

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

LA RUTA DE LA PROTEÍNA QUINASA C EN *Saccharomyces
cerevisiae*. CONEXIONES CON EL CONTROL DEL CICLO
CELULAR

BÁRBARA MARTÍNEZ BONO

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2006

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 4 de Novembre de 2005 davant un tribunal format per:

- D^a. María Molina Martín
- D^a. M. Ángeles de la Torre Ruiz
- D. Eloi Garí Marsol
- D. Lynne Yennush
- D. José Enrique Pérez Ortín

Va ser dirigida per:
D. Juan Carlos Igual García

©Copyright: Servei de Publicacions
Bárbara Martínez Bono

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6466-X

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

La ruta de la proteïna quinasa C en *Saccharomyces cerevisiae*. Conexiones con el ciclo celular

Memoria presentada por
Bàrbara Martínez Bono
Para optar al grado de Doctora
por la Universitat de València



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

El Dr. JUAN CARLOS IGUAL GARCÍA, Profesor Titular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València

CERTIFICA: Que Bárbara Martínez Bono, Licenciada en Bioquímica por la Universitat de València ha realizado bajo su dirección el trabajo que con el título **“Ruta de la proteína quinasa C en *Saccharomyces cerevisiae*. Conexiones con el control del ciclo celular en levadura”** presenta para optar al grado de Doctora por la Universitat de València.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Burjassot, a 18 de Julio del 2005.

Dr. Juan Carlos Igual García

A mi abuelo

A mis dos familias

AGRADECIMIENTOS

Desde que empecé el doctorado he estado pensando ¿y yo que pondré en los agradecimientos? Ahora ha llegado el momento y me doy cuenta de que no es fácil resumir tantos años en sólo unas líneas.

Ante todo gracias al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular al completo, ya que siempre encuentras a alguien dispuesto a ayudar.

Esta tesis no hubiera llegado a buen puerto sin la ayuda y paciencia de mi director, gracias Juan Carlos por confiar en mí.

Se dice que el último año de la tesis es el más difícil (es verdad!), pero en mi caso ha sido mucho más llevadero gracias a la inestimable ayuda y compañía de mis amigos del “laboratorio de ciclo”: Paco, M^a Angels, Elena, Inma, Josep y Ana P (la adoptada del lab). Muchas gracias chic@s por compartir las risas en la hora “tonta” y por aguantar mi verborrea!! No se olvida tampoco a los que se fueron: Ethel y especialmente Ana C (siempre de buen humor). Gracias también a Carmen y Dolores por sus buenas ideas y comentarios.

Gracias también a José Enrique por darme siempre buenos consejos y ofrecerme la oportunidad de iniciarme en otros campos de la ciencia y nuevas tecnologías.

Gracias a Paula y Lola por la ayuda con los Chrips y a Oreto y Pepe con los Chips de DNA, siempre dispuestos a ayudar.

Quisiera también expresar mi agradecimiento al Dr. Michael Hall del Biozentrum, Universidad de Basilea, donde realicé los experimentos de purificación por TAP, y a todo el personal de su laboratorio, en especial a JM (y Bea) y a Helena por hacerme sentir como en casa.

Lo mejor de esta tesis han sido los amigos que he hecho por el camino. Gracias a M^a Jesús y Julia por las charlas nocturnas en el laboratorio de plantas, a Lorena, Ana R y Gema por compartir la hora de la comida y el “estoy en crisis” y mucho más.

Se quedan en el tintero muchos nombres de compañeros con los que he compartido penas y alegrías que son muchas veces comunes en el tránsito por el doctorado. Gracias a todos por los buenos ratos que hemos pasado juntos.

Gracias con todo mi corazón a mi familia por apoyarme todos estos años. A mi madre por comprenderme incluso cuando parecía imposible (y diseñar la portada de la tesis que me hacía mucha ilusión), a mi padre por enseñarme a superar las dificultades, a mi hermano Jose y a mi niña, Luisa por cuidarme y preocuparse de mí y finalmente a mi abuela por su cariño incondicional.

Gracias a mi “segunda familia” los Mascarós al completo: a Concha por preguntarme por mis “bichitos”, a Andrés (padre) por abrirme las puertas de su casa y también al resto de la tropa: Montse, Jose, Alejandro y Mari Luz (y Boireta) por estar ahí.

Y lo mejor para el final: Andrés no tengo espacio suficiente para agradecerte todos los detalles que has tenido conmigo, sobre todo en estos últimos momentos de estrés (aguanta un poco que aún falta la lectura), sin ti no lo hubiera conseguido. GRACIAS, GRACIAS!!

ÍNDICE

1. Introducción	1
La ruta de la proteína quinasa C	5
La pared celular	5
Sensores en la membrana plasmática.....	7
La proteína Rho1	9
Otros activadores de Pkc1.....	11
La proteína quinasa C	12
Cascada MAP quinasa	13
Factores de transcripción regulados por la ruta PKC	14
Reguladores negativos de la ruta	17
Funciones de la ruta PKC	18
Regulación transcripcional mediada por MAPKs	22
El ciclo celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
Reguladores clave del ciclo celular de <i>S. cerevisiae</i>	29
Transcripción y proteólisis en el control del ciclo celular.....	31
Dinámica del ciclo celular	34
Transición G1/S.....	36
2. Materiales y métodos	41
Cepas y condiciones de crecimiento	43
Obtención de las cepas de levadura	46
Construcción de plásmidos	46
Transformación de bacteria	47
Transformación de levadura	47
Determinación de la concentración de células	48
Ensayos de actividad β -galactosidasa	48
Localización de proteínas mediante inmunofluorescencia indirecta	48
Inmunoprecipitación de la cromatina	49

Detección de RNA mediante <i>northern</i>	50
Análisis de expresión génica global mediante macrochips de DNA	52
Detección de proteínas mediante <i>western</i>	54
Filtración en gel	56
Purificación de proteínas por afinidad en tándem (TAP)	57
Inmunoprecipitación y ensayo quinasa	58
3. Regulación de la expresión del gen <i>FKSI</i> por la ruta PKC	61
Caracterización del elemento de secuencia responsable de la regulación del gen <i>FKSI</i> por la proteína quinasa C	64
La expresión del gen <i>FKSI</i> está regulada por la ruta PKC ...	64
Estudio del sinergismo entre los elementos de secuencia Rlm1BS y SCB	80
Estudio del mecanismo de regulación de la función de Rlm1 por la ruta PKC	85
Análisis de los niveles de Rlm1 en mutantes de la ruta PKC	85
Estudio de la localización subcelular de Rlm1 en mutantes de la ruta PKC	87
Análisis de la unión <i>in vivo</i> de Rlm1 al promotor del gen <i>FKSI</i>	89
Análisis de la unión <i>in vivo</i> de Slt2 al promotor del gen <i>FKSI</i>	92
Análisis de la unión <i>in vivo</i> de la RNA polimerasa II al promotor del gen <i>FKSI</i>	96
Análisis de la unión <i>in vivo</i> de Swi6 al promotor del gen <i>FKSI</i>	105
Relación del complejo transcripcional Paf1C con la ruta PKC....	107
La proteína Paf1 se modifica post-traduccionalmente de forma dependiente de la ruta PKC	109

Unión <i>in vivo</i> de Paf1 al gen <i>FKSI</i>	110
Paf1 se une al gen <i>FKSI</i> de forma independiente de Pkc1, Slr2 y Rlm1	112
El desplazamiento de Paf1 a lo largo del gen <i>FKSI</i> se ve afectado en ausencia de Pkc1 y Slr2	116
Resumen del capítulo	118
4. Estudio genómico de la regulación de la expresión génica por la ruta PKC	121
Identificación de genes regulados por Pkc1 mediante DNA arrays	125
Clasificación funcional de los genes identificados	137
Discusión	142
5. Identificación de proteínas asociadas a Pkc1 y Slr2	149
Identificación de proteínas que interaccionan con Pkc1 y Slr2 ...	151
Asociación de Pkc1 en complejos macromoleculares	151
Identificación de proteínas mediante purificación de Pkc1-TAP	160
Identificación de proteínas mediante purificación de Slr2-TAP	161
Participación de la carioferina Kap123 en el control de la integridad celular	166
Las células mutantes <i>kap123Δ</i> presentan defectos de integridad celular	166
Actividad de la ruta PKC en el mutante <i>kap123 Δ</i>	168
6. Relación de la ruta PKC con la ciclina Cln2	173
Interacciones genéticas entre Cln2 y la ruta PKC	176
¿Regula la ciclina Cln2 la actividad de la ruta PKC?	181
¿Regula la ruta PKC la actividad de la ciclina Cln2?	187
Discusión	188
7. Conclusiones	193
8. Bibliografía	199

1. Introducción

Las células han desarrollado mecanismos que detectan los estímulos externos y los convierten en una respuesta celular adecuada, lo que les permite una rápida adaptación cuando las condiciones extracelulares se modifican. Las células de levadura están especialmente expuestas a las cambiantes condiciones del medio en el que habitan. La adecuada respuesta celular frente a cambios extracelulares es esencial para que las levaduras sobrevivan a los cambios medioambientales. Esta respuesta generalmente implica cambios en la expresión génica y precisa de rutas que transduzcan la señal desde la superficie celular hasta el núcleo donde se localiza la maquinaria transcripcional. Las proteínas sensoras localizadas en la membrana plasmática son las responsables de detectar las señales producidas por alteraciones medioambientales. Una vez detectado un estímulo, la señal debe transmitirse hasta el núcleo. Distintas proteínas quinasas están involucradas en la transmisión de esta señal. En algunos casos estas quinasas se organizan en un módulo, conservado durante la evolución, conocido como cascada de MAP quinasas (*mitogen-activated protein*) compuesto por tres quinasas que se activan secuencialmente: una MAPKKK que activa a la MAPKK la cual a su vez activa a la MAPK. Finalmente, cada ruta induce la activación de factores de transcripción específicos que modulan la respuesta de la célula regulando en el núcleo la expresión de un conjunto de genes.

En *S. cerevisiae* se han descrito 5 rutas de transducción de señal en las que intervienen cascadas de MAP quinasas. En primer lugar, la ruta de respuesta a feromonas o conjugación y la ruta de crecimiento filamentoso que comparten muchos de los miembros del módulo central de MAP quinasas. La ruta de esporulación, también llamada de privación de nutrientes, controla el proceso de formación de esporas cuando las condiciones del medio extracelular son adversas. Y por último, las rutas HOG de respuesta a alta osmolaridad en el medio y la ruta de integridad celular o de la proteína quinasa C (PKC). Cada una de estas rutas detecta y transduce señales específicas para distintos tipos de estímulos. El *output*

principal de las rutas de MAP quinasas es la regulación de la transcripción génica, aunque también existe respuesta mediada por las MAP quinasas o sus efectores en otros niveles (Para revisiones sobre las distintas rutas ver: Gustin *et al.*, 1998; Schmidt y Hall, 1998; Posas *et al.*, 1998; Heinisch *et al.*, 1999; Millar, 1999; Igual y Estruch F., 2000; O'Rourke *et al.*, 2002; Perez y Calonge, 2002; Edmunds y Mahadevan, 2004; Levin, 2005).

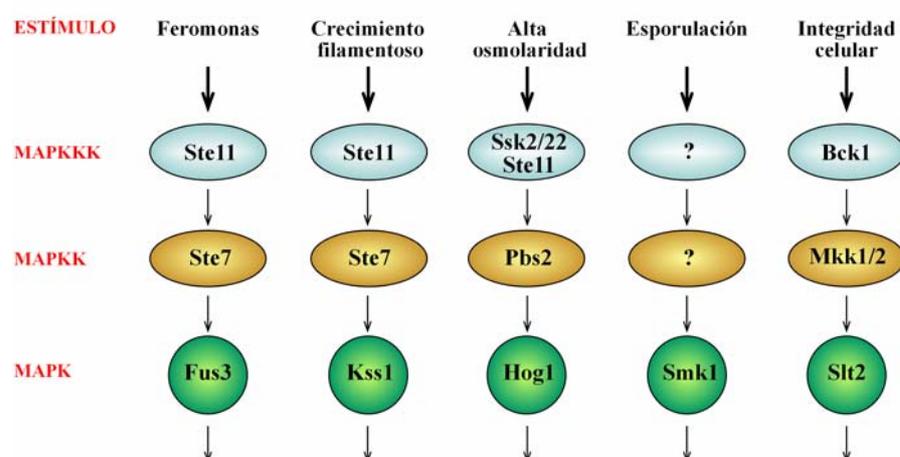


Figura 1.1. Esquema de las rutas MAPKs de *Saccharomyces cerevisiae*

El trabajo realizado en esta tesis se ha centrado en el estudio de la ruta PKC. En el siguiente apartado se resumen las funciones y componentes de la ruta PKC.

LA RUTA DE LA PROTEÍNA QUINASA C

En *S. cerevisiae*, a diferencia de las células de mamíferos, las funciones de la proteína quinasa C las desempeña una única proteína, Pkc1. La ruta PKC es esencial para el mantenimiento de la integridad celular en diferentes condiciones medioambientales y durante diversos procesos morfogénéticos a través de la regulación de la biosíntesis de pared celular y del citoesqueleto de actina.

La pared celular

La pared celular de levadura es una estructura robusta que aísla físicamente a la célula del medio externo y le proporciona un soporte osmótico. La pared celular está compuesta por dos capas: la capa interna, compuesta por polímeros de glucano y quitina que proporciona resistencia mecánica y elasticidad, y la capa externa, compuesta por proteínas altamente glicosiladas que protege la capa de glucano de la acción de enzimas degradativas y participa en fenómenos de reconocimiento celular (para revisiones ver: Lipke y Ovalle, 1998; Kapteyn *et al.*, 1999; Klis *et al.*, 2002). La red de polímeros de glucano se compone de cadenas lineales de β 1,3-glucano que se conectan entre sí mediante módulos de β 1,6-glucano. La enzima responsable de la síntesis de β 1,3-glucano es la glucano sintasa (GS) cuya subunidad catalítica está codificada por los genes *FKS1* y *FKS2*. La función del β 1,6-glucano es conectar la red de β 1,3-glucano con algunas proteínas de la pared celular. Además, actúa como sitio de unión de la quitina. La quitina está formada por monómeros de N-acetilglucosamina y se deposita en los anillos de quitina alrededor de las cicatrices de las yemas y en las paredes laterales de la madre. La proporción de quitina en la pared celular es muy pequeña, sin embargo, su síntesis se incrementa considerablemente en células con pared debilitada.

En la pared celular existe también una gran proporción de proteínas altamente glicosiladas que proporcionan carga negativa a la pared celular. Son las denominadas CWPs (*cell wall proteins*). Existen dos grupos principales de CWPs: las proteínas GPI y las proteínas PIR. Las proteínas GPI se suelen unir a través de módulos de β 1,6-glucano a la red de β 1,3-glucano. En el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado alrededor de 70 posibles proteínas GPI (Caro *et al.*, 1997), la mitad de las cuales se ha estimado que residen en la pared celular (Smits *et al.*, 1999). Por otro lado, las proteínas PIR se unen directamente a la red de β 1,3-glucano. En *S. cerevisiae* están representadas principalmente por una familia de 4 proteínas: Pir1, Pir2, Pir3 y Pir4. Además, otras proteínas como: Pau1, Sps100 e Ygp1 presentan cierta similitud con las proteínas PIR. Aparte de las proteínas GPI y PIR, también se han detectado en la pared celular otras proteínas, entre ellas: enzimas modificadoras de la estructura de la pared celular como Bgl2 (β -1,3-glucosiltransferasa) y Cts1 (quitinasa); miembros de la familia Hsp70 como Ssa1 y Ssa2 (Lopez-Ribot y Chaffin, 1996) y también enzimas glicolíticas como Tdh1, Tdh2 y Tdh3 (Pardo *et al.*, 2000; Delgado *et al.*, 2001).

La pared celular no es una estructura estática sino que se producen cambios en su estructura y composición en respuesta a situaciones de estrés con la finalidad de reforzar la pared celular y mantener la integridad de la célula. Así por ejemplo: aumenta la síntesis de quitina, se incrementan los entrecruzamientos de la red de β 1,3-glucano con módulos β 1,6-glucano y aumenta la expresión de genes que codifican enzimas de biosíntesis de componentes de la pared celular u otras CWPs, mientras que la expresión de otros genes se reprime (Zhao *et al.*, 1998; Jung y Levin, 1999; Terashima *et al.*, 2000; Rep *et al.*, 2000; Posas *et al.*, 2000; Abramova *et al.*, 2001; Gasch y Werner-Washburne, 2002).

Sensores en la membrana plasmática

La ruta PKC responde a perturbaciones en la superficie celular, por ello los primeros componentes de la ruta deben ser proteínas asociadas a la membrana o a la pared celular que actuarán de sensores. Las proteínas Wsc1, Wsc2 y Wsc3 se han identificado como sensores asociados a la membrana y/o a la pared celular (Verna *et al.*, 1997; Gray *et al.*, 1997), siendo Wsc1 la que más contribuye en la regulación de la ruta PKC. Mutantes en los genes *WSC* tienen fenotipos similares a los mutantes de la ruta PKC y la activación de Slt2 a elevadas temperaturas depende de las proteínas Wsc. Existen otras dos proteínas sensoras relacionadas entre sí que transmiten la señal hacia PKC: Mid2 y Mtl1 (Ketela *et al.*, 1999; Rajavel *et al.*, 1999). Mid2 actúa en paralelo con Wsc1 durante el crecimiento vegetativo, pero su principal función es señalar defectos en la pared celular durante la conjugación. Estas proteínas sensoras presentan en común una región rica en serina y treonina altamente glicosilada que se extiende desde la membrana plasmática hasta la pared celular. Este puede ser el dominio que detecta el estrés en el exterior de la célula provocando cambios conformacionales en la proteína e iniciando la transducción de la señal.

Las proteínas Wsc1 y Mid2 parecen ser las más importantes en la señalización hacia la ruta PKC. La señalización de estos sensores convergen en la proteína GTPasa Rho1. Sin embargo, parece existir cierta especificidad en la señalización de cada sensor. Así, se ha sugerido que Mid2 sería el responsable de transmitir la señal hacia las moléculas de Rho1 que interaccionan con Pkc1, mientras que Wsc1 podría desencadenar la activación a través de Rho1 de otros efectores (Sekiya-Kawasaki *et al.*, 2002).

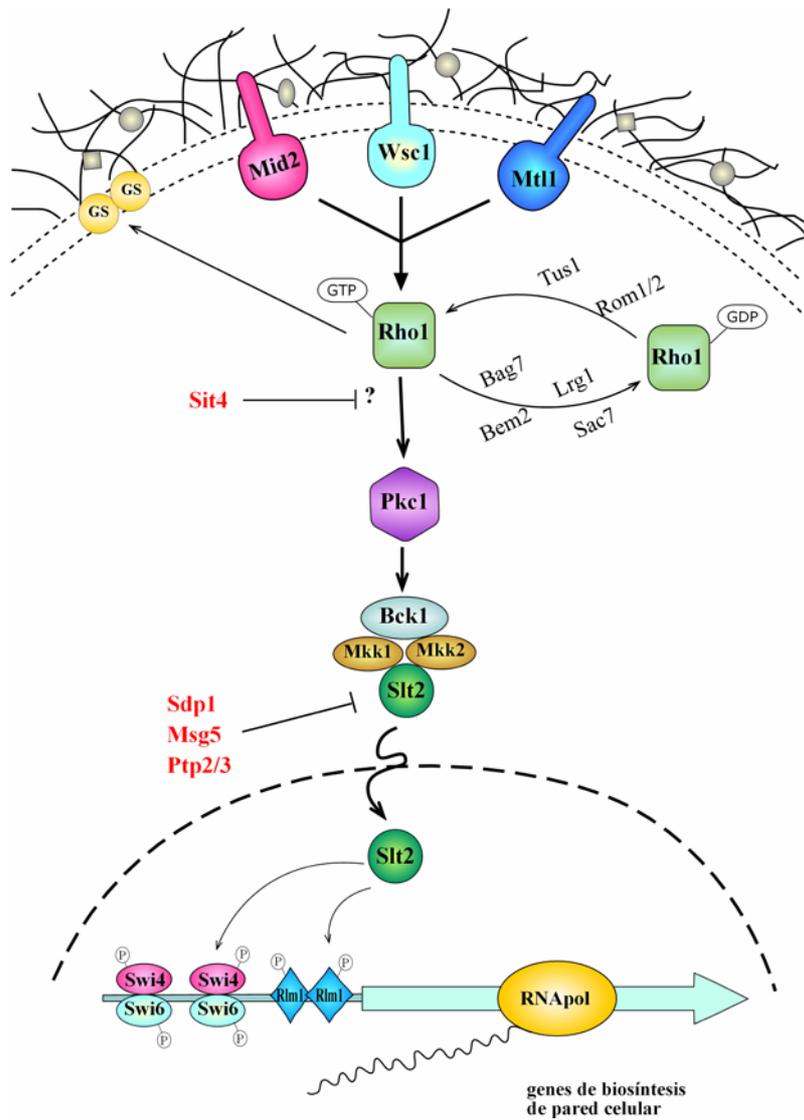


Figura 1.2. Esquema de los principales componentes de la ruta PKC

La proteína Rho1

Rho1 pertenece a una familia de proteínas pequeñas de unión a GTP implicadas en la organización del citoesqueleto de actina (Madden y Snyder, 1998). En *Saccharomyces cerevisiae* existen, además de Rho1, otras cinco GTPasas tipo-Rho, denominadas Rho2, 3, 4 y 5 y Cdc42. Rho2 es una proteína no esencial y parcialmente redundante con Rho1 (Madaule *et al.*, 1987; Ozaki *et al.*, 1996; Helliwell *et al.*, 1998a). Las proteínas Rho3 y Rho4 parecen participar conjuntamente en la polarización de actina y la formación de la yema (Matsui y Toh, 1992; Kagami *et al.*, 1997). En cuanto a Rho5, se ha sugerido que podría funcionar reprimiendo la ruta de integridad celular (Schmitz *et al.*, 2002a). Por su parte, Cdc42 es necesaria para la correcta localización de la yema y también para el establecimiento del crecimiento polarizado (Johnson y Pringle, 1990; Johnson, 1999; Gulli *et al.*, 2000; Shimada *et al.*, 2004). Las proteínas Rho están preniladas en el extremo C-terminal. Esta modificación permite su asociación con la membrana, la cual es fundamental para su correcta localización y activación (Schafer y Rine, 1992; Inoue *et al.*, 1999).

Sin duda, Rho1 desempeña un papel clave en la célula de levadura, ya que recibe la mayor parte de señales de la membrana plasmática y participa en múltiples procesos implicados en la biogénesis de la pared celular, la organización del citoesqueleto de actina, la secreción polarizada y la internalización de proteínas desde la membrana plasmática (Drgonova *et al.*, 1996; Madden y Snyder, 1998; Drgonova *et al.*, 1999; Lipschutz y Mostov, 2002; deHart *et al.*, 2003). Rho1 se localiza en sitios de crecimiento polarizado de forma dependiente del citoesqueleto de actina (Yamochi *et al.*, 1994; Qadota *et al.*, 1996; Ayscough *et al.*, 1999). Rho1 se activa por la acción de dos factores intercambiadores de nucleótido (GEF) denominados Rom1 y Rom2 (Ozaki *et al.*, 1996). Estudios genéticos sugieren que la función principal en señalización la realiza Rom2 (Schmidt *et al.*, 1997;

Bickle *et al.*, 1998). La actividad de Rom2 se regula por los sensores de la membrana plasmática Wsc1 y Mid2 (Philip y Levin, 2001) y por la quinasa Tor2 (Schmidt *et al.*, 1997). Recientemente se ha caracterizado a la proteína Tus1 como otra GEF de Rho1 (Schmelzle *et al.*, 2002). Por otro lado, la inactivación de Rho1 está regulada por las proteínas con actividad GTPasa Bem2 (Zheng *et al.*, 1993; Peterson *et al.*, 1994), Sac7 (Schmidt *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 2000), Bag7 y Lrg1 (Roumanie *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 2002). Se ha observado que estas proteínas GAP regulan Rho1 de forma dependiente de la diana de Rho1. Así, Lrg1 regula la actividad relacionada con la glucano sintasa (Watanabe *et al.*, 2001), mientras que Sac7 y Bem2 son las únicas que regulan la ruta de Pkc1-MAPK (Martin *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2002). Además, la proteína Rdi1, un inhibidor de disociación Rho-GDP inactiva a Rho1 y también a Cdc42. Rdi1 libera Rho1 y Cdc42 de su asociación con las membranas e interfiere en la función de las GAPs y GEFs, bloqueando la disociación de GDP y la hidrólisis de GTP (Masuda *et al.*, 1994; Koch *et al.*, 1997).

Rho1 realiza una función clave en el control de la integridad celular a través de dos mecanismos. Por un lado, activa a la proteína Pkc1 interaccionando con sus dominios C1 y HR1 y le confiere la capacidad de responder a fosfatidilserina (Nonaka *et al.*, 1995; Schmitz *et al.*, 2001; Schmitz *et al.*, 2002b). Por otro lado, actúa como regulador positivo de la subunidad catalítica del enzima β -1,3-glucanosintasa (GS) responsable de la síntesis de β -1,3-glucano, el componente estructural más abundante en la pared celular (Drgonova *et al.*, 1996; Qadota *et al.*, 1996). Rho1 estimula la actividad catalítica de la GS de modo dependiente de GTP. Tanto Rho1 como la GS se localizan en la membrana plasmática en sitios de remodelación de la pared celular.

Además de Pkc1, Rho1 también actúa a través de otros efectores como las proteínas Skn7, Bni1, Bnr1 y Sec3. La proteína Skn7 forma parte de un sensor-de-dos-componentes que participa en la detección de alta

osmolaridad en el medio. El sensor transduce la señal, por un lado a Ssk1 que activa la ruta HOG y, por otro lado a Skn7 que actúa como factor de transcripción regulando la expresión de genes que participan en la integridad de la pared celular y otros procesos (Lu *et al.*, 2003). Además Skn7 puede ser activado por Rho1 en respuesta a estrés en la pared celular (Alberts *et al.*, 1998). Se ha sugerido que Skn7 podría actuar en paralelo a Pkc1 en la regulación del crecimiento de la pared celular (Brown *et al.*, 1994). Por su parte, las proteínas Bni1 y Bnr1 son dos forminas que dirigen el ensamblaje de los filamentos de actina en respuesta a la activación por Rho1 (Sagot *et al.*, 2002a; Sagot *et al.*, 2002b). Finalmente, existen evidencias de la interacción de Rho1 y Cdc42 con la proteína Sec3 que pertenece a un complejo multiproteico denominado *exocyst*, implicado en la señalización y unión de vesículas a la membrana en los sitios de crecimiento polarizado. Se ha sugerido que a través de su interacción con Sec3, Rho1 y Cdc42 podrían participar en la regulación de la localización de este complejo de la maquinaria de exocitosis (Guo *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001).

Otros activadores de Pkc1

Por otro lado, en la activación de Pkc1 también contribuyen otras proteínas como Pkh1 y Pkh2, homólogas a la proteína quinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositol de mamíferos, que activan a Pkc1 en respuesta a choque térmico medio (Inagaki *et al.*, 1999; Casamayor *et al.*, 1999). Por otro lado, las proteínas quinasas Ypk1 y Ypk2, homólogas a la quinasa SGK de mamíferos y reguladas por las anteriores (Pkh1 y 2), también parecen participar en el mantenimiento de la integridad celular (Roelants *et al.*, 2002; Schmelzle *et al.*, 2002; Roelants *et al.*, 2004). Además, en condiciones de falta de nutrientes, la función de la quinasa Tor2 en la inducción de la polarización del citoesqueleto de actina dependiente del ciclo celular está mediada por la ruta PKC (Schmidt *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997;

Helliwell *et al.*, 1998a; Helliwell *et al.*, 1998b). En esta situación, Tor2 activa a Rho1 (a través de Rom2) lo que consecuentemente activa a la ruta PKC (Schmidt *et al.*, 1997).

La proteína quinasa C

En mamíferos existen varias isoformas de la proteína quinasa C. Sin embargo, *Saccharomyces cerevisiae* presenta una sola variante, codificada por el gen *PKC1* (Levin *et al.*, 1990). Pkc1 contiene dominios funcionales característicos de las distintas isoformas de PKC de mamíferos. En el extremo N-terminal de la proteína aparecen dos copias del dominio HR1 (HR1A y B). El dominio HR1A contribuye a la interacción de Pkc1 con Rho1 (Schmitz *et al.*, 2002b). Pkc1 también posee un dominio C1 (rico en Cys). Este dominio en las PKCs de mamíferos es el responsable de la activación de la quinasa en respuesta a DAG ó ésteres de forbol. Sin embargo, Pkc1 de levadura no responde aparentemente a dicha activación (Watanabe *et al.*, 1994; Antonsson *et al.*, 1994). En su lugar, el dominio C1 parece ser otro sitio de interacción con Rho1 (Nonaka *et al.*, 1995; Schmitz *et al.*, 2002b). En Pkc1 existe también un dominio C2 que en PKCs de mamíferos es el responsable de la unión de fosfolípidos en respuesta a Ca^{2+} . En *S. cerevisiae* el dominio C2 media la activación de Pkc1 por fosfatidilserina pero sin embargo no responde a la activación por Ca^{2+} . (Antonsson *et al.*, 1994; Kamada *et al.*, 1996). Finalmente, al igual que otras PKCs, Pkc1 posee un sitio pseudosustrato que mantiene inactiva a la quinasa mediante interacciones intramoleculares cuando su función no es requerida.

PKC1 es un gen esencial para la viabilidad de la célula. Su inactivación produce lisis celular debido a defectos en la construcción de la pared celular (Paravicini *et al.*, 1992; Levin y Bartlett-Heubusch, 1992). Una de las características fenotípicas de las cepas mutantes en la ruta PKC es que el fenotipo de lisis celular es remediable mediante el tratamiento con

estabilizadores osmóticos como el sorbitol o altas concentraciones de sal.

Pkc1 se localiza en los sitios de crecimiento polarizado (Andrews y Stark, 2000). Además, recientemente se ha determinado que Pkc1 se acumula en el núcleo y también se asocia al SPB (Denis y Cyert, 2005). Los diferentes dominios de Pkc1 parecen ser responsables de la localización diferencial de la proteína. El dominio C2 podría ser el responsable de la localización de Pkc1 en el SPB lo que sugiere que Pkc1 podría regular el esqueleto de microtúbulos directamente. Por su parte, el dominio HR1 sería el responsable de su localización en cuello y punta de la yema (Denis y Cyert, 2005).

La cascada MAP quinasa

El núcleo de la ruta PKC está constituido por un módulo MAP quinasa. La proteína Pkc1 regula la actividad de la MAPKKK Bck1, a la cual fosforila en múltiples sitios al menos *in vitro* (Levin *et al.*, 1994). Por su parte, se asume que Bck1 fosforila en residuos de serina y treonina a dos MAPKK redundantes, Mkk1 y Mkk2 (Irie *et al.*, 1993; Kamada *et al.*, 1995; Paravicini y Friedli, 1996). Éstas son Ser/Thr/Tyr quinastas encargadas de la activación del último elemento de la cascada, la MAPK Slt2/Mpk1, por fosforilación en un motivo Thr-X-Tyr (Lee *et al.*, 1993). Los mutantes en proteínas de la cascada MAPK presentan un fenotipo de lisis celular que únicamente se hace evidente cuando se somete a las células a agentes que causan daños en la pared celular como por ejemplo altas temperaturas. El hecho de que el defecto en la integridad celular de dichos mutantes sea menos acusado que el observado en los mutantes *pkc1*, sugiere que Pkc1 pueda actuar a través de otros efectores diferentes a la cascada de MAP quinastas.

Se ha localizado a Slt2 en el núcleo (Kamada *et al.*, 1995; Baetz *et*

al., 2001; Hahn y Thiele, 2002) y también en sitios de crecimiento polarizado (van Drogen y Peter, 2002). Mkk1 y Mkk2 también han sido localizadas en sitios de crecimiento polarizado. La localización de Slk2, Mkk1 y Mkk2 en sitios de crecimiento polarizado depende de la función de Spa2, que actúa en la organización del citoesqueleto de actina. Spa2 parece actuar como proteína de ensamblaje para que estas proteínas desarrollen su función en los sitios de polarización (Fujiwara *et al.*, 1998; Sheu *et al.*, 1998; van Drogen y Peter, 2002).

Existe un homólogo de Slk2, la proteína quinasa Mlp1, de la cual se ha sugerido que podría actuar en una ruta paralela a Slk2 regulando efectores de la ruta de integridad celular (Watanabe *et al.*, 1997; Jung *et al.*, 2002) y jugar un papel en los mecanismos de protección contra la oxidación celular (Belli *et al.*, 2004).

Factores de transcripción regulados por la ruta PKC

El factor de transcripción Rlm1

El factor Rlm1 es el principal responsable de la respuesta transcripcional regulada por la ruta PKC, que desencadena la expresión de genes específicos de biosíntesis de pared celular (Jung y Levin, 1999; Terashima *et al.*, 2000). El factor Rlm1 interacciona *in vitro* e *in vivo* con Slk2 y su actividad transcripcional se regula directamente mediante fosforilación por Slk2 (Watanabe *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 1997; Jung *et al.*, 2002). Rlm1 también interacciona con la proteína quinasa Mlp1. Rlm1 es un miembro de la familia de factores de transcripción tipo MADS box (Dodou y Treisman, 1997). Se ha demostrado que Rlm1 se une *in vitro* a la misma secuencia que el factor MEF2A de mamíferos (CTAW₄TAG) (Dodou y Treisman, 1997). En *S. cerevisiae* existen al menos dos factores más de la familia MADS Box, Smp1 (participa en la ruta HOG) y Mcm1 (participa en

la ruta que especifica el tipo sexual de la levadura).

Los factores de transcripción de la familia MADS box pueden actuar formando homodímeros o heterodímeros con otras proteínas. Su asociación con distintas proteínas permite dirigir selectivamente la capacidad activadora de la transcripción sobre distintos genes. Un buen ejemplo es el caso del factor Mcm1: en forma de monómero activa la transcripción de genes específicos- α ; en combinación con la proteína $\alpha 1$ activa la transcripción de genes específicos- α ; en combinación con la proteína $\alpha 2$ reprime la transcripción de genes α -específicos y también interacciona con Ste12 para activar la transcripción de genes requerido para la fusión celular y la conjugación (revisión en (Mead *et al.*, 2002). En el caso concreto de Rlm1, se ha demostrado que Rlm1 es capaz de heterodimerizar *in vitro* con Smp1 y MEF2A (Dodou y Treisman, 1997). Además se ha determinado que el factor Rlm1 es capaz de actuar tanto de activador como de represor de la expresión génica (Jung y Levin, 1999). Esto sugiere que debe existir una regulación más compleja de Rlm1 que la simple activación por fosforilación de Slt2. Por otro lado, aunque Rlm1 media la expresión de genes regulados por la ruta PKC, su delección no produce el fenotipo de lisis celular característico de los mutantes de la ruta PKC. Además, en el caso del gen *FKS2* se ha descrito que aunque Rlm1 participa en su expresión en condiciones basales, este factor no media la inducción térmica del gen estimulada por la ruta PKC (Zhao *et al.*, 1998; Jung y Levin, 1999). Por ello, se supone que existen otras proteínas que median la regulación de la expresión de genes de pared celular dependiente de la ruta PKC.

El factor de transcripción SBF

Un segundo factor de transcripción relacionado con la ruta PKC es el factor de transcripción de ciclo celular SBF, formado por una proteína de unión al DNA, Swi4 y una proteína reguladora, Swi6. Interacciones

genéticas y similitudes fenotípicas entre mutantes en SBF y mutantes de la ruta PKC indican que SBF está implicado en el mantenimiento de la integridad celular (Igual *et al.*, 1996; Madden *et al.*, 1997; Baetz *et al.*, 2001). Diversos genes implicados en la biosíntesis de pared celular se expresan periódicamente por la acción de SBF con un pico en la transición G1/S coincidiendo con el inicio de la gemación (Igual *et al.*, 1996; Iyer *et al.*, 2001). Se ha descrito que Swi6 y Swi4 interaccionan con Slt2 *in vivo* e *in vitro* y son fosforilados por dicha quinasa (Madden *et al.*, 1997; Baetz y Andrews, 1999; Baetz *et al.*, 2001). Sin embargo, el papel de Slt2 en la actividad de SBF es todavía bastante confuso. Muchos de los genes regulados por SBF, entre ellos los genes de las ciclinas *CLN1* y *CLN2*, no lo están por Slt2 (Madden *et al.*, 1997) y, en el caso de genes que codifican para proteínas de pared celular que están regulados tanto por SBF como por PKC, parece que dichas rutas actúan en paralelo (Igual *et al.*, 1996). Solamente en los genes de las ciclinas *PCL1* y *PCL2* (regulados por SBF) se ha analizado directamente la regulación por Slt2. La delección de *SLT2* produce únicamente un defecto muy ligero en la inducción por choque térmico de dichos genes, así como en la inducción de *PCL2* por feromonas (Madden *et al.*, 1997; Baetz *et al.*, 2001); se ha sugerido que Slt2 podría activar la unión de Swi4 y Swi6 a los promotores de dichos genes. Por otro lado, mediante un análisis con *DNA arrays* se ha descrito que existe un grupo de genes corregulados por Slt2 y Swi4 pero no por Swi6, lo que ha llevado a plantear la hipótesis de que exista una función de Swi4 regulada por Slt2 e independiente de SBF (Baetz *et al.*, 2001). Sin embargo, esta hipótesis se apoya en resultados que muestran simplemente una correlación, es decir, que existen algunos genes que estarían regulados tanto por Swi4 como por Slt2 pero sin datos concluyentes que apoyen una relación directa. Por último, quizás el dato más llamativo y contundente de la conexión entre SBF y la ruta PKC es que la fosforilación *in vivo* de Swi6 dependiente de Slt2 afecta a prácticamente la mitad de la proteína Swi6 presente en la célula

(Madden *et al.*, 1997; Queralt e Igual, 2003) y, sin embargo, un mutante de Swi6 que no se fosforila por Slt2, no presenta defectos importantes en la integridad celular, lo que ha llevado a plantear a los autores, sorprendentemente, que “Slt2 puede no modular la actividad de Swi6” (Baetz *et al.*, 2001). Evidentemente, estamos aún lejos de entender cuál es la conexión funcional entre la ruta PKC y SBF.

Reguladores negativos de la ruta

La existencia de una regulación negativa de las rutas de señalización es de vital importancia para desactivarlas cuando la célula se ha adaptado a las nuevas condiciones. Por ello, en procesos de señalización mediados por fosforilación las proteínas con actividad fosfatasa presentan una función muy importante contrarrestando la función de las quinasas. Las MAP quinasas se activan por fosforilación en residuos de Thr y Tyr y se inactivan por defosforilación de cualquiera de estos dos residuos. Se han descrito 4 proteínas fosfatasas que inactivan a la ruta PKC defosforilando a Slt2. En primer lugar, las tirosina fosfatasas Ptp2 y Ptp3 (Mattison *et al.*, 1999), las cuales son también responsables de inactivar a las MAPK Hog1 y Fus3 en la ruta HOG y en la ruta de respuesta a feromonas respectivamente. La expresión de *PTP2* se induce dependientemente de Slt2 en respuesta a choque térmico (Mattison *et al.*, 1999) y parece estar controlada al menos parcialmente por Rlm1 (Hahn y Thiele, 2002). Esta regulación genera un ciclo de retroinhibición muy habitual en cascadas de señalización. Por otro lado, se encuentran las proteínas fosfatasas de especificidad dual, Msg5 (Martin *et al.*, 2000) y Sdp1 (Collister *et al.*, 2002). Recientemente, se ha determinado que Msg5 y Slt2 actúan una sobre otra *in vivo* e *in vitro*, de modo que Slt2 podría actuar sobre Msg5 para mantener una activación prologada de la ruta PKC (Flandez *et al.*, 2004). En cuanto a Sdp1, es la única fosfatasa que defosforila específicamente a Slt2. Su actividad no está

controlada por la ruta PKC y su expresión esta controlada por Msn2/4 (Hahn y Thiele, 2002; Collister *et al.*, 2002).

Por último, otra fosfatasa, Sit4, una Ser/Thr fosfatasa de la familia de las PP2A, también afecta a la actividad de la ruta PKC (de la Torre-Ruiz *et al.*, 2002). Sit4 es importante para la inhibición de la actividad basal e inducida de la ruta PKC. No se conoce el mecanismo molecular de regulación de la ruta PKC por Sit4, aunque se sabe que actúa en niveles superiores a la proteína Pkc1.

Funciones de la ruta PKC

La función principal de la ruta PKC es el mantenimiento de la integridad celular en respuesta a estrés medioambiental y procesos de crecimiento polarizado. Así, la ruta PKC participa en la respuesta de adaptación a un choque térmico y al estrés hipoosmótico (Davenport *et al.*, 1995; Kamada *et al.*, 1995). Tanto el crecimiento a temperaturas altas como la disminución de la osmolaridad externa produce cambios fisiológicos que originan estrés en la superficie celular, lo cual activa a la ruta PKC que actúa estimulando la remodelación y biosíntesis de la pared celular necesaria para crecer en dichas condiciones. Por otro lado, la ruta PKC también se activa durante periodos de crecimiento polarizado, como la formación de las proyecciones durante la conjugación y la gemación (Marini *et al.*, 1996; Zarzov *et al.*, 1996; Gray *et al.*, 1997). Esta activación es esencial para mantener la integridad de la estructura celular en estos procesos morfogénicos. El estrés en la pared celular producido por la extensa remodelación y expansión de la superficie celular durante la formación de la yema y las proyecciones durante la conjugación es probablemente la señal que activa la ruta para asegurar la integridad celular. Por último, la ruta PKC también actúa en el mantenimiento de la integridad celular durante la quiescencia (Krause y Gray, 2002).

La importancia de la ruta PKC en la respuesta a alteraciones en la pared celular se manifiesta por la sensibilidad de mutantes de la ruta PKC a agentes que provocan daños sobre la pared como temperatura elevada, el vanadato, el blanco de calcofluor o los tratamientos con enzimas que digieren la pared. Estas sensibilidades son suprimibles por sorbitol (de Nobel *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2000). Se ha determinado que estos tratamientos tienen en común que inducen la fosforilación y activación de Slt2, sugiriendo que la debilitación de la pared aumenta la presión ejercida sobre la cara interna de la membrana plasmática generando un estrés detectado por los sensores de membrana. Los sensores de membrana transmiten la señal al interior celular desencadenando la respuesta de la célula con el objeto de garantizar la integridad de la pared celular (Popolo *et al.*, 1997; Ram *et al.*, 1998; Kapteyn *et al.*, 1999; Smits *et al.*, 1999). A esta respuesta se la ha denominado mecanismo compensatorio. Durante la activación del mecanismo compensatorio se produce una activación constitutiva de la ruta de integridad celular (de Nobel *et al.*, 2000).

La respuesta celular desencadenada por la célula para mantener la integridad celular implica la remodelación de la pared celular. Como ya se ha comentado, la ruta PKC activa la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con la biosíntesis de los componentes de la pared celular. Se ha sugerido que podría participar en la regulación de la deposición de quitina en la pared celular controlando, además de la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de quitina (Bulik *et al.*, 2003; Levin, 2005), la redistribución de la quitina sintasa (Chs3) en la membrana plasmática (Valdivia y Schekman, 2003). Por otra parte, otros estudios han sugerido que Pkc1 podría regular la actividad de la oligosacáril transferasa, que cataliza la N-glicosilación de proteínas, proceso muy importante en el ensamblaje de la pared celular (Zufferey *et al.*, 1995; Park y Lennarz, 2000). Y por otra parte, la GTPasa Rho1 activa la subunidad catalítica del enzima β -1,3-glucanosintasa (GS) responsable de la síntesis de

β -1,3-glucano (Drgonova *et al.*, 1996; Qadota *et al.*, 1996).

