M. W. (2005) Sequestosome 1/p62 shuttles polyubiquitinated Tau for proteasomal degradation. *J. Neurochem.* **94**, 192–203
  - Breitkreutz, A., Choi, H., Sharom, J. R., Boucher, L., Neduva, V., Larsen, B., Lin, Z. Y., Breitkreutz, B. J., Stark, C., Liu, G., Ahn, J., Dewar-Darch, D., Regul, T., Tang, X., Almeida, R., Qin, Z. S., Pawson, T., Gingras, A. C., Nesvizhskii, A. I., and Tyers, M. (2010) A global protein kinase and phosphatase interaction network in yeast. *Science* **328**, 1043–1046
  - Huang, D., Friesen, H., and Andrews, B. (2007) Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast. *Mol. Microbiol.* **66**, 303–314
  - Nakamura, T., Sanokawa, R., Sasaki, Y. F., Ayusawa, D., Oishi, M., and Mori, N. (1995) Cyclin I. A new cyclin encoded by a gene isolated from human brain. *Exp. Cell Res.* **221**, 534–542
  - Sanbhnani, S., and Yeong, F. M. (2012) CHFR. A key checkpoint component implicated in a wide range of cancers. *Cell Mol. Life Sci.* **69**, 1669–1687
  - Yu, X., Minter-Dykhouse, K., Malureanu, L., Zhao, W. M., Zhang, D., Merkle, C. J., Ward, I. M., Saya, H., Fang, G., van Deursen, J., and Chen, J. (2005) Chfr is required for tumor suppression and Aurora A regulation. *Nat. Genet.* **37**, 401–406
  - Geley, S., Kramer, E., Gieffers, C., Gannon, J., Peters, J. M., and Hunt, T. (2001) Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint. *J. Cell Biol.* **153**, 137–148
  - Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M., and Brenner, S. E. (2004) WebLogo. A sequence logo generator. *Genome Res.* **14**, 1188–1190

# MS/MS spectra and data analysis

Accession	Description	m/z	Peptide	Xcorr	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides
YNL289W	PCL1 SGDID:S000005233, Chr XIV from 87897-88736, Genome Release 64-1-1, Verified ORF, "Cyclin, interacts with cyclin-dependent kinase Pho85p"	636,80646	FHNDSSPLNK	2,58	129,50	88,17	1	27
YNL289W	PCL1 SGDID:S000005233, Chr XIV from 87897-88736, Genome Release 64-1-1, Verified ORF, "Cyclin, interacts with cyclin-dependent kinase Pho85p"	754,70435	YTNYYTPTLLTAACYLNK	2,3	240,00	90,00	1	40



Peptide Summary

Sequence: FHNDSSPLNK, K10-GlyGly (114.04293 Da)  
 Charge: +2, Monoisotopic m/z: 636.80646 Da (+4.43 mmu/+6.96 ppm), MH+: 1272.60564 Da, RT: 27.82 min,  
 Identified with: SEQUEST (v1.20); XCorr:2.58, Probability:0.00, Ions matched by search engine: 7/18  
 Fragment match tolerance used for search: 0.5 Da

Fragment Matches

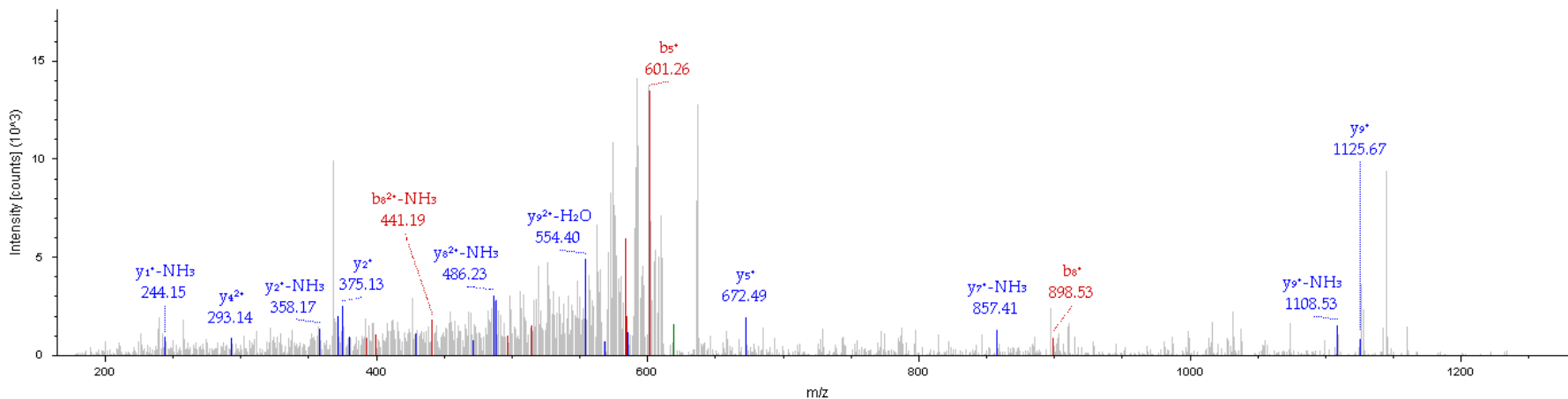
Value Type: Theo. Mass [Da]

