



Sandra López Avilés
Tesi Doctoral

**Paper de la quinasa *Srk1* en la progressió del cicle
cel·lular i la resposta a estrès en *Schizosaccharomyces
pombe***

Tesi presentada per
Sandra López Avilés
Per tal d'optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

Barcelona, Maig de 2007

Programa de doctorat de Biologia i Patologia Cel·lulars,
Bienni 2002-2004, de la Universitat de Barcelona

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció
de la Doctora Rosa Aligué Alemany en el Departament de
Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica
de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona

Barcelona, Maig de 2007

Per tal d'explicar la seva teoria de la relativitat, Einstein deia que quan estàs en bona companyia una hora et sembla un minut, mentre que quan estàs en una situació incòmoda, un minut et sembla una hora, i que això era la relativitat. Mirant enrere, jo puc dir que els cinc anys que he passat en aquest laboratori em semblen molt curts ara que això s'acaba, és a dir, que aquesta tesi ha estat una experiència positiva tant a nivell científic com a nivell personal. Per això vull agrair a totes aquelles persones que ho han fet possible.

En primer lloc, la Rosa: Jefa! Què t'he de dir? Sobren les paraules... Gràcies per tantes estones parlant de ciència i del que no era ciència... per fer-me veure que tot i que els sacrificis en el laboratori no sempre tenen recompensa, val la pena continuar lluitant... He après molt al teu costat! I sobre tot gràcies per haver confiat en mi des del primer moment (probablement més que jo mateixa). Et trobaré a faltar a Londres...

A l'Oriol, la Neus i el Carles: Quin luxe de "jefes"! Sabeu donar bones idees quan es tracta de feina, però sobre tot, sabeu donar ànims quan és necessari... i quines calçotades que organitzeu! Tant debò aquest bon ambient que heu creat al laboratori durí molts anys...

A l'Eulàlia, gràcies per trobar sempre un moment per ajudar-me quan ho he necessitat i per preocupar-te de que tot funcioni bé (encara que a vegades t'ho posem difícil) al lab. A la Xus, perquè m'ha agradat tenir-te tant a prop de la meua poïata, pels "truquets" i les històries de quan estàveu a Farmàcia.

Als tècnics del laboratori: la Sònia, el Jaume i la Maria. Tots tres ens faciliteu molt la feina, i encara que ens agrada queixar-nos, no sabem la sort que tenim de comptar amb vosaltres. Jaumet! Que esto se acaba... aunque a veces te diga que eres muy ruidoso voy a echar de menos tus selecciones musicales y tus críticas de moda... le das mucha vidilla al lab!

A las secres, Nùria y Carme, mira que habéis tenido paciencia conmigo,... y es que esto del papeleo no está hecho para mí!

Als post-docs del lab: el Siscu (encara que em portis sempre la contrària!), la Nùria, l'Albert, la Marta i el Josep Maria. Quina sort tenir gent tant bona a la poïata del costat. Ens salveu la vida quan comencem a moure'ns pel laboratori i no sabem ni agafar una pipeta. Gràcies per transmetre'm la vostra curiositat científica.

Les noies de confocal: l'Anna Bosch, la Maria i ara l'Anna Lladó. M'he quedat amb les ganes de fer un in vivo de pombe! Potser en el futur... Dra. Lladó! gràcies per interessar-te sempre per com m'anaven les coses. A vegades un petit gest és suficient per pujar els ànims!

Al grup de l'Oriol: cada vegada sou més gent! Espero no deixar-me ningú... l'Ignasi, l'Ana, la Patri, la Paki, la Mireia, la Raffi, la Silvia, la Maria i la Miriam. Alguns acabeu tot just de començar i altres ja esteu encetant la recta final. A tots us vull donar ànims per tirar endavant i molta sort, perquè en això de la ciència, la sort també hi juga un paper molt important...

Paki, ja se que ho saps, però a vegades és bo sentir-ho dels demés: tens molta capacitat i el que és més important, tens un gran esperit lluitador. No et rendeixis, "que tu vales para esto"!

Mireia, sembla ahir que les dues començàvem... Gràcies per les estonetes disteses parlant de mil coses diferents al passadís del "Lola", sempre amb la mateixa implicació i compromís en el que fas i dius. Per cert, no me n'oblido que el meu marit et deu un ball...

Albert, no me n'oblidava de tu... quin crack! m'ha agradat molt haver-te conegut. No canviis i estic segura que arribaràs molt lluny, en la ciència i en la vida. Tinc la impressió que escoltaré parlar de tu des de Londres!

Montse, què diferent seria tot si al món hi hagués més gent com tu... una gran científica i una gran persona. Sempre disposada a escoltar els demés amb un somriure als llavis. Sí he tingut un problema (i no parlo de ciència) m'ha ajudat molt parlar amb tu. Gràcies per ser com ets!

Sonia Carujo, a ti es que hay que quererte... gracias por dejarme compartir tus cosas, por los ratos de risa con tus sesiones de cuentos y tus historias del "pienso contigo" y el "sunflán". Mira que a veces han saltado chispas entre nosotras (y es que las dos tenemos nuestro carácter), pero al final no ha habido nada que no se arreglase con dos horas de charla y un buen abrazo. No te olvides de mí ahora que me voy a las Inglaterras...

Y aunque ya no estén en el lab, gracias a Jorge y a Elson, por tantas risas en la bahía pombe. A les nenes de la Neus: Cristina, cuando empecé la tesis me dabas mucho respeto, pero luego me dí cuenta de que eres una persona muy accesible y que vale mucho la pena acercarse a hablar contigo...

Vero! Qué pedazo de científica! Viéndote se aprende mucho, pones tanto entusiasmo en todo lo que haces... Estos últimos meses me ayudó mucho el tenerte cerca, con los nervios del post-doc y de la escritura de la tesis. Ahora que se acerca el momento de la defensa, me acuerdo mucho de ti. Mándame un poquito de tu energía el día 22, anda...

Neus... crec que ets una de les persones més tenaces que conec. Ja sabem que això de fer una tesi no és fàcil (sí no la faria tothom) i a vegades la p21 no vol localitzar-se on toca però tu no et rendeixes mai. Continua esforçant-te tant, que segur que trobaràs la recompensa ben aviat!

Blanca! Eres la digna heredera de Ras. Vas a ver que todo te va a ir muy bien, porque cuando se trabaja tanto y además con tan buen humor los experimentos tienen que salir a la fuerza!

Sandra! Encara que hagi perdut l'exclusivitat del nom, me n'alegro molt d'haver compartit aquest temps al laboratori amb tu. Ens veiem ben aviat a Londres!

Noelia, la otra chica checkpoint, que responsabilidad! No te preocupes que tu puedes con esto y con más. Mucha suerte!

No me'n puc oblidar del Roger: encara me'n recordo de la primera vegada que et vaig veure...

Dios! Dónde me había metido?! Aviat em vaig adonar que els primers anys al lab no haurien estat iguals sense les teves cançons de fons (sí Elvis levantara la cabeza...). Cuantes cosas han passat des de llavors... En el futur, may the force be with... us!

A la gent del Carles, la Cheles, la Laia, la Sandra, la Jemina, la Maite, Cecilia y Elena, encara que ens separi el passadís sempre ens uniran les celebracions al seminari. Cheles, me alegro de haber tenido la oportunidad de conocerte mejor estos últimos meses. Espero que todo te vaya muy bien en la nueva etapa!

I ara les meves nenes Pombe:

Eva, mi niña...! Me has ayudado tanto des del principio que el papel se queda corto... Gracias por los abrazos y gestos de cariño cuando estaba un poco "tova", por infundirme calma cuando estaba histérica con los plazos de la tesis y en definitiva por estar a mi lado y ser buena amiga sin esperar nada a cambio. Ojalá en Londres encuentre tan buena gente como tú... Y ahora ánimos con el proyecto que heredas y un pequeño consejo: trabaja mucho y con optimismo, que para que los experimentos salgan se necesita también un puntito de fe!

Albí! Que suerte tenerte en el grupo... con lo desastre que yo soy, la incursión en mamífero habría sido un caos si tú no hubieras puesto un poco de orden. Gracias por tantas conversaciones divertidas a la hora de comer, por estar siempre dispuesta a echar una mano, en fin, por hacerme sentir que podía contar contigo en cada momento.

Alba, mira que fa ben poquet que et vas unir al grup de pombes, però la integració ha estat plena! Quin bon ull que ha tingut la Rosa en escollir-te! Gràcies per ajudar-me en els moments més crítics de l'escriptura i per l'excel·lent cum laude que em vas atorgar quan estava "al borde del ataque de nervios". Espero que tinguis molta sort amb la tesi i sobre tot espero la teva visita a UK.

Neus! La darrera incorporació del grup... Ara tu has passat a ser la petita del grup! Però amb la teva energia te'ls menges a tots! Des del primer dia que vaig veure que encaixaries en el grup a la perfecció. Sort amb els últims exàmens i amb el que vindrà després...

I encara que no és nena y que ja no és pombe, vull agrair al Germán els mesos compartits al laboratori. Per deixar-me conèixer la seva visió tan diferent del món.

Y por último, mi Maribel: Mira que han pasado cosas en estos cinco años, pero sí me tengo que quedar con algo, sería con el haberte conocido. Empezamos juntas esta etapa y a tu lado he aprendido tantas cosas... te he echado mucho de menos este último año que ya no estabas en el lab, però me ha permitido darme cuenta que la tuya no és de esas amistades que se pierden en cuanto sales por la puerta. Gracias por ser una amiga incondicional! En el futuro espero que Toni y yo podamos compartir otras muchas experiencias con José Luis y contigo... y dentro de muy poquito, con Ferran. Supongo que ya lo sabes, pero... Que te quiero, guapa!

Gràcies a la Laura, per saber perdonarme les temporades que he estat despenjada del món i per ser una bona amiga tots aquests anys.

Gracias a mi familia, a mis hermanos, Jorge y María, y mis casi hermanos, Raquel y Jordi. Por entenderme y no cuestionarme cuando empecé esta locura de la tesis. Por soportar mis berrinches con paciencia y por apoyarme de forma incondicional. Sé que no os lo digo con la frecuencia que os merecís, pero os quiero mucho y os voy a echar mucho de menos en Londres.

Gracias a la Marina, porque su risa se contagia y hace que se me olviden los momentos más tristes.

Gracias a mi abuela, porque, aunque creo que todavía no ha entendido qué era lo que hacía su nieta en el Clínic, siempre ha tenido una palabra de cariño y de ánimo cuando la he necesitado.

Gracias a mis padres, porque han sido el mejor ejemplo que una hija podría tener. Gracias por tantas velas y otros tantos desvelos. Por vosotros soy como soy y sólo espero que os sintáis tan orgullosos de mí como yo me siento de vosotros.

Gracias a mi otra familia, Juaní y Antonio, Mar y Albert, por confiar tanto en mí y por hacerme sentir desde el principio como una más de la familia. A la Sara, por dejarme participar en sus juegos y por esos besos que te alegran el día.

Y por último, gracias a Toni. Hay que ver lo que es la vida... Sí no te hubiera conocido, ahora no estaría escribiendo estos agradecimientos porque probablemente no hubiera estado tan loca como para empezar una tesis... Sin embargo, aquí estoy, y no puedo hacer otra cosa que darte las gracias por ayudarme a conseguirlo. Gracias por contagiarme tus ganas y tu entusiasmo, por todas las veces que me has tenido que consolar y convencer de que valía para esto. Como ya te dije en su momento, tú me das valor... te quiero!

Barcelona, Abril del 2007

*La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero...
¡qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener
confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado
para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que
alcanzarla, cueste lo que cueste."*

Maria Skłodowska-Curie

*A mis padres,
a Toni,*

ABREVIATURES	1
INTRODUCCIÓ	3
1. CICLE CEL·LULAR EN SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE	5
1.1 Cdc2/Cdk1	7
1.2 Ciclines	8
1.2.1 <i>Puc1</i>	9
1.2.2 <i>Cig2</i>	10
1.2.3 <i>Cig1</i>	11
1.2.4 <i>Cdc13</i>	12
1.3 Regulació dels complexos Cdc2-Ciclines	15
1.3.1 <i>Rum1</i>	16
1.3.2 <i>Wee1/Mik1</i>	17
1.3.3 <i>Cdc25</i>	18
1.3.4 CAK	19
1.3.5 <i>Plo1</i>	20
1.3.6 <i>Flp1/Clp1</i>	23
1.3.7 <i>Proteòlisi mitjançada per ubiquitinització: SCF i APC/C</i>	24
2. CHECKPOINTS	29
2.1 <i>Checkpoints</i> que vigilen la integritat del DNA	29
2.1.1 <i>Checkpoint</i> de fase G1	30
2.1.2 <i>Checkpoint</i> de intra-S	30
2.1.3 <i>Checkpoint</i> de G2/M	30
2.1.3.1 <i>Reconeixement del dany al DNA</i>	31
2.1.3.2 <i>Propagació del senyal</i>	32

2.1.3.3 Execució del senyal: <i>Chk1</i>	33
2.1.4 Checkpoint S _{dNTP} -M o de replicació	36
2.1.4.1 Proteïnes específiques del checkpoint de replicació: <i>Cds1</i> i <i>Mrc1</i>	36
2.2 Checkpoint d'acoblament del fus mitòtic	38
2.3 Checkpoint d'orientació del fus mitòtic	41
3. RESPOSTA A ESTRÈS	44
3.1 Components centrals de la resposta a estrès	45
3.1.1 <i>Sty1</i>	46
3.1.2 <i>Wis1</i>	49
3.1.3 <i>Wis4</i> i <i>Win1</i>	50
3.2 Activació del mòdul <i>Wis4/Win1-Wis1-Sty1</i>	51
3.3 Adaptació a l'estrès: canvis en l'expressió gènica	54
3.4 Dianes de <i>Sty1</i>	56
3.4.1 <i>Atf1</i>	57
3.4.2 Altres dianes de <i>Sty1</i> : <i>Cmk2</i> i <i>Srk1</i>	59
3.5 Inactivació de la <i>Sty1</i> : les fosfatases <i>Pyp1</i> , <i>Pyp2</i> i <i>PP2C</i>	61
3.6 Respostes específiques als diferents tipus d'estrès	62
3.6.1 Estrès per calor	62
3.6.2 Estrès oxidatiu	63
3.6.3 Estrès osmòtic	67
3.7 Altres vies en la resposta a estrès	68
OBJECTIUS	69
MATERIALS I MÈTODES	73
1. TÈCNiques DE MANIPULACIÓ DE DNA	75

1.1 PCR (<i>Polymerase chain reaction</i>)	75
1.2 Mutació puntual	76
1.3 Digestió del DNA amb enzims de restricció	77
1.4 Lligació de fragments de DNA	78
1.5 Extracció de DNA plasmídic i purificació de fragments de DNA	78
1.6 Electroforesi de DNA	79
2.OBTENCIÓ DE LES SOQUES EMPRADES	82
2.1 Integració d'epítops	83
2.1.1 Integració d'epítops mitjançant el plàsmid pRIP2	83
2.1.2 Integració d'epítops mitjançant productes de PCR	84
2.2 Delecció de gens	85
2.3 Creuaments genètics	85
3. MEDIS I CONDICIONS DE CULTIU	86
3.1 Medis i condicions de cultiu de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	86
3.1.1 Inducció de promotors <i>nmt1</i>	87
3.1.2 Mètodes de sincronització	88
3.1.2.1 Elutriació	88
3.1.2.2 Sincronització amb hidroxiurea (HU)	88
3.2 Medis i condicions de cultiu d' <i>Escherichia coli</i>	89
4. TÈCNiques DE TRANSFORMACIÓ	89
4.1 Transformació en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	89
4.2 Transformació en <i>Escherichia coli</i>	90
5. EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS	91
5.1 Proteïnes de fusió a GST	91

5.2 Proteïnes de fusió a histidines	93
6. OBTENCIÓ DE L'EXTRACTE PROTEIC DE <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	93
7. QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES	94
8. ELECTROFORESI DE PROTEÏNES (SDS-PAGE)	95
9. ELECTROTRANSFERÈNCIA I IMMUNODETECCIÓ	97
9.1 Electrotransferència	97
9.2 Immunodetecció	97
10. IMMUNOPRECIPITACIÓ	99
11. ASSAJOS D'ACTIVITAT QUINASA <i>IN VITRO</i>	101
12. IMMUNOCITOQUÍMIQUES	102
13. CITOMETRIA DE FLUXE	104
RESULTATS	107
1. La sobreexpressió de la <i>Srk1</i> inhibeix l'entrada a mitosi	109
2. El bloqueig en el cicle per la sobreexpressió de la <i>Srk1</i> té lloc a través de la <i>Cdc25</i>	110
3. La <i>Srk1</i> interacciona amb la <i>Cdc25</i> i la fosforila en el seu domini regulador N-terminal	111
4. La <i>Srk1</i> bloqueja l'entrada a mitosi a través de la fosforilació i inhibició de la <i>Cdc25</i>	113
5. La <i>Srk1</i> provoca una acumulació de la <i>Cdc25</i> al citoplasma	116
6. La inhibició de la <i>Cdc25</i> per la <i>Srk1</i> és dependent de la proteïna 14-3-3 <i>Rad24</i>	118
7. L'activitat de la <i>Srk1</i> està regulada al llarg del cicle cel·lular	120
8. La <i>Srk1</i> és necessària per a que es doni la unió entre la <i>Rad24</i> i la <i>Cdc25</i> en resposta a estrès osmòtic	123
9. La <i>Srk1</i> és ràpidament activada en resposta a estrès	123

10. La Sty1 fosforila la Srk1 en el residu T463	125
11. La Cdc25 és exportada del nucli en resposta a estrès de forma dependent de la Srk1	126
12. La Srk1 contribueix al bloqueig del cicle cel·lular en resposta a estrès	131
13. La Srk1 és inestable en una soca $\Delta sty1$	133
14. La sobreexpressió de la Srk1 disminueix l'activació de la Sty1	135
15. L'efecte de la sobreexpressió de la Srk1 en l'activació de la Sty1 és parcialment dependent de les fosfatases Pyp1 i Pyp2	137
16. La sobreexpressió de la Srk1 provoca un canvi en la mobilitat electroforètica de la Wis1	139
17. La delecció de <i>srk1</i> condueix a una hiperactivació de la Sty1	141
DISCUSSIÓ	143
1. La Srk1 regula la transició G2/M a través de la Cdc25	145
2. La Srk1 en la resposta a estrès	153
3. La Srk1 en la regulació de la Sty1	162
CONCLUSIONS	169
BIBLIOGRAFIA	173

AMIZ	Astral Microtubule Interaction Zone	MCM	Minichromosome Maintenance Protein
APC	Anaphase Promoting Factor	MEK1	MAPK/ERK Kinase 1
APC/C	Anaphase Promoting Factor/Ciclosome	MEN	Mitosis Exit Network
ARE	AU Rich Element	MMS	Methyl Methane Sulfanate
ATM/ATR	Ataxia-Telangiectasia Mutated/ATM- and Rad3-related	N	Nitrogen
CaM	Calmodulina	ORC	Origin Replication Complex
C	Carboni	ORF	Open Reading Frame
CESR	Core Environmental Stress Response	PB1,PB2	Polo-Boxes 1, 2
CLC	Checkpoint Loading Complex	PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
CORE	Core Environmental Stress Response	PKA	AMPc Kinase Protein
CSC	Checkpoint Sliding Clamp	PP2C	Protein Phosphatase 2C
DBS	Double Break Strand	RC	Replication Complex
ERK1	Epidermical Growth Factor Receptor Kinase 1	ROS	Reactive Oxygen Element
FEAR	Cdc Forteen Early Anaphase Release	SAPK	Stress Activated Protein Kinase
HSE	Heat Shock Promoter Element	SCF	Skp1 Cullin F-box protein
HSF	Heat Shock Factor	SESR	Specific Enviromental Stress Response
HSP	Heat Shock Protein	SIN	Septations Initiation Network
HU	Hidroxiurea	SPB	Spindle Pole Body
IR	Ionising Radiation	SRP	Stress Response Pathway
JNK	N-Jun Kinase	UV	Ultraviolet light
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase		
MAPKK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase		
MAPKKK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase		
MBF	Mlu Binding Factor		
MCC	Mitotic Checkpoint Complex		

1. CICLE CEL·LULAR EN SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE

El llevat de fissió *Schizosaccharomyces pombe* va ser descrit per primera vegada per P. Lindner el 1893, que el va aïllar a partir d'un tipus de cervesa africana, donant-li el nom de *pombe* (cervesa en swahili). Tot i així, el seu valor com a eina per a l'estudi del cicle cel·lular no va ser posat de relleu fins el 1950 per Murdoch Mitchison (Mitchison, 1957).

Filogenèticament prové d'una branca ancestral dels *ascomycetes*, denominada *archaeascomycetes* i estudis comparatius de les seqüències de DNA i RNA demostren que aquest llinatge va separar-se dels *ascomycetes* aproximadament fa uns 4000 milions d'anys.

Observades fenotípicament, es tracta de cèl·lules cilíndriques, d'uns 3-4 µm de diàmetre i 10-14 µm de llargada, que conserven la seva forma allargada gràcies a un creixement exclusivament polar i al fet que es divideixen per mitjà d'un sept transversal que separa la cèl·lula mare en dues cèl·lules filles iguals. Genèticament, contenen una dotació de tres cromosomes amb

4940 ORFs predits, aproximadament un 43% dels quals contenen introns.

Avui en dia, el llevat de fissió *S. pombe* es considera un excel·lent model per a l'estudi dels mecanismes bàsics que controlen el cicle cel·lular en eucariotes, donat que aquests han estat altament conservats al llarg de l'evolució. D'altra banda, la utilització d'un organisme com el llevat de fissió atorga altres avantatges per a l'estudi d'aquests mecanismes.

En primer lloc, les cèl·lules de *S. pombe* són predominantment haploids durant el cicle vegetatiu, essent només diploids en condicions de depleció nutricional, generalment per manca de fonts de nitrogen en el medi. En aquest cas, dues cèl·lules haploids de diferent tipus d'aparellament poden conjugarse donant lloc a un zigot amb dotació genètica 2n. En qualsevol cas, aquest estat és transitori i ràpidament aquestes cèl·lules diploids tendeixen a progressar en meiosi donant lloc a quatre ascospores contingudes en un asc i que són novament haploids. Aquestes espores poden germinar un cop les condicions òptimes de creixement són restablertes en el medi. Ocasionalment, també es pot observar creixement vegetatiu de

cèl·lules diploids provinents de mutants auxotròfics complementaris.

En segon lloc, en part fruit de la característica anterior, en part degut a que la taxa de recombinació és molt alta en elles, són cèl·lules fàcilment manipulables genèticament. En conjunt, tot plegat permet que s'hi puguin dur a terme deleccions, integracions de *tags* i promotors controlables exògenament, així com mutacions puntuals.

Per últim, donada la simplicitat de l'organisme i la curta durada del seu cicle cel·lular (aproximadament 3 hores), l'efecte que aquestes modificacions puguin tenir en el genoma són fàcilment avaluables fenotípicament. Així, alteracions que alenteixin la progressió en el cicle cel·lular donaran lloc a cèl·lules elongades i, de forma inversa, totes aquelles alteracions que accelerin el cicle faran que les cèl·lules que les continguin presentin un tamany inferior en comparació a la soca salvatge. Aquest fet va ser inicialment observat per Thuriaux i Nurse el 1978, i va conduir al descobriment del gen codificant per la Cdc2 com a factor clau en la progressió del cicle cel·lular en *S.*

pombe (Fantès, 1981; Nurse and Bissett, 1981; Nurse and Thuriaux, 1980; Thuriaux *et al.*, 1978).

De la mateixa manera que succeeix en organismes eucariotes superiors el cicle cel·lular de *S. pombe* es pot dividir en quatre fases discretes conegudes com G1, S, G2 i M. Fruit d'aquest procés, tots els components necessaris per a la supervivència cel·lular així com el material genètic de la cèl·lula mare són duplicats i repartits de forma equitativa entre les cèl·lules filles.

La fase G1 (*Gap phase 1*) es caracteritza per ser una fase de síntesi activa de proteïnes necessàries per estadis posteriors del cicle, principalment aquelles que permetran la replicació del material genètic en la fase S.

La fase S, o fase de síntesi, comença quan té lloc l'inici de la replicació a diferents punts del genoma. Donat que el DNA s'ha de duplicar una i només una vegada cada cicle cel·lular (el contrari donaria lloc a poliploidia), l'activació dels orígens de replicació ha d'estar fortament regulada. Així, un cop el DNA ha estat replicat, els orígens són inactivats i les cèl·lules progressen en la següent fase del cicle, la fase G2 (*Gap phase 2*), durant la qual les

cèl·lules creixen fins a assolir la mida adequada per a poder dur a terme la fase de mitosi.

Per últim, en la fase M o de mitosi, les cèl·lules amb el DNA duplicat segreguen els seus cromosomes en dos nuclis, i aquest esdeveniment és seguit per un procés de citocinesi que conduirà finalment a la separació de dues cèl·lules filles.

D'altra banda, durant el cicle cel·lular es donen els mecanismes de control o *checkpoints*, en que la cèl·lula comprova que la replicació ha tingut lloc de forma correcta, que no hi ha hagut cap alteració en el genoma, que les condicions externes són òptimes per a la divisió i que els fusos mitòtics estan correctament units als centròmers. En cas contrari, aquests mecanismes aturen la progressió del cicle.

La transició entre fases està controlada de forma molt acurada mitjançant l'activitat d'una única quinasa, la Cdc2/Cdk1, que es pot trobar associada a diferents subunitats reguladores o ciclines, depenent de la fase del cicle cel·lular (fig. 1). D'altra banda, les accions d'altres quinases i fosfatases, així com la unió d'altres proteïnes acaben de modular l'activitat de la Cdc2.

Aquestes fases, així com els mecanismes implicats en la seva regulació seran explorats amb més profunditat a continuació.

1.1 Cdc2/Cdk1:

En *S. pombe* la quinasa Cdc2 dirigeix les dues transicions majors del cicle cel·lular: *START*, punt en el qual les cèl·lules es comprometen a progressar en el cicle mitòtic, i la transició G2/M, moment a partir del qual s'inicien els processos de condensació dels cromosomes, ensamblatge dels fusos mitòtics i formació de l'anell d'actomiosina, que finalment culminaran en la mitosi i posterior citocinesi (Nurse *et al.*, 1981). Es tracta d'una proteïna altament conservada al llarg de l'evolució de manera que en eucariotes superiors han estat identificats ortòlegs que poden complementar mutants de *Cdc2* de *S. pombe*. En aquests organismes, però, la Cdc2 únicament és responsable de la transició G2/M, mentre que altres cinases molt properes a aquesta (Cdk4/6 i Cdk2) controlen les transicions restants del cicle cel·lular (Morgan, 1997).

La Cdc2 és una proteïna de 34 kDa amb activitat serina/treonina quinasa. És, de fet, la subunitat

catalítica d'un complex heterodimèric amb una subunitat reguladora o ciclina. Tot i que els nivells de la Cdc2 són constants al llarg del cicle, la seva activitat és fluctuant, experimentant un augment durant la transició G1/S i essent màxima a l'inici de la mitosi. Aquesta fluctuació s'assoleix gràcies a múltiples esdeveniments, entre els que trobem la unió a la seva ciclina, processos de fosforilació i defosforilació i unió a proteïnes inhibidores.

Totes les cyclines tenen en comú un domini anomenat *cyclin box*, que és necessari per tal que puguin unir-se a la Cdc2 i activar-la. A *S. pombe* han estat descrites 4 cyclines diferents, que seran exposades a continuació.

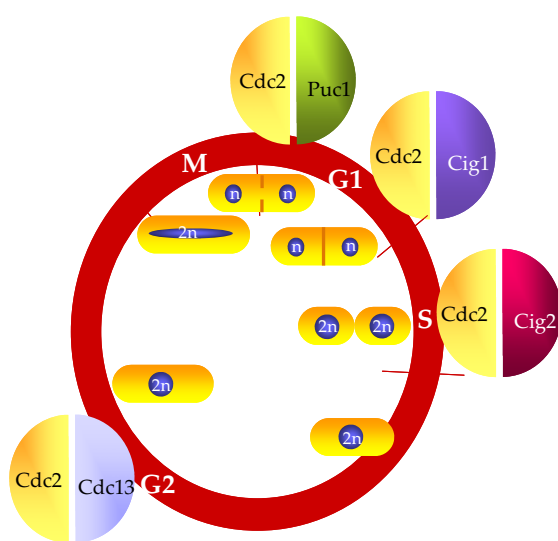


Fig. 1. Cicle cel·lular de *Schizosaccharomyces pombe*.

1.2 Cyclines:

A *S. pombe* les transicions entre les diferents fases estan controlades per la Cdc2 acomplexada amb diferents cyclines. Fins el moment s'han descrit 4 cyclines diferents: la Puc1, la Cig1, la Cig2 i la Cdc13. La primera regeix la fase G1, la Cig1 i la Cig2 són cyclines de fase S i la Cdc13 és la responsable de la transició G2/M. Les tres darreres són cyclines de tipus B, mentre que la Puc1 té una major similitud amb les cyclines de fase G1 de *S.cerevisiae*. De fet, de totes 4, únicament la Cdc13 és essencial per a la viabilitat cel·lular, i pot compensar l'acció de les altres cyclines en cas que aquestes no hi siguin presents. Aquest fet s'explica si considerem que l'activitat que la Cdc2 assoleix quan s'acomplexa amb les cyclines de fase G1 o S és moderada, i això li permet fosforilar substrats d'elevada afinitat necessaris per aquestes transicions. Un cop superada la fase S, un augment en l'activitat de la Cdc2 com a conseqüència de la seva unió a la Cdc13 permet la fosforilació d'altres substrats de menor afinitat, necessaris per a dur a terme la transició G2/M. Donat que la transcripció de la Cdc13 no es troba regulada al llarg del cicle, la

fluctuació dels seus nivells s'aconsegueix a través de la seva degradació al final de la fase M. La Cdc13 comença a acumular-se durant la fase G1, i assoleix nivells màxims en G2. En absència de les ciclines de fase G1, la fase S s'endarrereix fins que l'activitat quinasa associada a la Cdc13 supera el llindar necessari per a la fosforilació dels substrats d'aquesta fase (Fisher and Nurse, 1996). Curiosament, la delecció de Cdc13 dóna lloc a processos de re-replicació, conduint a cèl·lules gegantines amb nuclis engrandits (Hayles *et al.*, 1994). Aquest fet implica que l'activitat de la Cdc2 durant la fase G2 s'encarrega, entre d'altres, de bloquejar la maquinària replicativa, evitant així cicles succesius de replicació.

1.2.1 *Puc1*:

Aquesta ciclina va ser descrita per primera vegada en un *screening* dissenyat per tal d'identificar proteïnes capaces de complementar la funció de les ciclines de fase G1 a *S.cerevisiae* (Forsburg and Nurse, 1991). La seva funció en condicions normals és difícil d'establir, però pot ser posada de manifest si paral·lelament es delecten les

ciclines de fase S Cig1 i Cig2. (Martin-Castellanos *et al.*, 2000). En aquesta situació, la pèrdua de la Puc1 dóna lloc a un bloqueig en la fase G1 i a un augment en el tamany de les cèl·lules. Tot plegat suggereix que la Puc1 és necessària per tal d'acoblar l'inici de la fase S amb la consecució d'un tamany crític per tal de dur a terme aquesta fase. La Puc1 és constitutivament expressada al llarg del cicle a uns nivells baixos i pateix una inducció a G1 (Forsburg *et al.*, 1991). Tot i que el seu paper va resultar críptic al principi, avui en dia s'ha establert la seva contribució en la fosforilació responsable de la degradació de l'inhibidor de la Cdc2 Rum1. (Martin-Castellanos *et al.*, 2000). D'altra banda, la Puc1 també ha estat implicada en la formació del complex Cdc10/Sct1 que controla l'expressió de gens a *START* en col·laboració amb la quinasa Ran1/Pat1 (Connolly *et al.*, 1997). Donat que la Pat1 està clarament implicada en la regulació del desenvolupament sexual i la meiosi (on té un paper inhibidor) (Iino and Yamamoto, 1985), la interacció entre ambdues proteïnes explicaria el fenotip de meiosi accelerada en mutants mancats de la Puc1. (Forsburg and Nurse, 1994). Ara per

ara, no han estat descrites altres funcions de la Puc1.

1.2.2 Cig2:

La Cig2 és la principal ciclina de fase S. Malgrat que quan es va identificar se li van atribuir funcions mitòtiques (Bueno and Russell, 1993), avui sabem que el seu paper principal el juga en la promoció de la replicació del DNA (Connolly and Beach, 1994; Mondesert *et al.*, 1996). La transcripció de la Cig2 es troba regulada al llarg del cicle cel·lular, experimentant un pic durant la transició G1/S (Connolly *et al.*, 1994). De la mateixa manera, els nivells de proteïna així com l'activitat associada al complex Cdc2/Cig2 també són màxims en aquest punt (Mondesert *et al.*, 1996; Martin-Castellanos *et al.*, 1996; Fisher *et al.*, 1996). La seva estabilitat també està sotmesa a regulació, i les fluctuacions observades són també degudes a l'acció dels complexos SCF i APC (Yamano *et al.*, 2004). Tot i que ha estat àmpliament demostrat que el complex Cig2/Cdc2 té una implicació important en la regulació de la fase S (mutants de *cig2* presenten un bloqueig en fase S (Mondesert *et al.*, 1996)), les dianes a través de les quals du a terme

aquesta regulació no són massa clares, per ara. Un possible candidat que ha estat proposat és la proteïna essencial per a l'inici de la replicació Drc1 (Sld2 a *S.cerevisiae*) (Masumoto *et al.*, 2002; Noguchi *et al.*, 2002). Drc1 conté llocs putatius de fosforilació pel complex Cdc2-Cig2 que, si es muten, fan que la proteïna sigui inactiva. Moltes altres proteïnes requerides per a la síntesi de DNA poden ser fosforilades per la Cdc2 *in vitro* (v.g. ORC, MCMs), i fins i tot s'ha descrit la interacció *in vivo* de la Cdc2 amb un dels membres del complex ORC (Orc2), (Leatherwood *et al.*, 1996) encara que la significança d'aquests fets no ha estat establerta.

Un altre substrat conegut del complex Cdc2-Cig2 és la proteïna Cdc18. Breument dir que és un dels components del complex pre-replicatiu que s'estableix en els orígens de replicació just abans d'iniciar la síntesi de DNA, necessari per tal de reclutar la maquinària replicativa a aquests orígens. En aquest cas, no es tracta d'una fosforilació activadora, ans al contrari, la fosforilació de la Cdc18 per la Cdc2 unida a Cig2 condueix a la dissociació d'aquesta del DNA i a la seva posterior degradació (Lopez-

Girona *et al.*, 1998; Jallepalli *et al.*, 1997). D'altra banda, la transcripció de la Cdc18 és bloquejada durant la fase S (Baum *et al.*, 1998). D'aquesta manera, s'aconsegueix reduir la seva activitat a una finestra molt estreta i evitar que un cop la fase S ha estat completada es torni a donar una activació dels orígens de replicació.

D'altra banda, l'expressió de la Cig2 també es troba sotmesa a regulació (Ayte *et al.*, 2001) El complex MBF (*Mlu Binding Factor*) que comprèn la proteïna Cdc10 unida a les proteïnes Res1 o Res2 regula l'expressió de gens importants per a la fase S, com ara *cdc18* i *cdt1*, a més de *cig2* (Obara-Ishihara and Okayama, 1994). En experiments de sobreexpressió es conclou que la Res1 té un paper activador, mentre que la Res2 té un paper repressor. Sorprenentment, aquest últim és parcialment dependent de la Cig2 i constitueix una retroalimentació negativa de la Cig2 sobre la seva pròpia expressió. La Cig2 pot unir-se a la Res2, però no per fosforilar-la. Més aviat, aquesta unió permet que la Cig2 es dirigeixi al complex MBF, on fosforila la Res1 a la Ser130. Com a conseqüència d'aquesta fosforilació té lloc una davallada en

l'expressió de gens dependents de MBF, entre els quals, com ja s'ha dit, es troba la pròpia Cig2. És important observar que un dels altres gens regulats pel complex MBF és el de la Cdc18. Per tant, a part de la regulació abans esmentada de l'estabilitat de Cdc18 per part de Cig2, també té una implicació en la regulació de la seva expressió. Així, el complex Cdc2-Cig2 evita la re-replicació a través de dues vies que condueixen a la desaparició de la proteïna Cdc18 dels orígens de replicació (fig. 2).

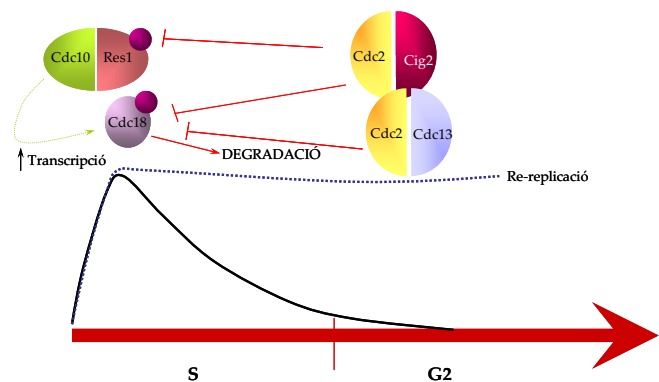


Fig. 2. Regulació de la Cdc18 per la Cdc2-Cig2.

1.2.3 Cig1:

La Cig1 va ser descrita per primera vegada com una ciclina de tipus B, amb un paper important en la progressió de la fase G1 (Bueno *et al.*, 1991). Tot i així, la seva delecció no té un efecte marcat en el cicle, donat que la Cdc13 pot assumir les

seves funcions (Fisher *et al.*, 1996). Val a dir que malgrat la seva funció és duta a terme durant la fase G1, la seva activitat és màxima durant la mitosi (Basi and Draetta, 1995).

A diferència dels complexos Cdc2-Cig2 o Cdc2-Cdc13, el complex Cdc2-Cig1 no pot ser inhibit per la Rum1 (Correa-Bordes and Nurse, 1995; Martin-Castellanos *et al.*, 1996; Benito *et al.*, 1998). Tanmateix, el complex Cdc2-Cig1 pot fosforilar la Rum1, afectant-ne l'estabilitat (Benito *et al.*, 1998). Així, la Cig1 conjuntament amb la Puc1 funciona promovent la degradació de la Rum1 i d'aquesta manera afavorint l'activitat dels complexos Cdc2-Cig2 i Cdc2-Cdc13 (Martin-Castellanos *et al.*, 2000), necessària d'altra banda per tal de progressar en les transicions G1/S i G2/M. És a dir, que els complexos Cdc2-Cig1 i Cdc2-Puc1 funcionarien com a monitors del creixement cel·lular durant la fase G1, promovent de forma indirecta la transició G1/S a través de la inhibició de la Rum1.

1.2.4 Cdc13:

La Cdc13 és l'única ciclina completament indispensable per a la progressió del cicle cel·lular. Els nivells de proteïna són fluctuants,

augmentant al llarg de G2 i davallant a mida que les cèl·lules progressen a través de la mitosi i la fase G1 (Creanor and Mitchison, 1996). Donat que la seva transcripció no pateix fluctuacions, aquestes són fruit de la seva degradació mitjançada pel complex APC (*Anaphase Promoting Factor*), que és alhora regulat per la pròpia Cdc2-Cdc13. Darrerament s'ha demostrat que la xaperona Cdc37 és necessària per tal que es formi el complex Cdc2-Cdc13 (Turnbull *et al.*, 2006).

A més de la regulació de la seva estabilitat, l'activitat del complex Cdc2-Cdc13 també es troba afectada per l'acció de l'inhibidor específic Rum1, així com per l'acció d'una quinasa activadora (CAK1), de quinases inhibidores (Wee1 i Mik1) i de la fosfatasa activadora Cdc25. Aquestes regulacions seran més àmpliament explorades en un apartat posterior dedicat a la regulació del complex Cdc2-Cdc13.

D'altra banda, considerant el seu paper en la progressió del cicle, aquest complex constitueix la diana última dels mecanismes de control o *checkpoints*, que l'inhibeixen en situacions de dany al DNA, bloqueig en la replicació, estrès, etc... per tal d'evitar que la cèl·lula

es divideixi fins que no hagi solucionat o s'hagi adaptat a aquests insults.

La localització del complex també ha estat motiu d'estudi, i ara sabem que pot estar localitzat al nucli durant les fases S i G2, però també al nuclèol, al *spindle pole body* (SPB), així com també al llarg del fus mitòtic (Alfa *et al.*, 1989; Alfa *et al.*, 1990; Gallagher *et al.*, 1993). En el cas del nucli, aquesta localització és clarament dependent de la Cdc13 (Alfa *et al.*, 1989). És interessant remarcar que molts dels seus reguladors també es localitzen al nucli (*v.g.* la Wee1 i la Cdc25) (Aligue *et al.*, 1997) i que, en el cas dels *checkpoints*, la deslocalització de la Cdc25 contribueix a la inhibició del complex (Lopez-Girona *et al.*, 1999).

En referència als seus substrats, un gran nombre de proteïnes poden ser fosforilades per la Cdc2-Cdc13, tot i que en molts casos el significat d'aquestes fosforilacions és elusiu. De la mateixa manera que quan la Cdc2 es troba unida a la Cig2, el complex Cdc2-Cdc13 pot fosforilar la Cdc18, promovent la seva dissociació del pre-RC i posterior degradació (Lopez-Girona *et al.*, 1998). Aquesta no és l'única forma

en que el complex pot evitar la re-replicació del DNA. Altres components del pre-RC com ara l'Orp2 són també dianes de la Cdc2-Cdc13 i la seva associació estable als orígens de replicació és necessària per tal de garantir que no es donarà un altre cicle de replicació fins que no s'hagi dut a terme la mitosi (Wuarin *et al.*, 2002).

La Cdc13 pot també interaccionar amb els microtúbuls (Booher and Beach, 1988) i, a més, altres substrats potencials durant la mitosi inclouen la fosfatasa Dis2 (Yamano *et al.*, 1994) i la proteïna reguladora dels microtúbuls i del SPB Dis1. Fins el moment, però, el paper d'aquestes fosforilacions resta irresolt.

La Cdc2-Cdc13 s'ha involucrat també en la condensació dels cromosomes i ara sabem que la seva implicació en aquest procés té lloc a través de la proteïna Cut3 (component de la condensina). La Cdc2-Cdc13 fosforila la Cut3 *in vitro* i com a mínim en un residu *in vivo*. La mutació d'aquest residu (T19) a alanina anul·la la seva funció en impedir que s'acumuli al nucli (Sutani *et al.*, 1999). També fent referència a la condensació de la cromatina, un substrat àmpliament utilitzat *in vitro* en assajos per

analitzar l'activitat del complex Cdc2-Cdc13 ha estat la histona H1. Aquesta conté dues regions bàsiques amb un elevat nombre de residus putatius de fosforilació per la Cdc2 (aa polar-S/T-P-X-K) que semblen estar implicats en la interacció del nucleosoma amb el DNA. La histona H1 és altament fosforilada durant la mitosi per la Cdc2 en mamífer (Langan *et al.*, 1989), i la Cdc2 immunoprecipitada de cultius de *S. pombe* es també capaç de fosforilar-la *in vitro*. Tot plegat sembla indicar que la histona H1 és un altre dels substrats de la Cdc2-Cdc13, i probablement aquesta fosforilació té una implicació en la condensació de la cromatina, prèvia a la mitosi.

Un concepte àmpliament acceptat en *Xenopus* i mamífer és l'existència d'un *loop* d'autoactivació de la Cdc2-Cdc13 a través dels seus reguladors principals Wee1 (Mueller *et al.*, 1995; Tang *et al.*, 1993; McGowan and Russell, 1995; Watanabe *et al.*, 1995) i Cdc25 (Kumagai and Dunphy, 1992; Kumagai and Dunphy, 1996; Izumi and Maller, 1993; Kuang *et al.*, 1994; Strausfeld *et al.*, 1994; Hoffmann *et al.*, 1993; Clarke *et al.*, 1993). En el cas de la primera es tractaria d'una fosforilació inhibidora, mentre que

en el cas de la segona seria activadora. Malgrat els antecedents en altres espècies i el fet que la regió amino-terminal de la Wee1 conté llocs potencials de fosforilació, no s'ha pogut demostrar que la Cdc2-Cdc13 la fosforili *in vivo*. En el cas de la Cdc25, el complex Cdc2-Cdc13 pot fosforilar-la *in vitro* (Wolfe and Gould, 2004) i una fosforilació activadora dependent de la Cdc2-Cdc13 ha estat també demostrada *in vivo* (Kovelman and Russell, 1996).

Mentre que en *S. cerevisiae* i en mamífer és un fet acceptat que la Cdc2 pot fosforilar el complex APC afavorint la forma activa unida a la subunitat Cdc20 (implicada en la separació de les cromàtides) (Rudner and Murray, 2000; Kraft *et al.*, 2003), una regulació similar no ha estat demostrada encara a *S. pombe*. Nogensmenys, sí que és ben establert que la Cdc2 pot fosforilar una altra subunitat de l'APC, la proteïna Ste9/Srw1, encarregada de degradar la ciclina Cdc13 durant la fase G1. (Yamaguchi *et al.*, 1997; Kitamura *et al.*, 1998; Blanco *et al.*, 2000). Aquesta fosforilació té com a resultat la dissociació de l'APC i la seva posterior proteòlisi. (Blanco *et al.*, 2000).

Fent també referència a la regulació de l'APC, també ha estat descrita la interacció de la Cdc2-Cdc13 amb la proteïna Psp1/Sds23 (Jang *et al.*, 1997). Tot i que la funció d'aquesta proteïna no és ben coneguda, se sap que té un paper positiu en la degradació mitjançada pel ciclosoma (Ishii *et al.*, 1996), probablement intervenint en el reconeixement de les *Destruction Boxes* de les proteïnes dianes per part de l'APC.

Per últim, també s'ha suggerit la implicació de la Cdc2-Cdc13 en la regulació de la citocinesi, donat que l'expressió d'una forma no degradable de la Cdc13 bloqueja la sortida de la mitosi i la formació del sept, alhora que impedeix la localització normal de membres de la via *SIN* (*Septation Initiation Network*) (Chang *et al.*, 2001).

Altres dianes no han estat fins el moment descrites, tot i que, donada la implicació de la Cdc2 en gran nombre de processos i que moltes proteïnes contenen el seu consens de fosforilació no es pot descartar que en el futur apareguin nous candidats.

1.3 Regulació dels complexos Cdc2-ciclins:

Com queda patent en l'apartat anterior, els complexos Cdc2-ciclins són els motors cel·lulars que permeten que el cicle progressi. Per aquest motiu, han d'estar perfectament controlats, ja que una activació prematura tindria com a conseqüència la divisió cel·lular sense que s'hagi pogut replicar el DNA o sense que s'hagi assolit la mida adequada. Aquests processos conduirien finalment a la pèrdua de la viabilitat de la cèl·lula. És per això que les cèl·lules han desenvolupat mecanismes per poder frenar la progressió del cicle cel·lular i que tenen com a objectiu final disminuir l'activitat dels complexos Cdc2-ciclins.

En aquest apartat es consideraran l'inhibidor específic Rum1, així com els processos de fosforilació i de defosforilació que afecten la funció de la Cdc2 i els mecanismes de degradació que regulen l'estabilitat de les ciclins. Per últim, malgrat que no l'afecti directament, també s'explorarà la implicació de la fosfatasa Flp1/Clp1 en la inactivació del complex Cdc2-Cdc13 i en la defosforilació dels seus substrats.

1.3.1 Rum1:

La Rum1 va ser identificada en virtut de la seva capacitat per bloquejar el cicle cel·lular en fase G1 (Moreno and Nurse, 1994). En treballs posteriors es va demostrar que aquest bloqueig era dut a terme a través la inhibició dels complexos Cdc2-Cdc13 i Cdc2-Cig2. (Correa-Bordes *et al.*, 1995; Martin-Castellanos *et al.*, 1996). Aquesta interferència en la progressió del cicle és important perquè manté les cèl·lules en un estat referit com a *pre-START* fins que aquestes han assolit una mida suficient per acomplir un altre cicle (Labib and Moreno, 1996; Martin-Castellanos *et al.*, 1996). Impedeix, a més, que es doni una mitosi sense que s'hagi

replicat prèviament el DNA (Correa-Bordes *et al.*, 1995). Així, la pèrdua de la Rum1 condueix a un escurçament de la fase G1 i impedeix que les cèl·lules puguin bloquejar-se en condicions de manca de fonts de nitrogen, essent en conseqüència estèrils. En contraposició, la sobreexpressió de Rum1 dóna lloc a un augment de la ploidia degut a re-replicació, reminiscent al que es dóna en absència de la Cdc13. (Jallepalli and Kelly, 1996; Correa-Bordes *et al.*, 1995). Rum1 no només inhibeix els complexos, sinó que també afavoreix que la Cdc13 pugui ser degradada durant la fase G1 (on ja no pot ser inhibida per la fosforilació a la Y15) (Hayles and

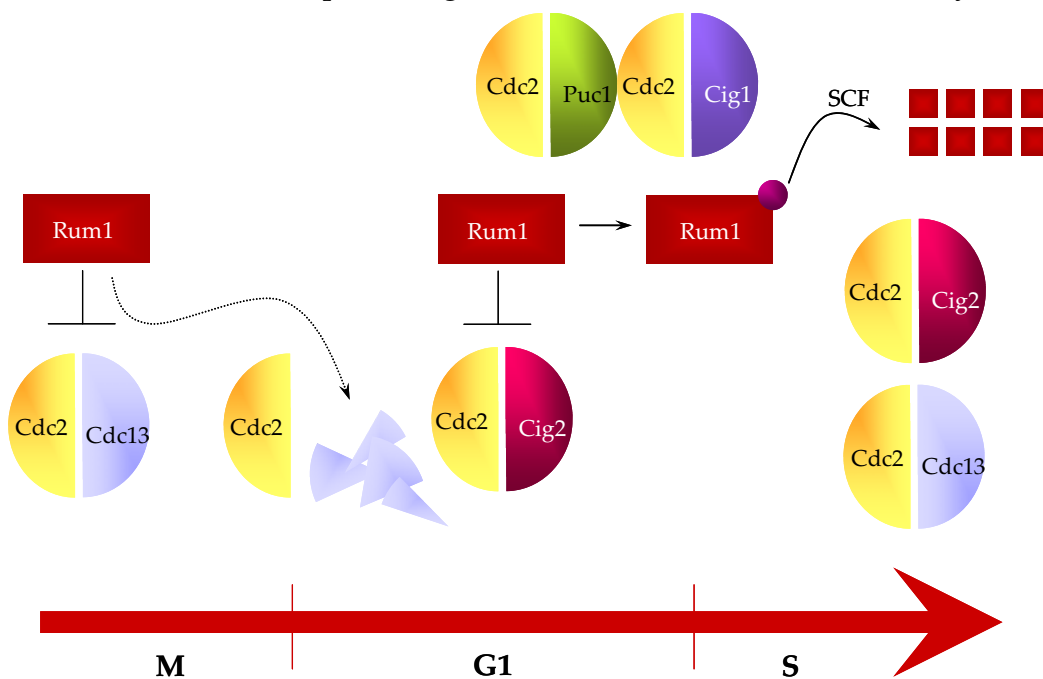


Fig. 3. Regulació de la fase G1 per Rum1.

Nurse, 1995). En aquest cas estaria actuant com a proteïna adaptadora entre la Cdc13 i la maquinària proteolítica (fig. 3) (Correa-Bordes *et al.*, 1997).

Rum1 comença a acumular-se al final de la fase M, i els nivells de proteïna són màxims durant la fase G1. A partir d'aquest punt, la fosforilació per part del complex Cdc2-Cig1 (que és insensible a la inhibició per Rum1) en els residus T58 i T62 el marca per a ser degradat (Benito *et al.*, 1998) (fig. 3). En el cas de la Rum1 la degradació està mitjançada pel complex ubiquitin-lligasa SCF (*Skp1*, *Cullin*, *F-Box protein*) i requereix en concret dos factors F-Box: la Pop1 i la Pop2 (Kominami and Toda, 1997; Jallepalli *et al.*, 1998; Kominami *et al.*, 1998; Maekawa *et al.*, 1998).

1.3.2 *Wee1/Mik1*:

L'activitat de la Cdc2 pot ser inhibida a través de la fosforilació en la tirosina 15 (Y15) (Gould and Nurse, 1989). Aquesta fosforilació és duta a terme per les quinases Wee1 i Mik1 (fig. 4), essent Wee1 la quinasa principal (Nurse, 1975; Russell and Nurse, 1987b; Featherstone and Russell, 1991; Lundgren *et al.*, 1991; Parker and Piwnicka-Worms, 1992;

McGowan and Russell, 1993; Lee *et al.*, 1994). Aquesta fosforilació inhibidora és necessària per tal d'evitar una activació prematura del complex Cdc2-Cdc13 i, en conseqüència, la delecció simultània d'ambdues quinases dona lloc a un fenotip de catàstrofe mitòtica (Lundgren *et al.*, 1991).

La Wee1 és alhora subjecte de regulació per altres quinases (Dunphy, 1994). La quinasa Nim1/Cdr1 es va clonar en un *screening* ideat per aïllar supressors de la mutació *cdc25-22* (Russell and Nurse, 1987a). La seva delecció provoca un alentiment en l'entrada en mitosi, mentre que la seva sobreexpressió l'accelera. La quinasa Nim1 juga el seu paper a través de la inhibició de la Wee1, però no a través de la Mik1, donat que la sobreexpressió és únicament letal en mutants *mik1*⁻ (Wu and Russell, 1993). Altres estudis *in vitro* confirmen aquest fet, demostrant que la fosforilació de la Wee1 en el seu domini catalític per la Nim1 disminueix la seva activitat (Coleman *et al.*, 1993; Parker *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1993).

És curiós, per altra banda, el fet que la localització de la Nim1 i de la Wee1 no sembla coincidir. Així, la

Wee1 és una proteïna predominantment nuclear, mentre que la Nim1 es detecta exclusivament al citoplasma (Wu *et al.*, 1996). S'han considerat dues hipòtesis que poguessin explicar aquest fet: la primera assumiria que la Nim1 al citoplasma fosforilaria la Wee1 de nova síntesi, inhibint-la abans que accedís al nucli. Una altra explicació plausible implicaria la contínua sortida i entrada del nucli per part de la Wee1, de la Nim1 o de totes dues. A favor d'aquesta hipòtesi estaria el fet que la interacció de la Wee1 amb la proteïna Swo1 (membre de la família Hsp90) s'ha demostrat necessària per la funció de la Wee1 (Aligue *et al.*, 1994). Aquest tipus de xaperones s'han relacionat prèviament amb la regulació de la localització de proteïnes, recolzant la hipòtesi del *shuttling*.

La Swo1 no només estaria participant en la localització de la Wee1, sinó que també tindria un paper en l'estabilitat de la Wee1 i la Mik1 (Goes and Martin, 2001).

Una altra quinasa amb homologia a la Nim1, la Cdr2, és també capaç d'inhibir la Wee1, fosforilant-la al domini N-terminal (regulador). És interessant notar que aquest domini

N-terminal conté diversos llocs potencials de fosforilació, així com una regió probablement involucrada en la localització i el reconeixement del substrat (Aligue *et al.*, 1997).

Per últim, la Wee1 i la Mik1 són substrats de les proteïnes de *checkpoint*, que les fosforilen estabilitzant-les. Aquest fet, però, serà explorat més endavant en l'apartat dedicat als *checkpoints*.

1.3.3 Cdc25:

Donat que el complex Cdc2-Cdc13 és inhibit per fosforilació en la Y15, per tal que les cèl·lules puguin avançar en el cicle cal que aquest residu sigui defosforilat (fig. 4). S'han descrit dues fosfatases capaces de dur a terme aquesta defosforilació: la Cdc25 i la Pyp3, jugant el paper dominant la Cdc25 (Russell and Nurse, 1986; Gould *et al.*, 1989; Gould *et al.*, 1990; Millar *et al.*, 1991; Millar *et al.*, 1992a; Kovelman *et al.*, 1996).

La Cdc25 s'acumula a la cèl·lula prèviament a l'entrada a mitosi, coincidint amb un augment del seu mRNA (Moreno *et al.*, 1990) i desapareix després de la fase M, probablement degut a la degradació mitjançada per ubiquitina (Nefsky and Beach, 1996).

D'altra banda, també s'ha suggerit que el control de la seva taxa traduccional actua com un sensor acoblant el creixement cel·lular amb la mitosi (Daga and Jimenez, 1999). L'activitat de la Cdc25 és també modulada per fosforilació. Com ja s'ha esmentat abans, la pròpia Cdc2 pot fosforilar-la (Kovelman *et al.*, 1996; Wolfe *et al.*, 2004) com a part d'un mecanisme de retroalimentació positiva de la seva pròpia activació. Aquesta fosforilació seria contrarestada a la sortida de mitosi per la fosfatasa homòloga a la Cdc14 de *S. cerevisiae* Flp1/Clp1 (Kovelman *et al.*, 1996; Wolfe *et al.*, 2004). La Cdc25 és també substrat de les quinases de *checkpoint* Chk1 i Cds1 (Peng *et al.*, 1997; Lopez-Girona *et al.*, 1999, Lopez-Girona *et al.*, 2001) i

de la quinasa *Srk1* en condicions d'estrès així com en condicions normals (Lopez-Aviles *et al.*, 2005). Es tracta, en aquest cas, de fosforilacions inhibidores de la seva funció, que participen alhora en la seva estabilització a través de la proteïna 14-3-3 Rad24.

En altres organismes s'ha demostrat que la quinasa POLO és també capaç de fosforilar i activar la Cdc25, però la mateixa regulació, tot i que se'n sospita l'existència, no s'ha pogut demostrar fins el moment per la quinasa Plo1.

1.3.4 CAK:

La Cdc2 pateix una altra fosforilació a banda de la prèviament esmentada per les quinases Wee1 i Mik1. La fosforilació del residu

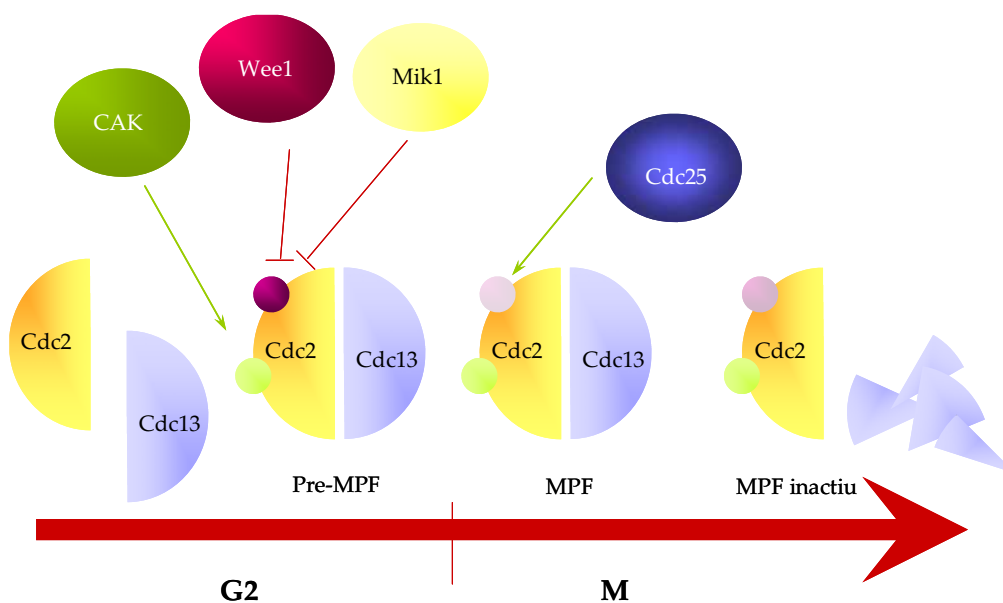


Fig. 4. Regulació del complex Cdc2-Cdc13.

treonina 167 (T167), situat a la regió *T-loop* produeix el rearranjament del domini d'unió al substrat i enforteix la interacció amb la ciclina, atorgant nous punts de contacte (Russo *et al.*, 1996) (fig. 4).

En eucariotes superiors la quinasa responsable d'aquesta fosforilació és també un complex Cdk-Ciclina, la Cdk7-CiclinaH (Harper and Elledge, 1998). A *S. pombe* existeixen dos tipus de quinases capaces de dur a terme aquesta fosforilació. La primera seria l'homòloga d'aquest complex a eucariotes superiors, i rep el nom de Mcs2-Mcs6 (Buck *et al.*, 1995; Damagnez *et al.*, 1995). L'altra correspondria a l'homòleg de la quinasa Cak1 de *S.cerevisiae*, anomenada Csk1 a *S. pombe* (Hermand *et al.*, 1998). La Csk1 pot fosforilar *in vitro* tant la Cdc2 com la Mcs6, però *in vivo* no és clar si ambdues quinases (la Csk1 i la Mcs6) poden fosforilar la Cdc2.

D'altra banda, no se sap si la fosforilació a la T167 és limitant per a l'activitat del complex Cdc2-Cdc13, ni si és prèvia o posterior a la fosforilació a la Y15.

1.3.5 *Plo1*:

La *Plo1* és una altra quinasa essencial per a la progressió del cicle

cel·lular. Les seves funcions són pleiotròpiques, intervenint en la formació del fus bipolar, en la formació de l'anell d'actina, en l'activitat de l'APC i en la septació (Ohkura *et al.*, 1995; May *et al.*, 2002). La seva sobreexpressió té conseqüències a molts nivells, però principalment condueix a una descoordinació entre la mitosi i la citocinesi. Atenent a les seves múltiples implicacions, no és d'estranyar que la seva localització sigui dinàmica. Així, la *Plo1* es localitza al *SPB* al principi de la mitosi i al llarg del fus mitòtic i en l'anell d'actina durant la citocinesi (Bahler *et al.*, 1998b; Mulvihill *et al.*, 1999).

Estructuralment, la *Plo1* com els seus homòlegs a *S.cerevisiae* (*Cdc5*) i a mamífer (*Plk1*) conté un domini quinasa altament conservat a la regió amino-terminal, i dos dominis *Polo-Boxes* (*PB1* i *PB2*) a la regió carboxi-terminal (Hudson *et al.*, 2001; Seong *et al.*, 2002). Les *Polo Boxes* semblen ser importants per a la localització de la *Plo1*, així com per a la interacció amb els seus substrats (Lee *et al.*, 1998; Seong *et al.*, 2002). Estudis realitzats per Elia *et al.* utilitzant llibreries peptídiques de diferents organismes van revelar

que la Plo1 s'uneix preferentment a pèptids fosforilats per Cdks, és a dir, Ser/Tre seguides de Pro. Curiosament, aquest residu fosforilat interaccionaria amb un Trp conservat entre espècies, que quan es muta impedeix la correcta localització de les Plks. Aquest fet recolzaria la hipòtesi que les Plks necessiten una fosforilació prèvia per part de la Cdc2 en els seus substrats per tal de poder fosforilar-los. Cal, però, tenir en compte que no tots els substrats coneguts de les Plks són també substrat de les Cdks. Una possibilitat seria que la fosforilació de substrats de Plks per part de les Cdks podria no ser necessària però afavoriria la fosforilació per Plks. Alternativament, alguns d'aquests substrats podrien contenir en la regió d'unió a Plks residus amb càrrega negativa que mimetitzessin aquesta fosforilació.

Contràriament al que succeeix a *S.cerevisiae* i mamífer, els nivells de mRNA i proteïna de la Plo1 no varien al llarg del cicle. La seva activitat, en canvi, sí que pateix fluctuacions. Això suggereix que són modificacions post-traduccionals (probablement fosforilacions) les que fan que la

seva activitat oscil·li. De fet, l'activitat mitòtica de la Plo1 pot ser abrogada mitjançant el tractament amb fosfatasa lambda (Tanaka *et al.*, 2001).

En un principi, evidències a *Xenopus laevis* van suggerir que la Plx1 (l'homòleg de Plo1 en aquest organisme) era la quinasa responsable de l'activació primerenca de la Cdc25 que conduïa a l'amplificació de l'activació de la Cdc2 (Kumagai *et al.*, 1996). Per contra, a *S. pombe* s'ha pogut demostrar que la Plo1 és inactiva en mutants *cdc25-22* o *cdc2-33*, on la Cdc2 encara no s'ha activat (Tanaka *et al.*, 2001). Hom esperaria que en aquests mutants la Plo1 fos ja activa, i el contrari indica que cal una activació prèvia de la Cdc2 per tal que la Plo1 s'activi. Donada la implicació de la Plo1 en la mitosi, aquest fet aniria més a favor d'un paper promovent l'amplificació de l'activació de la Cdc2 que a favor d'un paper com a iniciador del *loop*.