Además de la biosíntesis de los componentes de la pared celular, el mantenimiento de la integridad celular implica la regulación del citoesqueleto de actina, ya que es necesario un aporte continuo de componentes celulares a los sitios de remodelación de la pared celular. La ruta PKC controla la polarización del citoesqueleto de actina, dirigiendo las vesículas de secreción al sitio de crecimiento en la superficie celular (Costigan *et al.*, 1992; Mazzoni *et al.*, 1993; Zarzov *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1996; Delley y Hall, 1999; Nanduri y Tartakoff, 2001; Breton *et al.*, 2001; Valdivia y Schekman, 2003). Además, se ha observado que las proteínas Rho1, Mkk1, Mkk2 y Slt2 se localizan en los parches de actina (Yamochi *et al.*, 1994; Sheu *et al.*, 1998). La ruta PKC también se ha implicado en la despolarización transitoria del citoesqueleto, desde los puntos de crecimiento de la yema hacia el resto de la superficie de la célula, para responder a la necesidad de redistribuir la síntesis y reparación de la pared por toda la célula en respuesta a diversos estreses (incluso agresiones sobre la pared celular). Se había sugerido que esta función depende de Pkc1 pero no de la cascada de MAP quinasa (Delley y Hall, 1999), aunque recientemente esta aseveración ha sido cuestionada (Levin, 2005).

Diversos estudios han relacionado la ruta PKC con el control del ciclo celular. Se ha descrito que Slt2 participa en el *checkpoint* de morfogénesis retrasando la progresión del ciclo celular en la transición G2/M. Los *checkpoints* son mecanismos de vigilancia que previenen el inicio de un proceso del ciclo celular si existen anomalías o cuando un proceso anterior no se ha completado satisfactoriamente. El *checkpoint* de morfogénesis bloquea el ciclo celular en G2/M dando tiempo a la recuperación del citoesqueleto de actina y con ello a la formación y crecimiento de la yema antes de la división celular. Existen diversas opiniones sobre las causas responsables de la activación del *checkpoint* de morfogénesis, entre ellas se han señalado la despolarización del

citoesqueleto de actina (Lew, 2000; Harrison *et al.*, 2001; Lew, 2003) y el tamaño de la yema (Kellogg, 2003; Harvey y Kellogg, 2003). La transición G2/M está controlada por la quinasa Cdc28 y el *checkpoint* bloquea la progresión en el ciclo celular al inhibir a Cdc28 por fosforilación de la Tyr-19. Slt2 actúa favoreciendo esa fosforilación, aunque hay discusión sobre de que modo actúa, ya que unos autores han sugerido que activaría a la quinasa Swe1, responsable de la fosforilación de la Tyr-19 de Cdc28 (Mizunuma *et al.*, 1998; Harrison *et al.*, 2001; Mizunuma *et al.*, 2001), mientras que otros autores sugieren que inactivaría a la fosfatasa Mih1, que revierte la fosforilación en Tyr-19 de Cdc28 (Harrison *et al.*, 2001; Martínez-Anaya *et al.*, 2003). Por otro lado, diversos estudios han mostrado una conexión entre Pkc1 y el complejo remodelador de la cromatina RSC, sugiriéndose que actuarían coordinadamente en la transición G2/M (Hosotani *et al.*, 2001; Romeo *et al.*, 2002; Chai *et al.*, 2002).

La ruta PKC ha sido también relacionada con otras funciones. Así, distintas evidencias relacionan la ruta PKC con el metabolismo del DNA. Se ha observado que Pkc1 activa a la CTP sintetasa (Yang y Carman, 1995; Yang *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2003) y que células mutantes en la función Pkc1 presentan frecuencias elevadas de recombinación del DNA (Huang y Symington, 1994; Luo *et al.*, 2002). Además, la viabilidad de mutantes de la ruta depende de un *checkpoint* de integridad del DNA funcional y la ruta se activa al bloquear la replicación del DNA (Queralt e Igual, 2005). Por otra parte, las interacciones genéticas que presentan mutantes de la ruta PKC con genes implicados en el SPB o el funcionamiento de microtúbulos sugieren una relación de la ruta con este proceso (Khalfan *et al.*, 2000; Hosotani *et al.*, 2001); de hecho recientemente se ha localizado a Pkc1 en el SPB, lo que sugiere que Pkc1 podría regular el esqueleto de microtúbulos directamente (Denis y Cyert, 2005). Por otra parte, existen estudios que sugieren una participación de la ruta PKC en el

control del metabolismo del carbono (Brandao *et al.*, 2002; Salgado *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2005) y en la regulación de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática (Souza *et al.*, 2001). Por tanto, la ruta PKC presenta funciones adicionales en la célula además del mantenimiento de la integridad celular. Al igual que la proteína quinasa C de mamíferos, probablemente Pkc1 desempeñe un papel general en el control del crecimiento y la proliferación celular en levadura.

REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN POR MAPKS

Era conocido desde hace tiempo que las MAPKs controlan la expresión génica a través de la regulación de factores de transcripción. Sin embargo, más recientemente se ha observado que las MAPKs también actúan a otros niveles. Así, las MAPKs son capaces de unirse a los promotores y reclutar y activar a distintas proteínas de la maquinaria transcripcional, complejos remodeladores de la cromatina y proteínas nucleosomales, necesarias para la activación de la transcripción (para revisiones recientes ver Yang *et al.*, 2003; Edmunds y Mahadevan, 2004).

Uno de los casos mejor estudiados es el mecanismo de regulación de la transcripción por la MAPK Hog1. Hog1 es la MAPK de la ruta HOG, responsable de desencadenar la respuesta celular en condiciones de alta osmolaridad en el medio (Posas *et al.*, 2000; O'Rourke *et al.*, 2002; Hohmann, 2002; Saito y Tatebayashi, 2004). La ruta se compone de un módulo de MAPKs compuesto por las MAPKKKs Ssk2, Ssk22, la MAPKK Pbs2 y la MAPK Hog1. Una vez activada, Hog1 es importada al núcleo donde inducirá la expresión génica. Estudios genómicos han determinado que la ruta HOG regula la expresión en respuesta a estrés hiperosmótico de aproximadamente 600 genes (Rep *et al.*, 2000; Posas *et al.*, 2000; O'Rourke y Herskowitz, 2004). Hasta la fecha se han caracterizado 5 factores de transcripción regulados por Hog1: los factores Msn2/4, Msn1, Hot1 y Smp1,

que actúan como reguladores positivos, y el factor Sko1, que actúa como represor de la transcripción (Schuller *et al.*, 1994; Rep *et al.*, 1999; Rep *et al.*, 2000; Proft y Struhl, 2002; Hohmann, 2002; de Nadal *et al.*, 2003).

Estudios recientes han determinado que Hog1 es capaz de unirse al DNA de los promotores de diversos genes regulados por la ruta en respuesta a estrés osmótico (Alepuz *et al.*, 2001; Proft y Struhl, 2002; Alepuz *et al.*, 2003; de Nadal *et al.*, 2004). El reclutamiento de Hog1 a los promotores está mediado por los factores de transcripción, aunque la situación es diferente para los diversos genes estudiados. En el caso del gen *GPD1*, se determinó que el factor Hot1 está asociado constitutivamente al gen y sólo en respuesta a estrés osmótico recluta a Hog1. Sin embargo, en el caso del gen *STL1*, únicamente en respuesta a estrés osmótico se produce la asociación, de forma interdependiente, de la MAPK Hog1 y el factor Hot1 al promotor de *STL1*. Hay que resaltar que la fosforilación de Hot1 por Hog1 no afecta a la capacidad de Hot1 de unirse al DNA o activar la transcripción de *STL1* (Alepuz *et al.*, 2001). En otros genes como *HSP12*, *CTT1* y *ALD3* la inducción de la expresión por estrés osmótico está controlada por los factores de transcripción Msn2/4 (Rep *et al.*, 1999), que son los responsables del reclutamiento de Hog1 a los promotores de dichos genes (Alepuz *et al.*, 2001). En los genes *CTT1* y *HSP12*, Hog1 media el reclutamiento del factor Hot1 al promotor. En este caso la actividad quinasa de Hog1 si parece ser necesaria para este reclutamiento (Alepuz *et al.*, 2001; Alepuz *et al.*, 2003). Es importante resaltar, que tanto el dominio responsable de la actividad quinasa, como el dominio *docking* de Hog1, responsable de la interacción con otras proteínas, son necesarios para la activación de la transcripción. Una vez unida al promotor, Hog1 es capaz de reclutar y activar a componentes de la maquinaria general de la transcripción como la RNA polimerasa II, proteínas Srb-mediador, TFIIB y el complejo histona desacetilasa Rpd3-Sin3 (Alepuz *et al.*, 2003; de Nadal *et al.*, 2004). Sin

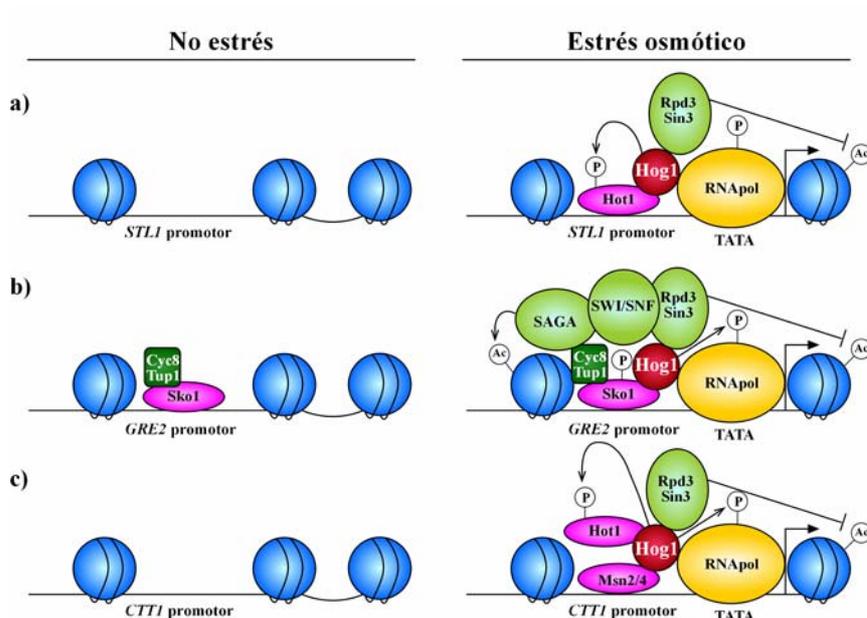


Figura 1.3. Esquema de regulación transcripcional mediada por la MAPK Hog1 en *S. cerevisiae* (adaptada de Edmunds *et al.*, 2004)

embargo, se ha demostrado que aunque la eliminación de la actividad quinasa de Hog1 no impide reclutamiento de la RNA polimerasa II si se afecta la transcripción génica (Alepuz *et al.*, 2003). Estas observaciones sugieren que una vez se ha reclutado la maquinaria transcripcional a los promotores, parece ser necesario un paso de activación de sus componentes posiblemente por fosforilación mediada por Hog1.

Otros estudios han analizado cómo controla Hog1 la regulación de la expresión mediada por represor Sko1. En condiciones de no-estrés, el factor Sko1 mantiene reprimida la expresión de genes regulados por estrés osmótico reclutando al complejo co-represor Cye8-Tup1 a los promotores de

estos genes (Proft y Serrano, 1999; Garcia-Gimeno y Struhl, 2000; Proft *et al.*, 2001). En respuesta a estrés hiperosmótico, Hog1 se asocia a Sko1 en los promotores de, al menos, los genes *GRE2* y *AHPI*. Una vez en el promotor, Hog1 fosforila a Sko1 y transforma la actividad de Sko1-Cyc8-Tup1 de represora en activadora de la transcripción. En este contexto se produce un reclutamiento de los complejos remodeladores de la cromatina SAGA y SWI/SNF. Se ha observado que el represor Cyc8-Tup1 no se libera del promotor sino que permanece unido y en su ausencia el reclutamiento de SAGA y SWI/SNF resulta menos eficiente (Proft y Struhl, 2002). Los autores de este estudio sugieren que la complejidad de este mecanismo favorece un cambio rápido entre encendido-apagado del gen, especialmente favorable cuando las células se han adaptado al estrés o este ha cesado. Sugieren que sería más rápido eliminar del promotor únicamente a los cofactores que liberar a todos los factores de transcripción para tener que volver a reclutarlos (Proft y Struhl, 2002).

Hasta la fecha, no se han encontrado evidencias que demuestren que otras MAPKs de levadura puedan ejercer funciones similares. Sin embargo, algunas observaciones sugieren que la MAPK Slt2, de la ruta de integridad celular, podría estar relacionada con proteínas que participan en el proceso de transcripción. Así, se ha sugerido que las proteínas HMG1-like Nph6A y Nph6B podrían estar reguladas por la ruta PKC, actuando por debajo de Slt2 (Costigan *et al.*, 1994). También se ha observado que Slt2 posee cierta actividad transcripcional (Costigan *et al.*, 1994; Soler *et al.*, 1995). Además, interacciones genéticas y similitudes fenotípicas entre mutantes de la ruta PKC y miembros del complejo Paf1C, que se asocia con la RNA pol II en el proceso de transcripción, sugieren que dicho complejo podría estar regulado por la ruta PKC para controlar la expresión génica de determinados grupos de genes (Chang *et al.*, 1999).

Los estudios realizados en células de mamíferos no han mostrado resultados tan evidentes como en levadura, aunque diversas evidencias

sugieren que en organismos superiores las MAPKs podrían seguir un modo de actuación similar al observado en la quinasa Hog1. Por ejemplo, se ha determinado que la MAPK p38, homóloga a Hog1, interacciona con la RNA pol II (Alepez *et al.*, 2003). Esto sugiere que al igual que ocurre en levadura, la MAPK p38 podría participar en el reclutamiento de la RNA pol II a los promotores de genes regulados. Futuros estudios son necesarios para descubrir si el papel que ejerce Hog1 en la regulación de la transcripción génica es aplicable a otras MAPKs.

EL CICLO CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae*

El ciclo celular es una sucesión ordenada de procesos mediante los cuales una célula crece y se divide en dos. Básicamente, la célula debe completar cuatro funciones durante el ciclo celular: crecer, replicar el DNA, segregar los cromosomas en dos conjuntos iguales y dividirse. El ciclo celular se ha dividido históricamente en cuatro fases: la fase S (síntesis) durante la cual se replica el DNA, la fase M (mitosis) en la que se segregan los cromosomas y se dividen las células, y dos fases G1 y G2 (*gap*) que separan el final de la mitosis del inicio de la replicación (G1) y el final de la replicación del inicio de la mitosis (G2). La caracterización molecular de los procesos que controlan la progresión en el ciclo celular ha despertado siempre un gran interés, incrementado por su relación directa con el cáncer y otros problemas médicos importantes. Los trabajos realizados en diferentes organismos han puesto de manifiesto que en todos los eucariotas, desde los organismos pluricelulares más complejos hasta los eucariotas más simples como las levaduras, el ciclo celular está gobernado por los mismos principios generales y que las proteínas clave han sido fuertemente conservadas durante la evolución. En el centro de los mecanismos que gobiernan el ciclo celular está una familia de quinasas denominadas CDK (*cyclin-dependent kinases*). Las CDKs implicadas en el control del ciclo

celular son quinasas cuya actividad oscila a lo largo del ciclo mediante su asociación con proteínas reguladoras inestables de abundancia variable según la fase del ciclo, de ahí su denominación de ciclinas (Morgan, 1997; Roberts, 1999; Murray, 2004). Entre las diferentes CDKs, la CDK1 (Cdc28 en *S. cerevisiae*) está fuertemente conservada entre todos los eucariotas y es la máxima responsable del control de las transiciones G1/S y G2/M en levadura y de la transición G2/M en animales.

Uno de los organismos de mayor utilidad en la comprensión de los diversos aspectos del ciclo celular ha sido la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En *S. cerevisiae*, al igual que en células de mamífero, el principal control durante el ciclo celular está situado al final de la fase G1, en un punto llamado START. En START se coordina el crecimiento con la división celular: la célula solo entrará en un nuevo ciclo celular si ha alcanzado un tamaño crítico y las condiciones medioambientales son apropiadas. Además, en este punto de control de la fase G1 la célula decide su destino entre las diferentes opciones de desarrollo: 1) ejecutar START y comprometerse con una nueva ronda de división; 2) parar el ciclo celular en G1, dando lugar a la entrada en fase G0, o la esporulación, dependiendo del tipo celular y de la severidad de la limitación de nutrientes; 3) en el caso de las células haploides responder a la presencia de feromonas parando el ciclo celular y activando el proceso de conjugación.

Una vez ejecutado START se ponen en marcha los diferentes procesos post-START: la gemación, la duplicación del SPB (huso acromático en levadura) y el inicio de la replicación del DNA. La formación de la yema implica la polarización del citoesqueleto de actina, y la secreción direccional de componentes necesarios para la formación de la pared celular. El crecimiento de la yema sucede en dos fases: inicialmente presenta un crecimiento apical y polarizado. Más tarde, cuando la yema alcanza la tercera parte de su tamaño final, el crecimiento se vuelve isotrópico, produciéndose deposiciones de pared celular uniformemente por toda la

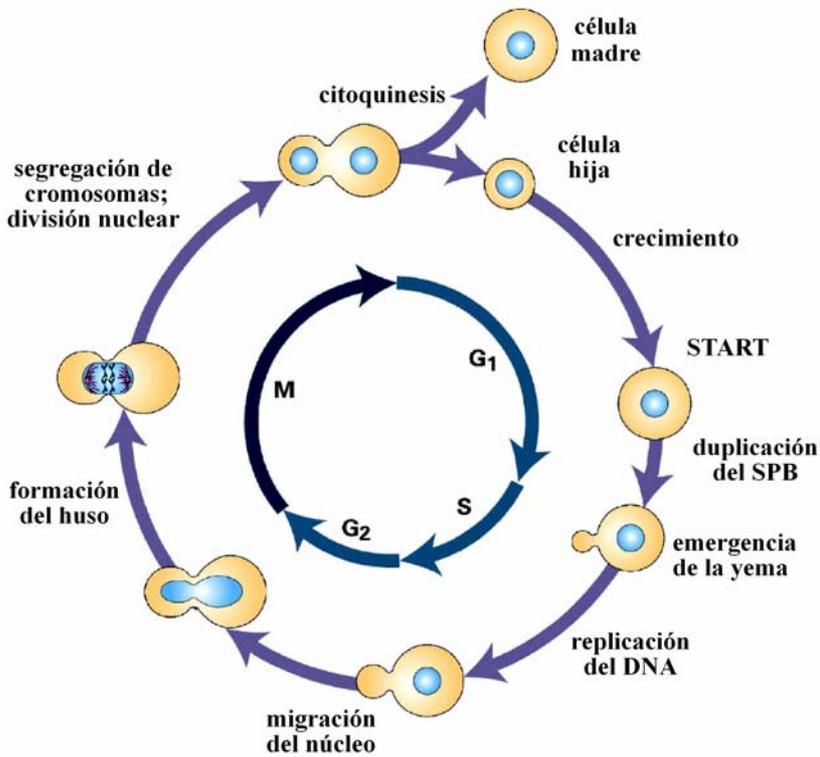


Figura 1.4. Esquema del ciclo celular de *S. cerevisiae* (adaptada de Lodish *et al.*, 2004)

yema. Este último proceso se produce al final de la fase S y durante la mitosis. La aparición y el tamaño de la yema sirven pues como marcadores de las diferentes fases del ciclo celular. Por su parte, la mitosis se subdivide en 4 fases: profase, metafase, anafase y telofase. Los cromosomas se condensan durante la profase, se alinean con el huso acromático en metafase, se separan en dos durante la anafase y se descondensan en la telofase. En *S.*

cerevisiae, a diferencia de los eucariotas superiores, la mitosis se caracteriza por ser cerrada ya que la membrana nuclear no desaparece; además la formación del SPB es premitótica. Por último, al final de la mitosis se lleva a cabo la citoquinesis. Durante la citoquinesis se produce la contracción del anillo de actomiosina, se refuerza la pared celular y se hidroliza la quitina dando lugar a la separación de las dos células, siendo la célula hija algo más pequeña que la madre.

Reguladores clave del ciclo celular de *S. cerevisiae*

Cdc28

Saccharomyces cerevisiae posee al menos 5 CDKs, de las cuales únicamente Cdc28 tiene una función clara en la regulación del ciclo celular (Mendenhall y Hodge, 1998). El gen *CDC28* es esencial y su mutación bloquea la progresión en el ciclo celular en Start, aunque posteriormente se identificaron algunos alelos que bloquean el ciclo celular en la entrada de mitosis. El gen *CDC28* se expresa constitutivamente a lo largo del ciclo y la abundancia de la proteína Cdc28 es invariable y no limitante durante todo el ciclo celular. Por tanto, la regulación de la actividad quinasa, como ocurre con otras CDKs, será post-traducciona. La CDK monomérica no tiene actividad proteína quinasa y su activación requiere dos procesos: la unión de la ciclina y la fosforilación del residuo Thr-169 en Cdc28. Esta activación se revierte por la unión de proteínas inhibitoras denominadas CKIs y por fosforilación del residuo Tyr-19 en Cdc28 (Morgan, 1997).

Ciclinas

Las ciclinas, se definen como proteínas capaces de unir y activar a la CDK. Presentan gran variabilidad, conteniendo un único dominio común conservado denominado “caja ciclina”. En *S. cerevisiae* existen nueve ciclinas diferentes que forman complejos con Cdc28 implicadas en la

regulación de la progresión del ciclo celular (Mendenhall y Hodge, 1998; Andrews y Measday, 1998; Breeden, 2000; Miller y Cross, 2001). Estas ciclinas se pueden dividir en tres grupos: ciclinas de fase G1 (Cln1, Cln2, Cln3), ciclinas de fase S (Clb5, Clb6) y ciclinas de fases G2 y M (Clb1, Clb2, Clb3, Clb4). Todas las ciclinas son de síntesis periódica y sus niveles oscilan fuertemente a lo largo del ciclo, salvo Cln3; el gen *CLN3* únicamente presenta pequeños cambios en su expresión siendo los niveles de la proteína prácticamente constantes a lo largo del ciclo celular. Además de activar a Cdc28, las ciclinas también pueden participar aportando funciones específicas a los complejos Cdc28-ciclina a través del reconocimiento de sustratos o localizando a la quinasa en sitios concretos (Miller y Cross, 2000; Miller y Cross, 2001; Edgington y Futcher, 2001; Loog y Morgan, 2005).

Inhibidores de CDKs (CKIs)

En *S. cerevisiae* se han descrito dos CKI de Cdc28: Far1 y Sic1. Ambas proteínas se sintetizan al final de la mitosis y son degradadas en la transición G1/S (Schwob *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1996; Henchoz *et al.*, 1997). Far1 es un inhibidor de la actividad de los complejos Cdc28-Cln, siendo inactivo frente a complejos Cdc28-Clb (Tyers y Futcher, 1993; Peter y Herskowitz, 1994). Interviene en la coordinación entre el crecimiento y el ciclo celular (Alberghina *et al.*, 2004), en el proceso de gemación y en la respuesta a feromonas (Peter *et al.*, 1993; Gulli y Peter, 2001). Por su parte, Sic1 es el inhibidor de los complejos Cdc28-Clb, siendo inactivo frente a complejos Cdc28-Cln (Mendenhall, 1993). La función de Sic1 controla la iniciación de la fase S y es importante para la salida de mitosis (Visintin *et al.*, 1998) y para el control de la iniciación de la replicación del DNA (Schwob *et al.*, 1994; Lengronne y Schwob, 2002).

Swe1

La quinasa Swe1 fosforila a la CDK Cdc28-Clb en la Tyr-19 inactivándola (Booher *et al.*, 1993). Participa en el mecanismo de *checkpoint* de morfogénesis que detiene el progreso del ciclo en G2/M en respuesta a fallos en la formación de la yema (Lew, 2003; Kellogg, 2003). Además, recientemente se ha observado que también participa en la transición G1/S regulando la entrada de la célula en un nuevo ciclo celular tras una parada causada por el bloqueo de la síntesis de proteínas (Saracino *et al.*, 2004).

Transcripción y proteólisis en el control del ciclo celular

La activación de los diversos complejos CDK-ciclina a lo largo del ciclo estará determinada por los niveles existentes de ciclinas y de inhibidores en cada momento. Dos mecanismos moleculares van a ser básicos para el control de los niveles de estos reguladores del ciclo: la regulación de la transcripción génica y el control de la estabilidad de proteínas.

La expresión coordinada de distintos grupos de genes es una estrategia muy frecuente en *S. cerevisiae*. Se calcula que los genes de expresión periódica representan alrededor del 15-20% del conjunto global de genes (Spellman *et al.*, 1998; Cho *et al.*, 1998; Iyer *et al.*, 2001). Dichos genes están normalmente implicados en procesos específicos del ciclo celular y su pico de expresión coincide en la mayoría de los casos con el momento en que se necesitan sus productos. Este sistema puede proporcionar ventajas competitivas garantizando una máxima fidelidad y eficacia en los procesos del ciclo celular (Breedon, 2003).

En *S. cerevisiae*, existen varias ondas de expresión periódica a lo largo del ciclo: en la transición M/G1, al principio de la fase G1, en la

transición G1/S (Start) y en las fases S, G2 y M. Esta transcripción periódica está regulada por factores de transcripción que son a su vez expresados de forma periódica apareciendo una serie de interrelaciones entre ellos que ayudan a organizar las sucesivas oleadas de expresión (Simon *et al.*, 2001; Breeden, 2003). En cada una de estas ondas de expresión se sintetizarán reguladores clave para controlar el avance en el ciclo celular. El principio de la fase G1 es el momento de máxima expresión del gen *CLN3* y del gen *SWI4* (componente de SBF). Cln3 activa a los factores de transcripción SBF y MBF, los cuales son los responsables de la expresión de muchos genes en la transición G1/S. Entre estos genes se encuentran los de las ciclinas de fase G1 *CLN1* y *CLN2* y de fase S *CLB5* y *CLB6*, factores de transcripción como el propio *SWI4* o *NDD1*, así como muchos genes implicados en síntesis y reparación del DNA, gemación y pared celular, y duplicación del huso acromático. En la fase S se expresan los genes de las ciclinas *CLB3* y *CLB4* y de factores de transcripción como *FKH2*. Fkh2 se asocia a Ndd1 y Mcm1 para controlar la transcripción específica de genes en la fase G2/M, entre ellos los genes de las ciclinas *CLB1* y *CLB2* y de los factores de transcripción *SWI5* y *ACE2*. Posteriormente Swi5 y Ace2 activan una nueva oleada de expresión en la transición M/G1 que incluye al gen del inhibidor *SIC1*.

El segundo mecanismo implicado en el control de los niveles celulares de reguladores del ciclo celular es la proteólisis mediada por ubiquitinación de proteínas y degradación en el proteasoma. (Jorgensen y Tyers, 1999; Koepp *et al.*, 1999; Tyers y Jorgensen, 2000; Murray, 2004). Existen dos ubiquitina ligasas (enzimas requeridos para la ubiquitinación de sustratos específicos) que juegan un papel muy importante en la regulación del ciclo celular de *S. cerevisiae*. El complejo SCF, responsable de la degradación de ciclinas G1 y de inhibidores de CDKs, controla la transición

G1/S (DeSalle y Pagano, 2001). El complejo APC, responsable de la degradación de inhibidores de anafase y de ciclinas mitóticas, controla la transición metafase-anafase y la salida de mitosis (Morgan, 1999; Zachariae y Nasmyth, 1999; Peters, 2002). El complejo SCF está formado por cuatro subunidades: Skp1, Cdc53, Rbx1 y una proteína adaptadora con 'caja F' que es la subunidad responsable del reconocimiento específico de los sustratos. Las proteínas adaptadoras que intervienen en la regulación del ciclo son Cdc4, Grr1 y Met30. El complejo SCF^{Cdc4} transfiere la ubiquitina a Sic1 y Far1, SCF^{Grr1} media la ubiquitinación de las ciclinas G1 y SCF^{Met30} está implicado en la degradación de Swe1. Una región de las proteínas sustrato rica en prolina, serina y treonina denominada PEST es la responsable de su inestabilidad. SCF está constitutivamente activo a lo largo del ciclo. Sin embargo, se controla la susceptibilidad del sustrato para ser ubiquitinado, ya que la fosforilación del mismo es esencial para el reconocimiento a través de las proteínas adaptadoras.

El complejo APC (*anaphase promoter complex*) es un complejo de elevada masa molecular en el que participan al menos 13 subunidades. El correcto funcionamiento del complejo APC depende de las proteínas adaptadoras Cdc20 o Cdh1, las cuales se encargan de unir a los sustratos. La proteína adaptadora Cdc20 reconoce al inhibidor de anafase Pds1 y a las ciclinas Clb. Cdh1 media la degradación entre otras proteínas de Cdc20 y de las ciclinas Clb. La ubiquitinación mediada por APC depende de unos elementos de secuencia característicos presentes en el sustrato (la caja destructora y la caja KEN). Al contrario de lo que ocurre en la ruta SCF, en esta vía de degradación se controla la actividad del complejo APC mediante la regulación de los niveles de Cdc20 y Cdh1, de manera que la ruta solo está activa desde la transición metafase-anafase hasta la transición G1/S. Fuera de este periodo, los sustratos degradados por esta vía son estables.

Dinámica del ciclo celular

El ciclo celular está controlado por la activación de los diversos complejos CDK-ciclina a lo largo del ciclo. Dichos complejos CDK-ciclina aparecen en ondas sucesivas de actividad quinasa garantizando el orden y la alternancia de los procesos (Nasmyth, 1996; Mendenhall y Hodge, 1998). En la fase G1 la célula se encuentra en un estado de baja actividad quinasa Cdc28 siendo Cln3 la única ciclina presente en la célula. Al final de la fase G1, la quinasa Cdc28-Cln3 promueve la entrada en una nueva ronda de división al activar la transcripción mediada por los factores SBF y MBF (Dirick *et al.*, 1995; Stuart y Wittenberg, 1995), responsables de la transcripción periódica de, entre muchos otros, los genes *CLN1* y *CLN2*, y los genes *CLB5* y *CLB6* respectivamente. La síntesis de Cln1 y Cln2 promueve la aparición brusca de las actividades quinasa Cdc28-Cln1/2. Los complejos Cdc28-Cln estimulan los procesos post-Start (Lew y Reed, 1993; Benton *et al.*, 1993; Cvrckova y Nasmyth, 1993; Gulli *et al.*, 2000; Haase *et al.*, 2001; Moffat y Andrews, 2004) y, lo que es importante, inducen la degradación del inhibidor Sic1 e inactivan la degradación de ciclinas Clb, (Tyers, 1996; Schneider *et al.*, 1996). Como consecuencia de ello, aparece las actividades quinasa de fase S Cdc28-Clb5 y Cdc28-Clb6, las cuales son las encargadas de controlar la iniciación de la síntesis de DNA (Epstein y Cross, 1992; Schwob y Nasmyth, 1993; Donaldson *et al.*, 1998; Weinreich *et al.*, 2001). Posteriormente en el ciclo, surge la actividad quinasa asociada a las ciclinas Clb3 y Clb4 controlando la formación del huso acromático. Durante la fase G2-M se acumulan las actividades quinasa Cdc28-Clb1/2 que controla la segregación de cromátidas y la elongación del huso acromático (Surana *et al.*, 1991; Richardson *et al.*, 1992; Fitch *et al.*, 1992; Grandin y Reed, 1993; Amon *et al.*, 1993) y promueven el cambio de crecimiento polarizado a crecimiento isotrópico de la yema (Lew y Reed, 1993; Grandin y Reed, 1993; Surana *et al.*, 1993). La actividad Cdc28-Clb

pone aismismo en marcha el proceso de salida de mitosis (Azzam *et al.*, 2004). Finalmente, la inactivación de las quinasas Cdc28-Clb por la activación de la degradación de las ciclinas Clb y la acumulación del inhibidor Sic1 origina la salida de mitosis y la vuelta al estado de baja actividad quinasa (Yeong *et al.*, 2001; Wasch y Cross, 2002; Stegmeier y Amon, 2004).

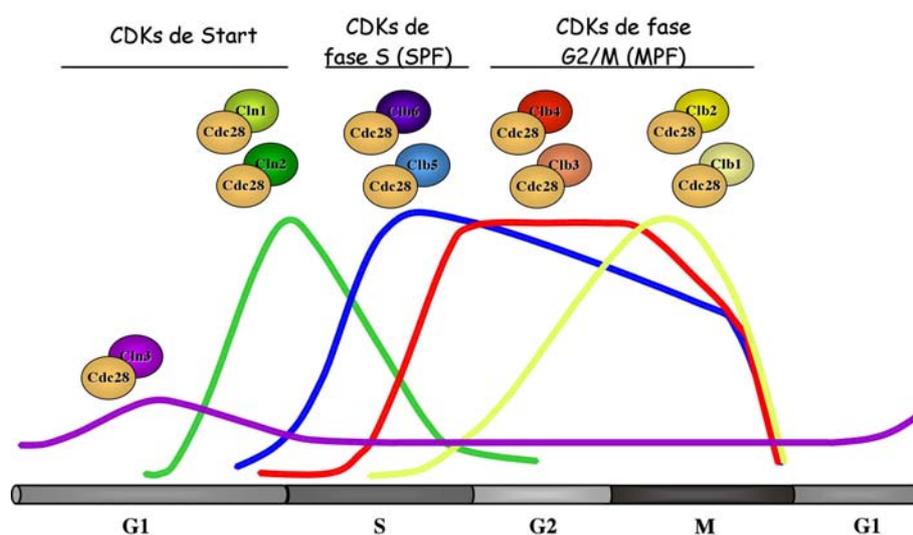


Figura 1.4. Ondas de actividad quinasa a lo largo del ciclo celular

A continuación se describe con más detalle los procesos que ocurren durante la transición G1/S por su mayor relación con los resultados presentados en este trabajo.

Transición G1/S

La célula de *S. cerevisiae* se compromete a una nueva ronda de división en el proceso de Start (Wittenberg y Flick, 2003). La ejecución de Start requiere que la célula haya alcanzado un tamaño crítico y que las condiciones medioambientales sean apropiadas. A nivel bioquímico implica la activación de Cdc28 por las ciclinas de G1 Cln. Las ciclinas Cln son el factor limitante y crítico para realizar Start. Mediante el control del nivel de Cln la célula de levadura coordina el crecimiento y la división celular (Rupes, 2002; Alberghina *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2004; Jorgensen y Tyers, 2004). Aunque son parcialmente redundantes en el sentido de que la presencia de al menos una de ellas es suficiente para la progresión en el ciclo, las ciclinas Cln desempeñan papeles diferentes en la transición G1/S. El inicio de la nueva ronda de división comienza con la activación de la quinasa Cdc28-Cln3. Cln3 está presente durante todo el ciclo con niveles prácticamente constantes y sin embargo el complejo Cdc28-Cln3 únicamente se activa al final de la fase G1. El mecanismo molecular de dicha activación se desconoce, aunque juega un papel importante la proteína Whi3, la cual, mediante su unión al mRNA de *CLN3* y a la quinasa Cdc28 controla la formación del complejo Cdc28-Cln3 y su entrada al núcleo (Gari *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004). Una vez activada, la quinasa Cdc28-Cln3 pone en marcha el programa de transcripción específico de la fase G1 tardía mediado por los factores de transcripción SBF y MBF (Dirick *et al.*, 1995; Stuart y Wittenberg, 1995).

SBF y MBF son factores heterodiméricos constituidos por una subunidad reguladora común, Swi6, y una proteína, diferente pero homóloga, con afinidad específica por DNA, Swi4 y Mbp1 respectivamente (revisado en Breeden, 1996 y 2003). Este sistema transcripcional es esencial para la viabilidad celular ya que las dobles mutaciones *swi4mbp1* y

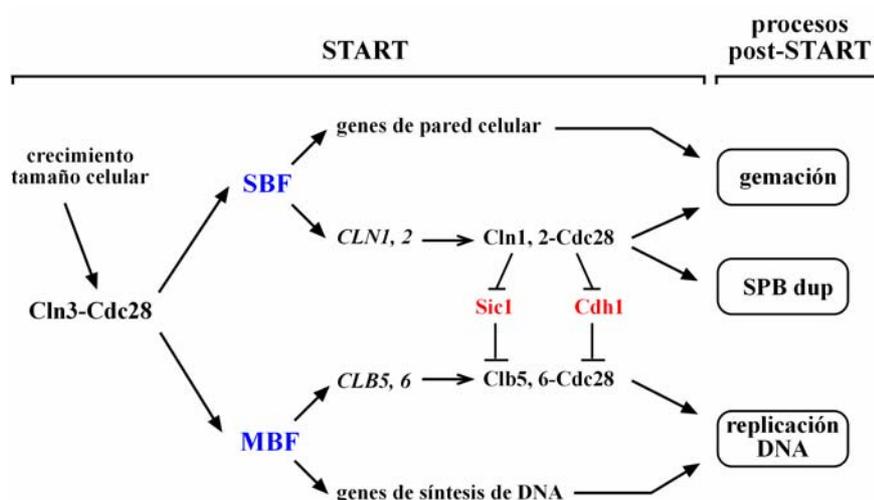


Figura 1.5. Esquema de START

swi4swi6 son letales. El factor SBF, controla la expresión de los genes *CLN1*, *CLN2* y genes relacionados con la biosíntesis de la pared celular. Por su parte, el factor MBF es responsable de la expresión periódica de los genes de las ciclinas *CLB5* y *CLB6* y de muchos genes relacionados con la síntesis de DNA. Además, estudios genómicos han descrito que SBF y MBF se unen a los promotores de distintos genes que codifican factores de transcripción que a su vez controlan la expresión de genes implicados en funciones tan diversas como gemación, síntesis y reparación de DNA, duplicación del SPB, elongación del huso, segregación cromosómica, migración y división nuclear y citoquinesis (Horak *et al.*, 2002). No hay que considerar a SBF y MBF como factores independientes ya que están claramente relacionados; no sólo comparten una misma subunidad, Swi6, sino que Swi4 y Mbp1 son

proteínas similares y ambos factores tienen funciones parcialmente redundantes.

El efecto de la inactivación de SBF o MBF en la expresión de los genes que regulan es muy variado. En algunos casos, como la regulación de genes implicados en el metabolismo de la pared celular (Igual *et al.*, 1996) o genes relacionados con la replicación del DNA (Koch *et al.*, 1993), la inactivación de SBF o MBF elimina su regulación periódica en G1/S pero sin alterar sus niveles globales. Sin embargo, en otros casos como en los genes de *CLN1* y *CLN2*, la inactivación de SBF y MBF origina una disminución importante de la expresión (Breedon y Mikesell, 1994; Cross *et al.*, 1994).

La actividad de SBF y MBF se regula a diferentes niveles. La expresión de *SWI4* (pero no *MBP1* o *SWI6*) varía a lo largo del ciclo celular, con un pico de expresión en G1 (MacKay *et al.*, 2001). Por su parte, se producen cambios en la localización subcelular de Swi6 a lo largo del ciclo celular (Taba *et al.*, 1991; Sidorova *et al.*, 1995) que son importantes para su funcionalidad (Queralt e Igual, 2003). Los factores están unidos a los promotores diana desde el inicio de la fase G1 (Cosma, 2002). Sin embargo, no pueden activar la transcripción debido a que se encuentran bloqueados por la unión del represor Whi5. Al final de la fase G1, Cdc28-Cln3 fosforila a Whi5 y con ello induce la expresión por SBF y MBF iniciándose un nuevo ciclo celular (Costanzo *et al.*, 2004; de Bruin *et al.*, 2004). En cuanto a la inactivación de la transcripción, los mecanismos son diferentes para SBF y MBF. En el primer caso, SBF se suelta del promotor por la acción de Cdc28-Clb2 al fosforilar a Swi4 (Amon *et al.*, 1993; Koch *et al.*, 1996). Sin embargo, el factor MBF se inactiva por un mecanismo desconocido aún, pero independiente de los complejos Cdc28-Clb.

Como consecuencia de la activación del programa transcripcional de Start, se produce la síntesis de las ciclinas Cln1, Cln2, Clb5 y Clb6. Dichas ciclinas se unen a Cdc28 apareciendo bruscamente la actividad quinasa

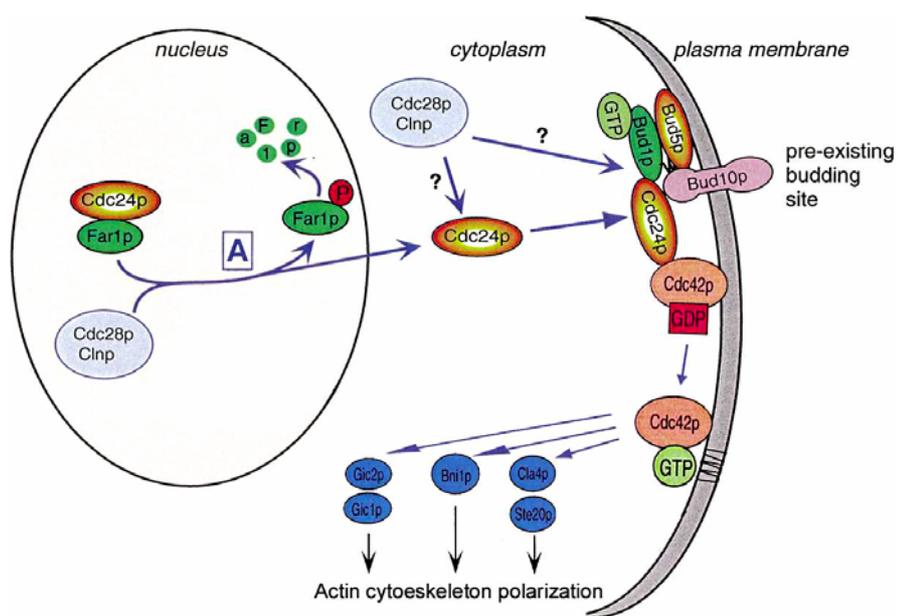


Figura 1.6. Regulación del proceso de gemación por Cdc28-Cln (adaptada de Gulli y Peter, 2001)

Cdc28-Cln1 y Cdc28-Cln2 pero permaneciendo inactivos los complejos Cdc28-Cln5 y Cdc28-Cln6 por la presencia del inhibidor Sic1. Las quinasas Cdc28-Cln1/2 pondrán en marcha los procesos post-Start: la polarización del citoesqueleto y gemación (Lew y Reed, 1993; Benton *et al.*, 1993; Cvrcikova y Nasmyth, 1993; Gulli *et al.*, 2000; Moffat y Andrews, 2004), la duplicación y/o separación del SPB (*spindle pole body* equivalente al centrosoma de eucariotas superiores) (Haase *et al.*, 2001) e, indirectamente, la iniciación de la replicación del DNA.

En lo que respecta a la iniciación de la replicación, ésta va a depender de la aparición de la actividad quinasa Cdc28-Cln5/6, las CDKs

responsables en último término de poner en marcha la síntesis de DNA. El papel de Cdc28-Cln1/2 en este proceso es fosforilar a Sic1 induciendo su degradación (Tyers, 1996; Schneider *et al.*, 1996) de manera que se elimina el inhibidor de las quinasas Cdc28-Clb5/6, a la vez que inactivan la degradación de las ciclinas Clb por APC (Amon *et al.*, 1994). Además, los complejos Cdc28-Cln1/2 se autofosforilan marcando a las ciclinas Cln1 y Cln2 para su degradación (Lanker *et al.*, 1996). Con todo ello, se realiza una transición de actividad quinasa Cdc28-Cln1/2 a Cdc28-Clb5/6. La aparición de la actividad Cdc28-Clb5/6 da lugar al comienzo de la fase S, iniciándose la replicación del DNA.