Ion Series: Neutral Losses | Precursor Ions

#1	b <sup>+</sup>	b <sup>2+</sup>	Seq.	y <sup>+</sup>	y <sup>2+</sup>	#2
1	148.07570	74.54149	F			10
2	285.13461	143.07094	H	1125.52836	563.26782	9
3	399.17754	200.09241	N	988.46945	494.73836	8
4	514.20449	257.60588	D	874.42652	437.71690	7
5	601.23652	301.12190	S	759.39957	380.20342	6
6	688.26855	344.63791	S	672.36754	336.68741	5
7	785.32132	393.16430	P	585.33551	293.17139	4
8	898.40539	449.70633	L	488.28274	244.64501	3
9	1012.44832	506.72780	N	375.19867	188.10297	2
10			K-GlyGly	261.15574	131.08151	1

Fragment Spectrum

Extracted from: Y:\data\orbitrap\_velos\Raw\1206\SHJC\120626\_S\_SHJC\_01.raw #5651 RT: 27.82  
 ITMS, CID, z=+2, Mono m/z=636.80646 Da, MH+=1272.60564 Da, Match Tol=0.3 Da



Sequence: YTNVYTPDLLTAACYLNK, Y1-Acetyl (42.01057 Da), C14-Carbamidomethyl (57.02146 Da), K18-GlyGly (114.04293 Da)  
 Charge: +3, Monoisotopic m/z: 754.70435 Da (-4.22 mmu/-5.59 ppm), MH+: 2262.09848 Da, RT: 44.60 min,  
 Identified with: SEQUEST (v1.20); XCorr:2.30, Probability:0.00, Ions matched by search engine: 7/68  
 Fragment match tolerance used for search: 0.5 Da

Fragment Matches

Value Type: Theo. Mass [Da]

Ion Series: Neutral Losses Precursor Ions

#1	b <sup>+</sup>	b <sup>2+</sup>	b <sup>3+</sup>	Seq.	y <sup>+</sup>	y <sup>2+</sup>	y <sup>3+</sup>	#2
1	206.08116	103.54422	69.36524	Y-Acetyl				18
2	307.12884	154.06806	103.04780	T	2057.03725	1029.02226	686.35060	17
3	421.17177	211.08952	141.06211	N	1955.98957	978.49842	652.66804	16
4	520.24019	260.62373	174.08491	V	1841.94664	921.47696	614.65373	15
5	683.30351	342.15539	228.43935	Y	1742.87822	871.94275	581.63093	14
6	784.35119	392.67923	262.12191	T	1579.81490	790.41109	527.27649	13
7	881.40396	441.20562	294.47284	P	1478.76722	739.88725	493.59393	12
8	982.45164	491.72946	328.15540	T	1381.71445	691.36086	461.24300	11
9	1095.53571	548.27149	365.85009	L	1280.66677	640.83702	427.56044	10
10	1208.61978	604.81353	403.54478	L	1167.58270	584.29499	389.86575	9
11	1309.66746	655.33737	437.22734	T	1054.49863	527.75295	352.17106	8
12	1380.70458	690.85593	460.90638	A	953.45095	477.22911	318.48850	7
13	1451.74170	726.37449	484.58542	A	882.41383	441.71055	294.80946	6
14	1611.77236	806.38982	537.92897	C-Carbami...	811.37671	406.19199	271.13042	5
15	1774.83568	887.92148	592.28341	Y	651.34606	326.17667	217.78687	4
16	1887.91975	944.46351	629.97810	L	488.28274	244.64501	163.43243	3
17	2001.96268	1001.48498	667.99241	N	375.19867	188.10297	125.73774	2
18				K-GlyGly	261.15574	131.08151	87.72343	1

Fragment Spectrum

Extracted from: C:\121015\121009\_S\_JCJC\_01\_01\_20\_percent\_60min\_CID.raw #11704 RT: 44.60  
 ITMS, CID, z=+3, Mono m/z=754.70435 Da, MH+=2262.09848 Da, Match Tol=0.3 Da