D'altra banda, encara es desconeix la quinasa responsable de l'activació de la Plo1. Si bé en un principi els resultats anteriors van suggerir que pogués ser la pròpia Cdc2, l'observació que la mutació del consens de fosforilació de la Plo1

per la Cdc2 no altera la seva activitat a mitosi contradiu aquesta hipòtesi. A *Xenopus*, la quinasa xPlkk s'ha identificat en virtut de la seva capacitat de fosforilar la Plx1 (Qian *et al.*, 1998). Existeixen homòlegs d'aquesta quinasa també a *S. pombe*, però no s'ha pogut establir encara cap relació. En un treball recent s'ha vist que la fosforilació depenent del *SRP* (*Stress Response Pathway*) a la Ser 402 és necessària per a la localització de Plo1 al *SPB* i la seva funció (Petersen and Hagan, 2005), però en aquest cas tampoc es coneix la quinasa responsable, donat que aquesta Ser no és consens de la MAPK Sty1.

Sembla, en qualsevol cas, que la correcta localització de la Plo1 al *SPB* a l'inici de mitosi és un esdeveniment important per a la seva activació i funcions posteriors. És un fet palès, que cal una activació de la Cdc2-Cdc13 per tal que es doni aquesta localització, però el mecanisme a través del qual funciona encara no s'ha resolt. En aquest aspecte, la proteïna Cut12 sembla jugar un paper important, donat que l'expressió d'un dominant hiperactiu localitza la Plo1 al *SPB* sense necessitat d'una activació de la Cdc2-Cdc13 (*v.g.* en

un mutant Cdc25-22 a la temperatura restrictiva). (Hudson *et al.*, 1990; Bridge *et al.*, 1998; Mulvihill *et al.*, 1999; MacIver *et al.*, 2003).

La dissociació de la Plo1 del *SPB* al final de mitosi també està regulada, essent necessària l'activació de l'*APC* (Mulvihill *et al.*, 1999). És interessant, d'altra banda, notar que la Plo1 mateixa s'ha involucrat en l'activació de l'*APC* i que s'ha suggerit que la interacció amb el component de l'*APC* Cut23 permetria dirigir la seva activitat a altres components del mateix complex (May *et al.*, 2002).

Per últim, la Plo1 també s'ha relacionat amb la regulació de la localització del septe a través de la regulació de la sortida del nucli de la proteïna Mid1/Dmf1 (Bahler *et al.*, 1998b), així com en la regulació de la cascada *SIN* (Tanaka *et al.*, 2001) i en la formació de l'anell d'actomiosina (Mulvihill and Hyams, 2002). A *S.cerevisiae* també té lloc una regulació de la via homòloga al *SIN*, la via *MEN*. Aquí s'ha establert que l'activació es dona a través de la inhibició de les proteïnes Bfa1-Bub2 (que inhibeixen la GTPasa Tem1 en afavorir la seva unió a GDP) per part de la Cdc5. No se sap encara si

en el cas de la Plo1 el mecanisme s'ha conservat, però sense cap dubte, les proteïnes homòlogues a Bfa1 i Bub2, Byr4 i Cdc16 serien bons candidats. Finalment, la pròpia via *SIN* semblaria tenir una implicació en la desactivació de la Plo1 (Tanaka *et al.*, 2001), però aquest és un tema que queda encara pendent en l'estudi de la regulació de la Plo1.

1.3.6 *Flp1/Clp1*:

La sortida de mitosi requereix la inactivació del complex CDK. A *S.cerevisiae*, això s'aconsegueix gràcies a la fosfatasa Cdc14, que promou la degradació de la ciclina i l'acumulació de l'inhibidor de CDKs Sic1 (Visintin *et al.*, 1998; Jaspersen *et al.*, 1999), a més de revertir fosforilacions en els substrats de la CDK. La Cdc14 té també implicacions en la citocinesi i s'ha definit com l'efector final de la via *MEN* (Traverso *et al.*, 2001).

Mitjançant l'alineament de seqüències s'han pogut trobar ortòlegs de la Cdc14 en altres organismes, entre els quals trobem la fosfatasa Flp1/Clp1 a *S. pombe* (Li *et al.*, 1997; Cueille *et al.*, 2001; Trautmann *et al.*, 2001; Gruneberg *et al.*, 2002). A diferència de la Cdc14,

però, la Flp1 no és essencial per a la viabilitat cel·lular, ni per a la sortida de mitosi (Cueille *et al.*, 2001). La Flp1 no és necessària per a la defosforilació i activació de la subunitat de l'APC Ste9, ni tampoc per a la degradació de la Cdc13 i l'acumulació de la Rum1 (Cueille *et al.*, 2001).

A *S.cerevisiae* la localització de la Cdc14 és el factor principal que regula la seva activitat. La Cdc14 es localitza al nuclèol unida al seu inhibidor Net1, i és la fosforilació d'aquest per part de les vies *FEAR* i *MEN* el que permet que durant l'anafase la Cdc14 abandoni el nuclèol en la seva forma activa (Stegmeier *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2002; Yoshida and Toh-e, 2002; Azzam *et al.*, 2004; Jaspersen *et al.*, 1998; Bardin *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2000). La Flp1 té en comú amb la Cdc14 la seva localització nucleolar en interfase i la seva dispersió cap el nucli i el citoplasma durant la mitosi, concentrant-se als cinetocors, al fus mitòtic i a l'anell d'actina (Cueille *et al.*, 2001; Trautmann *et al.*, 2001; Trautmann and McCollum, 2005). El mecanisme de retenció així com el seu alliberament són diferents als descrits per la Cdc14, donat que no

s'ha descrit que hi hagi cap proteïna homòloga a l'inhibidor Net1 i s'ha vist que la via *SIN*, homòloga al *MEN*, no és essencial per a la seva sortida del nuclèol (Cueille *et al.*, 2001). De forma interessant, però, la inactivació de la via *SIN* és necessària per tal que la Flp1 retorni a la seva localització nucleolar (Cueille *et al.*, 2001).

Tot i que la Flp1 s'allibera del nuclèol en etapes primerenques de la mitosi, ho fa en un estat hiperfosforilat que la manté inactiva. Aquesta fosforilació és duta a terme per la Cdc2 (Wolfe *et al.*, 2006). A mida que l'activitat de la Cdc2 disminueix durant l'anafase, la pròpia Flp1 té capacitat autocatalítica per revertir aquesta fosforilació, estimulando la seva activitat (Wolfe *et al.*, 2006). És per aquest motiu que la Flp1 no assoleix l'activitat màxima fins el final de la mitosi, i es crea així un gradient en l'activitat de la Flp1, que permet que només substrats d'elevada afinitat puguin ser defosforilats per la Flp1 al principi de mitosi.

Com s'ha esmentat abans, la Cdc14 promou la sortida de mitosi a través de la degradació de la ciclina mitòtica i l'acumulació de la Sic1. En el cas de la Flp1, el seu paper no és

essencial ni funciona a través dels mateixos mecanismes, tot i que també regula la sortida de mitosi. La Flp1 defosforila la Cdc25 i això fa que sigui reconeguda per l'APC i la ubiquitin-lligasa Pub1 i que, en conseqüència, es degradi. (Esteban *et al.*, 2004; Wolfe *et al.*, 2004). D'aquesta manera, la Flp1 conduiria a la inactivació de la Cdc2 en eliminar la retroalimentació positiva a través de la Cdc25, afavorint que la Cdc2 es trobi en la seva forma fosforilada a la Y15.

1.3.7 Proteòlisi mitjançada per ubiquitinització: SCF i APC/C

El proteasoma pot reconèixer i degradar proteïnes prèviament ubiquitinitzades i aquest és un pas imprescindible per tal que el cicle pugui avançar. La ubiquitinització és un procés dut a terme per l'acció conjunta de tres enzims: E1, enzim encarregat d'activar la ubiquitina, E2, enzim que conjuga la ubiquitina i E3 o ubiquitina lligasa. A *S. pombe* s'han descrit dos complexos E3, el SCF i l'APC/C, que seran explorats a continuació.

SCF(Skp1-Cullin1-F-Box)

A l'igual que l'APC, el SCF és un complex format per múltiples

subunitats i que s'ha conservat al llarg de l'evolució. A *S. pombe* aquest complex comprèn la subunitat Skp1 (Hermand *et al.*, 2003), les proteïnes Pop1 i Pop2 que contenen dominis F-Box i la subunitat *cullin*, Pcu1. La Pop1 i la Pop2 no són essencials, i es poden trobar formant homodímers o heterodímers (Kominami *et al.*, 1998). La Pop1 i la Pop2 s'encarreguen d'atorgar especificitat al complex, donat que les diferents combinacions condueixen a la degradació diferencial de substrats del SCF. En qualsevol cas, ambdues proteïnes s'han involucrat en la degradació de l'inhibidor de la Cdc2 Rum1, així com de la Cdc18 (Kominami *et al.*, 1997; Jallepalli *et al.*, 1998). En conseqüència, la delecció de qualsevol de les dues proteïnes condueix a poliploidies degudes a una inhibició de l'activitat de la Cdc2.

La Pcu1 es va aïllar per la seva semblança a les proteïnes *Cullin* identificades en altres organismes. De fet, es van trobar dues proteïnes amb elevada homologia, la Pcu1 i la Pcu3, tot i que només la primera pot formar complex amb la Pop1 i la Pop2, regula la poliploidia i és essencial per a la viabilitat cel·lular

(Kominami *et al.*, 1998). La Pcu3, però, s'ha implicat en la resposta a estrès, donat que la seva delecció dóna lloc a hipersensibilitat enfront condicions d'estrès (Kominami *et al.*, 1998). El paper de la Pcu1 seria el d'actuar com a plataforma per a la unió de les altres subunitats.

El complex SCF reconeix proteïnes prèviament fosforilades per la Cdc2, com és el cas de la Rum1 i la Cdc18, i la mutació d'aquests residus per altres no fosforilables condueix a l'estabilització de la proteïna (Lanker *et al.*, 1996; Schneider *et al.*, 1996; Henchoz *et al.*, 1997; Jallepalli *et al.*, 1997; Jallepalli *et al.*, 1998; Verma *et al.*, 1997; Baum *et al.*, 1998; Benito *et al.*, 1998; Nishizawa *et al.*, 1998).

Darrerament s'ha vist que un altre substrat del complex SCF és la ciclina de fase S Cig2 (Yamano *et al.*, 2004). Aquesta ciclina es degrada també pel complex de l'APC, però en el cas del SCF el motiu que es reconeix és diferent, implicant la fosforilació de residus a la regió *cyclin box*. El SCF degrada la Cig2 en acabar la fase S, mentre que l'APC la degrada en fase G1. S'aconsegueix d'aquesta manera que l'activitat del complex Cdc2-Cig2 quedi limitada a un moment molt concret del cicle

cel·lular. D'altra banda, la Pop1 i la Pop2 no regulen únicament l'estabilitat de la Cig2, sinó que també en regulen la transcripció (Yamano *et al.*, 2000), afegint un nou nivell de control en l'activitat d'aquesta ciclina.

APC/C

L'APC/Ciclosoma és l'altre complex ubiquitina-lligasa que funciona a *S. pombe*. Aquest, és essencial per tal que les cèl·lules progressin a anafase (King *et al.*, 1995; Hershko, 1997) i s'ha establert que la seva activitat persisteix al llarg de la fase G1 (Amon *et al.*, 1994; Yamano *et al.*, 1996).

L'especificitat de substrat així com la seva activitat és dependent de la unió a dues subunitats reguladores, Slp1 i Ste9 (Yamaguchi *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998; Kitamura *et al.*, 1998), homòlogues a les proteïnes de *S.cerevisiae* Cdc20 i Cdh1/Hct1, respectivament. El complex APC^{Cdc20} (APC^{Slp1} a *S. pombe*) és responsable de la separació de les cromàtides germanes a l'anafase, a través de la degradació de la proteïna securin (Cut2 a *S. pombe* i Pds1 a *S. cerevisiae*).

Fins l'anafase, les cromàtides germanes es mantenen unides mitjançant les cohesines. Per tal que durant la mitosi, els cromosomes

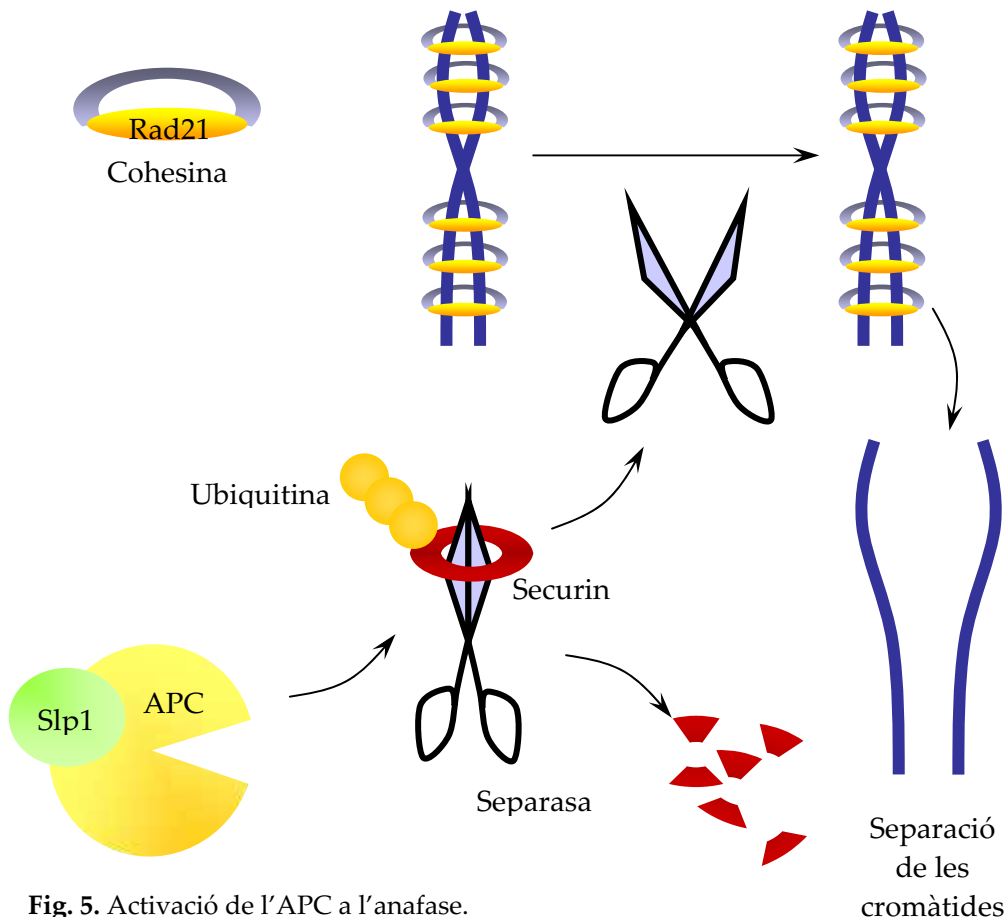


Fig. 5. Activació de l'APC a l'anafase.

puguin segregar, cal que la cohesina s'obri. En concret, és una de les subunitats que la formen, la proteïna Rad21 (*Scc1* a *S. cerevisiae*) la que és degradada. Aquesta degradació està mitjançada per la separasa (Cut1 a *S. pombe* o Esp1 a *S. cerevisiae*), que té activitat proteolítica (fig. 5). La proteïna securin s'uneix a la separasa impedint que s'activi de forma prematura a la cèl·lula, però un cop s'assoleix l'anafase, cal que sigui degradat a través de l'APC^{Slp1} (APC^{Cdc20}) per tal que la separasa pugui fer la seva funció i les cromàtides es puguin separar (fig. 5) (Funabiki *et al.*, 1996; Michaelis *et al.*, 1997; Ciosk *et al.*, 1998; Kumada *et al.*, 1998; Uhlmann *et al.*, 1999). La proteïna Slp1 té també un paper en la regulació del *checkpoint* d'acoblament del fus mitòtic, donat que es troba unida a la proteïna del *checkpoint* Mad2 mentre els microtúbuls no s'han associat correctament als cinetocors. Un cop es dona la unió estable del fus, es trenca la unió i la Slp1 s'allibera, formant el complex actiu APC^{Slp1} (Kim *et al.*, 1998).

Quant al complex APC^{Ste9}, se sap que és responsable de la degradació de les ciclins Cdc13 i Cig1 durant la

fase G1, però no a la sortida de mitosi (on es sospita que és el complex APC^{Slp1} el responsable), i que aquest complex és alhora inhibït per la fosforilació per la Cdc2 de la subunitat Ste9 durant la fase S i G2. Aquesta fosforilació actua a dos nivells: per una banda promou la separació de la Ste9 del complex i per l'altra en provoca la degradació (Blanco *et al.*, 2000). La Ste9 també es troba regulada a nivell de l'estabilitat del seu mRNA, essent ràpidament degradat en G2 per tal que la Cdc13 pugui acumular-se (Alvarez *et al.*, 2006).

Per últim, altres membres de l'APC poden patir modificacions, com ara fosforilacions (*v.g.* per PKA) o ubiquitinitzacions (revisat per Yanagida *et al.*, 1999), que també en regulen l'activitat. Tot plegat permet obtenir un control molt fi en la degradació de proteïnes necessària per a la progressió del cicle cel·lular.

Com ha quedat palès en aquest apartat dedicat a la regulació del cicle cel·lular de *S. pombe*, les progressions a través de les diferents fases del cicle són processos que han d'estar controlats de forma molt acurada, perquè qualsevol error es podria traduir en

la pèrdua de la viabilitat cel·lular. En els apartats que segueixen s'exploraran els diferents mecanismes de vigilància que adverteixen la cèl·lula quan algun procés s'està donant de forma errònia així com els sistemes que la cèl·lula ha desenvolupat per tal de fer front a canvis en el seu medi extracel·lular que li suposen un estrès. A mida que ens endinsem en l'estudi d'aquests processos ens adonem que el cicle cel·lular està íntimament lligat a aquests sistemes de control i es fa clara l'existència d'un diàleg entre la maquinària del cicle i la que regeix els mecanismes de vigilància i de resposta a estrès.

2. CHECKPOINTS:

Els mecanismes de vigilància o *checkpoints* permeten que la cèl·lula detecti anomalies que es poden donar a diversos nivells (dany al DNA, aturada de la replicació, acoblament incorrecte del fus mitòtic, orientació errònia del fus...) i que bloquegi la progressió en el cicle fins a resoldre aquests problemes. Els *checkpoints* esdevenen doncs mecanismes que afecten la funció del complex Cdc2-ciclina i seran per tant explorats a continuació com un cas concret de regulació d'aquest complex.

En primer lloc es parlarà del *checkpoints* que vetllen per la integritat del DNA i que inclouen els *checkpoints* de dany al DNA en les diferents fases del cicle així com el *checkpoint* de replicació. A continuació, també s'analitzaran els *checkpoints* que es refereixen a la correcta associació del fus mitòtic així com a l'orientació d'aquest.

En tots els casos, aquests mecanismes consten d'unes proteïnes que detecten els problemes, proteïnes que transdueixen els senyal i proteïnes efectores. Malgrat això, aquestes proteïnes no són sempre ben conegudes. En aquesta introducció

es farà referència bàsicament a les proteïnes que intervenen en el *checkpoint* de dany durant la fase G2 i en el *checkpoint* de replicació, perquè tenen el seu efecte en la fase del cicle de que es subjecte aquesta tesi.

2.1 *Checkpoints* que vigilen la integritat del DNA:

La integritat del DNA es pot veure afectada a diferents nivells i en diferents moments del cicle cel·lular. Així, les radiacions ionitzants (IR) provocaran al DNA talls de doble cadena (*Double Strand Breaks* o *DBS*), mentre que les radiacions UV o el MMS donaran lloc a lesions massives al DNA. D'altra banda, la depleció de ribonucleòtids per tractament amb hidroxidurea (que inhibeix l'enzim ribonucleòtid reductasa) atura la replicació del DNA i això també serà reconegut com una alteració en la topologia del DNA. A continuació, es presentaran els diferents *checkpoints* de dany al DNA que poden afectar la cèl·lula en funció de la fase del cicle en que es donen i per últim es parlarà del *checkpoint* de replicació del DNA.

2.1.1 Checkpoint de fase G1:

En cèl·lules de mamífer la detecció de dany al DNA durant la fase G1 dona lloc a una aturada en la progressió del cicle a través de dos mecanismes independents, el primer mitjançat per p53 i el segon per inhibició de la fosfatasa Cdc25A. A *S. pombe*, no hi ha cap proteïna homòloga a p53 i, tot i que es sospita que es pugui donar un bloqueig en fase G1 en resposta a alteracions en el DNA, aquesta fase és tan curta que no s'han estudiat els possibles mecanismes que hi puguin estar involucrats.

2.1.2 Checkpoint de intra-S:

A *S. pombe* existeix un *checkpoint* en resposta a radiació ionitzant durant la replicació del DNA (Christensen *et al.*, 2000), així com en resposta a radiació UV o MMS (Rhind and Russell, 1998; Lindsay *et al.*, 1998). La durada i extensió del bloqueig en el cicle és diferent en ambdós casos, de la mateixa manera que s'ha demostrat per *S.cerevisiae* (Tercero and Diffley, 2001). Bàsicament, el tractament amb MMS produeix tres efectes: en primer lloc, no s'activen els orígens de replicació que encara no ho havien fet; en segon lloc, les forquetes de replicació actives

alenteixen la seva progressió i, per últim, les forquetes tenen tendència a col·lapsar-se. Experiments en *S.cerevisiae* suggereixen que les proteïnes del *checkpoint* s'encarregarien de prevenir l'activació dels orígens de replicació tardans, però no intervindrien en l'alentiment de les forquetes funcionals. Més aviat semblaria que el propi dany al DNA suposaria un impediment físic a la progressió de les forquetes i en conseqüència resultaria un avanç més lent de la maquinària replicativa (Tercero *et al.*, 2001). Donat que les radiacions ionitzants produeixen menys lesions capaces d'alentir la progressió de les forquetes, el retràs que s'observa seria únicament degut a l'acció de les proteïnes del *checkpoint*. Finalment, a diferència del *checkpoint* de G2/M, aquest bloqueig del cicle no funciona a través de la Cdc2 i la Cdc25 (Kommajosyula and Rhind, 2006), tot i que recentment s'havia suggerit que fos així.

2.1.3 Checkpoint de G2/M:

Aquest és el *checkpoint* més estudiat a *S. pombe* i, donat que es tracta d'un mecanisme altament conservat a mamífer i *S. cerevisiae*, s'han pogut extrapolar molts dels descobriments

obtinguts en aquests organismes. Com ja s'havia comentat, aquest *checkpoint* es compon de proteïnes que detecten el dany, proteïnes que transdueixen el senyal i proteïnes efectores, com es representa en la següent taula:

<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>
Rad3	Mec1	ATR
Tel1	Tel1	ATM
Rad26	Ddc2	ATRIP
Rad17	Rad24	Rad17
Rad1	Rad17	Rad1
Rad9	Ddc1	Rad9
Hus1	Mec3	Hus1
Cut5	Dpb11	TopBP1
Crb2	Rad9	BRCA1
Chk1	Chk1	Chk1
Mrc1	Mrc1	Mrc1
Cds1	Rad53	Chk2

Taula 1. Proteïnes que participen en el *checkpoint* de fase G2. En blau s'indiquen les proteïnes implicades en la detecció del dany, en groc les proteïnes que transdueixen el senyal i en taronja les efectores.

2.1.3.1 Reconeixement del dany al DNA:

Tot i que el mecanisme que reconeix el dany a *S. pombe* no es coneix del cert, sí que està ben establert què és el que succeeix a mamífer. Extrapolant el paper de les proteïnes ATM/ATR i ATRIP s'assumeix que les proteïnes homòlogues Rad3 i

Rad26 s'associen a la cromatina danyada (taula 1). La Rad26 és llavors fosforilada de forma depenent de la Rad3 (probablement de forma directa), i aquest fet reflecteix l'activació del *checkpoint* (Edwards *et al.*, 1999).

La Rad3 és una proteïna gran amb un domini similar a PI-3 kinasa (Bentley *et al.*, 1996). Presenta la màxima homologia amb l'ATR, tot i que també comparteix certa homologia amb l'ATM. A mamífer, l'ATM respon principalment a trencaments de doble cadena, mentre que l'ATR està implicat en la resposta a danys massius al DNA (per tractament amb radiació UV o MMS) i a bloqueig en la replicació. A *S. pombe* l'homòleg d'ATM és la proteïna Tel1 (taula 1), però aquesta no està implicada en la senyalització del *checkpoint*, sinó que se l'ha relacionat amb el manteniment dels telòmers.

La Rad3 s'associa *in vivo* amb la Rad26 i, encara que l'activitat de la darrera és desconeguda, és essencial per a la funció de la Rad3 (Edwards *et al.*, 1999). En mamífer i en *S. cerevisiae* les proteïnes homòlogues a la Rad26, l'ATRIP i la Ddc2 (taula 1) són necessàries per tal que els homòlegs de la Rad3, l'ATR i la

Mec1 s'uneixin a la cromatina danyada (Kondo *et al.*, 2001; Melo *et al.*, 2001; Zou and Elledge, 2003; Rouse and Jackson, 2002). Considerant això, s'ha suggerit que la Rad26 podria estar dirigint la Rad3 a les zones on hi ha l'alteració del DNA (fig. 6).

Entre les proteïnes necessàries per el *checkpoint* d'integritat del DNA trobem també la proteïna Rad17, que comparteix homologia amb les subunitats del RFC (*Replication Factor C*) (Griffiths *et al.*, 1995). La Rad17 pot associar-se a les quatre subunitats petites del RFC, Rfc(2-5) (Shimada *et al.*, 1999). La Rad17 estaria substituint la subunitat Rfc1 del RFC, donant lloc a un nou complex, el CLC (*Checkpoint Loading Complex*) (Caspari *et al.*, 2000; Green *et al.*, 2000).

D'altra banda, les proteïnes Rad9, Rad1 i Hus1 (9·1·1) formen una estructura similar a la del PCNA (complex necessari per a la processivitat de les polimerases Pole i Pol δ durant la replicació) (Thelen *et al.*, 1999; Caspari *et al.*, 2000). El PCNA s'assembla a una anella que llisca al llarg del DNA, i s'ha proposat que el complex 9·1·1 podria funcionar de la mateixa forma, desplaçant-se al llarg de la

cromatina per detectar les zones de dany, formant el que s'ha anomenat CSC (*Checkpoint Sliding Clamp*). Per analogia amb el que s'ha descrit en referència al RFC i al PCNA, el complex 9·1·1 seria carregat al DNA pel complex Rad17·Rfc2-5, de forma independent de Rad3 (fig. 6). El fet que dos mecanismes independents siguin necessaris per tal de detectar el dany al DNA evita que alteracions puntuals en l'estructura de la cromatina, tals com la transcripció de gens, donin lloc a una activació del *checkpoint*.

2.1.3.2 Propagació del senyal:

Per tal que el senyal d'activació del *checkpoint* arribi a les proteïnes efectores, cal que dues proteïnes, la Crb2 i la Cut5/Rad4, s'associïn als complexos de reconeixement prèviament descrits.

Cut5 és una proteïna essencial, no únicament implicada en la resposta a dany al DNA a fase G2, sinó també implicada en els *checkpoints* d'altres fases del cicle o per aturada en la replicació. Té, a més, un paper en la replicació del DNA durant un cicle normal (Fenech *et al.*, 1991; Saka *et al.*, 1997).

La Crb2 es va aïllar en un doble híbrid per la seva capacitat

d'interaccionar amb la Cut5 (Saka *et al.*, 1997; Willson *et al.*, 1997), i s'ha observat que també pot fer-ho amb la Chk1. Tant la Cut5 com la Crb2 contenen dominis BRCT a la seva estructura. Aquests dominis evolutivament conservats es poden trobar també en diverses proteïnes de reparació del DNA i esdevenen mòduls d'interacció entre proteïnes (Lehmann, 1993).

La pèrdua de la Crb2 o de la Cut5 evita que la Chk1 pugui ser fosforilada en resposta a dany al DNA (McFarlane *et al.*, 1997), però no afecta altres proteïnes del *checkpoint* que també es fosforilen de forma dependent de la Rad3 (Rad26, Rad9, Hus1). Considerant aquest seguit de dependències en la propagació del senyal, tot semblaria indicar que la Crb2 i la Cut5

actuarien com a adaptadors que permetrien l'associació de la Chk1 amb el complex format a la zona del DNA malmès (fig. 6). Aquesta hipòtesi seria consistent amb el que ja s'ha demostrat en mamífer per les proteïnes homòlogues Cut5 i Rhp9 (Makiniemi *et al.*, 2001).

En qualsevol cas, el que és clar és que totes les proteïnes descrites fins el moment són necessàries per tal que la Chk1 es fosforili en darrer terme (fig. 6) (Walworth and Bernardis, 1996).

2.1.3.3 Execució del senyal: Chk1

Un cop la Chk1 ha estat fosforilada i activada ha de transduir el senyal de dany. Per fer-ho, la Chk1 interacciona amb les proteïnes que regulen la progressió del cicle cel·lular Wee1 i Cdc25, activant la

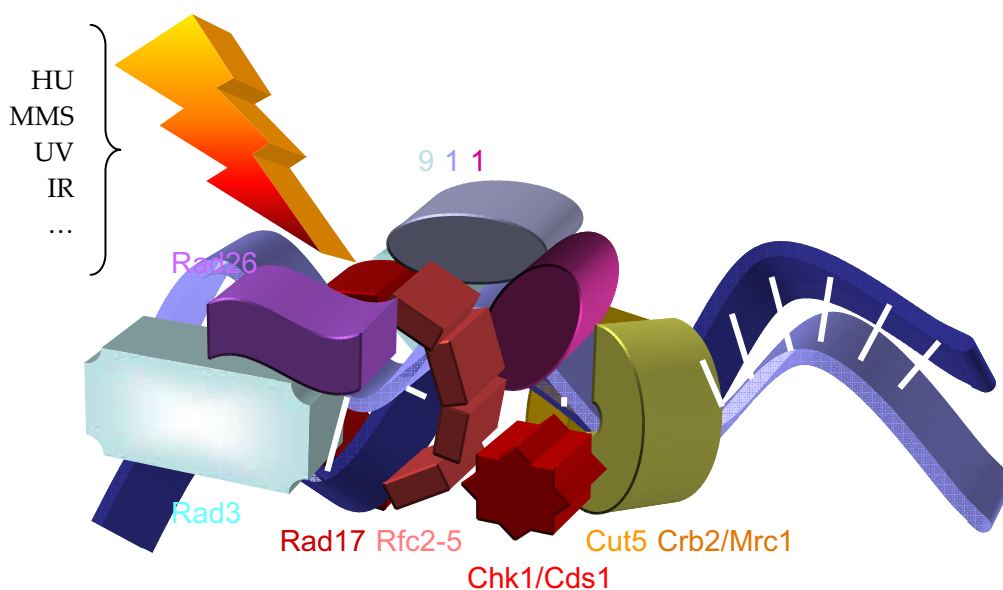


Fig. 6. Proteïnes dels *checkpoints* de dany al DNA i de replicació.

primera i inhibint la segona (Raleigh and O'Connell, 2000) per tal d'afavorir l'estat inhibit (fosforilat a la Y15) de la Cdc2 (fig. 7).

Quant a la fosforilació de la Cdc25, en mamífer s'ha observat que permet la unió d'una proteïna 14-3-3 i que això és important per al *checkpoint* (Peng *et al.*, 1997). A *S. pombe* existeixen dues proteïnes 14-3-3, la Rad24 i la Rad25 (Ford *et al.*, 1994). Totes dues proteïnes s'uneixen a la Chk1 i ho fan amb més afinitat a la forma fosforilada (Chen *et al.*, 1999). La Cdc25 pot ser fosforilada per la Chk1 en múltiples residus del domini N-terminal i la mutació de nou d'aquests abroga el bloqueig en resposta a dany al DNA o a aturada en la replicació (Zeng *et al.*, 1998). Els residus fosforilats esdevenen llocs d'unió per la Rad24 i la Rad25, i aquesta associació té com a resultat l'exclusió de la Cdc25 del nucli (fig. 7) (Lopez-Girona *et al.*, 1999). Tot i que en un principi es va creure que la separació de la Cdc25 del seu substrat (la Cdc2) era suficient per inhibir-ne la funció, més endavant es va demostrar que la fosforilació de la Cdc25 per la Chk1 té alhora un efecte negatiu sobre la seva activitat catalítica (Furnari *et al.*, 1999). És a dir, la

deslocalització de la Cdc25 per si sola no impedeix que el cicle avanci, i cal que la seva activitat sigui inhibida per tal que les cèl·lules puguin frenar la progressió en el cicle en resposta a dany al DNA (Lopez-Girona *et al.*, 2001). Curiosament, la Cdc25 i la Rad24 també es troben associades en condicions normals i de forma independent de la Chk1 durant la interfase (Chen *et al.*, 1999). A més, la unió entre ambdues proteïnes no augmenta en resposta a dany al DNA. Una possible explicació a aquest fet podria ser que altres quinases serien responsables de la fosforilació durant la interfase i, en mitosi, la fosforilació per la Chk1 impediria que la Rad24 es dissociés de la Cdc25.

D'altra banda, el paper de les proteïnes 14-3-3 (que existeixen com a dímers en solució) és probablement el d'afavorir la interacció entre proteïnes. El fet que la Rad24 pugui unir-se també a la Chk1 podria estar indicant que la Rad24 està promovent la interacció entre la Chk1 i les seves dianes.

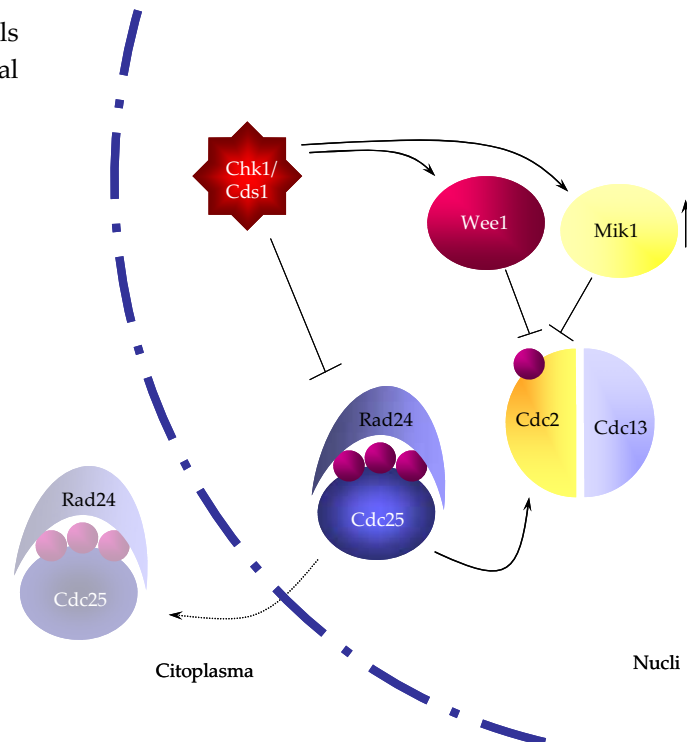
Hi ha hagut certa controvèrsia en referència al paper de les quinases inhibidores Wee1 i Mik1 (O'Connell *et al.*, 1997; Baber-Furnari *et al.*, 2000;

Raleigh *et al.*, 2000; Rhind and Russell, 2001). L'expressió de la Mik1 és fluctuant al llarg del cicle, experimentant un pic màxim a la fase S (Baber-Furnari *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2000). La Wee1, en canvi és la quinasa dominant en quant a la inhibició de la Cdc2-Cdc13 a la transició G2/M. Això, juntament amb el fet que la Wee1 s'hiperfosforila de forma dependent del *checkpoint* (O'Connell *et al.*, 1997) va portar a pensar que la Wee1 era l'altra diana a través de la qual la Chk1 efectuava el *checkpoint*. Curiosament, no es podia explicar el fet que cèl·lules que contien al·lels inactius per la Wee1 i la Cdc25 encara podien bloquejar-se en resposta a dany al DNA. Estudis posteriors però, van poder demostrar que la Mik1 també participa en la resposta al *checkpoint*. En primer lloc, una regulació positiva de la seva activitat facilita que es pugui establir el *checkpoint* i, si l'exposició a l'agent genotòxic és mantinguda, un increment en la seva transcripció i la subsegüent acumulació de la proteïna permet el manteniment de la resposta (fig. 7) (Baber-Furnari *et al.*, 2000; Rhind *et al.*, 2001). No obstant, cal tenir en compte que l'aportació d'aquestes

dues quinases és menor quan es compara amb el paper de la Cdc25, donat que la doble delecció de *wee1* i de *mik1* no presenta cap defecte en l'execució del bloqueig.

Per últim, cada cop més s'està arribant al convenciment que les proteïnes de *checkpoint* no només regulen la maquinària del cicle, sinó que també coordinen i participen en els mecanismes de reparació. Un exemple patent és la demostració que la Crb2 és necessària per modular l'activitat de l'helicasa Rqh1 i la topoisomerasa Top3 durant la fase G2 després d'haver produït talls de doble cadena per radiació ionitzant (Caspari *et al.*, 2002). De la mateixa manera, en el cas de les proteïnes de *checkpoint* de replicació, la proteïna efectora Cds1 (que es comentarà a continuació) també és necessària per regular l'activitat de la resolvasa Mus81. La Mus81 està implicada en la resolució d'estructures de recombinació (Boddy *et al.*, 2001; Kaliraman *et al.*, 2001), com ara les *Holliday junctions*, un estat intermedi en la recombinació que es dona quan hi ha un bloqueig de les forquetes de replicació. Així, darrerament s'han estat concentrant esforços en esbrinar ja no només el mecanisme

Fig. 7. Execució dels *checkpoints* de dany al DNA i de replicació.



que permet bloquejar la progressió en el cicle, sinó també de quina manera s'aconsegueix acoblar aquest bloqueig amb l'adaptació o la resolució del dany.

2.1.4 Checkpoint S_{dNTP-M} o de replicació:

El *checkpoint* que s'activa en resposta a un bloqueig en la replicació (degut a l'addició d'HU) tot i que es troba conservat en eucariotes superiors va ser descrit per primera vegada a *S. pombe*. El bloqueig en el cicle cel·lular secundari a l'aturada en la replicació és fruit de la fosforilació de la Y15 de la Cdc2. Genèticament es va poder demostrar perquè el mutant *cdc2-3w* que codifica per una Cdc2 insensible a la fosforilació en la Y15, no pateix el bloqueig a mitosi

que s'hauria de donar pel tractament amb HU. Les proteïnes implicades en aquest *checkpoint* són comunes en la seva majoria a les que intervenen en el *checkpoint* de G2-M en resposta a dany al DNA i que han estat explicades a l'apartat anterior. Únicament dues proteïnes difereixen. La Mrc1 i la Cds1 són, respectivament, encarregades de transduir el senyal i d'efectuar el *checkpoint*. A continuació s'analitzarà el paper d'aquestes dues proteïnes.

2.1.4.1 Proteïnes específiques del *checkpoint* de replicació: Cds1 i Mrc1:

Un cop presentades les proteïnes que intervenen en el *checkpoint* de dany al DNA, la resposta a bloqueig

en la replicació o *checkpoint* S_{dNTP}-M és molt més fàcilment abordable. Bàsicament, gran part de les proteïnes implicades coincideixen amb les del *checkpoint* de dany al DNA. Els dos *checkpoints* únicament difereixen en dos elements: la quinasa efectora, Cds1 en lloc de Chk1 i en una de les proteïnes encarregades de transmetre el senyal, Mrc1 i no Crb2. La quinasa iniciadora del *checkpoint* de replicació continua essent la Rad3, i per tal que s'activi la quinasa efectora Cds1 segueix essent necessària la funció dels complexos Rad17-Rcf2-5 i Rad9-Rad1-Hus1. La Cut5 és igualment requerida per a la transmissió del senyal però, en canvi, la Crb2 no hi intervé i en el seu lloc hi juga un paper equivalent en l'activació de la Cds1 la proteïna Mrc1 (Alcasabas *et al.*, 2001; Tanaka and Russell, 2001). La Mrc1 és fosforilada de forma dependent de la Rad3, i també de la quinasa homòloga Tel1 (Zhao *et al.*, 2003) i aquesta fosforilació permet la unió amb la Cds1.

La Cds1 no només respon a bloqueig en la replicació, sinó que també s'activa en resposta a dany al DNA durant la fase S (Murakami and Okayama, 1995; Boddy *et al.*,

1998; Lindsay *et al.*, 1998). És interessant comprovar que és suficient la substitució de la Crb2 per la Mrc1 per tal que la maquinària de *checkpoint* pugui específicament activar un efector o un altre.

De la mateixa manera que s'ha explicat per la Chk1, la Cds1 també pot fosforilar la Cdc25 (fig. 7) (Boddy *et al.*, 1998; Zeng *et al.*, 1998; Furnari *et al.*, 1999; Rhind *et al.*, 1998) i, d'altra banda, en resposta a bloqueig en la replicació té lloc una acumulació del mRNA i de la proteïna de la Mik1 (Baber-Furnari *et al.*, 2000; Boddy *et al.*, 1998; Christensen *et al.*, 2000), probablement a través de la regulació del factor de transcripció Cdc10. El paper de la Mik1 en aquest *checkpoint* és més important que el que juga en el de dany al DNA perquè, en absència de la Cdc25, la Mik1 per si sola és capaç d'aturar el cicle cel·lular (Rhind and Russell, 2001). De nou, el paper de la Wee1 resulta un tant obscur, ja que se sap que pot ser fosforilada per la Cds1 *in vitro*, però el significat que això pugui tenir *in vivo* no s'ha establert. En altres organismes, en canvi, semblaria que la fosforilació

contribuiria a l'estabilització de la Wee1 (Yamada *et al.*, 2004).

Per últim, la quinasa Chk1 pot reforçar aquest *checkpoint* en condicions en que la Cds1 no és funcional (Boddy *et al.*, 1998; Zeng *et al.*, 1998; Brondello *et al.*, 1999). Segurament aquest fet és degut a que l'aturada mantinguda de la replicació genera finalment dany al DNA. Per aquest motiu ha estat difícil la separació del papers de cadascuna d'aquestes quinases en els *checkpoints*.

2.2 *Checkpoint* d'acoblament del fus mitòtic:

Durant la mitosi, les cèl·lules han de segregat de forma equitativa el DNA que han duplicat prèviament durant la fase S. Si qualsevol d'aquests processos no es du a terme de forma correcta, això condueix a la pèrdua o al guany de material genètic. Sovint aquestes alteracions són letals per la cèl·lula i, en organismes superiors, poden predisposar al càncer.

El *checkpoint* d'acoblament del fus mitòtic protegeix la integritat del genoma perquè controla que les cromàtides germanes estiguin correctament unides al fus de microtúbuls a través dels

cinetocors. Només que un dels cinetocors no estigui unit al fus provoca que el *checkpoint* bloquegi el cicle cel·lular abans que les cèl·lules progressin en l'anafase. D'aquesta manera es prevé la segregació dels cromosomes fins que no s'ha corregit el defecte.

En *S. pombe* les primeres proteïnes que van ser identificades en aquest *checkpoint* van ser la Mad2 i la Mph1 (l'homòleg de la Mps1 de *S. cerevisiae* i eucariotes superiors). Es va observar que mutants d'aquests dos gens eren defectius en l'execució del *checkpoint* i que la seva sobreexpressió bloquejava el cicle cel·lular en l'anafase (He *et al.*, 1997; He *et al.*, 1998). Altres components del *checkpoint* (Mad1, Mad3, Bub1 i Bub3) es van poder identificar per homologia de seqüències amb proteïnes prèviament identificades a *S. cerevisiae* (Bernard *et al.*, 1998; Ikui *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Millband and Hardwick, 2002). A part d'aquestes, l'Ark1 (l'homòleg de la quinasa Aurora (Petersen and Hagan, 2003)), els components del SPB Alp4 i Alp6 (Vardy and Toda, 2000) i la proteïna associada als microtúbuls Alp14 (Garcia *et al.*, 2001) també juguen un paper en la senyalització del *checkpoint*.

Gràcies al fet que les proteïnes que intervenen estan altament conservades entre organismes, s'ha pogut establir un model consens. L'activació del *checkpoint* es dona per una manca de tensió o per la presència de cinetocors no acoblats al fus. Les proteïnes del *checkpoint* formen petits sub-complexes la composició dels quals es veu alterada com a part de la resposta. Així, per exemple, la Bub1 i la Bub3 es troben unides durant interfase, i és només a la mitosi que formen un trímer amb la Mad1 (fig. 8) (Brady and Hardwick, 2000). Quan té lloc l'activació del *checkpoint*, les proteïnes Mph1, Mad1, Mad2, Mad3, Bub1 i Bub3 es localitzen als cinetocors no acoblats (fig. 8). En el cas de la Mad1 i la Bub1, aquesta unió als cinetocors és més estable que en el cas de les altres proteïnes (Howell *et al.*, 2000; Howell *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2004). L'associació de les proteïnes del *checkpoint* amb els cinetocors és important per a l'activació d'aquesta via (Kadura *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 1998; Vanoosthuyse *et al.*, 2004), probablement perquè afavoreix que es trenquin interaccions entre les pròpies proteïnes del *checkpoint* i es formi l'anomenat *Mitotic Checkpoint*

Complex (MCC) (Sudakin *et al.*, 2001). El MCC bloqueja l'anafase a través de la unió a l'APC. Com ja es va comentar en un apartat anterior, l'APC^{Slp1} és el complex encarregat d'ubiquitinitzar la proteïna *securin* (que manté la *separasa* inhibida), per tal que la *separasa* pugui degradar la *cohesina* que manté les dues cromàtides germanes unides. Durant l'activació del *checkpoint*, la Slp1 s'acobla al MCC i d'aquesta manera s'evita que s'activi l'APC (fig. 8) (revisat a Yu, 2002). Un cop tots els cinetocors estan correctament acoblats al fus, la interacció de la Slp1 amb la Mad2 desapareix (Ikui *et al.*, 2002). Segurament la formació de nou dels complexos inicials permet que s'alliberi la Slp1.

Un aspecte que requeriria un estudi més profund per tal de poder entendre el funcionament del *checkpoint* és el paper de les fosforilacions en aquesta via. La proteïna Mph1 té activitat quinasa i s'ha demostrat necessària per a l'hiperfosforilació de la Mad1 i la seva localització als cinetocors (Abrieu *et al.*, 2001; Stucke *et al.*, 2002; Hardwick *et al.*, 1996). La Bub1 és també una quinasa, i la seva activitat és necessària per tal de

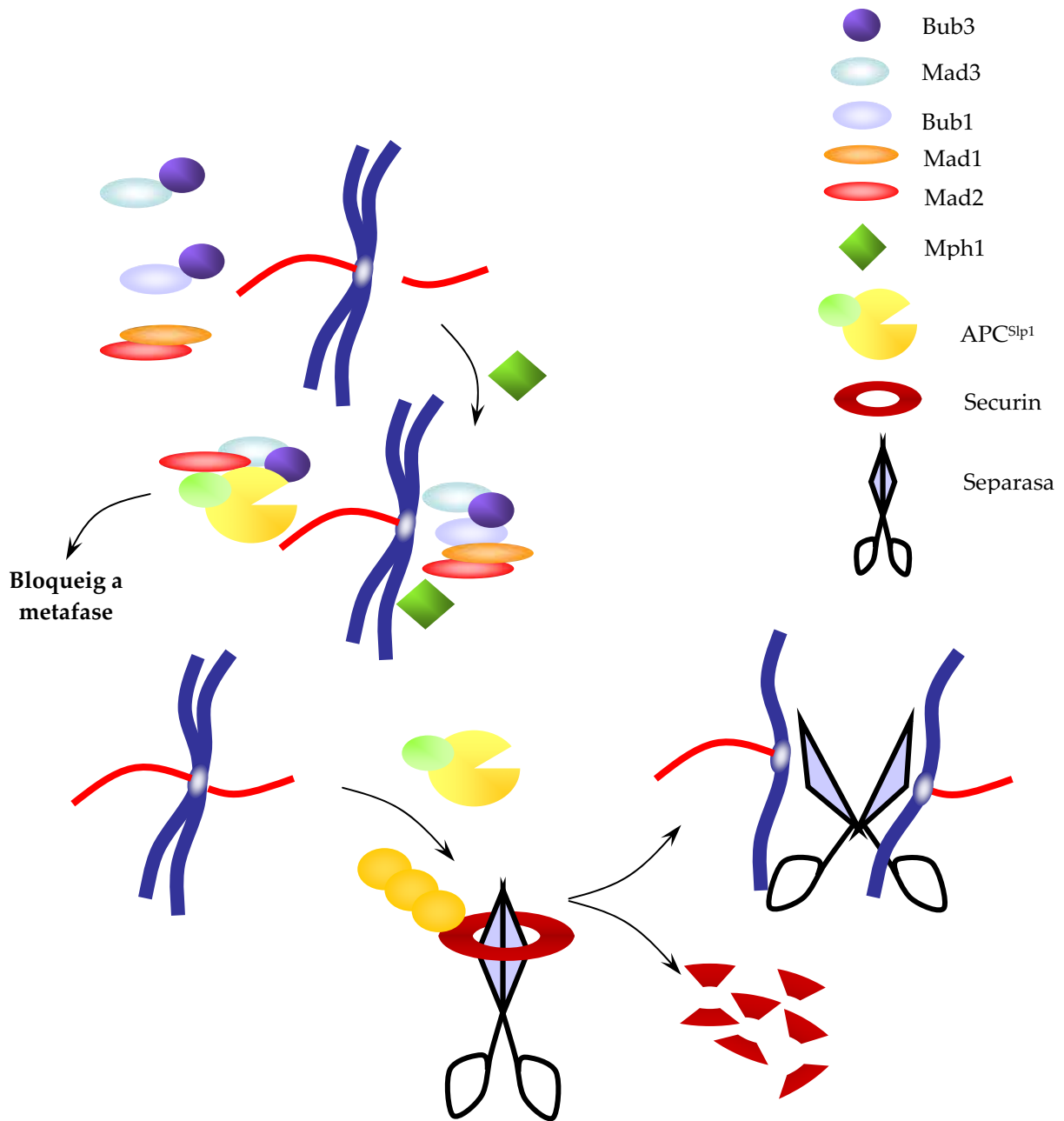


Fig. 8. *Checkpoint* d'acoblament del fus mitòtic.

reclutar tots els components del *checkpoint* als cinetocors. A més, la Bub1 és també un substrat de la Cdc2, i aquesta fosforilació contribueix a la seva funció (Yamaguchi *et al.*, 2003). Evidències en altres organismes suggereixen

que la fosforilació d'altres components del *checkpoint* poden intervenir també en la regulació de l'establiment del bloqueig en anafase.

De forma interessant, la pèrdua de la cohesió entre cromàtides

germanes (v.g. en mutants de la Rad21) també activa el *checkpoint*, suggerint que aquests components de la *cohesina* estan afavorint la interacció del fus amb el cinetocor (Toyoda *et al.*, 2002).

Per últim, el *checkpoint* d'acoblament del fus mitòtic també ha d'interferir amb el procés de septació. En aquest cas aquesta regulació seria independent de Mad2 i Bub3 i funcionaria a través de la via *SIN*. Si atenem al que passa en *S. cerevisiae*, la Bub2 (per analogia amb la regulació de la Dbf2) seria un bon candidat com a regulador del component del *SIN*, Sid2 (Fesquet *et al.*, 1999).

2.3 Checkpoint d'orientació del fus mitòtic:

El fus mitòtic ens proporciona un altre mecanisme de control addicional del cycle cel·lular a part de l'esmentat en l'apartat anterior. En aquest cas es tracta del *checkpoint* d'orientació del fus, que bloqueja la mitosi si el fus no està correctament alineat de forma paral·lela a l'eix longitudinal de la cèl·lula.

Per tal d'explorar el funcionament d'aquest *checkpoint*, cal comprendre en primer lloc de quina manera es

posiciona i s'orienta el fus en condicions normals.

El posicionament del fus es pot dividir en tres etapes (fig. 9). Durant la profase, el fus es forma molt a prop del còrtex de la cèl·lula i s'alinea amb l'eix polar de la cèl·lula. Aquest fenomen rep el nom de migració del fus. A la metafase, els microtúbuls astrals inicien la rotació del fus per tal d'alinear-lo amb l'eix longitudinal de la cèl·lula. En aquest punt l'angle que es forma entre l'eix polar i el fus és aproximadament de 30° (Gachet *et al.*, 2004). Seguidament, els cromosomes segreguen i el fus acaba d'alinear-se amb l'eix longitudinal. Per últim, durant l'anafase B els microtúbuls astrals són necessaris per corregir la posició del fus fins el final de la mitosi, en un procés que s'ha anomenat

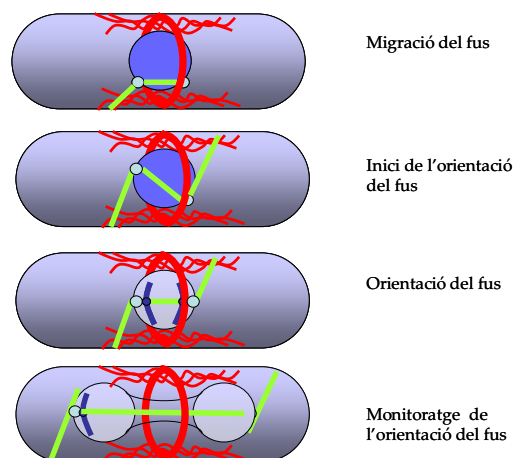


Fig. 9. Posicionament del fus mitòtic.

monitoratge de l'orientació del fus (fig. 9) (Tolic-Norrelykke *et al.*, 2004). Així, els mecanismes que governen el correcte posicionament del fus mitòtic depenen de la presència de microtúbuls astrals funcionals i, quan se n'afecta la nucleació, la pèrdua d'aquests condueix a l'orientació errònia del fus (Krapp *et al.*, 2001; Samejima *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2003).

D'altra banda, els extrems positius dels microtúbuls astrals interaccionen amb el còrtex que envolta el nucli, en una zona que s'ha anomenat AMIZ (*astral microtubule interaction zone*) (Gachet *et al.*, 2004). Per aquest motiu, proteïnes presents a l'anell d'actomiosina s'han suggerit com a possibles candidates implicades en l'orientació del fus. D'acord amb això, el tractament de les cèl·lules amb la droga latrunculina (que impedeix la polimerització dels monòmers d'actina) impedeix que el fus pugui orientar-se, de la mateixa manera que succeeix amb mutants de la proteïna implicada en la nucleació de l'actina For3 (Gachet *et al.*, 2004) o en mutants de les miosines de tipus V Myo51 i Myo52. Aquestes evidències han portat a la idea de que els microtúbuls astrals

dirigeixen la rotació del fus a partir de la seva interacció amb components de l'anell d'actomiosina (fig. 9). Tot i així, aquesta creença ha estat recentment desafiada per Zimmerman *et al.* que en els seus estudis mostren que els microtúbuls astrals resideixen a l'interior del nucli (on no podrien interaccionar amb el còrtex) i que bàsicament existeixen a metafase (Zimmerman *et al.*, 2004).

Així, ens trobem que hi ha dos corrents que intenten explicar els mecanismes que posicionen el fus. En el model de Zimmerman *et al.*, els microtúbuls intranuclears orientarien el fus exercint força contra una membrana nuclear rígida o, alternativament, contra el còrtex mateix (fet que requeriria una gran flexibilitat de la membrana nuclear). En el model de Gachet *et al.*, en canvi, malgrat també s'accepta l'existència de microtúbuls astrals intranuclears, es considera que el paper principal el juguen els microtúbuls astrals citoplasmàtics. Aquests intervindrien en el posicionament inicial del fus així com en el manteniment de l'orientació.

En l'apartat anterior es mostrava que el tractament amb agents que

afecten els microtúbuls activaven el *checkpoint* d'acoblament del fus mitòtic. De forma similar, el tractament amb drogues que afecten la polimerització de l'actina també provoca un bloqueig en la separació de les cromàtides. Moltes de les proteïnes implicades en el *checkpoint* d'acoblament del fus s'han suggerit com a components del *checkpoint* d'orientació del fus. Aquest seria el cas de les proteïnes Bub1, Mad3 o Bub3 (Tournier *et al.*, 2004). És interessant, però, buscar components específics d'aquest *checkpoint* i no de l'altre. En aquest respecte, s'ha vist que la MAPK Sty1 i el seu substrat Atf1 són necessàries per tal de prevenir la separació de les cromàtides germanes en resposta a perturbacions del citoesquelet d'actina (Gachet *et al.*, 2001). La conclusió que es pot extreure d'aquests treballs és que els *checkpoints* d'acoblament del fus i el d'orientació poden tots dos inhibir l'APC a través de mecanismes que se solapen tot i no ser idèntics. És encara un tema pendent els aspectes diferencials de cadascun d'aquests dos *checkpoints*.

3. RESPOSTA A ESTRÈS

Les cèl·lules eucariotes s'han d'enfrontar sovint a insults ambientals que poden provocar danys a molts nivells, essent fins i tot letals. Per aquest motiu els organismes eucariotes han desenvolupat mecanismes que els protegeixen contra aquests canvis en l'ambient i que permeten que s'adaptin a les noves condicions. Es tracta de sistemes altament conservats evolutivament i que es caracteritzen per tenir com a nucli central de la via una cascada de quinases que conformen el programa de resposta a estrès. En conjunt, aquestes quinases pertanyen a la família de les MAP quinases activades per estrès. En mamífer són membres d'aquesta família les SAPKs (*stress activated protein kinases*) p38 i JNK (*c-Jun N-terminal kinase*). En llevat també s'han descrit vies homòlogues a aquestes de mamífer i, així, es va aïllar a *S.cerevisiae* la quinasa Hog1 (Brewster *et al.*, 1993) i a *S. pombe* la quinasa Spc1/Sty1/Phh1 (Shiozaki and Russell, 1995; Millar *et al.*, 1995; Kato T. *et al.*, 1996).

Bàsicament, la resposta a estrès consisteix en mecanismes que detecten els canvis desfavorables

per la cèl·lula, mecanismes que transmeten aquests senyals i els mecanismes compensatoris que finalment condueixen a canvis en l'expressió gènica i en el metabolisme per tal de sobreviure a condicions no òptimes pel creixement.

En mamífer l'activació de les SAPKs pot ser efectuada per diferents tipus de senyals, com ara estrès osmòtic, calor, radiació UV, citoquines inflamatòries, etc. A *S.cerevisiae*, en canvi, la quinasa Hog1 s'ha implicat bàsicament en la resposta a estrès osmòtic (Brewster *et al.*, 1993; Schuller *et al.*, 1994). A *S. pombe* la quinasa Sty1 recorda més en el seu funcionament a les quinases de mamífer perquè és necessària per a la resposta a una gran varietat de senyals (Millar *et al.*, 1995; Shiozaki *et al.*, 1995; Shiozaki and Russell, 1996; Degols *et al.*, 1996; Degols and Russell, 1997; Shieh *et al.*, 1997; Shiozaki *et al.*, 1997). Entre d'altres, la Sty1 s'activa en resposta a augment de l'osmolaritat, estrès oxidatiu, calor, radiació UV i deprivació nutricional. Donada la semblança amb les vies de mamífer, els mecanismes de resposta a estrès de *S. pombe* han servit en els darrers anys per entendre de quina forma

les cèl·lules eucariotes s'adapten a les condicions desfavorables.

És un fet interessant que, malgrat una cèl·lula pot estar exposada a un ampli espectre d'estressos i d'extensió variable, la resposta serà d'acord amb la severitat i el tipus d'insult i estarà governada per una mateixa via de resposta a estrès. És a dir, que la cascada de SAPKs és capaç de rebre diferents estímuls i decidir quina ha de ser la resposta adequada en cada cas.

D'altra banda, la resposta a estrès està íntimament lligada a la progressió del cicle cel·lular. Una mostra d'això és el fet que molts dels reguladors d'aquesta via es van aïllar en *screenings* ideats per posar de manifest proteïnes implicades en la regulació del cicle cel·lular. A més, mutants dels components centrals de la via com ara la Sty1 o la Wis1 presenten fenotips semblants als de mutants d'activadors del cicle (fenotip *cdc*). Per contra, la hiperactivació de la Sty1 condueix al fenotip *wee* i en casos extrems a fenotip de catàstrofe mitòtica.

A continuació s'exposaran els components claus en la resposta a estrès, així com els mecanismes generals i les respostes específiques que es donen en cada cas concret.

3.1 Components centrals de la resposta a estrès:

De forma genèrica, les cascades de MAPK es componen per una MAPK central que és activada per una MAPKK que és alhora activada per una MAPKKK. En el cas de la cascada de resposta a estrès a *S. pombe*, la MAPK central és la Sty1, que és fosforilada per la MAPKK Wis1 que pot ser activada per dues MAPKKKs, la Wak1/Wik1/Wis4 o la Win1. A continuació s'analitzarà el paper de cadascun d'aquests components en la resposta a estrès (fig. 10).

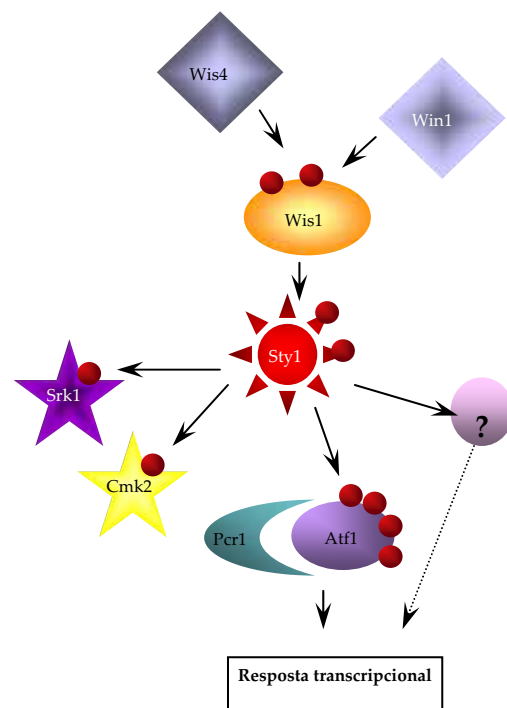


Fig. 10. Cascada de senyalització d'estrès a *S. pombe*.

3.1.1 *Sty1*

La quinasa principal en la resposta a estrès a *S. pombe* és la *Sty1*, també coneguda com a *Spc1* i *Phh1*. El 1995, dos grups van aïllar el gen que codifica per aquesta proteïna mitjançant dues aproximacions experimentals similars. En el cas de Millar *et al.*, es va concloure que mutacions en el gen de *sty1* rescataven el fenotip letal provocat per la inactivació de dues fosfatases, la *Pyp1* i la *Pyp2* (Millar *et al.*, 1995). Aquestes havien estat prèviament descrites com a reguladors negatius de l'entrada en mitosi (Millar *et al.*, 1992b). En aquest mateix *screening* es va aïllar també el gen de *sty2*, que posteriorment va ser identificat com a *wis1* i que codifica per la MAPKK encarregada d'activar la *Sty1*. En paral·lel, el grup de Russell va descriure el gen de *spc1* en un estudi semblant al de Millar *et al.*, buscant mutacions que suprimissin el fenotip letal de mutants dels gens *ptc1* i *ptc3* (Shiozaki *et al.*, 1995). *Ptc1* i *ptc3* codifiquen per la fosfatasa PP2C que també s'ha implicat en la resposta a estrès. Curiosament, en aquest mateix estudi també es va aïllar el gen *spc2* que codificava novament per la MAPKK activadora de *Spc1*, *Wis1*. Finalment, el 1996 el

mateix gen va ser aïllat de nou mitjançant el clonatge per PCR d'homòlegs de les MAPKs (Kato, Jr. *et al.*, 1996).

Com ja s'havia comentat al principi d'aquest capítol, estudis posteriors han posat de manifest que la *Sty1* és necessària per a la resposta a un ample espectre d'estressos, incloent elevada osmolaritat, estrès oxidatiu, temperatura, radiació UV, depleció de fonts de N i de C, augment del pH extracel·lular, etc (Millar *et al.*, 1995; Shiozaki *et al.*, 1995; Shiozaki *et al.*, 1996; Degols *et al.*, 1996; Degols *et al.*, 1997; Shieh *et al.*, 1997; Shiozaki *et al.*, 1997; Madrid *et al.*, 2004; Soto *et al.*, 2002). Aquest fet queda reflectit per la incapacitat de mutants de *sty1* de créixer en aquestes condicions. No menys important és la observació que aquests mutants exhibeixen un fenotip elongat que indica un alentiment en l'entrada en mitosi d'aquestes cèl·lules. Aquest fenotip també apareix en mutants de la MAPKK *Wis1*, i es veu exacerbat quan es tracta les cèl·lules amb estrès (Millar *et al.*, 1995; Shiozaki *et al.*, 1995; Warbrick and Fantes, 1991). La sospita que hi hagués una connexió entre la resposta a estrès i la progressió del cicle cel·lular es va

confirmar en veure la interacció letal entre mutacions de *sty1* i *cdc25* a la temperatura permissiva (Millar *et al.*, 1995; Shiozaki *et al.*, 1995). A més, les cèl·lules *sty1*⁻ són defectives en el bloqueig per depleció de N necessari per a dur a terme la meiosi i tampoc poden reiniciar el cicle cel·lular normal després d'haver patit estrès. Tot i aquestes evidències, moltes de les dianes a través de les quals la Sty1 efectua les seves funcions són encara desconegudes.