Por su parte, el papel de Cdc28-Cln1/2 en gemación comienza a ser entendido a nivel molecular. El proceso clave en la gemación es activar a la GTPasa Cdc42, la cual pone en marcha la polarización del citoesqueleto de actina en el sitio de gemación. La activación de Cdc42 depende del reclutamiento a la membrana de su factor intercambiador de nucleótidos Cdc24. En la fase G1, Cdc24 está secuestrada en el núcleo por su asociación a Far1. La activación de los complejos Cdc28-Cln1/2 desencadena la degradación de Far1 liberando a Cdc24, el cual puede salir ahora al citoplasma y activar a Cdc42 (Gulli y Peter, 2001). Aunque Cln1 y Cln2 son muy similares en estructura regulación y función, y de hecho son generalmente consideradas como ciclinas equivalente, estudios genéticos sugieren que Cln2 desempeña el papel principal en el control del proceso de gemación (Queralt e Igual, 2004).

2. Materiales y métodos

Cepas y condiciones de crecimiento

Cepas bacterianas

Durante todo el trabajo realizado, la cepa de *Escherichia coli* utilizada fue DH5 α . Las células bacterianas se cultivaron en medio LB (extracto de levadura 0.5%, triptona 1%, NaCl 1%) o en medio 2xYT (extracto de levadura 1%, triptona 2%, NaCl 1%). Las cepas resistentes a ampicilina se cultivaron en medio de cultivo suplementado con 50 μ g/ml de ampicilina y 50 μ g/ml de nafcilina (denominados LBA o 2xYTA). Las placas de medio de cultivo sólido se prepararon añadiendo agar bacteriológico al 2%. Las células se cultivaron a 37°C en agitación.

Cepas de levadura

Las cepas de levadura utilizadas en esta tesis se describen en la Tabla 2.1. Las células de levadura se cultivaron en medio YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona bacteriológica, 2% glucosa) o en medio mínimo sintético (SD) para la selección de plásmidos (0,67% yeast nitrogen base, 2% glucosa) suplementado con los aminoácidos adecuados a 40 μ g/ml. Las cepas resistentes a la geneticina se cultivaron en placas de YPD con 200 μ g/ml de G418 (geneticina). Las células se cultivaron a 25°C con agitación, salvo mención.

Para la realización de ensayos de actividad β -galactosidasa las cepas transformadas con los plásmidos adecuados, se inocularon en medio SD suplementado con los aminoácidos adecuados y se cultivaron durante toda la noche a 25°C. Después, se transfirieron las células a medio de cultivo YPD, En un primer momento, cultivos en fase preexponencial se incubaron 4h a 25°C, posteriormente las células se incubaron 4h a 37°C y se recogieron en fase exponencial de crecimiento.

Tabla 2.1. Cepas de levadura utilizadas.

Cepa	Genotipo	Origen
W303-1a	<i>MATa ade2 trp1 leu2 his3 ura3 can1</i>	
BAM1-11A	<i>MATα ade2 trp1 leu2 his3 ura3 met⁻ swi4^{ts}</i>	L.H. Johnston
BY600	<i>MATa ade2 trp1 leu2 his3 ura3 met⁻ can1</i> <i>ho::lacZ swi6::TRP1</i>	L Breeden
BY604	<i>MATα ade2 trp1 leu2 his3 ura3 met⁻ can1</i> <i>ho::lacZ swi4::LEU2</i>	L. Breeden
CY19	<i>MATα ade2-1 trp1 leu2 his3 met⁻ can1-100</i> <i>ho::lacZ mbp1::URA3</i>	L.H. Johnston
1783	<i>MATa ade2 trp1 leu2 his3 ura3 sucΔ9</i>	D. Levin
DL454	<i>slt2::TRP1</i> en 1783	D. Levin
SEY6211	<i>MATa ade2 trp1 leu2 his3 ura3 sucΔ9</i>	D. Levin
SEY6211DK	<i>slt2::LEU2</i> en SEY6211	D. Levin
TB50a	<i>MATa leu2 ura3 rme1 trp1 his3Δ GAL+</i>	M. N. Hall
PAY225	<i>RPB1-myc</i> en W303-1a	P. Alepuz
JC6-3a	<i>MATa ade2 trp1 leu2 his3 ura3 can1 met⁻ pkc1-8</i>	Nuestro grupo
JC800	<i>pkc1-8</i> en BY604 (<i>swi4::LEU2</i>)	Nuestro grupo
JCY076	<i>MATα ade2 trp1 leu2 his3 ura3 met⁻ swi4^{ts}</i> <i>swi6::TRP1 mbp1::URA3</i>	Nuestro grupo
JCY104	<i>swi4::ADE2</i> en W303-1a	Nuestro grupo
JCY114	<i>SWI6:3HA:kanMX6</i> en W303-1a	Nuestro grupo
JCY296	<i>cln2::LEU2</i> en W303-1a	Nuestro grupo
JCY345	<i>rlm1::TRP1</i> en W303-1a	Este trabajo

JCY398	<i>cln1::URA3</i> en JC63a (<i>pkc1-8</i>)	Nuestro grupo
JCY409	<i>cln2::LEU2</i> en JC63a (<i>pkc1-8</i>)	Este trabajo
JCY413	<i>rlm1::TRP1</i> en JCY104 (<i>swi4::ADE2</i>)	Este trabajo
JCY456	<i>SWI6:3HA:kanMX6</i> en JC63a (<i>pkc1-8</i>)	Este trabajo
JCY464	<i>slt2::TRP1</i> en W303-1a	Nuestro grupo
JCY465	<i>SWI6:3HA:kanMX6</i> en JCY464 (<i>slt2::TRP1</i>)	Este trabajo
JCY513	<i>SLT2:TAP</i> en W303-1a	Este trabajo
JCY514	<i>PKC1:TAP</i> en W303-1a	Este trabajo
JCY515	<i>SLT2:TAP</i> en TB50a	Este trabajo
JCY516	<i>PKC1:TAP</i> en TB50a	Este trabajo
JCY600	<i>PAF1:3HA:kanMX6</i> en W303-1a	Este trabajo
JCY601	<i>PAF1:3HA:kanMX6</i> en JC63a (<i>pkc1-8</i>)	Este trabajo
JCY602	<i>PAF1:3HA:kanMX6</i> en JCY413 (<i>rlm1::TRP1</i>)	Este trabajo
JCY603	<i>PAF1:3HA:kanMX6</i> en JCY464 (<i>slt2::TRP1</i>)	Este trabajo
JCY605	<i>RPB1:18myc:TRP1</i> en JC63a (<i>pkc1-8</i>)	Este trabajo
JCY606	<i>RPB1:18myc:TRP1</i> en JCY413(<i>rlm1::TRP1</i>)	Este trabajo
JCY607	<i>RPB1:18myc:TRP1</i> en SEY6211 (wt)	Este trabajo
JCY608	<i>RPB1:18myc:TRP1</i> en SEY6211DK (<i>slt2::LEU2</i>)	Este trabajo
JCY609	<i>RPB1:18myc:TRP1</i> en BY604(<i>swi4::LEU2</i>)	Este trabajo
JCY610	<i>RPB1:18myc:TRP1</i> en JC800 (<i>swi4::LEU2 pkc1-8</i>)	Este trabajo

JCY611	<i>cln2::LEU2</i> en JCY514 (<i>PKC1:TAP</i>)	Este trabajo
JCY612	<i>cln2::LEU2</i> en JCY464 (<i>slt2::TRP1</i>)	Este trabajo
JCY663	<i>kap123::kan MX6</i> en W303-1a	Nuestro grupo

Obtención de las cepas de levadura

La interrupción de los genes se realizó utilizando plásmidos con casete de disrupción o casete de disrupción obtenidos mediante PCR (según Longtine *et al.*, 1998). Los marcajes de proteínas con distintos epítopos se realizaron integrando fragmentos de DNA amplificados por PCR que codifican para el epítipo y el marcador de selección según se describe en Longtine *et al.*, 1998.

Construcción de los plásmidos

Los fragmentos de DNA de secuencias reguladoras del gen *FKSI* se amplificaron por PCR con oligonucleótidos específicos y se clonaron en el sitio *XhoI-SmaI* del *polilinker* del vector pLGL (derivado del plásmido pLGΔ178) que contiene el gen reportero *lacZ* fusionado con el promotor mínimo del gen *CYCI*. Los plásmidos se nombraron con los números de los últimos nucleótidos coincidentes con la secuencia del gen *FKSI*. Los insertos de los plásmidos pF468-414~~meb~~:*lacZ*, pF460-414:*lacZ*, pF460-414~~meb~~:*lacZ*, pF427-391:*lacZ*, y pRIm1BS:*lacZ* se obtuvieron mediante hibridación de oligonucleótidos complementarios entre sí y posterior clonación en el vector pLGL. En los experimentos se analizaron varios clones independientes de cada construcción.

El plásmido pRLM1-HA se obtuvo mediante integración en el plásmido YEp181-*RLM1* (cedido por el Dr. Irie) del casete de marcaje con el epítipo HA en C terminal.

Transformación de bacteria

Las transformaciones de bacteria con productos obtenidos a partir de ligación de DNA-inserto y vector, se realizaron con células competentes siguiendo el método de transformación por electroporación. Se utilizó un electroporador *E. coli Pulser* (*BioRad*), en las condiciones: 1,8 kV, 25 μ F, 200 Ω . Una vez sometidas las células al pulso de corriente, se dejaron recuperar en medio SOC (Extracto de levadura 0,5%, Tristona 2%, Glucosa 20 mM, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM) durante 45 minutos a 37°C y posteriormente se recogieron por centrifugación y se sembraron en placas de LBA.

Transformación de levadura

Las transformaciones con plásmidos y productos de PCR se realizaron siguiendo el método de transformación con acetato de litio (Gietz *et al.*, 1995) y se sembraron en placas de medio SD en ausencia del aminoácido adecuado. Las transformaciones en las que la selección fue resistencia a kanamicina se siguió el mismo protocolo con algunas modificaciones: después del choque térmico las células se centrifugaron y se incubaron en 4 ml de YPD en agitación durante 3-4 horas antes de sembrar en las placas con geneticina.

Determinación de la concentración de células

La concentración celular en los cultivos fue determinada en cultivos en fase exponencial (entre $2 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^7$ cel/ml), tras una sonicación breve para dispersar las células, utilizando un *Particle Count and Size Analyser Z₂* (Coulter Inc.).

Ensayos de actividad β -galactosidasa

La actividad β -galactosidasa se determinó a partir de $5 \cdot 10^7$ - 10^8 células, cultivadas como se ha explicado previamente. Una vez recogidas y lavadas con agua, se resuspendieron en 200 μ L de tampón Z (Na_2HPO_4 60 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 40 mM, KCl 10 mM, MgSO_4 1 mM, 0.1% de β -mercaptoetanol, pH 7) conteniendo 1mg/mL de zimoliasa 20T. Después de 20 minutos a 30°C se clarificaron los extractos por centrifugación. Cantidades adecuadas de extracto (2-180 μ L) se ajustaron con tampón Z hasta un volumen final de 900 μ L y se añadió 180 μ L de ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido) a una concentración de 4 mg/ml. Las muestras se incubaron a 30°C hasta que desarrollaron color amarillo. Las reacciones se detuvieron por adición de 450 μ L de Na_2CO_3 1M y se determinó la Absorbancia a 420 nm. La actividad se expresa en U/mg proteína total, donde 1 U se define como $A_{420} \cdot 10^3$ /min. de incubación. La concentración de proteína total se cuantificó por el método de Bradford.

Localización de proteínas mediante inmunofluorescencia indirecta

Aproximadamente 10^8 células se fijaron añadiendo formaldehído 37% en proporción 1:10 al medio de cultivo e incubando durante 60 min. en agitación a 25°C. Después de sonicar suavemente las células se lavaron dos veces con tampón A (Sorbitol 1.2 M, β -mercaptoetanol 0.1%, KH_2PO_4 50

mM pH 7.0). Para la obtención de esferoplastos se incubaron las células con Tampón A conteniendo zimoliasa 20T 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante aprox. 1-2 horas a 37°C con agitación. Una alícuota de 50-100 μL de la suspensión de esferoplastos se incubó con 20 μL de una disolución 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpo anti-HA *High Affinity 3F10 (Roche)* en PBS (NaCl 150 mM, Na_2HPO_4 40 mM y NaH_2PO_4 10 mM) conteniendo BSA 0.1% durante toda la noche a 4°C. Tras lavar los esferoplastos consecutivamente con PBS, PBS con NP-40 0.1% y PBS, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-rata conjugado con Alexa546 (*Molecular Probes*) durante 4 horas a 4°C en oscuridad. Tras lavar los esferoplastos como en el caso del anticuerpo primario, se tiñó el DNA con DAPI (*Sigma*) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS. Las muestras se visualizaron con un microscopio de fluorescencia *Axioskop de Zeiss Inc.* Las fotografías se obtuvieron con una cámara *SPOT de Diagnostic Instruments Inc.*

Inmunoprecipitación de la cromatina

Una misma cantidad de células para todas las muestras, aproximadamente $5 \cdot 10^8$ células, se entrecruzaron añadiendo formaldehído a una concentración final de 1% seguido de una incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación. La reacción de entrecruzamiento se detuvo añadiendo Glicina a una concentración final de 0.125 M y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente en agitación. Se lavaron las células 4 veces con TBS frío (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM), se resuspendieron en 300 μL de tampón de lisis (HEPES 50 mM pH 7.5, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 1%, deoxicolato sódico 0.1%, PMSF 1mM, Benzamidina 1 mM e inhibidores de proteasas CompleteTM de Roche) y se rompieron con perlas de vidrio con agitación vigorosa en vortex a 4°C durante 15 minutos. Se añadió tampón de lisis hasta un volumen final de 600 μL y se recuperó el extracto turbio. Las

muestras se sonicaron durante 2 pulsos de 30 segundos seguidos de 1 pulso de 20 segundos. Se eliminaron los restos celulares por centrifugación. Se separó una alícuota de 10 μ L como control del extracto total. Las proteínas etiquetadas con HA o myc se inmunoprecipitaron con 8 μ g de antiHA 12CA5 (*Roche*) o antimyc (*Roche*), respectivamente, unido a *Dynabeads Pan Mouse IgG* (*Dynal Biotech*) incubando las muestras durante 2 h a 4°C con agitación. Las muestras se lavaron 2 veces con 1 mL de tampón de lisis, 2 veces con 1 ml de tampón de lisis con NaCl 360 mM, 2 veces con 1 ml de tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM pH 8, LiCl 250 mM, NP-40 0.5%, deoxicolato sódico 0.5%, EDTA 1 mM) y 1 vez con TE 1x. La elución de las proteínas retenidas se realizó incubando las muestras a 65°C en agitación con 50 μ L de tampón de elución (TE 1x, SDS 1%, EDTA 10 mM) durante 10 minutos. La elución se repitió recuperando 30 μ l que se juntaron con la primera elución. Para revertir el entrecruzamiento se incubaron las muestras (incluida la alícuota tomada como control) a 65°C durante 15 h. El DNA se purificó mediante digestión con proteinasa K durante 1 h, dos extracciones de fenol:cloroformo:isoamílico y una de cloroformo:isoamílico. Finalmente se precipitó con un volumen de isopropanol y NaCl en concentración final de 80 mM. El DNA se resuspendió en 30 μ L de TE y se conservó a 4°C. Se analizó la presencia de las zonas de DNA de interés mediante PCR utilizando como molde el DNA obtenido. Los oligonucleótidos utilizados amplificaron fragmentos de DNA de los genes *FKSI*, *GASI*, *MNN1*, *MAT*, *GPD1*, *CTT1* e *HIS4*.

Detección de RNA mediante *northern*

Los extractos de RNA totales se prepararon fundamentalmente siguiendo el protocolo de (White *et al.*, 1986). Aproximadamente 10⁸ células se resuspendieron en 75 μ L de sacarosa 0.32 M, Tris-HCl 20 mM pH 7.5, EDTA 10 mM, heparina 0.5 mg/mL y se rompieron en el vortex con perlas

de vidrio durante 4 pulsos de 20 segundos. Inmediatamente se añadieron 600 μL de tampón (NaCl 100 mM, EDTA 5 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.5, SDS 1% y heparina 0.5 mg/mL) y 500 μL de fenol neutro atemperado a 65°C. La mezcla resultante se incubó a 65°C y se agitó con el vortex frecuentemente durante 5 min. La fase acuosa se extrajo con fenol a 65°C hasta tres veces, una vez con fenol/cloroformo/isoamílico y una vez con cloroformo/isoamílico. El RNA total se precipitó con NaAcO 0.3 M y 3 volúmenes de etanol absoluto. Para la electroforesis a 5 μg de RNA total se añadieron 2.5 μL glioxal 40%, 8 μL DMSO y 1.5 μL de tampón Na_3PO_4 100 mM pH 6.5 y se desnaturizó a 50°C durante 15 minutos. Los fragmentos de RNA se separaron en un gel de agarosa al 1.2% en tampón Na_3PO_4 10 mM pH 6.5 y se transfirieron a una membrana de nylon cargada positivamente (*Roche*) en tampón Na_3PO_4 25 mM pH 6.5. Finalizada la transferencia se fijó covalentemente el RNA a la membrana por irradiación con luz UV en un equipo Stratalinker (*Stratagene*) a 125000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$. Las sondas de fragmentos de PCR de secuencias internas del gen de interés se marcaron con ^{32}P por *random primer* con el kit *Redipime II random prime labelling system* (*Amersham Biosciences*). La membrana se prehibridó durante 1 h en disolución de hibridación SSPE 4X (NaCl 0.18 M, NaH_2PO_4 0.01 M, EDTA 0.001 M pH 7,7), Denhart 5X (BSA 0.1%, Ficoll 0.1% y PVP 0.1%), SDS 0.5%, DNAss 0.1 mg/ml. Seguidamente, se añadió la sonda de DNA marcada con ^{32}P y desnaturizada y se hibridó la membrana durante toda la noche a 65°C en rotación. Posteriormente, se eliminó la sonda no hibridada en la membrana, mediante 2 lavados a 65°C en tampón de lavado A (SSPE 2X, SDS 0.1%) durante 5 minutos y 2 lavados en tampón de lavado B (SSPE 1X, SDS 0.1%) durante 15 minutos. Los transcritos se detectaron mediante autorradiografía. La cuantificación se realizó utilizando el programa *Quantity One Quantitation v4.0* (*Bio-Rad*) y los resultados se normalizaron frente a la actina como control de carga.

Análisis de expresión génica global mediante macrochips de DNA

Extracción de RNA total

La extracción de RNA total utilizado en los análisis mediante DNA *arrays*, se realizó siguiendo el protocolo descrito previamente por Sherman *et al.*, 1986 con algunas modificaciones. Se recogieron aprox. $5 \cdot 10^8$ - 10^9 células provenientes de cultivos en fase en exponencial de crecimiento. Las células se lavaron con agua fría, manteniéndose en hielo en todo momento. Se resuspendieron en 500 μ l de tampón LETS (LiCl 0.1 M, EDTA 10 mM, SDS 0.2%, Tris-HCl 10 mM pH 7.4) y se añadieron 500 μ l de fenol y perlas de vidrio. Las células se rompieron por agitación en un aparato *Fast Prep (Savant Instruments)* mediante 3 pulsos de 30 segundos. Se eliminaron los restos celulares por centrifugación a 4°C a máxima velocidad durante 5 minutos. La fase acuosa se extrajo 2 veces con fenol:cloroformo:isoamílico y 1 vez con cloroformo:isoamílico. El RNA total se precipitó a -80°C durante al menos 3 h con 1 volumen de LiCl 5 M. El precipitado se lavó con etanol al 70%. Para obtener un mayor grado de pureza, tras resuspender el precipitado en agua destilada, se realizó una segunda precipitación con NaAcO 0.3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Se cuantificó la concentración del RNA total mediante medición de la absorbancia a 260 nm.

Marcaje radioactivo de RNA

El RNA total obtenido como se ha descrito previamente se marcó mediante transcripción reversa. La mezcla consistente en: 30 μ g de RNA total, 0,5 μ g de oligo dT (5' T₁₅VN 3'), 1 μ l RNAsa OUT (*Invitrogen*) y agua sin RNAsas hasta un volumen de 10 μ l, se incubó durante 10 min a 70°C y se enfrió en hielo durante 5 minutos, para desnaturalizar la muestra. Sobre esta mezcla se añadieron: 5 μ l de tampón 5xFirst-Strand (*Invitrogen*),

3 μ l de 0,1 DDT, 1,5 μ l de mezcla de dNTPs (dATP, dGTP y dTTP 16 mM y dCTP 100 μ M), 5 μ l de ^{33}P - α -dCTP (10 μ Ci/ μ l), 1 μ l de SuperScript II RT (200 U/ μ l, *Invitrogen*) y agua sin RNasas hasta un volumen final de 30 μ l. La mezcla resultante se incubó a 43°C durante 1 h. La reacción se detuvo por la adición de 1 μ l de EDTA 0,5 M. Se utilizó una columna MicroSpin S-300 HR (*Amersham Bioscience*), siguiendo las instrucciones del fabricante para eliminar los nucleótidos no incorporados. Finalmente, la muestra marcada se resuspendió en 100 μ l de agua destilada. La cantidad de marca radioactiva incorporada se cuantificó mediante medición de dpm en un contador de centelleo.

Hibridación de los macrochips de DNA con muestras radiactivas

La hibridación de las membranas de los macrochips se realizó en tubos de plástico cilíndricos de base plana de 12.5 x 2.5 cm. Cuando se utilizaron los macrochips por primera vez se realizó un paso previo a la hibridación (no necesario en las posteriores hibridaciones). En este caso, los macrochips se incubaron con SDS 0.5% durante 30 minutos en agitación a 80°C. Este paso tiene la finalidad de eliminar las impurezas que pudieran quedar en la membrana tras la impresión del macrochip. Seguidamente, se realizó una prehibridación de la membrana a 65°C durante 30 minutos en 5 ml de la misma solución de hibridación (5xSSC, 5x Denhart, SDS 0.5%, 100 μ g/ml de DNAss de esperma de salmón) pero sin añadir la muestra radioactiva. Después se desechó esta solución y añadieron 5 ml de solución de hibridación conteniendo la muestra marcada radioactivamente. Se utilizó una cantidad fija de $4 \cdot 10^6$ dpm/ml de solución de hibridación para cada muestra. Las membranas se incubaron en una estufa giratoria a 65°C durante toda la noche. Posteriormente, se realizaron varios lavados para eliminar la muestra que no ha hibridado en el macrochip. El tampón de lavado A (2x SSC, 0.1% SDS) se utilizó para realizar un primer lavado del macrochip durante 20 min

a 65°C en agitación. Consecutivamente, se realizaron dos lavados durante 30 min cada uno a 65°C utilizando tampón de lavado B (0.2x SSC, 0.1% SDS). Tras los lavados, las membranas se mantuvieron húmedas sellándose con film transparente y se expusieron contra una pantalla captadora de imágenes (BAS-MP, *Fujifilm*) durante el tiempo adecuado. Una vez captada la imagen, los macrochips se sometieron a la eliminación de la muestra radiactiva para su posterior reutilización. Para ello, se vertió sobre la membrana 150 ml de tampón de *stripping* (5 mM Na₂PO₄, pH 7.5, 0.1% SDS) calentado hasta ebullición y se incubó en agitación durante 10 min. Esta operación se repitió 3 veces y la eliminación de la muestra radiactiva se confirmó exponiendo la membrana contra la pantalla. Las imágenes se adquirieron mediante lectura de las pantallas utilizando un *Fujifilm FLA3000 Phosphorimager*. La intensidad de los puntos se determinó mediante el programa *Array Vision* (*Imaging Research, Canada*).

Detección de proteínas mediante *western*

Los extractos totales de proteínas para el análisis por *western* se prepararon a partir de 10⁸ células provenientes de cultivos en fase exponencial. Las células se lavaron con agua fría, se incubaron a 95°C durante 5 minutos, se resuspendieron en 15 µL de urea 5 M y se rompieron por agitación vigorosa con perlas de vidrio durante dos pulsos de un minuto. Se añadió al extracto 50 µL de tampón SDS 2%, Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, se agitó en el vortex durante 1 minuto y se trató a 95°C durante 2 minutos. Finalmente, se centrifugó el extracto crudo durante 15 minutos a máxima velocidad para separar el extracto de las perlas de vidrio y de los restos celulares. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford utilizando el reactivo *Dye Reagent* de *Bio-Rad*. Concentraciones equivalentes de proteína total se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante electrotransferencia en húmedo a

110 V durante 1,5 h. Las membranas se bloquearon con TBS-T (Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, NaCl 0.125 M, Tween-20 0.1%) suplementado con bloqueante al 2% durante 1 h a T^a ambiente y se incubaron con el anticuerpo primario a 4°C durante al menos 2 horas. Se eliminó el anticuerpo primario mediante 3 lavados de 10 minutos con TBS-T. Las membranas se incubaron con anticuerpo secundario durante 45 minutos a 4°C. Posteriormente se lavaron como en el paso anterior. La detección se realizó utilizando los reactivos *ECL Advance Western blotting* (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos utilizados fueron Anti-HA 12CA5 de *Roche*, Anti-c-myc 9E10 de *Roche*, Antifosfo p44/p42 MAPK de *New England Biolabs* y AntiProteína A de *Roche*. Y los anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-rata de *Roche* y anti-cabra de *Santa Cruz*.

Detección de Pkc1-TAP mediante western

Los extractos totales de proteínas para el análisis por *western* se prepararon a partir de 10⁸ células provenientes de cultivos en fase exponencial. Las células se lavaron con agua fría y se resuspendieron en 1 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Glicerol 10% y CHAPS 0.2%) con inhibidores de proteasas y fosfatasas (NaF 0.4 µg/ml, NaN₃ 0.65 µg/ml, pNPP 2.3 µg/ml, NaPPi 2.7 µg/ml, β-GP 2.2 µg/ml, PMSF 1 mM y tabletas Complete) y se rompieron mediante agitación a 4°C con perlas de vidrio en un Fast Prep (*Savant Instruments*) durante 6 pulsos de 30 segundos. El extracto se centrifugó en primer lugar a baja velocidad (800 rcf) y posteriormente el sobrenadante se centrifugó a alta velocidad (13400 rcf). Se añadió al sobrenadante y al precipitado de cada centrifugación disolvente de muestras de proteínas y se incubaron las muestras a 95°C durante 5 minutos. Cantidades equivalentes de proteína total se separaron por SDS-PAGE. La transferencia a membranas de nitrocelulosa y detección

posterior se realizó del mismo modo que se ha descrito en el apartado anterior.

Filtración en gel

Aproximadamente $5 \cdot 10^9$ células se cultivaron en medio SD o YPD a 25°C y se incubaron durante 1h a 37°C. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron en agua fría. Se resuspendieron en 10 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Glicerol 10% y CHAPS 0.2%) con inhibidores de proteasas y fosfatasa (NaF 0.4 µg/ml, NaN₃ 0.65 µg/ml, pNPP 2.3 µg/ml, NaPPi 2.7 µg/ml, β-GP 2.2 µg/ml, PMSF 1 mM y tabletas Complete), se alicuotaron en varios tubos y se rompieron mediante agitación a 4°C con perlas de vidrio en un Fast Prep (*Savant Instruments*) durante 6 pulsos de 30 segundos. Tras eliminar las perlas de vidrio se juntaron los extractos y se incubaron con los restos celulares durante 2h a 4°C, con la finalidad de solubilizar Pkc1. El extracto se clarificó por centrifugación. Seguidamente se filtró el extracto a través de filtros de 0.22 µm y se determinó la concentración de proteína mediante el método de Bradford. Un cantidad total de proteína de 5 mg en un volumen total de 0.5 ml de tampón de lisis se cargó en una columna de Superosa 6 HR 10/30 (*Amersham Biotech*). Se recogieron fracciones de 1 ml del eluido. Las fracciones se inmunoprecipitaron utilizando 30 µl de IgG-agarosa 6 *Fast Flow* (*Amersham Biotech*) y se detectó la proteína Pkc1-TAP mediante detección por *western* utilizando anti Proteína A (*Roche*). El perfil de elución se comparó con los controles de peso molecular del kit HMW de calibración de filtración en gel (*Amersham Biotech*) que eluyeron en las siguientes fracciones: 14 (Tiroglobulina 669 kDa), 16 (Ferritina 440 kDa), 17 (Catalasa 232 kDa) y 18 (Aldolasa 158 kDa).

Purificación de proteínas por afinidad en tándem (TAP)

El protocolo utilizado para esta purificación está basado en el desarrollado en el grupo de Seraphin (Puig *et al.*, 2001). Aproximadamente 10^{11} células (5 L de cultivo) se cultivaron en medio SD o YPD a 25°C y se incubaron durante 1h a 37°C. Las células, previamente lavadas en agua fría, se resuspendieron en 50 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Glicerol 10% y CHAPS 0.2%) con inhibidores de proteasas y fosfatasas (NaF 0.4 µg/ml, NaN₃ 0.65 µg/ml, pNPP 2.3 µg/ml, NaPPi 2.7 µg/ml, β-GP 2.2 µg/ml, PMSF 1 mM y tabletas Complete) y se rompieron mediante agitación a 4°C con perlas de vidrio en un Bead-Beater (*Biospecs*) durante 6 pulsos de 30 segundos. Tras eliminar las perlas de vidrio, en el caso de Pkc1-TAP se incubó el extracto con los restos celulares durante 2h a 4°C, con la finalidad de solubilizar Pkc1. Posteriormente, se clarificó el extracto por centrifugación. Se determinó la concentración de proteína mediante el método de Bradford. La cantidad de proteína se igualó en los extractos de las cepas con proteínas etiquetadas y las cepas control sin etiquetar. Los extractos se preclarificaron pasándolos a través de una columna de Sepharose CL 4B-200 (*Amersham Bioscience*). El proceso de inmunoprecipitación se inició mediante incubación durante 2 h a 4°C en agitación lenta de los extractos con 500 µl de IgG Sepharose 6-Fast Flow (*Amersham Bioscience*). La sefarosa se lavó varias veces en tampón de lisis. Posteriormente, se realizó un lavado con 10 ml de una mezcla 1:1 de tampón de lisis con tampón TEV (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 0.5 mM, glicerol 10%, CHAPS 0.2% y 1 mM DTT) y un lavado con 10 ml de tampón TEV. La reacción de corte con la enzima TEV (*Invitrogen*) se llevó a cabo mediante la adición de 1.5 ml de tampón de corte TEV y 15 µl de enzima TEV (10 U/µl) y la mezcla se incubó en la columna con rotación a 4°C durante toda la noche. Se recogió el eluido junto con un lavado realizado con 500 µl de tampón TEV. Al eluido (aprox. 2 ml) se

añadieron 6 μ L de CaCl_2 1 M, 6 ml de tampón calmodulina (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM, glicerol 10%, CHAPS 0.2%, β -mercaptoetanol 10 mM, MgAcO 1 mM, imidazol 1 mM, CaCl_2 2 mM) y 400 ml de calmodulina-sefarosa (*Amersham Bioscience*) y se incubó la mezcla con rotación lenta durante 1.5 h a 4°C. Seguidamente, se descartó el eluido y recuperaron las proteínas unidas a las perlas de calmodulina mediante la adición de disolvente de muestras de proteínas y ebullición durante 5 minutos a 95°C. Las proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE. Y el gel se reveló mediante tinción con plata, siguiendo el procedimiento de Shevchenko *et al.*, 1996. Posteriormente, las bandas se recortaron del gel y se identificaron mediante espectrometría de masas.

Inmunoprecipitación y ensayo quinasa

En esta tesis se determinó la actividad quinasa de la proteína Pkc1-TAP y de Cdc28-Cln2-HA. El protocolo utilizado en ambos casos es básicamente el mismo aunque difiere en algunos puntos. Los ensayos quinasa se realizaron a partir de aproximadamente $5 \cdot 10^8$ células, que se resuspendieron en 100 μ L de tampón de lisis (durante todo el ensayo se mantuvieron las muestras en hielo). Se utilizó un tampón de lisis diferente en cada caso, el tampón P (PBS 1x pH 7.5, Glicerol 10%, CHAPS 0.2 %, PMSF 1 mM e inhibidores de proteasas CompleteTM de *Roche*) para inmunoprecipitar Pkc1-TAP y el tampón C (NaCl 250 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 0.1%, Tris-HCl 50 mM pH 8, PMSF 1mM e inhibidores de proteasas CompleteTM de *Roche*) para Cln2-HA. Las células se rompieron con perlas de vidrio mediante agitación vigorosa durante 10 pulsos de 1 minuto. El extracto de células se clarificó por centrifugación a máxima velocidad a 4°C durante 5 minutos. Se cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford y en caso necesario se ajustaron las muestras para utilizar la misma cantidad de proteína total en todas las

muestras. Las proteínas etiquetadas con HA se inmunoprecipitaron con 8 μg de 12CA5 antiHA (*Roche*) previamente unido a Dynabeads (*Dynal*) en un volumen final de 150 μl de tampón de lisis P incubando 2 h a 4°C con agitación. Alternativamente, las proteínas etiquetadas con TAP se inmunoprecipitaron mediante incubación con 50 μl IgG agarosa durante 4 h a 4°C en un volumen final de 150 μl de tampón de lisis C. Posteriormente, las muestras se lavaron 4 veces con 1 mL de tampón de lisis y dos veces con tampón K (Tris-HCl 50 mM pH 8, MgCl_2 10 mM, DTT 1 mM) con inhibidores de proteasas. Las muestras inmunoprecipitadas se separaron en dos alícuotas, una de ella se preparó para el análisis por *western* y con la otra se realizó el ensayo quinasa. En la alícuota para el *western* se añadieron 20 μl de disolvente de muestras de proteínas y se hirvió 5 minutos a 95°C. Posteriormente, las proteínas se resolvieron mediante SDS-PAGE. La alícuota para el ensayo quinasa se lavó dos veces con tampón K. Para el ensayo de Pkc1-TAP se añade: 5 μL de tampón K, 2 μL de ATP 5 μM , 2 μL MBP 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0.2 μL de ^{32}P -ATP (2 μCi) y 0.8 μl de agua estéril. Alternativamente, para el ensayo de Cln2-HA se añaden sobre la IgG agarosa: 7.5 μL de tampón K, 3 μL de ATP 5 μM , 4 μL histona H1 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0.2 μL de ^{32}P -ATP (2 μCi) y 0.3 μl de agua estéril. Las reacciones se desarrollaron por incubación durante 30 minutos a 30°C. La reacción se detuvo poniendo las muestras en hielo. Se añadió agua destilada hasta 20 μl a cada muestra. Se dispusieron 5 μl de cada muestra sobre un papel de fosfocelulosa (*Chromatography Paper P81, Whatman*), se dejó evaporar el tampón y se realizaron varios lavados para eliminar la radioactividad no incorporada en los sustratos. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos a 40°C en agitación con el tampón 1 (NaHCO_3 50 mM pH 9,2). Después se realizó un lavado de 10 minutos a 40°C en metanol. El papel de fosfocelulosa se dejó secar a temperatura ambiente y se selló con film transparente. Tras lo que se expuso el tiempo adecuado contra una Pantalla captadora de imágenes. Las imágenes se adquirieron mediante lectura de las pantallas

utilizando un *Fujifilm FLA3000 Phosphorimager*. La cuantificación de la actividad quinasa y de la cantidad de proteína en el *western* se realizó utilizando el programa *Image Gauge V3.12* de *Fujifilm* y los resultados se normalizaron frente al control de proteína no marcada.

3. Regulación de la expresión del gen FKS1 por la ruta PKC

Las células deben reaccionar ante los estímulos externos adaptando su metabolismo en función de las condiciones extracelulares. La célula es capaz de detectar los cambios que se producen en el medio extracelular mediante proteínas sensoras que se encuentran en la superficie celular. Estas proteínas sensoras son capaces de transmitir el estímulo detectado al interior celular. Entre las proteínas responsables de transmitir la señal dentro de la célula se encuentran las cascadas de MAP quinasas. Las cascadas MAP quinasa, a través de la regulación de factores de transcripción, desarrollan su función principal mediante la modificación de la transcripción génica.

En *Saccharomyces cerevisiae* existen varias rutas de transducción de señal compuestas por cascadas de MAP quinasas. Estas rutas son activadas en respuesta a estímulos variados, produciendo una respuesta concreta de la célula mediante la expresión de genes específicos. Una de estas rutas de transducción de señal es la ruta de la proteína quinasa C, también llamada “ruta de integridad celular”, debido a que es la principal responsable del mantenimiento de la integridad de la célula de levadura.

Se ha descrito que la ruta PKC regula la expresión de genes específicos implicados en morfogénesis (Igual *et al.*, 1996; Jung y Levin, 1999; Lagorce *et al.*, 2003; Boorsma *et al.*, 2004). Hasta la fecha se conocen dos factores de transcripción dianas de Slt2: el factor heterodimérico SBF (formado por Swi4 y Swi6) y el factor Rlm1. SBF tiene un importante papel en el control del ciclo celular en la transición G1/S regulando la expresión periódica de numerosos genes, entre ellos genes implicados en la biosíntesis de pared celular (Igual *et al.*, 1996; Simon *et al.*, 2001). Por otro lado, el factor Rlm1 parece ser el principal responsable de la transcripción de genes específicos de síntesis de pared celular, incluyendo proteínas de membrana y pared celular (proteínas GPI, familia PIR) y también enzimas de biogénesis de pared celular (Jung y Levin, 1999; Lagorce *et al.*, 2003; Boorsma *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2004). Aunque diversos estudios otorgan el papel primordial de la regulación de la transcripción mediada por la ruta de

integridad celular a estos factores, existen ciertas observaciones que indican que los factores SBF y Rlm1 no son los únicos responsables de la regulación por la ruta PKC de la expresión de genes de pared celular. Un aspecto clave para un mejor conocimiento de la ruta será, por tanto, la determinación de los mecanismos moleculares de la regulación transcripcional de genes de pared celular.

CARACTERIZACIÓN DEL ELEMENTO DE SECUENCIA RESPONSABLE DE LA REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN *FKS1* POR LA PROTEÍNA QUINASA C

La expresión del gen *FKS1* está regulada por la ruta PKC

Uno de los genes regulados por la ruta PKC es el gen *FKS1* (Igual *et al.*, 1996; Heinisch *et al.*, 1999; Jung y Levin, 1999). El gen *FKS1* codifica la subunidad catalítica de la (1-3)- β -glucano sintasa, una de las enzimas que participan en la síntesis de la pared celular. La expresión del gen *FKS1* está regulada a lo largo del ciclo celular, presentando un máximo de expresión en la transición G1/S (Igual *et al.*, 1996). El estudio por *northern* de la expresión de *FKS1* indicó que la expresión del gen disminuye de manera muy significativa (4 veces) en una cepa con la mutación *pkc1-8* (Figura 3.1A), aunque dicha expresión sigue estando regulada a lo largo del ciclo celular (Igual *et al.*, 1996). La expresión periódica del gen *FKS1* está controlada por el factor de transcripción de ciclo celular Swi4, ya que su inactivación elimina la periodicidad en la expresión (Igual *et al.*, 1996). Sin embargo, los niveles globales de expresión en cultivos asincrónicos no se ven afectados al inactivar componentes del programa transcripcional de G1/S como Swi4, Swi6 y Mbp1 (Figura 3.1B).

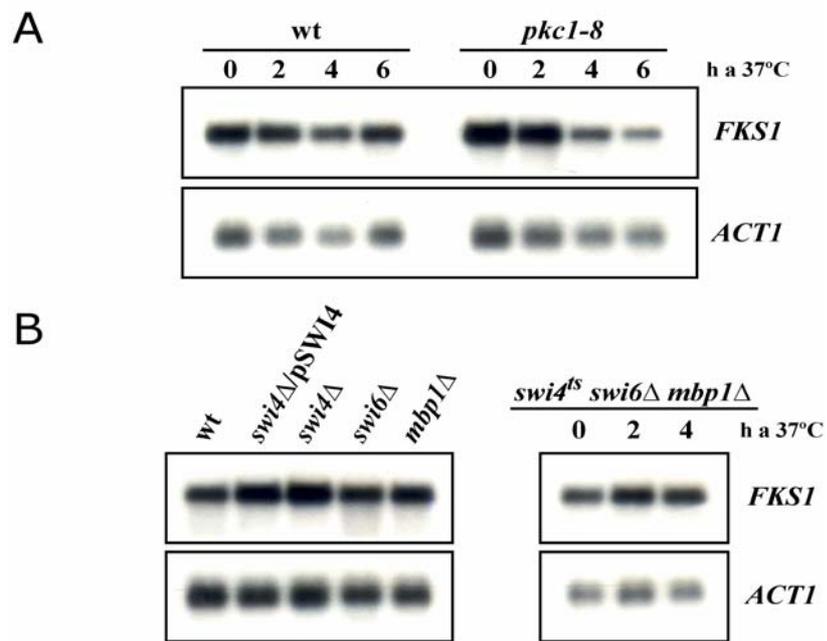


Figura 3.1. Análisis de la expresión del gen *FKS1*. A) Cultivos en fase exponencial de la cepa salvaje (W303-1a) y mutante *pkc1-8* (JC6-3a) cultivados a 25°C se incubaron a 37°C durante los tiempos indicados. Se analizó la expresión del gen *FKS1* mediante *northern*. Se muestra la banda correspondiente al mRNA de *ACT1* como control de carga. B) Se analizó la expresión del gen *FKS1* mediante *northern* en cultivos a 25°C de la cepa salvaje (W303-1a), *swi4* Δ (BY604), *swi6* Δ (BY600), *mbp1* Δ (CY19) y *swi4* Δ (BY604) conteniendo un plásmido multicopia con el gen *SWI4* así como de la cepa *swi4*^{ts}*swi6* Δ *mbp1* Δ (JCY076) cultivada a 25°C e incubada a 37°C durante 2 y 4 horas. Se muestra la banda correspondiente al mRNA de *ACT1* como control de carga. C) Análisis de la expresión del gen *FKS1* mediante la utilización de una fusión heteróloga obtenida por la introducción de un fragmento de la región 5' de *FKS1* desde las posiciones -712 a -81 en el vector pLGL, el cual contiene el promotor basal de *CYC1* fusionado al gen *lacZ* (construcción pF712-81:*lacZ*). Se determinó la actividad β -galactosidasa en extractos de células salvaje (W303-1a), *swi4* Δ (BY604) y *pkc1-8* (JC6-3a) transformadas con la construcción pF712-81:*lacZ*, cultivadas a 25°C y transferidas a 37° durante 4 horas. La actividad detectada en el caso del vector pLGL fue de 2-3 unidades

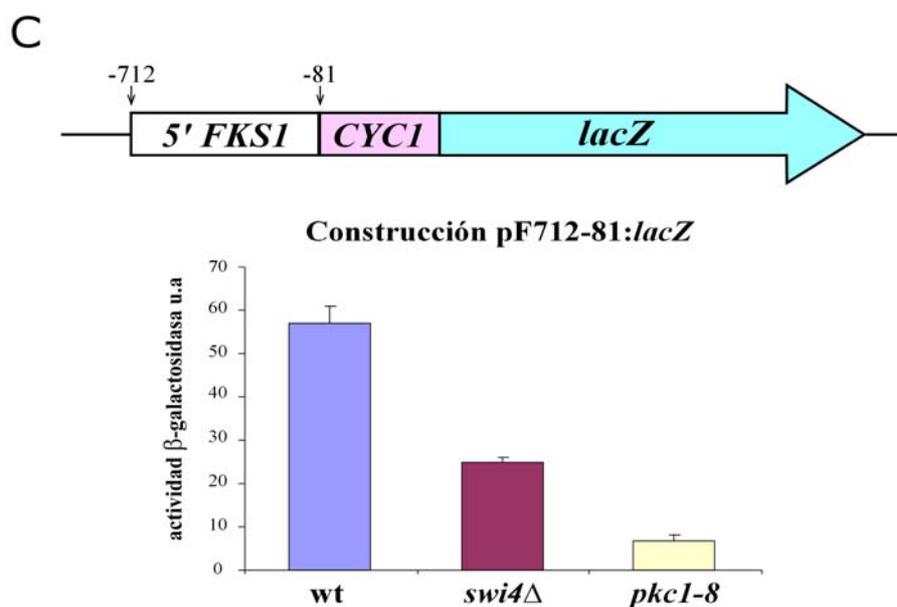


Figura 3.1. Análisis de la expresión del gen *FKSI* (continuación)

También se ha estudiado la regulación transcripcional del gen *FKSI* utilizando una fusión génica consistente en un fragmento entre -712 y -81 del promotor de *FKSI*, el promotor basal de *CYCI* y la región codificante del gen *lacZ*. Como se puede observar en la Figura 3.1C, a diferencia de lo que se observa en el análisis por *northern*, se detecta un efecto de la inactivación de *SWI4* en cultivos asincrónicos, disminuyendo los niveles de expresión aproximadamente a la mitad de los valores detectados en la cepa salvaje. Por su parte, la inactivación de la ruta PKC origina una disminución muy importante (de 8 veces) en los niveles de actividad β-galactosidasa. Dicho fragmento sirve pues para conferir regulación por Swi4 y por la ruta PKC al gen *lacZ*, lo cual permite el uso de estas fusiones heterólogas para el estudiar la región promotora del gen *FKSI*, en especial en lo concerniente a

la identificación de la secuencia responsable de la regulación por la ruta PKC.

El análisis de la secuencia del promotor de *FKSI* permite identificar posibles secuencias reguladoras conocidas (Figura 3.2). Así, existen 3 secuencias consenso del sitio SCB (sitio de unión del factor de transcripción

```

-800 TCACAGTATC TTATCGAGCT AACTATTTTC GACACACATG AAAAAGCAGA
-750 AATATTAACG AAAAAGAAAA GAAAGACCAT GTCATGTACG GGCAATCAGA
-700 ATCTGTAACA AGCGCCATTT TTTTTTCTGT ATCGGGCCCT CCTTACTGCT
-650 CTCCTTCCGT GTAACGCGTT ATGAAACTCT AATCCTACTA TCGGCGACTC
-600 TCGCGAAATT TTTCTTAACG CGTCCTTGTA CTGCGTCTAA CGCTTTTGCC
-550 ACTTGGATTT CTATTATAGG AAATAGTCTC ACTTACTGGG CGACGAATTT
-500 TCGCGTTTTG ATGAAGCACA GGAAGAATTT CTTTTTTTTT TGGCTTCTTC
-450 TGGTTCCGTT TTTTACGCGC ACAAATCTAA AAAAAGAAAT AATTATAACC
-400 TAGTCTCGAA AATTTTTCATC GATCCATTCG TTCCTTTTTT TCGATTTTTT
-350 CAGATCAAAA TTCTTGTTTC TTTCTTTGTC TTAGTTTATA TAAAAAGATA
-300 TTTTGATTTT ACTCCTGAAC TATTTATTCT TTCTAAGAAG GCCAGAACAC
-250 TACAGCTGTT TTAACCGACT ACGAAGTTCT CCATTCTCGA ACACTAGCCT
-200 TCATTTACCA AACAGGAACT AGCGTATATC ATTAGTCCTT ATTCGAAAAG
-150 AGATTGGTAG ATATTTATTG TAGTTTGTGA GAAGGAGAAA ATACTGTCAT
-100 TGGACTGATA GTTAGAGGAC ATTAACCTCT CTTACGTTTC CTCAAAAAAA
-500 TTAAAATAAG CAAGTAGCTG AAATCAAGTC TTTCATACAA CGGTCAGACC
+1 ATGAACACTG ATCAACAACC TTATCAGGGC CAAACGGACT ATACCCAGGG
  
```

SCB: CDCGAAA

MCB: ACGCG(T)

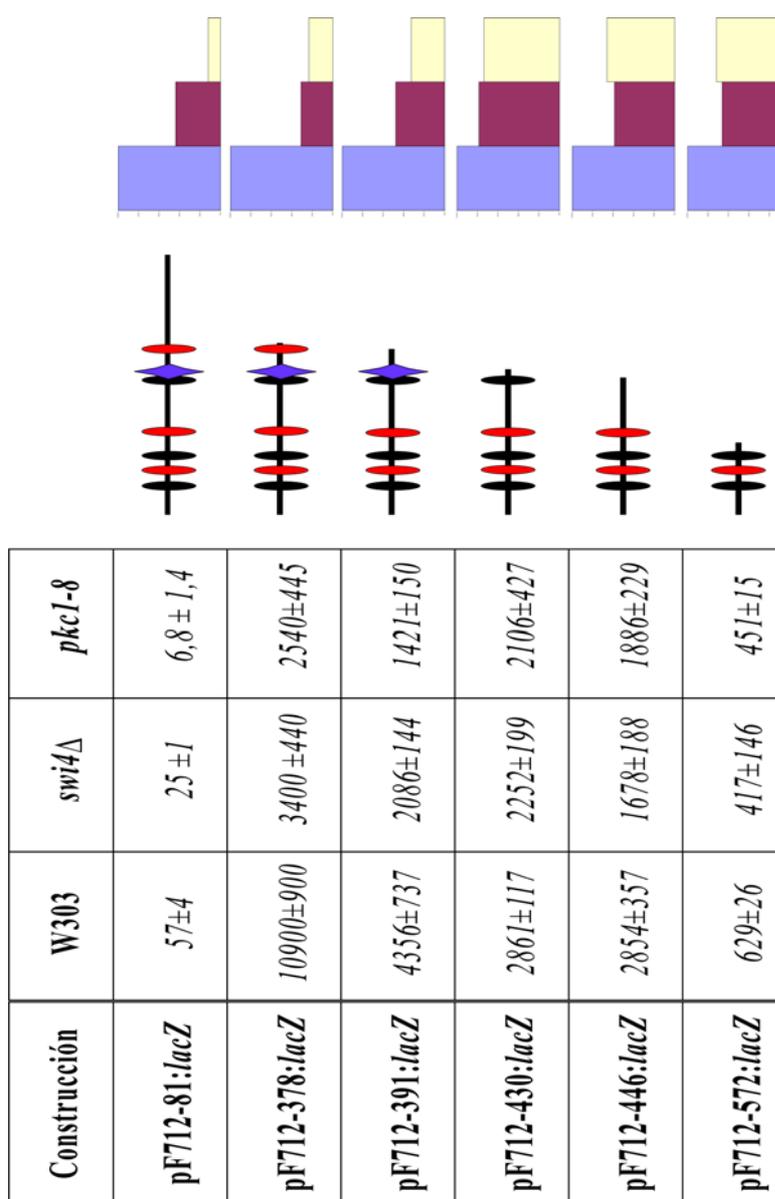
Rlm1BS-like: CTAAAAAAG

Figura 3.2. Secuencia de la región 5' del gen *FKSI*. Se muestra la secuencia de una región de 850 nucleótidos *upstream* del codón de inicio del gen *FKSI*. Se han indicado las secuencias reguladoras SCB (en rojo), MCB (en negro) y una secuencia Rlm1BS-like (en azul), que difiere en un nucleótido de la secuencia consenso del sitio de unión del factor Rlm1 (la secuencia presenta una A-indicada en cursiva- en lugar de una T).

SBF) y 3 secuencias consenso MCB (sitio de unión del factor de transcripción MBF). Estas secuencias son probablemente las responsables de la expresión periódica del gen. El análisis de la secuencia del promotor de *FKSI* también revela la existencia de un posible sitio de unión del factor de transcripción Rlm1 (Rlm1BS-like). La secuencia consenso de unión del factor Rlm1 fue primeramente determinada por el grupo del Dr. Treisman CTA(T/A)₄TAG (Dodou y Treisman, 1997). Sin embargo, la secuencia que aparece en el promotor del gen *FKSI* no se ajusta exactamente al consenso ya que es: CTA(T/A)₄AAG. No conocemos a priori si la sustitución de T por A en la octava posición pudiera afectar la unión del factor Rlm1.

En un primer momento, se analizó la expresión del gen *lacZ* en una serie de construcciones obtenidas recortando el promotor en dirección 3'-5' (Figura 3.3). El punto de partida fue una construcción que contiene el fragmento entre -712 a -81 del promotor fusionado al gen *CYCI:lacZ*. Como se ha comentado anteriormente, la expresión de dicha fusión génica está fuertemente regulada por Pkc1, ya que en el mutante *pkc1-8* la expresión del gen reportero decaía más de 8 veces respecto a la cepa salvaje (Figuras 3.1, 3.3 y 3.7).

Figura 3.3. Análisis de la expresión de fusiones heterólogas del promotor de *FKSI* con el gen *lacZ* (I). Cultivos en fase exponencial de las cepas salvaje W303-1A, JC6-3a (*pkc1-8*) y BY604 (*swi4Δ*) transformadas con plásmidos que expresan el gen reportero *lacZ* bajo el control de distintos fragmentos de la región 5' del gen *FKSI*, se incubaron durante 4 h en YPD a 37°C. Los niveles de expresión se analizaron mediante la determinación de la actividad β-galactosidasa en extractos de las cepas correspondientes. Se muestra un mapa esquemático de cada construcción, indicando las secuencias reguladoras presentes: SCB (óvalo rojo), MCB (óvalo negro), Rlm1BS-like (rombo azul). El nombre del plásmido indica el fragmento de la región del promotor de *FKSI* presente en cada construcción. En la parte derecha se ha representado los niveles relativos de expresión, en relación a la cepa salvaje, para cada cepa: W303 (barra azul), *swi4Δ* (barra granate) y *pkc1-8* (barra amarilla).



Se analizó a continuación la construcción que contenía la secuencia de nucleótidos comprendida entre -712 y -378 del promotor del gen *FKS1*. Se obtuvo una elevada tasa de expresión con incrementos de más de 100 veces en la actividad β -galactosidasa respecto a la construcción pF712-81:*lacZ*, lo cual indicaba que esta región contiene potentes secuencias UAS (*upstream activating sequences*). Es importante señalar que esta tasa de expresión se reduce de manera significativa en el mutante *pkc1-8* en comparación a los niveles de la cepa salvaje. Este resultado indica que la región de -712 a -378 es suficiente para mediar la regulación de la expresión de *FKS1* por la ruta PKC. Por otro lado, en la zona de -391 a -81 parece existir una fuerte actividad represora, ya que en aquellas construcciones en que se ha eliminado esta zona la expresión del gen reportero aumenta fuertemente. Además, dicha región no tiene función activadora de la transcripción, ya que la actividad β -galactosidasa en presencia del plásmido pF391-81:*lacZ* decae a niveles similares a los obtenidos con el vector vacío (Figura 3.4 y datos no mostrados). En la siguiente construcción, pF712-391:*lacZ*, los valores de actividad β -galactosidasa disminuyen sensiblemente, probablemente debido a la eliminación de una secuencia de unión de SBF (SCB), pero la expresión sigue estando regulada por la actividad de Pkc1 ya que la actividad disminuye significativamente en el mutante *pkc1-8*. Tras observar estos resultados, se diseñó una construcción que contenía secuencias entre -712 y -572 (plásmido pF712-572:*lacZ*). En esta construcción, se ha recortado la secuencia manteniéndose únicamente las 2 posibles secuencias reguladoras MCB y 1 sitio SCB situadas en el extremo 5' del promotor. Estas secuencias tienen una capacidad elevada para activar transcripción, como se observa en la cepa salvaje, pero, lo que es más interesante, dicha expresión no está regulada por la ruta PKC, ya que la actividad β -galactosidasa apenas disminuye en relación con la cepa salvaje. Por tanto, la secuencia comprendida entre -391 y -572 es necesaria para mediar la regulación por la ruta PKC. Hay que hacer constar que la cepa

mutante *pkc1-8* siempre muestra unos niveles de actividad β -galactosidasa ligeramente reducidos en comparación con la cepa salvaje, incluso en la expresión basal con el vector vacío. Es posible que la inactivación de Pkc1 pueda afectar ligeramente a los niveles de actividad β -galactosidasa por algún otro mecanismo además de la regulación transcripcional, por ejemplo afectando al número de copias del plásmido o a la elongación de la transcripción en la región codificante del gen *lacZ* como ha sido sugerido previamente (Fan y Klein, 1994; Chavez y Aguilera, 1997; Chang *et al.*, 1999). Por ello solo hemos considerado prueba de regulación por la ruta diferencias de más de tres veces respecto de la cepa salvaje.

Para localizar con mayor exactitud, cuales son las secuencias responsables para la regulación por la ruta PKC, se diseñaron las fusiones pF712-446:*lacZ* y pF712-430:*lacZ*. En la primera construcción (pF712-446:*lacZ*) se mantuvieron 2 secuencias MCB y 2 secuencias SCB. La construcción pF712-430:*lacZ* contiene un sitio MCB adicional. Existen por tanto varias secuencias reguladoras en ambas construcciones y de hecho la actividad transactivadora de los dos fragmentos es alta; sin embargo, en ambas construcciones se ha perdido la regulación mediada por la ruta PKC. Por tanto, mediante el análisis de las construcciones obtenidas recortando el promotor en dirección 3'-5' hemos determinado que secuencias comprendidas entre -391 y -430 son necesarias para la regulación de la expresión del gen *FKS1* por la ruta PKC. Este fragmento de 39 nucleótidos incluye la secuencia Rlm1BS-like, lo cual apunta a este sitio como el elemento regulador a través del cual actuaría la ruta PKC. Asimismo, estos estudios han localizado una región que actúa como represora de la expresión, situada en la zona entre -391 y -81.

En segundo lugar, se analizó la expresión del gen reportero en las distintas cepas de levadura para las fusiones heterólogas obtenidas recortando el promotor en dirección 5'-3' (Figura 3.4). Dichas

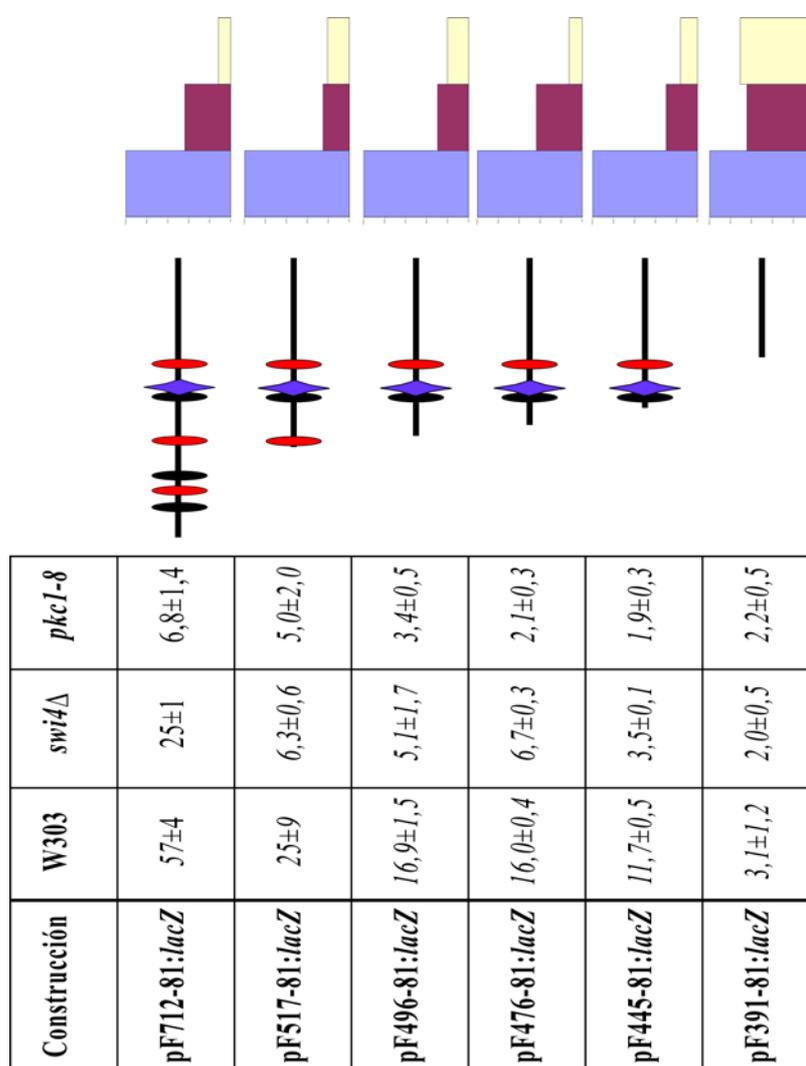


Figura 3.4. Análisis de la expresión de fusiones heterólogas del promotor de *FKSI* con el gen *lacZ* (II). Se analizó la regulación de la expresión del gen *lacZ* por diversos fragmentos de la región 5' del gen *FKSI* tal como se explica en la figura 3.3.

construcciones contienen la secuencia con actividad represora entre -391 y -81, por lo tanto el nivel de expresión no es muy elevado. En la construcción pF517-81:*lacZ* se han eliminado las 2 secuencias MCB y 1 SCB situadas en el extremo 5' del promotor del gen *FKSI*. Aunque su eliminación disminuye el valor de actividad β -galactosidasa, no se pierde la regulación mediada por la ruta PKC. Este resultado es consistente con el obtenido con la construcción pF712-572:*lacZ* (ver Figura 3.3). En las dos siguientes construcciones, pF496-81:*lacZ* y pF476-81:*lacZ* se ha eliminado otra secuencia SCB. Al igual que en el caso anterior, se produce una ligera bajada en el nivel de activación transcripcional pero se mantiene la regulación mediada por PKC, ya que la actividad β -galactosidasa está claramente disminuida en el mutante *pkc1-8*. Estos resultados, junto con los obtenidos en la Tabla 1, indican por tanto que los elementos reguladores SCB y MBC de la zona 5' del promotor contribuyen al nivel de expresión pero no son los responsables de la regulación mediada por Pkc1.

El análisis de la construcción pF445-81:*lacZ*, nos permitió determinar que la secuencia comprendida entre -445 y -81 responde a la regulación por Pkc1, mientras que si se elimina la secuencia comprendida entre -445 y -391 (construcción pF391-81:*lacZ*), se pierde la capacidad de activar la transcripción. Por tanto, el análisis de las construcciones de la Figura 3.4 nos permite determinar que las secuencias comprendidas entre -445 y -391 del promotor del gen *FKSI* son necesarias para mediar la regulación por la ruta PKC. Combinando este análisis con el descrito en la Figura 3.3, se ha determinado que la secuencia mínima necesaria para conseguir regulación mediada por la ruta se sitúa entre -430 y -391 de *FKSI*.

En un tercer tipo de aproximación, se obtuvieron construcciones conteniendo fragmentos de la zona central del promotor del gen *FKSI*, con la finalidad de localizar exactamente los elementos de secuencia suficientes para mediar la regulación del gen *FKSI* por la ruta PKC (Figura 3.5). Mediante este análisis pretendíamos estudiar también la contribución a la

regulación de la transcripción del gen *FKS1* de las otras posibles secuencias reguladoras existentes en el promotor. Por ello, las secuencias analizadas se extienden más allá de la secuencia mínima necesaria para la regulación determinada en el análisis anterior.

La eliminación de las 2 secuencias MCB y las 2 secuencias SCB localizadas en el extremo 5' del promotor, en las construcciones pF496-378:*lacZ* y pF476-391:*lacZ* (Figura 3.5) provoca una drástica disminución de la expresión del gen *lacZ* cuando se compara con los valores observados para las construcciones pF712-378:*lacZ* y pF712-391:*lacZ* (ver Figura 3.3), aunque la expresión sigue respondiendo a la actividad de la ruta PKC. Este resultado es consistente con otras observaciones descritas en las Figuras 3.3 y 3.4 que indicaban que estas secuencias SCB y MCB de la región 5' del promotor no son responsables de la regulación mediada por la ruta PKC, pero tienen una gran importancia en la intensidad de la activación transcripcional del gen *lacZ*. A pesar de la disminución observada, la actividad β -galactosidasa detectada en extractos de la cepa salvaje conteniendo el plásmido pF476-391:*lacZ* es todavía bastante alta (más de 700 unidades), lo cual refleja que la zona localizada entre -476 y -391 constituye por sí misma una potente *UAS*, que además es responsable de la regulación por Pkc1.

En la siguiente construcción pF460-415:*lacZ* se ha eliminado una secuencia de nucleótidos en 5' del promotor localizada entre -476 y -460, y por el extremo 3' entre -415 y -391. Esto ha producido una disminución drástica de la expresión del gen *lacZ*, ya que los niveles de actividad β -galactosidasa disminuyen más de 20 veces, lo que indica que alguna o ambas de estas secuencias eliminadas contribuyen a la potencia transcripcional del promotor. Sin embargo, la regulación por Pkc1 se mantiene en dicha construcción, lo que indica que la secuencia entre -460 y -415 es suficiente para conferir regulación por la ruta PKC.

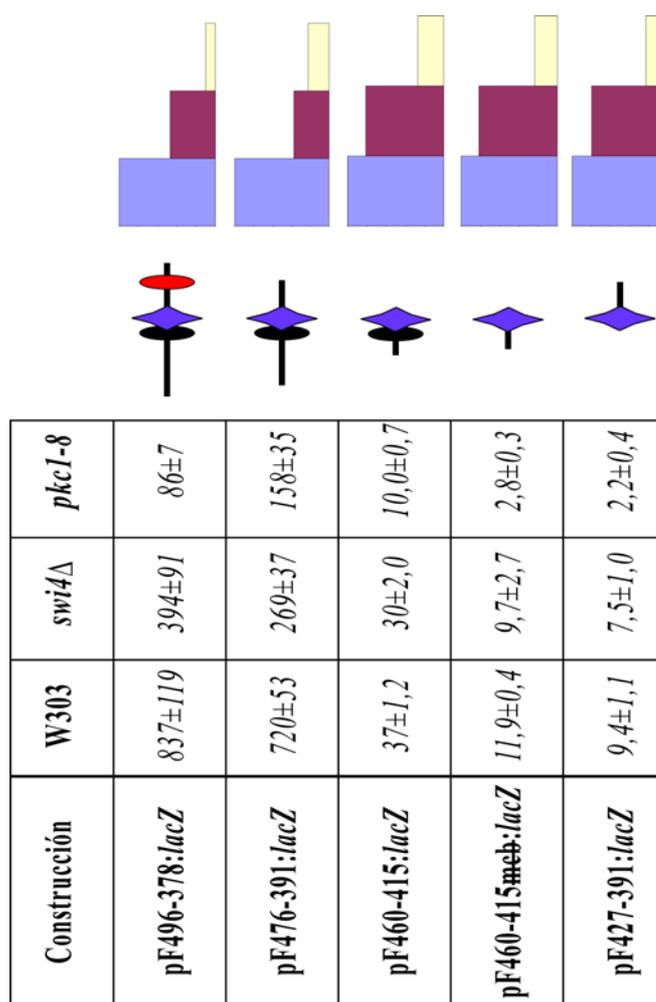


Figura 3.5. Análisis de la expresión de fusiones heterólogas del promotor de *FKS1* con el gen *lacZ* (III). Se analizó la regulación de la expresión del gen *lacZ* por diversos fragmentos de la región 5' del gen *FKS1* tal como se explica en la figura 3.3.

En la secuencia comprendida entre -460 y -415, las únicas secuencias reguladoras conocidas son un sitio MCB (ACGCG) y la secuencia Rlm1BS-like (CTAAAAAAAG). Con la finalidad de determinar cuál de estas secuencias reguladoras es la responsable de la regulación por PKC, se obtuvo la construcción pF460-415~~mb~~:*lacZ* en la que se inactivó el sitio MCB modificando su secuencia a ACACA. La inactivación del sitio MCB produce una disminución de 3 veces en el nivel de expresión del gen reportero en la cepa salvaje, lo que indica que dicho elemento contribuye a la expresión del gen. Aunque el nivel de expresión es bastante bajo, continúa, sin embargo, estando regulado por la actividad de Pkc1 ya que disminuye significativamente en la cepa *pkc1-8*. En esta construcción solamente existe como secuencia reguladora conocida el sitio Rlm1BS-like, lo que sugiere que con toda probabilidad la ruta PKC actúe a través de este elemento regulador. El análisis realizado con otra construcción que también posee como única secuencia conocida el sitio Rlm1BS-like, la construcción pF427-391:*lacZ*, proporcionó resultados similares: una expresión débil, pero que responde todavía a la actividad de la ruta PKC. Por tanto, estos resultados indican que la ruta PKC regula la expresión del gen *FKS1* a través de una secuencia localizada entre las posiciones -427 y -415; esta región engloba al sitio Rlm1BS-like.

El análisis de expresión de las fusiones heterólogas diseñadas, nos ha permitido identificar al elemento regulador Rlm1BS-like como responsable de la regulación por la ruta PKC de la transcripción del gen *FKS1*. Muy probablemente dicha regulación se realice a través del factor de transcripción Rlm1. Para confirmar que efectivamente Rlm1 regula la expresión del gen *FKS1*, se analizó el efecto que la inactivación de Rlm1 produce sobre la expresión del gen *lacZ* en varias de las construcciones analizadas anteriormente. En la Figura 3.6 se muestra la actividad β -galactosidasa detectada con las construcción analizadas en la cepa salvaje y mutantes *pkc1-8* y *rlm1Δ*. En todos los casos estudiados, la delección del gen

RLM1 provoca una fuerte disminución de la expresión génica respecto a la cepa salvaje. Este resultado confirma que Rlm1 regula la expresión del gen *FKS1*, de acuerdo con resultados previamente publicados (Jung y Levin, 1999), y que lo hace a través del elemento de secuencia Rlm1BS-like (único presente por ejemplo en la construcción pF427-391). Además, como se

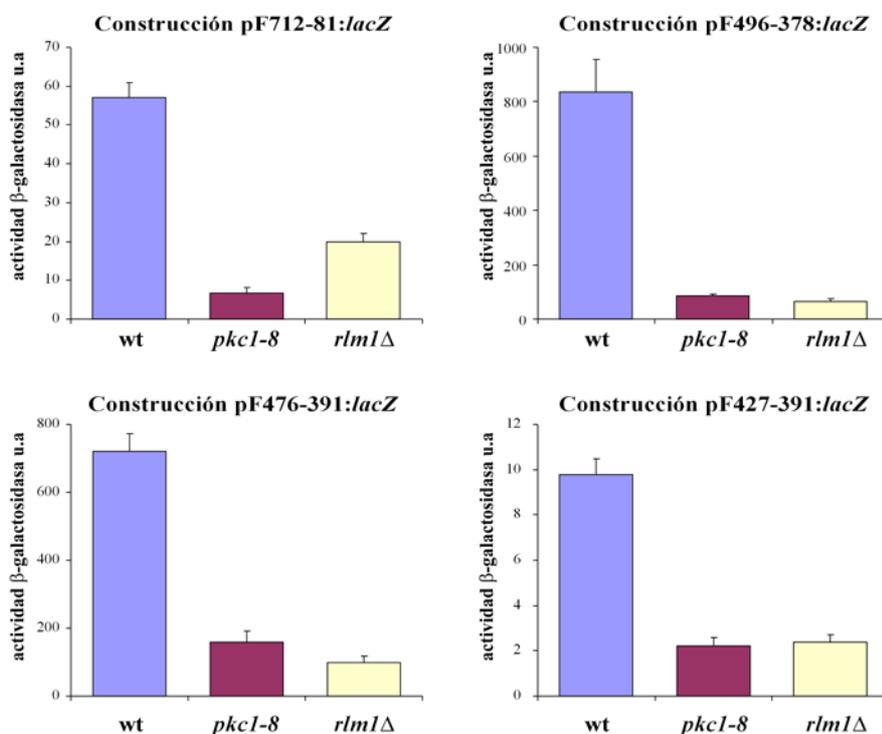


Figura 3.6. Papel del factor de transcripción Rlm1 en la expresión del gen *FKS1*. Actividad β -galactosidasa en extractos de células salvaje (W303-1a), *pkc1-8* (JC6-3a) y *rlm1* Δ (JCY345) transformadas con las construcciones pF712-81:*lacZ*, pF496-378:*lacZ*, pF476-391:*lacZ* o pF427-391:*lacZ*.

describe más adelante, en este trabajo hemos detectado unión *in vivo* de Rlm1 al promotor de *FKS1* (ver Figura 3.12). En conclusión, estos resultados junto con el análisis de las fusiones génicas realizado anteriormente, indican que la ruta PKC regula la expresión del gen *FKS1* actuando a través del sitio Rlm1BS-like y del factor de transcripción Rlm1.

En el caso de las construcciones pF496-378:*lacZ*, pF476-391:*lacZ* y pF427-391:*lacZ* los valores de actividad β -galactosidasa en el mutante *rlm1* Δ son similares o menores a los observados en la cepa *pkc1-8*, lo cual es consistente con que Pkc1 actúe solamente a través de Rlm1 y del sitio Rlm1BS-like. En este sentido, resulta llamativo que para la construcción pF712-81:*lacZ* el nivel de expresión está más afectado en la cepa mutante *pkc1-8* que en el mutante *rlm1* Δ . En el grupo de Dr. Treisman, se observó que la sobreexpresión de una forma truncada de Rlm1 que es capaz de unirse al DNA pero no puede activar la transcripción, provoca mayores defectos que los observados en el mutante *rlm1* Δ (Dodou y Treisman, 1997). Es decir, la presencia de una versión de Rlm1 que no puede activar la transcripción supone un mayor problema para la célula que la ausencia total de Rlm1, lo cual puede explicar por qué en el caso de la construcción pF712-81:*lacZ*, la cual contiene el fragmento completo del promotor de *FKS1*, la expresión es más baja en el mutante *pkc1-8* que en el mutante *rlm1* Δ .

Como hemos visto, el factor Rlm1 por sí sólo es capaz de regular la expresión mediada por Pkc1 del gen *FKS1* actuando a través del sitio Rlm1BS-like. Sin embargo, la capacidad activadora de la transcripción de este elemento aislado es muy débil, como se observa en las construcciones pF427-391:*lacZ* y pF460-415:*lacZ*. En comparación con ellas, la construcción con todos los elementos reguladores conocidos (pF712-378:*lacZ*) presenta niveles de expresión más de 1000 veces mayores. A ello contribuyen las diferentes secuencias SCB y MCB presentes en el promotor. Además, la diferencia de más de 20 veces entre los niveles de expresión de pF476-391:*lacZ* y pF460-415:*lacZ* indica la existencia de un fuerte elemento

activador en la secuencia de -476 a -460 o bien en la secuencia de -415 a -391. El hecho de que la construcción pF427-391:*lacZ* que contiene la región de -415 a -391 proporcione niveles muy bajos de expresión, indica que la secuencia entre -476 a -460 es la que actúa como un fuerte activador de la expresión. Además, como se observa en la Figura 3.6, esta expresión es dependiente de Rlm1. Es interesante destacar algunas propiedades de la secuencia entre -476 y -460. En esta zona existe una secuencia de 12 nucleótidos rica en A/T con una C intermedia, localizada entre -474 y -463 que es una repetición invertida de la secuencia entre -422 y -411 (Figura 3.7). Esta repetición en 3' solapa con el sitio Rlm1BS-like. Estudios recientes sobre el sitio de unión de Rlm1 han mostrado que la primera C de la secuencia consenso es dispensable siendo suficiente la secuencia TA(T/A)₄TAG para la unión específica de Rlm1 (Jung y Levin, 1999; Boorsma *et al.*, 2004). Considerando esto, es evidente la similitud entre la secuencia invertida y el sitio Rlm1BS-like. El factor de transcripción Rlm1 pertenece a la familia MADS box. Este tipo de factores son capaces de

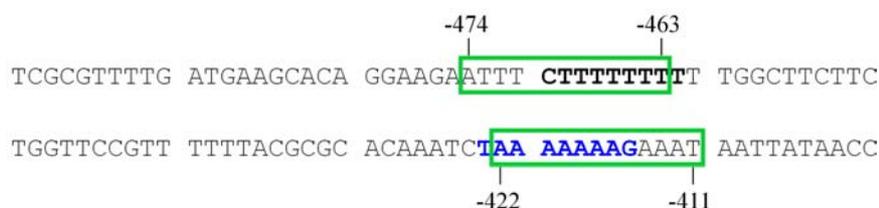


Figura 3.7. Detalle de la secuencia del promotor del gen *FKSI*. Se muestra la secuencia de nucleótidos entre -401 y -500 del promotor del gen *FKSI*. Se ha indicado en azul la secuencias reguladora Rlm1BS-like, y recuadradas en verde las secuencias repetidas inversas. Dentro de la primera repetición, se indica en negrita una secuencia similar al sitio Rlm1BS-like.

actuar en forma de monómeros y también formando homo o heterodímeros y de hecho se ha descrito que la presencia de dos sitios de unión de Rlm1 potencia enormemente la expresión del gen reportero *lacZ* en comparación con fusiones con un solo sitio de unión de Rlm1 (Dodou y Treisman, 1997; Jung *et al.*, 2002). Por ello nuestros resultados sugieren que Rlm1 actúe como dímero en la regulación de la expresión del gen *FKS1* uniéndose al sitio que hemos denominado Rlm1BS-like y a la secuencia comprendida entre -470 y -462.

ESTUDIO DEL SINERGISMO ENTRE LOS ELEMENTOS DE SECUENCIA Rlm1BS Y SCB.

En el apartado anterior, se ha determinado que la ruta PKC regula la expresión del gen *FKS1* actuando a través de un elemento regulador consistente en un sitio de unión del factor de transcripción Rlm1. Sin embargo, como se ha discutido anteriormente, la capacidad transactivadora de este elemento regulador en solitario es muy débil. La actividad, sin embargo, aumenta drásticamente cuando se combina con otros elementos reguladores, que en el caso del gen *FKS1* pueden ser los sitios SCB y MCB. Estos resultados sugieren una relación de sinergismo entre la regulación por Rlm1 a través del sitio Rlm1-BS y la regulación por SBF a través de sitios SCB/MCB.

Con la finalidad de estudiar si existe una relación de sinergismo entre la función de los factores Rlm1 y SBF, y estudiar su relación en un contexto diferente al del promotor del gen *FKS1*, se diseñaron 3 construcciones que contenían diferentes combinaciones de secuencias reguladoras en el plásmido pLGL: 1) pSCB:*lacZ*, que contiene un fragmento del promotor del gen *HO* con 3 secuencias consenso de SCB, 2) pRlm1BS:*lacZ*, que contiene la secuencia consenso de unión de Rlm1 y 3)

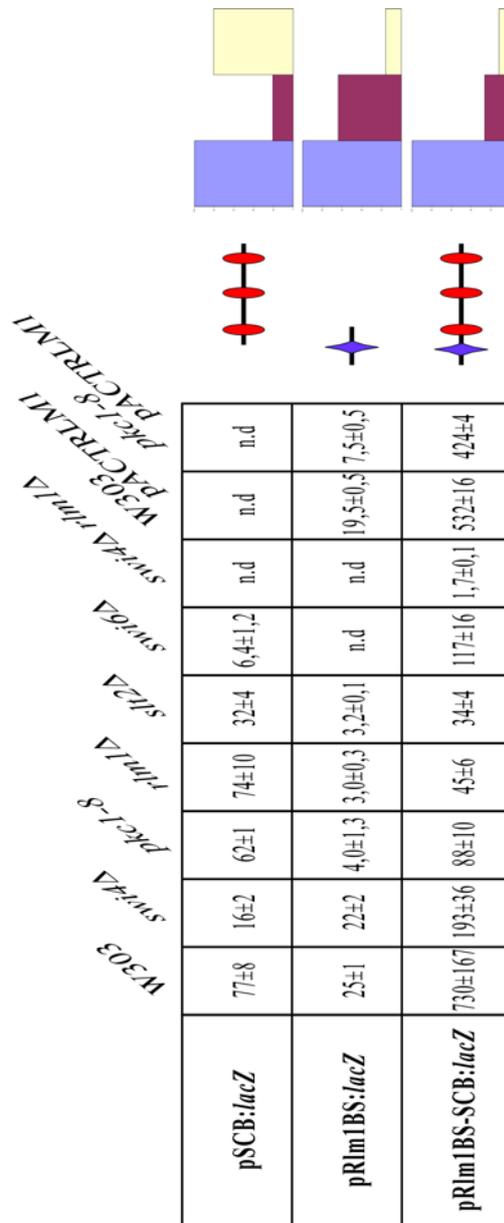
pRlm1BS-SCB:*lacZ*, que contiene el sitio de unión de Rlm1 seguido del fragmento del promotor del gen *HO* con los tres sitios SCB. Se analizó la expresión del gen *lacZ* en dichas construcciones en la cepa salvaje y en los mutantes *swi4Δ*, *pkc1-8*, *rlm1Δ*, *slt2Δ*, *swi6Δ* y el doble mutante *swi4Δ rlm1Δ*; también se estudió la expresión en las cepas salvaje y mutante *pkc1-8* transformadas con el plásmido pACTRLM1 (Watanabe *et al.*, 1995), el cual expresa una fusión que contiene la proteína Rlm1 fusionada al dominio de activación transcripcional del factor Gal4 (GAD). Esta proteína es constitutivamente activa y no necesita la función de Slt2 para su activación.

El análisis de la construcción pSCB:*lacZ* indicó, como era de esperar, una expresión fuertemente dependiente de SBF, ya que el nivel de expresión disminuye hasta el 20% en el caso del mutante *swi4Δ* y el 8% en el mutante *swi6Δ* respecto a la expresión observada en la cepa salvaje (Figura 3.8). Sin embargo, y también como era de esperar, no se observaron diferencias importantes en la expresión cuando se inactivaba Rlm1. La expresión tampoco resultó afectada significativamente en un mutante *pkc1-8*. Por el contrario, en el mutante *slt2Δ* los niveles de expresión del gen reportero se reducen a la mitad. Un efecto similar de la inactivación de Slt2 en la expresión del gen *SCB:lacZ* ha sido publicado por el grupo del Dr. Francois (Martin-Yken *et al.*, 2003). Slt2 fosforila a Swi4 y Swi6 aunque no se conoce el efecto que dicha fosforilación ejerce sobre SBF (Madden *et al.*, 1997; Baetz *et al.*, 2001). En este sentido, la ausencia de Slt2 podría afectar a la actividad transcripcional de SBF, provocando una disminución en la expresión del gen reportero. Sin embargo, no podemos descartar que la disminución de la expresión observada se deba a efectos indirectos sobre el número de copias del plásmido en la célula o efectos sobre el gen *lacZ* o la enzima β -galactosidasa (Fan y Klein, 1994; Chavez y Aguilera, 1997). De hecho, se ha observado que la transcripción del gen *lacZ* supone problemas de elongación en *S. cerevisiae* y se ha sugerido que mutantes en la ruta PKC serían más sensibles a este problema (Chang *et al.*, 1999). Además, hay que

tener en cuenta que el fragmento del promotor *HO* utilizado en la construcción pSCB:*lacZ* confiere una regulación fuertemente periódica de la expresión génica y que por tanto alteraciones en la progresión en el ciclo celular pueden dar lugar de manera indirecta a cambios en los niveles de actividad detectados. Slt2 interviene en procesos de polarización del crecimiento como la gemación (Marini *et al.*, 1996; Gray *et al.*, 1997; van Drogen y Peter, 2002) o en el control de la mitosis (Harrison *et al.*, 2001) por lo que su inactivación podría afectar indirectamente a la expresión del gen pSCB:*lacZ*.

El análisis de la construcción pRlm1BS:*lacZ* confirmó la débil potencia transactivadora del sitio Rlm1BS cuando aparece una única copia, ya que para la cepa salvaje se obtuvieron valores de actividad β -galactosidasa de sólo 25 unidades. Este resultado es similar al publicado para construcciones que contienen un único sitio de unión de Rlm1 (Dodou y Treisman, 1997; Jung *et al.*, 2002). Dicha expresión es, como cabe esperar, totalmente dependiente de Rlm1 y Slt2, así como de Pkc1, ya que en los respectivos mutantes la expresión se reduce casi por completo. Sin embargo, la inactivación de Swi4 no supuso consecuencias en la expresión. La expresión de una proteína Rlm1 constitutivamente activa en la cepa *pkc1-8*

Figura 3.8. Análisis de la expresión en construcciones con secuencias reguladoras de unión de los factores SBF y Rlm1. Se construyeron tres fusiones génicas en las que el gen *lacZ* se expresa bajo el control de un fragmento del promotor de *HO* que contiene 3 elementos SCB (pSCB:*lacZ*), una secuencia de unión de Rlm1 (pRlm1BS:*lacZ*) o ambos elementos reguladores (pRlm1BS-SCB:*lacZ*). Se analizó la expresión del gen reportero *lacZ* en las cepas salvaje y mutantes *pkc1-8* (JC63-a), *swi4* Δ (BY604), *rlm1* Δ (JCY345), *slt2* Δ (JCY464), *swi6* Δ (BY600), *swi4rlm1* Δ (JCY413) transformadas con los distintos plásmidos, tal como se explica en la figura 3.3. En el caso de las cepas W303 y *pkc1-8* también se analizó la expresión en presencia del plásmido pACTRLM1 que expresa una versión del factor Rlm1 constitutivamente activo.



(plásmido pACTRLM1), fue capaz de suplir en parte los defectos de expresión del mutante.

El análisis de la construcción pRlm1BS-SCB:*lacZ* reveló interesantes resultados. La potencia transactivadora del promotor experimentó un considerable aumento al fusionar 3 sitios SCB al sitio de unión de Rlm1. En la cepa salvaje se obtuvieron valores de actividad β -galactosidasa de 730 unidades, frente a las 25 unidades obtenidas en la construcción conteniendo un sitio Rlm1BS y 77 para la construcción conteniendo 3 sitios SCB. Este resultado indica un claro efecto de sinergismo entre los elementos reguladores Rlm1BS y SCB. La expresión del gen *lacZ* depende totalmente de los factores SBF y Rlm1, ya que en un doble mutante *swi4* Δ *rlm1* Δ la expresión se elimina totalmente. La inactivación de Rlm1, bien por delección del gen *RLM1*, o en cepas mutantes *slt2* Δ o *pkc1-8*, provoca una fuerte disminución de la expresión, obteniéndose valores similares a los de la cepa salvaje en la construcción pSCB:*lacZ*. En este contexto, no existe Rlm1 activo, y se reproduce la activación mediada únicamente por los 3 elementos SCB. En un mutante *pkc1-8* transformado con el plásmido pACTRLM1 el nivel de expresión se recupera hasta valores similares a los de la cepa salvaje. Por otro lado, la ausencia de las proteínas Swi4 o Swi6, origina también una disminución importante de la expresión del gen reportero. Sin embargo, en este caso, la actividad β -galactosidasa es mayor que la obtenida para la construcción pRlm1BS:*lacZ*, lo cual sugiere que en estas cepas existe cierta actividad residual de los elementos SCB. Esto puede ser debido a la redundancia funcional existente entre los factores de transcripción SBF (Swi4 y Swi6) y MBF (Mbp1 y Swi6) y al hecho de que Swi4 sea capaz de activar la transcripción incluso en ausencia de Swi6 (Baetz *et al.*, 2001). En conclusión, los datos obtenidos en el análisis de estas construcciones son consistentes con la existencia de un potente efecto sinérgico entre los factores Rlm1 y SBF.