De la mateixa manera que la resta de components de la família de les MAPKs, la Sty1 s'activa per la fosforilació en dos residus altament conservats del seu domini catalític, la Thr171 i la Tyr173. Aquests residus compleixen el consensus de la MAPKK Wis1, és a dir, la seqüència TGY (Warbrick *et al.*, 1991; Shiozaki *et al.*, 1995). La fosforilació d'aquests no només és necessària per a l'activitat de la Sty1, sinó que també s'ha vist que mutacions en aquests residus abroguen la correcta localització de Sty1 en resposta a estrès. En el cas de *S. pombe*, la Sty1 és una proteïna citoplasmàtica en condicions normals i, quan les cèl·lules se sotmeten a estrès, la Sty1

ràpidament transloca al nucli. En un principi es va creure que la Sty1 es comportaria de la mateixa manera que ho fa la MAPK de mamífer ERK1 en quant a la seva localització. L'ERK1 és també una proteïna citoplasmàtica que entra al nucli després d'haver estat fosforilada per la MAPKK MEK1. La MEK1 conté en la seva seqüència un senyal d'exportació nuclear que impedeix que es localitzi al nucli. Semblaria que en condicions normals la unió de l'ERK1 a la MEK1 actua com una mena d'ancoratge citoplasmàtic de la primera. Després de l'activació de la via, la fosforilació de l'ERK1 trencaria la interacció entre ambdues proteïnes i permetria que l'ERK1 entrés al nucli (Fukuda *et al.*, 1997). Tot i així, l'ERK1 està mancada d'una seqüència de localització nuclear i no s'ha pogut establir fins el moment quin és el mecanisme que afavoreix aquest desplaçament de citoplasma a nucli. En el cas de la Sty1, malgrat la Wis1 també conté una seqüència d'exportació nuclear, aquesta no condiciona la localització citoplasmàtica de la Sty1 en condicions normals, donat que en cèl·lules $\Delta wis1$ la Sty1 continua essent citoplasmàtica. No obstant, la

fosforilació de la Sty1 és encara un pas imprescindible per tal que pugui translocar-se al nucli. És important notar que part de la resposta a l'estrès té lloc a través de canvis en l'expressió gènica i això implica la interacció (bé sigui directa o indirecta) de la Sty1 amb factors de transcripció. D'acord amb aquest fet, el factor de transcripció Atf1 va ser durant molt de temps l'únic substrat conegut de la Sty1 (Takeda *et al.*, 1995; Kanoh *et al.*, 1996; Shiozaki *et al.*, 1996; Wilkinson *et al.*, 1996). Estudis duts a terme per Gaits *et al.*, van demostrar que la delecció d'*atf1* evitava la localització nuclear de la Sty1, i que la unió d'ambdues proteïnes era afavorida per la fosforilació de la Sty1. És a dir, a diferència del que succeeix a mamífer, en *S. pombe*, la Wis1 no actua com a un ancoratge citoplasmàtic de la Sty1 en condicions normals, sinó que és l'Atf1 qui actua com a ancoratge nuclear de la Sty1 en condicions d'estrès (Gaits *et al.*, 1998). D'altra banda, mutants dels llocs de fosforilació de la Sty1 poden encara unir-se *in vivo* a l'Atf1. Així doncs, tot i que sembla clar que la fosforilació de la Sty1 és necessària per a la seva localització nuclear, el

paper exacte que juga no ha estat clarificat fins el moment. S'ha suggerit que bé podria estar afavorint la interacció amb algun sistema de importació nuclear o, per contra, que la fosforilació podria bloquejar la unió amb sistemes d'exportació nuclear. Cap de les dues hipòtesis, però, s'ha validat encara. El que sí sembla clar és que l'entrada de la Sty1 al nucli és un procés dependent d'un mecanisme de transport actiu, perquè la mutació del factor intercanviador de nucleòtids Pim1 afecta negativament la localització de la Sty1 al nucli (Gaits and Russell, 1999). La Sty1 no conté en la seva seqüència cap senyal de localització nuclear evident, de manera que probablement el transport tingui lloc a través de la interacció amb una proteïna que formi un complex amb la Sty1 i el transportador. D'altra banda, la Sty1 roman al nucli durant un període molt curt (aproximadament 20 min) i la seva sortida de nou al citoplasma és duta a terme a través del transportador Crm1. Aquesta sortida és necessària per tal que la Sty1 pugui ser inactivada per les fosfatases Pyp1 i Pyp2, que són essencialment citoplasmàtiques (Gaits *et al.*, 1999).

Per últim, en el que a localització de Sty1 pertoca, també s'ha descrit que la localització citoplasmàtica de la Wis1 és necessària per tal que la Sty1 es transloqui al nucli en resposta a estrès. Prova d'això és el fet que l'addició d'un senyal de localització nuclear que fa que la Wis1 es localitzi constitutivament al nucli evita l'acumulació nuclear de la Sty1 posterior a l'exposició a estrès (Nguyen *et al.*, 2002).

3.1.2 Wis1

Com ja s'ha dit, altres components de la via de les MAPKs d'estrès a *S. pombe* també es van aïllar en *screenings* que buscaven reguladors del cicle cel·lular. De fet, un dels primers membres identificat va ser el gen *win1*, la mutació del qual (*win1-1*) revertia el rescat de la letalitat del mutant *cdc25-22* per part de la mutació *wee1-50* (Ogden and Fantes, 1986). Tot i que aquest mutant va ser descrit molt aviat en el rastreig de reguladors del cicle, el producte gènic no va ser identificat fins el 1998 (Samejima *et al.*, 1998), quan es va veure que es tractava d'una de les MAPKKKs encarregada d'activar la via.

Seguidament a la troballa del gen de *win1*, es van dissenyar *screenings*

que permetessin, ara, rescatar el fenotip del triple mutant *win1-1 wee1-50 cdc25-22*. Fruit d'aquests estudis van sorgir 5 gens que funcionaven com a supressors del fenotip anterior quan s'expressaven des de plàsmids multicòpia (Warbrick and Fantes, 1992). Dels 5 gens, dos d'ells, *wis1* i *wis4*, codifiquen per una MAPKK i una MAPKKK, respectivament (Warbrick *et al.*, 1991; Samejima *et al.*, 1997).

La Wis1 és l'única MAPKK capaç d'activar la Sty1 sota condicions d'estrès (Degols *et al.*, 1996). Per aquest motiu, la seva delecció presenta la mateixa sensibilitat a elevada osmolaritat o temperatura, agents oxidants o deprivació nutricional que mutacions en el gen de *sty1*. A més, en cèl·lules $\Delta wis1$ no és possible detectar fosforilació de la Sty1 en resposta a cap mena d'estrès (Millar *et al.*, 1995; Shiozaki *et al.*, 1995; Degols *et al.*, 1996; Degols *et al.*, 1997) i, per contra, la sobreexpressió de *wis1* condueix a una hiperactivació de la via que resulta tòxica per a la cèl·lula (Millar *et al.*, 1992b; Otilie *et al.*, 1992; Shiozaki *et al.*, 1995).

La Wis1 té una estructura similar a les MAPKKs de mamífer, amb un

domini catalític C-terminal (Warbrick *et al.*, 1991) i un domini N-terminal que conté una regió de unió a la Sty1 i un senyal d'exportació nuclear (Nguyen *et al.*, 2002). Tot i que sempre s'havia considerat que la Wis1 era una proteïna eminentment citoplasmàtica, estudis de Nguyen *et al.*, van demostrar que la Wis1 era també capaç de translocar al nucli en resposta a estrès, alhora que la Sty1. La Wis1 és una proteïna de mida considerable (aproximadament 70KDa) i és poc probable que la seva entrada al nucli tingui lloc per difusió passiva. És més plausible, doncs, que estigui mitjançada per algun mecanisme de transport actiu. Quant a la relocalització al citoplasma de la Wis1, aquesta té lloc als pocs minuts de l'entrada i sembla ser dependent de l'exportina Crm1 (Nguyen *et al.*, 2002). El moviment de la Wis1 sembla ser important per tal que la Sty1 pugui localitzar-se al nucli i, de fet, en el treball de Nguyen *et al.* se suggereix que la Wis1 podria estar jugant un paper clau en el transport de la Sty1 de citoplasma a nucli.

3.1.3 Wis4 i Win1

El gen de *wis4* (aïllat en el mateix *screening*) codifica per la MAPKKK que activa la Wis1 mitjançant la fosforilació de dos residus del domini catalític, Ser469 i Thr473. El fet que la delecció de *wis4* no presentés un fenotip tan sever en resposta a estrès com la delecció de components situats més avall en la via (*wis1⁻* o *sty1⁻*) va fer pensar de bon principi que tingués un paper redundant en l'activació de la Wis1 (Samejima *et al.*, 1997; Shieh *et al.*, 1997; Shiozaki *et al.*, 1997). D'altra banda, estudis genètics inicials suggerien que la proteïna codificada pel gen *win1* podia funcionar també com una MAPKKK, però problemes en el seu clonatge no van permetre que es pogués identificar el producte genètic fins el 1998 (Samejima *et al.*, 1998). En aquest mateix estudi es mostrava que la Win1 i la Wis4 (també anomenada Wik1 i Wak1) actuaven de forma redundant en l'activació de la Wis1, podent-la fosforilar en els mateixos residus. El paper específic de cadascuna d'aquestes MAPKKKs ha estat força controvertit perquè en el treball de Samejima *et al.*, se li restava importància a la Wis4 en la senyalització d'estrès osmòtic,

atorgant-li un paper principal a la Win1. En canvi, treballs de Shiozaki *et al.* demostraven que la delecció de la Wis4 disminuïa la fosforilació de la Wis1 en aquest tipus d'estrès (Shiozaki *et al.*, 1997), tot i que no l'eliminava completament. Avui en dia, no hi ha separació entre els papers d'ambdues quinases, assumint que totes dues poden activar la via en resposta a diversos tipus d'estrès.

3.2 Activació del mòdul Wis4/Win1-Wis1-Sty1:

Un dels aspectes encara fosc en la resposta a estrès és la manera com es transmet el senyal fins el mòdul central exposat en apartats anteriors. En el cas de *S. cerevisiae* ha estat ben establert que la MAPK Hog1 és regulada en resposta a estrès osmòtic per el sistema de dos components conformat per la histidina-quinasa Sln1, la fosfotransferasa Ypd1 i la quinasa Ssk1 (l'anomenat *two component phosphorelay system*) (Posas and Saito, 1998). En condicions de baixa osmolaritat, la Sln1 s'autofosforila en una histidina del seu domini catalític. Aquest grup fosforil és seguidament transferit a un residu Asp del seu domini receptor. En

aquest estat, la fosfotransferasa Ypd1, mitjançant un intermediari fosforilat a la His64 d'elevada energia, pot transferir el grup fosforil al domini receptor de la quinasa Ssk1. La Ssk1 fosforilada és inactiva i no pot activar la MAPKKK Ssk2 (homòloga a la Wis4 i a la Win1) ni, en conseqüència, la MAPK Hog1. Per contra, quan en el medi extern es dóna un augment de l'osmolaritat, la Sln1 és inhibida, permetent que s'activi la via (Posas *et al.*, 1998).

Intents per trobar un sistema que funcionés de forma similar a *S. pombe* van donar lloc finalment a la identificació de les proteïnes Mcs4 (semblant a Ssk1), Mpr1 (homòloga a Ypd1) i Mak1, Mak2 i Mak3 (amb activitat histidina quinasa). De fet, la Mcs4 ja havia estat prèviament descrit com un regulador potencial de la mitosi, donat que la seva pèrdua rescatava el fenotip de catàstrofe mitòtica del doble mutant *cdc2-3w wee1-50* (Booher and Beach, 1987; Molz *et al.*, 1989). Estudis posteriors van revelar que la Mcs4 era important per a la senyalització d'estrès perquè en mutants d'aquest gen l'activació de la Sty1 es veia minvada en resposta a estrès. A més, aquestes cèl·lules mostraven

un defecte en el creixement que es veia accentuat en condicions d'alta osmolaritat o de privació nutricional. Per últim, la sensibilitat dels mutants de *mcs4* no es veia afectada per la delecció de *wis4*, indicant que ambdues proteïnes funcionaven en una via lineal (Shiozaki *et al.*, 1997; Cottarel, 1997; Shieh *et al.*, 1997). Per homologia de seqüències es va veure que la Mcs4 era similar a la quinasa reguladora de la resposta Ssk1 de *S. cerevisiae*, suggerint que també pogués existir un sistema de dos components a *S. pombe*. Com en el cas de la Ssk1, la Mcs4 també conté un residu Asp al domini receptor (D412) que és necessari per a la seva funció (fig. 11). En un principi, l'anàlisi del mutant $\Delta mcs4$ va fer pensar que la Mcs4 estigués implicada en la senyalització de diferents tipus d'estrès. La identificació del residu D412 i la seva mutació, però, va desvelar que la Mcs4 és únicament necessària per a l'activació de la Sty1 en resposta a H₂O₂. (Buck *et al.*, 2001). La discrepància entre els fenotips del mutant puntual i la delecció s'interpreten com el resultat de pertorbar la integritat d'un complex SAPK multi-proteic en absència de Mcs4, de manera que la

delecció de *mcs4* afectaria més d'un sistema de forma indirecta.

La Mpr1 (també conegut com Spy1) és estructuralment i funcional semblant a la proteïna Ypd1 de *S. cerevisiae* que se situa per sobre de la Ssk1 en la transmissió del senyal. La Mpr1 conté un residu His conservat (H221) que funciona com a intermediari en la transmissió del grup fosforil a la Mcs4. Malgrat aquestes semblances inicials, la proteïna de *S. pombe* i la de *S. cerevisiae* presenten diferències notables. En primer lloc, la delecció de *YPD1* és letal perquè condueix a una hiperactivació de la Hog1 que resulta tòxica per a la cèl·lula. En canvi, la Mpr1 és un regulador positiu de la Mcs4 i, per tant, la seva delecció no té grans conseqüències per a la cèl·lula en condicions normals (Nguyen *et al.*, 2000). La funció de la Mpr1 queda restringida a la resposta a estrès oxidatiu (Buck *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2000), mentre que la Ypd1 funciona en resposta a estrès osmòtic. Curiosament, tot i que la fosforilació de la Sty1 es veu afectada per la delecció de *mpr1* en resposta a estrès oxidatiu, els mutants de *mpr1* no són més sensibles en comparació a la soca salvatge a aquest tipus d'estrès.

Més interessant encara, l'expressió de gens necessaris per a l'adaptació en aquestes condicions (v.g. *ctt1*) no es troba disminuïda en el mutant (Nguyen *et al.*, 2000). Aquest comportament s'interpreta com un efecte compensatori exercit per la Pap1, independent de la Sty1. En un apartat posterior referit a la resposta a estrès oxidatiu, s'explorarà més profundament el funcionament d'aquesta via paral·lela. Finalment, dir que el paper de la fosforilació presenta encara algunes incògnites: la fosforilació de la Mcs4 és activadora, donat que la interacció entre ambdues proteïnes és dependent de la presència de la His221 de la Mpr1 i es veu augmentada en tractar les cèl·lules amb H₂O₂. Sorprenentment, la mutació de la His221 de la Mpr1 (Nguyen *et al.*, 2000) o del Asp412 de la Mcs4 (Buck *et al.*, 2001) augmenten la fosforilació basal de la Sty1. La conclusió que se'n extreu és que la Mcs4 deu regular negativament el mòdul Wis4/Win1-Wis1-Sty1 en condicions normals i de forma positiva en resposta a estrès oxidatiu.

Arribat aquest punt en que ja s'havien trobat homòlegs per dos dels components del sistema de *S.*

cerevisiae, es va analitzar el genoma de *S. pombe* amb la fi de trobar una histidina quinasa amb funció similar a la de Sln1. Així, es van identificar les proteïnes Mak1, Mak2 i Mak3 com a candidates potencials (Buck *et al.*, 2001). Totes tres proteïnes comparteixen una estructura similar que consisteix en un domini histidina quinasa seguit d'un domini PAS/PAC. Aquest domini és també comú a proteïnes procariotes sensors de l'estat redox, com ara Aer i ArcB d' *E. coli*, fet que

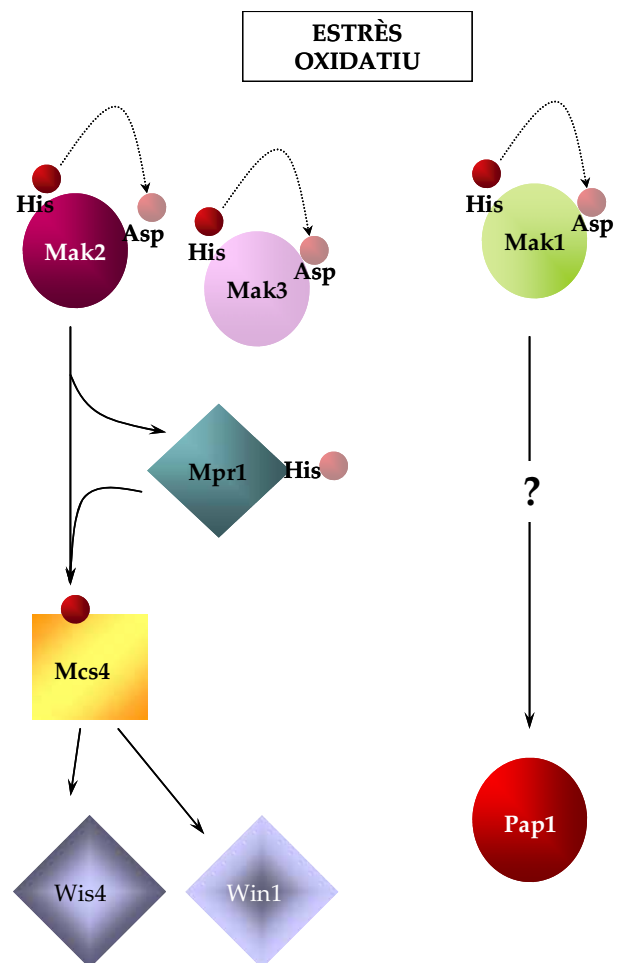


Fig. 11. Activació del mòdul Wis4/Win1-Wis1-Sty1.

explicaria que a *S. pombe* aquest mòdul s'encarregui de senyalitzar l'estrès oxidatiu i no l'osmòtic.

Les histidines quinases de *S. pombe* conformen no un, sinó dos sistemes de transmissió de grups fosforil. La Mak2 i la Mak3 s'encarregarien de transmetre el senyal d'estrès oxidatiu a través de la Mpr1 i la Mcs4 fins al mòdul Wis4/Win1-Wis1-Sty1-Atf1. En canvi, la Mak1 també estaria implicada en la resposta a estrès oxidatiu, però aquest cop a través de la Pap1 (fig. 11). Com passava amb la delecció de *mpr1*, la delecció de *mak2* i *mak3* tampoc es tradueix en hipersensibilitat al tractament amb H₂O₂, probablement degut a un efecte compensatori de la via constituïda per la Mak1 i la Pap1.

Així, tot i que estructuralment la via de *S. cerevisiae* i la de *S. pombe* comparteixen una arquitectura similar, hi ha trets distintius que les diferencien, com ara el tipus d'estrès que les activen. En aquest aspecte, els mecanismes a través dels quals les cèl·lules de *S. pombe* detecten estressos diferents a l'oxidatiu són fins el moment elusius.

3.3 Adaptació a l'estrès: canvis en l'expressió gènica:

L'estudi de la resposta a estrès en diferents organismes ha revelat l'existència de dos paradigmes: en primer lloc, l'exposició a dosis baixes d'un estrès condueix a una resposta adaptativa que confereix resistència transitòria a dosis més elevades del mateix tipus d'estrès. En segon lloc, l'adaptació a un tipus d'estrès dóna lloc a una major resistència a altres estressos, aparentment no relacionats, és a dir, a una protecció creuada (Jamieson, 1992; Lee *et al.*, 1995; Moradas-Ferreira and Costa, 2000). Aquests fenòmens suggerien que diferents estímuls podien activar mecanismes de defensa semblants, o que existia un mecanisme de defensa general que conferia un nivell bàsic de protecció. El 2003, la publicació de les dades obtingudes a partir de *microarrays* de DNA en resposta a diferents estressos ambientals va ajudar a entendre aquests fenòmens (Chen *et al.*, 2003). Així, es va veure que la expressió d'un subgrup de gens pateix canvis en quatre de les cinc condicions assajades, mentre que la expressió d'un altre subgrup de gens és específica de només un o dos tipus d'estrès. Els gens del

primer grup són els anomenats CESR (*core environmental stress response*) i corresponen a gens que codifiquen per proteïnes implicades en el metabolisme, antioxidants com ara la catalasa, la glutatió peroxidasa, la tioredoxina o la glutaredoxina, enzims implicats en processos d'ubiquitinització, l'enzim glicerol-3-fosfat deshidrogenasa, factors de transcripció com l'Atf1 i la Pcr1 i proteïnes implicades en senyalització com la Mpr1 i la Srk1, entre d'altres. En tots aquests casos, l'expressió d'aquests gens es veu augmentada en resposta a estrès, però en aquest grup també s'inclouen gens la expressió dels quals es veu reprimida sota aquestes condicions. És el cas, per exemple, d'enzims implicats en la síntesi de proteïnes, el transport, la transcripció, l'organització del citosquelet, etc. La regulació d'aquests gens depèn bàsicament de la Sty1 i en menor grau del factor de transcripció Atf1. En el següent apartat es parlarà més extensament d'aquest factor de transcripció, però de moment dir que durant molt de temps va ser l'únic substrat conegut de la Sty1. Atenent als patrons d'expressió en cèl·lules *wt*, $\Delta sty1$ o $\Delta atf1$, els gens que pertanyen al

CESR es poden subdividir segons la seva dependència de la Sty1, l'Atf1, de tots dos o de cap d'ells. Així, els gens de la classe 1 contenen aquells gens la expressió basal dels quals i la seva inducció en resposta a estrès és dependent de la Sty1 i de l'Atf1 (v.g. *ctt1*, *grx1* i *gpx1*). La classe 2 la conformen gens que requereixen la Sty1 i l'Atf1 per a la seva inducció però no per a l'expressió basal. Els gens de la classe 3 necessiten la Sty1 per a la inducció, però són independents de l'Atf1 (v.g. *srk1*, *mpr1* i *ptc1*). Finalment, la classe 4 conté gens independents tant de la Sty1 com de l'Atf1.

La Sty1 pot jugar també un paper en la repressió de gens del CESR, donat que l'expressió d'alguns d'ells augmenta en cèl·lules $\Delta sty1$. Ja s'havia parlat de que l'Atf1 podia tenir un paper repressor en l'expressió de gens dependent de l'estat de fosforilació de la Sty1 (Degols *et al.*, 1997), però aquest no es pot considerar un mecanisme general, perquè bé podria ser que la inducció d'aquests gens constituís un mecanisme compensatori de l'absència de la Sty1. En conclusió, la Sty1 juga un paper crític en la regulació de gens del CESR i, donat que no totes les dianes de la Sty1 ho

són també de l'Atf1, no es pot excloure l'existència d'altres factors de transcripció regulats per la Sty1. Com ja s'havia comentat, els microarrays van desvelar també l'existència d'un subgrup de gens que eren específicament induïts en un o dos tipus d'estrès. Aquests han estat classificats com *SESR* (*specific environmental stress response*). La implicació de la Sty1 i l'Atf1 en l'expressió d'aquests gens és menys crítica que en els gens de *CESR*, i únicament se li ha atorgat un paper més important en el cas d'estrès induït per H₂O₂ o per calor. L'estudi de les seqüències de DNA en la regió promotora d'aquests gens, així com el paper d'altres factors de transcripció o reguladors permetrà entendre millor el funcionament de la resposta transcripcional global en resposta a estrès.

D'altra banda, també s'ha mostrat que les proteïnes Tup11 i Tup12 regulen la conformació local de la cromatina per tal que la inducció d'alguns gens en resposta a estrès sigui específica (v.g. *cta3* o *fbp1*). En la seva absència, l'expressió d'aquests gens es troba desregulada, podent-se donar en condicions normals (Hirota *et al.*, 2003). Tot plegat suggereix que la via de les

SAPKs estaria regulant factors que intervenen en la topologia de la cromatina per tal que l'expressió de certs gens tingui lloc de forma específica en resposta a estrès.

En conjunt, aquests experiments ens demostren que la regulació dels gens de resposta a estrès està sotmesa a un control molt fi que assegura que la resposta en cada cas sigui adequada a la severitat de l'insult.

Per últim i no menys important també s'ha suggerit una implicació de la Sty1 en el manteniment de la traducció de proteïnes en resposta a estrès per tal de facilitar l'adaptació. Aquest fenomen és dependent de l'estat de fosforilació de l'eIF2, que s'ha de mantenir defosforilat per ser actiu. En absència de la Sty1 (i també d'Atf1 o Pcr1), l'eIF2 s'hiperfosforila, esdevenint inactiu (Dunand-Sauthier *et al.*, 2005).

Així, s'afegeix un nou nivell de control per part de la Sty1 en la producció de proteïnes en resposta a estrès.

3.4 Diances de Sty1:

La Sty1 és essencial perquè les cèl·lules puguin adaptar-se als estressos imposats. Les dades dels *microarrays* resumides en l'apartat

anterior mostren que la Sty1 és imprescindible per tal que es pugui donar l'expressió de gens necessaris per a l'adaptació. Aquest és un procés en gran part dependent del factor de transcripció Atf1. Per altra banda, part important de la resposta a estrès i tema central d'aquesta tesi és el paper de la Sty1 en la regulació d'altres quinases. En cèl·lules de mamífer, aquestes quinases reben el nom genèric de MAPKAP quinases, i a *S. pombe* s'han descrit fins el moment dues proteïnes d'aquest tipus, la Cmk2 i la Srk1. Per aquest motiu, en aquest apartat s'exposaran, per una banda, la regulació de l'Atf1 per part de la Sty1 i, per l'altra, la de les quinases Cmk2 i Srk1.

3.4.1 *Atf1*

D'acord amb el paper de la Sty1 en la regulació de l'expressió gènica en resposta a estrès, durant molt de temps el factor de transcripció Atf1 va ser el seu únic substrat conegut (Takeda *et al.*, 1995; Kano *et al.*, 1996; Shiozaki *et al.*, 1996; Wilkinson *et al.*, 1996). Com a tal, l'Atf1 comparteix funcions amb la Sty1, malgrat que no totes. Així, les cèl·lules $\Delta atf1$ són estèrils donada la seva incapacitat d'induir l'expressió

de *ste11* en condicions de deprivació de N i tampoc poden sobreviure en fase estacionària (Takeda *et al.*, 1995; Shiozaki *et al.*, 1996; Wilkinson *et al.*, 1996). Com els mutants de *sty1*, els mutants d'*atf1* són sensibles a estrès osmòtic i no s'observa una inducció dels gens *gpd1* (gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa), *ctt1* (catalasa) o *pyp2* (fosfatasa encarregada de defosforilar Sty1) en resposta a estrès osmòtic. Per contra, el mutant $\Delta atf1$ no presenta cap defecte en la progressió del cicle cel·lular i no és sensible a calor (Takeda *et al.*, 1995), ni a cadmi o arsenit, ni tampoc a drogues com ara cicloheximida, staurosporina o anisomicina (Toone *et al.*, 1998). Curiosament, tot i que aquest mutant tampoc és sensible a radiació UV o a MMS, l'Atf1 pot ser activat per aquests agents i induir l'expressió de *ctt1* en resposta a ells (Degols *et al.*, 1997).

L'Atf1 presenta homologia amb el factor de transcripció de mamífer ATF2, substrat conegut de les SAPKs p38 i JNK (revisat a Tibbles and Woodgett, 1999). Estructuralment, l'Atf1 presenta un domini de tipus b-ZIP que permet la seva interacció amb el DNA a través de les seqüències CRE. L'Atf1

funciona com un heterodímer amb un altre factor de transcripció, Pcr1, que també conté un domini del mateix tipus (Watanabe and Yamamoto, 1996; Wahls and Smith, 1994; Kanoh *et al.*, 1996). Tot i que l'heterodímer presenta una major afinitat d'unió (Kon *et al.*, 1997), el fet que Pcr1 sigui dispensable per la resposta a estrès osmòtic (Kon *et al.*, 1998) indica que l'Atf1 pot activar la transcripció de gens per si mateix, formant homodímers. D'altra banda, malgrat s'havia demostrat que la Sty1 fosforilava l'Atf1 tant *in vitro* (Wilkinson *et al.*, 1996) com *in vivo* (Shiozaki *et al.*, 1996) el paper d'aquesta fosforilació presentava fins fa poc algunes incògnites. Si bé se sabia que l'expressió de gens diana de l'Atf1 requeria que la Sty1 fos activa, el mecanisme a través del qual tenia lloc aquesta regulació era desconegut. En el cas de les cèl·lules de mamífer, se sap que en condicions normals l'ATF2 es troba en una conformació inactiva degut a la interacció intramolecular entre el seu domini d'unió al DNA i l'extrem N-terminal. Per tal que la proteïna sigui transcripcionalment activa, cal que aquesta interacció es trenqui mitjançant la unió d'ATF2 amb altres proteïnes com ara l'E1A o la c-

Jun o mitjançant la fosforilació per les SAPKs (Li and Green, 1996). També s'ha suggerit que la fosforilació podria tenir un efecte directe sobre el domini transactivador de la proteïna (Livingstone *et al.*, 1995; van Dam *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 1995), però, de nou, el mecanisme implicat és fosc. Per últim, també s'ha parlat d'un paper protector de la fosforilació en l'estabilitat d'ATF2, impeding la seva ubiquitinització i posterior degradació per part del proteasoma (Firestein and Feuerstein, 1998; Fuchs and Ronai, 1999; Fuchs *et al.*, 2000).

Recentment, en un treball de Lawrence *et al.* es presenten evidències que recolzarien més una implicació de la fosforilació en l'estabilitat de la proteïna que en una estimulació de l'activitat transcripcional de l'Atf1 (Lawrence *et al.*, 2007). Breument, en aquest estudi es muten tots els llocs putatius de fosforilació per la MAPK continguts en l'Atf1, i se n'observa l'efecte. Contra tota predicció, aquest mutant no presenta una pèrdua de funcionalitat evident ni tampoc exhibeix la mateixa sensibilitat que el mutant $\Delta atf1$ a diferents estressos.

Més sorprenent encara, el mutant dels llocs de fosforilació pot encara activar la transcripció de moltes de les seves dianes en resposta a estrès. Els autors presenten evidències experimentals que demostren que, més que activar la proteïna *per se*, la fosforilació de l'Atf1 condueix a una major estabilitat de la proteïna. De fet, l'Atf1 presenta un nivell de fosforilació basal que estaria afavorint la seva estabilitat en condicions normals. En resposta a estrès la seva hiperfosforilació contribuiria a l'acumulació de l'Atf1 per tal d'afavorir la seva activitat. En el mateix treball també es mostra que un altre factor que regula l'estabilitat de l'Atf1 és la seva interacció amb Pcr1. Curiosament, *pcr1* és un dels gens diana de l'Atf1, de manera que, de forma indirecta, l'Atf1 estaria regulant la seva pròpia estabilitat. Afegint complexitat al tema, la transcripció i l'estabilitat del mRNA d'*atf1* també es regulen de forma dependent de la Sty1. En resposta a estrès oxidatiu, la proteïna Csx1 s'hiperfosforila i s'uneix al mRNA d'*atf1* (que conté un element ARE), estabilitzant-lo (Rodríguez-Gabriel *et al.*, 2003).

3.4.2 Altres dianes de Sty1: Cmk2 i Srk1:

Tal com s'indicava al principi d'aquest apartat existeixen altres proteïnes que també poden ser regulades per la Sty1 i que participarien en la resposta a estrès. En el nostre grup, s'han descrit dues quinases estructuralment relacionades que són substrats *in vivo* de la Sty1. Es tracta de les quinases Cmk2 (Alemany *et al.*, 2002; Sanchez-Piris *et al.*, 2002) i Srk1/Cmk3 (Smith *et al.*, 2002; Asp and Sunnerhagen, 2003 i el treball d'aquesta tesi: Lopez-Aviles *et al.*, 2005), relacionades amb la quinasa de *S. cerevisiae* Rck2, que és també un substrat de la SAPK Hog1 (Bilsland-Marchesan *et al.*, 2000; Teige *et al.*, 2001). Ambdues proteïnes presenten també homologia amb les quinases dependents de calmodulina de mamífer, tot i que en el seu cas no s'ha descrit cap mena de regulació per Ca²⁺/CaM.

En el cas de la Cmk2, s'ha pogut establir una implicació en la resposta a estrès oxidatiu, recolzat pel fet que els mutants de *cmk2* exhibeixen sensibilitat a agents oxidants. Sabem que la Cmk2 és essencial per a la resposta a estrès

oxidatiu però, malgrat això, el mecanisme a través del qual exerceix la seva funció no s'ha pogut determinar encara (Alemany *et al.*, 2002; Sanchez-Piris *et al.*, 2002).

Quant a la *Srk1*, el gen que codifica per aquesta proteïna va ser clonat pel nostre grup en virtut de la seva homologia a les quinases dependents de calmodulina i per aquest motiu el vam anomenar *cmk3*. En el treball d'aquesta tesi es presenten les dades que es van obtenir per aquesta proteïna en la regulació del cicle cel·lular i en la implicació en la resposta a estrès. En paral·lel el grup de Quinn va aïllar aquest mateix gen en uns *arrays* de DNA com un gen fortament induït de forma depenent de la *Sty1* enfront un ampli espectre d'estressos (d'aquí el seu nom *Sty1-Regulated Kinase 1*). El fet que es tractés d'una quinasa i que presentés homologia amb un substrat conegut de la SAPK Hog1 de *S. cerevisiae* (*Rck2*) va despertar un gran interès en el seu estudi. En el treball de Smith *et al.*, mostren que, de la mateixa manera que la *Rck2*, la *Srk1* és fosforilada per la *Sty1* i pot translocar del citoplasma al nucli de forma depenent d'aquesta. En aquest mateix treball

es mostrava que la *Srk1* no era necessària per a l'activació de la *Sty1*, sinó que, per contra, la *Srk1* havia de ser responsable d'alguns dels efectes de la *Sty1*, donat que la seva delecció rescatava parcialment la toxicitat produïda per la sobreexpressió de la *Wis1*. Tot i que en aquest treball s'estudiava la localització de la *Srk1* i es proposava que els seus substrats es trobessin al nucli, cap candidat havia estat suggerit fins el present treball. En darrer lloc, també es proposava una implicació negativa de la *Srk1* en el desenvolupament sexual, donat que la sobreexpressió de la *Srk1* abolia el bloqueig en fase G1 en resposta a limitacions en la disponibilitat de N. Recolzant aquest paper negatiu en la meiosi, es mostrava que la delecció de *srk1* donava lloc a una hiperactivació del programa meiótic. Posteriorment a la publicació d'aquest article, en un treball d'Asp i Sunnerhagen es tornava a implicar la *Srk1* (anomenada *Mkp1* per aquest grup) en aquest procés. A més, en el mateix estudi es mostrava que la *Srk1* era fosforilada *in vivo* de forma depenent de la *Sty1* i que aquesta fosforilació desapareixia a mida que les cèl·lules entraven en mitosi o en

resposta a la privació de N (Asp *et al.*, 2003).

En els treballs anteriorment citats, però, no s'establia si la fosforilació de la Srk1 per part de la Sty1 tenia un efecte positiu o negatiu en l'activitat d'aquesta, ni el significat últim en la resposta a estrès. En el treball presentat en aquesta tesi es pretén presentar dades que permetin elucidar el paper de la quinasa Srk1 en la resposta a estrès, així com en la progressió del cicle cel·lular normal.

3.5 Inactivació de la Sty1: les fosfatases Pyp1, Pyp2 i PP2C:

La Sty1 i la Wis1 van ser descrites en *screenings* genètics que buscaven mutants que rescatessin el fenotip letal de la doble delecció de dues fosfatases, la Pyp1 i la Pyp2. Aquestes s'havien identificat prèviament com a reguladors negatius de la mitosi (Millar *et al.*, 1992b; Otilie *et al.*, 1992). En treballs posteriors es mostrava que la Pyp1 s'encarrega d'inactivar la Sty1. Entre d'altres, les observacions que recolzaven aquesta conclusió incloïen que les cèl·lules que sobreexpressaven *pyp1* patien un bloqueig en el cicle en resposta a elevada osmolaritat reminiscent a

l'observat en cèl·lules $\Delta sty1$, el nivell basal de fosforilació de la Sty1 era superior en mutants $\Delta pyp1$ i la Pyp1 era capaç de defosforilar específicament la Tyr173 *in vitro* (Shiozaki *et al.*, 1995; Millar *et al.*, 1995). El gen *pyp1* s'expressa de forma constitutiva a la cèl·lula i en resposta a estrès s'indueix més fortament de forma dependent de la Sty1. La Sty1 també és el substrat preferit de la fosfatasa Pyp2, però, a diferència de la Pyp1 l'expressió del gen *pyp2* únicament s'activa en resposta a estrès, esdevenint un mecanisme de retroalimentació negativa en l'activació de la Sty1 (Shiozaki *et al.*, 1995). D'aquesta manera, la Sty1 a través de l'activació de l'expressió de gens

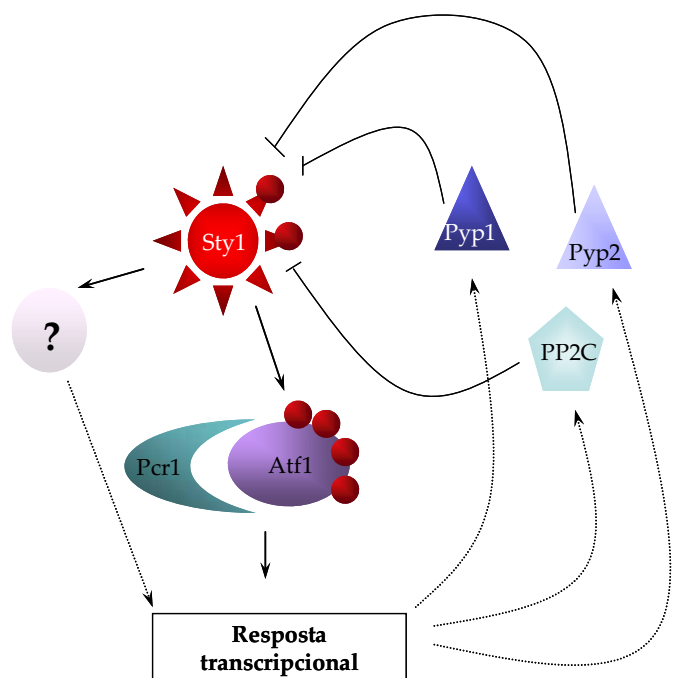


Fig. 12. Inactivació de la via d'estrès.

(CESR) regula la seva pròpia inactivació (fig. 12). Altres nivells de regulació d'aquestes dues fosfatases es desconeixen per ara, però probablement, existeixen.

Tal com es comentava al principi d'aquest capítol, la Sty1 i la Wis1 es van aïllar també en un *screening* similar a l'anterior, buscant mutacions que revertissin l'efecte letal de la inactivació dels gens *ptc1* i *ptc3* (Shiozaki *et al.*, 1995). Els gens *ptc1*, *ptc2* i *ptc3* codifiquen per fosfatases de tipus PP2C. En un principi es creia que aquestes fosfatases podien defosforilar directament la Sty1 o algun altre component de la via, per analogia amb la fosfatasa homòloga a *S. cerevisiae* (Maeda *et al.*, 1994). Per contra, a *S. pombe* només ha estat descrit que la fosfatasa PP2C pot regular la fosforilació de la Sty1 en la Thr171 després d'un xoc de calor per tal d'atenuar la resposta (Nguyen and Shiozaki, 1999). Sí que se sap, però, que afecta l'expressió de gens dependents de la Sty1, com ara *gpd1* (Gaits *et al.*, 1997). Curiosament, l'expressió de *ptc1* també s'indueix en resposta a estrès, conformant, de la mateixa manera que la Pyp2 un mecanisme de retroalimentació negativa (fig. 12).

Fins el moment, la diana de la PP2C és desconeguda però, donat que afecta la transcripció de gens dependents de la Sty1, probablement es tracti d'un regulador de la transcripció no descrit encara.

3.6 Respostes específiques als diferents tipus d'estrès:

La resposta a estrès és proporcional a l'extensió de l'insult, però també és específica al tipus d'estrès aplicat, en part gràcies a l'expressió diferencial d'un subgrup de gens (*SESR*) en cada cas. A continuació s'exposaran els mecanismes específics amb que la cèl·lula reacciona a les diferents agressions ambientals per tal de sobreviure i adaptar-se.

3.6.1 Estrès per calor

La resposta a calor és especial entre la resta de respostes a estrès perquè depèn més de la inactivació de la fosfatasa Pyp1 que d'un augment en l'activitat de la Wis1 (Nguyen *et al.*, 1999). Val a dir, però, que és necessari que hi hagi una certa activitat de la Wis1, doncs cèl·lules $\Delta wis1$ són deficientes en la resposta a aquest tipus d'estrès. La fosfatasa PP2C participa també en la modulació de la resposta,

defosforilant el residu Thr171 per tal d'atenuar l'activació de la Sty1 (Nguyen *et al.*, 1999).

Com a tret característic de la resposta a augment de la temperatura, les cèl·lules eucariotes indueixen la síntesi d'un grup de proteïnes genèricament conegut com a *heat shock proteins* (HSPs) (revisat a Lindquist and Kim, 1996). En condicions normals aquestes proteïnes participen com a xaperones en el correcte plegament de proteïnes de nova síntesi. En resposta a xoc de calor les HSPs minimitzarien els danys perquè evitarien l'agregació de proteïnes incorrectament plegades i n'afavoririen la degradació.

Les HSPs es classifiquen en funció de la seva mida i semblança. Així trobem les Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 i Hsps petites. Curiosament, només dues d'aquestes Hsps pertanyen al grup de gens del *CESR* (les Hsp9 i Hsp16), mentre que la resta de Hsps s'indueixen de forma específica en resposta a calor (i en menor grau a exposició a H₂O₂ o Cd) de forma independent de la Sty1 i de l'Atf1 (Chen *et al.*, 2003).

De forma general, en eucariotes l'expressió de les HSPs requereix

l'activació del factor de resposta a calor HSF. Tot i que a mamífer existeixen múltiples HSFs, a llevat només existeix un gen que codifiqui per aquest factor. És interessant, però, notar que el regulador de la resposta a estrès oxidatiu Prr1 (que serà comentat més endavant) conté també un domini d'unió al DNA semblant al dels HSFs. Potser aquest fet explicaria l'expressió de gens comuns en resposta a calor i a estrès oxidatiu.

Finalment, dir que el xoc de calor també condueix a l'expressió de gens que participen en la ubiquitinització i degradació de proteïnes, com ara *wos2* i *sti1*.

3.6.2 Estrès oxidatiu

Sense cap mena de dubte, la resposta a estrès oxidatiu és una de les millor caracteritzades, essent clar que hi participen el mòdul Wis4/Win1-Wis1-Sty1 i el factor de transcripció Pap1.

Quant a la Sty1, ja s'ha parlat en l'apartat dedicat a l'activació de la via que hi intervenen les proteïnes del sistema de dos components Mak2, Mak3, Mpr1 i Mcs4. Com ja s'ha dit, però, l'absència de components d'aquest mòdul no es tradueix en una major sensibilitat a

estrès oxidatiu, fet que suggereix que una altra via està compensant la seva pèrdua. En aquest apartat s'analitzarà el funcionament de la Pap1 per tal de comprendre la resposta a estrès oxidatiu a *S. pombe*. A diferència de l'Atf1, la Pap1 es localitza al citoplasma en condicions normals i transloca al nucli en resposta a dosis baixes d'H₂O₂ o dietilmaleat (Toone *et al.*, 1998; Kudo *et al.*, 1999; Castillo *et al.*, 2002). De fet, la Pap1 està contínuament entrant i sortint del nucli de forma dependent de l'exportina Crm1, i aquesta exportació és bloquejada quan les cèl·lules són exposades a agents oxidants. Per tal d'entendre aquest comportament cal analitzar l'estructura de la Pap1. La Pap1 conté una seqüència d'exportació nuclear al domini C-terminal, a més de dues regions riques en cisteïnes. La primera està localitzada a la zona N-terminal de la proteïna i l'altra al domini C-terminal (el *cysteine-rich domain* o CRD). L'exposició a dosis moderades d'H₂O₂ (0,2mM) indueix la formació d'un pont disulfur entre els dos grups de cisteïnes (Cys278 i Cys501 ó Cys532) que fa que la seqüència d'exportació nuclear deixi d'estar exposada i que per tant evita

la interacció de la proteïna amb la Crm1 i la sortida del nucli (fig. 13). Al nucli, la Pap1 pot induir l'expressió de gens necessaris per la detoxificació dels agents oxidants. Algunes de les dianes transcripcionals identificades de la Pap1 són el gen de la catalasa (*ctt1*) (Nakagawa *et al.*, 1995), els gens de la tioredoxina (*trx2*) (Toone *et al.*, 1998) i la tioredoxina reductasa (*trr1*) (Casso and Beach, 1996), el gen de la glutatió reductasa (*pgr1*) (Lee *et al.*, 1997) i del transportador ABC codificat pels gens *hba2* i *pmd1* (Toone *et al.*, 1998). Curiosament, la inducció de l'expressió del sistema de tioredoxines condueix a la reversió de l'estat oxidat (i actiu) de la Pap1 i esdevé, per tant, un mecanisme de retroalimentació negativa (Vivancos *et al.*, 2004).

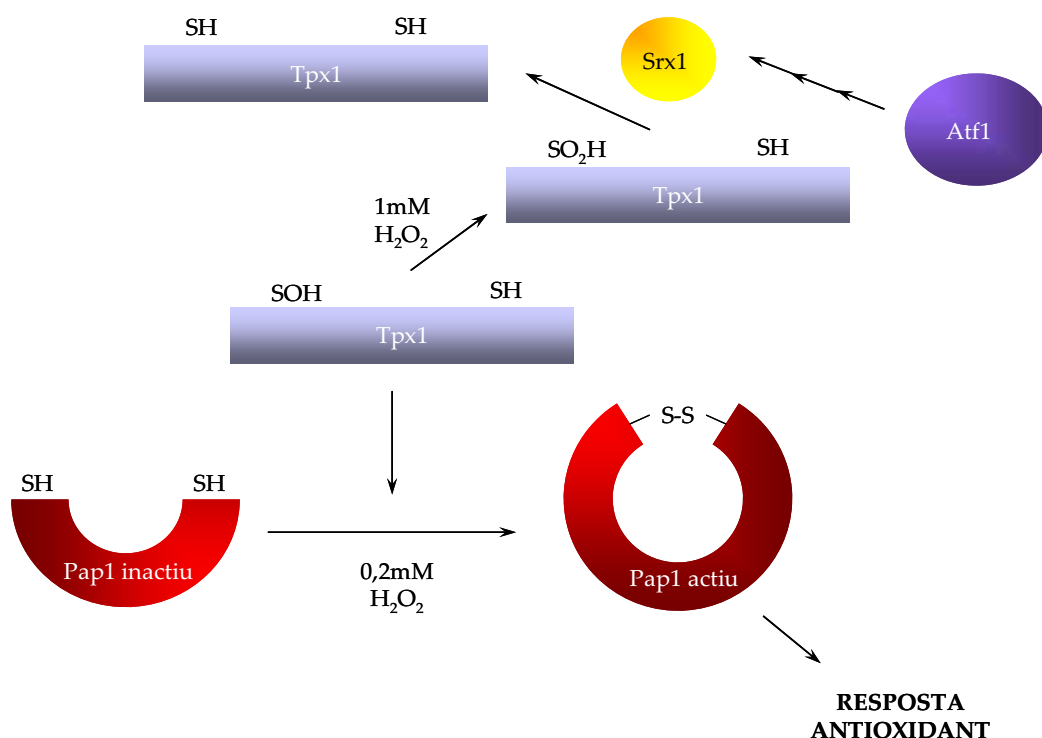
Un fenomen que cridava l'atenció sobre l'activació de la Pap1 era l'observació que la seva entrada al nucli no era immediata a l'exposició amb H₂O₂ (Quinn *et al.*, 2002; Vivancos *et al.*, 2004). Això, conjuntament amb el fet que la seva activació tingués lloc dins un marge tan estret de concentracions d' H₂O₂ (essent òptima a 0,2mM), indicava que probablement existia algun component que controlés l'activació

de la Pap1 i que podia ser inhibit per un excès de l'oxidant. Recentment els treballs de Vivancos *et al.* (2005) i Bozonet *et al.* (2005) han servit per identificar la peroxiredoxina Tpx1 com aquest regulador de la Pap1.

En termes generals, les peroxiredoxines participen en la detoxificació de l'H₂O₂ a través de l'oxidació d'una cisteïna (cisteïna peroxidàtica) a àcid sulfènic (Cys-SOH). Aquest intermediari oxidat pot formar un pont disulfur amb una cisteïna no oxidada d'una altra subunitat, donant lloc a un dímer, que pot ser reciclat de nou a l'estat monomèric reduït inicial per l'acció d'una tioredoxina. L'intermediari amb la cisteïna oxidada a àcid

sulfènic és l'encarregada de transmetre el senyal a la Pap1, probablement a través de la formació de dímers amb aquest (fig. 13) (Vivancos *et al.*, 2005). L'exposició a dosis elevades d'H₂O₂ pot inactivar les peroxiredoxines degut a que la cisteïna peroxidàtica oxidada a àcid sulfènic pot seguir reaccionant donant lloc a àcid sulfínic (fig. 13) (Rabilloud *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002). Aquest fet explicaria perquè dosis elevades de l'oxidant no activen la Pap1. L'estat inactiu de la Tpx1 pot ser revertit per l'acció d'una sulfiredoxina depenent d'ATP, la Srx1, que redueix l'àcid sulfínic a tiol (fig. 13) (Bozonet *et al.*, 2005; Vivancos *et al.*, 2005). Durant molt de temps s'havia

Fig. 13. Regulació de la Pap1 en resposta a estrès oxidatiu (Vivancos *et al.*, 2005).



observat que l'activació de la Pap1 podia estar regulada per la Sty1 (Toone *et al.*, 1998) perquè la seva localització nuclear es veia afectada en mutants $\Delta sty1$. En canvi, no s'havia pogut provar que la Pap1 fos una diana directa de la Sty1, i la seva sobreexpressió no conduïa a l'acumulació de la Pap1 al nucli (Nguyen *et al.*, 2000). Coneixent ara les evidències presentades per Vivancos *et al.* un nou enfocament és possible. El gen *srx1* pertany al grup de gens *CESR* induïts de forma dependent de la Sty1 i l'Atf1 en resposta a estrès oxidatiu. També ho són gens que codifiquen per proteïnes antioxidants com ara la catalasa o la glutatió peroxidasa (Chen *et al.*, 2003). Així, en resposta a dosis elevades d'oxidants, la Sty1 permetria l'activació de la Pap1 a través de l'expressió d'aquests gens. Per una banda disminuiria la severitat de l'estrès fins a dosis que no saturarien la Tpx1 i per altra banda, mitjançant la inducció del gen *srx1* permetria la reversió de l'estat hiperoxidat de la Tpx1 per tal que aquesta pugui transmetre el senyal a la Pap1 (Vivancos *et al.*, 2004; Vivancos *et al.*, 2005).

Una altra proteïna que també s'ha relacionat amb la resposta a estrès

oxidatiu és el regulador de la resposta Prr1 (Ohmiya *et al.*, 1999) tot i que la seva funció no és molt clara. Per analogia amb el seu homòleg de *S. cerevisiae* Skn7 es creu que podria participar en l'activació de la Pap1 (Ohmiya *et al.*, 1999) i, donat que també comparteix certa semblança amb la Mcs4 també s'ha suggerit que pugui ser activat per una histidina quinasa, potser la Mak1. Mutants de *prp1* també comparteixen trets característics de mutants d'*atf1* (v.g. són estèrils) i per aquest motiu també s'ha proposat que podria participar en l'activació de l'Atf1 (Greenall *et al.*, 2002).

Per últim, quant a la resposta a estrès oxidatiu, cal esmentar el cas particular de la resposta a metalls com l'arsenit que també generen espècies reactives d'oxigen (ROS) a la cèl·lula. En un treball de Rodriguez-Gabriel *et al.* es comparava la dependència de la Sty1 en la resposta a oxidants com l' H_2O_2 i la resposta a arsenit (Rodriguez-Gabriel and Russell, 2005). Com a conclusió d'aquest estudi s'extreia que la toxicitat produïda per l'arsenit no podia ser atribuïda únicament a la generació de ROS, però sí que es requeria la Sty1 per sobreviure a l'exposició a

aquest agent. L'activació de la Sty1 en resposta a arsenit no era dependent del sistema Mpr1-Mcs4 però sí que calia una certa activitat de la Wis4 i la Win1. De la mateixa manera que havia estat descrit per la resposta a calor, l'activació de la Sty1 durant l'exposició a arsenit semblava recaure en la inactivació de la fosfatasa Pyp1.

En definitiva, la resposta a estrès oxidatiu és un procés complex que requereix la participació coordinada de diferents sistemes.

3.6.3 Estrès osmòtic

L'exposició de les cèl·lules a elevada osmolaritat condueix a la deshidratació i a la consegüent pèrdua de la viabilitat. En tots els tipus cel·lulars la resposta primària a l'estrès osmòtic és l'acumulació de molècules que puguin compensar el

gradient osmòtic amb el medi extern. L'osmòlit majoritàriament produït és el glicerol que té, a part, la propietat de ser relativament inert i no afectar altres processos dins la cèl·lula. Un enzim clau en la síntesi de glicerol és la glicerol-3-fosfat deshidrogenasa, que a *S. pombe* és codificat pels gens *gpd1* i *gpd2* (Ohmiya *et al.*, 1995). L'expressió de *gpd2* és constitutiva, però la de *gpd1* només s'indueix en resposta a estrès, constituint un dels gens del *CESR* (Chen *et al.*, 2003). D'altra banda, la resposta a estrès osmòtic també afecta l'expressió de proteïnes de membrana que funcionen com a transportadors per tal d'afavorir l'extrusió d'ions Na^+ i K^+ . El transportador Sod2 (Jia *et al.*, 1992) i Trk1 i Trk2 respectivament s'encarregarien de l'exportació d'aquests cations.

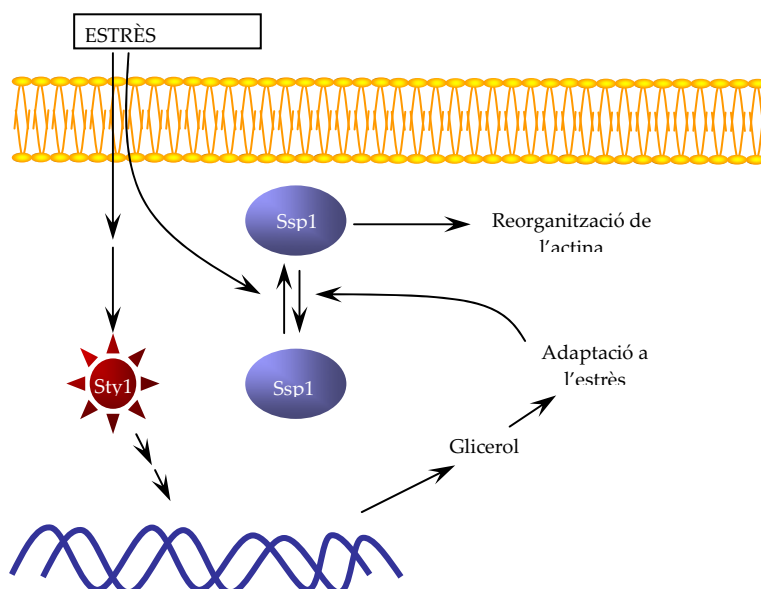


Fig. 14. Model de cooperació entre la Sty1 i la Ssp1 en resposta a estrès osmòtic (Rupes *et al.*, 1999).

Finalment, la quinasa Ssp1 s'ha implicat en la resposta a estrès osmòtic independent de la Sty1 (Rupes *et al.*, 1999). La Ssp1 és una quinasa amb homologia amb les quinases depenents de calmodulina que s'havia relacionat amb la dinàmica de l'actina i l'establiment del creixement bipolar (Matsusaka *et al.*, 1995). En aquest sentit, s'ha observat que la Ssp1 promou la despolimerització de l'actina. Semblaria que en resposta a estrès osmòtic aquesta activitat permetria la deslocalització de l'actina dels pols de creixement per tal de formar un entramat que protegís la integritat cel·lular (fig. 14).

3.7 Altres vies en la resposta a estrès:

Per últim, una darrera cascada de MAPKs constituïda per la MAPK Spm1/Pmk1 (Toda *et al.*, 1996; Zaitsevskaya-Carter and Cooper, 1997), la MAPKK Pek1 (Loewith *et al.*, 2000; Sugiura *et al.*, 1999) i la MAPKKK Mkh1 (Sengar *et al.*, 1997) també s'ha implicat en la resposta a diferents alteracions ambientals, com ara estrès hipo- i hiperosmòtic, privació de glucosa, dany a la paret o estrès oxidatiu (Madrid *et al.*, 2006). Encara no és molt conegut el

mecanisme que permet l'activació d'aquesta via, però el que sí sembla clar és que existeix una dependència de Sty1 i Atf1 per tal que és doni la inactivació de la Spm1 un cop s'ha superat l'estrès osmòtic. Aquest fet demostra que cal un diàleg entre diferents vies per tal que la resposta sigui adequada a l'insult aplicat.

Com s'ha pogut veure, el cicle cel·lular de *S. pombe* és un procés altament regulat a molts nivells, i en la majoria dels casos, ja sigui de forma directa o indirecta, hi juguen un paper important els complexos Cdc2-ciclina. Per aquest motiu, la regulació d'aquests complexos ha estat en els darrers anys un motiu d'estudi. En el transcurs d'aquesta tesi doctoral ens hem volgut endinsar en la regulació del complex Cdc2-Cdc13 a través del seu activador Cdc25 en resposta a estrès ambiental, i en concret hem volgut estudiar les implicacions de la quinasa Srk1 en el procés.

L'objectiu inicial del nostre grup era identificar homòlegs de les quinases dependents de calmodulina de mamífer al llevat de fissió *Schizosaccharomyces pombe*. En un treball anterior del grup ja s'havia identificat la quinasa Cmk2 com a homòloga d'aquest tipus de quinases.

En el treball d'aquesta tesi l'objectiu inicial ha estat caracteritzar una altra proteïna que també vam identificar com a quinasa amb homologia amb les CaM-quinases de mamífer, la Srk1.

Així, els objectius que hem volgut acomplir han estat els següents:

- Caracterització de la funció de la Srk1:

- Anàlisi de l'efecte de la sobreexpressió i de la delecció en la progressió del cicle cel·lular.
- Estudi dels mecanismes a través dels quals la Srk1 fa la seva funció.

Durant la realització d'aquesta tesi es va publicar un treball on es relacionava la Srk1 en la resposta a estrès, com a proteïna que interaccionava amb la MAPK Sty1. Resultats previs del nostre grup

també indicaven una implicació de la Srk1 en aquest procés. Per aquest motiu, en segon lloc ens vam plantejar un segon bloc d'objectius:

- Implicacions en la resposta a estrès:

- Anàlisi de l'activitat de la Srk1 en resposta a estrès.
- Activitat en resposta a diferents tipus d'estímul.
- Funcionalitat del paper de la Srk1 en la resposta a estrès.
- Paper de la Srk1 en la regulació de la via de resposta a estrès.

1. TÈCNIQUES DE MANIPULACIÓ DE DNA:

1.1 PCR (*Polymerase chain reaction*)

La reacció en cadena de la polimerasa permet amplificar una seqüència específica de DNA mitjançant l'ús d'oligonucleòtids corresponents a la zona flanquejant de la regió d'interès.

La reacció es du a terme de la següent manera:

Oligonucleòtid 5' 100 µM.....	0,5 µl
Oligonucleòtid 3' 100 µM.....	0,5 µl
DNA motlle 0,1 µg/µl.....	1 µl
Tampó 10x.....	5 µl
MgCl ₂ 50 mM.....	1,5 µl
dNTPs 25 mM.....	0,4 µl
Polimerasa*.....	1 µl
Aigua estèril.....	41,1 µl

*Polimerasa: *EcoTaq DNA polymerase* d'ECODEN (5 unitats/µl).

Un cop preparada la reacció, aquesta es sotmet als següents cicles de temperatura en un termociclador:

- 1.- 3 min a 94°C
- 2.- 1 min a 94°C
- 3.- 1 min a 55°C
- 4.- 3 min a 72°C
- 5.- Repetir 30 vegades des del pas 2
- 6.- 10 min a 72°C
- 7.- Mantenir a 15°C

Aquestes concentracions dels diferents components, així com els cicles emprats són orientatius i es poden modificar en funció del producte de PCR que es vol obtenir. A continuació s'indiquen algunes consideracions que cal contemplar abans de dissenyar la reacció de PCR:

- Oligonucleòtids: Generalment han de tenir una mida d'entre 18 i 24 nt, amb un percentatge de GCs del 40-60%. És important que no tinguin una estructura secundària molt forta i que no formin dímers entre ells.

Un altre factor que cal tenir en compte és la temperatura a la que els oligonucleòtids se separaran de la regió complementària o temperatura de *melting* (T_m). Aquesta es calcula en base a la següent fórmula:

$$T_m = [2x(\text{nombre d'As i Ts})] + [4x(\text{nombre de Cs i Gs})]$$

És important que els dos oligonucleòtids tinguin una T_m semblant, perquè aquest paràmetre és necessari per tal de dissenyar els cicles de la reacció.

- MgCl₂: Els ions Mg²⁺ formen un complex amb els dNTPs que és el substrat que reconeix la polimerasa. Un excés de Mg²⁺ en la reacció pot conduir a un augment en la síntesi de productes inespecífics i, per contra, un dèficit d'aquest ió pot provocar que l'eficiència de la reacció sigui molt baixa.

- Cicles d'amplificació:

El primer pas en la reacció (3 min a 94°C) permet que la polimerasa s'activi, donat que a temperatura ambient la seva activitat és molt baixa. Un cop s'ha dut a terme aquest primer pas, s'inicien els cicles d'amplificació:

1.- Desnaturalització del DNA motlle: Aquest pas permet que les dues cadenes de DNA se separin per tal que siguin accessibles als oligonucleòtids i a la polimerasa.

2.- Unió dels oligonucleòtids (*annealing*): Per tal que es doni la unió dels oligonucleòtids a la regió complementària del motlle cal que la temperatura disminueixi. Aquesta es calcula en base a la T_m dels oligonucleòtids, essent aproximadament entre 5 i 10°C inferior a aquesta. Generalment, però, aquesta temperatura es calcula de forma empírica.

3.- Extensió: En aquest pas augmenta la temperatura fins a 72°C per tal que la polimerasa assoleixi la seva activitat màxima.

Un cop aquest cicle s'ha repetit entre 25 i 35 vegades, es deixa que la polimerasa faci una darrera extensió de la cadena durant 10 min.

1.2 Mutació puntual:

Per tal de mutar residus específics de la seqüència d'una proteïna es va realitzar mutagènesi dirigida de la seqüència codificant mitjançant el kit *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* de la casa Stratagene.

Bàsicament, aquesta tècnica es basa en l'amplificació d'un plàsmid que contingui el gen que es vol mutar mitjançant uns oligonucleòtids que continguin la mutació que es vol introduir. Aquests oligonucleòtids han de ser complementaris a la mateixa regió del gen i en el seu disseny s'han de tenir en compte diverses consideracions:

- Han de tenir una mida entre 25 i 45 nt amb una T_m superior o igual a 78°C. La T_m en aquest cas es calcula amb la següent fórmula:

$$T_m = 81,5 + 0,41 \times (\%GC) - 675 / \text{nt totals} - \% \text{ de desaparellaments}$$

De forma òptima els oligonucleòtids han de tenir un contingut de GCs del 40% i preferentment acabar amb aquests nucleòtids.

La reacció es prepara de la següent manera:

Tampó 10x5 µl
 DNA motlle.....X µl (5–50 ng)
 Oligonucleotid 5' X µl (125 ng)
 Oligonucleotid 3' X µl (125 ng)
 dNTPs..... 1 µl
 Polimerasa *Pfu Turbo* (2,5 unitats/µl).....2 µl
 Aigua estèril.....qsp 50 µl

Els cicles d'amplificació emprats difereixen lleugerament pels recomanats per la casa comercial:

- 1.- 30 s a 95°C
- 2.- 30 s a 95°C
- 3.- 30 s a 55°C
- 4.- 4 min per Kb del plàsmid a 68°C
- 5.- Repetir des del pas 2 de 12 a 18 vegades (12 per mutacions puntuals i 18 per deleccions o insercions d'aminoàcids)

Un cop realitzada la PCR el producte es digereix amb l'enzim DpnI. Aquest enzim digereix específicament el DNA metilat, de manera que elimina de la reacció el DNA emprat com a motlle.

La reacció es llavors transformada en cèl·lules DH5α competents, segons el protocol que s'explica més endavant. Cal tenir en compte, que el producte de PCR, tot i tenir estructura de plàsmid presenta un tall en cadascuna de les cadenes, corresponent al punt on començava cadascun dels oligonucleòtids. Per tant, la bacteri haurà de reparar aquests talls i en conseqüència l'eficiència del procés no és tan elevada com en una transformació normal.