ESTUDIO DEL MECANISMO DE REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN DE Rlm1 POR LA RUTA PKC

En el apartado anterior, se ha determinado que la ruta de la proteína quinasa C regula la transcripción del gen *FKS1* a través de la secuencia reguladora Rlm1BS-like. El análisis mediante fusiones heterólogas conteniendo regiones del promotor *FKS1* demostró que la expresión del gen depende de Rlm1. Anteriormente al inicio de este trabajo, se había determinado que la activación de la transcripción mediada por Rlm1 depende de Slt2 (Watanabe *et al.*, 1997; Dodou y Treisman, 1997). El factor Rlm1 es fosforilado por Slt2 en distintas posiciones. Entre ellas, la fosforilación por Slt2 en los residuos de Ser-427 y Thr-439 es necesaria para la activación de la transcripción por Rlm1 (Jung *et al.*, 2002). No obstante, se desconocen las bases moleculares de la regulación de la transcripción por la ruta PKC a través del control de Rlm1. En este apartado, nos propusimos profundizar en el estudio de dicho mecanismo molecular.

Análisis de los niveles de Rlm1 en mutantes de la ruta PKC

Un primer nivel de regulación mediante el cual la ruta PKC podría regular la función de Rlm1 sería el control de los niveles celulares de Rlm1. De este modo, por ejemplo, la disminución en la transcripción del gen *FKS1* en cepas mutantes de la ruta podría deberse a la presencia de una menor cantidad de Rlm1 en la célula. Para comprobar dicha hipótesis se analizaron los niveles de Rlm1 en cepas salvaje y mutantes *slt2Δ* y *pkc1-8* transformadas con el plásmido pRLM1-HA, el cual contiene el gen *RLM1* fusionado a secuencias que codifican el epítipo HA. Se analizó la cantidad de Rlm1-HA tanto en células cultivadas a 25°C como en células incubadas a 37°C. Como se muestra en la Figura 3.9, no se observaron diferencias

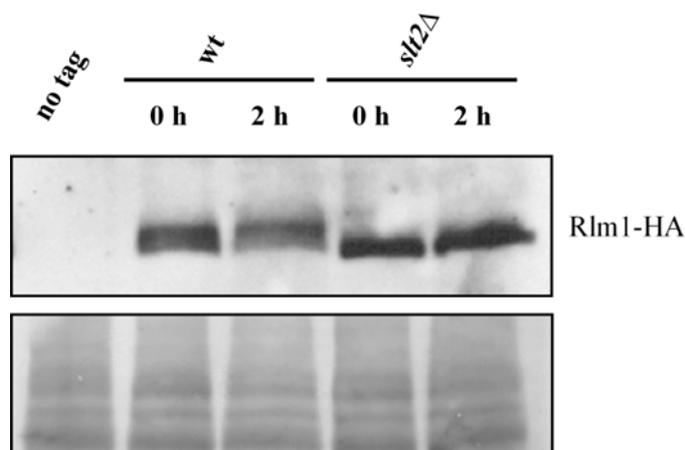


Figura 3.9. Análisis de los niveles de la proteína Rlm1 en mutantes de la ruta PKC.

Extractos de las cepas salvaje (W303-1a) y mutante *slt2Δ* (JCY464) transformadas con el plásmido pRLM1-HA se analizaron por *western*. Se incluye un control de la cepa salvaje transformada con un vector vacío. Las células se crecieron a 25°C y se transfirieron a 37°C durante los tiempos indicados en la figura. En el cuadro inferior se representa la zona de la membrana donde se localiza Rlm1-HA teñida con Ponceau, mostrada como control de carga.

significativas en la cantidad de proteína entre la cepa salvaje y los mutantes. Además, las diferentes condiciones de cultivo analizadas no parecen afectar a la cantidad de Rlm1 a pesar de que a 37°C se activa la ruta. Así pues, la regulación mediada por la ruta PKC de la actividad transcripcional del factor Rlm1 no se realiza a través de cambios en la cantidad de Rlm1.

Estudios anteriores habían determinado que Rlm1 es fosforilada por Slt2 (Watanabe *et al.*, 1997; Jung *et al.*, 2002). En la Figura 3.9 se observa que existe un cambio en la migración de Rlm1 en las cepas mutantes *slt2Δ* y *pkc1-8* (datos no mostrados). En la cepa salvaje la banda correspondiente a

Rlm1 aparece como un doblete (o banda ensanchada), mientras que en las cepas mutantes únicamente aparece una banda estrecha correspondiente a la zona con mayor movilidad electroforética. Este cambio de movilidad es consistente con la ausencia de proteína Rlm1 fosforilada en las cepas mutantes *slt2Δ* y *pkc1-8*.

Estudio de la localización subcelular de Rlm1 en mutantes de la ruta PKC

El análisis de niveles de Rlm1 en las distintas cepas nos permitió descartar que la regulación de la transcripción por la ruta PKC mediada por el factor Rlm1 se debiera al control de la abundancia de Rlm1. Otro posible nivel de regulación de la actividad de Rlm1 podría implicar el control de la localización subcelular de la proteína. En el caso de un factor de transcripción, es obvio que para ejercer su función es necesario que se encuentre en el núcleo celular. Así pues, es posible que la ruta PKC ejerza un papel sobre la localización de Rlm1, como por ejemplo regulando su importación al núcleo.

Con el objeto de comprobar si la localización de Rlm1 resultaba modificada en mutantes *slt2Δ* y *pkc1-8* respecto de la cepa salvaje, se recogieron células de las cepas salvaje y mutantes *slt2Δ* y *pkc1-8* transformadas con el plásmido *pRLM1-HA* cultivadas a 25°C, y tras 45 minutos (cepas *slt2Δ* y salvaje) o 4 horas (cepa *pkc1-8*) de incubación a 37°C. Se realizó un experimento de inmunofluorescencia de Rlm1-HA mediante la utilización de un anticuerpo anti HA. La comparación de la señal fluorescente debida a Rlm1-HA con la señal del DNA teñido con DAPI, nos permitió determinar que la proteína Rlm1-HA se localiza mayoritariamente en el núcleo celular, tanto en las células salvajes como en los mutantes *slt2Δ* y *pkc1-8* (Figura 3.10). Asimismo no se observaron cambios en la

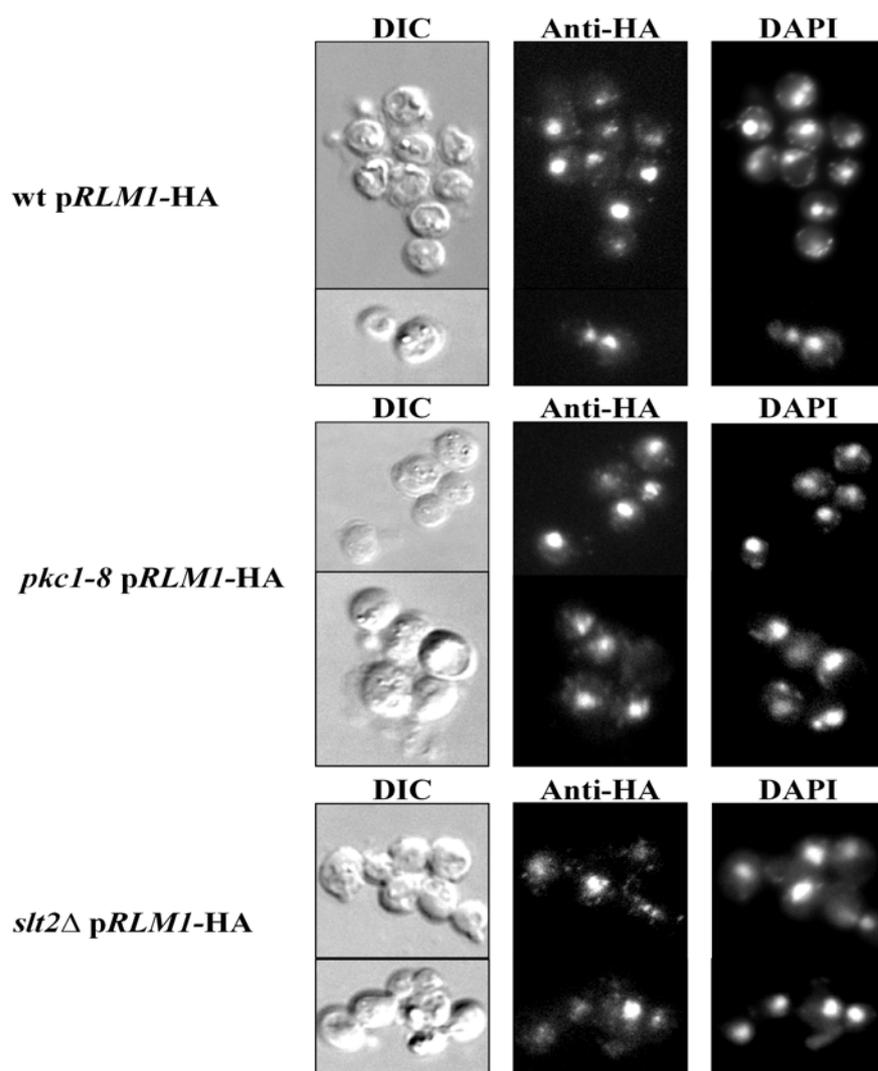


Figura 3.10. Localización subcelular de la proteína Rlm1 en mutantes de la ruta PKC. Se realizó un ensayo por inmunofluorescencia indirecta en células de las cepas salvaje (W303-1a) y mutantes *slt2* Δ (JCY464) y *pkc1-8* (JC63a) transformadas con el plásmido *pRLM1*-HA. Las células se cultivaron a 25°C y posteriormente se incubaron a 37°C durante 45 min (cepa salvaje y mutante *slt2* Δ) o 4 horas (*pkc1-8*).

localización celular en condiciones de activación de la ruta respecto de las condiciones normales de crecimiento. Este resultado está de acuerdo con los datos obtenidos por el grupo del Dr. Levin (Jung *et al.*, 2002). En conclusión, Pkc1 y Slr2 no controlan la localización subcelular de Rlm1 y por tanto la regulación de la actividad transcripcional de Rlm1 por la ruta PKC debe implicar otros mecanismos moleculares.

Análisis de la unión *in vivo* de Rlm1 al promotor del gen *FKS1*

Debido a que la localización subcelular de Rlm1 no resultaba afectada por las mutaciones en genes de la ruta PKC, nos propusimos investigar si la capacidad de Rlm1 de unirse a los promotores de los genes estaba regulada por la ruta PKC.

Durante esta tesis se analizó la unión al DNA de diferentes proteínas mediante experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina. Se ha investigado dicha unión en distintas regiones de los genes; en la Figura 3.11 se muestra un mapa de los fragmentos de DNA sobre los que se estudió la unión de proteínas *in vivo* a lo largo de este capítulo.

En este apartado, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina en cepas salvaje y mutantes *slr2Δ* y *pkc1-8* transformadas con el plásmido pRLM1-HA. Como se observa en la Figura 3.12, la inmunoprecipitación de Rlm1-HA produce una copurificación específica del fragmento de DNA correspondiente al promotor de *FKS1*. El fuerte aumento de intensidad en dicha banda se observa tanto en las muestras de las cepas salvajes como en las de los mutantes *slr2Δ* y *pkc1-8*. Así pues, Rlm1 está constitutivamente unido al promotor del gen *FKS1* independientemente de la actividad de la ruta PKC.

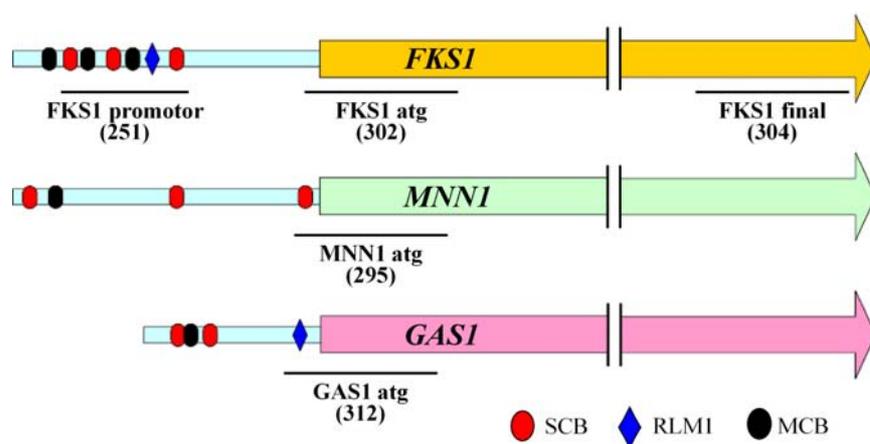


Figura 3.11. Esquema de localización de los fragmentos de DNA de los genes *FKS1*, *GAS1* y *MNN1* analizados en los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina. Se muestra un esquema de los distintos fragmentos de DNA correspondientes a los genes *FKS1*, *GAS1* y *MNN1* amplificados por PCR en los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina. Los números entre paréntesis indican la longitud en pb de cada fragmento. Los símbolos SCB (óvalo rojo), MCB (óvalo negro) y Rlm1BS (rombo azul) indican las posiciones de las secuencias reguladoras de los factores de transcripción SBF (CVCGAAA), MBF (ACGCG) y Rlm1 (CTAWWWTAG, permitiéndose una sustitución) respectivamente.

Los resultados anteriores han demostrado que no existe una regulación mediada por la ruta PKC de los niveles de Rlm1, ni de su localización subcelular, ni de su capacidad para unirse al DNA. Estudios de otros laboratorios han demostrado que la fosforilación de Rlm1 por Slt2 es necesaria para su actividad transcripcional (Watanabe *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 1997; Dodou y Treisman, 1997). Por tanto, la ruta PKC actuará regulando la capacidad de Rlm1 de activar la transcripción génica una vez este factor está unido al DNA. Por ejemplo, la ruta PKC podría regular la capacidad de Rlm1 para reclutar la maquinaria transcripcional a los promotores o bien para activar dicha maquinaria, o puesto que Rlm1

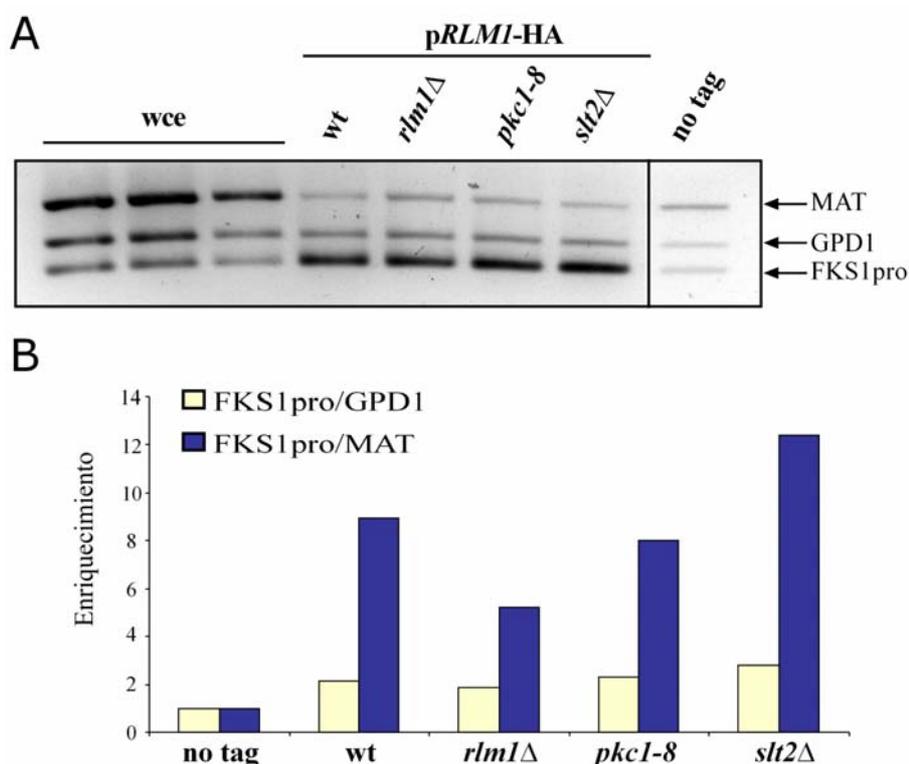


Figura 3.12. Análisis de la unión al promotor del gen *FKS1* de la proteína Rlm1 en mutantes de la ruta PKC. A) Se analizó la asociación de Rlm1 al promotor del gen *FKS1* en extractos de las cepas salvaje W303-1a y mutantes *rlm1*Δ (JCY345), *pkc1-8* (JC63a) y *slt2*Δ (JCY464) transformadas con el plásmido *pRLM1-HA*. Las células se cultivaron a 25°C y se incubaron durante 4 h a 37°C. Las muestras de DNA se purificaron tras entrecruzamiento e inmunoprecipitación de Rlm1-HA y se analizaron por PCR con oligonucleótidos que amplifican el fragmento *FKS1*-promotor y los fragmentos control MAT y GPD1. Se muestran controles de una cepa salvaje sin etiquetar (no tag) y de DNA extraído previamente a la inmunoprecipitación y amplificado utilizando diferentes cantidades de molde (wce: *whole cell extract*). Se muestra una figura representativa de los distintos experimentos realizados. B) Enriquecimiento relativo del fragmento *FKS1*-promotor para cada una de las cepas analizadas respecto de la cepa control sin etiquetar. Para obtener dicha representación, se cuantificó la intensidad de cada banda mediante el programa *Image Gauge 3.12* y se calcularon las intensidades relativas de la banda *FKS1*-promotor respecto a los fragmentos control GPD1 y MAT para cada carrera. Los valores obtenidos se dividieron por los correspondientes valores de la cepa control sin etiquetar.

pertenece a una familia de factores de transcripción como los MADS box que suelen actuar junto con otras proteínas, la fosforilación por PKC podría controlar la interacción de Rlm1 con otros reguladores de la transcripción presentes en el promotor.

Análisis de la unión *in vivo* de Slt2 al promotor del gen *FKS1*

Las investigaciones realizadas con otras cascadas MAP quinasa proporcionan datos útiles para avanzar en el estudio del mecanismo de regulación transcripcional por la ruta PKC. Un caso especialmente interesante es la ruta de la MAP quinasa Hog1 de *S. cerevisiae* (ver Introducción). Esta ruta, en respuesta a un aumento de osmolaridad en el medio de cultivo desencadena una respuesta de activación de la transcripción de genes específicos (Posas *et al.*, 2000; O'Rourke y Herskowitz, 2004). Hasta la fecha se han caracterizado 5 factores de transcripción dianas de la MAP quinasa Hog1: los activadores Msn2/4, Msn1, Hot1, Smp1 y el represor Sko1 (Schuller *et al.*, 1994; Rep *et al.*, 1999; Rep *et al.*, 2000; Profit y Struhl, 2002; Hohmann, 2002; de Nadal *et al.*, 2003). Al menos en algunos casos, se ha descrito que Hog1 es reclutado a los promotores de diversos genes a través de su interacción con estos factores (Alepuz *et al.*, 2001; Alepuz *et al.*, 2003). Una vez en el promotor, Hog1 media el reclutamiento al promotor y la activación de diversos componentes de la maquinaria general de la transcripción como la RNA polimerasa II, proteínas Srb-mediador, TFIIB y la histona desacetilasa Rpd3 (Alepuz *et al.*, 2001; de Nadal *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha observado que la MAP quinasa p38 de mamíferos que regula la transcripción génica a través de factores de la familia MEF2, interacciona con la RNA polimerasa II (Alepuz *et al.*, 2003). Por todo ello nos planteamos la posibilidad de que la MAPK Slt2 se uniera al promotor de los genes regulados por la ruta y actuara interaccionando con la maquinaria transcripcional.

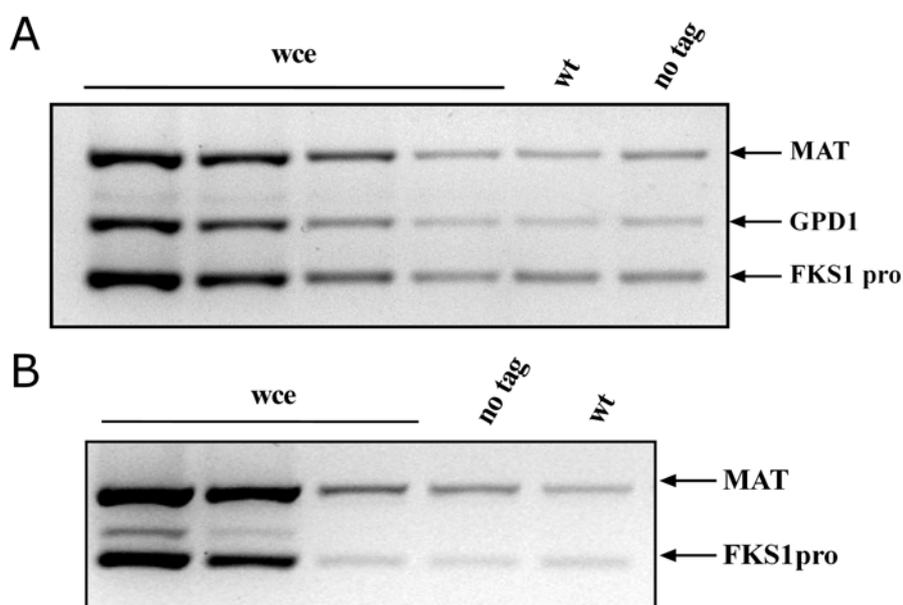


Figura 3.13. Análisis de la unión al promotor del gen *FKS1* de la proteína Slt2. Se analizó la asociación de Slt2 al promotor del gen *FKS1* en extractos de la cepa salvaje (W303-1a) transformada con el plásmido pSLT2-HA. Las células se cultivaron a 25°C y se incubaron durante 1 h a 37°C. Se analizó la unión de Slt2 al fragmento de DNA, *FKS1*-promotor, como se describe en la Figura 3.12. Se muestra el resultado obtenido en dos experimentos independientes.

Con la finalidad de estudiar dicha hipótesis, se analizó la unión de la proteína Slt2 al promotor del gen *FKS1*. Para ello, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina en una cepa que expresa la proteína Slt2 etiquetada con el epítipo HA. Las células se sometieron a un choque térmico de 1h a 37°C, con la finalidad de inducir la activación de la ruta. El análisis por PCR del DNA inmunoprecipitado, permitió detectar que existe un enriquecimiento pequeño pero significativo del fragmento de DNA correspondiente a la zona del promotor de *FKS1* en la cepa que expresa Slt2-

HA respecto de la cepa que expresa la proteína no marcada (Figura 3.13). Este resultado sugiere, por tanto, que la MAP quinasa Slt2 está asociada al promotor del gen *FKS1*. El fragmento de DNA analizado en estos experimentos es el mismo en el que se detectó la unión del factor Rlm1. La colocalización de Slt2 y Rlm1 en el promotor sugiere que Rlm1 pueda actuar como puente en la unión de Slt2 al DNA.

A continuación también se analizó la unión de Slt2 a zonas más próximas al inicio de la región codificante. Para ello, se utilizaron en los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina oligonucleótidos específicos que amplifican un fragmento de DNA de la región del ATG del promotor de *FKS1*. Como se observa en la Figura 3.14, existe un enriquecimiento específico de la banda correspondiente a la zona del ATG del promotor de *FKS1* en las células que expresan Slt2-HA en comparación con aquellas células donde Slt2 no ha sido marcada. La unión de Slt2 al DNA resultó ser más fuerte en esta zona centrada en el ATG que en la zona *upstream* del promotor analizada previamente, por lo que el resto de los experimentos realizados se llevaron a cabo en esta zona adyacente al ATG del promotor de *FKS1*. La señal detectada no es tan fuerte como en otras proteínas analizadas en este trabajo, aunque no por ello deja de ser repetitiva. De hecho, para confirmar esta unión se realizó el experimento en repetidas ocasiones utilizando 3 extractos diferentes, analizados en 10 reacciones de PCR diferentes. La media de todos estos experimentos indicó un enriquecimiento relativo del 93% de la banda de la zona del ATG del promotor de *FKS1* (Figura 3.14B). Este resultado confirma la unión *in vivo* de la MAPK Slt2 al promotor del gen *FKS1*.

Una vez detectada la unión de Slt2 al gen *FKS1*, un objetivo inmediato fue comprobar si, de manera similar a lo que ocurre con la MAPK quinasa Hog1, la unión de Slt2 está mediada por un factor de transcripción específico, en este caso por el factor Rlm1. Para estudiar esta posibilidad, se

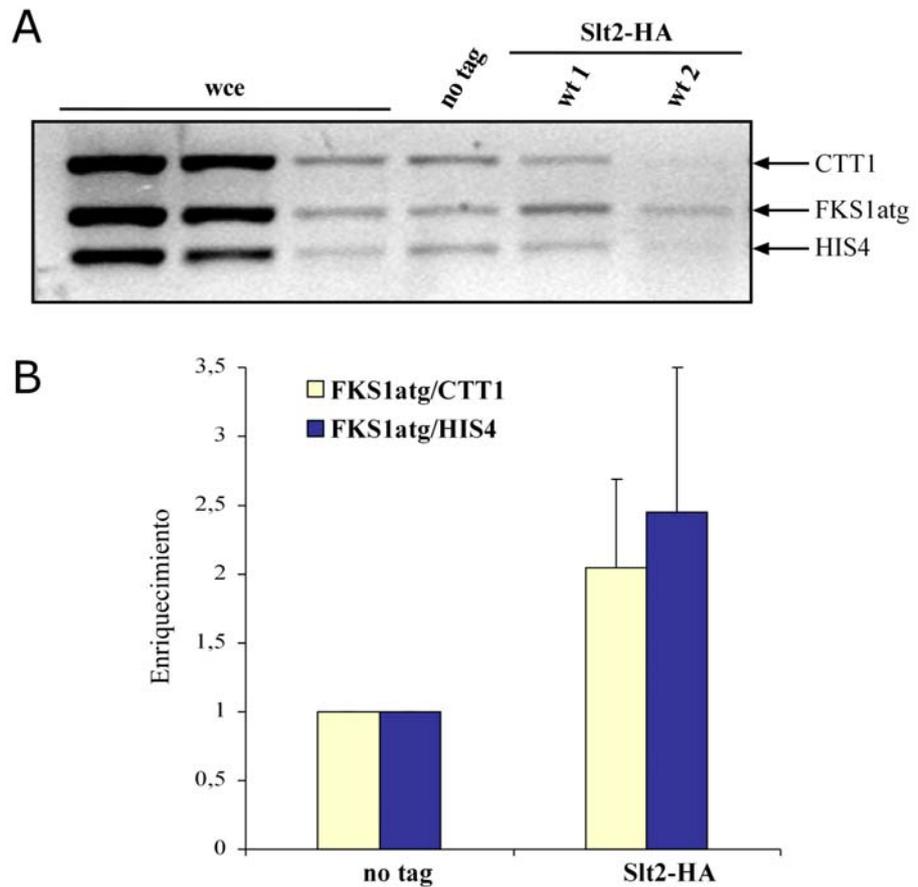


Figura 3.14. Análisis de la unión a la zona del ATG del gen *FKS1* de la proteína *Sl2*. A) Se analizó la asociación de *Sl2* al promotor del gen *FKS1* en la zona del ATG (fragmento *FKS1*-atg) en extractos de la cepa salvaje (W303-1a) transformada con el plásmido *pSL2*-HA. Las células se cultivaron a 25°C y se incubaron durante 1 h a 37°C. Se analizó la unión al DNA como se describe en la Figura 3.12, pero utilizando oligonucleótidos que amplifican el fragmento *FKS1*-atg y fragmentos control de los genes *CTT1* y *HIS4*. Se muestra una figura representativa de los distintos experimentos realizados. B) Enriquecimiento relativo del fragmento *FKS1*-atg en la cepa que expresa la proteína *Sl2*-HA respecto de la cepa control sin etiquetar. Los valores son la media de 10 experimentos diferentes realizados con tres extractos independientes.

analizó la unión de la proteína Slt2 al promotor del gen *FKS1* en la cepa mutante *rlm1Δ*, observándose un descenso en la intensidad relativa del fragmento correspondiente al promotor del gen *FKS1* comparada con la intensidad obtenida en una cepa salvaje (datos no mostrados). Sin embargo, los datos no son concluyentes dado la débil señal de unión de Slt2 en la cepa salvaje y se hace necesario un mayor estudio. En cualquier manera, estos indicios preliminares podrían apuntar a una dependencia de Rlm1 en la unión de la quinasa Slt2 al DNA.

Análisis de la unión *in vivo* de la RNA polimerasa II al gen *FKS1*

Los resultados obtenidos en el apartado anterior sugieren que la MAP quinasa Slt2 se asocia a los promotores de genes de pared celular para activar su expresión génica. En el caso de la regulación por la ruta HOG comentado anteriormente, la actividad de la MAPK Hog1 es necesaria para el reclutamiento al promotor de la maquinaria general de transcripción, como la RNA polimerasa II (Alepez *et al.*, 2001). Nos propusimos analizar la unión de la RNA polimerasa II al DNA del gen *FKS1*, para comprobar si la ruta PKC pudiera ejercer un control en este punto del proceso de transcripción, tal y como ocurre en la ruta HOG.

Para averiguar si la unión de la maquinaria transcripcional a los promotores de genes regulados por la ruta PKC depende del correcto funcionamiento de la ruta de integridad celular, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina en células que expresan Rpb1 (subunidad mayor del *core* de la RNA pol II) etiquetada con el epítipo myc. Se detectó unión específica de la subunidad central de la RNA polimerasa II al promotor del gen *FKS1* en células salvajes y también en células mutantes *slt2Δ*, *pkc1-8* y *rlm1Δ* (Figura 3.15). Este resultado sugiere que la entrada de la RNA polimerasa II al promotor del gen *FKS1* no está regulada por la ruta PKC.

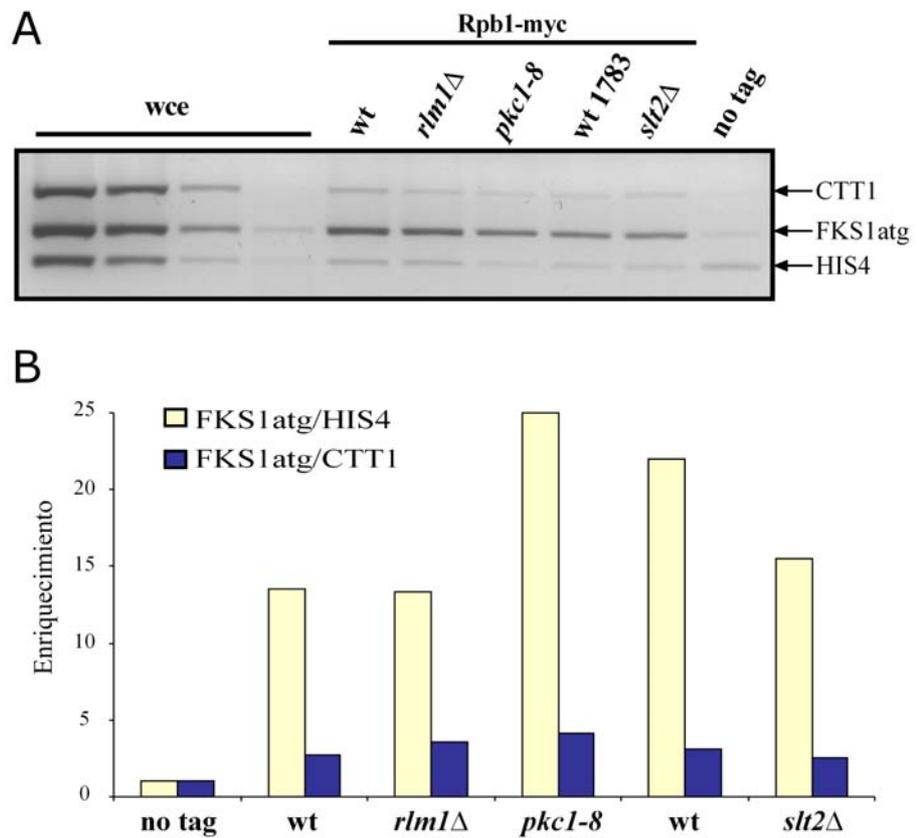


Figura 3.15. Unión de la RNA polimerasa II al gen *FKS1* en mutantes de la ruta PKC. A) Se analizó la asociación de Rpb1 al gen *FKS1* en la zona del ATG en extractos de las cepas salvaje (PAY225 y JCY607) y mutantes *rlm1*Δ (JCY606), *pkc1-8* (JCY605) y *slt2*Δ (JCY608) expresando la proteína Rpb1 etiquetada con el epítipo *myc*. Las células se cultivaron a 25°C y se incubaron durante 4 h a 37°C. Se analizó la unión al DNA como se describe en la Figura 3.14. Se muestra una figura representativa de los distintos experimentos realizados. B) Enriquecimiento relativo del fragmento FKS1-atg para cada cepa respecto de la cepa control sin etiquetar.

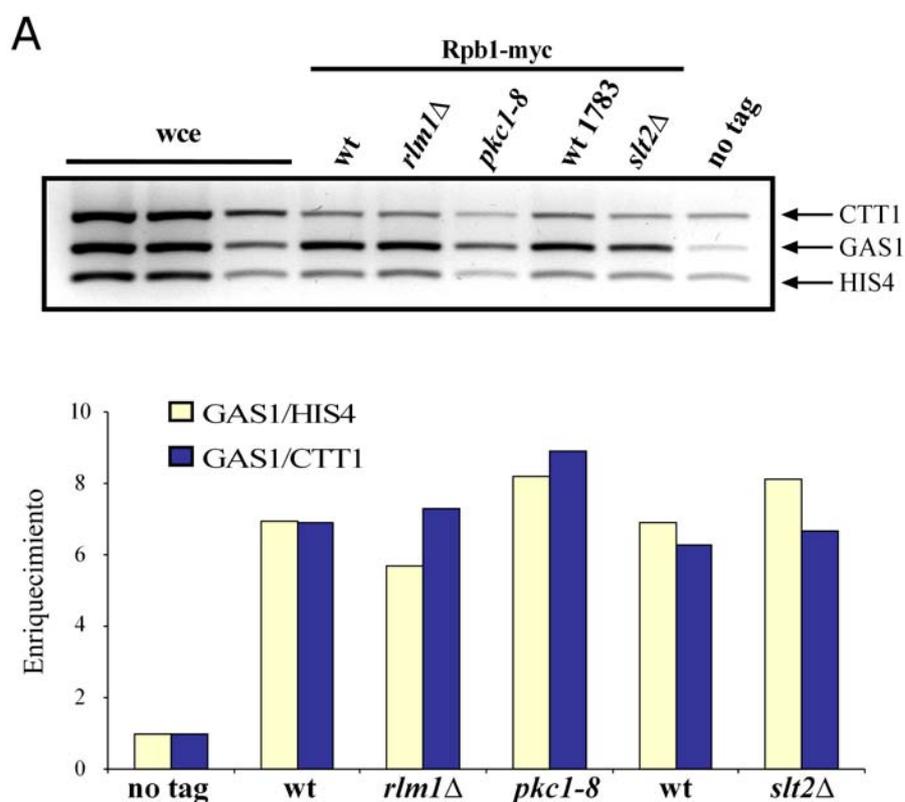
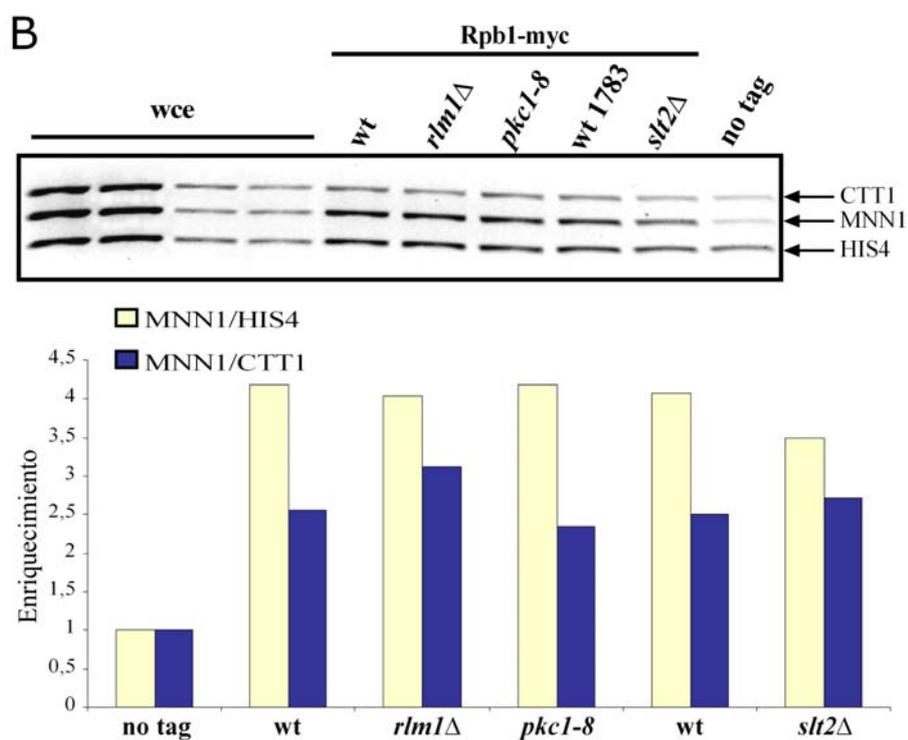


Figura 3.16. Unión de la RNA polimerasa II a los genes *GAS1* y *MNN1* en mutantes de la ruta PKC. Se analizó la asociación de Rpb1 a la región del ATG de los genes *GAS1* (A) y *MNN1* (B) en extractos de las cepas salvaje (PAY225 y JCY607) y mutantes *rlm1*Δ (JCY606), *pkc1-8* (JCY605) y *slt2*Δ (JCY608) que expresan la proteína Rpb1 etiquetada con el epítipo *myc* tal como se describe en la Figura 3.14. Se muestran figuras representativas de los distintos experimentos realizados.



Para comprobar si este hecho era extensible a otros genes regulados por la ruta PKC, se realizaron el mismo tipo de ensayos en los genes *GAS1* y *MNN1*. Se observó también unión de la subunidad Rpb1 de la RNAPol II a los promotores de estos genes en cepas deficientes en la ruta PKC, siendo la intensidad de la unión detectada similar a la observada en la cepa salvaje (Figura 3.16 A y B). Aunque existen más genes controlados por la ruta de integridad celular, los resultados obtenidos en los promotores de los genes *FKS1*, *GAS1* y *MNN1* parecen indicar que la ruta PKC no ejerce su control en la transcripción génica de genes específicos de pared celular mediante la

regulación en la entrada de la RNA polimerasa II a los promotores de los mismos.

En el proceso de la transcripción de un gen la entrada de la polimerasa al promotor es una parte importante pero existen otros procesos y proteínas participantes que deben ejercer su función correctamente. Por tanto, encontrar a la RNA polimerasa II en la zona de inicio de la transcripción no es señal inequívoca de que la transcripción ocurra adecuadamente. Era posible que la ruta PKC regulara la activación de la maquinaria transcripcional unida al promotor. Para analizar esta posibilidad se analizó la presencia de la RNA polimerasa II al final de la región codificante del gen *FKS1* en cepas salvaje y mutantes *rlm1Δ* y *pkc1-8*, detectándose unión de la proteína Rpb1 tanto en la cepa salvaje como en los mutantes de la ruta PKC (Figura 3.17). Este experimento nos muestra pues que la RNA polimerasa II es capaz de llegar al final del gen *FKS1* en células donde la ruta PKC no es activa.