Un cop obtingudes les colònies es du a terme l'extracció del DNA plasmídic i la seqüenciació per tal de comprovar que s'ha aconseguit mutar el gen.

1.3 Digestió del DNA amb enzims de restricció:

La digestió del DNA mitjançant enzims de restricció permet obtenir fragments que podran ser posteriorment emprats en reaccions de lligació per tal de clonar un gen en un plàsmid. D'altra banda les reaccions de digestió també s'utilitzen per tal de comprovar construccions, donat que en funció de si un plàsmid conté un insert o no el patró de restricció que s'obtindrà serà diferent.

En la realització d'aquesta tesi s'han utilitzat principalment enzims de la casa comercial Invitrogen.

En termes generals, les reaccions s'han dut a terme seguint les següents proporcions:

DNA.....	5 µl
Tampó 10x.....	2 µl
Enzim.....	1 µl
Aigua estèril.....	12 µl

La reacció s'incuba a la temperatura que indica la casa comercial (generalment a 37°C) durant un temps aproximat de 2 h. Alguns enzims tenen activitat durant períodes més llargs i es poden incubar tota la nit.

Quan s'han de realitzar digestions amb més d'un enzim, es poden utilitzar conjuntament, sempre i quan els dos enzims requereixin el mateix tampó o els dos tampons siguin compatibles. En cas contrari, caldria purificar el producte de la primera digestió abans de realitzar la segona.

1.4 Lligació de fragments de DNA:

Aquesta tècnica permet unir fragments de DNA sempre que els extrems siguin compatibles, bé perquè han estat digerits amb el

mateix enzim de restricció o bé perquè presentin extrems roms. D'aquesta manera es poden clonar gens o fragments de gens en diferents plàsmids.

Per tal de facilitar la reacció és important que la quantitat de molècules d'insert present sigui tres vegades superior que la quantitat de molècules de plàsmid. Aquesta proporció es calcula tenint en compte la concentració de cada mostra però també considerant la mida del fragment respecte el plàsmid.

La reacció es realitza de la següent manera:

	Lligació	Control
Plàsmid	x µl	x µl
Insert	y µl	-
Tampó 5x	3 µl	3 µl
Lligasa*	1 µl	1 µl
Aigua	11-x-y µl	11-x µl

* T4 DNA ligase d'Invitrogen

Les reaccions s'incuben durant un mínim de 6h a 16°C, i els productes es transformen llavors en cèl·lules DH5α competents segons el protocol que s'indica més endavant.

1.5 Extracció de DNA plasmídic i purificació de fragments de DNA:

L'extracció de DNA plasmídic es va fer emprant el kit *NucleoSpin Plasmid*

QuickPure de Macherey-Nagel i es va utilitzar el kit *NucleoSpin Extract* de Macherey-Nagel per a la purificació de fragments de DNA provinents de digestions o de PCR.

1.6 Electroforesi de DNA:

Per tal de visualitzar els productes de PCR o els fragments obtinguts en una digestió, les mostres es van separar mitjançant l'electroforesi en gels d'agarosa a l'1%. Aquests gels es preparen en tampó TAE (Tris-acetat 40 mM, EDTA 1 mM) on es dissol l'agarosa sòlida (1 g per 100 ml). La barreja s'ha d'escalfar per tal que l'agarosa es dissolgui completament. Un cop s'ha refredat, s'afegeix bromur d'etidi a una concentració final de 0,5 µg/ml i s'aboca en una cubeta fins que s'ha solidificat.

Les mostres preparades amb tampó de mostra 6x es carreguen en el gel (submergit en TAE) i es sotmeten a un voltatge de 50-100 V. El DNA té càrrega negativa de manera que en aplicar el camp elèctric es desplaçarà cap a l'ànode. Donat que l'agarosa forma un entramat que dificulta el pas de les molècules a través del gel, les mostres avancen més fàcilment com més petites són. D'aquesta manera, aquest gel

permet separar els diferents fragments de DNA en funció de la seva mida.

El bromur d'etidi s'intercala en el DNA i permet visualitzar els diferents fragment en irradiar el gel amb llum UV.

En les taules 1 i 2 es recullen respectivament els plàsmids i els oligonucleòtids emprats durant la realització d'aquesta tesi.

Oligonucleòtid	Seqüència	Propòsit
Cmk3 fwd	5'CACACACATATGCGTTTTAAAAGTATTCAGCAA AATATCGAGGA3'	Oligonucleòtids per clonar el gen <i>srk1</i> en els plàsmids pREP1, pREP41 i pGEX-KG amb les dianes NdeI i NotI
Cmk3 rv	5'CACACAGCGGCCCGCCACTTTTTGTGCGATGTGCGAC GATTATAC3'	
Cmk3 KA fwd	5'GGTGA AAAAAGTCGCCATTGCAGTTGTCCAGCGC GC 3'	Oligonucleòtids per mutar la Lys153 a Ala del gen <i>srk1</i> (al·lel inactiu)
Cmk3 KA rv	5'GCGCGCTGGACAACCTGCAATGGCGACTTTTTAC C3'	
Cmk3 Kan 5'	5'GTGTTGGCACATTTCCAGACGTA AAAACCAAACG ACTAGAGATCCGGATCCCCGGGTTAATTAA 3'	Oligonucleòtids per deleccionar el gen <i>srk1</i> amb els mòduls de kanamicina
Cmk3 Kan 3'	5'CGTCACTGAGTAAGCGTCAATTGATTAACAGAG TGGATAGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC3'	
Chk1 fw	5'CATGGCTCAAAAATTAGATAACTTTCCTTACC3'	Oligonucleòtids per amplificar el cDNA de <i>chk1</i> a partir d'una llibreria
Chk1 rv	5'CATTTTGTGAAACATCTGTAAGAACAATCGGC3'	
Chk1 NdeI fw	5'GCGCGCATATGGCTCAAAAATTAGATAACTTTC CTTACC3'	Oligonucleòtids per clonar el gen <i>chk1</i> en el plàsmid pREP1 amb les dianes NdeI i NotI
Chk1 NotI rv	5'GCGCGCGCGCCGCAATTTTGTGAAACATCTGTA AGAACAATCGGC3'	
Cmk3 T463A 5'	5'GTTCAAGCCGCTCGTGTCTCCTGGTGTAAAC3'	Oligonucleòtids per mutar la Thr 463 a Ala del gen <i>srk1</i>
Cmk3 T463A 3'	5'GTTAACACCAGGAGCACGAGCGGCTGAAC3'	
Rad24 pET20b 5'	5'GCGCGCCATATGTCTACTACTTCTCGTGAAGATG CTGTTTATTTAGCCAAACTTGCTGAGCAAGCCGA G3'	Oligonucleòtids per clonar el gen <i>rad24</i> en el plàsmid pET20b amb les dianes NdeI i NotI
Rad24 pET20b 3'	5'GCGCGCGCGGCCGCTGCGTCCGCCTTGGGCTCA GCTTCGCCTTCTGG3'	
Wis1 S17A fw	5'GCGCGCATATGTCTTCTCCAAATAATCAACCCT TGTCTTGCTCATTGAGACAGCTGCTATTCTCCT ACCGCACCTCCCGG3'	Oligonucleòtids per clonar el gen <i>wis1</i> en el plàsmid pGEX-KG amb les dianes NdeI i NotI. L'oligonucleòtid Wis1 S17A fw introdueix la mutació Ser17 a Ala
Wis1 fw	5'GCGCGCATATGTCTTCTCCAAATAATCAACCCT TGTCTTGCTCATTGAGACAGCTGTCTATTCTCCT ACCGCACCTCCCGG3'	
Wis1 rv	5'GCGCGGCGGCCGCGAGCTTCTTTTTACCTTTCT CTTAAAGAGCGCC3'	
Wis1 KD fw	5'GGTGTCACTATGGCCTTGGGAAATTAGTTGT CC3'	Oligonucleòtids per mutar la Lys349 a Arg del gen <i>wis1</i>
Wis1 KD rv	5'GGACAACCTAATTTCCGCAAGGCCATAGTGAC ACC3'	
Wis1 kan-N fw	5'CCGTGGCATTACCTACACAAAGCTACTCGTAG GTGATTGCCTTTAAACTTCCGAATTCGAGCTCGTT TAAAC3'	Oligonucleòtids per integrar els promotors <i>nmt41</i> o <i>nmt81</i> davant del gen endogen <i>wis1-12myc::ura4+</i> amb els mòduls de kanamicina.
Wis1 kan-N S17A rv	5'CCGGGAGGTGCGGTAGGAGAAATAGCCAGCTGT CTCAATGAGCAAGACAAGGGTTGATTATTTGGAG AAGACATCATGATTTAAACAAAGCGACTATA3'	L'oligonucleòtid Wis1 kan-N S17A rv introdueix la mutació Ser17 a Ala
Wis1 kan-N rv	5'CCGGGAGGTGCGGTAGGAGAAATAGACAGCTGT CTCAATGAGCAAGACAAGGGTTGATTATTTGGAG AAGACATCATGATTTAAACAAAGCGACTATA3'	

Taula 1. Oligonucleòtids utilitzats en aquest treball

Plàsmid	Dianes d'inserció	Procedència
pREP1- <i>srk1</i> -HA	NdeI – NotI	El present treball
pREP1- <i>srk1K153A</i> -HA	NdeI – NotI	El present treball
pREP41- <i>srk1</i> -HA	NdeI – NotI	El present treball
pREP2- <i>pyp3</i>	NdeI – BamHI	Dr. J. Millar
pGEX-KG- <i>srk1</i>	NdeI – NotI	El present treball
pGEX-KG- <i>srk1K153A</i>	NdeI – NotI	El present treball
pGEX-KG- <i>cdc25</i>	NdeI – NotI	Dr. P. Russell
pGEX-KG- <i>cdc25I</i> ¹⁻⁵⁶	NdeI – NotI	Dr. P. Russell
pGEX-KG- <i>cdc25II</i> ⁵⁶⁻¹⁴⁵	NdeI – NotI	Dr. P. Russell
pGEX-KG- <i>cdc25III</i> ¹⁴⁵⁻²⁵⁹	NdeI – NotI	Dr. P. Russell
pGEX-KG- <i>cdc25IV</i> ²⁵⁹⁻³⁷⁴	NdeI – NotI	Dr. P. Russell
pREP1- <i>chk1</i> -HA	NdeI – NotI	El present treball
pREP1- <i>wee1</i> -HA	NdeI – NotI	Estoc del laboratori
pGEX-KG- <i>srk1K153A T463A</i>	NdeI – NotI	El present treball
pINV1- <i>sty1</i> -HA	NdeI – NotI	Dr. P. Russell
pINV1- <i>sty1</i> -HA -DEGRON	NdeI – NotI	Dr. P. Russell
pREP1- <i>srk1</i> -flag	NdeI – NotI	El present treball
pGEX-KG- <i>wis1K349R</i>	NdeI – NotI	El present treball
pGEX-KG- <i>wis1K349R S17A</i>	NdeI – NotI	El present treball
pET20b- <i>rad24</i>	NdeI – NotI	El present treball
pGEX2TN- <i>cdc25 9A</i>	NdeI – SmaI	Dra. H. Piwnicka-Worms i Dr. P. Segundo

Taula 2. Plàsmids emprats en aquest treball

2.OBTENCIÓ DE LES SOQUES EMPRADES:

Les soques emprades en la realització d'aquesta tesi i els seus

genotips es recullen en la taula 3 a continuació. Les soques que utilitzem al laboratori contenen mutacions en els gens *ura4* i *leu2* de

Taula 3. Relació de soques emprades

Soca	Genotip	Procedència
<i>Wt</i>	<i>h leu1-32 ura4-D18</i>	Estoc del laboratori
Δ <i>sty1</i>	<i>h sty1::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	Dr. J. Millar
Δ <i>srk1</i>	<i>h srk1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	El present treball
<i>srk1-HA</i>	<i>h srk1-6HisHA::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	El present treball
<i>cdc2-3w</i>	<i>h cdc2-3w leu1-32 ura4-D18</i>	Estoc del laboratori
<i>cdc2-3w Δcdc25</i>	<i>h cdc2-3w cdc25::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	Estoc del laboratori
Δ <i>wee1</i>	<i>h wee1::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	Estoc del laboratori
Δ <i>mik1</i>	<i>h mik1::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	Estoc del laboratori
<i>wee1-50</i>	<i>h wee1-50 leu1-32 ura4-D18</i>	Estoc del laboratori
Δ <i>srk1 wee1-50</i>	<i>h srk1::kanMX6 wee1-50 leu1-32 ura4-D18</i>	El present treball
Δ <i>rad24</i>	<i>h rad24::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	Dr. P. Russell
<i>cut9-665</i>	<i>h cut9-665 leu1-32</i>	Dr. J. Millar
Δ <i>rad24 cut9-665</i>	<i>h rad24::ura4⁺ cut9-665 leu1-32 ura4-D18</i>	El present treball
<i>cdc25-12myc</i>	<i>h⁺ cdc25-12myc::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	Dr. P. Russell
<i>cdc25-9A</i>	<i>h⁺ cdc25-9A leu1-32</i>	Dra. H. Piwnica-Worms i Dr. P. Segundo
<i>cdc25-12myc Δsrk1</i>	<i>h cdc25-12myc::ura4⁺ srk1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	El present treball
<i>sty1-HA</i>	<i>h sty1-HA::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	Dr. J. Millar
Δ <i>atf1</i>	<i>h atf1::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	Dr. J. Millar
Δ <i>atf1 Δsrk1</i>	<i>h atf1::ura4⁺ srk1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	El present treball
<i>srk1-HA kan</i>	<i>h srk1-HA::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Dra. E. Hidalgo
Δ <i>sty1 srk1-HA kan</i>	<i>h sty1::ura4⁺ srk1-HA::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	El present treball
Δ <i>wis1 sty1-9myc</i>	<i>h wis1::ura4⁺ sty1-9myc::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	Dr. J. Millar
Δ <i>wis1sty1-9myc srk1-HA kan</i>	<i>h wis1::ura4⁺ sty1-9myc::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	El present treball
<i>nmt81::wis1-12myc</i>	<i>h nmt81::wis1-12myc::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	El present treball
<i>wis1-12myc</i>	<i>h wis1-12myc::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	Dr. P. Russell
<i>wis1-12myc Δsrk1</i>	<i>h wis1-12myc::ura4⁺ srk1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	El present treball
<i>nmt81::wis1S17A-12myc</i>	<i>h nmt81::wis1-12myc::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	El present treball
Δ <i>pyp1</i>	<i>h pyp1::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	Dr. J. Millar
Δ <i>pyp2</i>	<i>h⁺ pyp1::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18 adeM-210</i>	Dr. J. Millar

manera que es poden transformar amb plàsmids que continguin aquests marcadors i seleccionar-les segons la seva auxotrofia. Aquesta característica permet que es puguin dur a terme manipulacions genètiques com les integracions i les deleccions que s'exposaran a continuació.

2.1 Integració d'epítops:

La integració d'epítops permet detectar la proteïna endògena sense haver d'utilitzar un anticòs específic dirigit contra la proteïna.

La integració d'epítops a continuació del gen endogen es pot aconseguir mitjançant un procés de recombinació homòloga. En les cèl·lules de *S. pombe* aquest tipus de recombinació es dona amb una freqüència força elevada. Així, en transformar un plàsmid que contingui una seqüència de replicació autònoma, el 0,1% de les colònies obtingudes hauran integrat el plàsmid en la zona homòloga del genoma. Aquesta freqüència de recombinació es pot augmentar si es realitza un tall amb un enzim de restricció en la zona d'interès del plàsmid.

Així, la integració d'epítops es pot dur a terme mitjançant dos mètodes que s'explicaran a continuació:

2.1.1 Integració d'epítops mitjançant el plàsmid pRIP2:

En primer lloc cal clonar el gen d'interès en el plàsmid pRIP2 (que no conté seqüència de replicació autònoma).

A continuació, es digereix amb l'enzim PstI i un enzim que talli la seqüència del gen. D'aquesta manera s'elimina el promotor nmt del plàsmid i part de la seqüència amino-terminal del gen.

Aquest fragment linial restant es purifica i es transforma en la soca desitjada, seguint el protocol de transformació amb acetat de liti que s'exposarà més endavant.

Per últim, se sembren les cèl·lules en plaques de medi selectiu, considerant que el plàsmid pRIP2 conté una còpia del gen *ura4⁺*.

Per tal de descartar que la integració del plàsmid no sigui estable, les colònies obtingudes es fan créixer en medi ric (no selectiu) durant tres dies. Si el plàsmid no s'ha integrat en el genoma, es perdrà en absència de selecció. Finalment, les colònies es tornen a créixer en medi selectiu

per detectar les colònies que han integrat el plàsmid de forma estable.

2.1.2 Integració d'epítops mitjançant productes de PCR:

Alternativament, la integració d'epítops també es pot dur a terme mitjançant la transformació d'un fragment de PCR que contingui un marcador de selecció com ara el gen *ura4⁺* o el gen de resistència a la kanamicina (*kan*).

El fragment de PCR s'obté emprant com a motlle els plàsmids pFA6a-kanMX6 descrits per Bahler *et al.* (Bahler *et al.*, 1998a). Els oligonucleòtids que s'utilitzen han de tenir una mida d'aproximadament 100nt, i es dissenyen de la següent manera:

Oligonucleòtid 5': ~80 nt corresponents a la seqüència final del gen sense el codó de parada, seguits de ~20 nt corresponents al plàsmid de la kanamicina.

Oligonucleòtid 3': ~80 nt corresponents a una regió del terminador del gen allunyada aproximadament 80-200 nt del codó de parada, seguits de ~20 nt corresponents al plàsmid de la kanamicina.

Aquests oligonucleòtids han d'haver estat purificats per HPLC.

La reacció de PCR es du a terme com s'indica a continuació:

Oligonucleòtid 5' 100 µM.....	0,5 µl
Oligonucleòtid 3' 100 µM.....	0,5 µl
DNA motlle 0,1 µg/µl.....	1 µl
Tampó 10x.....	5 µl
MgCl ₂ 50 mM.....	1,5 µl
dNTPs 25 mM.....	0,4 µl
Polimerasa.....	1 µl
Aigua estèril.....	41,1 µl

1.- 3 min a 94°C

2.- 1 min a 94°C

3.- 1 min a 55°C

4.- 2 min a 72°C

5.- Repetir 35 vegades des del pas 2

6.- 10 min a 72°C

7.- Mantenir a 15°C

El producte de PCR es purifica i es transforma en la sòcia triada segons el protocol de transformació amb acetat de liti.

A diferència del mètode anterior, en aquest cas les cèl·lules es plaquegen en medi YES i és a l'endemà, un cop han crescut, que es fa una rèplica en medi selectiu (YES suplementat amb genètica 100 µg/ml per la resistència a kanamicina o EMM-LHA per gens amb *ura4⁺*).

De nou, per tal de seleccionar només aquells transformants estables, les colònies es fan créixer durant tres

dies en medi YES i a continuació es fa una rèplica en medi selectiu.

2.2 Delecció de gens:

De la mateixa manera que es poden integrar epítops, la recombinació homòloga també permet deleccionar gens. La delecció de gens és útil perquè permet analitzar la funció d'una proteïna en observar l'efecte que produeix la seva pèrdua.

La delecció de gens es pot dur a terme mitjançant l'ús de fragments de PCR com en el cas anterior, utilitzant com a motlle els plàsmids pFA6a-kanMX6.

En aquest cas, els oligonucleòtids emprats hauran de dissenyar-se atenent a les següents consideracions:

Oligonucleòtid 5': ~80 nt corresponents a una regió situada immediatament abans de l'origen de transcripció seguits de 20 nt corresponents al plàsmid.

Oligonucleòtid 3': ~80 nt corresponents a una regió situada immediatament després del codó de parada seguits de 20 nt corresponents al plàsmid.

La reacció es du a terme com en el cas de les integracions. Un cop obtingut el fragment de PCR el procediment que es segueix és el

mateix que en el cas de la integració d'epítops mitjançant fragments de PCR. Aquest mètode és el més emprat en l'actualitat, però alternativament els gens es poden disruptar mitjançant la introducció del gen *ura4⁺* en el marc de lectura del gen i la transformació d'aquest fragment en la soca.

2.3 Creuaments genètics:

Aquesta tècnica permet obtenir dobles mutants a partir dels mutants senzills, mitjançant un procés de conjugació. És necessari per tant que les dues soques tinguin un tipus d'aparellament diferent (h^+ o h^-) i que cadascuna de les mutacions porti un marcador diferent (*v.g.* *ura4⁺*, resistència a kanamicina, ...).

Durant la conjugació de les dues soques, bé per un procés de recombinació homòloga o bé per l'orientació aleatòria dels cromosomes en la placa metafàsica s'obtenen espores que poden contenir les dues mutacions. El procediment que s'utilitza és el següent:

- Barrejar 20 μ l dels cultius exponencials de cadascuna de les soques, formant una gota en una placa de ME.

- Incubar a 25°C durant 3 dies i observar la presència d'ascs zigòtics en la placa. Aquestes es distingeixen dels ascs azigòtics perquè presenten una aparença corbada, en contraposició als azigòtics, que són rectes.
- Digerir els ascs per alliberar les espores mitjançant l'addició de Glusulasa (una barreja de glucuronidasa i sulfatasa provinent del cargol *Helix pomatia*) a 1 ml d'aigua estèril on prèviament s'han resuspès les cèl·lules. Incubar un mínim de 12 h a temperatura ambient.
- Sembrar les espores en plaques de YES per facilitar el seu creixement i posteriorment fer rèpliques de les colònies obtingudes en plaques de medi selectiu.

3. MEDIS I CONDICIONS DE CULTIU

3.1 Medis i condicions de cultiu de *Schizosaccharomyces pombe*

Les soques de *S. pombe* es van fer créixer a 30°C excepte en el cas de les soques termosensibles que es van cultivar a 25°C. Els medis que es van emprar (elaborats segons

(Moreno *et al.*, 1991) són els següents:

YES: Medi ric utilitzat per el creixement normal vegetatiu.

0,5%(w/v) extracte de llevat

3,0%(w/v) glucosa

225 mg/l dels aminoàcids L-adenina, L-histidina, L-leucina, L-lisina i uracil en forma d'hidroclorur

EMM: Medi mínim emprat per seleccionar les soques segons la seva auxotrofia.

3 g/l hidrogen-ftalat de potassi

2,2 g/l Na₂HPO₄

5 g/l NH₄Cl

2% glucosa

20 ml/l sals*

1 ml/l vitamines**

0,1 ml/l minerals***

*Estoc 50x: 52,5 g/l MgCl₂·6H₂O

0,735 g/l CaCl₂·2H₂O

50 g/l KCl

2 g/l Na₂SO₄

**Estoc 1000x: 1 g/l àcid pantotènic

10 g/l àcid nicotínic

10 g/l inositol

10 mg/l biotina

***Estoc 10000x: 5 g/l àcid bòric

4 g/l MnSO₄

4 g/l ZnSO₄·7H₂O

2 g/l FeCl₂·6H₂O

0,4 g/l àcid molíbdic

1 g/l KI

0,4 g/l CuSO₄·5H₂O
10 g/l àcid cítric

L'EMM es va suplementar amb 225 mg/l dels aminoàcids essencials L-adenina, L-histidina, L-leucina o uracil segons l'auxotrofia de la soca que es volia seleccionar.

ME: Medi emprat per a la conjugació de soques de diferent tipus sexual.

3% extracte *bacto-malt*
225 mg/l dels aminoàcids L-adenina, L-histidina, L-leucina i uracil en forma d'hidroclorur pH 5,5 (ajustat amb NaOH)

En tots els casos, el medi sòlid es va obtenir per addició de 20 g/l d'agar.

3.1.1 Inducció de promotors *nmt1*:

Els experiments de sobreexpressió van ser duts a terme mitjançant l'ús de plàsmids de tipus pREP. Aquests deriven del plàsmid pUC i contenen promotors de tipus *nmt* (*no message thiamine*). Aquests promotors són reprimits per la presència de tiamina (Vit B1) en el medi de cultiu (5mM). Per contra, en absència d'aquesta s'indueix l'expressió dels gens sota el control del promotor (Maundrell, 1990; Maundrell, 1993). Existeixen diferents versions del

promotor *nmt* (*nmt1*, *nmt41* i *nmt81*) que difereixen en la seva potència d'inducció, essent el més fort el *nmt1*, seguit del *nmt41* i el *nmt81* (Basi *et al.*, 1993).

En termes generals, el procediment seguit va ser el següent:

- Inocular la soca en medi mínim suplementat amb els aminoàcids necessaris i tiamina (5 mM) per tal de mantenir el promotor reprimat.
- Fer créixer fins a assolir una densitat òptica a 595 nm de 0,8-1,2, indicativa de que les cèl·lules es troben en fase exponencial del creixement.
- Diluir el cultiu en medi amb tiamina (cultiu control) i sense tiamina considerant que ha d'estar en fase exponencial un cop transcorregudes les hores de sobreexpressió desitjades. Cal tenir en compte que petites restes de tiamina procedents del cultiu inicial poden afectar l'expressió del gen. Es recomana, per tant, rentar les cèl·lules amb aigua estèril abans de dur a terme la inducció.

3.1.2 Mètodes de sincronització:

Per tal d'estudiar la regulació durant el cicle de l'activitat de la *Srk1*, cultius exponencials de *S. pombe* van ser sincronitzats. Amb aquest fi es van emprar dos mètodes, el tractament amb hidroxidrea i l'elutriació. A continuació s'exposaran amb més detall ambdós casos.

3.1.2.1 Elutriació:

Aquest mètode és considerat el d'elecció per a la sincronització de cultius donat que no implica l'addició de drogues ni l'ús de mutants termosensibles que podrien alterar el resultat de l'experiment. L'elutriació es basa en el principi que les cèl·lules de cada fase concreta del cicle presenten una mida diferent, essent les més petites aquelles que es troben a l'inici de la fase G2. Considerant això, el mètode consisteix en la separació diferencial de cèl·lules en funció de la seva mida mitjançant l'aplicació de dues forces de signe contrari. Breument, un cultiu exponencial de *S. pombe* és introduït dins el rotor JE-5.0 d'una centrífuga Beckman J6 mitjançant una bomba de flux la força del qual podem controlar. Degut a la força centrífuga, les cèl·lules es dipositen

a la base del rotor, atenent a la seva mida (les més grans a la part més baixa i les més petites a la part superior). Mentre la força del flux aplicat no superi la força centrífuga, la situació es mantindrà així, però, en el moment en que es comenci a augmentar el flux, les cèl·lules més petites (aquelles que es trobaven a la part superior del cultiu) poden ser arrossegades i extretes del rotor. Aquestes cèl·lules (que per la seva mida es troben al principi de fase G2) són llavors recollides en medi fresc, on proliferaran de forma sincrònica (fig. 1).

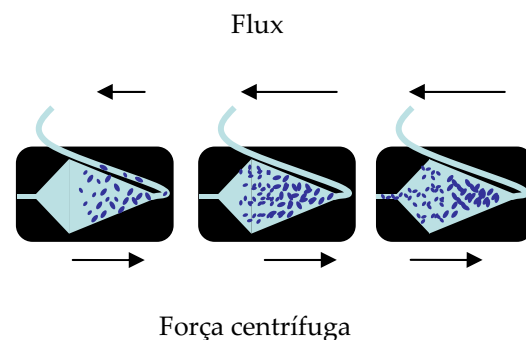


Fig1. Esquema de funcionament d'un elutriador.

La població que es recupera amb aquest mètode és aproximadament un 5% de la inicial i s'ha de tenir en compte a l'hora de calcular la mida del cultiu de partida.

3.1.2.2 Sincronització amb hidroxidrea (HU):

La sincronització amb hidroxidrea permet la sincronització de cultius

en fase G1/S a través del bloqueig de la síntesi de dNTPs. La hidroxidrea inhibeix l'enzim ribonucleòtid reductasa, de manera que impedeix que tingui lloc la replicació del DNA i atura les cèl·lules al principi de fase S. Bàsicament, el procediment que s'ha de seguir consisteix en tractar les cèl·lules amb una concentració de 10 mM d'HU durant 3 h. Passat aquest temps, el cultiu es centrifuga i es renta amb medi sense HU per finalment resuspendre'l en medi fresc. Es pot aconseguir una millor sincronització si el bloqueig es fa a 25°C i en medi mínim. De tota manera, aquest mètode no és dels més eficients, donat que hi ha cèl·lules que escapen del bloqueig.

3.2 Medis i condicions de cultiu d'*Escherichia coli*:

Les soques d'*E.coli* emprades en aquest treball es van fer créixer segons els protocols prèviament descrits per Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1998).

El medi utilitzat en aquest cas va ser LB (*Luria-Bertani*) i els cultius es van incubar a 37°C.

LB: 10 g/l triptona

5 g/l extracte de llevat

10 g/l NaCl

Quan va ser necessari, aquest medi va ser suplementat amb antibiòtics. D'aquesta manera es poden seleccionar les bactèries que contenen un determinat plàsmid en funció de la seva resistència.

En aquest estudi els antibiòtics emprats van ser ampicil·lina (50 mg/l) i cloramfenicol (20 mg/l).

4. TÈCNIQUES DE TRANSFORMACIÓ:

4.1 Transformació en *Schizosaccharomyces pombe*

La transformació de DNA a *S. pombe* permet tant la integració d'epítops i promotors controlables en els gens endògens, com la delecció de gens i la incorporació de plàsmids en forma episomal. El mètode seguit es basa en l'ús de cèl·lules fetes competents mitjançant el tractament amb acetat de liti (Norbury and Moreno, 1997). El procediment consta del següents passos:

- Inocular la soca de *S. pombe* en 5 ml de YES i créixer durant tota la nit a 30°C.
- L'endemà, diluir aquest cultiu, portant-lo a un volum final de 50 ml i deixar créixer 3 h més per tal d'assegurar que aquestes cèl·lules es troben en

- fase exponencial del creixement.
- Centrifugar el cultiu 5 min a 2500 rpm i descartar el sobrenedant.
 - Resuspendre en 50 ml d'aigua estèril i centrifugar de nou.
 - Resuspendre en un *eppendorf* amb 1 ml d'aigua estèril.
 - Centrifugar 1 min a 8000 rpm i descartar el sobrenedant.
 - Resuspendre en 1 ml d'acetat de liti* (LiAc-TE).
 - Centrifugar 1 min a 8000 rpm i descartar el sobrenedant.
 - Resuspendre les cèl·lules en 500 µl d'acetat de liti.
 - Dels 500 µl, prendre 100 µl per transformació i afegir 2 µl de ssDNA** i de 5 a 10 µl del plàsmid. Incubar 10 min a 30°C.
 - Afegir 260 µl de PEG*** i incubar a 30°C entre 30 i 60 min.
 - Afegir 43 µl de DMSO i incubar 5 min a 42°C.
 - Centrifugar 1 min a 8000 rpm i descartar el sobrenedant.
 - Rentar el pellet amb 1ml d'aigua estèril. Centrifugar de nou i descartar sobrenedant.
 - Resuspendre en 100 µl d'aigua estèril i plaquejar en medi

selectiu en funció de l'auxotrofia o la resistència a antibiòtic de la soca.

*LiAc-TE: 0,1 M acetat de liti, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA.

**ssDNA: 10 mg/ml de DNA d'esperma de salmó.

***LiAc-TE-PEG: 40% PEG4000 en LiAc-TE

4.2 Transformació en *Escherichia coli*:

La transformació de DNA es va realitzar en la soca d'*E. coli* DH5α per a l'amplificació de DNA plasmídic i en la soca BL21 per a l'expressió de proteïna. El protocol exposat a continuació, és el descrit per Kushner (Kushner, 1978):

- Incubar d'1 a 10 µl de DNA plasmídic amb 100 µl de cèl·lules fetes competents (amb CaCl₂ i MgCl₂) i incubar durant 30-60 min en gel.
- Realitzar un xoc tèrmic de 45 s a 42°C i mantenir en gel durant 2 min més.
- Afegir 1 ml de medi LB i incubar durant 1 h a 37°C en agitació, per tal de que les cèl·lules es recuperin.
- Centrifugar durant 15 s a màxima velocitat i descartar el sobrenedant.

- Plaquejar en medi LB suplementat amb l'antibiòtic corresponent.

La resistència d'una soca a un antibiòtic o a un altre ve donada pel plàsmid amb que ha estat transformada. En el cas de les cèl·lules BL21, aquestes ja són resistents a cloramfenicol de *per se* (donat que contenen el plàsmid pLys), de manera que la selecció en aquest cas és doble.

5. EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS:

5.1 Proteïnes de fusió a GST:

L'expressió de proteïnes de fusió a GST (glutatió-S-transferasa) es va realitzar emprant la soca d'*E. coli* BL21. El plàsmid en que es va clonar el gen codificant per la proteïna d'interès en cada cas va ser el plàsmid pGEX-KG. Aquest permet fusionar l'epítip GST a l'extrem N-terminal de la proteïna, i d'aquesta manera, un cop expressada, la proteïna pot purificar-se mitjançant boles de glutatió-sefarosa a partir de l'extracte total.

El procediment que es va seguir s'explica a continuació:

En primer lloc s'ha d'induir l'expressió de la proteïna:

- Inocular la soca de BL21 en 50 ml de LB suplementat amb ampicil·lina i cloramfenicol i fer créixer tota la nit a 37°C.
- L'endemà, amplificar aquest cultiu portant-lo a un volum final de 1 l i incubar de nou a 37°C fins que el cultiu tingui una densitat òptica a 595 nm de 0,8-1,2.
- Induir l'expressió de la proteïna mitjançant l'addició d'IPTG 0,5 mM i incubant durant 4 h més a temperatura ambient.
- Centrifugar el cultiu en el rotor GSA d'una centrífuga Sorvall durant 10 min a 5000 rpm a 4°C. El *pellet* obtingut es pot conservar a -80°C.

Un cop s'ha obtingut el *pellet*, les cèl·lules s'han de lisar per tal d'extreure'n la proteïna:

- Resuspendre el *pellet* en 10 ml de NETN* amb inhibidors de proteases**. Transferir la suspensió a un tub de 50 ml de polipropilè.
- Sonicar la suspensió per tal de disminuir la viscositat deguda a l'alliberament del DNA bacterià.

- Centrifugar a 15000 rpm durant 15 min a 4°C en el rotor SS34 d'una centrífuga Sorvall. Recollir el sobrenedant.

En darrer lloc, la proteïna de fusió es purifica incubant el lisat amb un columna d'afinitat de glutatió-sefarosa:

- Rentar 1ml de la reïna de glutatió-sefarosa 4B (d'Amersham Biosciences) una vegada amb 10 ml de PBS fred i una vegada amb 10 ml de NETN, per tal d'equilibrar-la. Centrifugar 3 min a 3000 rpm i descartar el sobrenedant.
- Afegir el lisat de BL21 a la resina i incubar 2 h a 4°C en agitació. Centrifugar la barreja 5 min a 3000 rpm i descartar el sobrenedant.
- Fer dos rentats de la reïna amb 50 ml de NETN i rentar de nou amb 1 ml de NET. Centrifugar i descartar el sobrenedant.
- En darrer lloc, eluir la proteïna afegint a la reïna 1ml de tampó d'elució*** i incubant 30 min a 4°C en agitació. Centrifugar 5 min a 3000 rpm i recollir el sobrenedant, que serà l'eluit1. Repetir el procés per tal d'obtenir una segona fracció de proteïna purificada (eluit2).

- Conservar la proteïna a -80°C.

*NET: 20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA.

NETN: 20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% NP-40 (o Igepal).

**Inhibidors de proteases: 10 µg/ml aprotinina, 5 µg/ml leupeptina, 1 mM PMSF.

***Tampó d'elució: 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 100 mM NaCl, 10 mM Glutatió, 2 mM DTT.

En alguns casos, pot ser necessari digerir la proteïna de fusió amb trombina per tal d'eliminar el GST. Donat aquest cas, després d'un rentat amb PBS, es resuspendrà la reïna en 1000 µl de PBS en lloc d'eluir la proteïna i s'afegiran 1000 µl de trombina (0,1 unitat/µl). Aquesta barreja s'incubarà 1h a 30°C i a continuació es centrifugarà per tal de separar el sobrenedant (que contindrà la proteïna digerida i la trombina) de la resina (que contindrà el GST). Per tal d'eliminar la trombina de la mostra, aquesta s'incubarà amb una resina de PABA (para-amino-benzamidina) (en una proporció de 75 µl de la resina per cada 6 unitats de trombina) durant 30 min a temperatura ambient. El sobrenedant resultant contindrà únicament la proteïna digerida.

5.2 Proteïnes de fusió a histidines:

L'expressió i purificació de la proteïna Rad24 es va fer mitjançant el plàsmid d'expressió en bacteri pET20b. Aquest vector permet la inducció de gens amb IPTG, resultant-ne una proteïna recombinant amb una cua de sis histidines.

La inducció del cultiu es du a terme de la mateixa manera que en el cas anterior, i un cop s'obté el *pellet* de bactèries es procedeix de la següent manera:

- Resuspendre el *pellet* en 1 ml de tampó de lisi* amb inhibidors de proteases per cada 50 ml de cultiu.
- Afegir lisozima fins una concentració final d'1 mg/ml.
- Incubar en gel durant 30 min.
- Sonicar la mostra (sis pols de 10 s).
- Centrifugar el lisat a 15000 rpm durant 20-30 min. Recollir el sobrenedant.
- Rentar 1 ml de reïna de Ni-NTA (Quiagen) amb 10 ml de tampó de lisi. Centrifugar i descartar el sobrenedant.
- Incubar el lisat amb la reïna durant 2 h en agitació suau a 4°C.
- Centrifugar 5 min a 3000 rpm i descartar el sobrenedant.
- Rentar la reïna dos cops amb tampó de rentat**. Centrifugar i descartar el sobrenedant.
- Afegir 1 ml de tampó d'elució*** a la reïna i incubar durant 30 min a 4°C en agitació suau.
- Centrifugar 5 min a 3000 rpm i recollir el sobrenedant (eluit 1). Aquest pas es pot repetir per tal d'obtenir una segona fracció de proteïna purificada (eluit 2). Conservar a -80°C.

*Tampó de lisi: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8,0.

**Tampó de rentat: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8,0.

***Tampó d'elució: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 8,0.

6. OBTENCIÓ DE L'EXTRACTE PROTEIC DE *Schizosaccharomyces pombe*:

Donat que les cèl·lules de *S. pombe* estan recobertes d'una paret, la lisi s'ha de dur a terme mitjançant l'acció combinada d'un tampó de lisi i de fricció mecànica. El procés consta del següents passos:

- Per tal d'obtenir el *pellet*, centrifugar 20 ml de cultiu durant 5 min a 3000 rpm. En el

cas de que es vulgui analitzar l'activació de Sty1, afegir gel a l'interior tub per tal d'evitar que la calor generada en la centrifugació pugui activar la MAPK.

- Resuspendre en 1 ml de *STOP buffer**, centrifugar 1 min a 8000 rpm a 4°C. Recollir el *pellet* que es pot conservar a -80°C.
- Resuspendre el *pellet* en 200 µl de tampó de lisi** amb inhibidors de proteases*** i afegir boles de vidre fins ¾ del volum final.
- Sotmetre les cèl·lules a 3 pols d'agitació a 6000 rpm en la *FAST-PREP™* a 4°C. Controlar el grau de lisi mitjançant l'observació de les mostres al microscopi.
- Foradar la base de l'*eppendorf* i introduir-lo en un altre *eppendorf*. Centrifugar 1 min a 8000 rpm a 4°C per tal de separar l'extracte de les boles de vidre.
- Centrifugar de nou aquest extracte 2 min a 14000 rpm per tal d'eliminar possibles restes cel·lulars de l'extracte.
- Recollir el sobrenedant i guardar-lo a -80°C.

**STOP buffer*: 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 10 mM EDTA, 1 mM Na₃N.

**Tampó de lisi: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 0,1% Tritó X-100, 10% Glicerol, 50 mM NaF.

***Inhibidors de proteases: 1 mM PMSF, 1 µg/ml Aprotinina, 1 µg/ml Leupeptina, 1 mM Na₂VO₃.

7. QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES:

La concentració de la proteïna present en les mostres es va fer mitjançant el mètode de Bradford. Aquest mètode es basa en el canvi de coloració que pateix el reactiu de Bradford (*Bio-Rad protein assay dye reagent concentrate*) en entrar en contacte amb els enllaços peptídics de la proteïna. Aquests canvis es poden valorar mitjançant la mesura de l'absorbància a 595 nm. La concentració es calcula en base als valors obtinguts amb una mostra patró de concentració coneguda, elaborada amb BSA (albumina sèrica bovina). La recta patró es prepara de la següent manera:

concentració	BSA 0,1µg/ml	Aigua	Reactiu de Bradford
0 µg/µl	0 µl	800 µl	200 µl
4 µg/µl	40 µl	760 µl	200 µl
8 µg/µl	80 µl	720 µl	200 µl
10 µg/µl	100 µl	700 µl	200 µl
15 µg/µl	150 µl	650 µl	200 µl

Taula 4. Proporcions de cadascun dels reactius emprats per a la quantificació de proteïnes

La mostra problema es prepara de la mateixa manera, afegint 5 µl de mostra a 795 µl d'aigua i 200 µl del reactiu de Bradford.

Després de barrejar el reactiu cal incubar 10 min a temperatura ambient abans de llegir l'absorvència a 595 nm.

8. ELECTROFORESI DE PROTEÏNES (SDS-PAGE):

L'electroforesi de proteïnes mitjançant gels de SDS-poliacrilamida en condicions desnaturalitzants permet la separació de les proteïnes presents en una mostra en funció del seu pes molecular (Laemmli, 1970). Les mostres que es volen analitzar són tractades prèviament amb un detergent aniònic, el SDS (dodecil sulfat sòdic). Aquest tractament confereix càrrega negativa a les proteïnes, anul·lant la seva càrrega intrínseca. L'aplicació a continuació d'un corrent elèctric promou la migració de les proteïnes a través de la matriu porosa de poliactilamida cap el pol positiu del camp (ànode). Donat que el tractament amb el detergent anul·la la pròpia càrrega de la proteïna, la velocitat de migració dependrà únicament de la mida d'aquesta, essent inversament

proporcional al logaritme del pes molecular.

La matriu de poliactilamida està formada per una barreja d'actilamida i bis-actilamida, i la concentració d'aquests polímers en el gel determinarà la mida del por resultant. Això influirà en la idoneïtat d'un tipus de gel o un altre per a la correcta separació de la mostra. Així, si es volen separar proteïnes de pes molecular gran, s'empraran gels de baixa concentració d'actilamida/bis-actilamida, és a dir gels amb pores grans. En canvi, si es volen separar proteïnes de baix pes molecular, serà més adequat emprar gels amb por petit o d'alta concentració d'actilamida/bis-actilamida.

Els gels per a l'electroforesi de proteïnes consten de dues fases:

- Gel empaquetador: Correspon a la part superior del gel i donat que té una baixa concentració d'actilamida (3,6%) permet que la mostra s'empaqueti en el límit amb la següent fase del gel.
- Gel resolutori: Situat a la part inferior del gel, permet la separació de les proteïnes degut a que conté un major

Taula 5. Preparació de gels d'acrilamida

Components	Gel resolutiu				Gel empaquetador
	8%	10%	12%	15%	
Solució1*	5ml	5ml	5ml	5ml	-
Solució2**	2,8ml	3,4ml	4ml	5ml	0,36ml
Solució3***	-	-	-	-	1,5ml
Aigua	2,2ml	1,6ml	1ml	-	1,2ml
TEMED	14µl	14µl	14µl	14µl	7,5µl
PSA 13%	50µl	50µl	50µl	50µl	30µl
Vfinal	10ml	10ml	10ml	10ml	3ml

*Solució1: 0,75M Tris-HCl, 0,29%SDS, pH8,8.

**Solució2: 30% Acrilamida, 0,8% Bis-acrilamida.

***Solució3: 0,25M Tris-HCl, 0,29%SDS, pH 6,8.

percentatge d'acrilamida (que pot variar de 8-15%).

En la taula 5 es recullen les proporcions que s'han de seguir per preparar els gels.

El PSA (persulfat amònic) actua com a iniciador de la reacció i el TEMED com a agent catalitzador.

Les mostres es preparen calculant la quantitat de proteïna que es vol carregar i afegint $\frac{1}{3}$ part d'aquest volum de tampó de mostra 4x*, és a dir $\frac{1}{4}$ part del volum final. Un cop preparades, les mostres es bullen durant 5 min i es carreguen en el gel. Per tal de poder aplicar el corrent elèctric, l'elèctrode i els gels hauran d'estar submergits en una cubeta que contingui tampó electròlit**. El corrent aplicat serà el corresponent a un amperatge

constant de 35 mA per gel. En el nostre cas, els gels emprats corresponen al sistema *Miniprotean* de Bio-Rad.

*Tampó de mostra 4x: 40 mM Fosfat sòdic pH 7,0, 0,40% Glicerol, 10% SDS, 0,2% DTT, blau de bromofenol.

**Tampó electròlit: 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina, 0,1% SDS, pH 8,3.

Tinció de gels de poliacrilamida amb Coomassie Blue:

Per tal de poder visualitzar el patró de proteïnes que han estat separades mitjançant un gel de poliacrilamida, aquest s'ha de tenyir mitjançant una solució de *Coomassie Blue*.

Aquesta tinció consisteix en la incubació durant aproximadament 15 min a temperatura ambient en agitació suau amb una solució del colorant* i el posterior tractament

amb una solució destenyidora** que permeti eliminar-ne l'excés.

*Solució de tinció: 2,5 mg/ml Coomassie Blue G-250, 45% Metanol, 10% Àcid acètic.

**Solució destenyidora: 50% Metanol, 10% Àcid acètic.

9. ELECTROTRANSFERÈNCIA I IMMUNODETECCIÓ:

Aquesta tècnica, també coneguda com a *western blot* permet la detecció d'una proteïna concreta present en una mostra mitjançant la reacció entre aquesta i un anticòs dirigit contra ella. Prèviament, la mostra ha d'haver estat separada mitjançant un gel de poliacrilamida i transferida a una membrana de nitrocel·lulosa o PVDF (fluorur de polivinilidè).

9.1 Electrotransferència:

Aquest procés consisteix en la transferència de les proteïnes presents en un gel de poliacrilamida cap a una membrana de nitrocel·lulosa o PVDF mitjançant l'aplicació d'un camp elèctric. Les proteïnes de la mostra, en tenir càrrega negativa migraran cap el pol positiu de l'elèctrode, on es trobaran amb la membrana i quedaran retingudes. Tot el sistema es trobarà submergit en un tampó de transferència* que permeti la

transmissió del camp elèctric. El muntatge del sistema es mostra a continuació:

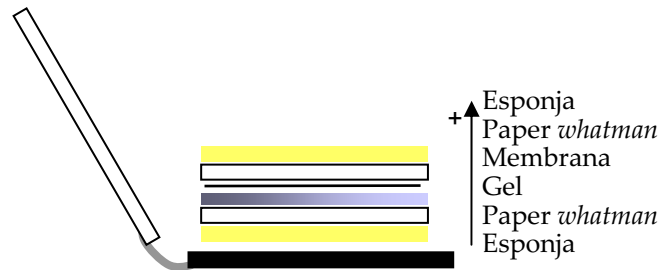


Fig2. Esquema del muntatge de la transferència del gel d'acrilamida

Un cop muntat el sistema, s'aplicarà un camp elèctric de 60 V durant 2 h o bé de 20 V durant tota la nit, a 4°C en ambdós casos per tal d'evitar l'escalfament de la mostra.

Cal dir que les membranes de PVDF s'han d'haver hidratat abans de dur a terme la transferència, incubant-les breument en metanol i equilibrant-les llavors amb tampó de transferència.

*Tampó de transferència: 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM Glicina, 0,02% SDS, 20% etanol.

9.2 Immunodetecció:

Com ja s'ha dit, aquesta tècnica permet la detecció d'una proteïna concreta mitjançant l'ús d'anticòssos que reaccionen específicament contra un epítot present en la proteïna. Es tracta d'una tècnica de detecció indirecta, donat que

l'anticòs que dona el senyal no s'uneix a la proteïna directament, sinó que ho fa a través d'un anticòs primari, que en aquest cas sí que reacciona amb la proteïna. Així diferenciarem dos tipus d'anticòs:

- Anticòs primari: Aquest anticòs reconeix específicament un (anticòssos monoclonals) o més epítops (anticòssos policlonals) continguts en la proteïna. S'obtenen inoculant la proteïna purificada (o fragments) en animals per tal de generar una resposta immunològica i extraient-ne després la sang per tal de separar l'anticòs. Quant els anticòssos monoclonals, aquests són produïts en ratolins i, en aquest cas, se n'extrau la melsa i se'n disgreguen les cèl·lules per tal d'establir línies cel·lulars que sintetitzin anticòssos contra un únic epítop. En el cas d'anticòssos policlonals, aquests es generen en animals més grans, com ara conills o cabres els quals són sagnats per tal d'obtenir una barreja d'anticòssos dirigits contra diferents epítops de la proteïna.

- Anticòs secundari: Aquest anticòs reconeix la regió constant present en l'anticòs primari i que és igual per tots els anticòssos generats en una mateixa espècie animal. Així, s'obtenen inoculant anticòssos de l'espècie on s'ha generat l'anticòs primari en un animal d'una espècie diferent. Els anticòssos secundaris porten conjugat un enzim (peroxidasa o fosfatasa alcalina) que en reaccionar amb el seu substrat donen lloc a un senyal detectable, proporcional a la quantitat de proteïna present a la mostra. La finalitat d'utilitzar un anticòs secundari és que permet amplificar el senyal, que seria molt baixa si només s'emprés un sol anticòs.

El passos que s'han de seguir per dur a terme aquesta tècnica es mostren a continuació:

- Hidratar la membrana on s'han transferit les proteïnes submergint-la en metanol absolut i rentant després amb aigua destilada i TBS*.
- Bloquejar la membrana mitjançant la incubació amb una solució de bloqueig** per

tal d'evitar que els anticossos s'uneixin de forma inespecífica a la membrana. Aquesta incubació es fa durant 1h a temperatura ambient, en agitació suau.

- Incubar la membrana en la solució de l'anticòs primari*** durant 2 h a temperatura ambient o bé durant tota la nit a 4°C. La dilució de l'anticòs serà diferent depenent de cada anticòs.
- Realitzar 3 cicles de rentat de 5 min a temperatura ambient amb TBST*.
- Incubar la membrana amb l'anticòs secundari dissolt en la solució d'anticòs*** en una proporció 1:2000. En el nostre cas l'enzim secundari emprat estava conjugat a l'enzim peroxidasa (HRP).
- Realitzar dos rentats de 5 min amb TBST i un darrer rentat de 10 min amb TBS.
- Per tal de detectar el senyal de l'anticòs, tractar la membrana amb el substrat proporcionat per el sistema de detecció (EZ-ECL Chemiluminescence Detection Kit for HRP, de Biological Industries) i captar la

quimioluminiscència en una pel·lícula fotogràfica (*Fuji Medical X-Ray film*, de Fujifilm).

*TBS: 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl

TBST: TBS 0,05% Tween-20

**Solució de bloqueig: 5% de llet en pols dissolta en TBST.

***Solució d'anticòs: 2,5% de llet en pols dissolta en TBST. En alguns casos, quan la casa comercial així ho indiqui la solució de bloqueig així com la solució d'anticòs es prepara amb BSA en lloc de amb llet.

En la taula 6 es recullen els anticossos emprats en aquest treball i la concentració a que s'han utilitzat.

10. IMMUNOPRECIPITACIÓ:

Aquesta tècnica consisteix en la purificació de proteïnes concretes presents en una mostra mitjançant l'ús d'anticossos dirigits contra aquestes. L'anticòs reconeix específicament la proteïna i, posteriorment, la incubació de la mostra amb una resina de proteïna A o G permet la separació del complex anticòs-proteïna de la resta de l'extracte. Les proteïnes A i G són d'origen bacterià i tenen una gran afinitat pels anticossos (proteïna A pels anticossos policlonals i G pels

Antigen	Font	Tipus	Dilució
HA (12CA5)	Roche	Monoclonal	1µg/ml
HA	Sigma	Policlonal	1:1000
PSTAIR	Upstate	Policlonal	1:2000
Myc (9E10)	Upstate	Monoclonal	1:1000
GST	Upstate	Policlonal	1:1000
Cdc25	Dr. Sergio Moreno	Policlonal	1:1000
Rad24	Dr. Helen Piwnica-Worms	Policlonal	1:10000
Fosfo-p38	Cell Signaling	Policlonal	1:1000
Hog1 (γ-215)	Santa Cruz	Policlonal	1:1000
Flag (M2)	Sigma	Monoclonal	1:2000
Actina	Immuno (MP Biomedicals)	Monoclonal	1:2000

Taula 6. Anticossos utilitzats en aquesta tesi

monoclonals). El procediment que es segueix és el següent:

- Preparar de 500 fins a 1000 µg d'extracte en un volum final de 300 µl de tampó de lisi amb inhibidors*. Afegir el volum d'anticòs aconsellat per la casa comercial (generalment es fan servir dilucions 1:100-1:300).
- Incubar la reacció durant tota la nit en agitació suau a 4°C.
- L'endemà, afegir a la mostra 30 µl de la resina de proteïna A o G. Prèviament, aquesta resina haurà estat equilibrada mitjançant 3 rentats amb 1 ml del mateix tampó de lisi. Incubar durant 1 h a 4°C.
- Centrifugar 1 min a 8000 rpm i recollir el sobrenedant com la fracció no unida.
- Realitzar 3 cicles de rentat de la resina amb 1 ml de tampó de lisi.
- Resuspendre la resina amb 30 µl de tampó de mostra 2x i correr en un gel SDS-PAGE, juntament amb la fracció no unida.
- Per últim, la transferència a una membrana i la immunodetecció de proteïnes concretes permetrà determinar interaccions de la nostra proteïna d'interès amb d'altres també presents en la mostra inicial i que han co-immunoprecipitat amb aquesta.

*El tampó de lisi emprat, així com els inhibidors de proteases són els mateixos que ja s'han esmentat per a l'obtenció d'extractes totals de *S. pombe*.

11. ASSAJOS D'ACTIVITAT QUINASA IN VITRO:

Els assajos quinasa permeten per una banda determinar si una proteïna és substrat d'una quinasa d'activitat coneguda i per altra banda analitzar l'activitat d'una quinasa donades unes condicions concretes.

En aquest treball s'han realitzat assajos quinasa emprant proteïnes purificades, així com assajos quinasa en què la quinasa havia estat immunoprecipitada a partir d'un extracte total de *S. pombe*. En aquest darrer cas, el substrat era també una proteïna purificada.

En termes generals, en un assaig quinasa es mesura la incorporació de P^{32} radiactiu (en forma d'ATP) en un substrat a través d'una reacció catalitzada per una quinasa.

La reacció es prepara de la següent manera:

Substrat.....	2 µg
Quinasa.....	1 µg
Tampó quinasa 10x*.....	3 µl
ATP 2,5mM.....	3 µl
$[\gamma^{32}\text{-P}]$ ATP**.....	0,2 µl
Aigua.....	qsp 30 µl

*Tampó quinasa 10x: 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM MgCl₂, 5 mM β-mercaptoetanol.

** $[\gamma^{32}\text{-P}]$ ATP d'Amersham (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)

Aquestes quantitats poden variar, essent únicament orientatives. Per exemple, la quantitat d'ATP es pot augmentar si es vol que el senyal sigui més específic (quan s'obtenen bandes inespecífiques) o, per contra, es pot disminuir si el senyal obtingut és molt baix. La quantitat d'ATP radiactiu que s'ha indicat correspon a un ATP que no ha decaigut encara. Així, cada quinze dies (semivida del P^{32}) des que el l'ATP ha començat a decaure s'ha de afegir el doble del volum inicial.

Tots els components es poden barrejar de forma normal, excepte l'ATP radiactiu que s'ha d'incorporar en una cambra habilitada per a treballar amb isòtops radiactius. A partir d'aquest punt tot el procés s'ha de dur a terme en aquesta cambra, darrera d'una mànec de metacrilat.

La reacció s'incuba durant 30 min a 30°C i, transcorregut aquest temps, la reacció s'atura afegint 10 µl de tampó de mostra 4x. A continuació les mostres es corren en un gel de poliacrilamida i aquest es tenyeix amb Coomassie Blue. Per tal de detectar el senyal de fosforilació, el gel s'asseca sobre un paper *whatman*

i s'exposa en una placa que l'amplificarà. L'autoradiografia es visualitzarà mitjançant un *phospho-imager* (BioRad).

En el cas dels assajos quinasa en que el que es vol determinar és l'activitat quinasa d'una proteïna present en una mostra de *S. pombe*, aquesta s'immunoprecipitarà segons el protocol descrit en l'apartat anterior i la resina resultant s'incubarà amb la resta de components de la reacció, que conservaran les mateixes proporcions que en el cas anterior però sense considerar el volum de la resina.

En els assajos de fosforilació de pèptids, la reacció es va preparar de la següent manera:

Substrat.....200 µM
 Quinasa.....1 µg
 Tampó quinasa 10x*2 µl
 ATP 2,5mM.....2 µl
 [γ^{32} -P] ATP**.....0,2 µl
 Aigua.....qsp 20 µl

*Tampó quinasa 10x: 200 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM MgCl₂, 50 mM DTT .

**[γ^{32} -P] ATP d'Amersham (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)

Els pèptids fosforilats es van separar per cromatografia de capa fina, emprant com a fase sòlida plaques

de cel·lulosa (*Merck*) i com a fase líquida una barreja de *n*-butanol: piridina: àcid acètic: aigua en una proporció 3:2:1:4.

12. IMMUNOCITOQUÍMIQUES:

Aquesta tècnica permet analitzar la localització subcel·lular d'un proteïna mitjançant l'ús d'anticossos dirigits contra aquesta. Aquests anticossos són alhora reconeguts per un anticòs secundari que porta conjugat un fluorocrom que pot ser visualitzat amb un microscopi de fluorescència.

Per tal que les proteïnes conservin la seva localització, les cèl·lules s'han de fixar amb metanol abans de començar el procés de marcatge. El protocol que s'utilitza és el següent:

- Centrifugar 1 ml de cultiu a 8000 rpm durant 1min. Descartar el sobrenedant i resuspendre en 0,5 ml de metanol a -20°C. D'aquesta forma les cèl·lules es poden conservar durant mesos a -20°C.
- Centrifugar les cèl·lules durant 1 min a 8000 rpm. Descartar el metanol i resuspendre en aigua autoclavada. Deixar que les cèl·lules s'hidratin durant 10 min.

- Realitzar dos cicles de rentat amb 1 ml de tampó PEM. Centrifugar 1 min a 8000 rpm i descartar el sobrenedant.
- Incubar les cèl·lules amb 500 µl de tampó PEMS amb 2 mg/ml de zimoliasa 20T (de Seicagaku) per tal de digerir la paret. Incubar 10 min a 37°C.
- Fer tres rentats amb 1 ml de tampó PEMS. Centrifugar 1 min a 8000 rpm i descartar el sobrenedant.
- Incubar les cèl·lules amb 1 ml de tampó PEMS a l'1% de tritó X-100 per permeabilitzar-les. Incubar 30 s a temperatura ambient.
- Realitzar tres rentats amb tampó PEM. Centrifugar 1 min a 8000 rpm i descartar el sobrenedant.
- Resuspendre les cèl·lules en 1 ml de tampó PEMBAL i incubar en agitació suau 30 min a temperatura ambient. Centrifugar 1 min a 8000 rpm i descartar el sobrenedant.
- Resuspendre de nou les cèl·lules en 200 µl de tampó PEMBAL on s'ha diluït l'anticòs primari (la dilució dependrà de l'anticòs, però oscil·larà entre 1:100 i 1:300). Incubar en agitació durant 16 h a temperatura ambient.
- Fer tres rentats amb tampó PEMBAL. Centrifugar 1 min a 8000 rpm i descartar el sobrenedant.
- Resuspendre les cèl·lules en 200 µl de tampó PEMBAL on s'ha diluït l'anticòs secundari (a una concentració 1:200). Incubar durant 6 h a temperatura ambient. A partir d'aquest punt les mostres s'han de protegir de la llum mitjançant paper d'alumini.
- Fer dos rentats amb PEMBAL. Centrifugar 1 min a 8000 rpm i descartar el sobrenedant.
- Resuspendre en 100 µl de solució DAPI i incubar 1 min a temperatura ambient per tal de tenyir el DNA. Centrifugar 1 min a 8000 rpm i descartar el sobrenedant.
- Rentar amb 1 ml d'aigua autoclavada.
- Resuspendre aproximadament en 30 µl d'aigua autoclavada i de la suspensió resultant estendre 5 µl en un portaobjectes. Un cop evaporada l'aigua, muntar la preparació amb una gota de *mowiol*.

- Deixar assecar abans d'observar al microscopi.

PEM: 100 mM PIPES, 1 mM EGTA, 1 mM Mg₂SO₄ pH 6,9

PEMS: PEM suplementat amb 1,2 M sorbitol

PEMBAL: PEM suplementat amb 100 mM hidroclorur de lisina, 0,1% NaN₃ i 1% BSA.

DAPI: Dilució 1:1000 d'una solució estoc d'1mg/ml de DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrat) en aigua autoclavada.

Mowiol:

- Barrejar 2,4 g de *mowiol* (Calbiochem ref.475904) amb 6 g de glicerol i agitar durant 1h.
- Afegir 6 ml d'aigua mQ i agitar 2 h més.
- Afegir 12 ml de Tris-HCl 0,2 M pH 8,5 i agitar 30 min més.
- Escalfar durant 10 min a 50°C.
- Centrifugar 15 min a 6500 rpm i aliquotar el sobrenedant.

Els anticossos que es van emprar són els següents:

Antigen	Font	Tipus	Dilució
HA	Sigma	Policlonal	1:500
Myc (9E10)	Upstate	Monoclonal	1:500
Actina	Immuno	Monoclonal	1:300
Anti-mouse 594	Alexa	Policlonal	1:200
Anti-rabbit 488	Alexa	Policlonal	1:200

Taula 7. Anticossos emprats en les immunocitoquímiques

13. CITOMETRIA DE FLUXE:

Aquesta tècnica permet determinar el contingut de DNA de les cèl·lules d'una mostra, mitjançant el marcatge amb iodur de propidi.

El procediment que s'ha de seguir s'explica a continuació:

- Centrifugar 1 ml de cultiu en fase exponencial del creixement 1 min a 8000 rpm. Descartar el sobrenedant i resuspendre en 1 ml d'aigua autoclavada.
- Centrifugar de nou i resuspendre les cèl·lules en 1 ml d'etanol al 70%. D'aquesta manera, les cèl·lules queden fixades i es poden conservar a 4°C durant períodes llargs de temps.
- Centrifugar 300 µl d'aquestes cèl·lules fixades 1 min a 8000 rpm i resuspendre en 1 ml de citrat sòdic 50 mM.
- Centrifugar les cèl·lules i resuspendre en 500 µl de citrat sòdic 50 mM suplementat amb RNAasa A a una concentració final de 0,1 mg/ml.
- Incubar durant 2 h a 37°C.
- Centrifugar durant 1 min a 8000 rpm i descartar el sobrenedant.

- Fer un rentat amb 1 ml de citrat sòdic 50 mM i a continuació resuspendre en 500 µl de citrat sòdic 50 mM amb iodur de propidi a una concentració de 4 mg/ml.
- Incubar la mostra durant 1 min en un bany d'ultrasons per tal de desfer possibles agregats cel·lulars.
- Per tal de processar les mostres, es va fer servir un equip Becton-Dickinson FACScan i el contingut de DNA va ser analitzat a través del canal FL2.

1. La sobreexpressió de la *Srk1* inhibeix l'entrada a mitosi:

Amb la finalitat de determinar un possible paper de la *Srk1* en la progressió del cycle cel·lular, es va analitzar l'efecte de la sobreexpressió de la *Srk1* en el fenotip de cèl·lules *wt*. Per aquest fi, el gen *srk1* sota el control del promotor *nmt1* es va induir en absència de tiamina en el medi. Com mostra la figura 1A, la sobreexpressió de la *Srk1* impedeix que les cèl·lules proliferin. En observar al microscopi el fenotip d'aquestes cèl·lules es va fer palès un bloqueig en el cycle cel·lular, tipificat per una elongació d'aquestes cèl·lules (donat que no poden progressar a mitosi però poden continuar creixent). Posteriorment, la tinció dels nuclis i l'anàlisi del contingut de DNA per citometria de flux va permetre determinar que aquestes cèl·lules es trobaven bloquejades a la transició G2/M, donat que el genoma ja s'havia duplicat (contingut 2n) i només presentaven un nucli.

Per tal de descartar que aquest efecte fos un artefacte degut a la sobreexpressió, els mateixos experiments es van dur a terme emprant un al·lel inactiu del gen

srk1, en que la lisina 153 del centre catalític havia estat mutada a alanina (*srk1KA*). Com s'observa en la figura 1, la sobreexpressió d'aquest al·lel a uns nivells similars als de la *Srk1 wt* no va ser capaç de produir el mateix bloqueig que aquesta.

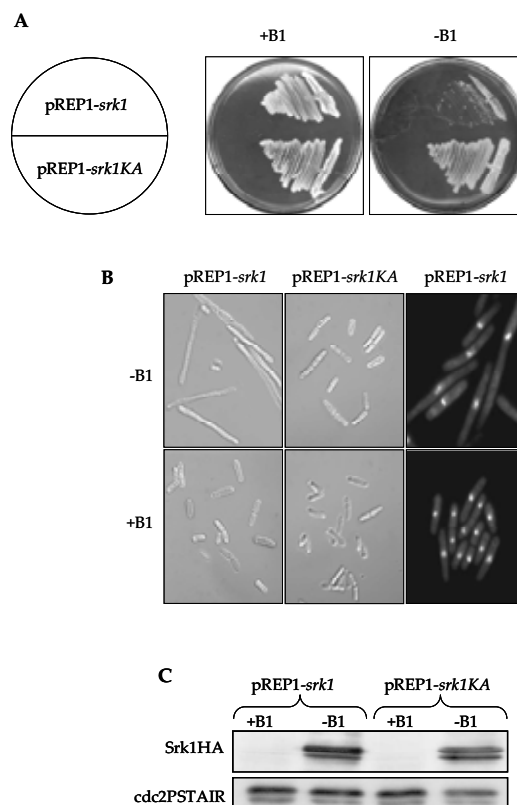


Fig. 1. (A i B) Cèl·lules *wt* que expressaven el plàsmid pREP1-*srk1* o bé el plàsmid pREP1-*srk1K153A* es van fer créixer en presència o absència de tiamina per induir l'expressió del gen en medi sòlid (A) o líquid (B). En (B), aquestes mateixes cèl·lules van ser fixades i tenyides amb DAPI. (C) *Western blot* dels extractes de les cèl·lules de (B) contra HA (per detectar *Srk1*) i contra la Cdc2 com a control de càrrega.

2. El bloqueig en el cicle per la sobreexpressió de la *Srk1* té lloc a través de la *Cdc25*:

Com ja s'ha comentat en la introducció, la transició G2/M és un procés altament regulat a través del complex *Cdc2-Cdc13*. Aquest pot rebre fosforilacions tant activadores com inhibidores. Dues quinases, la *Wee1* i la *Mik1* son responsables de la fosforilació inhibidora de la *Tyr15*, mentre que la fosfatasa *Cdc25* és l'encarregada de defosforilar aquest residu per tal que el complex sigui actiu. El fet que la sobreexpressió de la *Srk1* bloquegés el cicle cel·lular en la transició G2/M, suggeria que estava exercint la seva funció a través del complex *Cdc2-Cdc13*, ja fos de forma directa o indirecta. Per aquest motiu es va examinar l'efecte de la sobreexpressió de la *Srk1* en el mutant *cdc2-3w*. Aquest mutant presenta la peculiaritat de ser insensible a l'activitat de la *Cdc25* (essent possible la delecció del gen *cdc25*), malgrat que sí pot patir un bloqueig degut a la sobreexpressió de la *Mik1* o la *Wee1*. Com es mostra a la figura 2B, en aquestes cèl·lules la sobreexpressió de la *Srk1* no va produir el mateix efecte en el cicle cel·lular, indicant que la *Srk1*

exercia la seva funció a través de la *Cdc25*. Confirmant aquestes dades, la sobreexpressió de la *Srk1* en el mutant *Δcdc25 cdc2-3w* tampoc donava lloc al fenotip de bloqueig que s'observava en la soca *wt*. En canvi, la delecció dels gens *mik1* o *wee1* no era capaç d'abrogar l'efecte de la sobreexpressió de la *Srk1*. Un paper directe de la *Srk1* sobre la *Cdc2* és poc probable, donat que tot i que el mutant *cdc2-3w* és insensible a la *Cdc25*, encara pot ser inactivat per les fosforilacions inhibidores de la *Mik1* i la *Wee1* i, per tant, caldria esperar que una fosforilació inhibidora de la *Srk1* tingués el mateix efecte.

La defosforilació del residu *Tyr15* pot ser també duta a terme per la fosfatasa *Pyp3*. Per tal de confirmar que la *Srk1* actuava afavorint l'estat fosforilat de la *Cdc2*, es va analitzar l'efecte de la sobreexpressió conjunta d'aquesta amb la de la *Pyp3*. En concordança amb les dades inicials, la sobreexpressió de la *Pyp3* va conduir al restabliment del fenotip normal de les cèl·lules (figura 2D). En conjunt, aquestes dades ens indiquen que el bloqueig en el cicle cel·lular per la sobreexpressió de la *Srk1* és

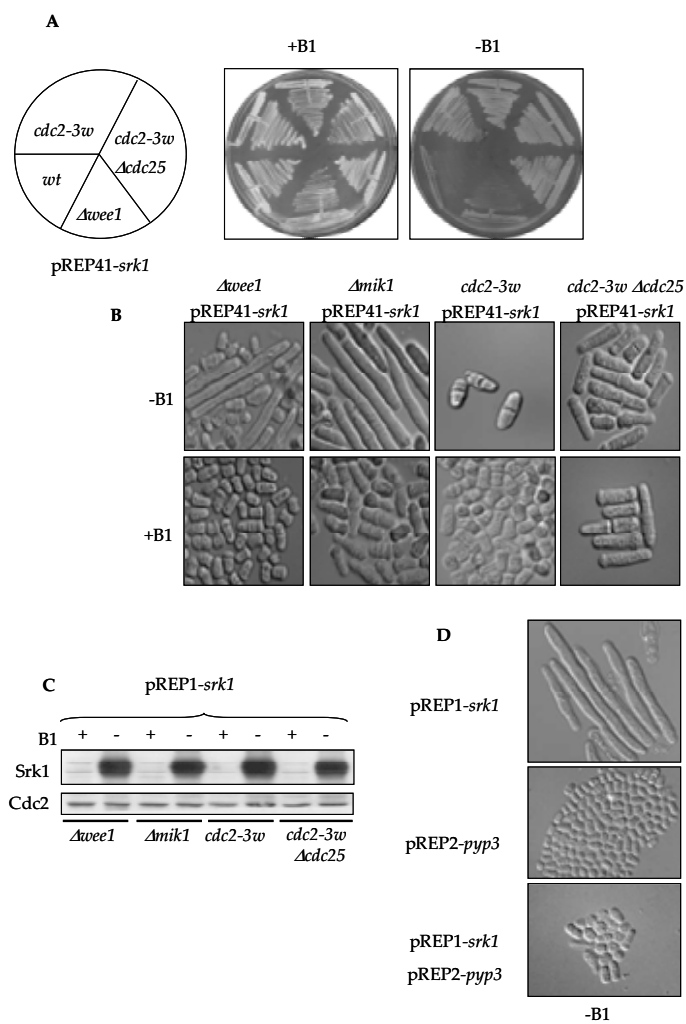


Fig. 2. (A) Cèl·lules *wt*, $\Delta wee1$, *cdc2-3w* i *cdc3-w* $\Delta cdc25$ transformades amb el plàsmid pREP41-*srk1* es van fer créixer en plaques en presència i en absència de B1.

(B) Cèl·lules $\Delta wee1$, $\Delta mik1$, *cdc2-3w* i *cdc3-w* $\Delta cdc25$ transformades amb el plàsmid pREP41-*srk1* van ser cultivades en medi mínim líquid suplementat o no amb B1. Les cèl·lules van ser fixades amb metanol i analitzades microscòpicament.

(C) Western blot dels extractes de les cèl·lules de l'apartat B emprant anticossos anti-HA i anti-Cdc2 per determinar els nivells de sobreexpressió i com a control de càrrega respectivament.

(D) Cèl·lules *wt* transformades amb el plàsmid pREP1-*srk1*, el plàsmid pREP2-*pyp3* o amb tots dos es van fer créixer en medi mínim líquid en presència o absència de B1 durant 24h.

principalment degut a la inactivació de la Cdc25.

3. La Srk1 interacciona amb la Cdc25 i la fosforila en el seu domini regulador N-terminal

Donats els resultats anteriors vam voler comprovar si la Srk1 i la Cdc25 interaccionaven *in vivo*. Amb aquest propòsit, la quinasa inactiva (Srk1K153A) es va sobreexpressar des d'un plàsmid pREP1 en absència de B1 en una soca on s'havia fusionat un epítot *12myc* al

gen *cdc25*. La Srk1KA-HA va ser immunoprecipitada de l'extracte cel·lular i es va analitzar la presència de la Cdc25 en els precipitats mitjançant *western blot*. Com es mostra a la figura 3A, la Cdc25 va co-immunoprecipitar conjuntament amb la Srk1KA, indicant que ambdues proteïnes interaccionaven *in vivo* (fig. 3A). Un cop demostrada aquesta interacció ens vam plantejar si la Cdc25 podia ser un substrat de Srk1. Per tal de provar aquesta

hipòtesi, la *Srk1* i la *Srk1K153A* es van expressar en bacteri com a proteïnes de fusió a GST. De la mateixa manera, la *Cdc25* també va ser purificada, així com quatre fragments del seu domini regulador N-terminal (fig. 3B). Aquestes proteïnes van ser utilitzades en un assaig quinasa *in vitro* en presència de la *Srk1* o de la *Srk1KA*, per tal de determinar si podien ser fosforilades per la primera. En la figura 3 es

mostra que la *Srk1* és capaç de fosforilar la proteïna sencera, així com els fragments II, III i en menor grau el fragment IV (fig. 3C). Per contra, en els carrils corresponents a la *Srk1KA* no s'observa fosforilació (fig. 3C). A continuació, vist que la proteïna purificada de bacteri podia fosforilar la *Cdc25*, es va voler determinar si la quinasa immunoprecipitada a partir d'extractes de *S. pombe* tenia també

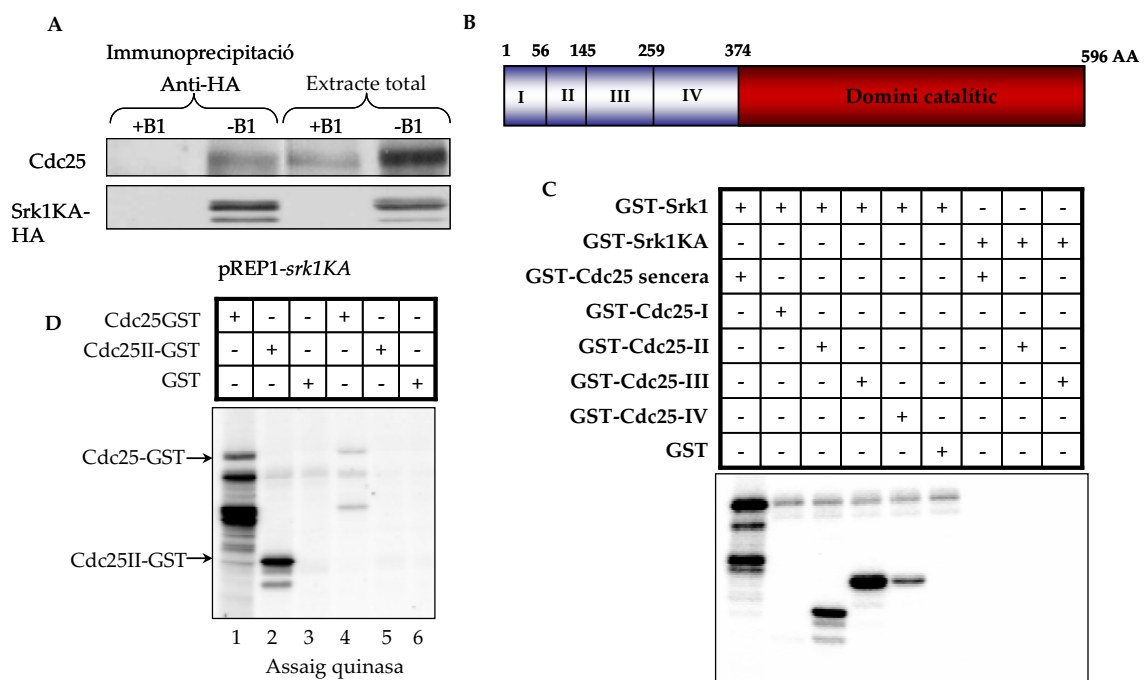


Fig. 3. (A) Cèl·lules *cdc25::12myc* transformades amb el plàsmid *pREP1-srk1KA* van ser cultivades en medi mínim en presència o no de B1. La *Srk1KA-HA* va ser immunoprecipitada dels extractes mitjançant i es va determinar la presència de la *Cdc25* en els precipitats mitjançant un *western blot* anti-myc.

(B) Esquema dels fragments de la *Cdc25* que es van expressar com a proteïnes de fusió a GST.

(C) La *Cdc25*, així com els diferents fragments del seu domini regulador van ser emprats com a substrat en un assaig quinasa amb la *Srk1* i la *Srk1KA*.

(D) La *Srk1* (carrils 1, 2 i 3) o la *Srk1KA* (4, 5 i 6) van ser sobreexpressades en cèl·lules *wt* i immunoprecipitades amb l'anticòs anti-HA. L'activitat dels precipitats es va provar emprant com a substrat la *Cdc25* sencera, el fragment II o la proteïna GST (com a control negatiu).

activitat sobre la Cdc25. Es va realitzar un assaig quinasa immunoprecipitant la *Srk1* o la seva paral·lela inactiva que havia estat sobreexpressada en cèl·lules *wt*. Aquests immunoprecipitats es van incubar amb la Cdc25-GST sencera i amb el fragment II en presència d'ATP radiactiu i se'n va determinar la fosforilació. Com s'observa en la figura 3D, només la quinasa activa va poder fosforilar els dos substrats. En els carrils on es va emprar la immunoprecipitació de la quinasa inactiva s'observa, però, un senyal molt dèbil (fig 3D, carril 4), que podria ser indicatiu de la presència d'una altra quinasa que hagués co-immunoprecipitat amb la primera i que pogués també fosforilar la Cdc25. No obstant, no es detecta cap senyal en el carril corresponent al fragment II (fig. 3D, carril 5), indicant que, si una altra quinasa pot fosforilar la Cdc25, aquesta ho fa en residus diferents als que són fosforilats per la *Srk1*.

4. La *Srk1* bloqueja l'entrada a mitosi a través de la fosforilació i inhibició de Cdc25

Les quinases dels *checkpoints* de dany al DNA i d'aturada en la replicació *Chk1* i *Cds1* pertanyen, a

l'igual que la *Srk1*, a la superfamília de quinases depenents de calmodulina (tot i que són independents d'aquesta). Aquestes quinases comparteixen una mateixa seqüència consens de fosforilació que consisteix en una serina o treonina precedida en la posició -2 per una arginina. Com ja es va explicar en la introducció, aquestes dues quinases fosforilen la Cdc25 en resposta a un bloqueig en la replicació o a dany en el DNA. D'aquesta manera, la inhibeixen i promouen una aturada en el cicle cel·lular per tal d'evitar que la cèl·lula es divideixi sense haver replicat correctament el DNA. En un treball de Zeng *et al.* es va crear un mutant de la Cdc25 on nou llocs de fosforilació per aquestes quinases havien estat mutats a alanina (*cdc25-9A*) (Zeng and Piwnicka-Worms, 1999). En conseqüència, aquesta soca no pot respondre eficientment al *checkpoint*. De forma interessant, aquests nou residus estan continguts en els tres fragments de la regió N-terminal de la Cdc25 que, com es mostrava en la figura 3, fosforila la *Srk1*. Tenint en compte que la *Srk1* pertany a la mateixa família de quinases que la *Chk1* i la *Cds1* i que, com aquestes, era capaç

de fosforilar la Cdc25, ens vam plantejar si la fosforilació per la *Srk1* tenia lloc en els mateixos residus de la Cdc25 que fosforilen la *Chk1* i la *Cds1*. Amb aquesta finalitat, el mutant de la Cdc25, Cdc25-9A es va expressar com a proteïna de fusió a GST i es va realitzar un assaig quinasa *in vitro* amb la *Srk1* (també purificada). Com es mostra en la figura 4A, la fosforilació observada en la Cdc25 *wt* es veu pràcticament anul·lada quan el que es fa servir com a substrat és el mutant Cdc25-9A. Recolzant aquest resultat, la sobreexpressió de la *Srk1* en una soca en que el gen *cdc25* havia estat substituït per l'al·lel amb les nou mutacions no patia l'elongació prèviament observada en la soca *wt* (figura 4B). Tot plegat, això ens indica que la inactivació de la Cdc25 per part de la *Srk1* té lloc a través de la fosforilació d'alguns, si no tots, els residus també fosforilats per les quinases del *checkpoint* *Chk1* i *Cds1*. En cèl·lules de mamífer, les quinases dels *checkpoints* *Chk1* i *Chk2* també poden fosforilar la Cdc25 en resposta a aturada en la replicació o a dany en el DNA. En el cas de la Cdc25C, la fosforilació es dona únicament en un residu, la Ser216. D'altra banda, la Cdc25C pot ser

també fosforilada per la Cdc2 en el residu Ser214, essent aquesta una fosforilació activadora (Bulavin *et al.*, 2003). De forma interessant aquestes fosforilacions són excloents, de manera que les quinases del *checkpoint* no poden inhibir la Cdc25 si aquesta ha estat prèviament activada per la Cdc2, i viceversa. Per tal de demostrar que la fosforilació de la Cdc25 per la *Srk1* es donava específicament en residus fosforilats per la *Chk1* i/o la *Chk2* es va fer servir una col·lecció de pèptids sintètics de la Cdc25C en un assaig quinasa amb la *Srk1* purificada. Aquests pèptids contenien els dos llocs de fosforilació abans citats, i s'havien dut a terme diverses modificacions. En alguns casos, un residu o l'altre havia estat mutat a alanina (residu no fosforilable) o bé a àcid aspàrtic (residu que mimetitza la fosforilació). En altres casos, aquests residus havien estat prèviament fosforilats. Com es mostra en la figura 4D, la *Srk1* va fosforilar únicament el pèptid que no havia estat modificat i el pèptid en que la Ser214 havia estat mutada a alanina, no podent fosforilar cap dels pèptids mutats a la Ser216 ni aquells en que la Ser214 havia estat

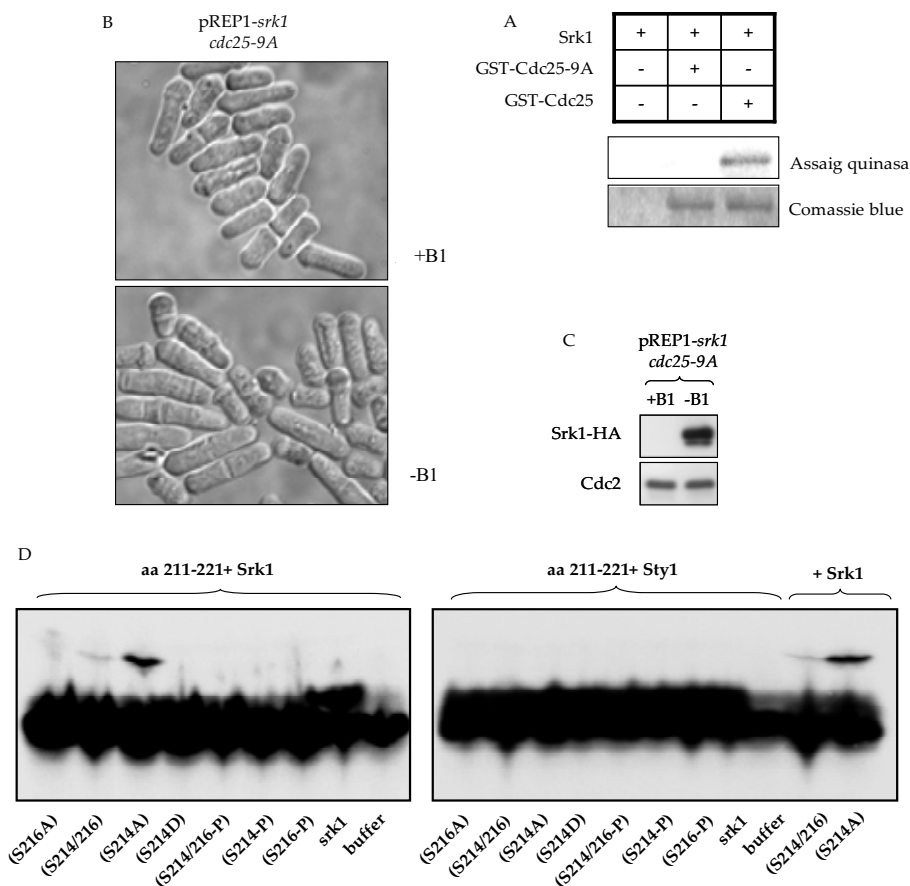


Fig. 4. (A) Assaig quinasa emprant la Cdc25-GST o la Cdc25-9A-GST com a substrat i la Srk1 purificada i digerida amb trombina com a quinasa. La tinció amb *Coomassie blue* indica que les quantitats de cadascun dels substrats eren equivalents.

(B) Cèl·lules *cdc25-9A* transformades amb el plàsmid pREP1-*srk1* es van fer créixer en medi mínim suplementat o no amb tiamina durant 24h i es van visualitzar al microscopi.

(C) *Western blot* dels extractes cel·lulars de (B) emprant anticossos anti-HA i anti-Cdc2 per a determinar els nivells de sobreexpressió i com a control de càrrega respectivament.

(D) Assaig quinasa emprant la Srk1-GST com a quinasa i diferents pèptids sintètics de la Cdc25C humana (aminoàcids 211 fins 221) com a substrat (esquerra):

- Carril 1: Ser216 mutada a alanina.
- Carril 2: Pèptid *wt*.
- Carril 3: Ser214 mutada a alanina.
- Carril 4: Ser214 mutada a àcid aspàrtic.
- Carril 5: Ser214 i Ser216 fosforilades.
- Carril 6: Ser214 fosforilada.
- Carril 7: Ser216 fosforilada.
- Carril 8: Srk1-GST sense cap pèptid.
- Carril 9: Tampó quinasa.

A la dreta de la figura es mostra el mateix assaig emprant la Sty1-GST en lloc de la Srk1-GST. Els carrils conserven el mateix ordre indicat a dalt i s'han afegit dos punts més corresponents als carrils 2 i 3 de l'assaig de l'esquerra.

prèviament fosforilada o mutada a Asp (residu pseudofosforilat). Com

a control, en el mateix assaig es va utilitzar com a quinasa la Sty1

purificada, per reforçar l'especificitat d'aquesta fosforilació. Com es comentarà a la discussió, la Sty1 no és capaç de fosforilar cap dels pèptids.

Així, aquestes dades indiquen que l'especificitat de substrat de la Srk1 és molt semblant a la de les quinases Chk1 i Cds1.

5. La Srk1 provoca una acumulació de la Cdc25 al citoplasma

A continuació vam voler examinar l'efecte de la sobreexpressió de la Srk1 en els nivells de la Cdc25 així com en la seva localització. En estudis anteriors ja s'havia demostrat que la fosforilació de la Cdc25 per les quinases del *checkpoint* produïa una deslocalització d'aquesta del nucli al citoplasma, essent aquest un procés mitjançat per la proteïna 14-3-3 Rad24. D'altra banda, la unió de la Cdc25 amb la Rad24 la protegeix de la degradació pel complex de l'APC, estabilitzant-la. Considerant aquests antecedents vam analitzar els nivells proteics de la Cdc25 en una soca que sobreexpressava la Srk1. En la figura 5A es mostra com la sobreexpressió de la Srk1 conduïa a una acumulació de la Cdc25. És important notar que, a part d'un important increment en

la quantitat de proteïna, la banda corresponent a la Cdc25 migra més lentament quan se sobreexpressa la Srk1, recolzant la fosforilació *in vivo* d'aquesta per part de la Srk1. Donat que un augment en els nivells de la Cdc25 semblarien estar afavorint la seva funció i això aniria en contra del bloqueig en el cicle observat en la sobreexpressió de la Srk1, vam decidir analitzar la localització de la Cdc25 en aquestes cèl·lules. Com s'observa en la figura 6, la sobreexpressió de la Srk1 provocava l'exclusió de la Cdc25 del nucli i la seva acumulació al citoplasma (fig.6, panell central anti-myc).

Per tal de comprovar si l'augment en els nivells de la Cdc25 observat en sobreexpressar la Srk1 era paral·lel al que s'observava en sobreexpressar la Chk1, també es van analitzar els nivells de proteïna en una soca en que s'havia induït l'expressió de la Chk1. En aquesta situació i com passava en sobreexpressar la Srk1, la Cdc25 també s'acumulava (figura 5B). Tot i que no es va determinar la localització de la proteïna, altres ja han mostrat que és citoplasmàtica (Lopez-Girona *et al.*, 1999). Per últim i per tal de descartar que aquesta acumulació fos un efecte derivat del

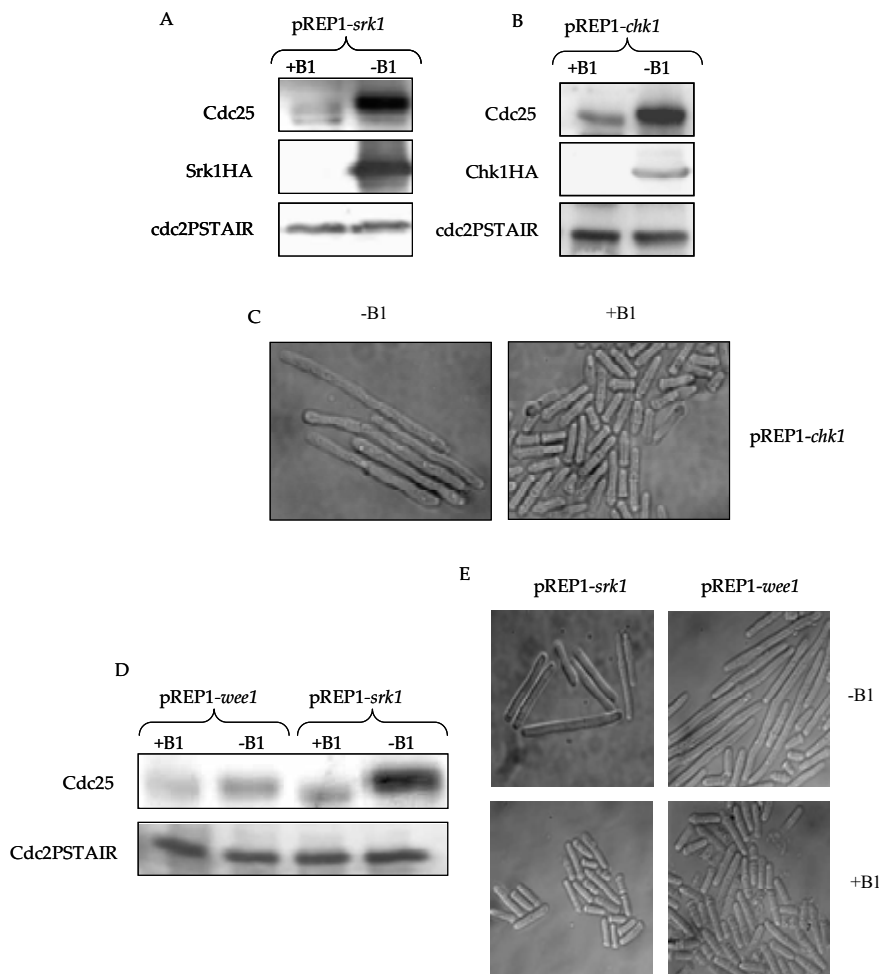


Fig. 5. (A) Cèl·lules *wt* transformades amb el plasmid pREP1-*srk1* van ser cultivades en medi mínim en presència o absència de B1. Els nivells de la Cdc25 van ser analitzats per *western blot* mitjançant l'anticòs anti-Cdc25. En la mateixa membrana es van realitzar *western blots* amb anticossos anti-HA i anti-Cdc2 com a control de la sobreexpressió i de càrrega, respectivament.

(B) Cèl·lules *wt* transformades amb el plasmid pREP1-*chk1* van ser cultivades en medi mínim suplementat o no amb B1. Es van analitzar els nivells de la Cdc25 per *western blot* mitjançant l'anticòs anti-Cdc25. També es van realitzar *western blots* amb anticossos anti-HA i anti-Cdc2 com a control de la sobreexpressió i de càrrega, respectivament.

(C) Les cèl·lules de B van ser fixades amb metanol i observades al microscopi.

(D) Cèl·lules *wt* transformades amb el plasmid pREP1-*wee1* o pREP1-*srk1* van ser cultivades en medi mínim en presència o absència de B1. Els nivells de la Cdc25 es van analitzar per *western blot* emprant l'anticòs anti-Cdc25. En la mateixa membrana es van realitzar *western blots* amb l'anticòs anti-Cdc2 com a control de càrrega.

(E) Les cèl·lules de (D) van ser fixades i analitzades microscòpicament. Donat que una menor sobreexpressió de la Wee1 provoca el mateix bloqueig que una sobreexpressió major de la Srk1, es va considerar el fenotip d'aquestes cèl·lules com a indicatiu del grau de bloqueig en el cicle cel·lular.

bloqueig en la fase G2 del cicle, els nivells de proteïna (figura 5D) així com la localització de la Cdc25

(figura 6) va ser analitzada en cèl·lules en que s'havia imposat un bloqueig en aquesta mateixa fase del

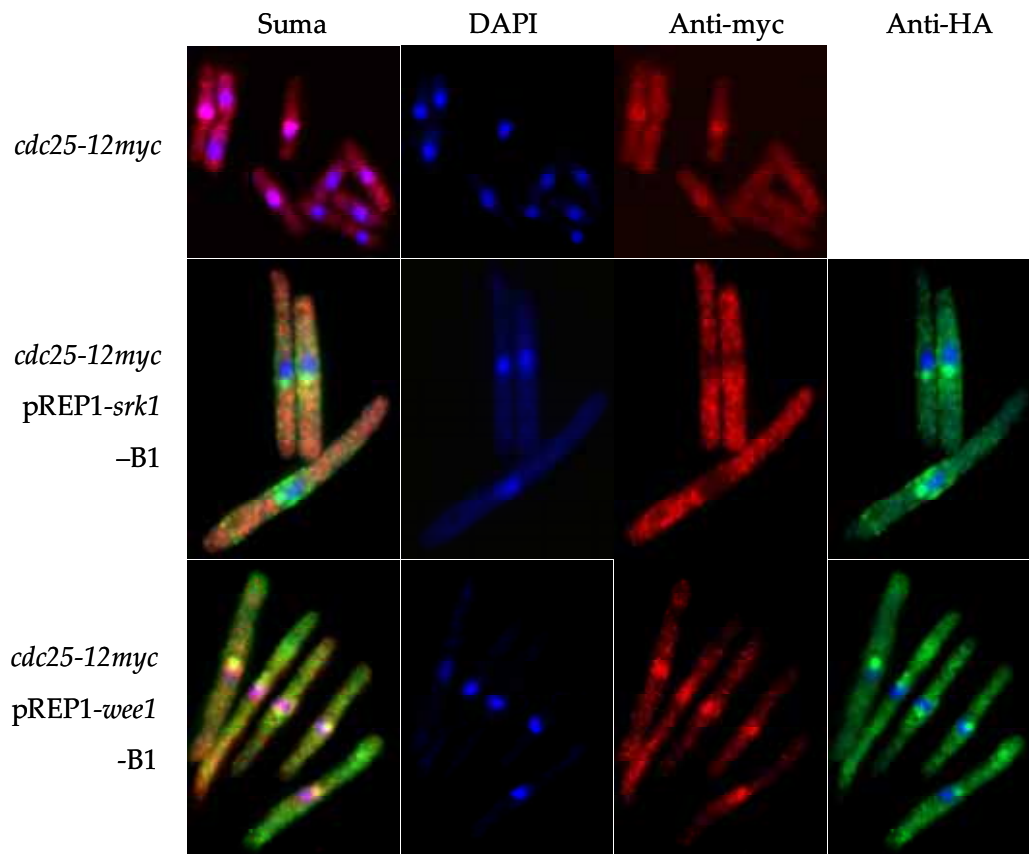


Fig. 6. Cèl·lules *cdc25::12myc* o aquestes mateixes cèl·lules transformades amb el plàsmid pREP1-*srk1* o el plàsmid pREP1-*wee1* i crescudes en absència de B1 van ser fixades amb metanol. La localització de la Cdc25 i de les proteïnes sobreexpressades va ser analitzada per immunocitoquímica mitjançant anticossos anti-myc i anti-HA, respectivament. Els nuclis d'aquestes cèl·lules van ser tenyits amb DAPI.

cicle mitjançant la sobreexpressió de la quinasa Wee1 (fig. 6 panell inferior anti-myc). En contrast amb els resultats obtinguts amb la *Srk1*, la sobreexpressió de la Wee1 no va aconseguir acumular la Cdc25 ni localitzar-la al citoplasma. Per tant, aquests resultats ens permeten concloure que l'activitat de la *Srk1* sobre la Cdc25 n'afecta l'estabilitat i la localització, podent ser un dels mecanismes que contribueixen a la

inhibició de la Cdc25 en allunyar-la del seu substrat, la Cdc2.

6. La inhibició de la Cdc25 per la *Srk1* és dependent de la proteïna 14-3-3 Rad24

Com ja es comentava a l'apartat anterior, la fosforilació de la Cdc25 per les quinases Chk1 i Cds1 crea un lloc d'unió per a la proteïna 14-3-3 Rad24. Aquesta unió, a més d'excloure la Cdc25 del nucli estabilitza la proteïna (al Khodairy

et al., 1994; Furnari *et al.*, 1997; Sanchez *et al.*, 1997; Lindsay *et al.*, 1998; Zeng *et al.*, 1998; Furnari *et al.*, 1999). Vist que la Srk1 era capaç de fosforilar com a mínim alguns dels residus que fosforilen aquestes quinases, ens vam plantejar que

també existís una dependència de la Rad24 en el bloqueig imposat per la sobreexpressió de la Srk1. Per aquest motiu, cèl·lules en que s'havia deleccionat el gen *rad24* van ser transformades amb el plàsmid pREP41-*srk1* o el mateix plàsmid

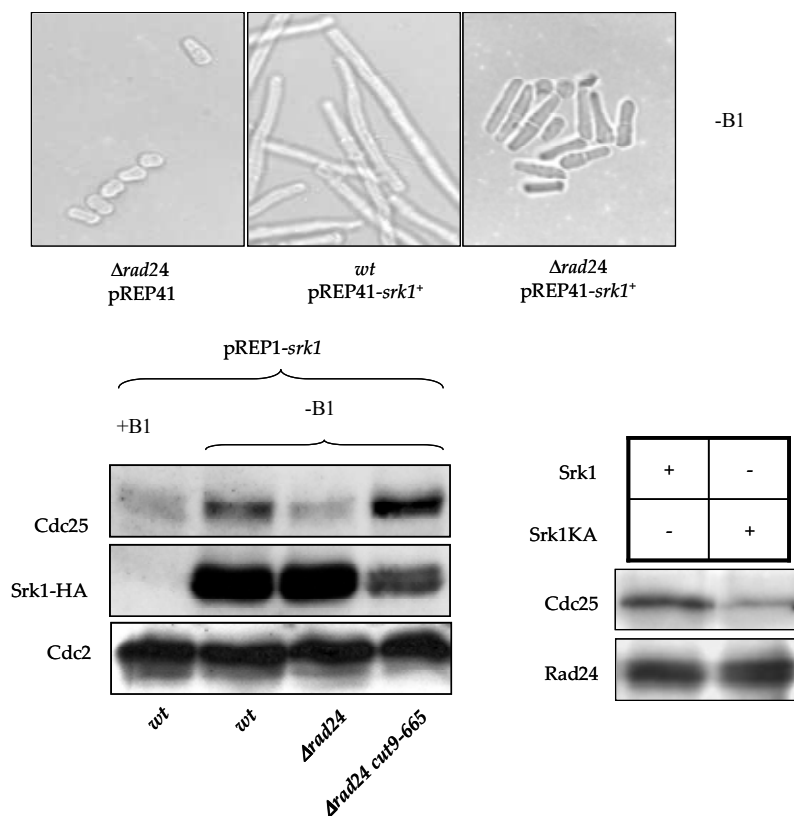


Fig. 7. (A) Cèl·lules $\Delta rad24$ transformades amb el plàsmid pREP41 buit (panell esquerre) o el plàsmid pREP41-*srk1* (panell dret) o cèl·lules *wt* transformades amb el plàsmid pREP41-*srk1* es van créixer en absència de B1 i van ser visualitzades al microscopi.

(B) Cèl·lules *wt*, $\Delta rad24$ i $\Delta rad24$ cut9-665 transformades amb el plàsmid pREP1-*srk1* es van cultivar en absència de B1 i en el cas de les cèl·lules *wt* també en presència de B1 com a control. Els nivells de la Cdc25 van ser analitzats en aquestes cèl·lules mitjançant *western blot* amb l'anticòs anti-Cdc25. Com a control de la sobreexpressió i de la càrrega es van dur a terme *wetern blots* anti-HA i anti-Cdc2.

(C) La Cdc25-GST es va incubar amb la Srk1-GST o la Srk1KA-GST en presència d'ATP a 30°C durant 30min. Passat aquest temps, es va afegir la Rad24-6His a la reacció durant 15 minuts més. La Rad24 va ser immunoprecipitada mitjançant l'anticòs anti-Rad24 i es va analitzar la presència de la Cdc25 en els precipitats mitjançant *western blot* anti-GST.

buit. En aquestes mateixes cèl·lules es van analitzar els nivells de la Cdc25 i es van comparar amb els de les cèl·lules *wt* (figura 7A i B). En aquests experiments es va veure que la delecció de *rad24* reverteix el bloqueig en el cicle cel·lular degut a la sobreexpressió de la Srk1 (fig. 7A). De forma consistent, quan es van analitzar els nivells de la Cdc25 en aquestes mateixes cèl·lules no es va observar l'acumulació de la Cdc25 pròpia de la sobreexpressió de la Srk1 (fig 7B). Aquest efecte podia ser restablert si conjuntament amb la delecció de *rad24* la sobreexpressió es duia a terme en una soca mutant pel component de l'APC Cut9 (*cut9-665*) (fig. 7B). Aquestes dades indicaven que la fosforilació de la Cdc25 per la Srk1 provocava la seva acumulació i la seva inhibició de forma depenent de la Rad24. Finalment, per tal de determinar que això fos degut a que la fosforilació estigués promovent la unió entre la Cdc25 i la Rad24 es va dur a terme un experiment *in vitro* que així ho confirmés. En aquest assaig es van incubar les proteïnes purificades Cdc25-GST i Srk1-GST o Srk1KA-GST en presència d'ATP i posteriorment es va afegir a la reacció la proteïna Rad24 purificada.

Seguidament, la Rad24 es va immunoprecipitar i es va analitzar la presència de la Cdc25 en els precipitats. Com s'observa en la figura 7C el pre-tractament de la Cdc25 amb la Srk1 activa afavoreix la unió de la primera amb la Rad24, no succeint el mateix amb la Srk1KA. En conjunt aquestes dades indiquen que la fosforilació de la Cdc25 per la Srk1 promou la unió de la primera a la proteïna 14-3-3 Rad24, que dóna lloc a la seva sortida del nucli al citoplasma i que la protegeix de la degradació pel proteasoma.

7. L'activitat de la Srk1 està regulada al llarg del cicle cel·lular:

Les cèl·lules deleccionades per *srk1*, malgrat no presentar un fenotip extrem, es divideixen amb una mida lleugerament inferior a la de les cèl·lules *wt* (10,5 +/-0,1µm del mutant enfront 14,0 +/-0,2µm del *wt*) (dades prèviament demostrades al nostre grup). Per aquest motiu, vam voler determinar si la Srk1 podia tenir un paper al llarg del cicle vegetatiu normal de la cèl·lula. Amb aquesta finalitat, un cultiu exponencial de cèl·lules on a continuació del gen endogen de la *srk1* s'havia integrat l'epítotop 6His-2

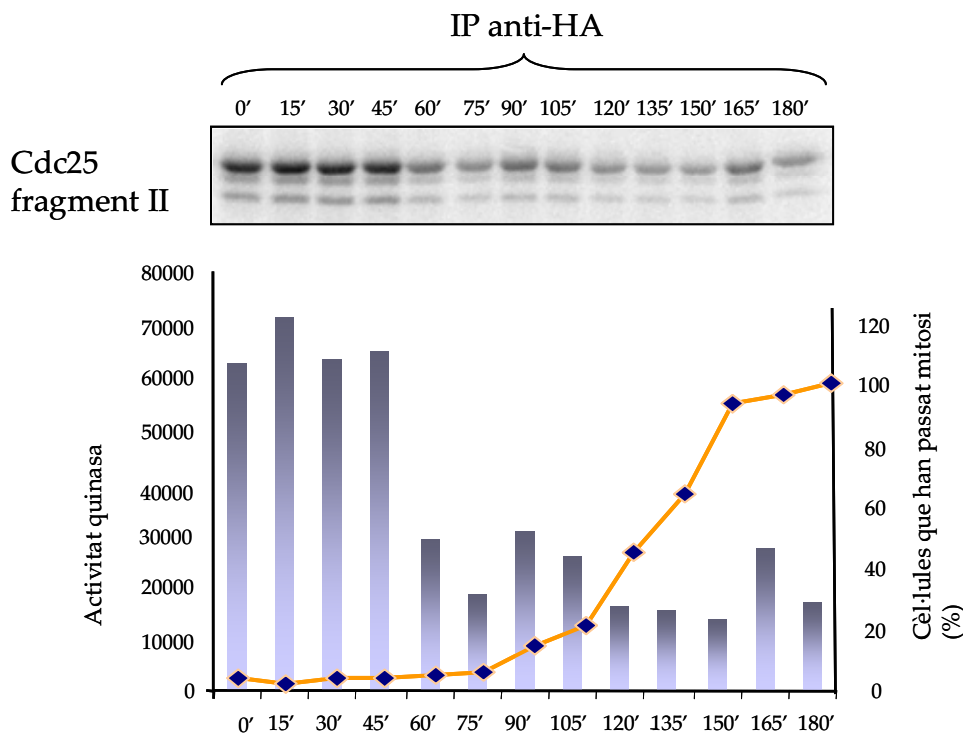


Fig. 8. Un cultiu exponencial de cèl·lules *srk1::HA* va ser sincronitzat al principi de la fase G2 per elutriació i es van agafar mostres sincròniques cada 15 min. La *Srk1*-HA es va immunoprecipitar de cadascun dels punts i es va emprar en un assaig quinasa amb el fragment II de la *Cdc25* com a substrat. En la gràfica es mostra la quantificació de l'activitat (barres) així com la representació de cèl·lules que havien passat la mitosi com a control de la sincronització (línia).

HA (*srk1::HA*) es va sincronitzar mitjançant el mètode de l'elutriació (que permet separar les cèl·lules en funció de la seva mida com s'explica a l'apartat de materials i mètodes). Les cèl·lules al principi de la fase G2 van ser recollides i es van deixar avançar en el cicle cel·lular. D'aquest cultiu es van prendre mostres cada 15 min i se'n va immunoprecipitar la *Srk1* endògena per tal de mesurar la seva activitat en un assaig quinasa *in vitro*. Com es mostra a la figura 8, l'activitat de la

Srk1 en aquests extractes és màxima en els primers punts de la sincronització (que corresponen a la fase G2 del cicle) i comença a disminuir a mida que les cèl·lules avancen en mitosi (figura 8). Prèviament ja havia estat demostrat que tot i que la fosforilació de la *Cdc25* per part de les quinases del *checkpoint* creava un lloc d'unió per la *Rad24* (Lopez-Girona *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1997; Zeng *et al.*, 1999), la unió d'aquesta a la *Cdc25* també es donava en

condicions normals, i no es veia modificada per l'activació del *checkpoint* (Chen *et al.*, 1999). Aquests dos fets en un principi contradictoris es poden explicar si considerem que durant la interfase la Cdc25 es pot trobar inhibida per altres quinases diferents a les del *checkpoint* i que aquestes són únicament responsables de la unió que es dona en resposta a dany al DNA o a bloqueig de la replicació. Vist que l'activitat de la Srk1 es trobava regulada al llarg del cicle,

una possibilitat seria que la Srk1 fos la quinasa responsable de la unió de la Cdc25 i la Rad24 en condicions normals. Per aquest motiu vam analitzar la unió que es donava entre ambdues proteïnes en una soca *wt* i una soca $\Delta srk1$. Com s'observa en la figura 9A (carrils 1 i 2), tot i que no s'elimina del tot, l'associació entre la Rad24 i la Cdc25 és menor en el mutant que en el *wt*, indicant que la Srk1 és, en part, responsable de la unió de Cdc25 i Rad24 en condicions normals.

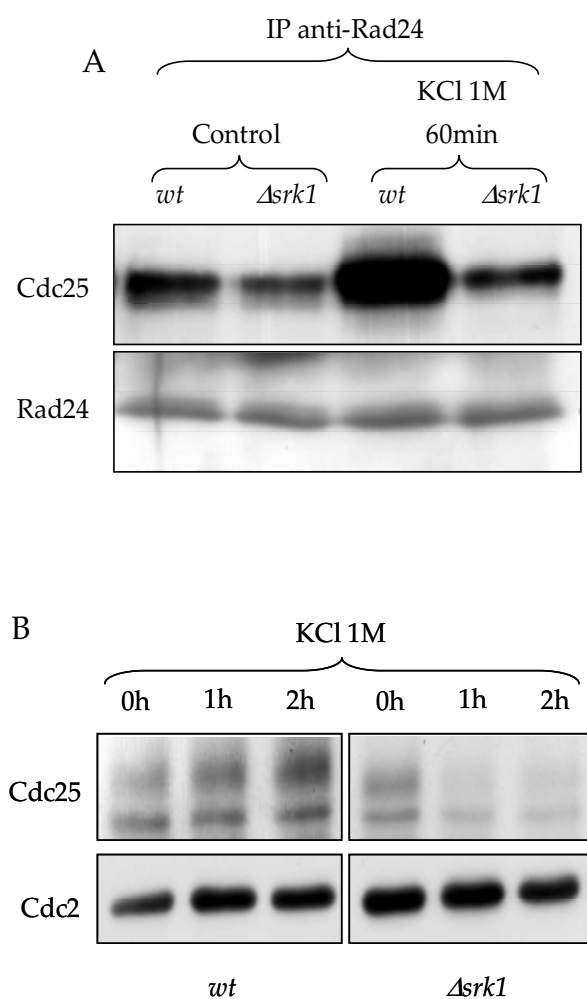


Fig. 9. (A) Cèl·lules *wt* (carrils 1 i 3) o $\Delta srk1$ (carrils 2 i 4) es van fer créixer en condicions normals (carrils 1 i 2) o es van tractar amb KCl 1M durant 60min (carrils 3 i 4). La proteïna Rad24 va ser immunoprecipitada dels extractes mitjançant l'anticòs anti-Rad24 i es va analitzar la presència de la Cdc25 en els precipitats per *western blot* amb l'anticòs anti-Cdc25. En el panell inferior es mostra el *western blot* anti-Rad24 com a control de la immunoprecipitació.

(B) Cultius exponencials de cèl·lules *wt* i $\Delta srk1$ van ser tractats amb estrès osmòtic (KCl 1M) i es van recollir mostres cada hora posterior al tractament. Els nivells de la Cdc25 en els extractes es van mesurar per *western blot* emprant l'anticòs anti-Cdc25. Com a control de càrrega es va realitzar un *western blot* anti-Cdc2.

8. La Srk1 és necessària per a que es doni la unió entre la Rad24 i la Cdc25 en resposta a estrès osmòtic:

En un treball previ ja s'havia mostrat que la Srk1 era fosforilada i s'acumulava al nucli en resposta a estrès de forma dependent de la Sty1 (Smith *et al.*, 2002). D'acord amb això, nosaltres vam veure que el tractament amb estrès osmòtic (KCl 1M) donava lloc a una activitat de la Srk1 molt superior a la basal. Aquest era un efecte directe de la fosforilació de la Srk1 per la Sty1, donat que en un assaig *in vitro* amb les proteïnes purificades es podia observar el mateix efecte (figura 10). De forma consistent amb els resultats previs, també vam poder determinar que l'associació entre la Rad24 i la Cdc25 augmentava de forma dramàtica en resposta a estrès osmòtic. Aquest era un efecte dependent de la Srk1, doncs no es donava en absència d'aquesta (figura 9A, carrils 3 i 4). Posteriorment, vam analitzar els nivells de la Cdc25 en cèl·lules tractades amb KCl 1M. En la soca *wt* vam observar que la proteïna augmentava en resposta a estrès osmòtic, mentre que en la soca $\Delta srk1$ no només no s'acumulava sinó que era gairebé indetectable al final de

l'experiment. Un augment en la taxa transcripcional de *cdc25* no ha estat descrita en resposta a estrès osmòtic (Chen *et al.*, 2003) de manera que aquest efecte es podria atribuir a un augment de l'estabilitat de la proteïna, probablement a través de la seva unió a la proteïna Rad24. Aquestes dades suggereixen que la Srk1 forma part d'un *checkpoint* diferent al de la integritat del DNA que modularia l'activitat de la Cdc25 a través de la seva unió a la proteïna Rad24 en resposta a estrès ambiental.

9. La Srk1 és ràpidament activada en resposta a estrès

Donat que ja havíem pogut comprovar que la Srk1 s'activava en

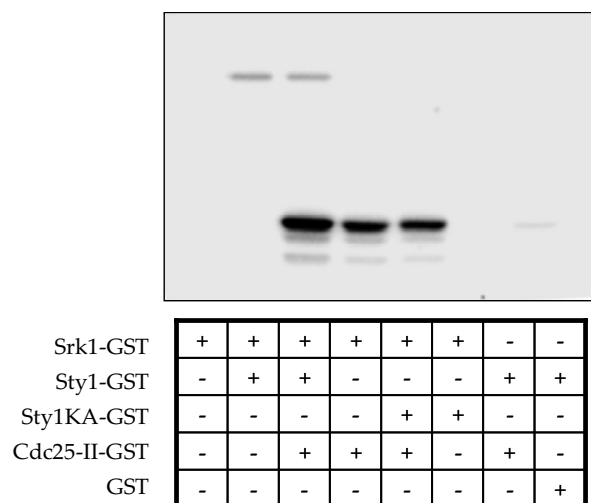


Fig. 10. La Srk1-GST purificada de bacteri es va incubar en presència de la Sty1 o de la quinasa inactiva (Sty1 KA) amb el fragment II de la Cdc25 en un assaig quinasa.

resposta a estrès, a continuació vam voler estudiar la cinètica que seguia aquesta activació. Amb aquesta finalitat, vam tractar un cultiu exponencial de cèl·lules *srk1::HA* amb estrès osmòtic (KCl 1M) i es van prendre mostres a diferents temps. La Srk1-HA es va immunoprecipitar i es va utilitzar en un assaig quinasa emprant el fragment II de la Cdc25 com a substrat. Com s'observa en la figura 11A, l'activació de la Srk1 és molt ràpida en resposta a estrès, i és mantinguda mentre segueix essent activa la MAPK Sty1 (figura 11B).

La MAPK és necessària per la resposta a un ampli rang d'estressos. Per aquest motiu, cèl·lules delectacionades pel gen *sty1* són sensibles a diferents insults ambientals. Fins el moment, pocs han estat els substrats descrits per la Sty1 i, de fet, els seus efectors poden respondre a diversos però no a tots els stressos aplicats a la cèl·lula als que respon la Sty1. En conseqüència, els mutants dels efectors de la Sty1 no presenten la mateixa sensibilitat a estrès que els mutants de la MAPK. Així, per exemple, una altra quinasa

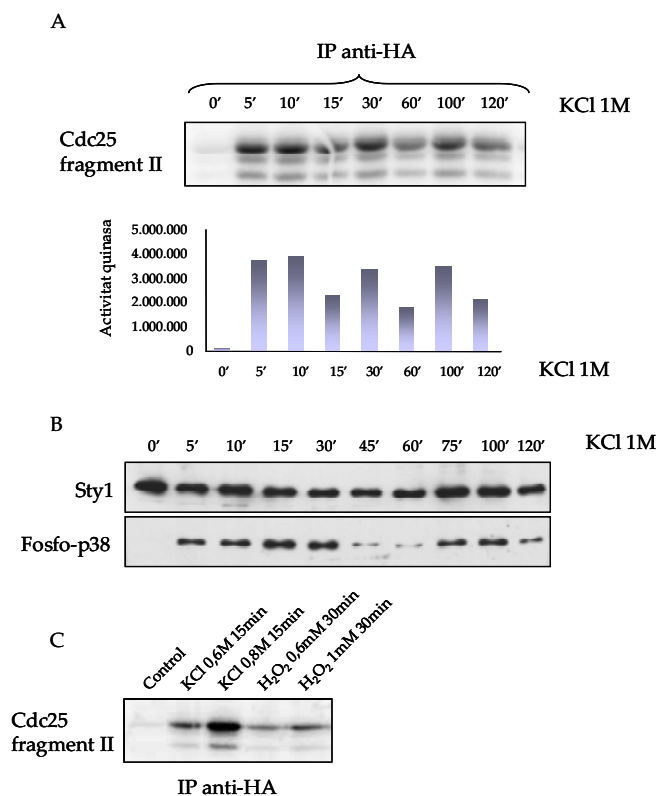


Fig. 11. (A) Cèl·lules *srk1::HA* van ser tractades amb KCl 1M i es van recollir mostres als temps indicats. La Srk1-HA va ser immunoprecipitada dels extractes cel·lulars i es va mesurar la seva activitat en un assaig quinasa emprant la Cdc25 com a substrat.

(B) Western blots de cèl·lules *sty1::HA* sotmeses al mateix tractament de l'experiment a (A) utilitzant els anticossos anti-HA (panell superior) i anti-fosfo-p38 (panell inferior), com a control de càrrega i per determinar l'activació de Sty1, respectivament. En aquest experiment s'inclouen també els punts 45min i 75min que no s'havien emprat en l'assaig quinasa.

(C) Cèl·lules *srk1::HA* van ser tractades amb KCl 0,6M o 0,8M i amb H₂O₂ 0,6mM o 1mM. La Srk1-HA va ser immunoprecipitada dels extractes cel·lulars i es va mesurar la seva activitat en un assaig quinasa emprant la Cdc25 com a substrat.

pertanyent a la família de les CaM-quinases, la *Cmk2*, respon únicament a estrès oxidatiu. El factor de transcripció *Atf1* és necessari per a la transcripció de molts dels gens de resposta a estrès de forma depenent de la *Sty1*, però no en tots els casos.

Tenint en compte que la inducció del gen *srk1* es donava enfront a diferents estressos, era lògic pensar que la seva activitat fos necessària per la resposta a més d'un tipus d'estrès. Per tal d'establir les implicacions de la *Srk1* en la resposta a estrès, es va dur a terme un assaig quinasa amb la *Srk1*-HA immunoprecipitada d'extractes de cèl·lules que havien estat sotmeses a estrès osmòtic (KCl) i a estrès oxidatiu (H₂O₂). En els dos casos es van fer servir dues dosis diferents d'estrès i es va mesurar l'activitat específica de la *Srk1*. Com mostra la figura 11C, la *Srk1* s'activa tant en resposta a estrès osmòtic com a estrès oxidatiu, i aquesta activació és dosi-dependent, doncs és major com més fort és l'estrès aplicat.

10. La *Sty1* fosforila la *Srk1* en el residu T463.

Un cop establert que la fosforilació de la *Srk1* per part de la *Sty1* era

activadora, vam voler determinar quin era el residu fosforilat per aquesta. Les MAPK comparteixen un consens de fosforilació que consisteix en una Ser o Thr seguida d'una Pro. Analitzant la seqüència proteica de la *Srk1* vam observar que existien quatre residus que s'ajustaven a aquest requeriment. Dels quatre, tres es trobaven a la regió catalítica de la proteïna mentre que només un es localitzava a la regió reguladora. En col·laboració amb el grup de la Dra. Elena Hidalgo es van generar dos construccions del gen *srk1* que donaven lloc a dos proteïnes de fusió a GST diferents: un primer fragment comprenia tota la regió N-terminal fins l'aminoàcid 420 i el segon fragment consistia en la regió entre el residu 403 i el final de la proteïna. Assajos quinasa duts a terme en el laboratori de la Dra. Hidalgo van permetre establir que únicament aquest segon fragment era fosforilat per la *Sty1*. Donat que en aquesta regió només es trobava el residu potencialment fosforilable per la *Sty1* 463 vam dur a terme la mutació puntual a Ala (residu no fosforilable). Es va generar la proteïna de fusió a GST i es va realitzar un assaig quinasa per tal de

determinar si aquesta mutació anul·lava la fosforilació de la *Srk1* per la *Sty1*. En la figura 12 s'observa que tot i no desaparèixer completament, la fosforilació de la *Srk1* per *Sty1* disminueix fortament en el mutant. La fosforilació residual resultant pot ser deguda a la fosforilació inespecífica d'altres Ser o Thr en absència del seu residu preferit. La fosforilació d'altres residus diferents a aquest en condicions normals és poc probable, doncs la MAPK no era capaç de fosforilar el fragment que contenia els altres tres residus que també acomplien el consens. D'altra banda, és poc probable que la *Sty1* fosforili residus que no s'ajustin a la seqüència S/T-P, de manera que amb les nostres dades, el residu T463 seria l'únic residu fosforilat per la *Sty1*.

Caldria, però, determinar l'efecte *in vivo* en la resposta a estrès d'aquesta mutació mitjançant la substitució del gen *wt* per el mutat en aquesta Thr. Seria també interessant analitzar la seqüència que envolta aquest residu per tal d'estudiar l'efecte que la fosforilació produeix sobre la proteïna. En mamífer, per exemple, la fosforilació de la MK2 per part de la p38 fa que exposi una seqüència d'exportació nuclear.

11. La *Cdc25* és exportada del nucli en resposta a estrès de forma dependent de la *Srk1*

Un cop observat que la interacció entre la *Rad24* i la *Cdc25* es veia fortament induïda en resposta a estrès (figura 9A), i que aquest era un efecte dependent de la presència de la *Srk1*, el següent pas va ser analitzar les implicacions d'aquesta

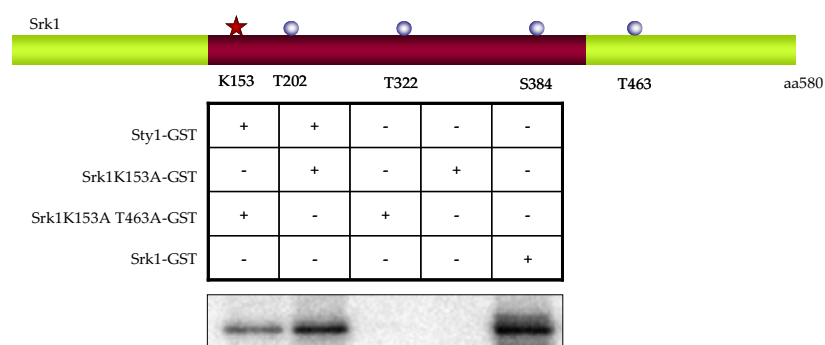


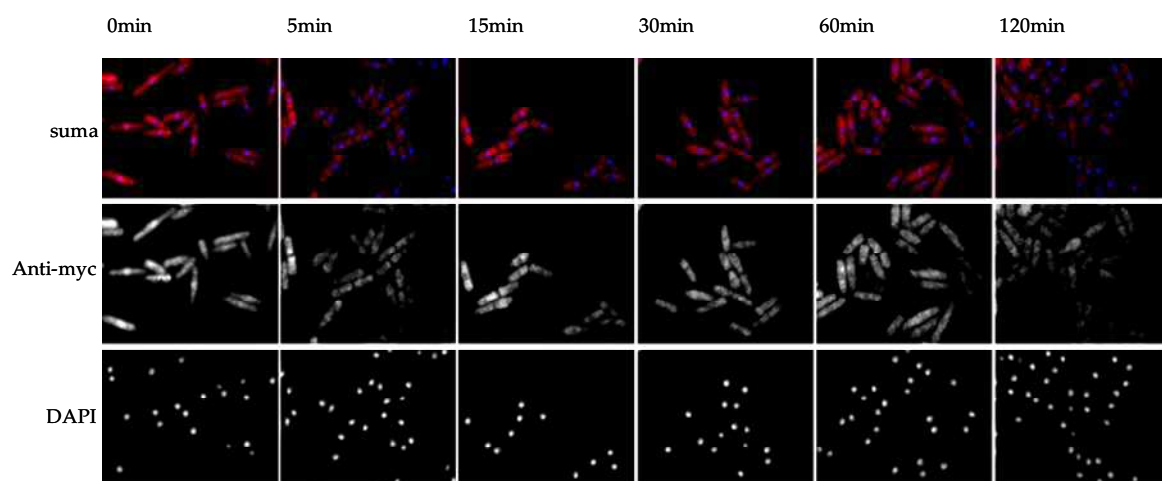
Fig. 12. Mitjançant mutació puntual es van generar els mutants *srk1K153A*, *srk1T463A* i el doble mutant *srk1K153A T463A* com a proteïnes de fusió a GST. Es va dur a terme un assaig quinasa amb la *Sty1* emprant aquests mutants com a substrat.

En la figura també es mostra l'estructura proteica de la *Srk1*. Els cercles blaus indiquen llocs putatius de fosforilació per *Sty1* i l'estrella vermella indica el centre catalític de l'enzim.

interacció en la resposta a estrès. En el cas dels *checkpoints* del DNA, la unió a la Rad24 implica la sortida del nucli de la Cdc25, per tant, nosaltres vam decidir estudiar la localització d'aquesta en resposta a estrès osmòtic (KCl 0,6M) i a estrès oxidatiu (H₂O₂ 1mM) i la rellevància de la Srk1 en el procés.

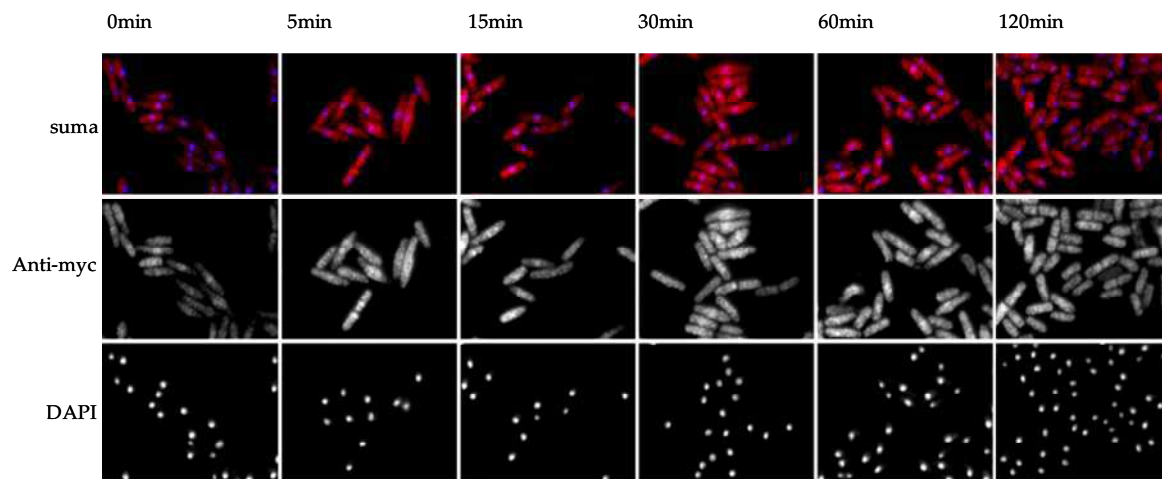
Com es mostra en les figures 13 i 15 (panells centrals) la Cdc25 és ràpidament exportada del nucli en resposta tant a estrès osmòtic com a estrès oxidatiu. Aquest és un efecte dependent de la Srk1 donat que en el mutant $\Delta srk1$ la Cdc25 es manté majoritàriament nuclear (figures 14 i 16, panells centrals). De forma interessant, en resposta a estrès oxidatiu, el mutant presenta tinció

nuclear per a la Cdc25 en els primers punts de l'experiment, però a partir del temps 30 min la Cdc25 comença a ser exclosa dels nuclis. En la discussió s'aportaran arguments que permetin explicar aquest fet. Com a control de que la delecció del gen *srk1* no estava afectant altres paràmetres en la resposta a estrès, es va analitzar en aquestes mateixes mostres la dinàmica de l'actina (fig. 17-20, panells centrals). En aquest cas, en les dues soques estudiades els moviments de l'actina són similars, estant concentrada als pols de creixement i als septes en condicions normals i redistribuint-se per tota la cèl·lula després del tractament (fig. 17-20, panells centrals).