El resultado anterior es en principio sorprendente y plantea una clara paradoja. Las cepas deficientes en la ruta PKC presentan una clara reducción en la expresión del gen *FKS1* y, sin embargo, en los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina no se observan diferencias importantes en la intensidad de la unión de la RNAPol II en la región final del gen. Una posible explicación es que la ruta PKC controle algún componente de la maquinaria de expresión génica diferente de la RNAPol II que actúe en alguna etapa posterior a la síntesis del transcrito, por ejemplo en la maduración y/o estabilidad del mRNA. Por otro lado, hay que tener en cuenta que la inactivación de la ruta PKC reduce significativamente pero no elimina totalmente la expresión del gen *FKS1*, por lo que incluso en las células mutantes en la ruta PKC existe RNAPol II transcribiendo el gen. No se puede descartar que el ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina no permita diferenciar la cantidad de proteína unida al DNA. Para intentar

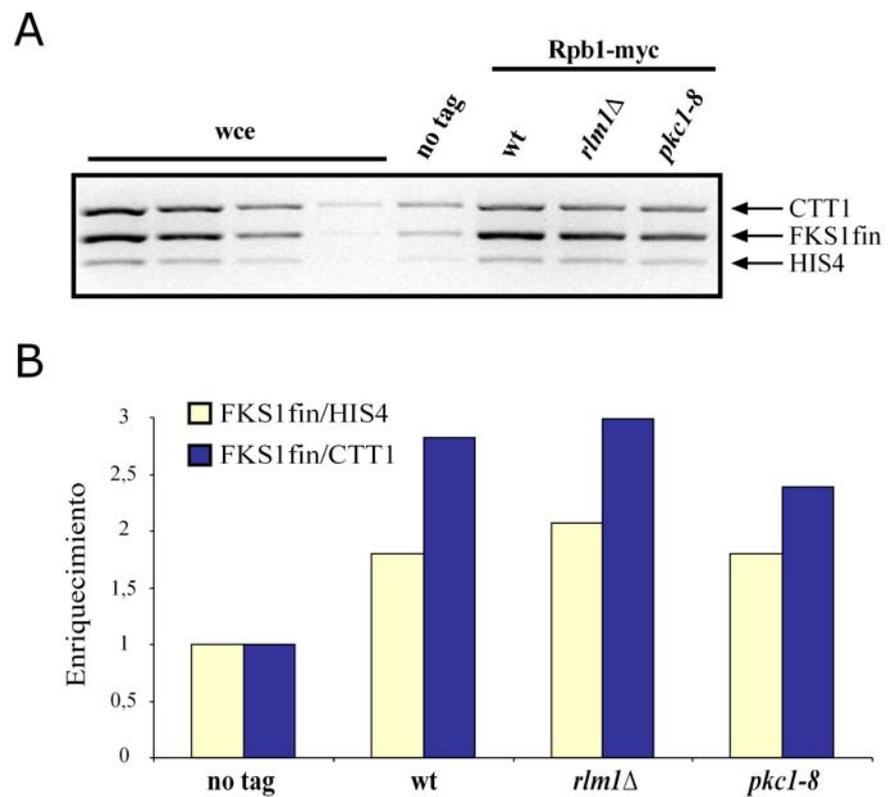
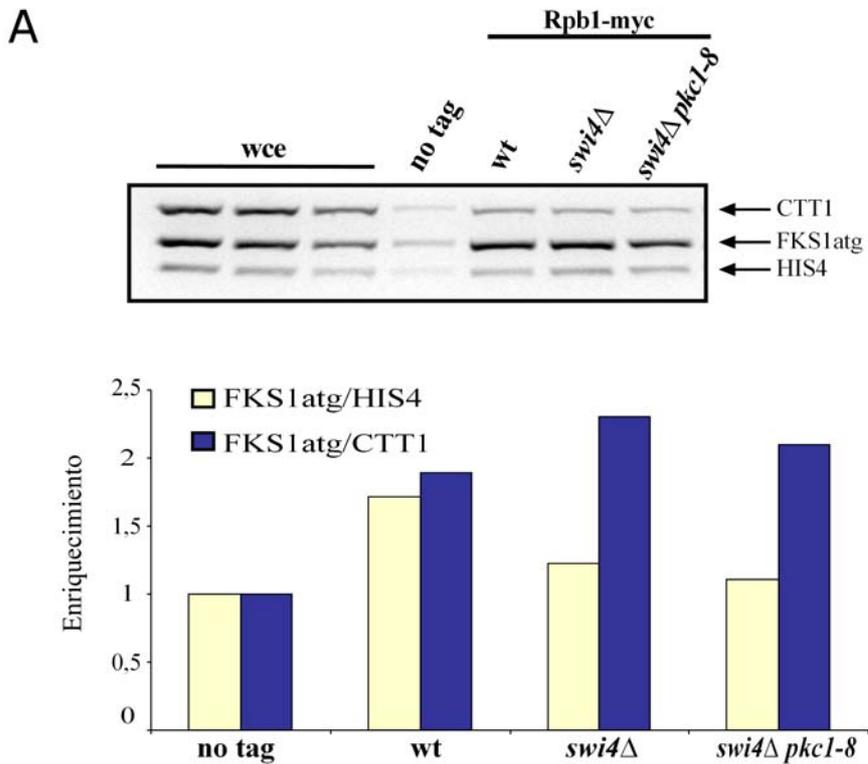


Figura 3.17. Unión de la RNA polimerasa II al final del gen *FKS1* en mutantes de la ruta PKC. A) Se analizó la asociación de Rpb1 al final de la zona codificante del gen *FKS1* en extractos de las cepas salvaje (PAY225 y JCY607) y mutantes *rlm1*Δ (JCY606), *pkc1-8* (JCY605) y *slt2*Δ (JCY608) que expresan la proteína Rpb1 etiquetada con el epítipo *myc*. Las células se cultivaron a 25°C y se incubaron durante 4 h a 37°C. Se analizó la unión al DNA como se describe en la Figura 3.12, pero utilizando oligonucleótidos que amplifican el fragmento FKS1-final y fragmentos control de los genes *CTT1* y *HIS4*. Se muestra una figura representativa de los distintos experimentos realizados. B) Enriquecimiento relativo del fragmento FKS1-final para cada cepa respecto de la cepa control sin etiquetar.



minimizar el nivel de expresión del gen *FKS1*, y puesto que su expresión está controlada además de por la ruta PKC por el factor de transcripción SBF, se analizó la unión de la RNapol II al gen *FKS1* en células donde el gen *SWI4* ha sido deletado. Los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina en el mutante *swi4Δ* y en el doble mutante *swi4Δ pkc1-8* revelaron la unión de la RNapol II a la región del ATG y a la región final del gen *FKS1* en ambos mutantes (Figura 3.18 A y B). Sin embargo, mientras que el enriquecimiento de la banda de la zona ATG fue similar en ambas cepas y en

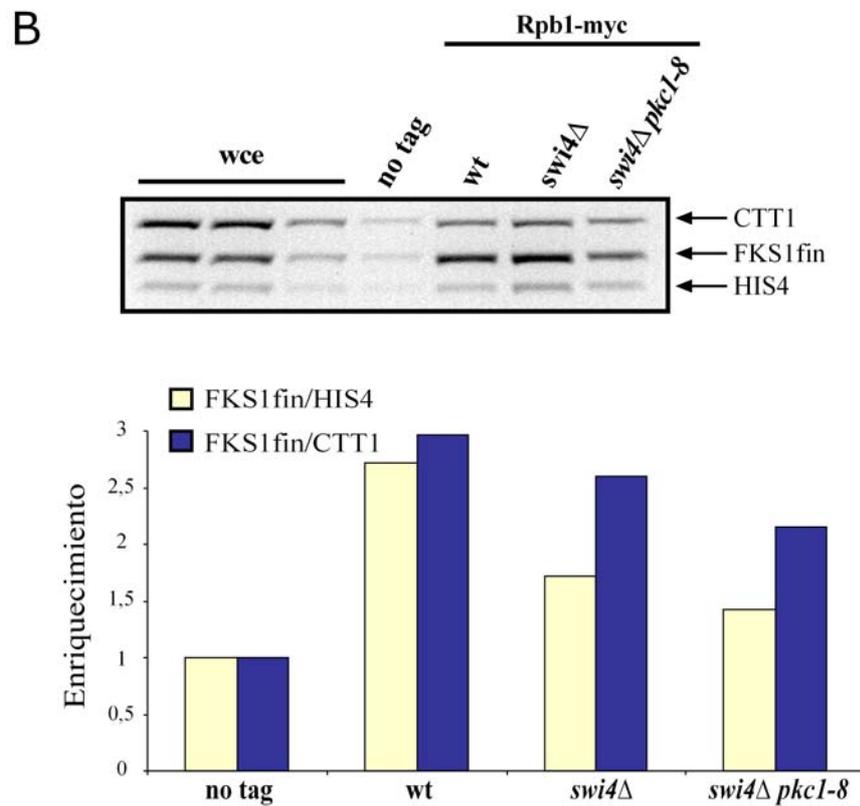


Figura 3.18. Unión de la RNA polimerasa II al gen *FKS1* en el mutante simple *swi4Δ* y en el doble mutante *pkc1-8 swi4Δ*. Se analizó la asociación de Rpb1 a la zona del ATG (A) o final de la región codificante (B) del gen *FKS1* en extractos de la cepa salvaje (PAY225) y de los mutantes *swi4Δ* (JCY609) y *swi4Δ pkc1-8* (JCY610) expresando la proteína Rpb1 etiquetada con el epítipo *myc*. Las células se cultivaron a 25°C y se incubaron durante 4 h a 37°C. Se analizó la unión al DNA como se describe en la Figura 3.14. y 3.17. Se muestran figuras representativas de los distintos experimentos realizados.

la cepa salvaje, la intensidad de la unión detectada en la zona final del gen fue más débil en la cepa doble mutante *swi4Δ pkc1-8* que en su cepa parental *swi4Δ* o en la cepa salvaje. Esta disminución en la cantidad de RNAPol II presente al final de la región codificante podría reflejar la reducción en la expresión que acompaña a la inactivación de Pkc1. Sin embargo, es necesario hacer constar que se trata de un resultado preliminar, por lo que son necesarios más ensayos para estudiar de forma precisa la cantidad de RNAPol II presente al final del gen, no solo en el caso de la cepa *swi4Δ pkc1-8* respecto a la cepa *swi4Δ*, sino también en la cepa *pkc1-8* respecto de la cepa salvaje. Aclarar si la inactivación de Pkc1 afecta o no a la capacidad de la RNAPol II para desplazarse a lo largo del gen *FKS1* será importante para entender como la ruta controla la expresión génica.

La ruta PKC controla la expresión génica dependiente del factor de transcripción Rlm1. Sin embargo, el mecanismo molecular del proceso es todavía desconocido. Los resultados presentados en este apartado demuestran que la ruta PKC no controla los niveles de Rlm1, ni su localización en el núcleo ni su capacidad para unirse al DNA. La quinasa Slt2 se asocia al promotor del gen, pero ni su actividad ni la de Rlm1 son necesarias para la ocupación del promotor por la RNAPol II. La regulación de la expresión génica por la ruta PKC debe implicar por tanto alguna etapa posterior al reclutamiento de la RNA polimerasa. Teniendo en cuenta que la fosforilación de Rlm1 por Slt2 es necesaria para la activación transcripcional, una hipótesis plausible sería que Rlm1 reclutara a Slt2 al promotor; una vez en el promotor, la quinasa fosforilaría al factor Rlm1 el cual ahora podría activar, por un mecanismo sin caracterizar, a la RNAPol II previamente unida al promotor. Sin embargo, no se puede descartar que Slt2 actúe a través de otras proteínas además de Rlm1. La transcripción necesita del ensamblaje de grandes complejos donde participan multitud de proteínas tanto en la etapa de iniciación en el promotor del gen como durante la

elongación o la terminación de la transcripción. Además, la maduración del transcrito se lleva a cabo de manera acoplada a la transcripción y así recientemente se ha descrito como las proteínas implicados en la formación del mRNA maduro se incorporan al transcrito durante el proceso de transcripción (revisado en Proudfoot *et al.*, 2002; Ares y Proudfoot, 2005). Es evidente que para que se genere un mRNA funcional no sólo las etapas de la transcripción sino también todos los procesos acoplados de maduración del mRNA deben llevarse a cabo correctamente. Este escenario proporciona a la célula enormes posibilidades de regulación, ya que si alguna de las proteínas que participan en cualquiera de estas etapas no desempeña correctamente su función el proceso de expresión génica será estéril.

Análisis de la unión *in vivo* de Swi6 al promotor del gen *FKS1*

La expresión del gen *FKS1* depende de Rlm1 y SBF. Además hemos descrito, un fuerte efecto sinérgico entre los factores Rlm1 y SBF. Por otro lado, interacciones genéticas y similitudes fenotípicas entre mutantes en SBF y mutantes de proteínas de la ruta PKC indican que SBF está implicado en el mantenimiento de la integridad celular y que existe, por tanto, una relación entre la ruta PKC y el factor SBF (Iguar *et al.*, 1996; Madden *et al.*, 1997). Las proteínas Swi4 y Swi6 (que forman el factor SBF) interactúan con Slt2 y son fosforiladas *in vivo* e *in vitro* por dicha quinasa (Madden *et al.*, 1997; Baetz *et al.*, 2001). Sin embargo, el papel de dicha fosforilación no se conoce con exactitud.

Tras conocer que la unión al DNA del factor Rlm1 no estaba regulada por la ruta PKC, nos planteamos investigar si Pkc1 pudiera controlar la unión de Swi6 al promotor de genes de pared celular. Para ello se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina en cepas

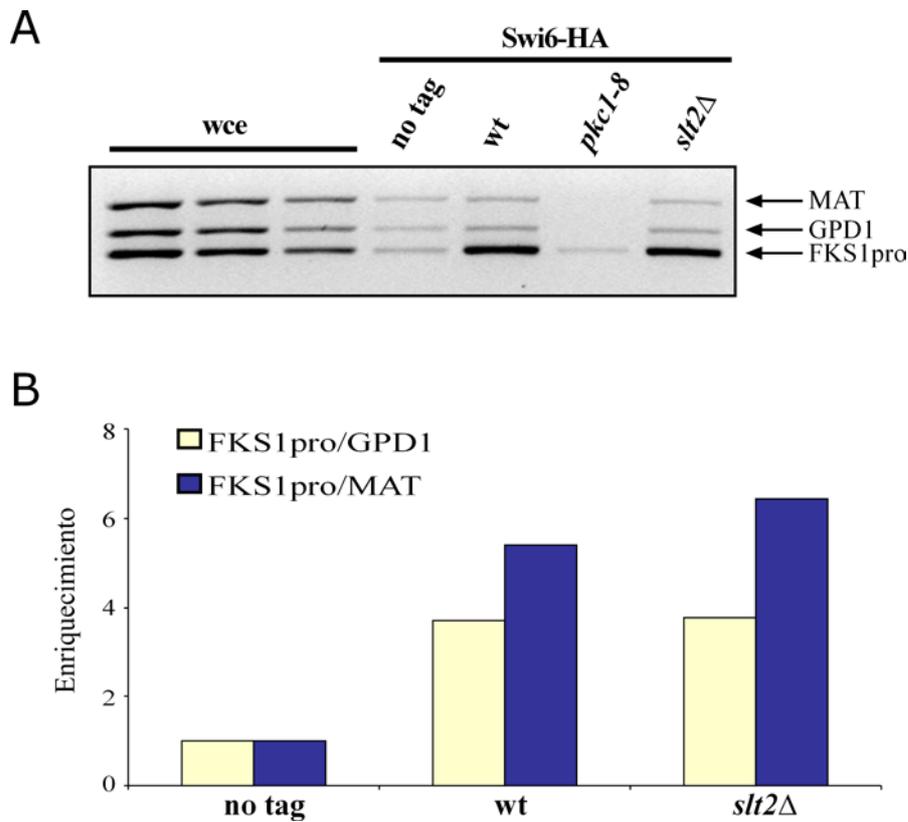


Figura 3.19. Análisis de la unión al promotor del gen *FKS1* de la proteína Swi6 en mutantes de la ruta PKC. A) Se analizó la asociación de Swi6 al promotor del gen *FKS1* en extractos de las cepas salvaje W303-1a (JCY114) y mutantes *pkc1-8* (JCY456) y *slt2Δ* (JCY465) que expresan la proteína Swi6 etiquetada con el epítipo HA. Las células se cultivaron a 25°C y se incubaron durante 4 h a 37°C. Se analizó la unión al DNA como se describe en la Figura 3.12. Se muestra una figura representativa de los distintos experimentos realizados. B) Enriquecimiento relativo del fragmento *FKS1*-promotor para cada una de las cepas analizadas respecto de la cepa control sin etiquetar.

mutantes de la ruta PKC que expresaban la proteína Swi6 etiquetada con el epítipo HA (Figura 3.19). En la imagen se observa que existe un enriquecimiento específico del fragmento de DNA del promotor de *FKS1* en el inmunoprecipitado de Swi6-HA, lo que refleja la unión del factor al promotor de *FKS1*. Dicha unión es independiente de la actividad de la ruta PKC ya que también se produce en los mutantes *slt2Δ* y *pkc1-8*.

RELACIÓN DEL COMPLEJO TRANSCRIPCIONAL Paf1C CON LA RUTA PKC

Como se ha comentado anteriormente, la ruta PKC controla la expresión génica en una etapa posterior a la ocupación del promotor por la RNAPol II. La presencia de la MAP quinasa Slt2 en el promotor sugiere que pueda actuar *in situ* controlando la actividad de proteínas que van a participar en el proceso de expresión génica. Una de ellas es el factor Rlm1, cuya fosforilación por Slt2 es necesaria para la activación de la transcripción. Sin embargo, no se puede descartar que Slt2 controle la función de otros componentes de la maquinaria transcripcional. Un caso especialmente interesante es el del complejo Paf1C. En *Saccharomyces cerevisiae* existen al menos dos formas diferentes de la RNA polimerasa II, una asociada al complejo mediador SRB y otra asociada al complejo Paf1C. Dichos complejos forman una estructura de proteínas que permiten a la RNA polimerasa II asociarse correctamente a los promotores de los genes que debe transcribir, además de facilitar la interacción con otras proteínas presentes en el promotor. El complejo mediador ó SRB contiene un núcleo consistente en mas de 16 proteínas de las familias Med y Srb, que presentan homología con proteínas de los complejos mediadores SRB de mamíferos

(Lewis y Reinberg, 2003; Chadick y Asturias, 2005; Bjorklund y Gustafsson, 2005; Kornberg, 2005). Por su parte, el complejo Paf1C, es bioquímica y funcionalmente distinto al complejo mediador. A Paf1C se le asignan funciones tanto de iniciación de la transcripción génica como de elongación (Betz *et al.*, 2002; Squazzo *et al.*, 2002; Swanson *et al.*, 2003). El complejo está compuesto por las proteínas Paf1, Cdc73, Hpr1, Ccr4, Ctr9, Rtf1 y Leo1 (Shi *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1999; Mueller y Jaehning, 2002). Existen indicios que apuntan a que algunas de estas proteínas podrían asociarse formando subcomplejos que actuarían en respuesta a distintas señales y/o activando la transcripción de diferentes genes (Mueller *et al.*, 2004).

Diversas observaciones han sugerido la existencia de una relación entre el complejo Paf1C y la ruta de la proteína quinasa C. Se ha observado que cepas mutantes *paf1Δ* ó *ccr4Δ* muestran diferentes fenotipos compartidos con mutantes de la ruta PKC como crecimiento lento y sensibilidad elevada a la temperatura y agentes como calcofluor, cafeína y SDS que causan daño en la pared celular (Chang *et al.*, 1999). Dichos fenotipos son además suprimibles mediante la adición al medio de cultivo de estabilizadores osmóticos. Además, se ha demostrado que mutaciones *paf1Δ* ó *cdc73Δ* dan lugar a tasas de recombinación del DNA elevadas (Chang *et al.*, 1999), de manera similar a lo observado en cepas con defectos en la función de Pkc1 (Huang y Symington, 1994). Uno de los datos más significativos que sugieren una relación entre Paf1C y la ruta PKC, es el hecho de que en mutantes de proteínas pertenecientes al complejo Paf1C se observa una expresión génica disminuida en genes de biosíntesis de pared celular regulados por la ruta PKC-MAPK (Chang *et al.*, 1999; Betz *et al.*, 2002). Se ha sugerido que el complejo Paf1C podría actuar por debajo de Pkc1 en la regulación de la transcripción (Chang *et al.*, 1999).

La proteína Paf1 se modifica post-traduccionalmente de forma dependiente de la ruta PKC

La posible conexión de la ruta PKC con el complejo Paf1C que sugieren los datos comentados anteriormente hacía interesante estudiar la posible participación de la proteína Paf1 en la regulación de la transcripción génica mediada por la ruta PKC. En un primer lugar, se investigó si la ruta PKC ejerce algún control sobre la cantidad de proteína Paf1 presente en la célula. Para ello, se analizaron los niveles de Paf1-HA en cepas salvaje y mutantes *slt2Δ* y *pkc1-8*. En las distintas cepas analizadas no se observaron diferencias significativas en la cantidad de proteína Paf1 (Figura 3.20 y datos no mostrados), lo que sugiere que la ruta PKC no ejerce control sobre los niveles celulares de Paf1. Sin embargo, se detectó un cambio de movilidad electroforética de Paf1 en las cepas *slt2Δ* y *pkc1-8*. En la cepa salvaje y en el mutante *rlm1Δ* la banda correspondiente a Paf1 presenta una movilidad

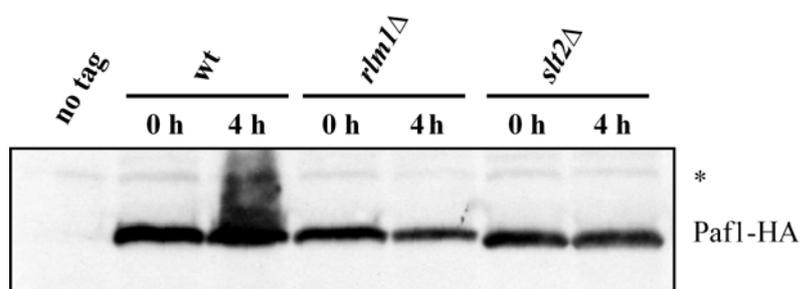


Figura 3.20. Análisis de los niveles de la proteína Paf1 en mutantes de la ruta PKC. Extractos de la cepa salvaje (JCY600) y de los mutantes *rlm1Δ* (JCY602) y *slt2Δ* (JCY603) expresando la proteína Paf1 etiquetada con el epítipo HA se analizaron por *western*. Las células se cultivaron a 25°C y se incubaron a 37°C durante los tiempos indicados en la figura. El asterisco indica una banda inespecífica que se muestra como control de carga.

electroforética menor que en las cepas mutantes *slt2Δ* y *pkc1-8*, donde la banda de Paf1 migra más rápidamente. Este tipo de variaciones en la movilidad electroforética suelen reflejar la existencia de una fosforilación de la proteína. Por tanto, este resultado sugiere la existencia de una fosforilación de Paf1 dependiente de la ruta PKC pero no de la presencia de Rlm1. La hipótesis más probable es que Paf1 sea fosforilada directamente por Slt2. Este resultado concuerda con la observación de que Cdc73 (otra proteína del complejo Paf1C) es fosforilada *in vitro* por Slt2 (Chang *et al.*, 1999). Por tanto, la ruta PKC podría actuar regulando la función del complejo Paf1C a través de la fosforilación de algunos de sus miembros.

Unión *in vivo* de Paf1 al gen *FKS1*

Se había publicado anteriormente que en un mutante *paf1Δ* la expresión del gen *FKS1* analizada mediante *northern* disminuía entre 3 y 5 veces respecto a la cepa salvaje (Chang *et al.*, 1999). Con el objetivo de identificar si el complejo Paf1C está implicado directamente en la expresión génica del gen *FKS1*, se analizó la unión de Paf1 al gen *FKS1*. Para ello, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina en cepas que expresan la proteína Paf1 marcada con el epítipo HA analizándose su unión en una zona del promotor que incluye la secuencia comprendida desde el nucleótido -619 hasta el -368. La banda correspondiente al gen *FKS1* no resultó enriquecida respecto a la cepa sin marcar, lo que indica que Paf1 no se une al gen *FKS1* en esta zona del promotor (Figura 3.21A). El complejo Paf1C se encuentra asociado con la RNA pol II, de modo que una hipótesis razonable es que Paf1 se una al DNA en la misma zona donde se une la RNA polimerasa II, cerca del inicio de transcripción. Para comprobar, esta hipótesis, se realizaron el mismo tipo de ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina pero utilizando oligonucleótidos que amplifican una zona

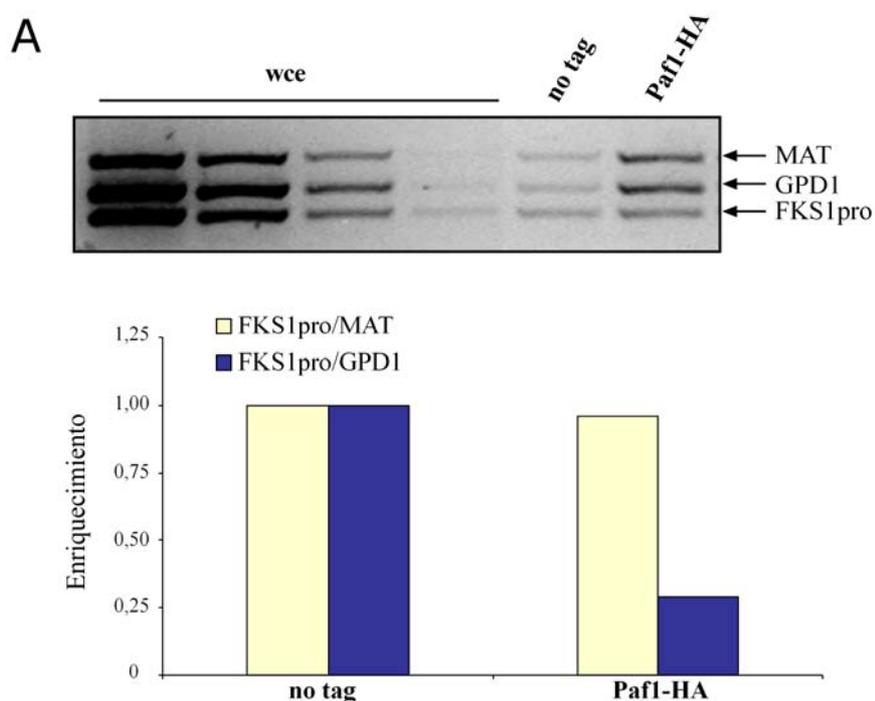


Figura 3.21. Análisis de la unión la proteína Paf1 al gen *FKS1*. Se analizó la asociación de la proteína Paf1 a la zona del promotor (A) o del ATG (B) del gen *FKS1* en extractos de la cepa salvaje W303-1a (JCY600) que expresa la proteína Paf1 etiquetada con el epítipo HA. Las células se cultivaron a 25°C y se incubaron durante 1 h a 37°C. Se analizó la unión al DNA como se describe en las Figuras 3.12. y 3.14. Se muestran figuras representativas de los distintos experimentos realizados.

centrada alrededor del ATG del gen *FKS1*. En la Figura 3.21B, se observa como la banda correspondiente a la zona del ATG del promotor de *FKS1* se encuentra enriquecida en las muestras de las cepas que expresan Paf1-HA respecto de las cepas sin marcar. Esto indica que Paf1 se asocia al DNA en la zona del ATG de *FKS1*.

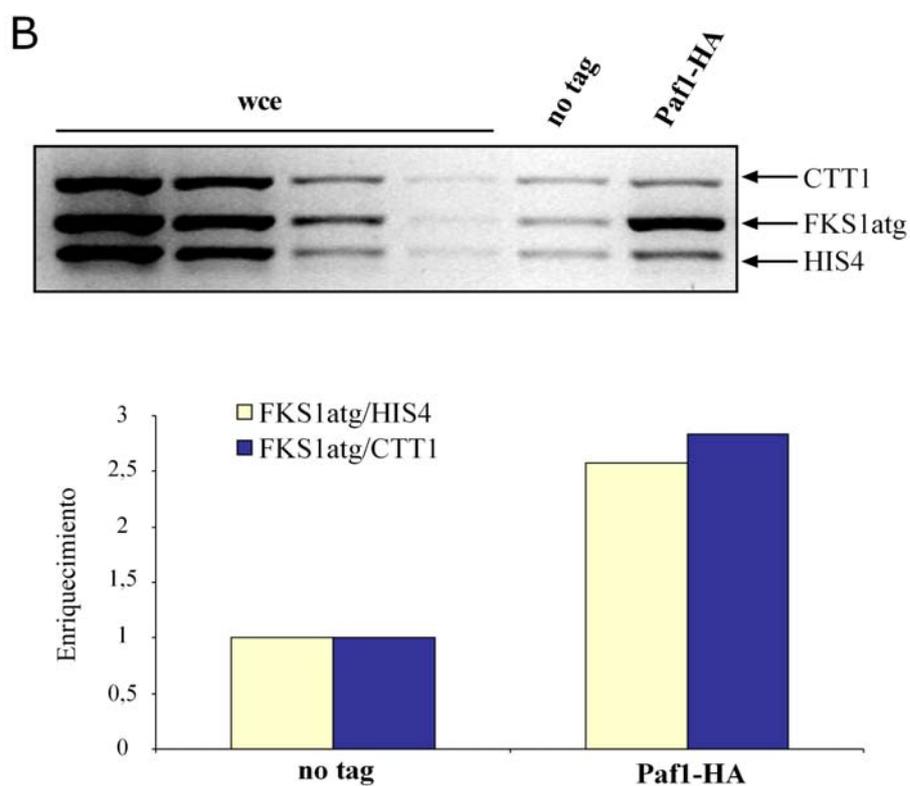


Figura 3.21. Análisis de la unión la proteína Paf1 al gen *FKS1* (continuación)

Paf1 se une al gen *FKS1* de forma independiente de Pkc1, Slt2 y Rlm1

Se ha observado que existe una posible fosforilación de Paf1 dependiente de la ruta PKC, por lo que resultaba interesante investigar si dicha fosforilación afecta a la unión de Paf1 a la zona del ATG del gen *FKS1*. Para ello, se estudió la unión de Paf1 al gen *FKS1* en cepas mutantes

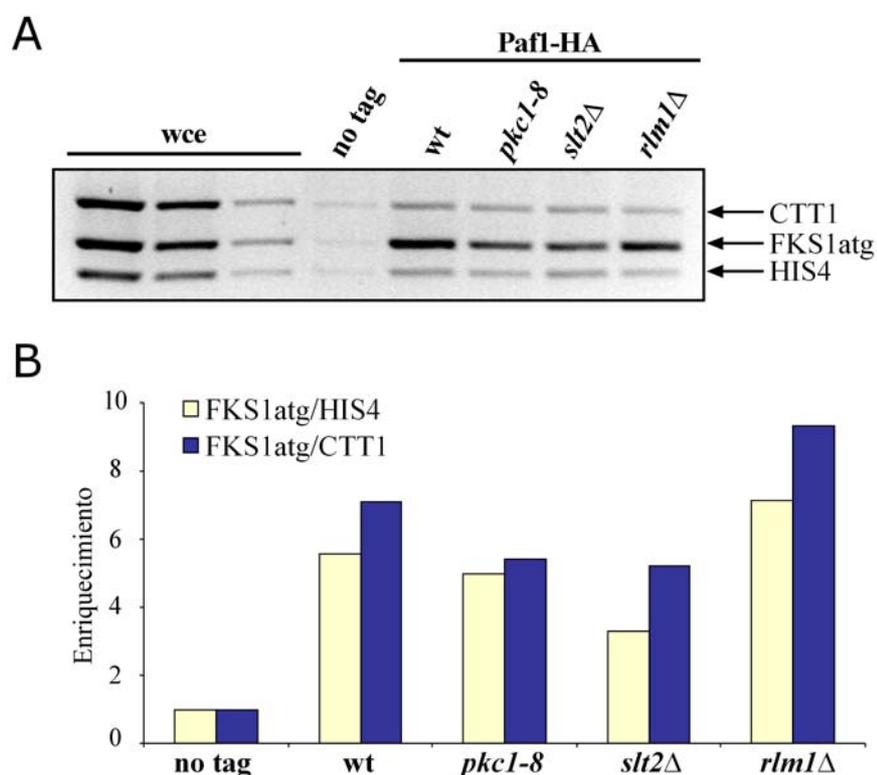
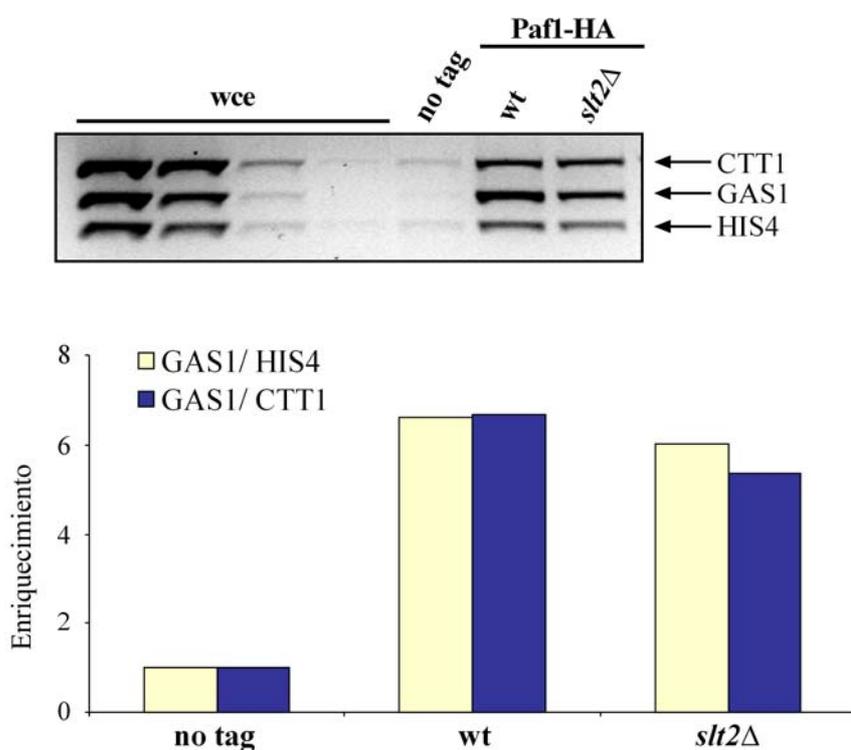


Figura 3.22. Análisis de la unión a la zona del ATG del gen *FKS1* de la proteína Paf1 en mutantes de la ruta PKC. A) Se analizó la asociación de la proteína Paf1 a la zona del ATG del gen *FKS1* en extractos de la cepa salvaje W303-1a (JCY600) y de los mutantes *pkc1-8* (JCY601), *slt2Δ* (JCY603) y *rlm1Δ* (JCY602) que expresan la proteína Paf1 etiquetada con el epítopo HA. Las células se cultivaron a 25°C y se incubaron durante 4 h a 37°C. Se analizó la unión al DNA como se describe en la Figura 3.14. Se muestra una figura representativa de los distintos experimentos realizados. B) Enriquecimiento relativo del fragmento FKS1-atg para cada cepa respecto de la cepa control sin etiquetar.

slt2Δ, *pkc1-8* y *rlm1Δ*. En la Figura 3.22, se muestran los resultados obtenidos en dicho análisis. La señal correspondiente para la banda del gen *FKS1* mostró un claro enriquecimiento respecto a la cepa sin marcar tanto en la cepa salvaje como en los mutantes *slt2Δ*, *pkc1-8* y *rlm1Δ*. Por tanto, la

A



unión de Paf1 a *FKS1* no se ve afectada en mutantes *slt2Δ*, *pkc1-8* ó *rlm1Δ*.

Para determinar si Paf1 pudiera unirse también a otros genes específicos de pared celular regulados por la ruta PKC, se estudió la unión de Paf1 a la zona del ATG de los genes *GAS1* y *MNN1* en la cepa salvaje y en el mutante *slt2Δ*. Se observó una clara unión de Paf1 al ATG del gen *GAS1* (Figura 3.23A) y también, aunque algo más débil, al gen *MNN1* (Figura 3.23B). Dicha unión no se ve afectada en ausencia de la proteína Slt2. Este resultado confirma que la ruta PKC, aunque parece ser responsable del estado de fosforilación de Paf1, no regula su asociación a los promotores de los genes diana.

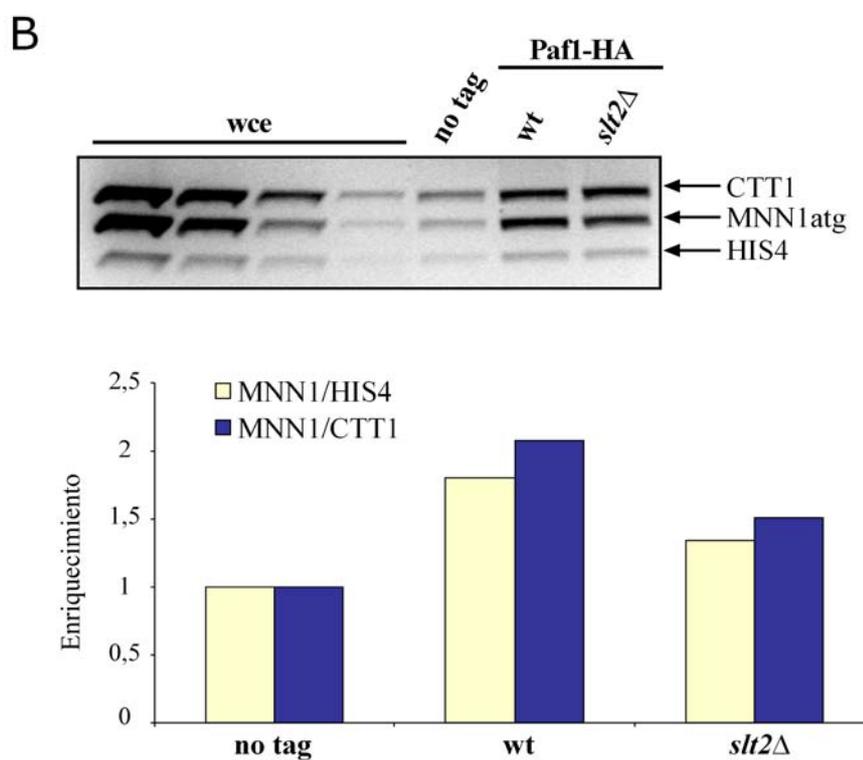


Figura 3.23. Análisis de la unión a la zona del ATG de los genes *GAS1* y *MNN1* de la proteína Paf1 en células salvajes y en el mutante *slt2Δ*. Se analizó la asociación de Paf1 a la región del ATG de los genes *GAS1* (A) y *MNN1* (B) en extractos de las cepas salvaje W303-1a (JCY600) y mutante *slt2Δ* (JCY603) expresando la proteína Paf1 etiquetada con el epítipo HA. Las células se cultivaron a 25°C y se incubaron durante 1 h a 37°C. Se analizó la unión al DNA como se describe en la Figura 3.14. Se muestran figuras representativas de los distintos experimentos realizados.

El desplazamiento de Paf1 a lo largo del gen *FKS1* se ve afectado en ausencia de Pkc1 y Slt2

Diversos estudios han demostrado que el complejo Paf1C posee funciones de elongación de la transcripción (Squazzo *et al.*, 2002; Mueller y Jaehning, 2002; Porter *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2005). Además, la proteína Ccr4 que forma parte del complejo Paf1C, posee actividad poliA deadenilasa y participa en el acortamiento de las colas poliA de los mensajeros (Tucker *et al.*, 2001; Tucker *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2002). Estas observaciones sugieren que Paf1C podría intervenir en la maduración del mRNA.

Con la finalidad de encontrar el punto de regulación por la ruta PKC de la expresión de genes específicos, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina en las cepas previamente analizadas, estudiando la unión de Paf1 al final de la secuencia codificante del gen *FKS1*. El resultado de este experimento desveló que en las cepas donde Pkc1 o Slt2 no ejercen su función, la unión de la proteína Paf1 al final del gen *FKS1* se ve drásticamente reducida (Figura 3.24). Este resultado es diferente del observado al analizar la unión de Paf1 en la zona del ATG, donde Paf1 se asocia fuertemente al DNA tanto en células salvajes como en mutantes de la ruta PKC (ver Figura 3.22). Estos resultados sugieren que un correcto funcionamiento de la ruta PKC es necesario para que Paf1 se desplace a lo largo del gen *FKS1*. Se ha demostrado que el complejo Paf1C posee funciones de elongación de la transcripción (Squazzo *et al.*, 2002; Mueller y Jaehning, 2002; Porter *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que la ruta PKC pudiera controlar la expresión de genes específicos regulando el proceso de elongación y/o terminación de la transcripción a través del complejo Paf1C. Una de las hipótesis más atractivas es que la ruta PKC pudiera regular la función del complejo Paf1C mediante la fosforilación de la proteína Paf1.

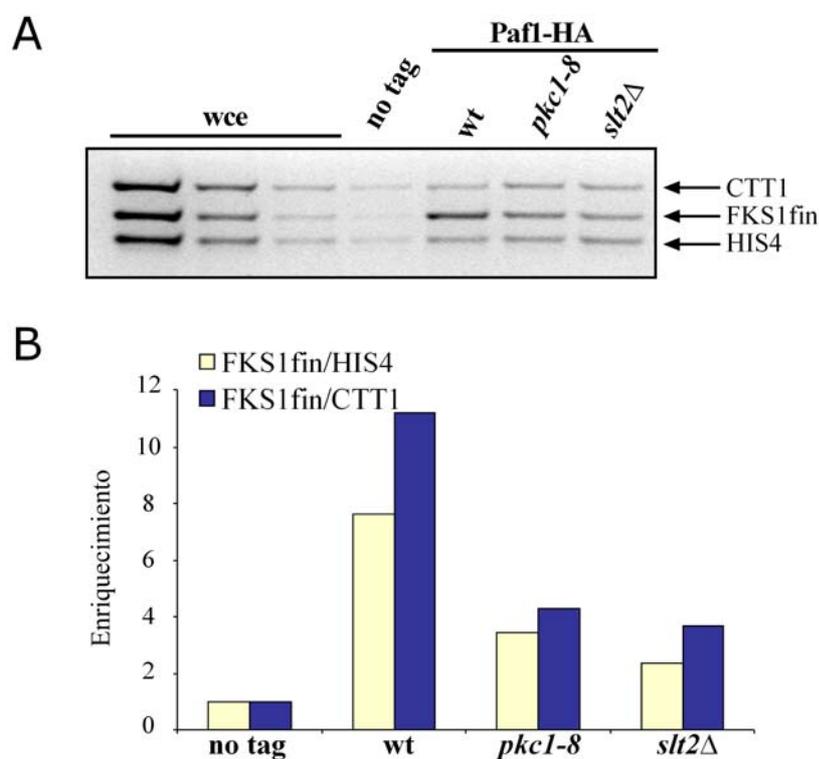


Figura 3.24. Análisis de la unión al final del gen *FKS1* de la proteína PafI en mutantes de la ruta PKC. A) Se analizó la asociación de PafI al final de la zona codificante del gen *FKS1* en extractos de la cepa salvaje W303-1a (JCY600) y de los mutantes *pkc1-8* (JCY601) y *slt2Δ* (JCY603) que expresan la proteína PafI etiquetada con el epítipo HA. Las células se cultivaron a 25°C y se incubaron durante 4 h a 37°C. Se analizó la unión al DNA como se describe en la Figura 3.17. Se muestra una figura representativa de los distintos experimentos realizados. B) Enriquecimiento relativo del fragmento FKS1-final para cada cepa respecto de la cepa control sin etiquetar.

RESUMEN DEL CAPÍTULO

En este capítulo se ha estudiado la regulación de la expresión del gen *FKS1* por la ruta PKC. En un primer lugar, se ha identificado la secuencia en el promotor del gen *FKS1* responsable de la regulación mediada por la ruta PKC, que corresponde con un sitio Rlm1BS-like. Se ha demostrado que la expresión del gen depende de Rlm1, que probablemente se asocie en forma de dímero al promotor. Además se ha descrito un fuerte efecto sinérgico entre SBF y Rlm1 en la regulación de la expresión génica. Anteriormente, se había descrito que Slt2 fosforila a Rlm1 y que esta fosforilación es necesaria para su actividad (Watanabe *et al.*, 1997; Jung *et al.*, 2002). En este estudio hemos comprobado que dicha fosforilación no afecta a los niveles celulares de proteína, a su localización subcelular o a su capacidad de unión al DNA. También, se ha observado que la ruta PKC no parece regular el reclutamiento de la RNA polimerasa II al gen *FKS1*. Por otro lado, se ha detectado una posible modificación por fosforilación de la proteína Paf1 dependiente de la ruta PKC. Dicha modificación no parece afectar a la asociación de Paf1 al promotor del gen *FKS1*. Sin embargo, el hecho de que en mutantes de la ruta PKC la asociación de Paf1 al final del gen *FKS1* se vea seriamente afectada parece indicar que la fosforilación de Paf1 dependiente de la ruta PKC podría afectar a su función. Los resultados obtenidos permiten plantear una hipótesis en que la ruta PKC regule la asociación del complejo Paf1C a la RNA polimerasa II y por tanto la función del complejo en elongación y/o terminación de la transcripción.

En los estudios realizados en esta tesis se ha determinado que la MAP quinasa Slt2 es capaz de asociarse al gen *FKS1*. Por tanto, estas observaciones sugieren que Slt2 actúe *in situ* en el promotor para regular la transcripción génica. Se ha detectado que las proteínas Rlm1, Swi6 y Paf1 se asocian al gen *FKS1*. Estas tres proteínas son fosforiladas por Slt2. Sin

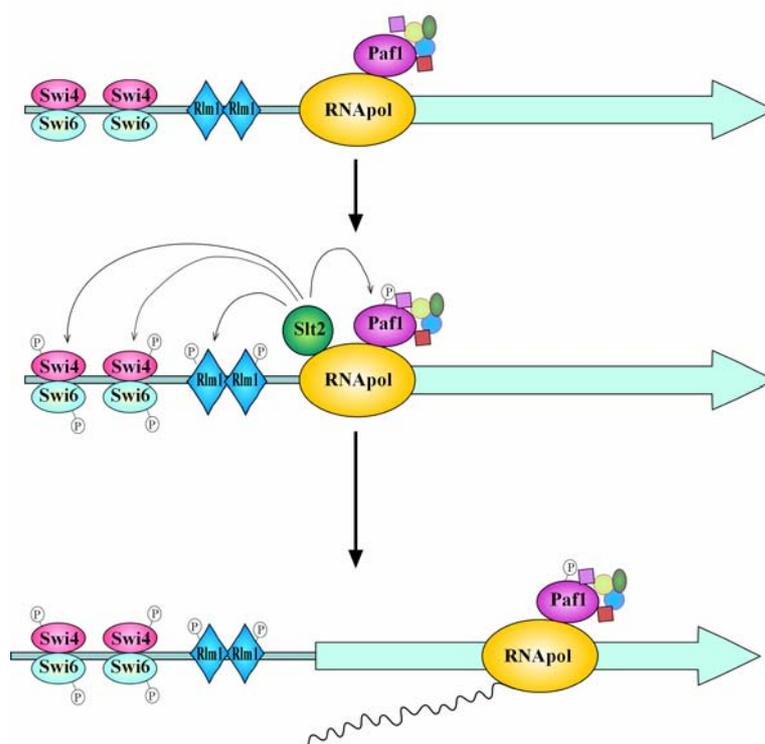


Figura 3.25. Modelo de la regulación de la transcripción por Slt2

embargo, se ha observado que la función de Slt2 no se requiere para la asociación al DNA de Rlm1, Swi6 o Paf1. Una hipótesis atractiva es que Slt2 fosforile *in situ* a estas proteínas para regular su función en la transcripción génica. Los resultados obtenidos plantean una serie de cuestiones todavía por resolver: 1) ¿qué proteína media el reclutamiento de Slt2 al DNA?; 2) ¿Cuál es la función de Slt2 *in situ* en el promotor? ¿Fosforila Slt2 a Rlm1, Swi6 o Paf1 una vez estos se han unido al DNA?; 3)

¿Cuál es la función de la fosforilación de Paf1 dependiente de la ruta PKC?