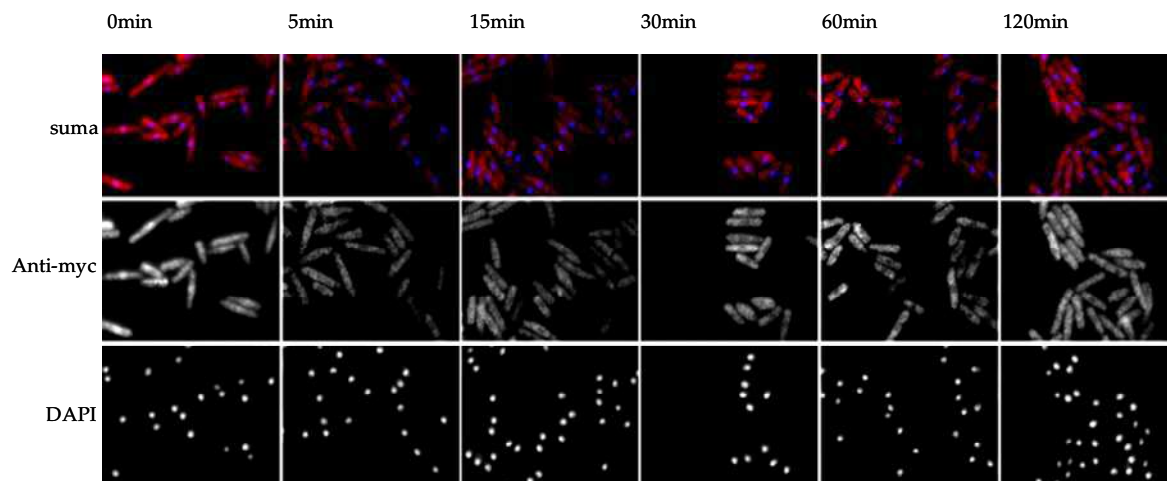
cdc25::12myc KCl 0,6M
ICC anti-myc

Fig. 13. Un cultiu exponencial de cèl·lules *cdc25::12myc* va ser tractat amb KCl 0,6M. Es van recollir mostres als temps indicats i les cèl·lules van ser fixades amb metanol. Es van realitzar immunocitoquímiques amb l'anticòs anti-myc (9E10) per determinar la localització de la Cdc25 (panell central) i es van tenyir els nuclis amb DAPI (panell inferior).



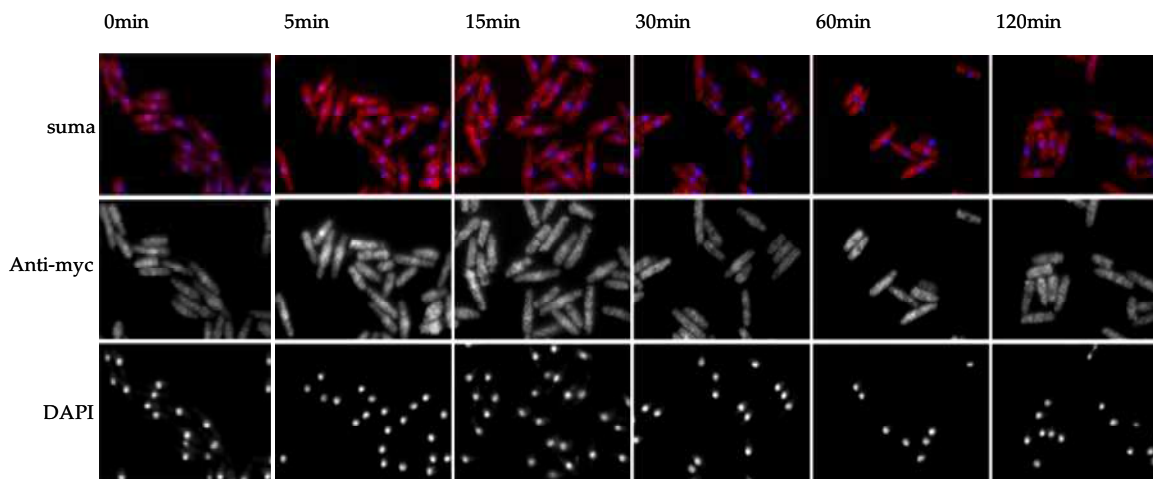
cdc25::12myc Δsrk1 KCl 0,6M
ICC anti-myc

Fig. 14. Un cultiu exponencial de cèl·lules *cdc25::12myc Δsrk1* va ser tractat amb KCl 0,6M. Es van recollir mostres als temps indicats i les cèl·lules van ser fixades amb metanol. Es van realitzar immunocitoquímiques amb l'anticòs anti-myc (9E10) per determinar la localització de la Cdc25 (panell central) i es van tenyir els nuclis amb DAPI (panell inferior).



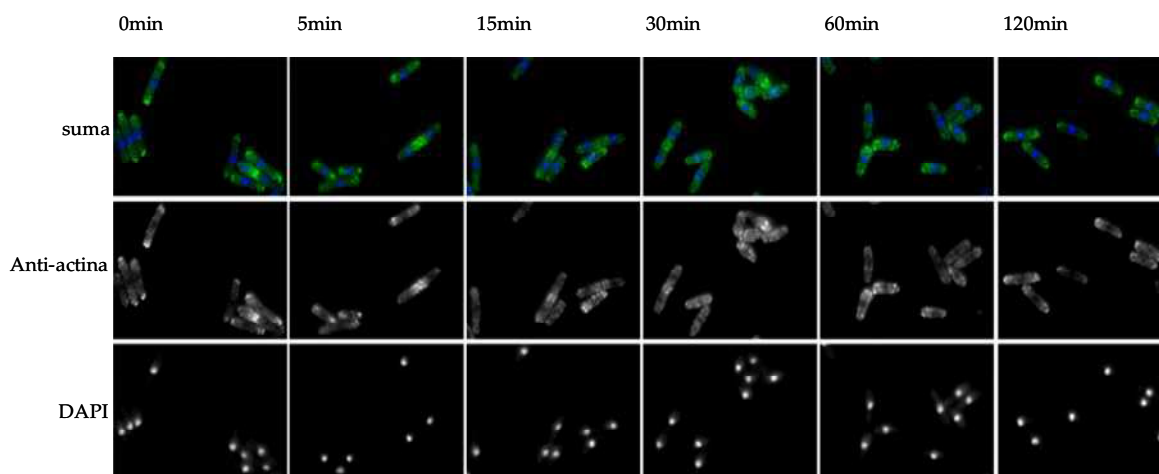
cdc25::12myc H₂O₂ 1mM
ICC anti-myc

Fig. 15. Un cultiu exponencial de cèl·lules *cdc25::12myc* va ser tractat amb H₂O₂ 1mM. Es van recollir mostres als temps indicats i les cèl·lules van ser fixades amb metanol. Es van realitzar immunocitoquímiques amb l'anticòs anti-myc (9E10) per determinar la localització de la Cdc25 (panell central) i es van tenyir els nuclis amb DAPI (panell inferior).



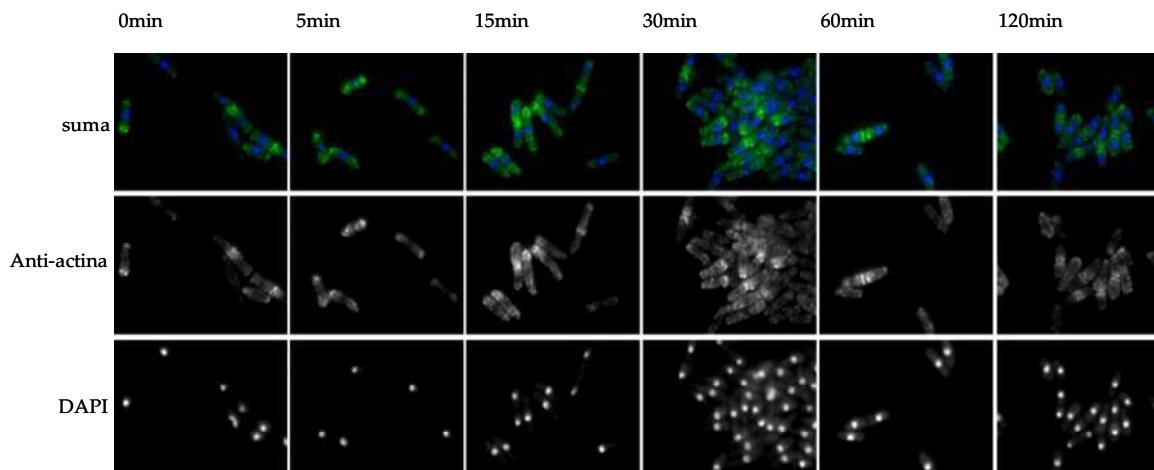
cdc25::12myc Δsrk1 H₂O₂ 1mM
ICC anti-myc

Fig. 16. Un cultiu exponencial de cèl·lules *cdc25::12myc Δsrk1* va ser tractat amb H₂O₂ 1mM. Es van recollir mostres als temps indicats i les cèl·lules van ser fixades amb metanol. Es van realitzar immunocitoquímiques amb l'anticòs anti-myc (9E10) per determinar la localització de la Cdc25 (panell central) i es van tenyir els nuclis amb DAPI (panell inferior).



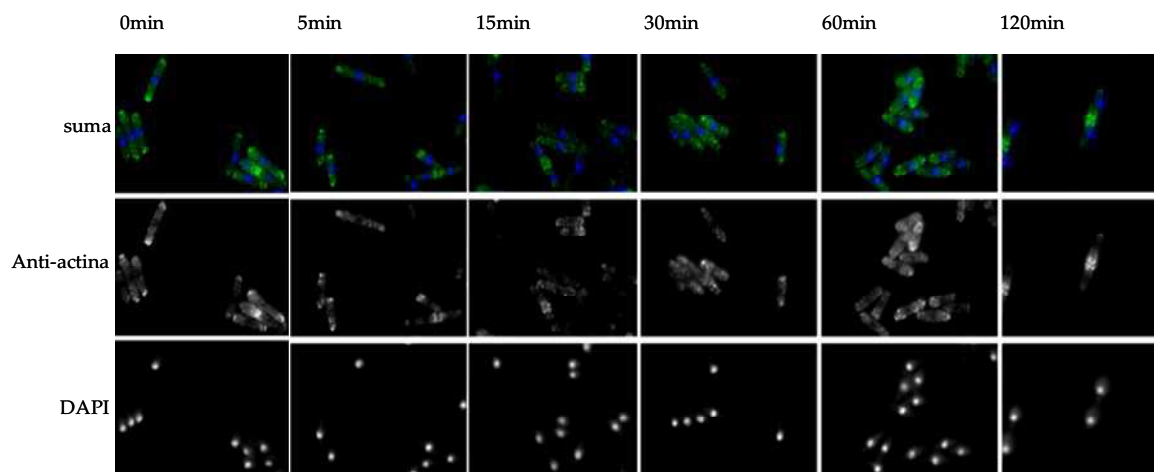
cdc25::12myc KCl 0,6M
ICC anti actina

Fig. 17. Un cultiu exponencial de cèl·lules *cdc25::12myc* va ser tractat amb KCl 0,6M. Es van recollir mostres als temps indicats i les cèl·lules van ser fixades amb metanol. Es van realitzar immunocitoquímiques amb l'anticòs anti-actina (panell central) i es van tenyir els nuclis amb DAPI (panell inferior).



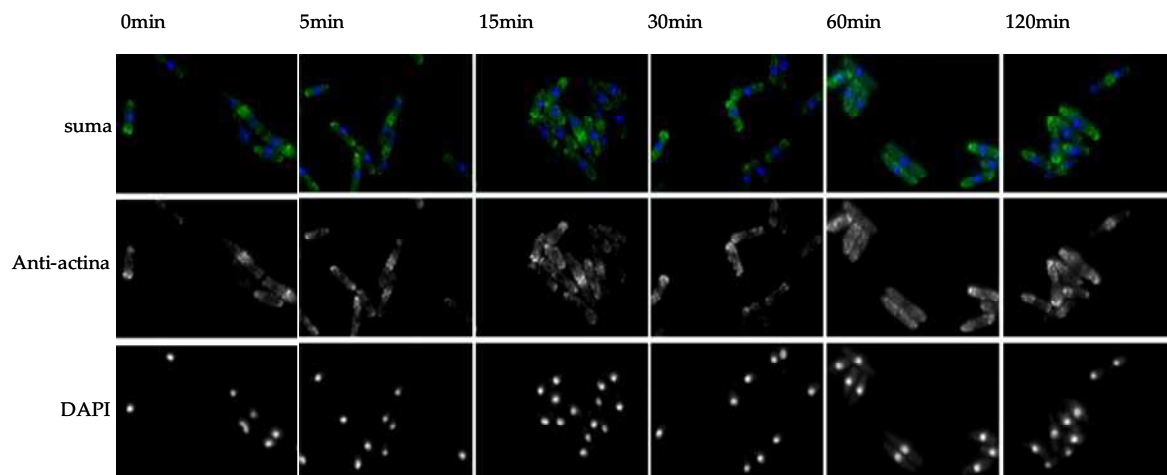
cdc25::12myc Δsrk1 KCl 0,6M
ICC anti-actina

Fig. 18. Un cultiu exponencial de cèl·lules *cdc25::12myc Δsrk1* va ser tractat amb KCl 0,6M. Es van recollir mostres als temps indicats i les cèl·lules van ser fixades amb metanol. Es van realitzar immunocitoquímiques amb l'anticòs anti-actina (panell central) i es van tenyir els nuclis amb DAPI (panell inferior).



cdc25::12myc H₂O₂ 1mM
ICC anti-actina

Fig. 19. Un cultiu exponencial de cèl·lules *cdc25::12myc* va ser tractat amb H₂O₂ 1mM. Es van recollir mostres als temps indicats i les cèl·lules van ser fixades amb metanol. Es van realitzar immunocitoquímiques amb l'anticòs anti-actina (panell central) i es van tenyir els nuclis amb DAPI (panell inferior).



cdc25::12myc Δsrk1 H₂O₂ 1mM
ICC anti-actina

Fig. 20. Un cultiu exponencial de cèl·lules *cdc25::12myc Δsrk1* va ser tractat amb H₂O₂ 1mM. Es recollir mostres als temps indicats i les cèl·lules van ser fixades amb metanol. Es van realitzar immunocitoquímiques amb l'anticòs anti-actina (panell central) i es van tenyir els nuclis DAPI (panell inferior).

12. La Srk1 contribueix al bloqueig del cicle cel·lular en resposta a estrès

Vist que en absència de la Srk1 la Cdc25 no podia ser exportada al citoplasma, vàrem decidir estudiar l'efecte que la delecció del gen *srk1* provocava en la progressió del cicle cel·lular en resposta a estrès.

Donat que el bloqueig que pateixen les cèl·lules en resposta a estrès és molt transitori degut a l'adaptació a les noves condicions, els experiments es van dur a terme en una soca *Δatf1* per tal d'exacerbar aquest bloqueig. Les cèl·lules *Δatf1* són deficientes en la resposta transcripcional a estrès i per aquest motiu no poden adaptar-se als

canvis imposats. Així el bloqueig del cicle en aquestes cèl·lules es fa més evident. Una aproximació similar es va utilitzar en un treball per Alexander *et al.*, per tal de demostrar la implicació de la proteïna Swe1 en el bloqueig que es dona en resposta a estrès osmòtic en cèl·lules de *S. cerevisiae* (Alexander *et al.*, 2001).

En base a això, les soques *Δatf1* i *Δatf1 Δsrk1* es van sincronitzar amb HU a principi de la fase S i es va analitzar la seva progressió en el cicle cel·lular en presència o en absència d'estrès osmòtic (KCl 0,6M). Com s'observa en la figura 21A, en les condicions control totes dues soques avancen en el cicle de

forma sincrònica, assolint un pic de septació d'un 40% als 150 min posteriors al bloqueig (fig. 21A, línies blava i vermella). En resposta a estrès les cèl·lules $\Delta atf1$ romanen aturades donat que no es poden adaptar (fig. 21A, línia rosa). En canvi, en el doble mutant $\Delta atf1 \Delta srk1$, tot i que la septació no es dona amb la mateixa cinètica que en condicions normals, les cèl·lules poden progressar en el cicle cel·lular (fig. 21A, línia turquesa), suggerint que la *Srk1* és responsable, almenys en part, del bloqueig subsegüent a l'exposició a estrès. Cal recordar que l'expressió de la *srk1* no es troba

regulada per *Atf1*, sinó que la seva inducció en resposta a estrès és únicament deguda a la *Sty1*, de manera que en la soca $\Delta atf1$ encara es pot induir l'expressió del gen *srk1*. A més, la soca $\Delta atf1$ no presenta el mateix fenotip elongat que la soca $\Delta sty1$, pel que no se l'ha implicat en la regulació del cicle cel·lular.

Cal dir que el bloqueig en el cicle és necessari per tal que les cèl·lules responguin correctament a l'estrès i, en conseqüència, les cèl·lules $\Delta srk1$ presenten una certa sensibilitat a estrès osmòtic (figura 21B).

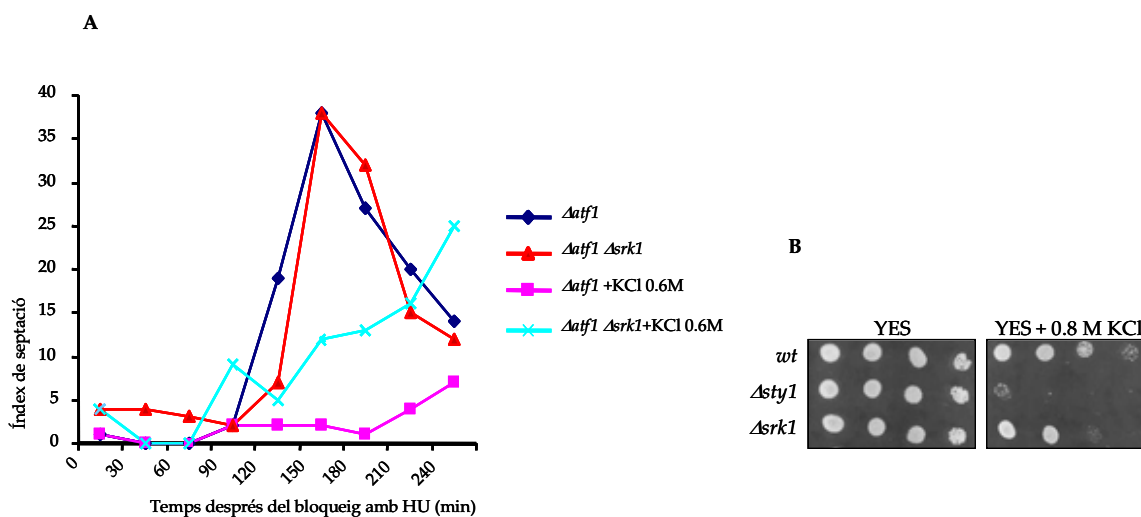
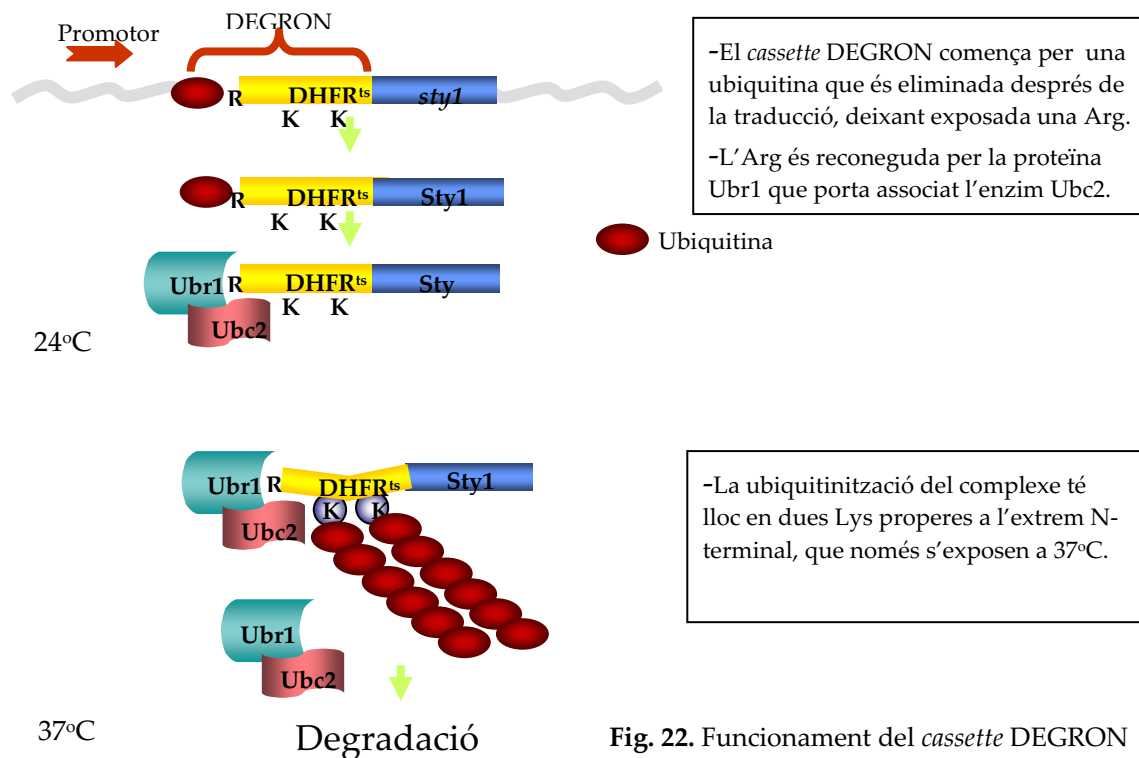


Fig. 21. (A) Cultius exponencials de les soques $\Delta atf1$ i $\Delta atf1 \Delta srk1$ van ser sincronitzats mitjançant l'addició d'hidroxiurea 10 mM al medi de cultiu durant 3h a 25°C. Passat aquest temps els cultius es van resuspendre en YES en presència o no de KCl, 0,6M. Es va analitzar la progressió en el cicle cel·lular de les dues soques mitjançant l'índex de septació. **(B)** Es van realitzar dilucions seriades de cultius exponencials de cèl·lules *wt*, $\Delta srk1$ i $\Delta sty1$ i es van plaquejar en plaques de YES (control) o de YES suplementat amb KCl (concentració final de 0,8M).

Fig. 22. Funcionament del *cassette* DEGRON

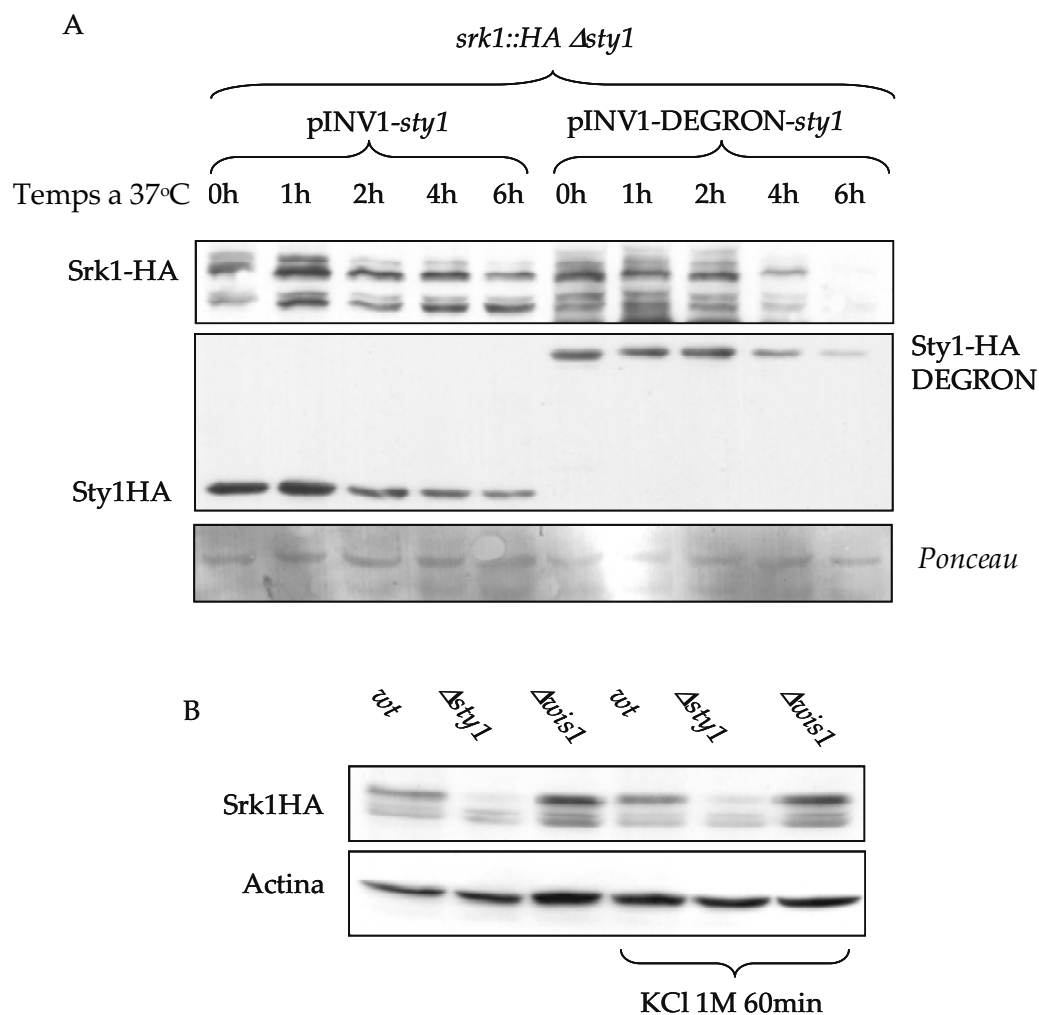
13. La *Srk1* és inestable en una soca Δ *sty1*

Amb la intenció de determinar si la Sty1 era la única quinasa responsable de l'activació de la *Srk1* en resposta a estrès, vam realitzar un assaig quinasa per tal de mesurar l'activitat de la *Srk1* en resposta a estrès en absència de la Sty1. Sorprenentment, però, en aquesta soca els nivells de la *Srk1* disminueixen dramàticament de manera que no es podia detectar activitat quinasa. Aquest fet ens va fer pensar que potser la Sty1 podia estar regulant no només l'activitat de la *Srk1*, sinó també la seva estabilitat. Per tal d'abordar aquesta qüestió, es va analitzar l'estabilitat de la *Srk1* en una soca *srk1::HA*

Δ *sty1* transformada amb el plàsmid pINV1-*sty1::HA-DEGRON*. Aquest plàsmid permet induir l'expressió del gen sota el control del promotor INV1 en absència de glucosa i reprimir-la en afegir glucosa al medi. Posteriorment, la proteïna de fusió es pot degradar en canviar el cultiu a la temperatura restrictiva de 37°C, que fa que l'epítot DEGRON adopti una conformació que és reconeguda per la maquinària d'ubiquitinització (figura 22). D'aquesta manera es pot analitzar l'estabilitat de la *Srk1* a mida que els nivells de la Sty1 disminueixen. En la figura 23A es mostra com a mida que la Sty1 és degradada, l'estabilitat de la *Srk1* disminueix, indicant que, com es sospitava, la

Fig. 23. (A) Cèl·lules *srk1::HA Δsty1* transformades amb el plàsmid pINV1-*sty1* o el plàsmid PINV1-DEGRON-*sty1* es van fer créixer en medi mínim (sense glucosa) durant 16h a 24°C. Passat aquest temps, els cultius es van resuspendre en medi fresc amb glucosa (2%) i es van incubar a 37°C. Es van agafar mostres als temps indicats després del canvi de temperatura. Es van dur a terme *western blots* dels extractes emprant l'anticòs anti-HA per detectar la Srk1-HA (panell superior) i les dues formes que s'havien expressat de la Sty1, Sty1-HA i Sty1-HA-DEGRON (panell central). En el panell inferior es mostra la tinció amb *ponceau* de la membrana com a control de la càrrega.

(B) Cèl·lules *srk1::HA*, *srk1::HA Δsty1* i *srk1::HA Δwis1* es van fer créixer en condicions normals o es van tractar amb KCl 1M durant 60min. Es van dur a terme *western blots* anti-HA i anti-Cdc2 per analitzar els nivells de la Srk1 i com a control de la càrrega, respectivament.



Sty1 regula la Srk1 no únicament a nivell transcripcional. En mamífer, l'estabilitat de la MAPKAPK-2 és dependent de la presència de la

MAPK p38 (Kotlyarov *et al.*, 2002; Sudo *et al.*, 2005). Aquestes dues proteïnes formen un complex inactiu en condicions normals, i la

unió entre ambdues proteïnes permet que siguin estables. En conseqüència l'absència d'una d'elles fa que l'altra sigui inestable i viceversa. D'altra banda, recentment ha estat descrit que en *S. pombe* l'estabilitat del factor de transcripció Atf1 és dependent d'un nivell basal de fosforilació per Sty1. Per tal de determinar si la Srk1 es comportava igual que la MAPKAPK-2 o si per contra, la seva estabilitat requeria una certa activitat de la Sty1 com en el cas de l'Atf1, vam analitzar els nivells de la Srk1 en una soca *wt*, Δ *sty1* i Δ *wis1*. En aquest darrer mutant, la Sty1 és sempre inactiva, en no poder ser activada per la MAPKK. El resultat d'aquest experiment es mostra a la figura 23B. Aquí s'observa que els nivells de la Srk1 són iguals en la soca *wt* que en la soca Δ *wis1*, indicant que és la presència i no l'activitat de la Sty1 el factor que permet que la Srk1

sigui estable.

Sense oblidar l'objectiu inicial, caldria analitzar l'activitat de la Srk1 en resposta a estrès en la soca Δ *wis1*.

14. La sobreexpressió de la Srk1 disminueix l'activació de la Sty1

En cèl·lules de mamífer la MAPKAPK-2 pot fosforilar la proteïna TTP (Hitti *et al.*, 2006). Aquesta proteïna reconeix els mRNAs amb elements rics en AUs i en promou la degradació. La MAPKAPK-2 comparteix funcions amb la Srk1 i, igual que ella pot fosforilar la CDC25C promovent la seva unió a la proteïna 14-3-3. Per aquest motiu ens vam plantejar si la Srk1 podria fosforilar substrats diferents a la Cdc25, i si es donava una conservació d'aquests substrats entre espècies. A *S. pombe*, existeix una proteïna similar a la TTP, la Csx1. A diferència de la TTP, aquesta proteïna s'ha vist implicada

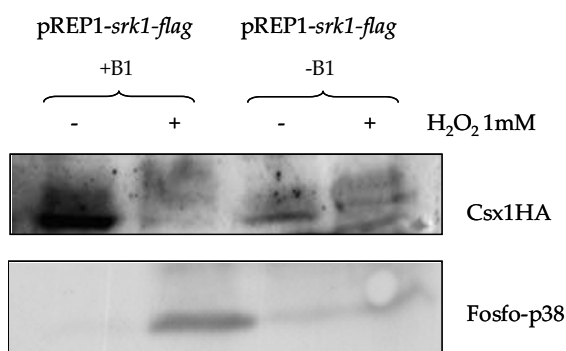
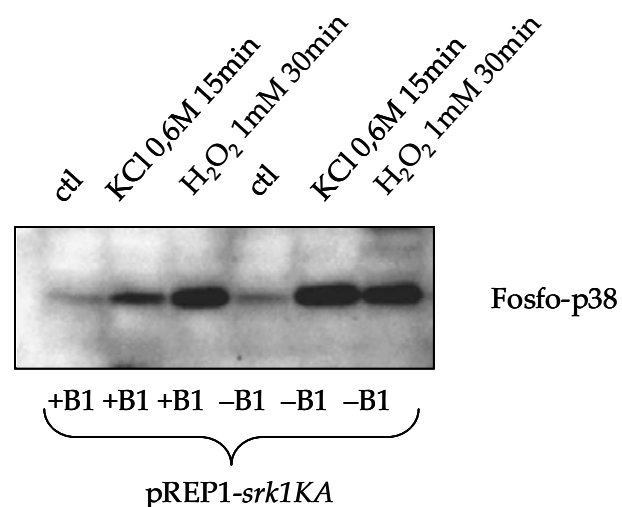


Fig. 24. Cèl·lules *csx1::HA* transformades amb el plàsmid *pREP1-srk1-flag* van ser crescudes en presència o en absència de B1 durant 24h. A continuació els cultius van ser dividits i van ser tractats o no amb H_2O_2 1mM durant 30min. Es van realitzar *western blots* d'aquestes mostres emprant els anticossos anti-HA o anti-fosfo-p38 per detectar la proteïna Csx1-HA i la fosforilació de Sty1, respectivament.

en l'estabilització de mRNAs amb elements rics en AUs. Entre aquests mRNAs es troba el d'*atf1*, que resulta estabilitzat en resposta a estrès oxidatiu. La Csx1 s'hiperfosforila en condicions d'estrès oxidatiu de forma dependent de la Sty1, però sorprenentment, la mutació dels llocs de fosforilació consens no té cap efecte en la sensibilitat d'aquestes cèl·lules a estrès oxidatiu. Per contra, la delecció del gen *csx1* no permet que les cèl·lules creixin en presència d'agents oxidants (Rodríguez-Gabriel *et al.*, 2003). Aquestes dades suggereixen que la fosforilació per part de la Sty1 no és crítica per la funció de la Csx1. Donats aquests antecedents, nosaltres ens vam plantejar que la Srk1 pogués també fosforilar la Csx1 en resposta a estrès oxidatiu. Per tal de provar

aquesta hipòtesi, vam observar l'efecte de la sobreexpressió de la Srk1 en la mobilitat de la Csx1 en un gel d'acrilamida. En contra del que esperàvem, la sobreexpressió de la Srk1 no provocava un retardament en la mobilitat de la Csx1 i, encara més sorprenentment, impedia que es donés la hiperfosforilació anteriorment descrita per Rodríguez-Gabriel *et al.* (2003) en resposta al tractament amb H₂O₂ (figura 24, panell superior). Per tal de determinar quina era la causa d'aquest efecte, ens vam disposar a analitzar l'activació de la Sty1 que es donava en aquestes cèl·lules. De forma consistent amb el resultat anterior, en cèl·lules que sobreexpressaven la Srk1 l'activació observada de la Sty1 era molt menor que en les cèl·lules que no la sobreexpressaven (figura 24, panell

Fig. 25. Cèl·lules *wt* transformades amb el plàsmid pREP1-*srk1KA* es van cultivar en presència o absència de B1 durant 24h. Els cultius van ser llavors dividits en tres parts iguals i es van tractar amb estrès osmòtic (KCl 0,6M durant 15min), amb estrès oxidatiu (H₂O₂ 1mM durant 30min) o no se'ls va aplicar tractament. Es va dur a terme un *western blot* anti-fosfo-p38 per tal de determinar la fosforilació de la Sty1.



inferior) . Aquest no era un artefacte de la sobreexpressió perquè la resposta era normal en cèl·lules on s'induïa l'expressió de la quinasa inactiva *Srk1KA* (figura 25) (de fet és inclús major en el cas de l'estrès osmòtic). Aquest mateix efecte es podia observar en tractar les cèl·lules amb estrès osmòtic (figura 26, panell superior). Per tant, aquests experiments indiquen que la sobreexpressió de la *Srk1* impedeix la correcta activació de la *Sty1* en resposta a estrès.

15. L'efecte de la sobreexpressió de la *Srk1* en l'activació de la *Sty1* és parcialment dependent de les fosfatases *Pyp1* i *Pyp2*

Donades les observacions anteriors,

una primera hipòtesi que ens vam plantejar va ser que la *Srk1* pogués activar les fosfatases encarregades d'inactivar la *Sty1*, la *Pyp1* i la *Pyp2*. Aquest seria un mecanisme de retroalimentació negativa que permetria silenciar ràpidament la via per tal d'evitar la toxicitat deguda a una hiperactivació de la *Sty1*. Nosaltres, en sobreexpressar la *Srk1* estaríem evidenciant un mecanisme que en condicions normals només es donaria després d'un tractament perllongat amb estrès. Amb la intenció de provar-ho, vam realitzar la sobreexpressió de la *Srk1* i el tractament amb els diferents tipus d'estrès en una soca *wt*, una soca $\Delta pyp1$ i una soca $\Delta pyp2$, esperant que en absència d'una

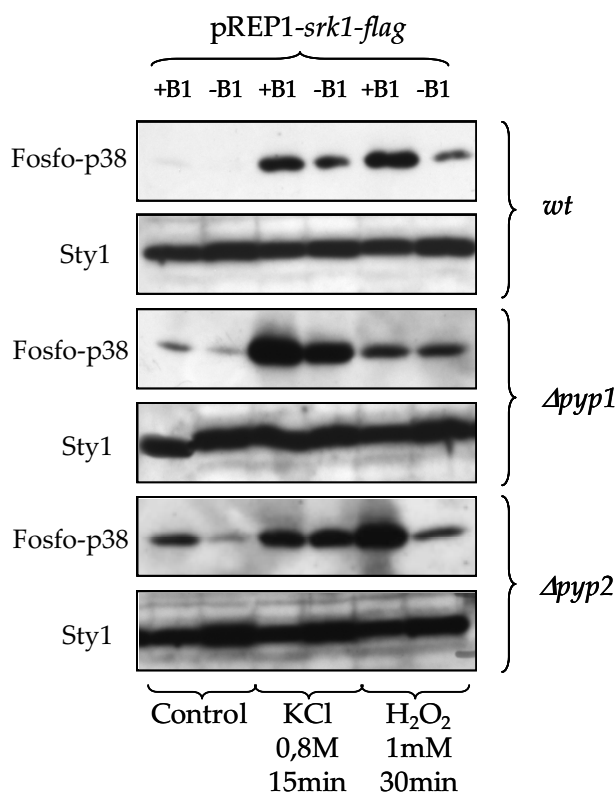


Fig. 26. Cèl·lules *wt*, $\Delta pyp1$ i $\Delta pyp2$ transformades amb el plàsmid pREP1-*srk1-flag* es van fer créixer en presència o en absència de B1 durant 24h. Els cultius resultants es van separar en tres parts iguals i a continuació se'ls va aplicar estrès osmòtic (KCl 0,8M durant 15min) o oxidatiu (H₂O₂ 1mM durant 30min) o van restar sense tractament. Es van realitzar *western blots* amb els anticossos anti-fosfo-p38 i anti-Hog1 per tal de detectar la forma fosforilada i activa de *Sty1* així com els nivells totals de la *Sty1*.

fosfatasa o l'altra no es pogués donar aquest bloqueig en l'activació de la Sty1.

Com s'observa en la figura 26, en la soca *wt* en la condició control no es detecta fosforilació de la Sty1. Per contra, en la soca $\Delta pyp1$ i sobre tot en la soca $\Delta pyp2$ s'observa una activació basal de la Sty1. En $\Delta pyp1$ és lògic que hi hagi uns nivells basals d'activació de Sty1, perquè en condicions normals, els nivells basals de la Pyp1 serveixen per inactivar la Sty1. En el cas de la Pyp2, sempre s'ha parlat de que la seva expressió és únicament induïda en resposta a estrès, de manera que en condicions normals la delecció de *pyp2* no hauria d'afectar l'activació basal de la Sty1. En canvi, el fet que la delecció simultània dels gens *pyp1* i *pyp2* condueixi a una hiperactivació letal de la Sty1 indicaria que realment la Pyp2 sí que jugaria un paper en condicions normals, per tal de contrarestar l'activació basal de la Sty1. Tenint això en consideració, sí que s'entendria la fosforilació observada en la soca $\Delta pyp2$ en condicions control. Curiosament, però, en tots dos casos aquesta activació basal de la Sty1 desapareixia en sobreexpressar la Srk1.

Pel que fa a les condicions d'estrès, és interessant notar un comportament diferent en les tres soques. En la soca *wt*, es dona una activació normal de la Sty1 en la resposta als dos tipus d'estrès que es veu minvada en sobreexpressar la Srk1. En la soca $\Delta pyp1$ (fig. 26, panells centrals), l'activació que es dona en resposta a estrès osmòtic és més elevada que la que provoca el mateix tractament en la soca *wt*. La sobreexpressió de la Srk1 en aquest cas continua disminuint l'activació de la Sty1. En canvi, en el cas de l'estrès oxidatiu, malgrat que l'activació observada en aquesta soca era lleugerament menor en comparació amb el *wt* o amb la resposta a estrès osmòtic, aquesta activació no es veu afectada per la sobreexpressió de la Srk1.

Per últim, en quant als resultats de la soca $\Delta pyp2$ (fig. 26, panells inferiors), l'estrès osmòtic provoca una activació de la Sty1 que no es veu afectada per la sobreexpressió de la Srk1. Per contra, el tractament amb estrès oxidatiu condueix a una fosforilació de la Sty1 que disminueix en sobreexpressar la Srk1.

Per tant, d'aquestes dades es desprenen diverses possibilitats. En

quant a l'efecte que provoca la sobreexpressió de la *Srk1* en condicions normals, això estaria indicant que la *Srk1* podria funcionar a través de totes dues fosfatases, i en absència d'una d'elles l'efecte observat seria degut a l'activació de l'altra. En condicions d'estrès osmòtic, l'efecte seria principalment dut a terme a través de la *Pyp2*, doncs la delecció d'aquest gen evita el bloqueig en la fosforilació de la *Sty1*. En canvi, en condicions d'estrès oxidatiu, la *Srk1* faria aquesta funció a través de la *Pyp1*, perquè en la soca $\Delta pyp1$ la sobreexpressió de la *Srk1* no modifica la fosforilació de la *Sty1*.

Alternativament, caldria considerar altres dianes a través de les quals la *Srk1* pogués dur a terme el seu efecte, donat que en condicions normals la delecció de només una de les fosfatases no aconsegueix revertir el paper de la *Srk1*. Altres possibilitats seran també contemplades en la discussió.

16. La sobreexpressió de la *Srk1* provoca un canvi en la mobilitat electroforètica de la *Wis1*.

Donats els resultats anteriors, vam voler considerar altres possibles dianes a través de les quals la *Srk1*

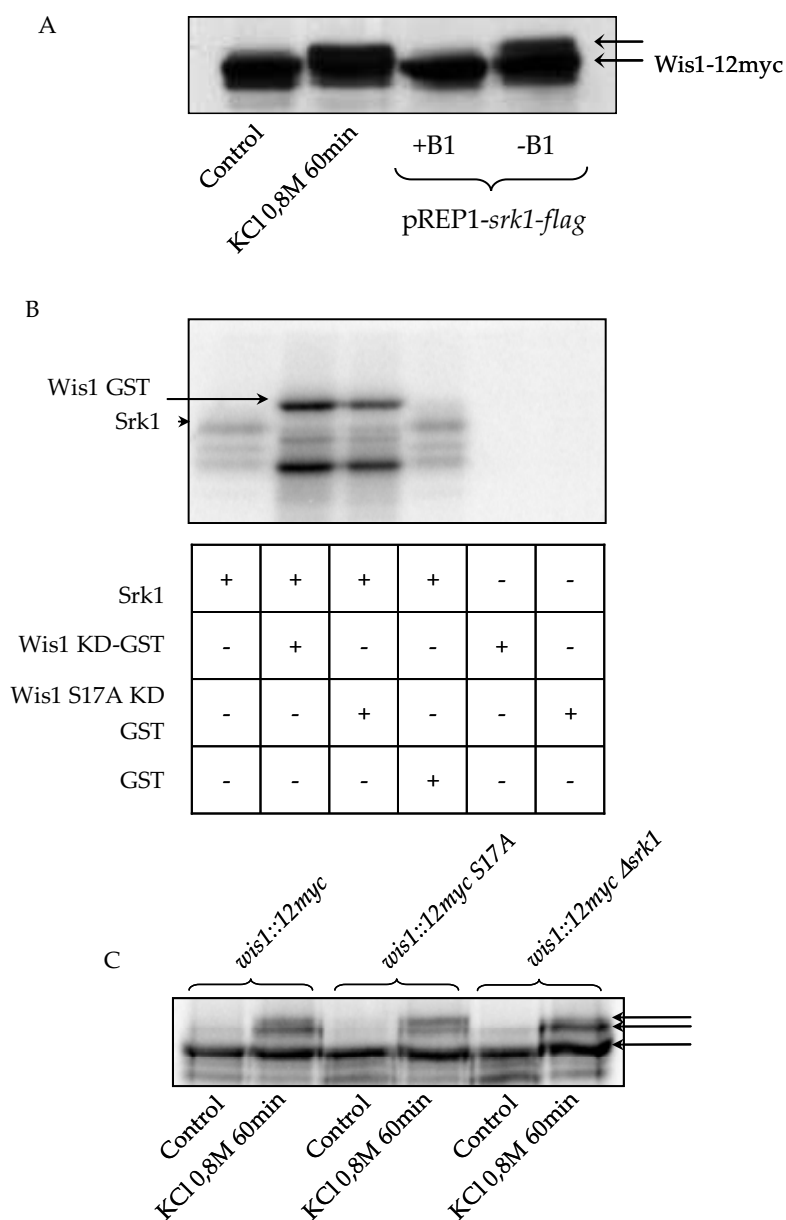
pogués dur a terme la seva funció. Un altre possible candidat seria la MAPKK encarregada de fosforilar i activar la *Sty1*, la *Wis1*. Prèviament, ja s'havia mostrat que la *Wis1* pot patir modificacions diferents a les fosforilacions consens als residus Ser469 i Thr473. Això es coneix perquè el mutant *Wis1DD* (on aquests residus s'han substituït per Asp) pot encara patir un retardament en la mobilitat electroforètica de la proteïna en resposta a elevada temperatura (Shiozaki *et al.*, 1998). A més, experiments realitzats pel Dr. Rodríguez-Gabriel mostren que la *Wis1* pateix una fosforilació després del tractament amb estrès osmòtic que es manté en el temps, indicant que no pot tractar-se d'una fosforilació activadora donat que persisteix quan la *Sty1* ja és inactiva (comunicació personal). Aquests antecedents ens van fer pensar que potser la *Srk1* podria ser responsable d'aquesta fosforilació que en aquest cas seria inhibidora.

Per aquest motiu vam voler observar l'efecte de la sobreexpressió de la *Srk1* en la mobilitat de la *Wis1*. Com s'observa en la figura 27A, la sobreexpressió va conduir a un alentiment de la

Fig. 27. (A) Cèl·lules *wis1::12myc* transformades amb el plàsmid pREP1-*srk1-flag* i cultivades durant 24h en medi suplementat o no amb B1 es van comparar amb les mateixes cèl·lules sense transformar que havien estat tractades o no amb estrès osmòtic (KCl 0,8M durant 60min). Es va realitzar un *western blot* anti-myc per tal de detectar les bandes de diferent mobilitat electroforètica corresponents a la Wis1.

(B) Les proteïnes purificades de bacteri Wis1 KD-GST i Wis1 S17A KD-GST (on el residu Lys349 havia estat mutat a Arg per evitar l'autofosforilació de Wis1) es van emprar com a substrat en un assaig quinasa amb la Srk1 purificada.

(C) Cèl·lules *nmt81::wis1::12myc* o la proteïna *nmt81::wis1S17A::12myc* des del promotor *nmt81* i cèl·lules *wis1::12myc Δsrk1* van ser sotmeses a estrès osmòtic (KCl 0,8M) durant 60min. El *Western blot* dels extractes utilitzant l'anticòs anti-myc va permetre identificar tres bandes corresponents a diferents estats de fosforilació de la Wis1.



mobilitat de la Wis1 molt semblant a l'observat en tractar les cèl·lules amb estrès osmòtic durant un temps llarg. Per tal de comprovar que la Wis1 pogués ser un substrat directe de la Srk1 vam expressar la Wis1 catalíticament inactiva (Wis1K349R)

com una proteïna de fusió a GST i la vam emprar en un assaig quinasa *in vitro*. Confirmant les dades anteriors, la Srk1 pot fosforilar molt eficientment la Wis1 *in vitro* (figura 27B).

La Wis1 conté quatre llocs putatius de fosforilació per la Srk1, tots quatre continguts en la seva regió N-terminal. De tots quatre, el primer ocupa la posició 17 en la seqüència de la proteïna. Analitzant l'entorn aminoacídic d'aquest residu vam observar que s'ajustava perfectament a la seqüència preferida de la Srk1, doncs contenia residus hidrofòbics (Leu i Ile) en les posicions -4, -1 i +1 a més d'un aminoàcid bàsic a la posició -2 (glutamina). D'altra banda, aquest residu es troba en la seqüència d'exportació nuclear de la Wis1 (que s'extèn del residu 9 fins el 18). Per aquest motiu vam considerar que aquest podria ser un bon candidat com a residu fosforilat per la Srk1. Dissortadament, la proteïna de fusió a GST que contenia aquest residu mutat a Ala continuava essent fosforilat per la Srk1 (figura 27B), indicant que aquest no és, si més no, l'únic residu fosforilat per la Srk1. Per últim vam voler determinar si la delecció del gen *srk1* aconseguia eliminar la fosforilació observada en el tractament amb estrès osmòtic (figura 27C). D'acord amb l'experiment anterior, en el mutant de la Ser17 així com en la soca *wt*, el tractament amb estrès durant

períodes llargs encara patia el canvi en la mobilitat electroforètica de la Wis1 que s'observava com dues bandes de pes superior a la de la proteïna no fosforilada. En canvi, en la soca Δ *srk1*, tot i que encara es podia detectar una de les bandes de fosforilació, el senyal de la banda superior desapareix. Aquest resultat indica que la Srk1 és en part responsable de la fosforilació de la Wis1, tot i que probablement altres quinases poden també fosforilar-la, donat que la pèrdua de la Srk1 no elimina la banda inferior del *western blot*.

17. La delecció del gen *srk1* condueix a una hiperactivació de la Sty1.

Tenint en compte l'efecte que observàvem en l'activació de la Sty1 en sobreexpressar la Srk1 vam plantejar-nos quin efecte tindria la delecció. Per tal d'evitar l'adaptació de les cèl·lules a l'estrès i així posar més clarament de manifest l'activació de la Sty1, aquest experiment el vam realitzar en una soca on s'havia deleccionat el gen *atf1*. Com es mostra a la figura 28, el tractament amb estrès osmòtic condueix a l'activació de la Sty1 en les dues soques, però en el cas de les

cèl·lules on s'havia deleccionat el gen *srk1*, la fosforilació de la Sty1 era molt més mantinguda en el temps, indicant que, en absència de la *Srk1*, la inactivació de la Sty1 no pot donar-se correctament.

Aquest resultat és consistent amb les dades prèviament mostrades per la sobreexpressió, i tot plegat indica que la *Srk1* és necessària per tal de desactivar la Sty1 quan les cèl·lules són sotmeses a un estrès perllongat, doncs una hiperactivació de la Sty1 és tòxica per la cèl·lula. D'acord amb

això, el doble mutant $\Delta atf1 \Delta srk1$ presenta una mida inferior a la del mutant simple $\Delta atf1$, que correlacionaria amb una hiperactivació de Sty1 en el doble mutant.

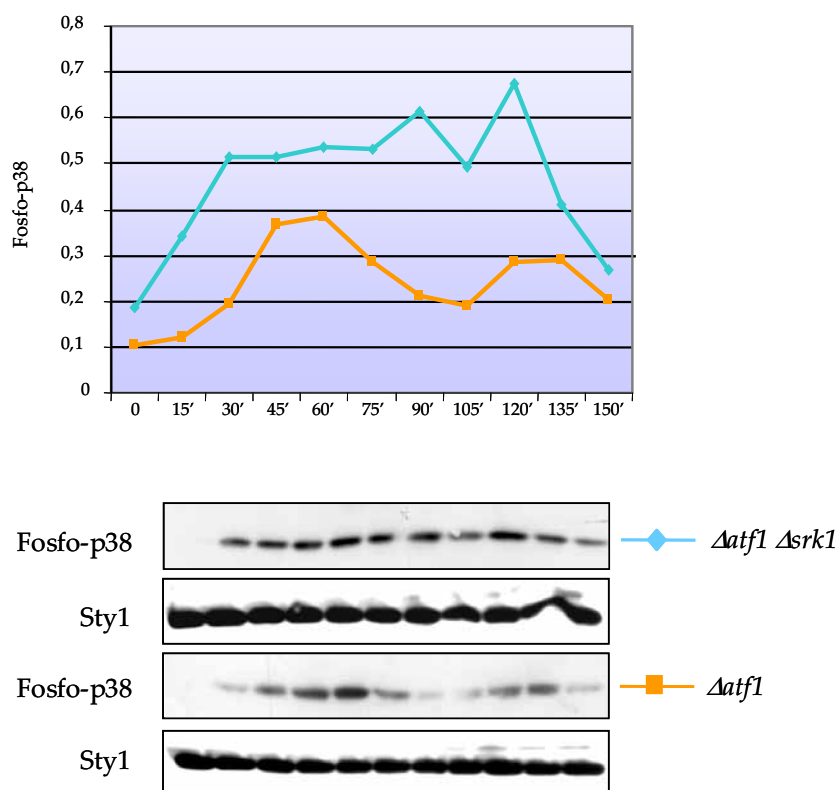


Fig. 28. Cèl·lules $\Delta atf1$ i $\Delta atf1 \Delta srk1$ van ser tractades amb KCl 0,8M i es van recollir mostres cada 15min. Es van dur a terme *western blots* dels extractes cel·lulars emprant anticossos anti-fosfo-p38 i anti-Hog1 per tal de detectar la forma activa de la Sty1 i els nivells totals de Sty1 presents a les mostres, respectivament. La gràfica mostra la quantificació dels *western blots* de la fosforilació de Sty1.

1. La *Srk1* regula la transició G2/M a través de la *Cdc25*

La transició G2/M és un dels processos més acuradament regulats del cicle cel·lular de *S. pombe*. Aquesta transició es troba sota el control del complex Cdc2-Cdc13 que és, alhora, subjecte de la regulació per altres proteïnes. Un dels mecanismes que n'afecten l'activitat i que es coneix millor és la regulació de l'estat de fosforilació de la Tyr15 de la Cdc2. Aquesta és una fosforilació inhibidora catalitzada per dues quinases, la Wee1 i la Mik1. La fosforilació d'aquest residu manté el complex en una forma inactiva per tal d'evitar que tingui lloc la transició G2/M de forma prematura. Així doncs, esdevé essencial l'existència d'una fosfatasa, la Cdc25, capaç de retirar el fosfat inhibidor per tal que el complex Cdc2-Cdc13 sigui finalment actiu i pugui promoure l'entrada en mitosi. Tant les quinases inhibidores Wee1 i Mik1 com la fosfatasa Cdc25 han estat descrites com a dianes dels mecanismes de vigilància o *checkpoints* per tal d'aturar la progressió del cicle cel·lular quan es detecta algun problema en la síntesi del DNA o quan es crea dany a

aquest nivell. De fet, és sobre la Cdc25 on recau la part més important de la resposta dels *checkpoints*, mentre que en el cas de les quinases Wee1 i Mik1 el seu paper no és essencial. Les proteïnes efectores dels *checkpoints* de dany al DNA i de replicació Chk1 i Cds1 fosforilen la Cdc25 en 12 residus. La mutació de nou d'aquests residus (S99, S148, S178, S192, S204, S206, T226, S234 i S359) a Ala (residu no fosforilable) impedeix que les cèl·lules puguin bloquejar la progressió del cicle en resposta a una aturada en la replicació o a dany al DNA. La fosforilació de la Cdc25 crea un lloc d'unió per les proteïnes 14-3-3, Rad24 i Rad25. L'associació amb aquestes proteïnes estabilitza la Cdc25 a més de permetre la seva exclusió del nucli. En un principi es va pensar que la deslocalització de la Cdc25 era suficient per tal de bloquejar-ne l'activitat. Més endavant, però, es va poder demostrar que la sortida del nucli no era suficient per tal d'inactivar la Cdc25, donat que un mutant constitutivament nuclear podia encara respondre als *checkpoints*. En canvi, el mutant *Δrad24* és deficient en la resposta, indicant que, tot i que la regulació

de la localització de la Cdc25 no és essencial per la resposta, la presència de la Rad24 en la cèl·lula sí que és necessària per tal que es doni el bloqueig en el cicle cel·lular. Això s'explica si entenem que la fosforilació de la Cdc25 per part de la Chk1 i la Cds1 és en si mateixa inhibidora, i la unió de la Rad24 el que fa és impedir que fosfatases presents a la cèl·lula puguin defosforilar aquests residus. D'acord amb aquest paper de les quinases Chk1 i Cds1 en la inhibició de la Cdc25, la seva sobreexpressió bloqueja el cicle cel·lular, donant lloc a un fenotip elongat de les cèl·lules. Si atenem a la localització de la Cdc25 en cèl·lules que sobreexpressen aquestes dues quinases, s'observa que es troba exclosa del nucli i concentrada al citoplasma com en el cas de l'activació del *checkpoint*. Per últim, quan es muten els nou llocs de fosforilació per la Chk1 i la Cds1 a Ala, les cèl·lules no responen a la sobreexpressió d'aquestes quinases. La Chk1 i la Cds1 pertanyen a la superfamília de quinases dependents de calmodulina, tot i que no requereixen Ca^{2+} /CaM per a la seva funció. Tots els membres d'aquesta família comparteixen una mateixa

seqüència consens de fosforilació, que consisteix en una Ser o Thr precedida dues posicions abans per una Arg.

Durant la realització d'aquesta tesi hem estudiat el paper de la quinasa Srk1 en la regulació del cicle cel·lular i la resposta a estrès. En el nostre grup la identificació d'aquesta quinasa es va fer en virtut de la seva homologia amb les quinases dependents de calmodulina de mamífer. Per aquest motiu en el grup la vàrem anomenar Cmk3 (per *CaM dependent kinase 3*). Posteriorment, però, es va publicar un article on es descrivia la mateixa quinasa com una proteïna induïda en resposta a estrès i on se l'anomenava Srk1 (per *Sty1 regulated kinase*) (Smith *et al.*, 2002). Per evitar confusions en quant a la nomenclatura, en el nostre grup vam decidir d'adoptar aquest mateix nom per referir-nos a ella. Tot i així, és important no oblidar que la Srk1 comparteix homologia amb les quinases dependents de calmodulina i, com passava amb les quinases dels *checkpoints* fosforila Ser o Thr contingudes en la seqüència consens Arg-X-X-Ser/Thr. En els experiments duts a terme en aquest treball es mostra com la

sobreexpressió de la *Srk1* provoca un bloqueig en el cicle cel·lular representat per un fenotip elongat de les cèl·lules. Les cèl·lules de *S. pombe* presenten una distribució del cicle cel·lular diferent a la de les cèl·lules de *S. cerevisiae* o a la d'eucariotes superiors, amb unes fases G1 i S molt curtes i una fase G2 que s'estén dos tercers parts del cicle. Per aquest motiu, gran part de les regulacions que es donen en la cèl·lula repercuteixen en aquesta etapa del cicle. En base a això, en observar el bloqueig degut a la sobreexpressió de la *Srk1* vàrem pensar en primer lloc que es tractés d'un bloqueig en la fase G2 del cicle. Aquest fet va ser confirmat en realitzar una anàlisi del contingut de DNA d'aquestes cèl·lules i una tinció dels nuclis. La sobreexpressió de la *Srk1* bloquejava les cèl·lules amb un sol nucli però amb contingut $2n$ de DNA, indicant que ja havia tingut lloc la replicació i confirmant per tant que aquestes cèl·lules es trobaven en la fase G2 del cicle.

Un bloqueig en aquesta fase podia ser dut a terme a través dels diferents reguladors del cicle abans citats. Amb la finalitat de conèixer la diana última responsable d'aquest

efecte vam sobreexpressar la *Srk1* en cèl·lules deficientes per aquests reguladors, assumint que en no tenir el seu substrat la *Srk1* no podria bloquejar el cicle. Les dues quinases *Wee1* i *Mik1* poden compensar-se en el cas que una d'elles no sigui present de manera que els mutants d'una o una altra quinasa són viables. En canvi, tal com ja s'ha comentat, la delecció de *cdc25* és letal per la cèl·lula, perquè tot i que existeix una altra fosfatasa capaç de defosforilar la Tyr 15 de la *Cdc2*, la *Pyp3*, aquesta no és capaç de compensar la seva funció en el cicle. Existeix, però, un mutant de la *cdc2*, *cdc2-3w*, que es caracteritza per ser insensible a la inactivació de la *Cdc25* (Carr *et al.*, 1989; Millar *et al.*, 1992a). En aquest mutant és possible deleccionar el gen *cdc25* sense que s'afecti la viabilitat de les cèl·lules i, a més, una regulació negativa que recaigui sobre la *Cdc25* no hi té efecte. Tenint en compte aquestes consideracions, l'anàlisi de l'efecte de la sobreexpressió de la *Srk1* es fa més entenedor. En aquest treball mostrem com la sobreexpressió de la *Srk1* dona lloc a un bloqueig en el cicle que és similar en les soques *wt*, $\Delta wee1$ i $\Delta mik1$. Per contra, la sobreexpressió de la *Srk1* en la soca

cdc2-3w o en la soca *cdc2-3w Δcdc25* no produeix cap efecte indicant que la *Srk1* està actuant a través de la *Cdc25*. En un primer moment, hom es podria plantejar que aquesta inhibició de l'entrada en mitosi fos deguda a una inactivació directa del complex *Cdc2-Cdc13* per part de la *Srk1*. Aquest fet és poc probable, doncs el mutant *cdc2-3w* tot i ser insensible a la inactivació de la *Cdc25* pot encara patir el bloqueig degut a la sobreexpressió de les quinases inhibidores *Wee1* i *Mik1*, suggerint que una fosforilació inhibidora de la *Srk1* hauria de tenir el mateix efecte que la d'aquestes quinases.

Aportant més claus en el mecanisme a través del qual la *Srk1* provoca el bloqueig, la sobreexpressió de la fosfatasa *Pyp3* reverteix l'efecte de la sobreexpressió de la *Srk1*, indicant que l'impediment de l'entrada en mitosi és degut a un manteniment de l'estat fosforilat a la *Tyr15* de la *Cdc2*.

D'altra banda, en els nostres experiments hem pogut provar que la *Srk1* i la *Cdc25* s'associen *in vivo* i que la *Cdc25* és substrat de la *Srk1* en un assaig quinasa *in vitro*. Més concretament, la *Srk1* pot fosforilar la regió N-terminal reguladora de la

Cdc25. A més, la sobreexpressió de la *Srk1* provoca un alentiment en la mobilitat electroforètica de la *Cdc25*, suggerint que aquesta fosforilació *in vitro* també es pot donar *in vivo*. Un fet que va cridar la nostra atenció en realitzar aquest experiment va ser que la sobreexpressió de la *Srk1* conduïa a una acumulació de la *Cdc25* a nivell de proteïna.

En condicions normals la *Cdc25* és una proteïna molt inestable, donat que únicament ha de fer la seva funció en un moment molt concret del cicle cel·lular. Una estabilització de la *Cdc25* ha estat descrita en resposta a dany al DNA o a bloqueig en la replicació i aquest és un procés mitjançat per les quinases *Chk1* i *Cds1* que promouen la unió entre la *Cdc25* i les proteïnes 14-3-3 *Rad24* i *Rad25*.

Els nou residus fosforilats per les quinases *Chk1* i *Cds1* es troben continguts en la regió reguladora N-terminal de la *Cdc25* que, com ja s'ha dit, també pot fosforilar la *Srk1*. Donat que les tres quinases pertanyen a una mateixa família i que comparteixen el mateix consens de fosforilació una primera idea que va sorgir va ser que la *Srk1* pogués fosforilar els mateixos residus que la *Chk1* o la *Cds1*. Aquesta hipòtesi es

va confirmar amb els experiments de sobreexpressió de la *Srk1* en la soca on els nou residus fosforilats per la *Chk1* i la *Cds1* de la *Cdc25* havien estat mutats. En aquesta soca la sobreexpressió no produïa l'efecte de bloqueig en el cicle i, a més, aquesta *Cdc25* mutada deixava de ser un bon substrat en un assaig quinasa *in vitro*.

Una altra possibilitat atenent als nostres resultats fóra que la *Srk1* intervingués en els *checkpoints* de dany al DNA o de replicació. Per tal de determinar si la *Srk1* podria formar part de la resposta d'aquests *checkpoints* en el nostre grup vam voler examinar la sensibilitat a radiació UV d'una soca en que s'havia deletat el gen *srk1* enfront una soca *wt*, una soca $\Delta chk1$ i una soca $\Delta rad1$. En aquestes dues darreres, l'exposició a dosis creixents de radiació conduïa a una pèrdua en la viabilitat d'aquestes cèl·lules, mentre que en el cas de les primeres, les cèl·lules aconseguien superar el dany imposat i això es traduïa en un manteniment de la viabilitat. Alternativament, la *Srk1* podria funcionar activant alguna de les quinases del *checkpoint* provocant d'aquesta manera el bloqueig en el cicle cel·lular. Per tal de descartar

aquesta hipòtesi, es va analitzar l'efecte de la sobreexpressió de la *Srk1* en una soca $\Delta chk1$, una soca $\Delta cds1$ i en el doble mutant $\Delta chk1 \Delta cds1$. En tots els casos, la sobreexpressió continuava bloquejant el cicle cel·lular, indicant que la *Srk1* actuava de forma independent d'aquestes dues quinases. Per tant aquests resultats en conjunt suggerien que la *Srk1* no és necessària per a la resposta a dany al DNA.

Interessantment, en mamífer existeix una quinasa que comparteix característiques funcionals amb la *Srk1*, la MAPKAPK-2. Aquesta quinasa és, com la *Srk1*, substrat de la MAPK de resposta a estrès p38 i s'ha implicat en el bloqueig del cicle cel·lular associat a radiació UV i a la fosforilació de la CDC25C (Manke *et al.*, 2005). Cal notar que aquest paper de la MAPKAPK-2 ha estat únicament observat en un tipus cel·lular concret, les cèl·lules U2OS, i no en altres. Aquest tipus cel·lular presenta la característica de ser deficient en la senyalització per la p53. Aquest mateix grup ha demostrat la implicació de la MAPKAPK-2 en la resposta a agents genotòxics en fibroblastes p53^{-/-} (Reinhardt *et al.*, 2007). Això indica

que tot i existir una certa semblança, al llarg de l'evolució i de forma dependent de les característiques del tipus cel·lular les dues quinases han divergit en el tipus d'estrès al que són capaces de respondre. És interessant notar també que la Sty1 sí que juga un paper en la resposta a radiació UV (Degols *et al.*, 1997), indicant que altres substrats de la MAPK puguin estar funcionant a aquest nivell.

Es pot seguir establint un paral·lelisme entre els mecanismes de funcionament de les quinases Chk1 i Cds1 i la Srk1 si atenem a altres aspectes com ara la localització de la Cdc25. En tots els casos, la sobreexpressió d'una d'aquestes quinases condueix a la sortida del nucli de la Cdc25 i a la seva acumulació al citoplasma. Si bé ara és clar que aquesta deslocalització no és suficient per a la inactivació de la Cdc25, sí que serveix per indicar que la Cdc25 s'ha associat a una proteïna 14-3-3. En la seqüència de la Cdc25 no existeix cap motiu d'exportació nuclear (Lopez-Girona *et al.*, 1999), per tant, per tal que es doni aquesta sortida del nucli cal que hi hagi una associació entre la Cdc25 i una

proteïna 14-3-3, que li atorga aquest senyal d'exportació nuclear.

Les proteïnes 14-3-3 protegeixen la forma fosforilada i inactiva de la Cdc25 de les fosfatases presents a la cèl·lula i també de la maquinària d'ubiquitinització que condueix a la seva degradació. D'acord amb això, nosaltres hem pogut demostrar que l'acumulació de la Cdc25 que s'observa en sobreexpressar la Srk1 és dependent de la presència de la Rad24 en la cèl·lula. També mostrem que aquesta pèrdua de l'estabilitat en el mutant $\Delta rad24$ es pot revertir si conjuntament també es muta un component de l'APC (*cut9-665*). Aquest fet indica que l'estabilització de la Cdc25 per part de la Rad24 és conseqüència d'un bloqueig en l'accés de la maquinària d'ubiquitinització. Amb aquestes dades, però, no podem deixar de notar que les cèl·lules $\Delta rad24$ que sobreexpressen la Srk1 no mostren el mateix fenotip que les que no la sobreexpressen. En el primer cas les cèl·lules presenten una mida superior a les darreres. Aquest efecte es pot explicar per la presència de l'altra proteïna de tipus 14-3-3, la Rad25, que compensaria parcialment la pèrdua de la Rad24.

Tant l'efecte en la localització com en l'estabilització de la Cdc25 es podrien interpretar com un artefacte de la sobreexpressió o de la fase del cicle en que es troben les cèl·lules. Aquesta sospita es dissipa en observar l'efecte que produeix la sobreexpressió de la quinasa Wee1 que provoca un bloqueig en la mateixa fase del cicle que la *Srk1*. Per contra, en aquestes cèl·lules no es detecta l'acumulació de la Cdc25 a nivell de proteïna i la localització d'aquesta és bàsicament nuclear.

D'altra banda, nosaltres hem pogut demostrar també que la fosforilació *in vitro* de la Cdc25 per part de la *Srk1* afavoreix la seva unió a la *Rad24*. Val a dir també que, *in vitro*, també hem pogut detectar associació amb la pròpia *Srk1* que seria remissent de la unió prèviament descrita per les quinases *Chk1* i *Cds1* en resposta als *checkpoints*. Les proteïnes 14-3-3 es troben formant dímers en condicions normals, de manera que el fet que puguin unir-se tant a les quinases del *checkpoint* com a la Cdc25 s'ha explicat com una forma de promoure el reconeixement i la unió de les quinases al seu substrat. Un aspecte encara sense resoldre en la regulació de la Cdc25 per part de

la *Chk1* i la *Cds1* és que no s'ha pogut demostrar que l'associació entre la *Rad24* i la Cdc25 augmenti en resposta a dany al DNA o a una aturada en la replicació. Ambdues proteïnes ja es poden detectar unides en condicions normals quan les quinases del *checkpoint* són inactives. Això s'ha volgut explicar mitjançant l'existència d'altres quinases que durant la interfase podrien promoure aquesta unió. En canvi, en el cas de l'activació dels *checkpoints*, la *Chk1* i la *Cds1* serien responsables de la fosforilació i subsegüent associació a la *Rad24*. Una hipòtesi que ens podríem plantejar seria que en condicions normals ja existeixi un cert nivell d'activació de la *Chk1* i la *Cds1* que participaria en aquesta unió. Aquest plantejament, però, és poc probable donat que els mutants $\Delta chk1$ i $\Delta cds1$ així com el doble mutant presenten, en condicions normals, un fenotip completament *wt*. En el cas que en condicions normals fossin responsables de mantenir la Cdc25 en un estat inactiu això es traduiria en un cicle cel·lular escurçat d'aquestes cèl·lules representat per una mida inferior en el moment de la septació.

Les cèl·lules $\Delta srk1$ són lleugerament més curtes quan se les compara amb les cèl·lules *wt*. Aquest fet és indicatiu d'una funció de la Srk1 en cada cycle cel·lular, tot i no ser una funció essencial per a la cèl·lula (doncs les cèl·lules delectonades per *srk1* són viables). L'anàlisi de l'activitat de la Srk1 al llarg del cycle permet determinar que en un cycle normal la Srk1 presenta una certa activitat, que és màxima al principi

de la fase G2 i que disminueix a mida que les cèl·lules entren en mitosi. Vist que la Srk1 és capaç de fosforilar la Cdc25 en residus que esdevenen llocs d'unió per la Rad24 vam voler determinar si l'activitat de la Srk1 era necessària per tal que es donés aquesta unió entre la Rad24 i la Cdc25 en un cycle normal prèviament descrita. De forma consistent amb aquesta hipòtesi, l'associació que es dona entre la

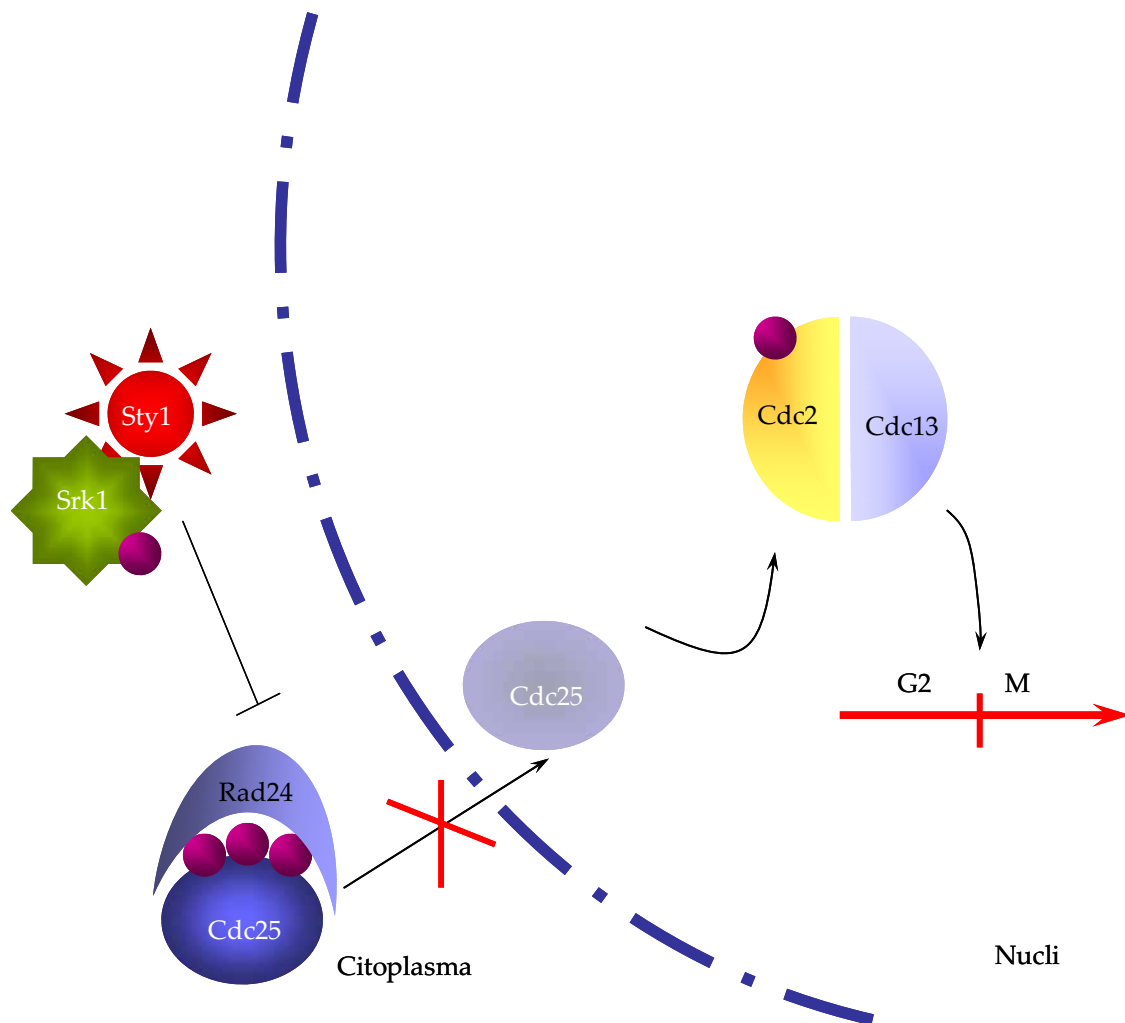


Fig 1. Model de funcionament de la Srk1 en un cycle normal.

Rad24 i la Cdc25 en la soca $\Delta srk1$ és menor que en la soca *wt*. Aquest resultat indica que en condicions normals la Srk1 contribueix a la unió de la Rad24 a la Cdc25, tot i que encara es dona una certa associació que no es pot explicar per la Srk1. Probablement encara hi ha altres quinases que poden participar en aquest procés.

En la figura 1 es mostra el model d'actuació que proposem per la Srk1 en un cicle normal.

2. La Srk1 en la resposta a estrès

Fins el moment, la Srk1 només s'ha descrit que pugui ser fosforilada per la MAPK Sty1. En aquest treball nosaltres hem pogut demostrar que aquesta és una fosforilació activadora i que el residu més plausible on té lloc aquesta fosforilació és la Thr463. Com ja s'indicava en l'apartat dels resultats la fosforilació d'altres residus diferents a aquest és poc probable, donat que el fragment de la Srk1 que comprèn tota la regió N-terminal fins l'aminoàcid 420 no és fosforilat per la Sty1. A més, queden descartats altres residus que no compleixen al consens de fosforilació de les MAPKs, perquè és un fet acceptat que la Sty1 mostra

una gran especificitat de substrat i fosforila únicament i exclusiva residus Ser o Thr seguits de prolina. No se sap, però, si la Sty1 és la quinasa responsable de l'activació de la Srk1 durant un cicle normal. Generalment, s'havia considerat que la MAPK Sty1 era inactiva en absència d'estrès. El fet que en condicions normals el patró d'expressió gènica fos diferent en una soca *wt* que en una soca $\Delta sty1$ indicava que en aquesta situació la Sty1 podia regular la transcripció de certs gens. No s'havia pogut, però, determinar si aquest era un efecte dependent o independent de la seva activitat quinasa. En el llevat de gemmació *S. cerevisiae*, la MAPK Hog1 s'ha implicat en la regulació de la transcripció gènica en resposta a estrès osmòtic perquè pot interaccionar amb el DNA a través del co-activador Hot1 i promoure el reclutament de la RNA PolIII als promotors (Alepuz *et al.*, 2003), així com la histona-deacetilasa Rpd3 (de Nadal *et al.*, 2004). En aquest cas, aquest és un efecte dependent de l'activitat quinasa de la Hog1. També en *S. cerevisiae* s'ha demostrat que la Hog1 en estat inactiu afavoriria la repressió de certs gens de resposta a estrès a

través de la proteïna Sko1. En resposta a estrès osmòtic, la fosforilació de la Sko1 per la Hog1 trencaria la interacció d'aquesta amb proteïnes repressores de la transcripció com ara Ssn6-Tup1 permetent l'expressió d'aquests gens (Proft *et al.*, 2001). De la mateixa manera a *S. pombe* també s'ha suggerit que en condicions normals la forma no fosforilada de l'Atf1 tindria un paper repressor sobre la transcripció de gens (Degols *et al.*, 1997). En ambdós casos es tractaria d'una regulació passiva de la transcripció gènica per part de la MAPK, donat que la repressió es dona en absència d'estímuls i cal una activació de la quinasa per tal que es doni la transcripció activa dels gens. Malgrat això, no s'havia pogut determinar que existís una activitat basal de la MAPK Sty1 en condicions normals. A favor d'aquest plantejament trobàvem que la resposta a dos tipus d'estrès diferents, el xoc tèrmic i l'arsenit s'havien atribuït a la inactivació de la fosfatasa Pyp1 (Nguyen *et al.*, 2000; Rodriguez-Gabriel *et al.*, 2005). En ambdós casos, però, es requeria la presència de la MAPKK Wis1, suggerint que en condicions normals es donava una certa

activitat de la via que era contrarestada per la fosfatasa Pyp1. En resposta a estrès, la inactivació d'aquesta fosfatasa donaria lloc a un augment en l'activitat de la Sty1. De la mateixa manera, la doble delecció de les fosfatases Pyp1 i Pyp2 condueix a una hiperactivació letal de la Sty1, fet que no s'entendria si no partíssim d'una certa activitat basal de la MAPKK Wis1. Recentment i recolzant aquesta idea, en un treball de Lawrence *et al.* s'ha demostrat que l'Atf1 presenta una fosforilació basal per part de la Sty1 que permet que la proteïna sigui estable en absència d'estrès (Lawrence *et al.*, 2007). Així doncs, cada cop esdevé més clar que la Sty1 no és únicament activa en resposta a estrès, sinó que ja en condicions normals hi ha una certa activitat de la via de les MAPKs que permet que la cèl·lula faci front a petits estímuls d'estrès que es generen en el propi procés de la divisió cel·lular. Alternativament, una activació basal de la Sty1 podria facilitar l'adaptació de la cèl·lula enfront un estrès més greu que pogués esdevenir. Val a dir que en condicions normals l'activitat de la Srk1 que es detecta és menor que en resposta a estrès. Probablement aquest fet és degut a

que una activació major no és necessària durant un cicle normal, perquè la funció que tindria la *Srk1* en aquest cas seria la de mantenir inhibida la *Cdc25* que es sintetitza a la cèl·lula fins que no s'hagués donat l'entrada en mitosi. A principi de la fase G2 la quantitat de *Cdc25* en la cèl·lula no és molt elevada, de manera que una activitat baixa de la *Srk1* ja seria suficient per inhibir-la. En canvi, en condicions d'estrès l'activació de la *Srk1* hauria de ser màxima per tal de garantir que la resposta es doni correctament.

D'acord amb això, quan s'analitza l'associació entre la *Rad24* i la *Cdc25* en resposta a estrès, veiem que es troba fortament induïda i que aquest és un efecte que depèn únicament de la presència de la *Srk1* donat que no s'observa en el mutant $\Delta srk1$. Aquesta és una diferència amb el comportament prèviament esmentat de la *Cdc25* en els *checkpoints*, on no es detectava un increment en la unió a la *Rad24*. Potser en el cas de la resposta a estrès, el bloqueig en el cicle cel·lular requereix una inactivació de la *Cdc25* més dràstica.

En línia amb això, quan analitzem l'activació de la *Srk1* en resposta a diferents tipus d'estrès observem

que, curiosament, l'activació que s'obté en resposta a estrès osmòtic és superior a la que s'observa en resposta a estrès oxidatiu. Aquest fet es pot interpretar de diferents maneres. Un primer plantejament podria ser que l'activitat de la *Srk1* en resposta a estrès oxidatiu és menys necessària que en resposta a estrès osmòtic, potser per la presència d'altres efectors de la via. A favor d'aquesta hipòtesi trobem l'existència d'una altra quinasa necessària per a la resposta a estrès oxidatiu, amb elevada semblança a la *Srk1*, la *Cmk2*. En segon lloc, hom podria pensar que en resposta a estrès osmòtic la *Srk1* és responsable de la fosforilació de substrats que requereixen una major activitat de la *Srk1* pel fet de ser menys afins. Així, una activitat menor de la *Srk1* seria suficient per fosforilar substrats d'elevada afinitat, mentre que caldria una activitat major només assolida sota certes condicions per fosforilar altres substrats. D'altra banda, l'activació de la *Srk1* es dosi-dependent, doncs és més forta a mida que augmenta la intensitat de l'estímul. D'aquesta manera la MAPK *Sty1* estaria garantint que la resposta a estrès fos proporcional al tipus i gravetat de l'estrès aplicat.

Quan observem la localització de la Cdc25 en resposta a estrès en una soca *wt* i la comparem amb una soca Δ *srk1* veiem que es dóna un comportament diferent. En la soca *wt* el tractament amb els dos tipus d'estrès provats (KCl 0,6M i H₂O₂ 1mM) provoca la sortida de la Cdc25 del nucli de forma molt ràpida. En canvi en la soca mutant el tractament amb estrès osmòtic no afecta la localització de la Cdc25 que es manté dins el nucli. En el cas de l'estrès oxidatiu, la delecció del gen *srk1* no provoca un efecte tant evident. Tot i que la sortida del nucli de la Cdc25 es veu retardada en comparació amb la soca control (aproximadament 30 min), encara es dóna. Això aniria en concordança amb una activitat menor de la *Srk1* en resposta a estrès oxidatiu i es podria entendre considerant la implicació d'altres quinases. Un bon candidat per a dur a terme aquest efecte seria la quinasa *Cmk2*, que com ja s'ha dit presenta homologia amb la *Srk1* i és essencial per a la resposta a estrès oxidatiu. Un altre candidat que es podria considerar també seria la quinasa del *checkpoint* de dany al DNA *Chk1*. L'H₂O₂ emprada en aquests experiments és una espècie reactiva d'oxigen. Com

a tal pot reaccionar amb diferents components de la cèl·lula com ara lípids i proteïnes. L'H₂O₂ pot afectar també la topologia del DNA tot i que no de forma directa sinó a través de la formació de radicals OH·. Aquests es produeixen en presència de cations dels metalls de transició com ara el Fe²⁺ a través de la reacció de Fenton (Imlay *et al.*, 1988). Els radicals OH· produeixen entre d'altres trencaments de doble cadena i de cadena simple, modificació de bases nitrogenades i formació d'adductes en el DNA. El fet que la sortida de la Cdc25 del nucli es doni relativament tard respecte el moment en que es va aplicar l'estrès podria indicar que la sortida del nucli de la Cdc25 en absència de la *Srk1* no és fruit de la resposta a estrès sinó que sorgeix com a resposta a l'aparició de dany al DNA que activa el *checkpoint* i la *Chk1*.

Una altra possibilitat seria que la pròpia MAPK *Sty1* pogués fosforilar la Cdc25. En cèl·lules de mamífer existeix un *checkpoint* anomenat d'antefase que bloqueja les cèl·lules en resposta a diferents tipus d'estrès. Aquest és un procés dependent de la MAPK p38, però cal dir que aquest *checkpoint* no es

dóna en tots els tipus cel·lulars. En un treball de Bulavin *et al.* s'ha proposat que la p38 pot fosforilar la Cdc25C en el residu Ser216 per tal de dur a terme aquest *checkpoint*. Crida, però, l'atenció que aquest residu Ser216 no compleix el consens de fosforilació per les MAPKs (S/T-P). Aquest mateix residu pot ser fosforilat per les quinases Chk1 i Cds1 (Bulavin *et al.*, 2003). De forma interessant dues posicions abans d'aquesta Ser trobem un altre residu (Ser214) que és substrat de la Cdc2. La fosforilació d'aquests residus és exclouent, de manera que si la Ser214 és fosforilada la Ser216 no és accessible i viceversa. En aquest treball els autors fan servir una sèrie de pèptids sintètics corresponents a la regió 211-221 amb diferents modificacions a les Ser214 i Ser216 de la CDC25C. Aquests pèptids serveixen com a substrat en un assaig quinasa amb la p38 immunoprecipitada d'extractes cel·lulars.

Nosaltres hem pogut demostrar emprant aquests mateixos pèptids que la Srk1 purificada de bacteri pot fosforilar la Ser216 mentre que quan s'utilitza Sty1 com a quinasa no es pot detectar fosforilació en cap dels

pèptids. Sabent això, semblaria més aviat que els resultats obtinguts per Bulavin *et al.* són deguts a la presència d'una altra quinasa (probablement homòloga a la Srk1) en els immunoprecipitats amb capacitat de fosforilar la CDC25C en aquest residu, i no pas a la p38. En paral·lel a la publicació del treball d'aquesta tesi es va publicar un treball per Manke *et al.* (2005) on es demostrava que la MAPKAPK-2 pot fosforilar la CDC25B i la CDC25C en resposta a radiació UV promovent un bloqueig en el cicle cel·lular. La MAPKAPK-2 es troba en condicions normals associada a la p38 de manera que seria probable que en haver immunoprecipitat la p38, la MAPKAPK-2 hagués coimmunoprecipitat i fos responsable de la fosforilació observada en els pèptids. Val a dir que recentment ha estat descrita una fosforilació directa de la CDC25B per part de p38 en el residu Ser249 *in vitro* (Lemaire *et al.*, 2006), de manera que no es pot excloure que la p38 pugui fosforilar la Cdc25C en altres residus diferents a la Ser216.

D'altra banda, quan nosaltres hem immunoprecipitat la *Srk1* inactiva d'extractes de *S. pombe* hem pogut detectar una certa fosforilació de la *Cdc25*, tot i que no dels diferents fragments de la regió N-terminal. Això ens indicaria que també en el cas de la *Srk1* pot coimmunoprecipitar una quinasa amb capacitat de fosforilar la *Cdc25*. Aquesta fosforilació tindria lloc en

residus diferents als que fosforila la *Srk1* i seria interessant determinar si en aquest cas la quinasa que coimmunoprecipita és la *Sty1* i quin significat tindria aquesta fosforilació.

Si continuem analitzant el paper de la *Srk1* en la resposta a estrès, aquest cop atenent a l'estabilitat de la *Cdc25* observem que, almenys en el cas de l'estrès osmòtic, la proteïna

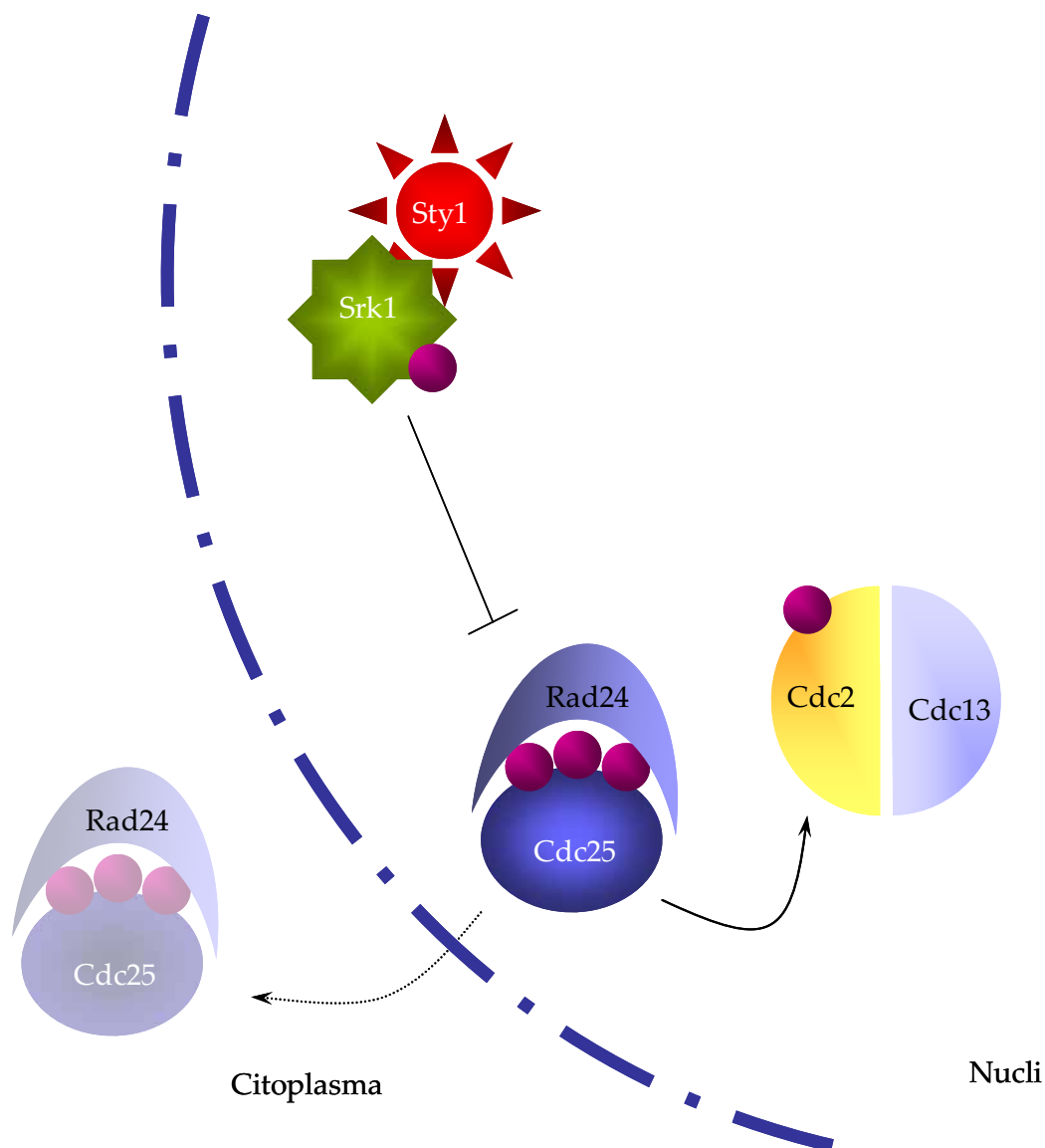


Fig 2. Model de funcionament de la *Srk1* en resposta a estrès.

s'acumula. Aquest és un efecte dependent de la *Srk1* donat que en absència d'aquesta la *Cdc25* esdevé inestable i es torna gairebé indetectable en un *western blot*. Aquesta observació estaria en concordança amb la inducció de la unió entre la *Rad24* i la *Cdc25* en resposta a estrès i de forma dependent de la *Srk1*. Així, totes aquestes dades en conjunt indiquen que en resposta a estrès, la *Srk1* és activada per la MAPK *Sty1* i fosforila la *Cdc25*. Es tracta d'una fosforilació inhibidora, ja que té lloc en residus que han estat prèviament descrits com a diana d'altres quinases que inactiven la *Cdc25*. Cal no oblidar que tot i inhibir-la, la fosforilació de la *Cdc25* estabilitza la proteïna a través de l'associació a una proteïna 14-3-3. Una manera d'interpretar aquest comportament seria que en resposta a estrès la cèl·lula procura aturar la progressió del cicle cel·lular per tal de poder respondre a l'insult i adaptar-se a ell. Aquest comportament ha estat també observat per altres grups, que han vist com era necessari per a la viabilitat de les cèl·lules (Kawasaki *et al.*, 2006). Com que, de forma general una cèl·lula de *S. pombe* es troba en la fase G2 del cicle, aquest

bloqueig es durà a terme a través del regulador positiu d'aquesta fase *Cdc25* (figura 2). Un cop superat l'estrès, la cèl·lula procedeix a dividir-se i per poder fer-ho de la forma més ràpida possible (en cas que torni a trobar-se en una situació adversa) utilitza els reguladors del cicle que ja havia sintetitzat prèviament. En el cas que aquests haguessin estat degradats, la reentrada en el cicle cel·lular seria més lenta, ja que caldria tornar a produir-los. Això suposaria, a part, una despesa d'energia que seria més perjudicial en condicions d'estrès. A *S. cerevisiae*, les cèl·lules presenten una fase G1 més perllongada que les de *S. pombe*, de manera que és més probable que els insults ambientals esdevinguin en aquesta fase del cicle. En aquest cas ha estat descrita una acumulació de l'inhibidor dels complexos *Cdc28*-Ciclins *Sic1*, que afavoriria un bloqueig en la fase G1 (Escote *et al.*, 2004; Zapater *et al.*, 2005), a més d'una repressió de l'expressió de la ciclins d'aquesta fase, la *Cln1* i la *Cln2*. En el cas de *S. pombe*, un comportament semblant no s'ha descrit, però seria interessant investigar l'existència d'un paper similar al de la *Sic1* de l'inhibidor del cicle *Rum1*. De fet, si

que se sap que la Rum1 és necessària per tal que les cèl·lules es bloquegin en resposta a deprivació de les fonts de nitrogen per tal que es dugui a terme la meiosi. No cal oblidar que la deprivació nutricional és un dels molts estímuls capaç d'activar la Sty1, i que les cèl·lules deficientes per la Sty1 presenten esterilitat deguda a la incapacitat de respondre a la manca de fonts de nitrogen. D'acord amb això, ben podria ser que la Sty1 estigués regulant la proteïna Rum1 a algun nivell. En resposta a diferents tipus d'estrès s'observa un increment en el mRNA de la Rum1 que podria ser degut a un augment en la taxa transcripcional del gen. Alternativament, podria tractar-se d'una estabilització del mRNA de la Rum1. El mRNA de la Rum1 conté elements rics en As i Us que s'han relacionat amb la seva inestabilitat (Daga *et al.*, 2003). La Sty1 s'ha implicat en la regulació de l'estabilitat del mRNA de l'Atf1, que conté també elements d'aquest tipus. D'altra banda, la proteïna Csx1 s'ha implicat també en l'estabilització de diversos mRNAs en resposta a estrès oxidatiu, entre els que es troba també el de l'Atf1. D'acord amb això, aquesta proteïna

esdevé essencial únicament en resposta a estrès oxidatiu. La Csx1 s'hiperfosforila en resposta a estrès oxidatiu de forma dependent de la Sty1, tot i que no és clara encara la significança d'aquesta fosforilació (Rodríguez-Gabriel *et al.*, 2003). El mRNA de la Rum1 augmenta en resposta a tractaments altres que l'estrès oxidatiu, de manera que una estabilització a través de la Csx1 no explicaria aquest comportament. Malgrat això, el fet que la Sty1 pugui participar en la regulació de mRNAs en resposta a un tipus d'estrès concret fa pensar que potser també ho pot fer en altres condicions i no permet descartar aquesta hipòtesi. De fet, en cèl·lules de mamífer, la via de la p38 regula l'estabilitat de mRNAs amb seqüències ARE com ara el del TNF α en resposta a inflamació a través de la proteïna TTP (Hitti *et al.*, 2006). Aquest fet recolzaria un paper de les MAPKs en la regulació de l'estabilitat de certs mRNAs en resposta a diferents tipus d'estímul. Atenent al bloqueig en la fase G2 del cicle, en els nostres experiments la delecció de la Srk1 no aconsegueix revertir completament el bloqueig en el cicle cel·lular de cèl·lules sotmeses a estrès osmòtic. Aquest

resultat indica que altres mecanismes participarien també en aquest procés, per tal de garantir que les cèl·lules bloquegin la seva progressió en el cicle en resposta a estrès fins que s'han pogut adaptar. De fet, únicament quan s'ha impedit aquesta adaptació mitjançant la delecció d'*atf1* hem pogut observar un efecte de la delecció del gen *srk1* en el cicle cel·lular. Fins el moment, però, no s'han descrit altres proteïnes implicades en aquest procés. En el cas del llevat *S. cerevisiae*, s'ha pogut observar un bloqueig en la fase G2 del cicle cel·lular dependent de la MAPK Hog1. Aquest bloqueig funciona a través de la quinasa inhibidora del cicle Swe1 (l'homòloga de Wee1), que resulta estabilitzada en resposta a estrès osmòtic (Clotet *et al.*, 2006). De forma interessant, en aquest mecanisme participen proteïnes comuns al *checkpoint* de morfogènesi, com són la quinasa Hsl1 i la proteïna Hsl7. A *S. pombe* la proteïna Wee1 no s'ha implicat encara en aquest procés, però caldria contemplar aquesta possibilitat. En canvi, sí que s'ha estudiat el mecanisme a través del qual les cèl·lules bloquejades poden reiniciar el cicle cel·lular. S'ha

descriu que la proteïna Plo1 és necessària per reentrar en el cicle un cop s'ha superat l'estrès, concretament el xoc de calor. En aquest treball per Petersen *et al.*, mostren com la Plo1 és fosforilada a la Ser402 de forma dependent de la via de resposta a estrès (Petersen *et al.*, 2005). La fosforilació en aquest residu promou el seu reclutament al SPB on pot dur a terme la seva funció. En aquest article proposen que aquesta fosforilació es dona també en un cicle normal, per tal d'ajustar la mitosi en funció de la disponibilitat de nutrients al medi. Malgrat tot, crida l'atenció el fet que la Ser402 no compleix el consens S/T-P de les MAPKs, indicant que la Plo1 no pot ser directament fosforilada per la Sty1. D'altra banda, la fosforilació d'aquest residu es segueix observant en temps on ja no es detecta activitat de la Sty1. Per tant, queda encara irresolt quina és la quinasa responsable d'aquesta fosforilació. Curiosament, en la posició adjacent a la Ser402 trobem una Thr (Thr403) que compleix el consens de les CaM quinases (R-X-X-S/T) i que podria ser substrat de la Srk1. Seria interessant analitzar si la Srk1 pot fosforilar aquest residu *in vivo* i, en

cas afirmatiu, quines conseqüències té aquesta fosforilació.

En aquest estudi hem volgut analitzar també l'existència d'alguna altra via diferent a la de la Sty1 capaç d'activar la Srk1. Els experiments inicials que vam dur a terme per investigar aquesta possibilitat van posar de manifest un efecte diferent a l'esperat. Si bé esperàvem que en deleccionar *sty1* l'activitat observada per la Srk1 fos nul·la en resposta a estrès, el que vam obtenir va ser una disminució dràstica en els nivells de proteïna. En conseqüència, l'activitat associada a aquests extractes era també inapreciable. Aquest fet va cridar la nostra atenció ja que implicava un mecanisme més de regulació de la Srk1 per part de la Sty1.

En cèl·lules de mamífer la MAPK p38 es troba, en condicions normals, formant un complex inactiu però molt estable amb la MAPKAPK-2. D'aquesta manera ambdues proteïnes s'estabilitzen i això es desprèn de l'observació que els ratolins *knock out* per una de les quinases presenten uns nivells molt baixos de l'altra (Sudo *et al.*, 2005; Kotlyarov *et al.*, 2002). A *S. pombe*, no s'ha descrit un comportament

semblant per la Sty1 amb cap dels seus substrats. En canvi recentment sí que s'ha descrit que la fosforilació del factor de transcripció Atf1 per la Sty1 contribueix a la seva estabilitat. En condicions normals un nivell basal de fosforilació és suficient per mantenir uns nivells mínims (Lawrence *et al.*, 2007). D'altra banda, l'Atf1 s'estabilitza a través de la seva unió a Pcr1, que és alhora subjecte de la regulació transcripcional per l'Atf1. Així, la Sty1 estabilitza l'Atf1 per fosforilació, però aquest factor de transcripció també és estable per la seva unió a Pcr1. En conseqüència en cèl·lules $\Delta pcr1$ els nivells de l'Atf1 són molt baixos. En el cas de la Srk1 nosaltres hem pogut determinar que l'estabilitat de la proteïna és dependent de la presència de la Sty1 en la cèl·lula. A més, aquest és un efecte independent de la seva activitat, doncs la proteïna segueix essent estable en una soca on s'ha deleccionat el gen *wis1* i on la MAPK no pot ser activada.

3. La Srk1 en la regulació de Sty1

En aquest treball hem volgut també buscar altres possibles dianes de la Srk1 que poguessin estar participant

en la resposta a estrès. Una de les primeres proteïnes en què vam pensar va ser la proteïna Csx1, donada la semblança amb la proteïna de mamífer TTP, com ja s'ha comentat. Experiments preliminars ja van indicar de bon principi que la Csx1 no era fosforilada *in vivo* per la Srk1. En canvi aquests primers experiments van permetre observar que la sobreexpressió de la Srk1 conduïa a una activació disminuïda de la Sty1 enfront diferents tipus d'estrès. La via d'estrès s'inhibeix gràcies a la presència de dues fosfatases, la Pyp1 i la Pyp2 que defosforilen els residus de la Sty1 prèviament fosforilats per la MAPKK Wis1. Ambdues fosfatases formen part dels gens del CESR, de manera que la seva expressió s'indueix en resposta a estrès. D'aquesta manera, la Sty1 afavoreix la seva pròpia inactivació. Per contra, la pèrdua de les dues fosfatases, igual que la sobreexpressió de la Wis1 condueix a una hiperactivació de la Sty1 en condicions normals que és letal per a la cèl·lula. El fet que la sobreexpressió de la Srk1 produís un bloqueig en la resposta a estrès per part de la Sty1 ens va fer pensar en un primer moment que la Srk1

pogués estar afavorint l'activitat d'aquestes dues fosfatases. Per tal de confirmar aquesta hipòtesi es va dur a terme la sobreexpressió en soques deficientes per una o l'altra fosfatasa sotmeses a diferents tipus d'estrès i es va analitzar la fosforilació de la Sty1, comparant-la amb la de cèl·lules que no sobreexpressaven la Srk1. En condicions normals, totes dues soques presenten un nivell de fosforilació basal de la Sty1 que respon a la sobreexpressió de la Srk1. En canvi en resposta a estrès osmòtic, la soca $\Delta pyp2$ presenta una fosforilació de la Sty1 que no es veu afectada per la sobreexpressió de la Srk1. En el cas de la soca $\Delta pyp1$ el comportament és similar al de la soca *wt*, tot i que el nivell d'activació de què es parteix és superior. Per contra, en resposta a estrès oxidatiu, és la delecció de *pyp1* i no la de *pyp2* la que reverteix l'efecte de la sobreexpressió de la Srk1. En conjunt aquestes dades suggereixen que la Srk1 pot estar afectant l'activació de la Sty1 a través de les fosfatases Pyp1 i Pyp2 i aquest efecte és clar en el cas de la resposta a estrès osmòtic i oxidatiu. Malgrat això, el fet que la delecció de totes dues fosfatases doni lloc a una

activació basal de la Sty1 reprimible per la sobreexpressió de la Srk1 fa sospitar l'existència d'un altre mecanisme que estigui implicat.

Un altre candidat que tindria sentit seria la pròpia MAPKK encarregada de fosforilar la Sty1, la Wis1. Una primera evidència que recolzaria aquesta hipòtesi seria el fet que la Wis1 pot experimentar una fosforilació en residus diferents als d'activació (Ser469 i Thr473) en resposta a xoc tèrmic (Shiozaki *et al.*, 1998). A més, aquesta fosforilació és dependent de l'activitat de la Sty1. Ja en aquest treball es comentava que en vertebrats s'havia suggerit la fosforilació inhibidora de les MAPKKs catalitzada per les MAPKs (Brunet *et al.*, 1994; Gotoh *et al.*, 1994; Saito *et al.*, 1994). D'altra banda, experiments realitzats al grup del Dr. Rodríguez-Gabriel també han permès observar una fosforilació de la Wis1 en residus altres que la Ser469 o la Thr473 en resposta a estrès osmòtic (comunicació personal). Igual que succeïa en el cas anteriorment citat, es tracta d'una fosforilació independent de les MAPKKs i no pot tenir caràcter activador, doncs encara es pot observar en moments en que la Sty1 ja és inactiva. Així, tot semblaria

indicar que la Wis1 pot patir fosforilacions altres que les activadores, que serien dependents de l'activitat de la MAPK i que probablement tindrien un paper inhibidor de la seva funció.

Donada la nostra observació de l'efecte de la sobreexpressió de la Srk1 en la fosforilació de la Sty1 i les dades obtingudes en els mutants de *pyp1* i *pyp2* ens vam plantejar que la Srk1 pogués estar inhibint la Wis1. A favor d'aquesta hipòtesi hem trobat diverses evidències. En primer lloc la sobreexpressió de la Srk1 provoca un retardament en la mobilitat electroforètica de la Wis1, similar a l'obtingut en tractar les cèl·lules de forma mantinguda amb estrès osmòtic. En segon lloc, la Srk1 pot fosforilar de forma eficient la Wis1 en un assaig quinasa *in vitro*. Per últim, la delecció del gen *srk1* elimina parcialment les bandes corresponents a fosforilació de la Wis1 en resposta a estrès osmòtic observades en un *western blot*. Val a dir, però, que la fosforilació no desapareix completament, indicant que poden existir altres quinases implicades en aquesta fosforilació. En la seqüència de la Wis1 trobem quatre residus potencialment fosforilables per la Srk1. Tots quatre

es troben continguts en la regió N-terminal de la proteïna. Amb la intenció de caracteritzar els residus fosforilats *in vivo* per la Srk1 vam mutar el residu Ser17 com a primera aproximació. Aquest residu compleix el consens de fosforilació per a les CaM quinases i, a més, presenta un entorn aminoacídic òptim per a la fosforilació per la Srk1. D'altra banda, aquest residu també ens va semblar interessant perquè es troba contingut en la regió corresponent a la seqüència d'exportació nuclear de la Wis1. Considerant això, vam pensar que una possible fosforilació d'aquest residu per la Srk1 podria estar afectant la localització de la Wis1. Malauradament, la mutació de la Ser17 no va afectar la fosforilació *in vitro* ni *in vivo* de la Wis1, indicant que aquest no era l'únic residu fosforilat per la Srk1. La Wis1 conté una regió necessària per a l'activació de la Sty1 entre els aminoàcids 200 i 300. Aquest domini és essencial perquè la Sty1 s'hi pugui unir i ser activada (Nguyen *et al.*, 2002). En concret, en aquesta regió podem trobar dos motius que compleixen el consens d'ancoratge de les MAPKs R-R-X₄₋₆-L/I-X-L/I (Bardwell and Thorner, 1996; Bardwell *et al.*, 2001).

D'acord amb això, els residus 234-243 i 260-265 estan implicats en la unió entre la Wis1 i la Sty1. En aquesta regió trobem un altre candidat per a la fosforilació per la Srk1, la Ser226. Aquesta Ser es troba molt a prop d'un dels motius d'ancoratge i seria interessant analitzar si la seva fosforilació pot afectar la unió entre la MAPKK i el seu substrat. Aquest seria un mecanisme possible per tal d'impedir que l'activació de la Sty1 fos sostinguda, donat que interrompria la transmissió del senyal cap a la MAPK.

Quin significat té aquest paper de la Srk1? Des del nostre punt de vista, aquest seria un altre mecanisme de retroalimentació negativa que permetria inactivar la Sty1 en resposta estrès. Si no existissin mecanismes d'aquest tipus, la hiperactivació de la Sty1 seria tòxica per a la cèl·lula. En el cas de les fosfatases Pyp1 i Pyp2, la seva expressió s'indueix en resposta a diferents tipus d'estrès i això permet que, un cop s'ha traduït la proteïna, la MAPK pugui ser inactivada. En quant a la Srk1, nosaltres hem demostrat que la proteïna s'activa en resposta a estrès per fosforilació directa per part de la Sty1 i aquesta

activació ràpida permet que la *Srk1* aturi la maquinària del cicle. Altres, però, han demostrat també que el gen *srk1* es troba fortament induït en resposta a estrès. La traducció de proteïnes és un procés més lent que l'activació per fosforilació, de manera que aquesta inducció s'entén millor com un mecanisme d'adaptació a llarg termini que com una resposta immediata a l'estrès. En les nostres mans, no hem pogut observar que el tractament amb estrès doni lloc a un augment en la quantitat de la *Srk1*. Malgrat tot, això es pot entendre si considerem que en una situació d'estrès la maquinària de traducció funciona de forma menys eficient i cal un increment en els nivells de mRNA per assolir uns mateixos nivells de proteïna.

Alternativament, ens hem plantejat una altra possible explicació a l'efecte observat en sobreexpressar la *Srk1*. La fosforilació minvada de la *Sty1* podria també ser deguda a que la sobreexpressió de la *Srk1* hagués afavorit l'expressió de gens adaptatius, de forma que les cèl·lules estarien en certa manera protegides d'estressos futurs i no caldria una activació tan forta de la *Sty1* per respondre. L'efecte contrari

ha estat descrit en el cas de la fosfatasa PP2C en un treball per Gaits *et al.* (Gaits *et al.*, 1997). En un primer moment es va pensar que aquesta fosfatasa regulés negativament l'estat de fosforilació de la *Sty1*. D'acord amb això s'esperava que la sobreexpressió de la PP2C donés lloc a una disminució de l'estat fosforilat de la *Sty1*. Per contra, la sobreexpressió va conduir a un augment en la fosforilació de la *Sty1*. De forma interessant, aquest efecte anava acompanyat de la disminució en la taxa transcripcional de gens del *CESR* com ara *pyp2* i *gpd1*. Així, aquests resultats indicaven que la PP2C regulava negativament factors de transcripció implicats en l'adaptació a l'estrès. En aquest treball no es va poder demostrar la interacció de la PP2C amb l'*Atf1*, i se suggeria que pogués modular l'activitat d'algun co-factor que participés en la resposta transcripcional a estrès.

La sobreexpressió de la *Srk1* té un efecte antagònic al de la PP2C. En aquest cas, la sobreexpressió fa que la fosforilació de la *Sty1* sigui menor. Considerant això no podem excloure que la *Srk1* tingui un paper positiu en la promoció de la transcripció de gens de resposta a

estrès, i seria interessant investigar aquesta possibilitat. De fet, sabem que la transcripció de gens en resposta a estrès és en alguns casos independent de l'Atf1 tot i que dependent de la Sty1. S'ha suggerit que proteïnes codificades per gens del *CESR* (com factors de transcripció, fosfatases o quinases que interaccionen amb la Sty1) puguin estar controlant l'expressió d'aquest mateix grup de gens (Chen *et al.*, 2003). És interessant recordar que la *srk1* és un d'aquests gens regulats en resposta a estrès. En el cas de la MAPKAPK-2/3 de les cèl·lules de mamífer, s'ha descrit una interacció d'aquesta en resposta a estrès amb membres del complex repressor de la transcripció del *polycomb* (Voncken *et al.*, 2005). Suposadament la fosforilació de membres d'aquest complex per la MAPKAPK-2 provocaria canvis en la seva composició que es traduirien en una remodelació de la cromatina amb un efecte desrepressor.

Aquesta darrera hipòtesi proposada no és exclouent de l'anterior, i podria ser que la *Srk1* participés en els dos processos. De fet, si fos així, esdevindria una manera de potenciar el seu efecte, donat que afavoriria l'expressió de gens del

CESR que afavoririen l'adaptació i per tant la inactivació de la Sty1, per una banda i, per l'altra, també provocaria la inducció de la fosfatasa Pyp2 i d'ella mateixa que participarien en la inactivació de la Sty1 de forma directa. Sigui certa una hipòtesi o l'altra, el que sí és clar és que la delecció de la *srk1* provoca una resposta exagerada en la fosforilació de la Sty1, i aquest fet es veu recolzat per un fenotip més curt de les cèl·lules indicatiu de la hiperactivació de la Sty1.

Així, en conjunt, podem concloure que la Sty1 és capaç de regular la *Srk1* a molts nivells. En primer lloc, la Sty1 pot fosforilar i activar la *Srk1*. També en modula la localització, perquè la *Srk1* entra al nucli en resposta a estrès de forma dependent de la Sty1 (Smith *et al.*, 2002). En segon lloc afecta la taxa transcripcional de la *srk1* en resposta a estrès, i per últim també en regula l'estabilitat un cop s'ha sintetitzat la proteïna.

D'altra banda, la *Srk1* és capaç de transmetre el senyal d'estrès a la maquinària del cicle cel·lular, però també hem pogut veure que modula l'activitat de la via per tal que no sigui tòxica per a la cèl·lula. En

definitiva, semblaria que la *Srk1* i la *Sty1* mantinguessin un diàleg que permetés que la resposta de la cèl·lula a l'estrès fos proporcional a la mida i el tipus d'estrès aplicat.

En la figura 3 es mostra un possible model de funcionament de la *Srk1* en la regulació de la *Sty1*.

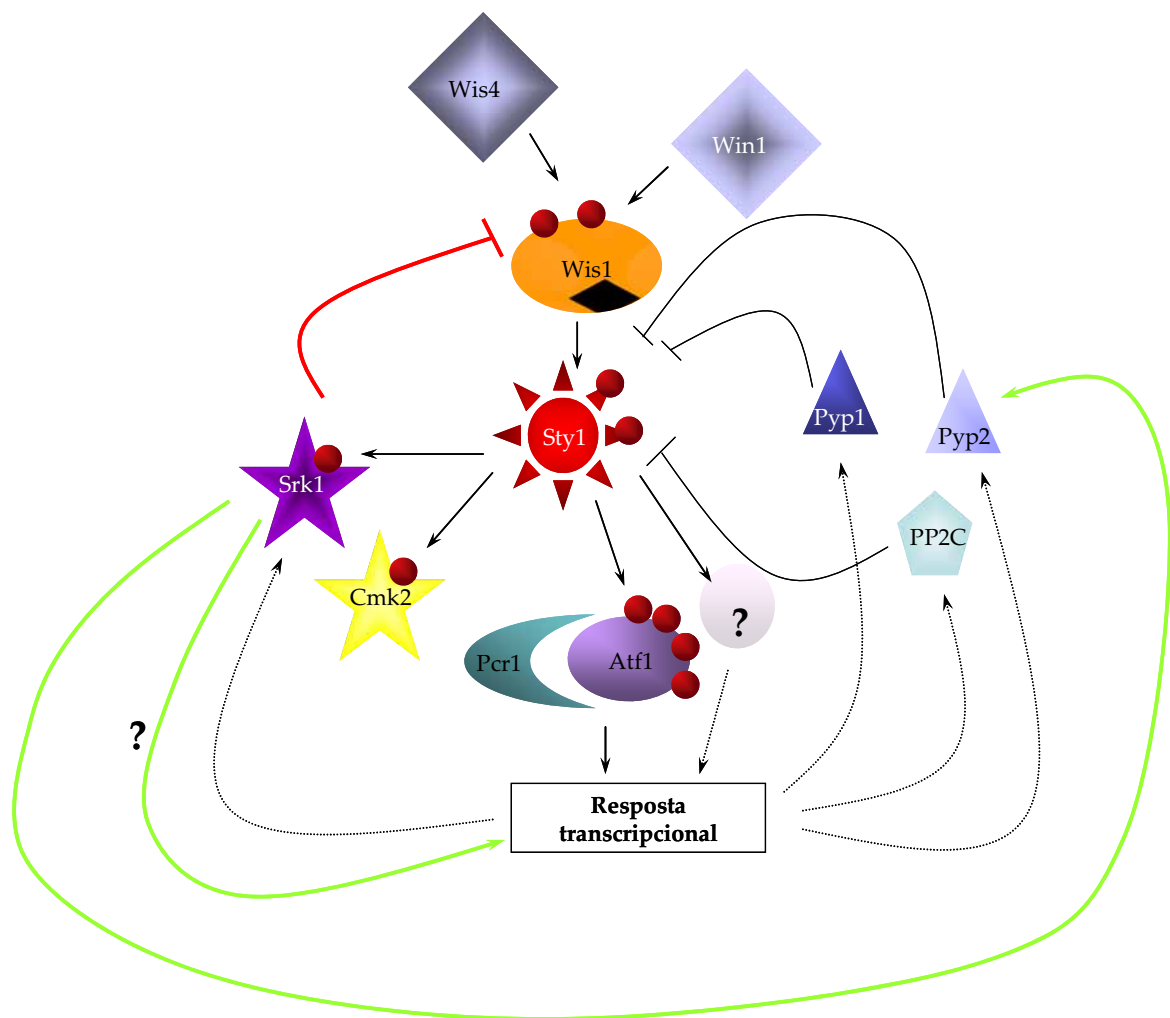


Fig 3. Paper de la *Srk1* en la regulació de l'activitat de la MAPK *Sty1*.

- La sobreexpressió de la *Srk1* però no de la quinasa inactiva *Srk1KA* provoca un bloqueig en la progressió del cicle cel·lular, durant la transició G2/M.
- El bloqueig degut a la sobreexpressió de la *Srk1* té lloc a través de la fosfatasa activadora del cicle *Cdc25* i no a través dels altres reguladors coneguts d'aquesta fase del cicle cel·lular *Wee1* o *Mik1*.
- La sobreexpressió de la *Srk1* afavoreix l'estat fosforilat a la Tyr 15 i inactiu de la *Cdc2*.
- La *Srk1* interacciona amb la *Cdc25* i fosforila el seu domini regulador amino-terminal.
- La fosforilació de la *Cdc25* per part de la *Srk1* és responsable del bloqueig en el cicle cel·lular.
- La *Srk1* fosforila la *Cdc25* en residus prèviament descrits com a dianes de la fosforilació per les quinases dels *checkpoints* de dany al DNA i d'aturada de la replicació *Chk1* i *Cds1*.
- La sobreexpressió de la *Srk1* provoca un augment del nivell de proteïna de la *Cdc25* i la seva acumulació al citoplasma.
- La inhibició de la *Cdc25* per la *Srk1* és dependent de la proteïna 14-3-3 *Rad24*.
- L'activitat de la *Srk1* està regulada al llarg del cicle cel·lular, essent màxima al principi de la fase G2.
- La *Srk1* afavoreix la unió entre la *Cdc25* i la *Rad24* en condicions normals i és necessària per a que es doni la unió entre ambdues proteïnes en resposta a estrès osmòtic.
- La fosforilació de la *Srk1* per part de la *Sty1* l'activa ràpidament en resposta a estrès.
- La *Srk1* no només s'activa en condicions d'estrès osmòtic sinó que també respon a estrès oxidatiu.
- La *Sty1* fosforila la *Srk1* en el residu Thr 463.
- La *Cdc25* és exportada del nucli al citoplasma en resposta a diferents tipus d'estrès de forma dependent de la *Srk1*. En el cas de l'estrès oxidatiu, hi ha implicades altres proteïnes

doncs la delecció de la *Srk1* no aboleix completament la sortida de la *Cdc25* al citoplasma.

- La *Sty1* regula l'estabilitat de la *Srk1*.
- La sobreexpressió de la *Srk1* disminueix l'activació de la *Sty1*.
- Aquest efecte de la sobreexpressió de la *Srk1* en l'estat fosforilat i actiu de la *Sty1* és parcialment dependent de les fosfatases *Pyp1* i *Pyp2*.
- La *Srk1* fosforila la MAPKK *Wis1* *in vitro* i la sobreexpressió de la *Srk1* provoca un canvi en la mobilitat electroforètica de la *Wis1* *in vivo*, suggerint que la *Wis1* pugui ser substrat *in vivo* de la *Srk1*.
- La delecció de la *Srk1* condueix a una hiperactivació de *Sty1* en resposta a estrès.

BIBLIOGRAFIA

1. Abrieu A, Magnaghi-Jaulin L, Kahana JA, Peter M, Castro A, Vigneron S, Lorca T, Cleveland DW, and Labbe JC (2001) Mps1 Is a Kinetochore-Associated Kinase Essential for the Vertebrate Mitotic Checkpoint. *Cell*, **106**, 83-93.
2. al Khodairy F, Fotou E, Sheldrick KS, Griffiths DJ, Lehmann AR, and Carr AM (1994) Identification and characterization of new elements involved in checkpoint and feedback controls in fission yeast. *Mol Biol Cell*, **5**, 147-160.
3. Alcasabas AA, Osborn AJ, Bachant J, Hu F, Werler PJ, Bousset K, Furuya K, Diffley JF, Carr AM, and Elledge SJ (2001) Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53. *Nat Cell Biol*, **3**, 958-965.
4. Alemany V, Sanchez-Piris M, Bachs O, and Aligue R (2002) Cmk2, a novel serine/threonine kinase in fission yeast. *FEBS Letters*, **524**, 79-86.
5. Alepuz PM, de Nadal E, Zapater M, Ammerer G, and Posas F (2003) Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *EMBO J*, **22**, 2433-2442.
6. Alexander MR, Tyers M, Perret M, Craig BM, Fang KS, and Gustin MC (2001) Regulation of Cell Cycle Progression by Swe1p and Hog1p Following Hypertonic Stress. *Mol Biol Cell*, **12**, 53-62.
7. Alfa CE, Booher R, Beach D, and Hyams JS (1989) Fission yeast cyclin: subcellular localisation and cell cycle regulation. *J Cell Sci Suppl*, **12:9-19**, 9-19.
8. Alfa CE, Ducommun B, Beach D, and Hyams JS (1990) Distinct nuclear and spindle pole body populations of cyclin-cdc2 in fission yeast. *Nature*, **347**, 680-682.
9. Aligue R, Akhavan-Niak H, and Russell P (1994) A role for Hsp90 in cell cycle control: Wee1 tyrosine kinase activity requires interaction with Hsp90. *EMBO J*, **13**, 6099-6106.
10. Aligue R, Wu L, and Russell P (1997) Regulation of Schizosaccharomyces pombe Wee1 Tyrosine Kinase. *J Biol Chem*, **272**, 13320-13325.
11. Alvarez B, Blanco MA, and Moreno S (2006) The fission yeast APC activator Ste9 is regulated by mRNA decay. *Cell Cycle*, **5**, 865-868.
12. Amon A, Irniger S, and Nasmyth K (1994) Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins in the next cycle. *Cell*, **77**, 1037-1050.
13. Asp E and Sunnerhagen P (2003) Mkp1 and Mkp2, two MAPKAP-kinase homologues in Schizosaccharomyces pombe, interact with the MAP kinase Sty1. *Mol Genet Genomics*, **268**, 585-597.
14. Ayte J, Schweitzer C, Zarzov P, Nurse P, and DeCaprio JA (2001) Feedback regulation of the MBF transcription factor by cyclin Cig2. *Nat Cell Biol*, **3**, 1043-1050.
15. Azzam R, Chen SL, Shou W, Mah AS, Alexandru G, Nasmyth K, Annan RS, Carr SA, and Deshaies RJ (2004) Phosphorylation by Cyclin B-Cdk Underlies Release of

- Mitotic Exit Activator Cdc14 from the Nucleolus. *Science*, **305**, 516-519.
16. Baber-Furnari BA, Rhind N, Boddy MN, Shanahan P, Lopez-Girona A, and Russell P (2000) Regulation of Mitotic Inhibitor Mik1 Helps to Enforce the DNA Damage Checkpoint. *Mol Biol Cell*, **11**, 1-11.
 17. Bahler J, Wu JQ, Longtine MS, Shah NG, McKenzie A, III, Steever AB, Wach A, Philippsen P, and Pringle JR (1998a) Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, **14**, 943-951.
 18. Bahler J, Steever AB, Wheatley S, Wang YL, Pringle JR, Gould KL, and McCollum D (1998b) Role of Polo Kinase and Mid1p in Determining the Site of Cell Division in Fission Yeast. *J Cell Biol*, **143**, 1603-1616.
 19. Bardin AJ, Visintin R, and Amon A (2000) A Mechanism for Coupling Exit from Mitosis to Partitioning of the Nucleus. *Cell*, **102**, 21-31.
 20. Bardwell AJ, Flatauer LJ, Matsukuma K, Thorner J, and Bardwell L (2001) A Conserved Docking Site in MEKs Mediates High-affinity Binding to MAP Kinases and Cooperates with a Scaffold Protein to Enhance Signal Transmission. *J Biol Chem*, **276**, 10374-10386.
 21. Bardwell L and Thorner J (1996) A conserved motif at the amino termini of MEKs might mediate high-affinity interaction with the cognate MAPKs. *Trends in Biochemical Sciences*, **21**, 373-374.
 22. Basi G and Draetta G (1995) p13suc1 of *Schizosaccharomyces pombe* regulates two distinct forms of the mitotic cdc2 kinase. *Mol Cell Biol*, **15**, 2028-2036.
 23. Basi G, Schmid E, and Maundrell K (1993) TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe* nmt1 promoter affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene*, **123**, 131-136.
 24. Baum B, Nishitani H, Yanow S, and Nurse P (1998) Cdc18 transcription and proteolysis couple S phase to passage through mitosis. *EMBO J*, **17**, 5689-5698.
 25. Benito J, Martin-Castellanos C, and Moreno S (1998) Regulation of the G1 phase of the cell cycle by periodic stabilization and degradation of the p25rum1 CDK inhibitor. *EMBO J*, **17**, 482-497.
 26. Bentley NJ, Holtzman DA, Flaggs G, Keegan KS, DeMaggio A, Ford JC, Hoekstra M, and Carr AM (1996) The *Schizosaccharomyces pombe* rad3 checkpoint gene. *EMBO J*, **15**, 6641-6651.
 27. Bernard P, Hardwick K, and Javerzat JP (1998) Fission Yeast Bub1 Is a Mitotic Centromere Protein Essential for the Spindle Checkpoint and the Preservation of Correct Ploidy through Mitosis. *J Cell Biol*, **143**, 1775-1787.
 28. Bilsland-Marchesan E, Arino J, Saito H, Sunnerhagen P, and Posas F (2000) Rck2 Kinase Is a Substrate for the Osmotic Stress-Activated Mitogen-Activated Protein Kinase Hog1. *Mol Cell Biol*, **20**, 3887-3895.
 29. Blanco MA, Sanchez-Diaz A, de Prada JM, and Moreno S (2000) APC(ste9/srw1) promotes degradation of mitotic cyclins in G(1) and is inhibited by cdc2

- phosphorylation. *EMBO J*, **19**, 3945-3955.
30. Boddy MN, Furnari B, Mondesert O, and Russell P (1998) Replication Checkpoint Enforced by Kinases Cds1 and Chk1. *Science*, **280**, 909-912.
 31. Boddy MN, Gaillard PH, McDonald WH, Shanahan P, Yates JR, and Russell P (2001) Mus81-Eme1 Are Essential Components of a Holliday Junction Resolvase. *Cell*, **107**, 537-548.
 32. Booher R and Beach D (1987) Interaction between cdc13+ and cdc2+ in the control of mitosis in fission yeast; dissociation of the G1 and G2 roles of the cdc2+ protein kinase. *EMBO J*, **6**, 3441-3447.
 33. Booher R and Beach D (1988) Involvement of cdc13+ in mitotic control in *Schizosaccharomyces pombe*: possible interaction of the gene product with microtubules. *EMBO J*, **7**, 2321-2327.
 34. Bozonet SM, Findlay VJ, Day AM, Cameron J, Veal EA, and Morgan BA (2005) Oxidation of a Eukaryotic 2-Cys Peroxiredoxin Is a Molecular Switch Controlling the Transcriptional Response to Increasing Levels of Hydrogen Peroxide. *J Biol Chem*, **280**, 23319-23327.
 35. Brady DM and Hardwick KG (2000) Complex formation between Mad1p, Bub1p and Bub3p is crucial for spindle checkpoint function. *Current Biology*, **10**, 675-678.
 36. Brewster JL, de Valoir T, Dwyer ND, Winter E, and Gustin MC (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*, **259**, 1760-1763.
 37. Bridge AJ, Morphew M, Bartlett R, and Hagan IM (1998) The fission yeast SPB component Cut12 links bipolar spindle formation to mitotic control. *Genes Dev*, **12**, 927-942.
 38. Brondello JM, Boddy MN, Furnari B, and Russell P (1999) Basis for the Checkpoint Signal Specificity That Regulates Chk1 and Cds1 Protein Kinases. *Mol Cell Biol*, **19**, 4262-4269.
 39. Brunet A, Pages G, and Pouyssegur J (1994) Growth factor-stimulated MAP kinase induces rapid retrophosphorylation and inhibition of MAP kinase kinase (MEK1). *FEBS Lett*, **346**, 299-303.
 40. Buck V, Russell P, and Millar JB (1995) Identification of a cdk-activating kinase in fission yeast. *EMBO J*, **14**, 6173-6183.
 41. Buck V, Quinn J, Pino TS, Martin H, Saldanha J, Makino K, Morgan BA, and Millar JBA (2001) Peroxide Sensors for the Fission Yeast Stress-activated Mitogen-activated Protein Kinase Pathway. *Mol Biol Cell*, **12**, 407-419.
 42. Bueno A and Russell P (1993) Two fission yeast B-type cyclins, cig2 and Cdc13, have different functions in mitosis. *Mol Cell Biol*, **13**, 2286-2297.
 43. Bueno A, Richardson H, Reed SI, and Russell P (1991) A fission yeast B-type cyclin functioning early in the cell cycle. *Cell*, **66**, 149-159.
 44. Bulavin DV, Higashimoto Y, Demidenko ZN, Meek S, Graves P, Phillips C, Zhao H, Moody SA, Appella E, Piwnicka-Worms H, and Fornace AJ (2003) Dual phosphorylation controls Cdc25

- phosphatases and mitotic entry. *Nat Cell Biol*, **5**, 545-551.
45. Carr AM, MacNeill SA, Hayles J, and Nurse P (1989) Molecular cloning and sequence analysis of mutant alleles of the fission yeast *cdc2* protein kinase gene: implications for *cdc2+* protein structure and function. *Mol Gen Genet*, **218**, 41-49.
 46. Caspari T, Dahlen M, Kanter-Smoler G, Lindsay HD, Hofmann K, Papadimitriou K, Sunnerhagen P, and Carr AM (2000) Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Hus1: a PCNA-Related Protein That Associates with Rad1 and Rad9. *Mol Cell Biol*, **20**, 1254-1262.
 47. Caspari T, Murray JM, and Carr AM (2002) Cdc2-cyclin B kinase activity links Crb2 and Rqh1-topoisomerase III. *Genes Dev*, **16**, 1195-1208.
 48. Casso D and Beach D (1996) A mutation in a thioredoxin reductase homolog suppresses p53-induced growth inhibition in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet*, **252**, 518-529.
 49. Castillo EA, Ayte J, Chiva C, Moldon A, Carrascal M, Abian J, Jones N, and Hidalgo E (2002) Diethylmaleate activates the transcription factor Pap1 by covalent modification of critical cysteine residues. *Molecular Microbiology*, **45**, 243-254.
 50. Chang L, Morrell JL, Feoktistova A, and Gould KL (2001) Study of Cyclin Proteolysis in Anaphase-Promoting Complex (APC) Mutant Cells Reveals the Requirement for APC Function in the Final Steps of the Fission Yeast Septation Initiation Network. *Mol Cell Biol*, **21**, 6681-6694.
 51. Chen D, Toone WM, Mata J, Lyne R, Burns G, Kivinen K, Brazma A, Jones N, and Bahler J (2003) Global Transcriptional Responses of Fission Yeast to Environmental Stress. *Mol Biol Cell*, **14**, 214-229.
 52. Chen L, Liu TH, and Walworth NC (1999) Association of Chk1 with 14-3-3 proteins is stimulated by DNA damage. *Genes Dev*, **13**, 675-685.
 53. Christensen PU, Bentley NJ, Martinho RG, Nielsen O, and Carr AM (2000) Mik1 levels accumulate in S phase and may mediate an intrinsic link between S phase and mitosis. *PNAS*, **97**, 2579-2584.
 54. Ciosk R, Zachariae W, Michaelis C, Shevchenko A, Mann M, and Nasmyth K (1998) An ESP1/PDS1 Complex Regulates Loss of Sister Chromatid Cohesion at the Metaphase to Anaphase Transition in Yeast. *Cell*, **93**, 1067-1076.
 55. Clarke PR, Hoffmann I, Draetta G, and Karsenti E (1993) Dephosphorylation of *cdc25-C* by a type-2A protein phosphatase: specific regulation during the cell cycle in *Xenopus* egg extracts. *Mol Biol Cell*, **4**, 397-411.
 56. Clotet J, Escote X, Adrover MA, Yaakov G, Gari E, Aldea M, de Nadal E, and 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.
 57. Coleman TR, Tang Z, and Dunphy WG (1993) Negative regulation of the *wee1* protein kinase by direct action of the *nim1/cdr1* mitotic inducer. *Cell*, **72**, 919-929.