4) ¿Controla la ruta PKC los procesos de elongación y/o maduración del mensajero? Futuras investigaciones son necesarias para resolver las cuestiones que se han planteado a partir de los resultados obtenidos.

***4. Estudio genómico de la
regulación de la expresión
génica por la ruta PKC***

La función principal de la ruta PKC es el mantenimiento de la integridad celular mediante la regulación de la transcripción de genes específicos de biosíntesis de pared celular (Iguar *et al.*, 1996; Jung y Levin, 1999), pero, como se ha comentado en la introducción, también se ha implicado a la ruta PKC en muchos otros procesos. La ruta PKC se activa durante periodos de crecimiento polarizado (Marini *et al.*, 1996; Zarzov *et al.*, 1996; Gray *et al.*, 1997). Durante este periodo de crecimiento es necesario un aporte continuo de diversos componentes celulares a los sitios de crecimiento. Diversos estudios han sugerido que la ruta PKC puede regular el transporte de dichos componentes mediante vesículas de secreción hacia los puntos de crecimiento (Costigan *et al.*, 1992; Mazzoni *et al.*, 1993; Nanduri y Tartakoff, 2001; Breton *et al.*, 2001). También se ha descrito que la ruta PKC participa en el mecanismo del *checkpoint* de morfogénesis regulando la entrada en mitosis (Mizunuma *et al.*, 1998; Harrison *et al.*, 2001; Mizunuma *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha observado que Pkc1 activa a la CTP sintetasa (Yang y Carman, 1995; Yang *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2003). Además, mutantes en la función Pkc1 presentan frecuencias elevadas de recombinación del DNA (Huang y Symington, 1994; Luo *et al.*, 2002) y nuestro grupo ha caracterizado que la viabilidad de mutantes de la ruta depende de que exista un *checkpoint* de integridad del DNA funcional (Queralt e Iguar, 2005). Estas observaciones sugieren una posible función de Pkc1 en el metabolismo del DNA. Por otra parte, las interacciones genéticas que presentan mutantes de la ruta PKC con genes implicados en el ensamblaje del huso acromático sugieren una implicación de la ruta en este proceso (Khalfan *et al.*, 2000; Hosotani *et al.*, 2001) y de hecho recientemente se ha localizado a Pkc1 en el SPB, lo que sugiere que Pkc1 podría regular el esqueleto de microtúbulos directamente (Denis y Cyert, 2005). También existen estudios que sugieren una participación de la

ruta PKC en el control del metabolismo del carbono (Brandao *et al.*, 2002; Salgado *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2005). Se ha sugerido que Pkc1 podría regular la H⁺-ATPasa de membrana plasmática (Souza *et al.*, 2001). Por tanto, la ruta PKC presenta funciones adicionales en la célula además del conocido mantenimiento de la integridad celular. Al igual que la proteína quinasa C de mamíferos, probablemente Pkc1 desempeñe un papel más general en el control del crecimiento y la proliferación celular.

Con la finalidad de profundizar en las posibles funciones de la ruta PKC, nos planteamos una aproximación genómica mediante la utilización de la tecnología de DNA *arrays* para encontrar nuevos genes cuya expresión dependa del correcto funcionamiento de la ruta PKC. En la actualidad, se están imponiendo cada vez más nuevas técnicas mediante las cuales en lugar de obtenerse información de un único proceso, proteína o gen concreto se obtiene información de la globalidad celular. Entre estas técnicas se encuentran los DNA *arrays*, que nos permiten comprobar con que genes de los dispuestos en el soporte es capaz de hibridar la muestra marcada que se pretende analizar. Esta tecnología resulta muy adecuada en este caso, ya que podemos detectar genes cuya expresión se vea modificada en una cepa de levadura donde Pkc1 no ejerza su función, sin un conocimiento previo de los mismos y sin tener que realizar miles de ensayos de detección de niveles de mRNA (tipo *northern* o RT-PCR).

IDENTIFICACIÓN DE GENES REGULADOS POR Pkc1 MEDIANTE DNA ARRAYS

Se utilizaron los macrochips de DNA disponibles en el Servei Central de Suport a la Investigació Experimental (SCSIE) de la Universitat de València que contienen el genoma completo de *Saccharomyces cerevisiae* distribuido en 6049 ORFs dispuestas sobre una membrana de nylon (Alberola *et al.*, 2004). Para realizar la estimación del nivel transcripcional en cepas salvaje y mutante *pkc1-8*, se partió de 2 cultivos independientes en YPD en fase exponencial de crecimiento para cada cepa, que se transfirieron a 37°C durante 4 h. A partir de las células se obtuvo RNA total que se retrotranscribió a cDNA en presencia de α -³³P-dCTP. En este trabajo se utilizaron dos macrochips (A y B) que se hibridaron con 2 muestras para la cepa salvaje (W1 y W2) y 2 para la cepa mutante (P1 y P2). Se realizaron también réplicas técnicas, es decir se rehibridaron los macrochips (una vez eliminada la muestra anterior) cambiando el orden de hibridación de las muestras provenientes de cada cepa salvaje y mutante. En la Figura 4.1 se muestran dos imágenes obtenidas al hibridar sobre los macrochips de nylon las muestras de cDNA radiactivo obtenidas a partir de RNA total de las cepas salvaje W303-1a y mutante *pkc1-8*.

Una vez obtenidas las imágenes de los macrochips, la intensidad correspondiente a cada una de las ORFs se cuantificó mediante el programa informático de análisis de imagen *Array Vision*TM. En un primer lugar se obtienen las intensidades crudas ARM (*Artifac-removed density*), calculadas como la media de píxeles en cada punto (ORF) en función del área, una vez se han eliminado los artefactos (manchas o motas). Y después se obtienen los valores corregidos sARM (*background corrected ARM density*).

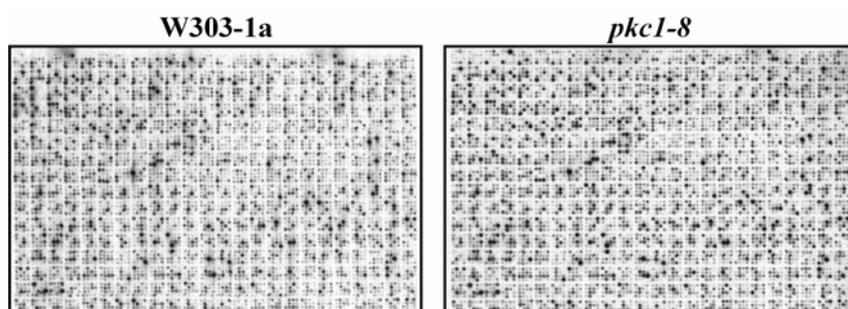


Figura 4.1. Hibridación de cDNA de cepas W303-1a y *pkc1-8* sobre un macrochip de DNA. Las imágenes corresponden a las hibridaciones obtenidas sobre el macrochip A con muestras de cDNA marcado radiactivamente obtenido mediante retrotranscripción de RNA total utilizando un cebador polidT, para las muestras de RNA de W303-1a (muestra W1) y de *pkc1-8* (muestra P1).

El hecho de realizar varias réplicas supone una validación de los resultados obtenidos en el experimento, pero para ello es necesario comprobar que cada una de estas réplicas es repetitiva. Para ello se representaron las intensidades obtenidas en cada réplica para cada ORF unas frente a otras obteniéndose un alto grado de repetitividad. Obteniéndose correlaciones entre 0.85 y 0.95 (Ver Figura 4.2).

Una vez comprobado que las réplicas dentro de cada condición correlacionaban bien entre sí, se procedió al análisis estadístico de los resultados. Para ello se utilizó el programa informático de análisis estadístico *Array StatTM*. La utilización de este tipo de programas estadísticos es imprescindible cuando se manejan tan gran cantidad de datos como los que se obtienen mediante las técnicas de análisis genómico global. Es necesario someter los datos a una normalización entre réplicas y también entre

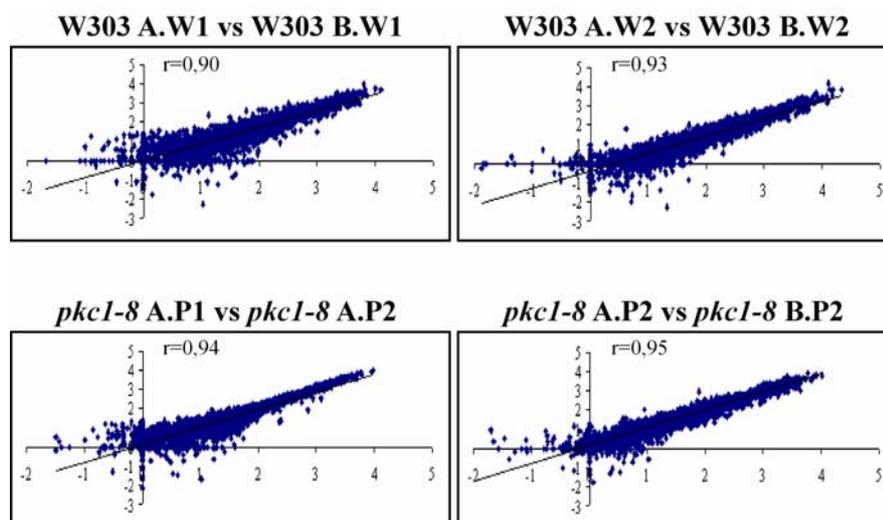


Figura 4.2. Representación de correlación entre transcriptomas obtenidos para cada réplica en las cepas W303-1a y *pkc1-8*. En esta figura se muestran algunas de las representaciones obtenidas con los datos de intensidades obtenidos a partir del análisis de imágenes como las que se muestran en la Figura 4.1, previamente a la realización de normalizaciones de algún tipo. Se indica la cepa de la que proviene el cDNA hibridado (W303-1a o mutante *pkc1-8*) el número de la muestra y sobre qué filtro se hibridó (A o B). Los valores de intensidad para cada ORF en cada cepa para las réplicas comparadas muestran entre ellos una correlación lineal con los valores de r que se indican en la figura.

condiciones (las distintas cepas). La primera normalización necesaria es la que se realiza entre las 4 réplicas de una misma cepa. Se debe conocer que genes generan señales lo suficientemente repetitivas como para ser incluidos en el análisis. El cálculo de las desviaciones típicas de cada réplica permite fijar un límite máximo de desviación para considerar la señal repetitiva. Aquellas señales que superaban este valor máximo de desviación son eliminadas y no consideradas al calcular el valor medio de intensidad para cada gen. El programa informático nos proporciona información sobre los

distintos pasos de normalización que realiza. En la Tabla 4.1 se muestra el listado de ORF obtenido tras el primer paso de normalización, en él se indica la intensidad obtenida para cada una de las réplicas. Cuando alguna de las réplicas ha sido eliminada por tener una desviación típica demasiado alta aparece indicado en la tabla con una X. Cuando la intensidad obtenida en alguna de las réplicas no supera un valor mínimo que permita distinguirla del fondo, no es analizada y aparece marcada en la tabla de datos como n/a .

Tabla 4.1. Normalización entre réplicas de la cepa mutante *pkc1-8* mediante el programa de análisis estadístico *Array Stat*TM.

Posición	ORF	réplica 1	réplica 2	réplica 3	réplica 4
R1 - C1 : 2	YDR525W-A	0,785	-2,189	2,016	-0,612
R1 - C1 : 3	YAL025C	0,771	-1,212	-0,369	0,811
R1 - C1 : 4	YAL022C	0,027	-1,629	1,657	-0,055
R1 - C2 : 1	YGL166W	-0,551	-2,285	1,150	1,685
R1 - C2 : 2	YAL064W	n/a	n/a	n/a	n/a
R1 - C2 : 3	YAL018C	-2,091	n/a	0,524	1,567
R1 - C2 : 4	YAR002W	-1,304	-1,108	1,059	1,352
R1 - C3 : 1	YGL127C	-1,320	-1,361	2,097	0,584
R1 - C3 : 2	YAL014C	0,156	-0,392	0,402	-0,166
R1 - C3 : 3	YBL030C	-1,431	-0,807	2,031	0,208
R1 - C3 : 4	YBR020W	n/a	n/a	n/a	n/a
R1 - C4 : 1	YGL121C	-1,511	-0,324	-0,373	2,209
R1 - C4 : 2	YAL008W	-1,730	-1,067	0,726	2,071
R1 - C4 : 3	YBL027W	-0,729	-1,534	1,663	0,600
R1 - C4 : 4	YBR028C	X	-1,435	-0,396	1,831

Se muestran los valores de intensidad obtenidos para cada réplica, tras el primer paso de normalización. En la primera columna se indica la posición de la ORF en el macrochip (fila-columna: punto).

X: el valor de intensidad para esta ORF en esta réplica ha sido descartado para el análisis posterior por tener una desviación típica demasiado alta.

n/a: el valor de intensidad para esta ORF en esta réplica no ha sido determinado por no superar el valor del fondo.

Una vez se ha normalizado entre réplicas, seleccionando así aquellos puntos que serán utilizados en el análisis, se procede a la normalización entre condiciones, es decir entre cada cepa. El programa informático dispone de varios tipos de normalización estadística. En este caso y en general en los experimentos de DNA *arrays* en que existen réplicas interdependientes con dos condiciones, se escogió la normalización por la mediana de manera iterativa y el cálculo de errores se llevó a cabo mediante la utilización del test estadístico FDR (*False Discovery Rate*). La normalización por la mediana resulta mucho menos afectada por la presencia de genes que tengan gran variación en su expresión entre dos condiciones y que pueden introducir desviación en el factor de normalización. Por otro lado, el cálculo iterativo permite eliminar sucesivamente el 2% de los genes diferenciales más extremos mejorando este tipo de normalización por la mediana. En este tipo de análisis estadístico es muy importante eliminar los falsos positivos, para ello se calculó la tasa de aparición de falsos positivos que genera el valor p. Habitualmente se considera un valor p estadístico igual a 0.05, esto indica que la probabilidad de que una determinada señal sea un falso positivo es del 5%. En cálculos estadísticos de experimentos individuales se determina un valor p para cada señal, sin embargo en el caso de los DNA *arrays*, donde en un único experimento se analizan miles de señales, este valor p se ve afectado por el número total de ORF's estudiadas. Esto provoca que el valor p en este tipo de análisis sea mucho más pequeño, llegando a valores de 10^{-4} , otorgando por tanto mayor validez estadística a los ensayos. El test estadístico FDR posibilita el cálculo del valor p, y clasifica los datos obtenidos como significativos si su valor p se ajusta al fijado previamente. Este test es adecuado para los experimentos de DNA *arrays* ya que permite reconocer un mayor número de diferencias reales entre los datos analizados. El programa estadístico nos permite de nuevo seguir los cálculos realizados mediante la presentación en las tablas de distintos valores estadísticos que representan la validez de los datos estudiados (Tabla 4.2). Que determinadas

ORF sean o no significativas no indica únicamente que los datos sean repetitivos sino que el programa ha interpretado que las intensidades son significativamente diferentes entre ambas condiciones. Por ello la mayoría de las ORF's no son significativamente diferentes. En un experimento de este tipo cabe esperar que los genes que se vean afectados por la mutación en *PKC1* no representen un gran número, ya que esta proteína afecta únicamente a algunos procesos celulares. Por tanto, la gran mayoría de los genes tendrán señales de intensidad muy similares en ambas cepas. Por ello cabe esperar que en una representación de logaritmos de las intensidades medias obtenidas para cada ORF de una cepa frente a las de la otra, los puntos se alineen en una recta que pasa por la bisectriz de la representación. Este es el caso, tal como se observa en la Figura 4.3.

Tabla 4.2. Normalización entre condiciones mediante el programa de análisis estadístico *Array Stat*TM. Se muestra la tabla de datos obtenida, tras el segundo paso de normalización entre condiciones. Se indica el logaritmo de la media de intensidades de cada ORF para cada cepa (Media Log P: para la cepa *pkc1-8*; Media Log W: para la cepa salvaje)

SD: la desviación típica de cada media calculada.

n: el número de réplicas consideradas en el cálculo de la media (intensidades dentro del rango de la desviación típica).

Diferencia: (Media LogP)- (Media LogW) = Log ratio P/W.

Signif: Indica la significatividad de los datos obtenidos para cada ORF.

no: los datos no superaron el test estadístico.

n/a: los datos no fueron analizados.

yes: ha sido considerada significativa en el análisis

Posición	ORF	Media Log P	SD	n	Media Log W	SD	n	Diferen	Error Estad	valor p	Signif
R1 - C1 : 2	YDR525W-A	1,398	0,129	4	1,041	0,266	4	0,357	0,148	0,01581	no
R1 - C1 : 3	YAL025C	1,654	0,117	4	1,520	0,205	4	0,134	0,118	0,25676	no
R1 - C1 : 4	YAL022C	0,899	0,195	4	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
R1 - C2 : 1	YGL166W	1,247	0,141	4	0,863	0,303	4	0,383	0,167	0,02166	no
R1 - C2 : 2	YAL064W	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
R1 - C2 : 3	YAL018C	0,086	0,406	3	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
R1 - C2 : 4	YAR002W	0,663	0,250	4	0,750	0,329	3	-0,087	0,227	0,70166	no
R1 - C3 : 1	YGL127C	1,390	0,130	4	1,333	0,223	3	0,057	0,144	0,69401	no
R1 - C3 : 2	YAL014C	1,593	0,119	4	1,622	0,198	3	-0,029	0,129	0,81939	no
R1 - C3 : 3	YBL030C	2,303	0,113	4	2,400	0,178	3	-0,097	0,117	0,40972	no
R1 - C3 : 4	YBR020W	n/a	n/a	n/a	1,214	0,238	3	n/a	n/a	n/a	n/a
R1 - C4 : 1	YGL121C	1,514	0,123	4	1,658	0,196	4	-0,144	0,116	0,21303	no
R1 - C4 : 2	YAL008W	1,828	0,115	4	1,913	0,188	4	-0,086	0,110	0,43784	no
R1 - C4 : 3	YBL027W	3,574	0,124	4	3,389	0,172	4	0,185	0,106	0,08015	no
R1 - C4 : 4	YBR028C	1,717	0,116	3	1,140	0,249	3	0,577	0,159	0,00028	yes

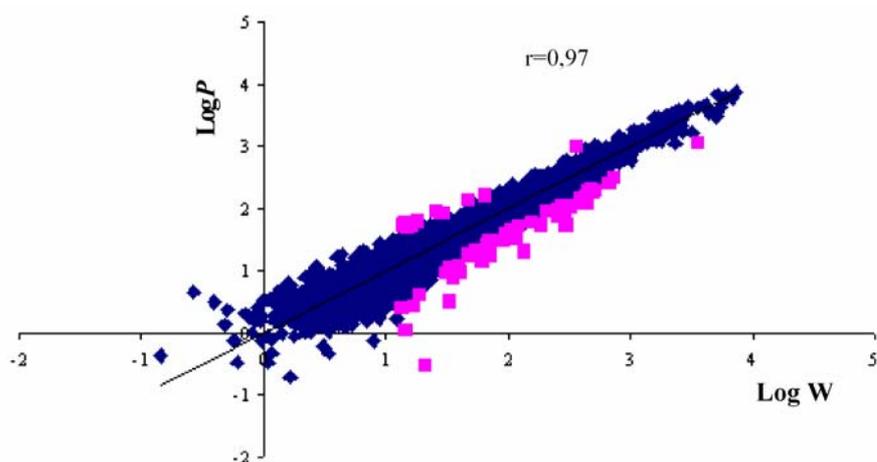


Figura 4.3. Representación logarítmica de intensidades medias de la cepa mutante *pkc1-8* frente a la cepa salvaje W303-1a. En esta figura se han representado los datos de intensidades medias obtenidas una vez se han realizado todas las normalizaciones pertinentes. Los valores de intensidad para cada ORF en cada cepa se alinean en una recta que pasa por la bisectriz de la representación. Los distintos puntos muestran entre ellos una correlación lineal con el valor de r que se indica en la Figura. Los valores que fueron considerados significativos se muestran en rosa.

Las intensidades correspondientes a cada ORF se ajustan perfectamente a una recta con un alto coeficiente de correlación $R=0.97$. Únicamente las ORF's significativamente diferentes entre las dos cepas (marcadas en rosa) se alejan de la recta.

Los experimentos de DNA *arrays* permiten la utilización de diferentes programas estadísticos de análisis que nos proporcionan distintas posibilidades de normalización. La representación MA (*MA plot*) de los datos es una herramienta útil para comprobar si los pasos de normalización que se han llevado a cabo en el análisis son los adecuados, así como en la

identificación de artefactos. Permite también comprobar la existencia de errores debidos a que existan desviaciones dependientes de la intensidad. Esta representación fue propuesta por primera vez en 2002 en el grupo del Dr. Speed (Dudoit *et al.*, 2002). La Figura 4.4A muestra dicha representación realizada con los datos previamente a su normalización. La nube de puntos no se dispone homogéneamente alrededor del eje de abscisas sino que adopta una forma cóncava donde la mayoría de los puntos se sitúan en valores negativos de Y. Esto significa que la intensidad de las señales no es igual de fuerte para ambas condiciones, siendo necesaria la normalización. Además los valores extremos no son tenidos en cuenta en el análisis, también son eliminados aquellos que se sitúan sobre el eje de

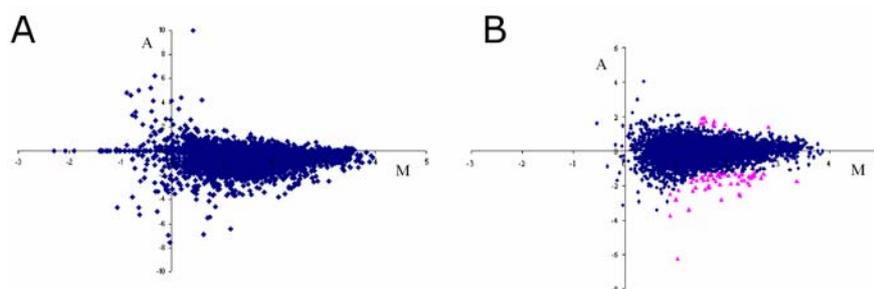


Figura 4.4. Representación de *MA plot* de los valores de intensidad obtenidos.

A partir de los valores de intensidad medios para cada ORF en cada cepa, previos a la normalización de los datos (A) o posteriormente a la normalización (B), donde W: intensidad media ORF en la cepa W303 y P: intensidad media ORF en la cepa *pkc1-8*. Posteriormente, se calcularon las funciones M y A, que se representaron respectivamente en los ejes de abscisas y ordenadas:

$$M = \text{Log}_{10} \left[\frac{P+W}{2} \right] ; \quad A = \text{Log}_2 \left[\frac{P}{W} \right]$$

Los valores que fueron considerados significativos se muestran en rosa y en azul los no significativos.

abcisas y que significan que la relación de intensidades es 0. Sin embargo, si realizamos la misma representación una vez los datos han sido normalizados (Figura 4.4B), la distribución de la nube de puntos ha cambiado notablemente distribuyéndose alrededor del eje de abcisas y con una forma más homogénea. Las ORF's consideradas estadísticamente significativas (marcadas en rosa), se sitúan centradas en la nube de puntos. Esto es debido a que el peso estadístico de las ORF's con intensidades demasiado bajas es menor, debido al error intrínseco en la detección que conllevan.

Una vez realizadas todas las normalizaciones pertinentes y comprobado con las herramientas disponibles que los cálculos estadísticos han sido los adecuados, obtenemos un listado de genes cuya expresión en el mutante *pkc1-8* es significativamente mayor o menor respecto a la cepa salvaje W303-1a. Se obtuvieron 54 genes cuya expresión en el mutante *pkc1-8* era menor al menos en 2.4 veces que en la cepa salvaje (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Genes reprimidos en mutante *pkc1-8*

ORF	Nombre	<i>pkc1-8</i>	n	W303	n	Ratio
YOR203W		0,28	4	21,19	4	0,01
YDL234C	GYP7	1,12	4	14,65	3	0,08
YDR516C	EMI2	3,18	4	33,08	4	0,10
YMR042W	ARG80	2,54	4	17,24	3	0,15
YKR039W	GAP1	20,29	4	136,65	3	0,15
YKL163W	PIR3	52,89	4	308,57	3	0,17
YCL030C	HIS4	52,77	4	294,01	4	0,18
YOR287C		2,46	4	13,43	4	0,18
YGR229C	SMI1	7,30	3	36,00	4	0,20
YDL115C	IWR1	4,03	4	18,69	4	0,22
YNL051W	COG5	13,37	4	61,50	4	0,22
YHR136C	SPL2	9,52	4	40,40	4	0,24
YKL131W	-	17,09	4	72,32	3	0,24
YDR055W	PST1	18,12	4	71,85	4	0,25
YKL164C	PIR1	114,26	4	445,33	3	0,26
YKR091W	SRL3	31,18	4	117,08	4	0,27
YMR316W	DIA1	71,12	4	258,64	3	0,27
YLR359W	ADE13	52,61	4	187,83	4	0,28

Tabla 4.3. Genes reprimidos en mutante *pkc1-8* (continuación)

ORF	Nombre	<i>pkc1-8</i>	n	W303	n	Ratio
YGL055W	OLE1	114,45	4	404,89	3	0,28
YPR194C	OPT2	9,02	4	31,07	4	0,29
YML123C	PHO84	28,39	4	93,23	4	0,30
YAL005C	SSA1	1103,97	3	3609,59	3	0,31
YGR061C	ADE6	91,75	4	296,40	4	0,31
YFL021W	GAT1	12,41	4	39,74	4	0,31
YNL160W	YGP1	103,52	4	330,68	4	0,31
YAL039C	CYC3	16,52	4	52,52	4	0,31
YAR071W	PHO11	20,66	4	62,57	4	0,33
YOR128C	ADE2	11,11	4	33,04	4	0,34
YIL162W	SUC2	28,14	4	83,14	4	0,34
YKL100C	-	17,43	4	51,35	3	0,34
YCR021C	HSP30	16,89	4	48,90	3	0,35
YAR015W	ADE1	151,87	4	431,93	4	0,35
YBR093C	PHO5	241,42	4	679,77	4	0,36
YBL005W	PDR3	16,99	4	47,36	4	0,36
YBL042C	FUI1	39,88	4	110,36	4	0,36
YER043C	SAH1	144,84	4	397,55	3	0,36
YLR198C	-	93,17	4	255,60	3	0,36
YLR194C	-	182,04	4	496,46	4	0,37
YJL189W	RPL39	189,48	4	505,52	3	0,37
YIL108W	-	24,76	4	65,98	4	0,38
YHR030C	SLT2	36,61	4	97,46	4	0,38
YHR094C	HXT1	58,82	4	156,14	4	0,38
YHR215W	PHO12	109,10	4	279,28	4	0,39
YPL118W	MRP51	21,34	4	54,56	4	0,39
YHR092C	HXT4	179,70	4	452,81	4	0,40
YOR375C	GDH1	112,30	4	280,45	4	0,40
YGR146C	-	42,36	4	105,57	4	0,40
YPL088W	-	27,99	4	69,51	4	0,40
YDR077W	SED1	303,33	4	745,48	4	0,41
YDL039C	PRM7	50,79	4	124,49	4	0,41
YAL040C	CLN3	39,57	4	96,00	4	0,41
YBR023C	CHS3	39,44	4	95,21	4	0,41
YAL053W	-	87,23	4	208,75	4	0,42
YEL077C	-	206,16	4	486,93	4	0,42

Se muestran aquellos genes que resultaron significativa y estadísticamente reprimidos en más de 2.5 veces (ratio P/W<0.4) en la cepa mutante *pkc1-8*, respecto de la cepa salvaje. En la tabla se indica la denominación sistemática del gen, su nombre, el valor de intensidad medio para cada cepa, el número de repeticiones que se han considerado para realizar el cálculo del valor medio, y el relación entre la intensidad media de cada cepa (ratio: valor medio ORF *pkc1-8*/ valor medio ORF wt).

También se determinaron como significativos 11 genes sobreexpresados en el mutante *pkc1-8* al menos en 2.4 veces más que en la cepa salvaje (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Genes sobreexpresados en mutante *pkc1-8*

ORF	Nombre	<i>pkc1-8</i>	n	W303	n	Ratio
YPL278C		56,34	4	14,65	4	3,85
YBR028C		52,06	3	13,80	3	3,77
YIL011W	TIR3	86,95	4	26,01	4	3,34
YLL056C		59,99	4	18,38	4	3,26
YPR002W	PDH1	52,21	4	16,51	4	3,16
YMR189W	GCV2	46,39	4	15,16	4	3,06
YGR188C	BUB1	138,28	4	47,33	4	2,92
YOR389W		81,95	4	28,22	4	2,90
YGR204W	ADE3	83,53	4	30,00	4	2,78
YPR149W	NCE102	958,18	4	361,28	4	2,65
YNL079C	TPM1	158,07	4	65,29	4	2,42

Se muestran aquellos genes que resultaron significativa y estadísticamente sobreexpresados en más de 2.4 veces (ratio *pkc1-8*/wt<0.4) en la cepa mutante *pkc1-8*, respecto de la cepa salvaje.

La utilización de un programa informático para realizar el análisis de los resultados, es muy necesario en estudios genómicos en los que se manejan gran número de datos. Aunque también puede presentar algunos problemas. Es conocido que las variaciones en la expresión de la mayoría de genes regulados por la ruta PKC en respuesta a daños en la pared no suele presentar cambios muy elevados, oscilando entre 1.5 y 2.5 veces (Igal *et al.*, 1996; Madden *et al.*, 1997; Jung y Levin, 1999; Baetz *et al.*, 2001; Boorsma *et al.*, 2004). Sin embargo, el análisis de nuestros datos extrajo

como significativos aquellas ORF que presentaban una variación en al menos 2.4 veces respecto a la cepa salvaje. Este punto de corte ha dado lugar a la eliminación de algunos genes que previamente habían sido identificados como regulados por la ruta PKC, como por ejemplo *RLMI* cuyo ratio *pkc1/wt* es de 0.51 ó *BGL2* con un ratio de 0.45, siendo en ambos casos repetitivas las réplicas no han sido considerados significativos en el análisis. Por tanto, aunque es posible que algunos genes no hayan sido detectados, cabe destacar la elevada exigencia en el análisis realizado lo que aumenta la significancia estadística de los genes que han sido detectados.

CLASIFICACIÓN FUNCIONAL DE LOS GENES IDENTIFICADOS

Una interpretación biológica de los resultados obtenidos es necesaria para situar exactamente en qué procesos celulares toma parte *Pkc1*. La forma más comúnmente utilizada para la presentación de los genes regulados obtenidos en un experimento de DNA *arrays* es la clasificación de los mismos en función de su ontología (del griego *onto* –ser y *logos* –estudio). La ontología de un gen nos dice *qué es* o más exactamente *a qué grupo* de genes pertenece, en función del tipo de clasificación utilizada. La ontología de un gen es un vocabulario específico y asumido por la comunidad científica, usado para describir la biología del producto de un gen en cualquier organismo. Existen tres conjuntos independientes de vocabularios u ontologías que describen: la función molecular, el proceso biológico en que participa el gen y el componente celular donde el producto génico puede encontrarse. Existen diferentes programas informáticos que nos permiten clasificar los genes obtenidos en nuestro análisis por su ontología. Como el programa *FatiGO* del Instituto CNIO en Madrid o el *GO Term Finder* de la base de datos del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* entre otros.

La clasificación del listado de genes obtenidos a partir del experimento de DNA *arrays* llevado a cabo en esta tesis se realizó basándose en el programa *GO Term Finder* (<http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder>). En la tabla 4.5 se muestran los resultados obtenidos para los genes que se transcriben menos en el mutante *pkc1-8* que en la cepa salvaje.

Hasta la fecha se han publicado al menos 8 artículos donde se ha estudiado a nivel genómico la expresión de genes en relación con la ruta PKC o la respuesta celular a daños producidos en la pared celular. En uno de los estudios publicados se analizó la expresión génica de una cepa portando una forma activa de Pkc1 (*PKC1-R398A*) (Roberts *et al.*, 2000). En otra publicación, se estudió el perfil de expresión en un mutante *rho1* (Hughes *et al.*, 2000). También se ha analizado la expresión génica de mutantes *slt2Δ* y *bck1Δ* (Baetz *et al.*, 2001). Además, en el grupo del Dr. Arroyo, estudiaron la respuesta celular a la presencia de Congo Red y Zimoliasa (Garcia *et al.*, 2004). Los estudios arriba comentados detectaron un número muy elevado de genes regulados en las condiciones ensayadas en cada uno. Por lo tanto, aunque muchos de los genes que resultaron significativos en nuestro análisis también fueron detectados en estos estudios, resulta más apropiado comparar nuestros datos con otros estudios publicados en los que el número de genes encontrados es más similar al nuestro. Dichos estudios incluyen: el estudio de la expresión génica en una cepa que expresa una forma activa de Mkk1 (*MKK1-S386P*), que detectó 26 genes regulados (Jung y Levin, 1999); el artículo donde se estudió el daño en la pared celular causado por la delección del gen *FKS1*, donde se identificaron 22 genes regulados (Terashima *et al.*, 2000); otro estudio analizó la expresión génica en cepas mutantes en genes de pared celular (*kre6Δ*, *gas1Δ*, *mnn1Δ* y *smi1Δ*), con la identificación de 80 genes regulados (Lagorce *et al.*, 2002) y el análisis de la expresión génica en presencia de CWF (blanco de calcofluor) y Zimoliasa, en el que obtuvieron 51 genes regulados (Boorsma *et al.*, 2004).

Tabla 4.5. Clasificación funcional de los genes reprimidos en el mutante *pkc1-8*

<i>Organización y biogénesis de la pared celular</i>		†
<i>SLT2</i>	MAP quinasa de la ruta de integridad celular	1,2,3,4
<i>CHS3</i>	quitina sintasa III	1,2,3
<i>SEDI</i>	componente estructural de la pared celular (proteína GPI)	1,3,4
<i>PIR1</i>	componente estructural de la pared celular (proteína o-glicosilada)	1,4
<i>PIR3</i>	componente estructural de la pared celular (proteína o-glicosilada)	1,3,4
<i>PST1</i>	componente de la pared celular (posible proteína GPI)	1,2,4
<i>SMI1</i>	implicada en regulación de la síntesis de pared celular	-
<i>YGP1</i>	componente de la pared celular (glicoproteína)	1,3
<i>YAL053w</i>	posible función en biosíntesis de β -glucano	2,3,4
<i>YLR194c</i>	componente de la pared celular	1,2,3,4
<i>Metabolismo de nucleótidos</i>		
<i>ADE1</i>	enzima de la ruta de biosíntesis de nucleótidos de purinas	2
<i>ADE2</i>	enzima de la ruta de biosíntesis de nucleótidos de purinas	-
<i>ADE6</i>	enzima de la ruta de biosíntesis de nucleótidos de purinas	-
<i>ADE13</i>	enzima de la ruta de biosíntesis de nucleótidos de purinas	-
<i>FUI1</i>	permeasa de uridina de alta afinidad	-
<i>Metabolismo de fosfato</i>		
<i>PHO5</i>	fosfatasa ácida inducida en respuesta a limitación de fosfato	3
<i>PHO11</i>	fosfatasa ácida inducida en respuesta a limitación de fosfato	-
<i>PHO12</i>	fosfatasa ácida inducida en respuesta a limitación de fosfato	-
<i>PHO84</i>	transportador de fosfato inorgánico de alta afinidad	-
<i>SPL2</i>	homólogo a PHO81, expresión inducida en respuesta a limitación de fosfato	-
<i>Metabolismo de carbono</i>		
<i>SUC2</i>	Invertasa, hidrólisis de sacarosa	-
<i>HXT1</i>	transportador de glucosa de baja afinidad	-
<i>HXT4</i>	transportador de glucosa de alta afinidad	-

<i>Metabolismo de aminoácidos</i>		
<i>GAP1</i>	permeasa general de aminoácidos	-
<i>GDH1</i>	biosíntesis de glutamato (glutamato deshidrogenasa)	-
<i>SAH1</i>	metabolismo de metionina (S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa)	-
<i>HIS4</i>	biosíntesis de histidina (enzima multifuncional)	-
<i>ARG80</i>	factor de transcripción de genes implicados en metabolismo de arginina	-
<i>OPT2</i>	transportador de oligopéptidos	-
<i>Biosíntesis de proteínas</i>		
<i>RPL39</i>	proteína ribosomal de la subunidad 60S	-
<i>MRP51</i>	proteína ribosomal mitocondrial; biosíntesis de Proteínas	-
<i>YOR287C</i>	procesamiento del pre-rRNA 20S	-
<i>Transporte mediado por vesículas</i>		
<i>GYP7</i>	GAP de la familia de Rab-GTPasas. Implicada en tráfico de vesículas	3
<i>COG5</i>	fusión de vesículas de transporte con el aparato de Golgi	-
<i>Ciclo celular y diferenciación</i>		
<i>CLN3</i>	ciclina de fase G1	4
<i>EMI2</i>	requerido en esporulación	-
<i>PRM7</i>	conjugación y fusión celular	3
<i>DIA1</i>	implicada en crecimiento pseudohifal	-
<i>SRL3</i>	relacionada con el <i>checkpoint</i> de integridad del DNA	3,4

<i>Otras funciones</i>		
<i>GATI</i>	factor de transcripción de genes reprimidos por nitrógeno	-
<i>PDR3</i>	factor de transcripción de la respuesta a multidrogas	-
<i>OLE1</i>	metabolismo de lípidos; desaturación de ácidos grasos	-
<i>CYC3</i>	citocromo c hemo-liasa	-
<i>HSP30</i>	respuesta a estrés	-
<i>SSA1</i>	plegamiento de proteínas	-
<i>Función desconocida</i>		
<i>IWR1</i>		-
<i>YEL077c</i>		-
<i>YIL108w</i>		-
<i>YGR146c</i>		-
<i>YKL100c</i>		-
<i>YKL131w</i>		-
<i>YLR198c</i>		-
<i>YPL088w</i>		3,4
<i>YOR203w</i>		-

† Los números indican que la ORF se detectó en los estudios: descritos en Jung *et al* 1999 (1), Terashima *et al*, 2000 (2), Lagorce *et al*, 2003 (3) y Boorsma *et al*, 2004 (4).

En la tabla 4.6 se muestra una clasificación funcional de los resultados obtenidos para aquellos genes en los que se produjo una inducción de la expresión en el mutante *pkc1-8* mayor que en la cepa salvaje.

Tabla 4.6. Clasificación funcional de los genes sobreexpresados en el mutante *pkc1-8* respecto la cepa salvaje W303-1a.

<i>Organización y biogénesis de la pared celular</i>	
<i>TIR3</i>	componente de la pared celular (glicoproteína)
<i>TPM1</i>	tropomiosina; citoesqueleto de actina
<i>Metabolismo de aminoácidos y nucleótidos</i>	
<i>GCV2</i>	enzima de la ruta de catabolismo de glicina
<i>ADE3</i>	enzima de la ruta de catabolismo de glicina y de fermentación de purinas
<i>Transporte mediado por vesículas</i>	
<i>NCE102</i>	secreción de proteínas
<i>YPL278c</i>	interacciona con COG4 transporte de vesículas
<i>Ciclo celular y diferenciación</i>	
<i>BUB1</i>	control del ciclo celular, <i>checkpoint</i> del huso acromático
<i>Función desconocida</i>	
<i>PDH1</i>	
<i>YBR028c</i>	
<i>YLL056c</i>	
<i>YOR389w</i>	

DISCUSIÓN

Se analizaron los genes que aparecen reprimidos en nuestro análisis, utilizando como criterio de clasificación el proceso biológico en que participan sus productos proteicos, mediante el programa *GO Term Finder*. Dicho análisis indicó que existen dos grandes grupos de genes que aparecen

significativamente sobrerrepresentados respecto a la proporción del genoma de levadura:

· *Genes de organización y biogénesis de la pared celular.* Con un valor p de $8.21 \cdot 10^{-8}$. Aparecen 10 genes del total de 54, lo que supone un 18.5% del total frente a la proporción en el genoma del 1.9%. Esta categoría se ha visto enriquecida en nuestro análisis en más de 9 veces respecto al genoma de levadura. Debido a que esta categoría es también la mayoritaria en otros estudios, comprobamos cuantos de estos genes detectados por nosotros aparecen en otros análisis. Obtuvimos que: 8 genes se encontraron también en el artículo de Jung *et al.*, 1999, 5 de los genes aparecen en el estudio de Terashima *et al.*, 2000, 7 genes también se detectaron en el estudio de Lagorce *et al.*, 2003 y 7 de estos genes aparecen en el estudio de Boorsma *et al.*, 2004. La reproducibilidad de nuestros resultados con los datos obtenidos por otros grupos en estudios similares, refuerza enormemente la fiabilidad de nuestro análisis. Cabe destacar que el único gen que no apareció en los artículos comparados con nuestro análisis es el gen *SMI1/KNR4*. Este gen resulta especialmente interesante ya que aunque su función es todavía desconocida podría estar involucrado en la coordinación entre la integridad de la pared con la progresión en el ciclo celular (Martin-Yken *et al.*, 2002). Además, se ha descrito que Smi1 interacciona con Slt2 (Martin-Yken *et al.*, 2003) y Bck2 (Martin-Yken *et al.*, 2002). Además de los 10 genes agrupados en esta categoría, es necesario comentar que nuestro análisis también identificó el gen *SSA1*. La chaperona Ssa1 participa en el plegamiento de proteínas en el citosol, pero también se ha localizado en la pared celular y se ha sugerido que su función podría estar implicada en la biosíntesis de la pared celular (Lopez-Ribot y Chaffin, 1996).

Por otro lado, hay que resaltar también que entre los genes inducidos en el mutante *pkc1-8* se identificaron otros 2 genes relacionados con pared celular y morfogénesis. Uno de ellos es el gen *TPM1*, que codifica para la

isoforma mayoritaria de la tropomiosina (Liu y Bretscher, 1989). La tropomiosina es necesaria para el correcto funcionamiento de los filamentos de actina (Karpova *et al.*, 2000). Es conocido que la ruta PKC controla la polarización del citoesqueleto de actina (Zarzov *et al.*, 1996; Schmidt y Hall, 1998); nuestro resultado sugiere que uno de los mecanismos de actuación podría implicar la regulación transcripcional del gen *TPM1*.