58. Connolly T and Beach D (1994) Interaction between the Cig1 and Cig2 B-type cyclins in the fission yeast cell cycle. *Mol Cell Biol*, **14**, 768-776.
59. Connolly T, Caligiuri M, and Beach D (1997) The Cdc2 protein kinase controls Cdc10/Sct1 complex formation. *Mol Biol Cell*, **8**, 1105-1115.
60. Correa-Bordes J, Gulli MP, and Nurse P (1997) p25rum1 promotes proteolysis of the mitotic B-cyclin p56cdc13 during G1 of the fission yeast cell cycle. *EMBO J*, **16**, 4657-4664.
61. Correa-Bordes J and Nurse P (1995) p25rum1 orders S phase and mitosis by acting as an inhibitor of the p34cdc2 mitotic kinase. *Cell*, **83**, 1001-1009.
62. Cottarel G (1997) Mcs4, a Two-Component System Response Regulator Homologue, Regulates the Schizosaccharomyces pombe Cell Cycle Control. *Genetics*, **147**, 1043-1051.
63. Creanor J and Mitchison JM (1996) The kinetics of the B cyclin p56cdc13 and the phosphatase p80cdc25 during the cell cycle of the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *J Cell Sci*, **109**, 1647-1653.
64. Cueille N, Salimova E, Esteban V, Blanco M, Moreno S, Bueno A, and Simanis V (2001) Flp1, a fission yeast orthologue of the S. cerevisiae CDC14 gene, is not required for cyclin degradation or rum1p stabilisation at the end of mitosis. *J Cell Sci*, **114**, 2649-2664.
65. Daga RR and Jimenez J (1999) Translational control of the cdc25 cell cycle phosphatase: a molecular mechanism coupling mitosis to cell growth. *J Cell Sci*, **112**, 3137-3146.
66. Daga RR, Bolanos P, and Moreno S (2003) Regulated mRNA Stability of the Cdk Inhibitor Rum1 Links Nutrient Status to Cell Cycle Progression. *Current Biology*, **13**, 2015-2024.
67. Damagnez V, Makela TP, and Cottarel G (1995) Schizosaccharomyces pombe Mop1-Mcs2 is related to mammalian CAK. *EMBO J*, **14**, 6164-6172.
68. de Nadal E, Zapater M, Alepuz PM, Sumoy L, Mas G, and Posas F (2004) The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoresponsive genes. *Nature*, **427**, 370-374.
69. Degols G and Russell P (1997) Discrete roles of the Spc1 kinase and the Atf1 transcription factor in the UV response of Schizosaccharomyces pombe. *Mol Cell Biol*, **17**, 3356-3363.
70. Degols G, Shiozaki K, and Russell P (1996) Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in Schizosaccharomyces pombe. *Mol Cell Biol*, **16**, 2870-2877.
71. Dunand-Sauthier I, Walker CA, Narasimhan J, Pearce AK, Wek RC, and Humphrey TC (2005) Stress-Activated Protein Kinase Pathway Functions To Support Protein Synthesis and Translational Adaptation in Response to Environmental Stress in Fission Yeast. *Eukaryotic Cell*, **4**, 1785-1793.
72. Dunphy G (1994) The decision to enter mitosis. *Trends in Cell Biology*, **4**, 202-207.

73. Edwards RJ, Bentley NJ, and Carr AM (1999) A Rad3-Rad26 complex responds to DNA damage independently of other checkpoint proteins. *Nat Cell Biol*, **1**, 393-398.
74. Escote X, Zapater M, Clotet J, and Posas F (2004) Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nat Cell Biol*, **6**, 997-1002.
75. Esteban V, Blanco M, Cueille N, Simanis V, Moreno S, and Bueno A (2004) A role for the Cdc14-family phosphatase Flp1p at the end of the cell cycle in controlling the rapid degradation of the mitotic inducer Cdc25p in fission yeast. *J Cell Sci*, **117**, 2461-2468.
76. Fantes PA (1981) Isolation of cell size mutants of a fission yeast by a new selective method: characterization of mutants and implications for division control mechanisms. *J Bacteriol*, **146**, 746-754.
77. Featherstone C and Russell P (1991) Fission yeast p107wee1 mitotic inhibitor is a tyrosine/serine kinase. *Nature*, **349**, 808-811.
78. Fenech M, Carr AM, Murray J, Watts FZ, and Lehmann AR (1991) Cloning and characterization of the rad4 gene of *Schizosaccharomyces pombe*; a gene showing short regions of sequence similarity to the human XRCC1 gene. *Nucl Acids Res*, **19**, 6737-6741.
79. Fesquet D, Fitzpatrick PJ, Johnson AL, Kramer KM, Toyn JH, and Johnston LH (1999) A Bub2p-dependent spindle checkpoint pathway regulates the Dbf2p kinase in budding yeast. *EMBO J*, **18**, 2424-2434.
80. Firestein R and Feuerstein N (1998) Association of Activating Transcription Factor 2 α (ATF2) with the Ubiquitin-conjugating Enzyme hUBC9. IMPLICATION OF THE UBIQUITIN/PROTEASOME PATHWAY IN REGULATION OF ATF2 IN T CELLS. *J Biol Chem*, **273**, 5892-5902.
81. Fisher DL and Nurse P (1996) A single fission yeast mitotic cyclin B p34cdc2 kinase promotes both S-phase and mitosis in the absence of G1 cyclins. *EMBO J*, **15**, 850-860.
82. Ford JC, al Khodairy F, Fotou E, Sheldrick KS, Griffiths DJ, and Carr AM (1994) 14-3-3 protein homologs required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Science*, **265**, 533-535.
83. Forsburg SL and Nurse P (1994) Analysis of the *Schizosaccharomyces pombe* cyclin puc1: evidence for a role in cell cycle exit. *J Cell Sci*, **107**, 601-613.
84. Forsburg SL and Nurse P (1991) Identification of a G1-type cyclin puc1+ in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, **351**, 245-248.
85. Fuchs SY and Ronai Z (1999) Ubiquitination and Degradation of ATF2 Are Dimerization Dependent. *Mol Cell Biol*, **19**, 3289-3298.
86. Fuchs SY, Tappin I, and Ronai Z (2000) Stability of the ATF2 Transcription Factor Is Regulated by Phosphorylation and Dephosphorylation. *J Biol Chem*, **275**, 12560-12564.
87. Fukuda M, Gotoh Y, and Nishida E (1997) Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of

- MAP kinase. *EMBO J*, **16**, 1901-1908.
88. Funabiki H, Yamano H, Kumada K, Nagao K, Hunt T, and Yanagida M (1996) Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature*, **381**, 438-441.
89. Furnari B, Blasina A, Boddy MN, McGowan CH, and Russell P (1999) Cdc25 Inhibited In Vivo and In Vitro by Checkpoint Kinases Cds1 and Chk1. *Mol Biol Cell*, **10**, 833-845.
90. Gachet Y, Tournier S, Millar JB, and Hyams JS (2004) Mechanism controlling perpendicular alignment of the spindle to the axis of cell division in fission yeast. *EMBO J*, **23**, 1289-1300.
91. Gachet Y, Tournier S, Millar JBA, and Hyams JS (2001) A MAP kinase-dependent actin checkpoint ensures proper spindle orientation in fission yeast. *Nature*, **412**, 352-355.
92. Gaits F, Degols G, Shiozaki K, and Russell P (1998) Phosphorylation and association with the transcription factor Atf1 regulate localization of Spc1/Sty1 stress-activated kinase in fission yeast. *Genes Dev*, **12**, 1464-1473.
93. Gaits F and Russell P (1999) Active Nucleocytoplasmic Shuttling Required for Function and Regulation of Stress-Activated Kinase Spc1/Sty1 in Fission Yeast. *Mol Biol Cell*, **10**, 1395-1407.
94. Gaits F, Shiozaki K, and Russell P (1997) Protein Phosphatase 2C Acts Independently of Stress-activated Kinase Cascade to Regulate the Stress Response in Fission Yeast. *J Biol Chem*, **272**, 17873-17879.
95. Gallagher IM, Alfa CE, and Hyams JS (1993) p63cdc13, a B-type cyclin, is associated with both the nucleolar and chromatin domains of the fission yeast nucleus. *Mol Biol Cell*, **4**, 1087-1096.
96. Garcia MA, Vardy L, Koonrugsu N, and Toda T (2001) Fission yeast ch-TOG/XMAP215 homologue Alp14 connects mitotic spindles with the kinetochore and is a component of the Mad2-dependent spindle checkpoint. *EMBO J*, **20**, 3389-3401.
97. Goes FS and Martin J (2001) Hsp90 chaperone complexes are required for the activity and stability of yeast protein kinases Mik1, Wee1 and Swe1. *European Journal of Biochemistry*, **268**, 2281-2289.
98. Gotoh Y, Matsuda S, Takenaka K, Hattori S, Iwamatsu A, Ishikawa M, Kosako H, and Nishida E (1994) Characterization of recombinant Xenopus MAP kinase kinases mutated at potential phosphorylation sites. *Oncogene*, **9**, 1891-1898.
99. Gould KL, Moreno S, Tonks NK, and Nurse P (1990) Complementation of the mitotic activator, p80cdc25, by a human protein-tyrosine phosphatase. *Science*, **250**, 1573-1576.
100. Gould KL and Nurse P (1989) Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature*, **342**, 39-45.
101. Green CM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, and Lowndes NF (2000) A novel Rad24 checkpoint protein complex closely related to replication factor C. *Current Biology*, **10**, 39-42.

102. Greenall A, Hadcroft AP, Malakasi P, Jones N, Morgan BA, Hoffman CS, and Whitehall SK (2002) Role of Fission Yeast Tup1-like Repressors and Prr1 Transcription Factor in Response to Salt Stress. *Mol Biol Cell*, **13**, 2977-2989.
103. Griffiths DJ, Barbet NC, McCreedy S, Lehmann AR, and Carr AM (1995) Fission yeast rad17: a homologue of budding yeast RAD24 that shares regions of sequence similarity with DNA polymerase accessory proteins. *EMBO J*, **14**, 5812-5823.
104. Gruneberg U, Glotzer M, Gartner A, and Nigg EA (2002) The CeCDC-14 phosphatase is required for cytokinesis in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *J Cell Biol*, **158**, 901-914.
105. Gupta S, Campbell D, Derijard B, and Davis RJ (1995) Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science*, **267**, 389-393.
106. Hardwick KG, Weiss E, Luca FC, Winey M, and Murray AW (1996) Activation of the Budding Yeast Spindle Assembly Checkpoint Without Mitotic Spindle Disruption. *Science*, **273**, 953-956.
107. Harper JW and Elledge SJ (1998) The role of Cdk7 in CAK function, a retro-retrospective. *Genes Dev*, **12**, 285-289.
108. Hayles J and Nurse P (1995) A pre-start checkpoint preventing mitosis in fission yeast acts independently of p34cdc2 tyrosine phosphorylation. *EMBO J*, **14**, 2760-2771.
109. Hayles J, Fisher D, Woollard A, and Nurse P (1994) Temporal order of S phase and mitosis in fission yeast is determined by the state of the p34cdc2-mitotic B cyclin complex. *Cell*, **78**, 813-822.
110. He X, Jones MH, Winey M, and Sazer S (1998) Mph1, a member of the Mps1-like family of dual specificity protein kinases, is required for the spindle checkpoint in *S. pombe*. *J Cell Sci*, **111**, 1635-1647.
111. He X, Patterson TE, and Sazer S (1997) The *Schizosaccharomyces pombe* spindle checkpoint protein mad2p blocks anaphase and genetically interacts with the anaphase-promoting complex. *PNAS*, **94**, 7965-7970.
112. Henchoz S, Chi Y, Catarin B, Herskowitz I, Deshaies RJ, and Peter M (1997) Phosphorylation- and ubiquitin-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor Far1p in budding yeast. *Genes Dev*, **11**, 3046-3060.
113. Hermand D, Pihlak A, Westerling T, Damagnez V, Vandenhaute J, Cottarel G, and Makela TP (1998) Fission yeast Csk1 is a CAK-activating kinase (CAKAK). *EMBO J*, **17**, 7230-7238.
114. Hermand D, Bamps S, Tafforeau L, Vandenhaute J, and Makela TP (2003) Skp1 and the F-box Protein Pof6 Are Essential for Cell Separation in Fission Yeast. *J Biol Chem*, **278**, 9671-9677.
115. Hershko A (1997) Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control. *Current Opinion in Cell Biology*, **9**, 788-799.
116. Hirota K, Hoffman CS, Shibata T, and Ohta K (2003) Fission Yeast Tup1-Like Repressors Repress Chromatin Remodeling at the

- fbp1+ Promoter and the ade6-M26 Recombination Hotspot. *Genetics*, **165**, 505-515.
117. Hitti E, Iakovleva T, Brook M, Deppenmeier S, Gruber AD, Radzioch D, Clark AR, Blackshear PJ, Kotlyarov A, and Gaestel M (2006) Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase 2 Regulates Tumor Necrosis Factor mRNA Stability and Translation Mainly by Altering Tristetraprolin Expression, Stability, and Binding to Adenine/Uridine-Rich Element. *Mol Cell Biol*, **26**, 2399-2407.
118. Hoffmann I, Clarke PR, Marcote MJ, Karsenti E, and Draetta G (1993) Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *EMBO J*, **12**, 53-63.
119. Howell BJ, Hoffman DB, Fang G, Murray AW, and Salmon ED (2000) Visualization of Mad2 Dynamics at Kinetochores, along Spindle Fibers, and at Spindle Poles in Living Cells. *J Cell Biol*, **150**, 1233-1250.
120. Howell BJ, Moree B, Farrar EM, Stewart S, Fang G, and Salmon ED (2004) Spindle Checkpoint Protein Dynamics at Kinetochores in Living Cells. *Current Biology*, **14**, 953-964.
121. Hudson JD, Feilotter H, and Young PG (1990) stf1: Non-Wee Mutations Epistatic to cdc25 in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, **126**, 309-315.
122. Hudson JW, Kozarova A, Cheung P, Macmillan JC, Swallow CJ, Cross JC, and Dennis JW (2001) Late mitotic failure in mice lacking Sak, a polo-like kinase. *Current Biology*, **11**, 441-446.
123. Iino Y and Yamamoto M (1985) Negative Control for the Initiation of Meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *PNAS*, **82**, 2447-2451.
124. Ikui AE, Furuya K, Yanagida M, and Matsumoto T (2002) Control of localization of a spindle checkpoint protein, Mad2, in fission yeast. *J Cell Sci*, **115**, 1603-1610.
125. Imlay JA, Chin SM, and Linn S (1988) Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*, **240**, 640-642.
126. Ishii K, Kumada K, Toda T, and Yanagida M (1996) Requirement for PP1 phosphatase and 20S cyclosome/APC for the onset of anaphase is lessened by the dosage increase of a novel gene sds23+. *EMBO J*, **15**, 6629-6640.
127. Izumi T and Maller JL (1993) Elimination of cdc2 phosphorylation sites in the cdc25 phosphatase blocks initiation of M-phase. *Mol Biol Cell*, **4**, 1337-1350.
128. Jallepalli PV and Kelly TJ (1996) Rum1 and Cdc18 link inhibition of cyclin-dependent kinase to the initiation of DNA replication in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev*, **10**, 541-552.
129. Jallepalli PV, Brown GW, Muzi-Falconi M, Tien D, and Kelly TJ (1997) Regulation of the replication initiator protein p65cdc18 by CDKáphosphorylation. *Genes Dev*, **11**, 2767-2779.
130. Jallepalli PV, Tien D, and Kelly TJ (1998) sud1+ targets cyclin-dependent kinase-phosphorylated Cdc18 and Rum1 proteins for degradation and stops unwanted diploidization in fission yeast. *PNAS*, **95**, 8159-8164.

131. Jamieson DJ (1992) *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J Bacteriol*, **174**, 6678-6681.
132. Jang YJ, Won M, Chung KS, Kim DU, Hoe KL, Park C, and Yoo HS (1997) A Novel Protein, Psp1, Essential for Cell Cycle Progression of *Schizosaccharomyces pombe* Is Phosphorylated by Cdc2-Cdc13 upon Entry into G0-like Stationary Phase of Cell Growth. *J Biol Chem*, **272**, 19993-20002.
133. Jaspersen SL, Charles JF, and Morgan DO (1999) Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Current Biology*, **9**, 227-236.
134. Jaspersen SL, Charles JF, Tinker-Kulberg RL, and Morgan DO (1998) A Late Mitotic Regulatory Network Controlling Cyclin Destruction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **9**, 2803-2817.
135. Jia ZP, McCullough N, Martel R, Hemmingsen S, and Young PG (1992) Gene amplification at a locus encoding a putative Na⁺/H⁺ antiporter confers sodium and lithium tolerance in fission yeast. *EMBO J*, **11**, 1631-1640.
136. Kadura S, He X, Vanoosthuyse V, Hardwick KG, and Sazer S (2005) The A78V Mutation in the Mad3-like Domain of *Schizosaccharomyces pombe* Bub1p Perturbs Nuclear Accumulation and Kinetochore Targeting of Bub1p, Bub3p, and Mad3p and Spindle Assembly Checkpoint Function. *Mol Biol Cell*, **16**, 385-395.
137. Kaliraman V, Mullen JR, Fricke WM, Bastin-Shanower SA, and Brill SJ (2001) Functional overlap between Sgs1-Top3 and the Mms4-Mus81 endonuclease. *Genes Dev*, **15**, 2730-2740.
138. Kanoh J, Watanabe Y, Ohsugi M, Iino Y, and Yamamoto M (1996) *Schizosaccharomyces pombe* gad7+ encodes a phosphoprotein with a bZIP domain, which is required for proper G1 arrest and gene expression under nitrogen starvation. *Genes Cells*, **1**, 391-408.
139. Kato T, Jr., Okazaki K, Murakami H, Stettler S, Fantès PA, and Okayama H (1996) Stress signal, mediated by a Hog1-like MAP kinase, controls sexual development in fission yeast. *FEBS Lett*, **378**, 207-212.
140. Kawasaki Y, Nagao K, Nakamura T, and Yanagida M (2006) Fission yeast MAP kinase is required for the increased securin-separase interaction that rescues separase mutants under stresses. *Cell Cycle*, **5**, 1831-1839.
141. Kim IG, Rhee DK, Jeong JW, Kim SC, Won M, Lee J, Song KW, and Kim HB (2003) Mad1p, a component of the spindle assembly checkpoint in fission yeast, suppresses a novel septation-defective mutant, sun1, in a cell-division cycle. *FEMS Microbiology Letters*, **227**, 183-188.
142. Kim SH, Lin DP, Matsumoto S, Kitazono A, and Matsumoto T (1998) Fission Yeast Slp1: An Effector of the Mad2-Dependent Spindle Checkpoint. *Science*, **279**, 1045-1047.
143. King RW, Peters JM, Tugendreich S, Rolfe M, Hieter P, and Kirschner MW (1995) A 20s complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific

- conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell*, **81**, 279-288.
144. Kitamura K, Maekawa H, and Shimoda C (1998) Fission Yeast Ste9, a Homolog of Hct1/Cdh1 and Fizzy-related, Is a Novel Negative Regulator of Cell Cycle Progression during G1-Phase. *Mol Biol Cell*, **9**, 1065-1080.
145. Kominami K and Toda T (1997) Fission yeast WD-repeat protein pop1 regulates genome ploidy through ubiquitin-proteasome-mediated degradation of the CDK inhibitor Rum1 and the S-phase initiator Cdc18. *Genes Dev*, **11**, 1548-1560.
146. Kominami Ki, Ochotorena I, and Toda T (1998) Two F-box/WD-repeat proteins Pop1 and Pop2 form hetero- and homo-complexes together with cullin-1 in the fission yeast SCF (Skp1-Cullin-1-F-box) ubiquitin ligase. *Genes to Cells*, **3**, 721-735.
147. Kommajosyula N and Rhind N (2006) Cdc2 Tyrosine Phosphorylation is Not Required for the S-Phase DNA Damage Checkpoint in Fission Yeast. *Cell Cycle*, **5**.
148. Kon N, Krawchuk MD, Warren BG, Smith GR, and Wahls WP (1997) Transcription factor Mts1/Mts2 (Atf1/Pcr1, Gad7/Pcr1) activates the M26 meiotic recombination hotspot in pombe. *PNAS*, **94**, 13765-13770.
149. Kon N, Schroeder SC, Krawchuk MD, and Wahls WP (1998) Regulation of the Mts1-Mts2-Dependent ade6-M26 Meiotic Recombination Hot Spot and Developmental Decisions by the Spc1 Mitogen-Activated Protein Kinase of Fission Yeast. *Mol Cell Biol*, **18**, 7575-7583.
150. Kondo T, Wakayama T, Naiki T, Matsumoto K, and Sugimoto K (2001) Recruitment of Mec1 and Ddc1 Checkpoint Proteins to Double-Strand Breaks Through Distinct Mechanisms. *Science*, **294**, 867-870.
151. Kotlyarov A, Yannoni Y, Fritz S, Laass K, Telliez JB, Pitman D, Lin LL, and Gaestel M (2002) Distinct Cellular Functions of MK2. *Mol Cell Biol*, **22**, 4827-4835.
152. Kovelman R and Russell P (1996) Stockpiling of Cdc25 during a DNA replication checkpoint arrest in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*, **16**, 86-93.
153. Kraft C, Herzog F, Gieffers C, Mechtler K, Hagting A, Pines J, and Peters JM (2003) Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *EMBO J*, **22**, 6598-6609.
154. Krapp A, Schmidt S, Cano E, and Simanis V (2001) *S. pombe* cdc11p, together with sid4p, provides an anchor for septation initiation network proteins on the spindle pole body. *Current Biology*, **11**, 1559-1568.
155. Kuang J, Ashorn CL, Gonzalez-Kuyvenhoven M, and Penkala JE (1994) cdc25 is one of the MPM-2 antigens involved in the activation of maturation-promoting factor. *Mol Biol Cell*, **5**, 135-145.
156. Kudo N, Taoka H, Toda T, Yoshida M, and Horinouchi S (1999) A Novel Nuclear Export Signal Sensitive to Oxidative Stress in the Fission Yeast Transcription Factor Pap1. *J Biol Chem*, **274**, 15151-15158.
157. Kumada K, Nakamura T, Nagao K, Funabiki H, Nakagawa T, and Yanagida M (1998) Cut1 is loaded

- onto the spindle by binding to Cut2 and promotes anaphase spindle movement upon Cut2 proteolysis. *Current Biology*, **8**, 633-641.
158. Kumagai A and Dunphy WG (1996) Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts. *Science*, **273**, 1377-1380.
159. Kumagai A and Dunphy WG (1992) Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts. *Cell*, **70**, 139-151.
160. Kushner S. An improved method for transformation of *Escherichia coli* with colE1 derived plasmids. 1978. Elsevier, Amsterdam.
Ref Type: Generic
161. Labib K and Moreno S (1996) rum1: a CDK inhibitor regulating G1 progression in fission yeast. *Trends in Cell Biology*, **6**, 62-66.
162. Langan TA, Gautier J, Lohka M, Hollingsworth R, Moreno S, Nurse P, Maller J, and Sclafani RA (1989) Mammalian growth-associated H1 histone kinase: a homolog of cdc2+/CDC28 protein kinases controlling mitotic entry in yeast and frog cells. *Mol Cell Biol*, **9**, 3860-3868.
163. Lanker S, Valdivieso MH, and Wittenberg C (1996) Rapid degradation of the G1 cyclin Cln2 induced by CDK-dependent phosphorylation. *Science*, **271**, 1597-1601.
164. Lawrence CL, Maekawa H, Worthington JL, Reiter W, Wilkinson CRM, and Jones N (2007) Regulation of *Schizosaccharomyces pombe* Atf1 Protein Levels by Sty1-mediated Phosphorylation and Heterodimerization with Pcr1. *J Biol Chem*, **282**, 5160-5170.
165. Leatherwood J, Lopez-Girona A, and Russell P (1996) Interaction of Cdc2 and Cdc15 with a fission yeast ORC2-like protein. *Nature*, **379**, 360-363.
166. Lee J, Dawes IW, and Roe JH (1995) Adaptive response of *Schizosaccharomyces pombe* to hydrogen peroxide and menadione. *Microbiology*, **141**, 3127-3132.
167. Lee J, Dawes IW, and Roe JH (1997) Isolation, Expression, and Regulation of the pgr1+ Gene Encoding Glutathione Reductase Absolutely Required for the Growth of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*, **272**, 23042-23049.
168. Lee KS, Grenfell TZ, Yarm FR, and Erikson RL (1998) Mutation of the polo-box disrupts localization and mitotic functions of the mammalian polo kinase Plk. *PNAS*, **95**, 9301-9306.
169. Lee MS, Enoch T, and Piwnicka-Worms H (1994) mik1+ encodes a tyrosine kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15. *J Biol Chem*, **269**, 30530-30537.
170. Lehmann AR (1993) Duplicated region of sequence similarity to the human XRCC1 DNA repair gene in the *Schizosaccharomyces pombe* rad4/cut5 gene. *Nucl Acids Res*, **21**, 5274.
171. Lemaire M, Froment C, Boutros R, Mondesert O, Nebreda AR, Monsarrat B, and Ducommun B (2006) CDC25B phosphorylation by p38 and MK-2. *Cell Cycle*, **5**, 1649-1653.

172. Li L, Ernsting BR, Wishart MJ, Lohse DL, and Dixon JE (1997) A Family of Putative Tumor Suppressors Is Structurally and Functionally Conserved in Humans and Yeast. *J Biol Chem*, **272**, 29403-29406.
173. Li XY and Green MR (1996) Intramolecular inhibition of activating transcription factor-2 function by its DNA-binding domain. *Genes Dev*, **10**, 517-527.
174. Lindquist S and Kim G (1996) Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. *PNAS*, **93**, 5301-5306.
175. Lindsay HD, Griffiths DJF, Edwards RJ, Christensen PU, Murray JM, Osman F, Walworth N, and Carr AM (1998) S-phase-specific activation of Cds1 kinase defines a subpathway of the checkpoint response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev*, **12**, 382-395.
176. Livingstone C, Patel G, and Jones N (1995) ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO J*, **14**, 1785-1797.
177. Loewith R, Hubberstey A, and Young D (2000) Skh1, the MEK component of the mkh1 signaling pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci*, **113**, 153-160.
178. Lopez-Aviles S, Grande M, Gonzalez M, Helgesen AL, Alemany V, Sanchez-Piris M, Bachs O, Millar JBA, and Aligue R (2005) Inactivation of the Cdc25 Phosphatase by the Stress-Activated Srk1 Kinase in Fission Yeast. *Molecular Cell*, **17**, 49-59.
179. Lopez-Girona A, Furnari B, Mondesert O, and Russell P (1999) Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature*, **397**, 172-175.
180. Lopez-Girona A, Kanoh J, and Russell P (2001) Nuclear exclusion of Cdc25 is not required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Current Biology*, **11**, 50-54.
181. Lopez-Girona A, Mondesert O, Leatherwood J, and Russell P (1998) Negative Regulation of Cdc18 DNA Replication Protein by Cdc2. *Mol Biol Cell*, **9**, 63-73.
182. Lundgren K, Walworth N, Booher R, Dembski M, Kirschner M, and Beach D (1991) mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell*, **64**, 1111-1122.
183. MacIver FH, Tanaka K, Robertson AM, and Hagan IM (2003) Physical and functional interactions between polo kinase and the spindle pole component Cut12 regulate mitotic commitment in *S. pombe*. *Genes Dev*, **17**, 1507-1523.
184. Madrid M, Soto T, Franco A, Paredes V, Vicente J, Hidalgo E, Gacto M, and Cansado J (2004) A Cooperative Role for Atf1 and Pap1 in the Detoxification of the Oxidative Stress Induced by Glucose Deprivation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*, **279**, 41594-41602.
185. Madrid M, Soto T, Khong HK, Franco A, Vicente J, Perez P, Gacto M, and Cansado J (2006) Stress-induced Response, Localization, and Regulation of the Pmk1 Cell Integrity Pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*, **281**, 2033-2043.
186. Maeda T, Wurgler-Murphy SM, and Saito H (1994) A two-

- component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, **369**, 242-245.
187. Maekawa H, Kitamura K, and Shimoda C (1998) The Ste16 WD-repeat protein regulates cell-cycle progression under starvation through the Rum1 protein in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet*, **33**, 29-37.
188. Makiniemi M, Hillukkala T, Tuusa J, Reini K, Vaara M, Huang D, Pospiech H, Majuri I, Westerling T, Makela TP, and Syvaaja JE (2001) BRCT domain-containing protein TopBP1 functions in DNA replication and damage response. *J Biol Chem*, **276**, 30399-30406.
189. Manke IA, Nguyen A, Lim D, Stewart MQ, Elia AEH, and Yaffe MB (2005) MAPKAP Kinase-2 Is a Cell Cycle Checkpoint Kinase that Regulates the G2/M Transition and S Phase Progression in Response to UV Irradiation. *Molecular Cell*, **17**, 37-48.
190. Martin-Castellanos C, Labib K, and Moreno S (1996) B-type cyclins regulate G1 progression in fission yeast in opposition to the p25rum1 cdk inhibitor. *EMBO J*, **15**, 839-849.
191. Martin-Castellanos C, Blanco MA, de Prada JM, and Moreno S (2000) The puc1 Cyclin Regulates the G1 Phase of the Fission Yeast Cell Cycle in Response to Cell Size. *Mol Biol Cell*, **11**, 543-554.
192. Masumoto H, Muramatsu S, Kamimura Y, and Araki H (2002) S-Cdk-dependent phosphorylation of Sld2 essential for chromosomal DNA replication in budding yeast. *Nature*, **415**, 651-655.
193. Matsusaka T, Hirata D, Yanagida M, and Toda T (1995) A novel protein kinase gene *ssp1+* is required for alteration of growth polarity and actin localization in fission yeast. *EMBO J*, **14**, 3325-3338.
194. Maundrell K (1990) *nmt1* of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *J Biol Chem*, **265**, 10857-10864.
195. Maundrell K (1993) Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene*, **123**, 127-130.
196. May KM, Reynolds N, Cullen CF, Yanagida M, and Ohkura H (2002) Polo boxes and Cut23 (Apc8) mediate an interaction between polo kinase and the anaphase-promoting complex for fission yeast mitosis. *J Cell Biol*, **156**, 23-28.
197. McFarlane RJ, Carr AM, and Price C (1997) Characterisation of the *Schizosaccharomyces pombe* *rad4/cut5* mutant phenotypes: dissection of DNA replication and G2 checkpoint control function. *Mol Gen Genet*, **255**, 332-340.
198. McGowan CH and Russell P (1995) Cell cycle regulation of human WEE1. *EMBO J*, **14**, 2166-2175.
199. McGowan CH and Russell P (1993) Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *EMBO J*, **12**, 75-85.
200. Melo JA, Cohen J, and Toczyski DP (2001) Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo. *Genes Dev*, **15**, 2809-2821.
201. Michaelis C, Ciosk R, and Nasmyth K (1997) Cohesins: Chromosomal

- Proteins that Prevent Premature Separation of Sister Chromatids. *Cell*, **91**, 35-45.
202. Millar JB, Buck V, and Wilkinson MG (1995) Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes Dev*, **9**, 2117-2130.
203. Millar JB, Lenaers G, and Russell P (1992a) Pyp3 PTPase acts as a mitotic inducer in fission yeast. *EMBO J*, **11**, 4933-4941.
204. Millar JB, McGowan CH, Lenaers G, Jones R, and Russell P (1991) p80cdc25 mitotic inducer is the tyrosine phosphatase that activates p34cdc2 kinase in fission yeast. *EMBO J*, **10**, 4301-4309.
205. Millar JB, Russell P, Dixon JE, and Guan KL (1992b) Negative regulation of mitosis by two functionally overlapping PTPases in fission yeast. *EMBO J*, **11**, 4943-4952.
206. Millband DN and Hardwick KG (2002) Fission Yeast Mad3p Is Required for Mad2p To Inhibit the Anaphase-Promoting Complex and Localizes to Kinetochores in a Bub1p-, Bub3p-, and Mph1p-Dependent Manner. *Mol Cell Biol*, **22**, 2728-2742.
207. Mitchison JM (1957) The growth of single cells : I. *Schizosaccharomyces pombe*. *Experimental Cell Research*, **13**, 244-262.
208. Molz L, Booher R, Young P, and Beach D (1989) cdc2 and the Regulation of Mitosis: Six Interacting mcs Genes. *Genetics*, **122**, 773-782.
209. Mondesert O, McGowan CH, and Russell P (1996) Cig2, a B-type cyclin, promotes the onset of S in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*, **16**, 1527-1533.
210. Moradas-Ferreira P and Costa V (2000) Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death. *Redox Rep*, **5**, 277-285.
211. Moreno S, Klar A, and Nurse P (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol*, **194:795-823.**, 795-823.
212. Moreno S and Nurse P (1994) Regulation of progression through the G1 phase of the cell cycle by the rum1+ gene. *Nature*, **367**, 236-242.
213. Moreno S, Nurse P, and Russell P (1990) Regulation of mitosis by cyclic accumulation of p80cdc25 mitotic inducer in fission yeast. *Nature*, **344**, 549-552.
214. Morgan DO (1997) CYCLIN-DEPENDENT KINASES: Engines, Clocks, and Microprocessors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **13**, 261-291.
215. Mueller PR, Coleman TR, and Dunphy WG (1995) Cell cycle regulation of a Xenopus Wee1-like kinase. *Mol Biol Cell*, **6**, 119-134.
216. Mulvihill DP and Hyams JS (2002) Cytokinetic actomyosin ring formation and septation in fission yeast are dependent on the full recruitment of the polo-like kinase Plo1 to the spindle pole body and a functional spindle assembly checkpoint. *J Cell Sci*, **115**, 3575-3586.

217. Mulvihill DP, Petersen J, Ohkura H, Glover DM, and Hagan IM (1999) Plo1 Kinase Recruitment to the Spindle Pole Body and Its Role in Cell Division in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*, **10**, 2771-2785.
218. Murakami H and Okayama H (1995) A kinase from fission yeast responsible for blocking mitosis in S phase. *Nature*, **374**, 817-819.
219. Nakagawa CW, Mutoh N, and Hayashi Y (1995) Transcriptional Regulation of Catalase Gene in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*: Molecular Cloning of the Catalase Gene and Northern Blot Analyses of the Transcript. *J Biochem (Tokyo)*, **118**, 109-116.
220. Nefsky B and Beach D (1996) Ubr1 acts as an E6-AP-like protein ubiquitin ligase in the degradation of cdc25. *EMBO J*, **15**, 1301-1312.
221. Nguyen AN, Ikner AD, Shiozaki M, Warren SM, and Shiozaki K (2002) Cytoplasmic Localization of Wis1 MAPKK by Nuclear Export Signal Is Important for Nuclear Targeting of Spc1/Sty1 MAPK in Fission Yeast. *Mol Biol Cell*, **13**, 2651-2663.
222. Nguyen AN, Lee A, Place W, and Shiozaki K (2000) Multistep Phosphorelay Proteins Transmit Oxidative Stress Signals to the Fission Yeast Stress-activated Protein Kinase. *Mol Biol Cell*, **11**, 1169-1181.
223. Nguyen AN and Shiozaki K (1999) Heat shock-induced activation of stress MAP kinase is regulated by threonine- and tyrosine-specific phosphatases. *Genes Dev*, **13**, 1653-1663.
224. Nishizawa M, Kawasumi M, Fujino M, and Toh-e A (1998) Phosphorylation of Sic1, a Cyclin-dependent Kinase (Cdk) Inhibitor, by Cdk Including Pho85 Kinase Is Required for Its Prompt Degradation. *Mol Biol Cell*, **9**, 2393-2405.
225. Noguchi E, Shanahan P, Noguchi C, and Russell P (2002) CDK Phosphorylation of Drc1 Regulates DNA Replication in Fission Yeast. *Current Biology*, **12**, 599-605.
226. Norbury C and Moreno S (1997) Cloning cell cycle regulatory genes by transcomplementation in yeast. *Methods Enzymol*, **283:44-59**, 44-59.
227. Nurse P (1975) Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature*, **256**, 547-551.
228. Nurse P and Bissett Y (1981) Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature*, **292**, 558-560.
229. Nurse P and Thuriaux P (1980) REGULATORY GENES CONTROLLING MITOSIS IN THE FISSION YEAST SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE. *Genetics*, **96**, 627-637.
230. O'Connell MJ, Raleigh JM, Verkade HM, and Nurse P (1997) Chk1 is a wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation. *EMBO J*, **16**, 545-554.
231. Obara-Ishihara T and Okayama H (1994) A B-type cyclin negatively regulates conjugation via interacting with cell cycle 'start' genes in fission yeast. *EMBO J*, **13**, 1863-1872.
232. Ogden JE and Fantes PA (1986) Isolation of a novel type of mutation in the mitotic control of

- Schizosaccharomyces pombe whose phenotypic expression is dependent on the genetic background and nutritional environment. *Curr Genet*, **10**, 509-514.
233. Ohkura H, Hagan IM, and Glover DM (1995) The conserved Schizosaccharomyces pombe kinase plo1, required to form a bipolar spindle, the actin ring, and septum, can drive septum formation in G1 and G2 cells. *Genes Dev*, **9**, 1059-1073.
234. Ohmiya R, Kato C, Yamada H, Aiba H, and Mizuno T (1999) Isolation of multicopy suppressors of the calcium sensitivity of a mutant lacking the bZIP transcription factor Atf1 in fission yeast. *Mol Gen Genet*, **261**, 297-306.
235. Ohmiya R, Yamada H, Nakashima K, Aiba H, and Mizuno T (1995) Osmoregulation of fission yeast: cloning of two distinct genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase, one of which is responsible for osmotolerance for growth. *Mol Microbiol*, **18**, 963-973.
236. Otilie S, Chernoff J, Hannig G, Hoffman CS, and Erikson RL (1992) The fission yeast genes pyp1+ and pyp2+ encode protein tyrosine phosphatases that negatively regulate mitosis. *Mol Cell Biol*, **12**, 5571-5580.
237. Parker LL and Piwnica-Worms H (1992) Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science*, **257**, 1955-1957.
238. Parker LL, Walter SA, Young PG, and Piwnica-Worms H (1993) Phosphorylation and inactivation of the mitotic inhibitor Weel by the nim1/cdr1 kinase. *Nature*, **363**, 736-738.
239. Peng CY, Graves PR, Thoma RS, Wu Z, Shaw AS, and Piwnica-Worms H (1997) Mitotic and G2 Checkpoint Control: Regulation of 14-3-3 σ Protein Binding by Phosphorylation of Cdc25C on Serine-216. *Science*, **277**, 1501-1505.
240. Pereira G, Hofken T, Grindlay J, Manson C, and Schiebel E (2000) The Bub2p Spindle Checkpoint Links Nuclear Migration with Mitotic Exit. *Molecular Cell*, **6**, 1-10.
241. Pereira G, Manson C, Grindlay J, and Schiebel E (2002) Regulation of the Bfa1p-Bub2p complex at spindle pole bodies by the cell cycle phosphatase Cdc14p. *J Cell Biol*, **157**, 367-379.
242. Petersen J and Hagan IM (2005) Polo kinase links the stress pathway to cell cycle control and tip growth in fission yeast. *Nature*, **435**, 507-512.
243. Petersen J and Hagan IM (2003) S. pombe Aurora Kinase/Survivin Is Required for Chromosome Condensation and the Spindle Checkpoint Attachment Response. *Current Biology*, **13**, 590-597.
244. Posas F and Saito H (1998) Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J*, **17**, 1385-1394.
245. Proft M, Pascual-Ahuir A, de Nadal E, Arino J, Serrano R, and Posas F (2001) Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J*, **20**, 1123-1133.

246. Qian YW, Erikson E, and Maller JL (1998) Purification and Cloning of a Protein Kinase That Phosphorylates and Activates the Polo-Like Kinase Plx1. *Science*, **282**, 1701-1704.
247. Quinn J, Findlay VJ, Dawson K, Millar JBA, Jones N, Morgan BA, and Toone WM (2002) Distinct Regulatory Proteins Control the Graded Transcriptional Response to Increasing H₂O₂ Levels in Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*, **13**, 805-816.
248. Rabilloud T, Heller M, Gasnier F, Luche S, Rey C, Aebersold R, Benahmed M, Louisot P, and Lunardi J (2002) Proteomics Analysis of Cellular Response to Oxidative Stress. EVIDENCE FOR IN VIVO OVEROXIDATION OF PEROXIREDOXINS AT THEIR ACTIVE SITE. *J Biol Chem*, **277**, 19396-19401.
249. Raleigh JM and O'Connell MJ (2000) The G(2) DNA damage checkpoint targets both Wee1 and Cdc25. *J Cell Sci*, **113**, 1727-1736.
250. Reinhardt HC, Aslanian AS, Lees JA, and Yaffe MB (2007) p53-Deficient Cells Rely on ATM- and ATR-Mediated Checkpoint Signaling through the p38MAPK/MK2 Pathway for Survival after DNA Damage. *Cancer Cell*, **11**, 175-189.
251. Rhind N and Russell P (2001) Roles of the Mitotic Inhibitors Wee1 and Mik1 in the G2 DNA Damage and Replication Checkpoints. *Mol Cell Biol*, **21**, 1499-1508.
252. Rhind N and Russell P (1998) The *Schizosaccharomyces pombe* S-Phase Checkpoint Differentiates Between Different Types of DNA Damage. *Genetics*, **149**, 1729-1737.
253. Rodriguez-Gabriel MA, Burns G, McDonald WH, Martin V, Yates JR, III, Bahler J, and Russell P (2003) RNA-binding protein Csx1 mediates global control of gene expression in response to oxidative stress. *EMBO J*, **22**, 6256-6266.
254. Rodriguez-Gabriel MA and Russell P (2005) Distinct Signaling Pathways Respond to Arsenite and Reactive Oxygen Species in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell*, **4**, 1396-1402.
255. Rouse J and Jackson SP (2002) Interfaces Between the Detection, Signaling, and Repair of DNA Damage. *Science*, **297**, 547-551.
256. Rudner AD and Murray AW (2000) Phosphorylation by Cdc28 Activates the Cdc20-dependent Activity of the Anaphase-promoting Complex. *J Cell Biol*, **149**, 1377-1390.
257. Rupes I, Jia Z, and Young PG (1999) Ssp1 Promotes Actin Depolymerization and Is Involved in Stress Response and New End Take-Off Control in Fission Yeast. *Mol Biol Cell*, **10**, 1495-1510.
258. Russell P and Nurse P (1987b) Negative regulation of mitosis by *wee1+*, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell*, **49**, 559-567.
259. Russell P and Nurse P (1987a) The mitotic inducer *nim1+* functions in a regulatory network of protein kinase homologs controlling the initiation of mitosis. *Cell*, **49**, 569-576.
260. Russell P and Nurse P (1986) *Schizosaccharomyces pombe* and *saccharomyces cerevisiae*: A look at yeasts divided. *Cell*, **45**, 781-782.

261. Russo AA, Jeffrey PD, and Pavletich NP (1996) Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struct Biol*, **3**, 696-700.
262. Saito Y, Gomez N, Campbell DG, Ashworth A, Marshall CJ, and Cohen P (1994) The threonine residues in MAP kinase kinase 1 phosphorylated by MAP kinase in vitro are also phosphorylated in nerve growth factor-stimulated rat pheochromocytoma (PC12) cells. *FEBS Lett*, **341**, 119-124.
263. Saka Y, Esashi F, Matsusaka T, Mochida S, and Yanagida M (1997) Damage and replication checkpoint control in fission yeast is ensured by interactions of Crb2, a protein with BRCT motif, with Cut5 and Chk1. *Genes Dev*, **11**, 3387-3400.
264. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 1998. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Ref Type: Generic
265. Samejima I, Mackie S, and Fantes PA (1997) Multiple modes of activation of the stress-responsive MAP kinase pathway in fission yeast. *EMBO J*, **16**, 6162-6170.
266. Samejima I, Lourenco PCC, Snaith HA, and Sawin KE (2005) Fission Yeast mto2p Regulates Microtubule Nucleation by the Centrosomin-related Protein mto1p. *Mol Biol Cell*, **16**, 3040-3051.
267. Samejima I, Mackie S, Warbrick E, Weisman R, and Fantes PA (1998) The Fission Yeast Mitotic Regulator win1+ Encodes an MAP Kinase Kinase Kinase That Phosphorylates and Activates Wis1 MAP Kinase Kinase in Response to High Osmolarity. *Mol Biol Cell*, **9**, 2325-2335.
268. Sanchez Y, Wong C, Thoma RS, Richman R, Wu Z, Piwnicka-Worms H, and Elledge SJ (1997) Conservation of the Chk1 checkpoint in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science*, **277**, 1497-1501.
269. Sanchez-Piris M, Posas F, Alemany V, Winge I, Hidalgo E, Bachs O, and Aligue R (2002) The Serine/Threonine Kinase Cmk2 Is Required for Oxidative Stress Response in Fission Yeast. *J Biol Chem*, **277**, 17722-17727.
270. Sato M, Koonruga N, Toda T, Vardy L, Tournier S, and Millar JBA (2003) Deletion of Mia1/Alp7 activates Mad2-dependent spindle assembly checkpoint in fission yeast. *Nat Cell Biol*, **5**, 764-766.
271. Schneider BL, Yang QH, and Futcher AB (1996) Linkage of Replication to Start by the Cdk Inhibitor Sic1. *Science*, **272**, 560-562.
272. Schuller C, Brewster JL, Alexander MR, Gustin MC, and Ruis H (1994) The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *EMBO J*, **13**, 4382-4389.
273. Sengar AS, Markley NA, Marini NJ, and Young D (1997) Mkh1, a MEK kinase required for cell wall integrity and proper response to osmotic and temperature stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*, **17**, 3508-3519.
274. Seong YS, Kamijo K, Lee JS, Fernandez E, Kuriyama R, Miki T, and Lee KS (2002) A Spindle

- Checkpoint Arrest and a Cytokinesis Failure by the Dominant-negative Polo-box Domain of Plk1 in U-2 OS Cells. *J Biol Chem*, **277**, 32282-32293.
275. Shah JV, Botvinick E, Bonday Z, Furnari F, Berns M, and Cleveland DW (2004) Dynamics of Centromere and Kinetochore Proteins: Implications for Checkpoint Signaling and Silencing. *Current Biology*, **14**, 942-952.
276. Shieh JC, Wilkinson MG, Buck V, Morgan BA, Makino K, and Millar JB (1997) The Mcs4 response regulator coordinately controls the stress-activated Wak1-Wis1-Sty1 MAP kinase pathway and fission yeast cell cycle. *Genes Dev*, **11**, 1008-1022.
277. Shimada M, Okuzaki D, Tanaka S, Tougan T, Tamai KK, Shimoda C, and Nojima H (1999) Replication Factor C3 of *Schizosaccharomyces pombe*, a Small Subunit of Replication Factor C Complex, Plays a Role in Both Replication and Damage Checkpoints. *Mol Biol Cell*, **10**, 3991-4003.
278. Shiozaki K and Russell P (1996) Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev*, **10**, 2276-2288.
279. Shiozaki K and Russell P (1995) Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAP kinase kinase homolog in the osmoregulation of fission yeast. *EMBO J*, **14**, 492-502.
280. Shiozaki K, Shiozaki M, and Russell P (1997) Mcs4 mitotic catastrophe suppressor regulates the fission yeast cell cycle through the Wis1-Spc1 kinase cascade. *Mol Biol Cell*, **8**, 409-419.
281. Shiozaki K, Shiozaki M, and Russell P (1998) Heat Stress Activates Fission Yeast Spc1/Sty1 MAPK by a MEKK-Independent Mechanism. *Mol Biol Cell*, **9**, 1339-1349.
282. Smith DA, Toone WM, Chen D, Bahler J, Jones N, Morgan BA, and Quinn J (2002) The *Srk1* Protein Kinase Is a Target for the Sty1 Stress-activated MAPK in Fission Yeast. *J Biol Chem*, **277**, 33411-33421.
283. Soto T, Beltran FF, Paredes V, Madrid M, Millar JBA, Vicente-Soler J, Cansado J, and Gacto M (2002) Cold induces stress-activated protein kinase-mediated response in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *European Journal of Biochemistry*, **269**, 5056-5065.
284. Stegmeier F, Visintin R, and Amon A (2002) Separase, Polo Kinase, the Kinetochore Protein Slk19, and Spo12 Function in a Network that Controls Cdc14 Localization during Early Anaphase. *Cell*, **108**, 207-220.
285. Strausfeld U, Fernandez A, Capony JP, Girard F, Lautredou N, Derancourt J, Labbe JC, and Lamb NJ (1994) Activation of p34cdc2 protein kinase by microinjection of human cdc25C into mammalian cells. Requirement for prior phosphorylation of cdc25C by p34cdc2 on sites phosphorylated at mitosis. *J Biol Chem*, **269**, 5989-6000.
286. Stucke VM, Sillje HH, Arnaud L, and Nigg EA (2002) Human Mps1 kinase is required for the spindle assembly checkpoint but not for centrosome duplication. *EMBO J*, **21**, 1723-1732.

287. Sudakin V, Chan GKT, and Yen TJ (2001) Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol*, **154**, 925-936.
288. Sudo T, Kawai K, Matsuzaki H, and Osada H (2005) p38 mitogen-activated protein kinase plays a key role in regulating MAPKAPK2 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **337**, 415-421.
289. Sugiura R, Toda T, Dhut S, Shuntoh H, Kuno T, and Kuno T (1999) The MAPK kinase Pek1 acts as a phosphorylation-dependent molecular switch. *Nature*, **399**, 479-483.
290. Sutani T, Yuasa T, Tomonaga T, Dohmae N, Takio K, and Yanagida M (1999) Fission yeast condensin complex: essential roles of non-SMC subunits for condensation and Cdc2 phosphorylation of Cut3/SMC4. *Genes Dev*, **13**, 2271-2283.
291. Takeda T, Toda T, Kominami K, Kohnosu A, Yanagida M, and Jones N (1995) *Schizosaccharomyces pombe* atf1+ encodes a transcription factor required for sexual development and entry into stationary phase. *EMBO J*, **14**, 6193-6208.
292. Tanaka K, Petersen J, MacIver F, Mulvihill DP, Glover DM, and Hagan IM (2001) The role of Plo1 kinase in mitotic commitment and septation in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J*, **20**, 1259-1270.
293. Tanaka K and Russell P (2001) Mrc1 channels the DNA replication arrest signal to checkpoint kinase Cds1. *Nat Cell Biol*, **3**, 966-972.
294. Tang Z, Coleman TR, and Dunphy WG (1993) Two distinct mechanisms for negative regulation of the Wee1 protein kinase. *EMBO J*, **12**, 3427-3436.
295. Taylor SS, Ha E, and McKeon F (1998) The Human Homologue of Bub3 Is Required for Kinetochores Localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related Protein Kinase. *J Cell Biol*, **142**, 1-11.
296. Teige M, Scheikl E, Reiser V, Ruis H, and Ammerer G (2001) Rck2, a member of the calmodulin-protein kinase family, links protein synthesis to high osmolarity MAP kinase signaling in budding yeast. *PNAS*, **98**, 5625-5630.
297. Tercero JA and Diffley JFX (2001) Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature*, **412**, 553-557.
298. Thelen MP, Venclovas C, and Fidelis K (1999) A Sliding Clamp Model for the Rad1 Family of Cell Cycle Checkpoint Proteins. *Cell*, **96**, 769-770.
299. Thuriaux P, Nurse P, and Carter B (1978) Mutants altered in the control co-ordinating cell division with cell growth in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet*, **161**, 215-220.
300. Tibbles LA and Woodgett JR (1999) The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 1230-1254.
301. Toda T, Dhut S, Superti-Furga G, Gotoh Y, Nishida E, Sugiura R, and Kuno T (1996) The fission yeast pmk1+ gene encodes a novel mitogen-activated protein kinase homolog which regulates cell integrity and functions

- coordinately with the protein kinase C pathway. *Mol Cell Biol*, **16**, 6752-6764.
302. Tolic-Norrelykke IM, Sacconi L, Thon G, and Pavone FS (2004) Positioning and Elongation of the Fission Yeast Spindle by Microtubule-Based Pushing. *Current Biology*, **14**, 1181-1186.
303. Toone WM, Kuge S, Samuels M, Morgan BA, Toda T, and Jones N (1998) Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase σ Sty1/Spc1. *Genes Dev*, **12**, 1453-1463.
304. Tournier S, Gachet Y, Buck V, Hyams JS, and Millar JBA (2004) Disruption of Astral Microtubule Contact with the Cell Cortex Activates a Bub1, Bub3, and Mad3-dependent Checkpoint in Fission Yeast. *Mol Biol Cell*, **15**, 3345-3356.
305. Toyoda Y, Furuya K, Goshima G, Nagao K, Takahashi K, and Yanagida M (2002) Requirement of Chromatid Cohesion Proteins Rad21/Scc1 and Mis4/Scc2 for Normal Spindle-Kinetochore Interaction in Fission Yeast. *Current Biology*, **12**, 347-358.
306. Trautmann S and McCollum D (2005) Distinct Nuclear and Cytoplasmic Functions of the *S. pombe* Cdc14-like Phosphatase Clp1p/Flp1p and a Role for Nuclear Shuttling in Its Regulation. *Current Biology*, **15**, 1384-1389.
307. Trautmann S, Wolfe BA, Jorgensen P, Tyers M, Gould KL, and McCollum D (2001) Fission yeast Clp1p phosphatase regulates G2/M transition and coordination of cytokinesis with cell cycle progression. *Current Biology*, **11**, 931-940.
308. Traverso EE, Baskerville C, Liu Y, Shou W, James P, Deshaies RJ, and Charbonneau H (2001) Characterization of the Net1 Cell Cycle-dependent Regulator of the Cdc14 Phosphatase from Budding Yeast. *J Biol Chem*, **276**, 21924-21931.
309. Turnbull EL, Martin IV, and Fantes PA (2006) Activity of Cdc2 and its interaction with the cyclin Cdc13 depend on the molecular chaperone Cdc37 in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci*, **119**, 292-302.
310. Uhlmann F, Lottspeich F, and Nasmyth K (1999) Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature*, **400**, 37-42.
311. van Dam H, Wilhelm D, Herr I, Steffen A, Herrlich P, and Angel P (1995) ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *EMBO J*, **14**, 1798-1811.
312. Vanoosthuysen V, Valsdottir R, Javerzat JP, and Hardwick KG (2004) Kinetochores Targeting of Fission Yeast Mad and Bub Proteins Is Essential for Spindle Checkpoint Function but Not for All Chromosome Segregation Roles of Bub1p. *Mol Cell Biol*, **24**, 9786-9801.
313. Vardy L and Toda T (2000) The fission yeast gamma-tubulin complex is required in G(1) phase and is a component of the spindle assembly checkpoint. *EMBO J*, **19**, 6098-6111.

314. Verma R, Annan RS, Huddleston MJ, Carr SA, Reynard G, and Deshaies RJ (1997) Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk Required for Its Degradation and Entry into S Phase. *Science*, **278**, 455-460.
315. Visintin R, Craig K, Hwang ES, Prinz S, Tyers M, and Amon A (1998) The Phosphatase Cdc14 Triggers Mitotic Exit by Reversal of Cdk-Dependent Phosphorylation. *Molecular Cell*, **2**, 709-718.
316. Vivancos AP, Castillo EA, Biteau B, Nicot C, AYTE J, Toledano MB, and Hidalgo E (2005) A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H₂O₂-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. *PNAS*, **102**, 8875-8880.
317. Vivancos AP, Castillo EA, Jones N, AYTE J, and Hidalgo E (2004) Activation of the redox sensor Pap1 by hydrogen peroxide requires modulation of the intracellular oxidant concentration. *Molecular Microbiology*, **52**, 1427-1435.
318. Voncken JW, Niessen H, Neufeld B, Rennefahrt U, Dahlmans V, Kubben N, Holzer B, Ludwig S, and Rapp UR (2005) MAPKAP Kinase 3pK Phosphorylates and Regulates Chromatin Association of the Polycomb Group Protein Bmi1. *J Biol Chem*, **280**, 5178-5187.
319. Wahls WP and Smith GR (1994) A heteromeric protein that binds to a meiotic homologous recombination hot spot: correlation of binding and hot spot activity. *Genes Dev*, **8**, 1693-1702.
320. Walworth NC and Bernards R (1996) rad-Dependent Response of the chk1-Encoded Protein Kinase at the DNA Damage Checkpoint. *Science*, **271**, 353-356.
321. Warbrick E and Fantes PA (1991) The wis1 protein kinase is a dosage-dependent regulator of mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J*, **10**, 4291-4299.
322. Warbrick E and Fantes PA (1992) Five novel elements involved in the regulation of mitosis in fission yeast. *Mol Gen Genet*, **232**, 440-446.
323. Watanabe N, Broome M, and Hunter T (1995) Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. *EMBO J*, **14**, 1878-1891.
324. Watanabe Y and Yamamoto M (1996) *Schizosaccharomyces pombe* pcr1+ encodes a CREB/ATF protein involved in regulation of gene expression for sexual development. *Mol Cell Biol*, **16**, 704-711.
325. Wilkinson MG, Samuels M, Takeda T, Toone WM, Shieh JC, Toda T, Millar JB, and Jones N (1996) The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes Dev*, **10**, 2289-2301.
326. Willson J, Wilson S, Warr N, and Watts FZ (1997) Isolation and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* rhp9 gene: a gene required for the DNA damage checkpoint but not the replication checkpoint. *Nucl Acids Res*, **25**, 2138-2146.
327. Wolfe BA and Gould KL (2004) Fission yeast Clp1p phosphatase affects G₂/M transition and mitotic exit through Cdc25p inactivation. *EMBO J*, **23**, 919-929.
328. Wolfe BA, McDonald WH, Yates III JR, and Gould KL (2006) Phospho-Regulation of the Cdc14/Clp1 Phosphatase Delays Late Mitotic

- Events in *S. pombe*. *Developmental Cell*, **11**, 423-430.
329. Wu L, Shiozaki K, Aligue R, and Russell P (1996) Spatial organization of the Nim1-Wee1-Cdc2 mitotic control network in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*, **7**, 1749-1758.
330. Wu L and Russell P (1993) Nim1 kinase promotes mitosis by inactivating Wee1 tyrosine kinase. *Nature*, **363**, 738-741.
331. Wuarin J, Buck V, Nurse P, and Millar JBA (2002) Stable Association of Mitotic Cyclin B/Cdc2 to Replication Origins Prevents Endoreduplication. *Cell*, **111**, 419-431.
332. Yamada A, Duffy B, Perry JA, and Kornbluth S (2004) DNA replication checkpoint control of Wee1 stability by vertebrate Hsl7. *J Cell Biol*, **167**, 841-849.
333. Yamaguchi S, Decottignies A, and Nurse P (2003) Function of Cdc2p-dependent Bub1p phosphorylation and Bub1p kinase activity in the mitotic and meiotic spindle checkpoint. *EMBO J*, **22**, 1075-1087.
334. Yamaguchi S, Murakami H, and Okayama H (1997) A WD Repeat Protein Controls the Cell Cycle and Differentiation by Negatively Regulating Cdc2/B-Type Cyclin Complexes. *Mol Biol Cell*, **8**, 2475-2486.
335. Yamano H, Gannon J, and Hunt T (1996) The role of proteolysis in cell cycle progression in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J*, **15**, 5268-5279.
336. Yamano H, Ishii K, and Yanagida M (1994) Phosphorylation of dis2 protein phosphatase at the C-terminal cdc2 consensus and its potential role in cell cycle regulation. *EMBO J*, **13**, 5310-5318.
337. Yamano H, Kitamura K, Kominami Ki, Lehmann A, Katayama S, Hunt T, and Toda T (2000) The Spike of S Phase Cyclin Cig2 Expression at the G1-S Border in Fission Yeast Requires Both APC and SCF Ubiquitin Ligases. *Molecular Cell*, **6**, 1377-1387.
338. Yamano H, Kominami Ki, Harrison C, Kitamura K, Katayama S, Dhut S, Hunt T, and Toda T (2004) Requirement of the SCFPop1/Pop2 Ubiquitin Ligase for Degradation of the Fission Yeast S Phase Cyclin Cig2. *J Biol Chem*, **279**, 18974-18980.
339. Yanagida M, Yamashita YM, Tatebe H, Ishii K, Kumada K, and Nakaseko Y (1999) Control of metaphase-anaphase progression by proteolysis: cyclosome function regulated by the protein kinase A pathway, ubiquitination and localization. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **354**, 1559-1569.
340. Yang KS, Kang SW, Woo HA, Hwang SC, Chae HZ, Kim K, and Rhee SG (2002) Inactivation of Human Peroxiredoxin I during Catalysis as the Result of the Oxidation of the Catalytic Site Cysteine to Cysteine-sulfinic Acid. *J Biol Chem*, **277**, 38029-38036.
341. Yoshida S, Asakawa K, and Toh-e A (2002) Mitotic Exit Network Controls the Localization of Cdc14 to the Spindle Pole Body in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Biology*, **12**, 944-950.
342. Yoshida S and Toh-e A (2002) Budding yeast Cdc5 phosphorylates Net1 and assists Cdc14 release from the nucleolus.

- Biochemical and Biophysical Research Communications*, **294**, 687-691.
343. Yu H (2002) Regulation of APC-Cdc20 by the spindle checkpoint. *Current Opinion in Cell Biology*, **14**, 706-714.
344. Zaitsevskaya-Carter T and Cooper JA (1997) Spm1, a stress-activated MAP kinase that regulates morphogenesis in *S. pombe*. *EMBO J*, **16**, 1318-1331.
345. Zapater M, Clotet J, Escote X, and Posas F (2005) Control of cell cycle progression by the stress-activated Hog1 MAPK. *Cell Cycle*, **4**, 6-7.
346. Zeng Y, Forbes KC, Wu Z, Moreno S, Piwnica-Worms H, and Enoch T (1998) Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1. *Nature*, **395**, 507-510.
347. Zeng Y and Piwnica-Worms H (1999) DNA Damage and Replication Checkpoints in Fission Yeast Require Nuclear Exclusion of the Cdc25 Phosphatase via 14-3-3 Binding. *Mol Cell Biol*, **19**, 7410-7419.
348. Zhao H, Tanaka K, Nogochi E, Nogochi C, and Russell P (2003) Replication Checkpoint Protein Mrc1 Is Regulated by Rad3 and Tel1 in Fission Yeast. *Mol Cell Biol*, **23**, 8395-8403.
349. Zimmerman S, Daga RR, and Chang F (2004) Intra-nuclear microtubules and a mitotic spindle orientation checkpoint. *Nat Cell Biol*, **6**, 1245-1246.
350. Zou L and Elledge SJ (2003) Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. *Science*, **300**, 1542-1548.