· *Genes de biosíntesis de nucleótidos de purina.* Con un valor p de $2.7 \cdot 10^{-4}$. Aparecen 4 genes del total de 54, lo que supone un 7.4% frente a la proporción en el genoma del 0.5%. Esta categoría se ha visto enriquecida en nuestro análisis en más de 14 veces respecto al genoma de levadura. El grupo al que pertenecen estos genes no aparece en los estudios con los que hemos comparado nuestros resultados. Cabe destacar que entre los genes inducidos hemos detectado el gen *ADE3*. Mientras *ADE1*, *ADE2*, *ADE6* y *ADE13* participan en la biosíntesis de nucleótidos de purinas, *ADE3* participa en el catabolismo de purinas. Por tanto, estos resultados sugieren que PKC podría jugar un papel positivo en el control del metabolismo de nucleótidos, en particular en la biosíntesis de nucleótidos de purinas. Además de los genes *ADE* reseñados, también se ha identificado el gen *FU11*, que codifica el transportador de alta afinidad de uridina, y el gen *HIS4* que interviene en la superruta de biosíntesis de histina y purinas y pirimidinas. Es interesante señalar que anteriormente se había descrito que Pkc1 activa por fosforilación a la CTP sintasa, implicada en la síntesis de nucleótidos de pirimidinas (Yang y Carman, 1995; Yang *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2003). Nuestros resultados indican que la ruta PKC pudiera controlar la ruta de síntesis de nucleótidos a otro nivel, regulando la transcripción al menos de genes implicados en la biosíntesis de nucleótidos de purinas.

Además de las dos categorías de genes comentadas, entre los grupos de genes con expresión reducida en el mutante *pkc1-8*, aparecen tres genes implicados en el metabolismo del carbono: *HXT1*, *HXT4* y *SUC2*. El hecho de que se hubiera descrito previamente que la expresión de los genes *HXT1*,

HXT4 y *SUC2*, entre otros, se ve afectada en un mutante *pkc1Δ* (Brandao *et al.*, 2002), valida nuestro resultado y refuerza la fiabilidad del experimento. Por otro lado, se confirma que Pkc1 podría estar involucrada en el control del metabolismo del carbono.

Por otra parte, se detectó que la expresión de los genes *GYP7* y *COG5* se reprime (ver Tabla 4.5) y la de los genes *NCE102* y *YPL278c* se induce en el mutante *pkc1-8* (ver Tabla 4.6). Estos genes participan en el transporte mediado por vesículas. La ruta PKC se ha implicado en el control del aparato de secreción y el transporte mediado por vesículas (Costigan *et al.*, 1992; Mazzoni *et al.*, 1993; Nanduri y Tartakoff, 2001; Breton *et al.*, 2001). Por tanto, el hecho de encontrar estos genes es consistente con las funciones previamente descritas para Pkc1.

De especial interés es la detección del gen *CLN3* en nuestro análisis, que además también se detectó en el estudio de Boorsma *et al.* en 2004. La ciclina Cln3 es la ciclina clave en la iniciación de una nueva ronda de división celular. La posibilidad de que PKC regule su expresión podría indicar un mecanismo de control de la proliferación celular por PKC. Por otro lado, entre los genes que se inducen en un mutante *pkc1-8* es especialmente interesante, el gen *BUB1* (ver Tabla 4.6). El gen *BUB1* codifica para una proteína quinasa involucrada en el *checkpoint* de SPB (*spindle pole boby*) (Roberts *et al.*, 1994; Farr y Hoyt, 1998). El *checkpoint* de SPB previene la entrada en anafase en aquellas células con defectos en el ensamblaje del huso acromático mitótico o en el anclaje de los cromosomas en el SPB (Hardwick, 1998; Lew y Burke, 2003). Se han encontrado interacciones genéticas entre la ruta PKC y genes implicados en la duplicación del SPB (Khalfan *et al.*, 2000; Hosotani *et al.*, 2001). Además, recientemente, se ha observado que Pkc1 podría localizarse en el SPB (Denis y Cyert, 2005). El haber detectado el gen *BUB1* en nuestro análisis sugiere que tal vez la ruta PKC tuviese algún papel en la regulación de la transcripción de genes implicados en el SPB y el huso acromático.

Los genes detectados también se analizaron mediante el programa *GO Term Finder* utilizando como criterio de clasificación el componente celular donde se localiza el producto proteico. Dos términos ontológicos aparecen significativamente incrementados en nuestros análisis:

· *Genes localizados en la pared celular.* Con un valor p de $1.63 \cdot 10^{-6}$. Del total de 54 genes reprimidos en nuestro estudio, 8 genes (*PIR3*, *PST1*, *PIR1*, *SSA1*, *YGPI*, *PHO5*, *YLR194c* y *SEDI*) están localizados en la pared celular, esto supone un 14.8% frente a la proporción del 1.5% del genoma de levadura. Esta categoría se ha visto enriquecida en casi 10 veces respecto a la composición del genoma completo.

· *Genes localizados en la membrana plasmática.* Con un valor p de $3.33 \cdot 10^{-4}$. Aparecen 8 genes (*GAP1*, *OPT2*, *PHO84*, *HSP30*, *FUII*, *HXT1*, *HXT4* y *PRM7*) del total de 54, lo que supone un 14.8% frente a la proporción en el genoma del 3.2%. Esta categoría se ha visto enriquecida en nuestro análisis en más de 4 veces respecto al genoma de levadura.

Hay además que tomar en consideración en este análisis los genes *SLT2*, *SMI1* y *CHS3* que no aparecen incluidos en estos dos grupos, pero que sus productos se localizan en sitios de crecimiento polarizado. La regulación por PKC de estos genes refleja la importancia de la función de la ruta PKC en los procesos que ocurren en la superficie celular.

Un tercer análisis utilizando el programa *GO Term Finder* se llevó a cabo, utilizando como criterio de clasificación la función celular realizada por el producto de los genes analizados. Es muy interesante el hecho de que 3 de los únicos 5 genes relacionados con actividad fosfatasa ácida que existen en todo el genoma han sido detectados en nuestro estudio. Esto supone un 5.5% de nuestros genes frente a un 0.0007% en todo el genoma, lo que da lugar a un enriquecimiento de esta categoría en 8000 veces. Los tres genes son *PHO5*, *PHO11* y *PHO12*, que codifican las tres fosfatasas ácidas presentes en la célula de *S. cerevisiae*. Estas enzimas participan en la ruta de captación de fosfato (Ogawa *et al.*, 2000). Cuando los niveles

intracelulares de Pi disminuyen se produce la activación de la transcripción mediada por los factores de transcripción Pho2 y Pho4. La ruta PHO regula la transcripción de al menos 22 genes en respuesta a la limitación de fosfato, entre ellos los genes *PHO5*, *PHO11* y *PHO12* (Ogawa *et al.*, 2000). En nuestro análisis además de los genes de las fosfatasas ácidas hemos detectado otros 2 genes relacionados con el metabolismo del fosfato: el gen *PHO84* que codifica para el transportador de Pi de alta afinidad y el gen *SPL2* que codifica para una proteína con homología con Pho81. La expresión tanto de *PHO84* como de *SPL2* se regula por Pho4 en respuesta a la limitación de fosfato (Ogawa *et al.*, 1995; Flick y Thorner, 1998; Ogawa *et al.*, 2000; Auesukaree *et al.*, 2003; Springer *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos sugieren que la ruta PKC participa en la regulación de la respuesta al ayuno de fosfato. En este sentido, recientes investigaciones en organismos superiores sugieren la participación de la proteína quinasa C de mamíferos en la regulación de la ruta de captación de Pi (Han *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005). Una posibilidad atractiva es que Pkc1 pudiera controlar la actividad de los factores de transcripción Pho2 y/o Pho4.

En conclusión, el estudio genómico que hemos realizado es consistente con muchas de las funciones con las que se había relacionado a la ruta PKC. Además, se han detectado algunos genes que sugieren la implicación de Pkc1 en otras funciones celulares menos investigadas, como la biosíntesis de nucleótidos de purina, el control del metabolismo del carbono o la respuesta celular a la limitación de fosfato. Un primer objetivo en el futuro será validar mediante análisis por *northern* o RT-PCR que la expresión de estos genes depende en efecto de la ruta PKC para posteriormente caracterizar el mecanismo molecular de dicha regulación.

5. Identificación de proteínas asociadas a Pkc1 y Slt2.

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON Pkc1 Y Slr2

Ya se ha comentado la gran variedad de procesos en los que participa la ruta de la proteína quinasa C distintos de su función principal en el mantenimiento de la integridad celular. Sin embargo, estamos lejos aún de conocer con exactitud cual es el papel de la ruta en estas funciones. Una forma de profundizar en el conocimiento de los mecanismos de actuación de la ruta PKC en los distintos procesos en que participa sería identificar nuevas proteínas que interaccionen con Pkc1 y Slr2.

Asociación de Pkc1 en complejos macromoleculares

Diversos estudios habían sugerido que Pkc1 debe interaccionar con otras proteínas posiblemente formando grandes complejos proteicos. En el grupo del Dr. Paravicini se realizaron experimentos de fraccionamiento subcelular observándose que Pkc1 se recogía en la fracción insoluble. La dificultad para solubilizar Pkc1 mediante el uso de distintos detergentes o sales sugirió que Pkc1 se asocia a la fracción insoluble mediante fuertes interacciones proteína-proteína con otras proteínas o complejos celulares (Antonsson *et al.*, 1994). Estudios realizados en el grupo de Dr. Levin también han sugerido la asociación de Pkc1 a grandes complejos proteicos (Watanabe *et al.*, 1994). Se ha sugerido que el largo dominio N Terminal, similar al de algunas isoformas de PKC de mamíferos, podría ser el responsable de la interacción con otras proteínas (Levin *et al.*, 1990). De hecho, como se ha visto en la introducción, los dominios HR1 y C1 responsables de la interacción con Rho1 residen en esta zona.

Análogamente, distintos estudios realizados con la proteína quinasa C de mamíferos han demostrado que tras su activación PKC se asocia con la fracción insoluble de las células, incluyendo asociación con el citoesqueleto (Kiley y Jaken, 1990; Mochly-Rosen *et al.*, 1990; Zalewski *et al.*, 1990) y el núcleo (Masmoudi *et al.*, 1989).

Con la finalidad de confirmar los indicios de que Pkc1 pudiera asociarse con otras proteínas formando grandes complejos proteicos, analizamos la presencia de Pkc1 en la fracción soluble tras someter los extractos celulares a tratamiento con diferentes detergentes. Para ello extractos de células que expresan Pkc1 marcada con el epítipo TAP, sometidos a tratamiento con o sin detergentes, se centrifugaron a baja velocidad (800 rcf) y posteriormente a alta velocidad (13400 rcf) y se analizó la presencia de Pkc1-TAP en las fracciones solubles y precipitadas (S y P). En la Figura 5.1 se observa que Pkc1-TAP se acumula mayoritariamente en la fracción insoluble (P), incluso cuando se realizó una centrifugación a baja velocidad (800 rcf) Pkc1 se acumuló también en la fracción insoluble (datos no mostrados). La adición de diversos detergentes al tampón de lisis no mejoró la solubilización de Pkc1. Únicamente la utilización de CHAPS en el tampón de lisis y la incubación prolongada del extracto con los restos celulares consiguió aumentar el grado de solubilidad de Pkc1-TAP. El detergente CHAPS suele dar buen resultado en la solubilización de proteínas hidrofóbicas o con tendencia a asociarse formando grandes complejos. Estas observaciones, de acuerdo con los datos publicados previamente, sugieren que la dificultad de solubilización de Pkc1 pudiera deberse a que se encuentre en forma de agregados asociada con otras proteínas o unida a estructuras celulares.

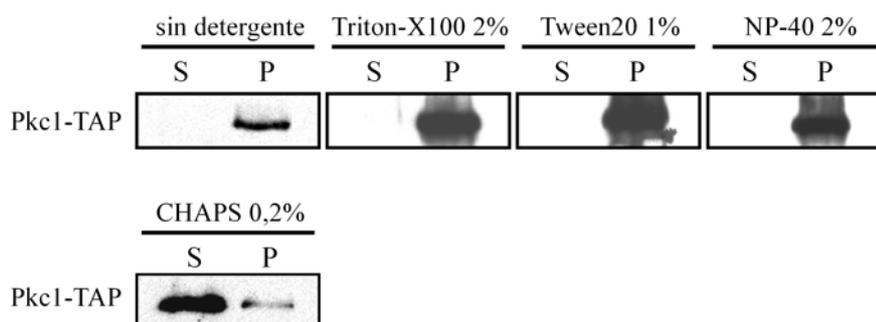


Figura 5.1. Asociación de Pkc1 con la fracción no soluble. Células que expresan Pkc1-TAP (JCY641) se cultivaron en medio YPD a 25°C. Se obtuvieron extractos crudos mediante lisado de las células con perlas de vidrio en tampón de lisis conteniendo diferentes detergentes, como se indica en la figura. Se separaron la fracción soluble (S) y la fracción precipitada (P) por una doble centrifugación, primero a baja velocidad (800 rcf) y, posteriormente, a alta velocidad (13400 rcf). En la figura se muestran las fracciones correspondientes a la segunda centrifugación. Cantidades equivalentes de sobrenadante y precipitado se inyectaron en geles de SDS-PAGE. Se detectó la proteína Pkc1-TAP mediante *western* utilizando un anticuerpo anti Proteína A.

Para obtener nuevos datos sobre la asociación de la proteína quinasa C a posibles complejos se realizó un experimento de filtración en gel. Mediante los experimentos de filtración en gel o exclusión molecular se puede determinar la masa molecular aparente de una proteína o complejo. En la Figura 5.2 podemos observar como la banda correspondiente a Pkc1-TAP apareció mayoritariamente en la fracción 9. El patrón de mayor masa molecular utilizado en el experimento, la tiroglobulina, con una masa molecular de 699 kDa, se recoge en la fracción 14, lo cual indica que Pkc1 aparece en una fracción correspondiente a una masa molecular aparente bastante mayor a 699 kDa. La masa molecular de Pkc1 es de 131 kDa,

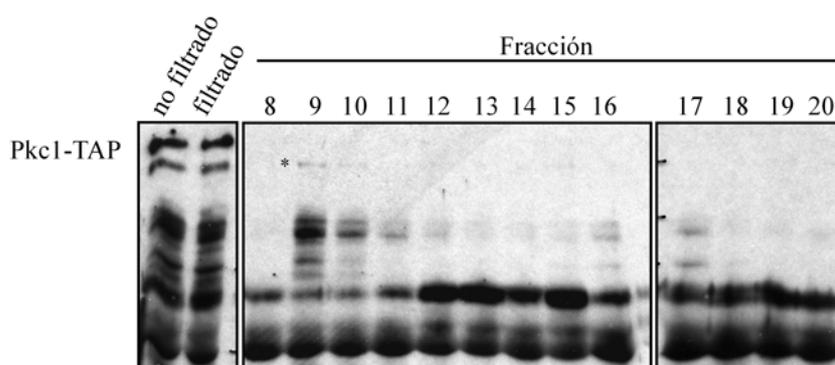


Figura 5.2. Experimento de filtración en gel de Pkc1-TAP. Se obtuvieron extractos crudos a partir de células que expresan Pkc1-TAP (JCY641) cultivadas en medio YPD a 25°C. 5 mg de proteína total filtrada se cargaron en una columna de Superosa 6 HR 10/30 (Amersham). Se recogieron fracciones de 1ml, a partir de los 7 primeros ml que corresponden con el volumen de elución de la columna, y la presencia de Pkc1-TAP se analizó mediante inmunoprecipitación y detección por *western*. El perfil de elución se comparó con patrones de peso molecular conocido que eluyen en las fracciones 14 (tiroglobulina, 669 kDa), 16 (ferritina, 440 kDa), 17 (catalasa 232 kDa) y 18 (aldolasa, 158 kDa). Se muestra un control del extracto crudo inmunoprecipitado antes y después de filtrar.

claramente inferior al que corresponde a la fracción 9. Este resultado sugiere que Pkc1 podría estar asociada a otras proteínas formando un complejo proteico de gran tamaño.

Identificación de proteínas mediante purificación de Pkc1-TAP

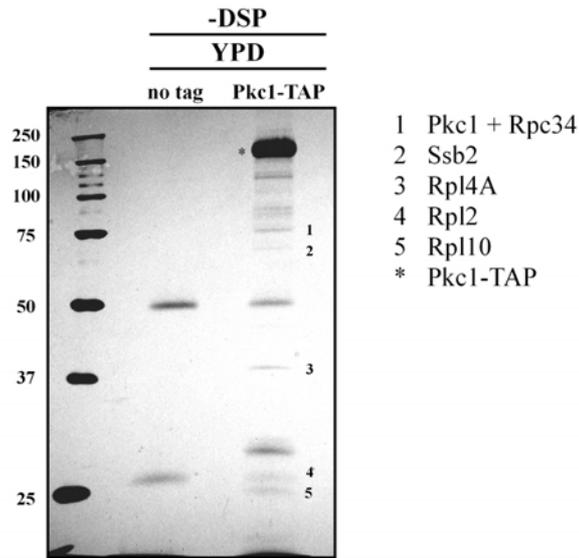
Las observaciones realizadas junto con los datos obtenidos por otros autores sugerían que Pkc1 muy probablemente estableciese interacciones con otras proteínas. Además, previamente se habían detectado interacciones

de Pkc1 con otras proteínas. Mediante la técnica de doble híbrido se había detectado que Pkc1 interacciona con Mkk1 (Paravicini y Friedli, 1996), Rho1 (Nonaka *et al.*, 1995; Kamada *et al.*, 1996) y Pab1 (Mangus *et al.*, 1998). La interacción con Rho1 además se ha confirmado mediante purificación de afinidad (Nonaka *et al.*, 1995). Por purificación de afinidad también se ha detectado interacción de Pkc1 con Fks1 (Drgonova *et al.*, 1996; Qadota *et al.*, 1996). Por otro lado, estudios proteómicos han detectado interacción de Pkc1 con otras proteínas como Eno1 (Gavin *et al.*, 2002), Gip1 (Ito *et al.*, 2001) y Zds2 (Uetz *et al.*, 2000).

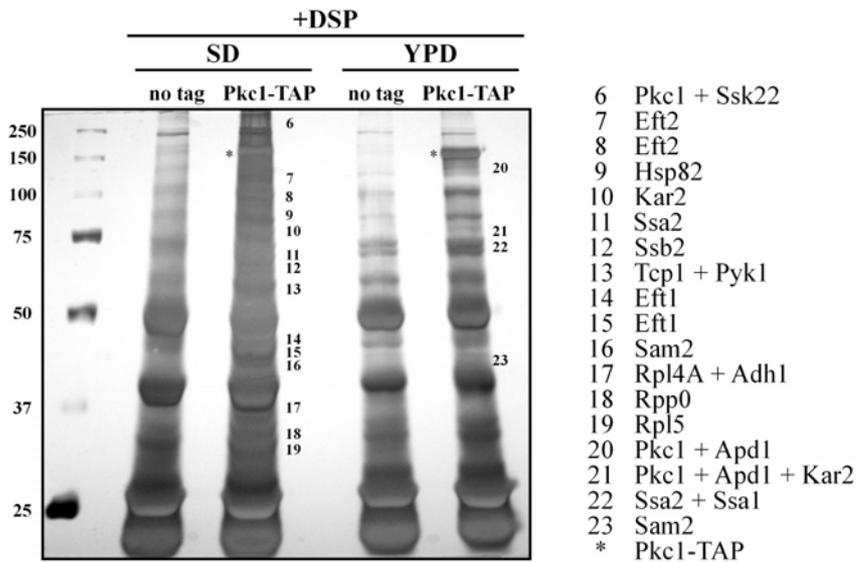
Con la finalidad de identificar nuevas proteínas que interaccionen con Pkc1 se realizaron ensayos de copurificación utilizando el método TAP (*Tandem Affinity Purification*) desarrollado por el grupo del Dr. Seraphin (ver Rigaut *et al.*, 1999; Puig *et al.*, 2001). El epítipo TAP se fusionó al C terminal de Pkc1. Debido a su voluminosidad se comprobó mediante análisis del crecimiento a 37°C y activación de la ruta que el epítipo TAP no afectaba a la funcionalidad de Pkc1. Se llevó a cabo la purificación a partir de extractos crudos de esta cepa. Las células se cultivaron a 25°C en medio YPD o SD y se incubaron durante 1h a 37°C (con la finalidad de

Figura 5.3. Purificación por el método TAP de Pkc1. Células salvajes (TB50a) sin marcar o células que expresan Pkc1-TAP (JCY516) se cultivaron en medio YPD o SD a 25°C y se incubaron 1h a 37°C. Los extractos crudos se obtuvieron mediante lisado de las células con perlas de vidrio en tampón de lisis sin DSP (A) o en presencia de DSP (B). Los extractos celulares se purificaron mediante el método TAP (ver Materiales y Métodos). Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y los geles de poliacrilamida se tiñeron con plata. Los nombres de las proteínas identificadas por espectrometría de masas se muestran en la figura. El asterisco indica la proteína Pkc1-TAP purificada.

A



B



activar la ruta PKC). Se obtuvieron los extractos crudos rompiendo las células en tampón de lisis o en tampón de lisis suplementado con DSP, un entrecruzador de proteínas (ver Materiales y Métodos). Posteriormente, se realizaron dos purificaciones de afinidad sucesivas. Un primer paso se realizó mediante columnas de IgG-sefarosa y después el eluido se sometió a una segunda purificación mediante columnas de calmodulina-sefarosa. Posteriormente, se separaron las proteínas contenidas en el purificado mediante SDS-PAGE y el gel se tiñó con plata. Las bandas se recortaron y se identificaron mediante espectrometría de masas. En la Figura 5.3 se muestran algunas imágenes obtenidas tras la tinción con plata de los geles de poliacrilamida.

En la Tabla 5.1 se muestra un resumen de los resultados obtenidos tras la identificación por espectrometría de masas de las bandas recortadas en varios experimentos.

Tabla 5.1. Proteínas identificadas mediante purificación de Pkc1 por el método TAP

<i>Proteína</i>	<i>Descripción</i>
Ssk22	MAP KKK de la ruta Hog1. Homóloga a Ssk2
Apd1	requerida para localización normal de parches de actina
Rpc34	subunidad de 34 kDa de la RNA pol III
Tcp1	chaperonina involucrada en citoesqueleto de actina
Kar2	chaperona involucrada en importación de proteínas al RE.
Ssa1	chaperona de la familia de Hsp70
Ssa2	chaperona de la familia de Hsp70

Tabla 5.1. Proteínas identificadas mediante purificación de Pkc1 por el método TAP (continuación)

<i>Proteína</i>	<i>Descripción</i>
Ssb2	chaperona asociada a ribosomas
Hsp82	chaperona de la familia de Hsp90
Rpl2	proteína ribosomal de la subunidad 60S
Rpl4a	proteína ribosomal de la subunidad 60S
Rpl5	proteína ribosomal de la subunidad 60S
Rpl10	proteína ribosomal de la subunidad 60S
Rpp0	proteína ribosomal
Eft2	factor de elongación de la traducción
Eft1	factor de elongación de la traducción
Sam2	S-adenosil metionina sintetasa
Pyk1	piruvato quinasa
Adh1	alcohol deshidrogenada

Las proteínas identificadas en este análisis que resultan más interesantes a priori son: Ssk22, Apd1 y Rpc34. Estas proteínas se identificaron en bandas que no coinciden con la migración esperada y en las que también estaba presente Pkc1 (o fragmentos de Pkc1). Esto podría deberse a que el entrecruzamiento no se haya revertido totalmente (en el caso de Ssk22 y Apd1) o a que la interacción persista incluso en las condiciones de electroforesis, tal como se ha visto en algunas interacciones no covalentes proteína-proteína.

La proteína Ssk22 es la MAP quinasa quinasa quinasa de la ruta HOG (Posas y Saito, 1998; Tatebayashi *et al.*, 2003). Es conocido que Pkc1 regula la actividad de la MAPKKK Bck1 en la ruta de integridad celular lo que da lugar a la activación del resto de quinasas de la cascada. La interacción detectada con Ssk22 podría sugerir que Pkc1 regulara también a esta MAPKKK. Las rutas HOG y PKC controlan la respuesta de la célula a diferentes estímulos. Así, la ruta HOG se activa en presencia de alta osmolaridad en el medio de cultivo, mientras que la ruta PKC se activa, entre otras señales, por choque hipoosmótico. Sin embargo, existen diversos indicios que sugieren una conexión entre las funciones de ambas rutas. Así, la proteína quinasa C y no la ruta HOG, es la responsable de la relocalización de ciertas proteínas desde el núcleo al citoplasma en respuesta a un estrés hiperosmótico (Nanduri y Tartakoff, 2001a). Por otro lado, diversos estudios han determinado que la ruta HOG está implicada en la biosíntesis de pared celular (Reynolds *et al.*, 1998; Lee y Elion, 1999; Rep *et al.*, 2000; Siderius *et al.*, 2000; O'Rourke y Herskowitz, 2004). La interacción detectada entre Pkc1 y la MAPKKK Ssk22 podría representar un mecanismo de conexión entre las actividades de ambas rutas.

Por su parte, la proteína Apd1 parece ser necesaria para la correcta localización de los parches de actina, aunque no se conocen mas datos sobre su función (Entian *et al.*, 1999). La ruta PKC regula la polarización del citoesqueleto de actina (Costigan *et al.*, 1992; Mazzoni *et al.*, 1993; Zarzov *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1996). En el caso concreto del proceso de despolarización, Pkc1 actúa de manera independiente de la cascada MAP quinasa (Delley y Hall, 1999; Harrison *et al.*, 2001). Una hipótesis probable es que Pkc1 interactúe con proteínas relacionadas con la síntesis o regulación del citoesqueleto de actina como podría ser Apd1. Hay que destacar que en este experimento se detectó también a Tcp1, que es una chaperona implicada en el funcionamiento del citoesqueleto de actina

(aunque la validez de este resultado es difícil de evaluar como se explica más adelante).

En cuanto a la proteína Rpc34, es una de las subunidades de la RNA polimerasa III. La RNA pol III es la responsable de la transcripción de los genes de tRNA, del 5S rRNA y de otros pequeños RNAs. Se ha observado que cuando se produce un bloqueo de la ruta de secreción la actividad de Pkc1 es necesaria para la represión transcripcional del tRNA (Li *et al.*, 2000). La posible interacción de Pkc1 con algún componente de la maquinaria de la RNA pol III es consistente con estas observaciones

Además de las proteínas comentadas, se han identificado otras cuya consideración es problemática. En 2002, se publicó un artículo donde se identificaron a nivel global multitud de complejos proteicos en levadura purificados por la técnica de TAP. En este estudio se descartaba la consideración de una serie de proteínas debido a su elevada frecuencia de detección o a su presencia en muestras control (Ho *et al.*, 2002). Muchas de las proteínas que hemos identificado en nuestro experimento se encuentran en este grupo, entre ellas las numerosas proteínas ribosomales y chaperonas detectadas, así como Kar2, Sam2, Adh1, y Eft2. Una dificultad inherente a la utilización de cualquier tipo de filtrado de datos es que interacciones reales tienen el riesgo de ser excluidas del análisis. Así, entre las proteínas relevantes que se incluyen en esta categoría están actina, tubulina, carioferinas, chaperoninas y proteínas de choque térmico, todas ellas proteínas que forman diferentes y numerosos complejos relevantes biológicamente.

Este podría ser el caso para la proteína Ssa1 y Tcpl ya que intervienen en procesos relacionados con las funciones de Pkc1. La chaperona Ssa1 se ha localizado en la pared celular y se ha sugerido que interviene en la biosíntesis de la pared celular (Lopez-Ribot y Chaffin, 1996). Además, el análisis de expresión genómica en un mutante *pkc1-8* realizado en esta tesis (ver apartado 4), indicó que la expresión del gen *SSA1*

es dependiente de Pkc1. Por su parte, Tcp1 es necesaria para la correcta biogénesis de estructuras de actina y microtúbulos. Es interesante resaltar que la sobreexpresión de proteínas del complejo TCP1, del que forma parte Tcp1, es capaz de rescatar los defectos en la polarización del citoesqueleto de actina asociados a la mutación del gen *TOR2* (Schmidt *et al.*, 1996) y que Tor2 controla el citoesqueleto de actina mediante la regulación de la ruta PKC (Schmidt *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997; Helliwell *et al.*, 1998).

Identificación de proteínas mediante purificación de Sl2-TAP

Es conocido que la proteína Sl2 establece interacciones con distintas proteínas. Entre las proteínas que interaccionan con Sl2 algunas de las más conocidas son: los factores de transcripción Swi4/Swi6 (Baetz *et al.*, 2001) y Rlm1 (Watanabe *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 1997), las MAPKK Mkk1 y Mkk2 (Soler *et al.*, 1995) y las proteínas Spa2 (van Drogen y Peter, 2002) y Smi1 (Martin-Yken *et al.*, 2003). Además, estudios proteómicos globales utilizando las técnicas de doble híbrido o mediante copurificación han detectado interacción de Sl2 con numerosas proteínas como, entre otras, las fosfatasas Sdp1 y Msg5 y la MAP KKK Bck1 (Soler *et al.*, 1995; Uetz *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2002; Hazbun *et al.*, 2003).

Con la finalidad de identificar nuevas proteínas que interaccionen con Sl2 se realizaron ensayos de copurificación utilizando el método TAP. Se partió de extractos crudos de una cepa que expresa Sl2 fusionado al epítipo TAP. La funcionalidad de la proteína Sl2-TAP se comprobó mediante análisis del crecimiento a 37°C y activación de la ruta. Las células

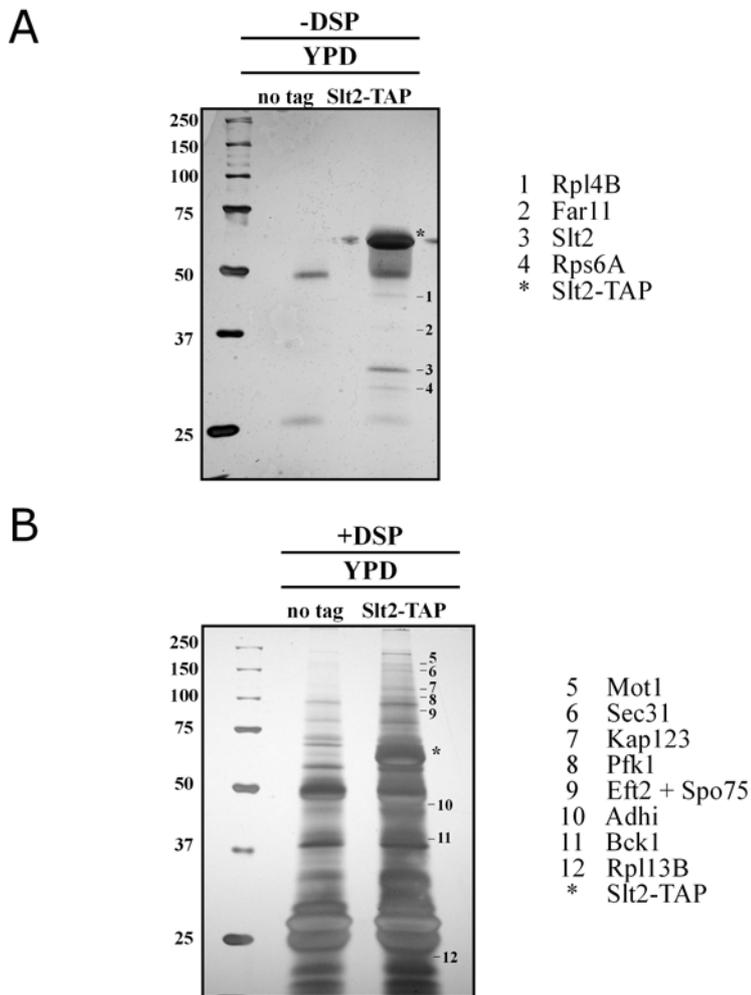


Figura 5.4. Purificación por el método TAP de Slt2. Células salvajes (TB50a) sin marcar o células que expresan Slt2-TAP (JCY515) se cultivaron en medio YPD o SD a 25°C y se incubaron 1h a 37°C. Los extractos crudos se obtuvieron mediante lisado de las células con perlas de vidrio en tampón de lisis sin DSP (A) o en presencia de DSP (B). Los extractos celulares se purificaron mediante el método TAP (ver Materiales y Métodos). Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y los geles de poliacrilamida se tiñeron con plata. Los nombres de las proteínas identificadas por espectrometría de masas se muestran en la Figura. El asterisco indica la proteína Slt2-TAP purificada.

se cultivaron a 25°C y se incubaron 1h a 37°C (con la finalidad de activar a la MAP quinasa). Se purificó Sl2-TAP siguiendo el protocolo explicado anteriormente. Se realizaron varios experimentos de purificación en los que se obtuvieron extractos en presencia o ausencia de entrecruzador (DSP). Las bandas obtenidas en la electroforesis de la fracción purificada se recortaron y se identificaron mediante espectrometría de masas. En la Figura 5.4 se muestran algunas imágenes obtenidas tras la tinción con plata de los geles de poliacrilamida.

En la Tabla 5.2 se muestra un resumen de los resultados obtenidos tras la identificación por espectrometría de masas de las bandas recortadas en varios experimentos.

Tabla 5.2. Proteínas identificadas mediante purificación de Sl2 por el método TAP

<i>Proteína</i>	<i>Descripción</i>
Bck1	MAPKKK de la ruta PKC
Kap123	carioferina; transporte de proteínas entre el núcleo y el citoplasma
Far11	parada en G1 en respuesta a feromonas
Spo75	esporulación
Mot1	factor de transcripción de unión a caja TATA
Sec31	transporte de vesículas
Snu114	corte y empalme del RNA
Adh1	alcohol deshidrogenasa
Tdh1	gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa

Tabla 5.2. Proteínas identificadas mediante purificación de Slr2 por el método TAP (continuación)

<i>Proteína</i>	<i>Descripción</i>
Pfk1	6-fosfofructoquinasa. Glicolisis
Fas2	ácido grasos sintasa
Ssa1	chaperona de la familia de Hsp70
Hsp82	chaperona de la familia de Hsp90
Eft2	factor de elongación de la traducción
Rpl4b	proteína ribosomal de la subunidad 60S
Rpl13B	proteína ribosomal de la subunidad 60S
Rps6a	proteína ribosomal de la subunidad 40S

En primer lugar, hay que destacar que se ha detectado la proteína Bck1, la MAP quinasa quinasa quinasa de la ruta PKC. Es conocida la interacción de Slr2 con Bck1 (Ho *et al.*, 2002). También se detectaron proteínas relacionadas con el metabolismo del carbono y de ácidos grasos, proteínas de choque térmico y algunas proteínas ribosomales. Como se ha comentado anteriormente, estas proteínas pertenecen al grupo de proteínas que suelen aparecer en este tipo de análisis debido a su abundancia. Así pues, aún a riesgo de eliminar interacciones reales, estas proteínas no han sido consideradas.

Entre el resto de proteínas detectadas algunas de las más atractivas son a priori: Kap123, Mot1 y Sec31. La proteína Kap123 ó carioferina β participa en la importación de proteínas al núcleo. La relación de Kap123 con la ruta PKC se comenta en el próximo apartado. Por su parte, Mot1 es

una proteína represora de la transcripción que actúa uniéndose a la caja TATA (Collart, 1996; Muldrow *et al.*, 1999; Gumbs *et al.*, 2003). Es interesante resaltar, el hecho de que Mot1 se una a la caja TATA de los promotores, ya que en este trabajo hemos detectado a Slt2 unida al promotor basal de *FKSI*. Esto sugiere que la ruta PKC pudiera regular la transcripción de algunos genes mediante una interacción entre Mot1 y Slt2 *in situ* en el promotor. En este estudio, también se ha detectado a la proteína Sec31, requerida para la correcta formación de las vesículas de transporte desde el retículo endoplásmico (Salama *et al.*, 1997). La ruta PKC ha sido implicada en la regulación de la ruta de secreción y transporte vesicular (Mazzoni *et al.*, 1993; Nanduri y Tartakoff, 2001b). Además, hay que señalar que en esta tesis (ver apartado 4) se ha detectado que la expresión de varios genes implicados en el transporte mediado por vesículas (*COG5*, *GYP7*, *NCE102* y *YPL278c*) se ve afectada en un mutante *pkc1-8*. Estas observaciones sugieren que la proteína Sec31 podría ser una diana de la ruta PKC en la regulación de la ruta de secreción. Además, se ha detectado a Ssa1, que como se ha comentado previamente, se localiza en pared y podría estar implicada en la biosíntesis de la pared celular.

Los resultados obtenidos en este apartado sugieren, de manera preliminar, posibles mecanismos de actuación de la ruta PKC en sus diversas funciones celulares. No obstante, es necesario validar las interacciones detectadas mediante otras aproximaciones de copurificación o técnica de doble híbrido.

PARTICIPACIÓN DE LA CARIOFERINA Kap123 EN EL CONTROL DE LA INTEGRIDAD CELULAR

Las células mutantes *kap123Δ* presentan defectos de integridad celular

La carioferina Kap123 pertenece a la familia de carioferinas β . Su función se ha relacionado con la importación al núcleo de proteínas ribosomales y de las histonas H3 y H4 (Goldfarb, 1997; Mosammaparast *et al.*, 2002; Sydorsky *et al.*, 2003). La carioferina Kap123 es una de las proteínas obtenidas en la identificación de proteínas que interaccionan con Slt2 por el método TAP. Se han iniciado estudios para caracterizar la relación de la carioferina Kap123 con la ruta PKC.

La primera observación que hay que resaltar es que las células de una cepa mutante *kap123Δ* muestran un acusado fenotipo de lisis celular. En la Figura 5.5 se muestran imágenes de las células *kap123Δ*. Se observa la presencia de abundantes restos celulares en el medio de cultivo junto a numerosas células lisadas. Este resultado indica con rotundidad que la ausencia de Kap123 afecta severamente a la integridad celular, un proceso que depende de la actividad de la ruta PKC.

Por otro lado, la cepa mutante *kap123Δ* es inviable a 37°C (Figura 5.6). Lo más relevante es que este defecto en el crecimiento es suprimido, aunque no totalmente, por la adición de un estabilizador osmótico como el sorbitol al medio de cultivo. Este resultado indica que la pérdida de viabilidad a alta temperatura está ocasionada por defectos en el control de la integridad celular. Estos fenotipos son similares a los observados en mutantes de la ruta PKC (Torres *et al.*, 1991; Lee y Levin, 1992; Irie *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993). Todas estas observaciones indican que la carioferina Kap123 participa en el control de la integridad celular y plantean la posibilidad de que Kap123 pudiera controlar la actividad de la ruta PKC.

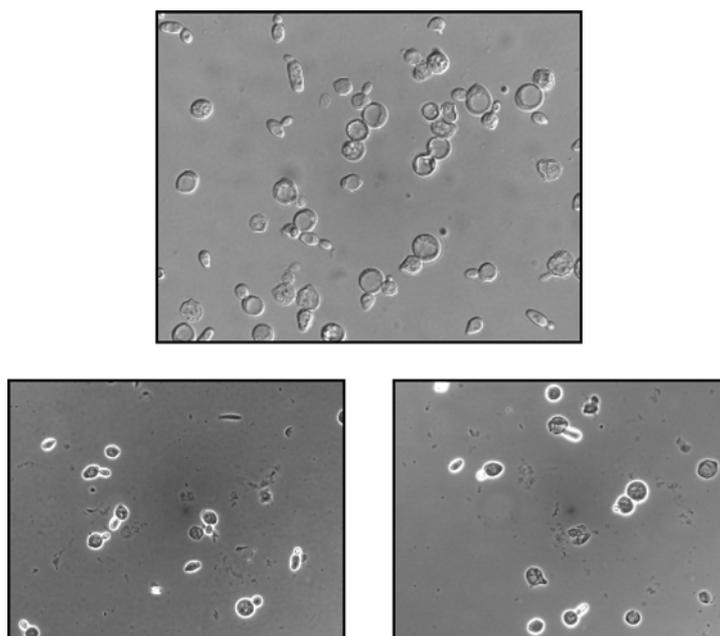


Figura 5.5. Fenotipo de lisis celular en células mutantes *kap123Δ*. Células de cultivos a 25°C en fase exponencial de crecimiento de la cepa mutante *kap123Δ* (JCY663).

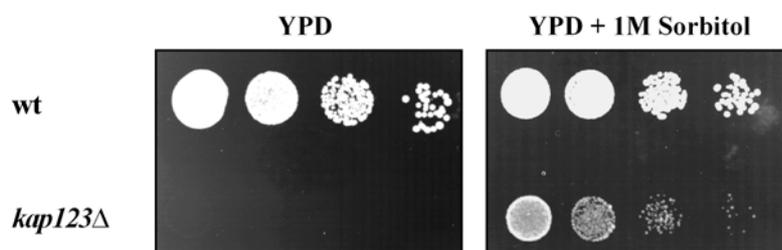


Figura 5.6. Análisis del crecimiento a 37°C de la cepa mutante *kap123Δ*. Diluciones seriadas de cultivos de las cepas salvaje (W303-1a) y mutantes *kap123Δ* (JCY663) se sembraron en placas de YPD con o sin Sorbitol 1M y se incubaron durante 3 días a 25°C.

Actividad de la ruta PKC en el mutante *kap123Δ*

Para investigar la actividad de la ruta PKC, se analizó en primer lugar si la expresión de un gen regulado por la ruta pudiera verse afectada en células mutantes en Kap123. Para ello se utilizaron plásmidos que expresan el gen reportero *lacZ* bajo el control de un fragmento del promotor del gen *FKS1* entre -712 y -82 (pF712-81:*lacZ*) o entre -476 y -391 (p476-91:*lacZ*). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.7. Tanto con la fusión que contiene el promotor completo del gen *FKS1* como con la que contiene una secuencia más pequeña con una muy fuerte actividad UAS, se observó

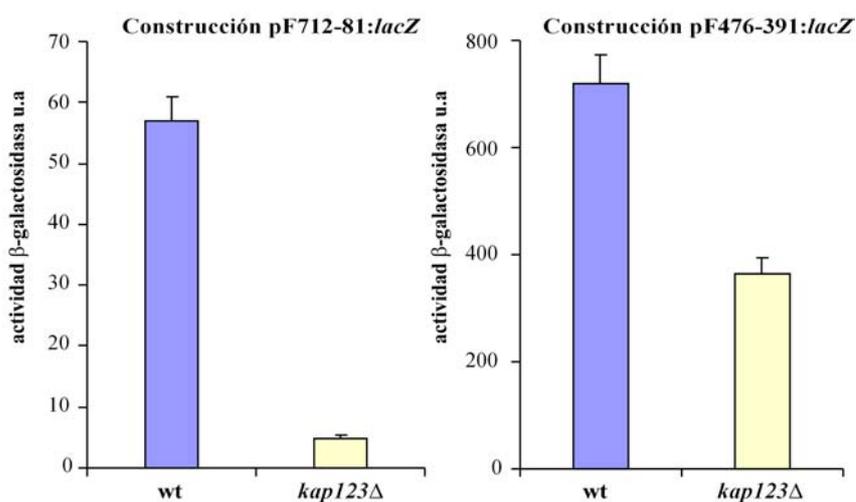


Figura 5.7. Efecto de la mutación *kap123Δ* en la expresión del gen *FKS1*. Se analizó la actividad β-galactosidasa en extractos de las cepas (W303-1a) y mutante mutantes *kap123Δ* (JCY663) transformadas con los plásmidos pF712-81:*lacZ* ó pF476-391:*lacZ*, que contiene el gen *lacZ* bajo el control de las secuencias de -712 a -81 ó -476 a -391 del promotor del gen *FKS1*. Las células se cultivaron a 25°C. Los valores representa la media de tres transformantes diferentes.

una clara disminución de la actividad β -galactosidasa en las células mutantes *kap123* Δ , especialmente en el caso del promotor completo. Este resultado indica que la ruta PKC no es funcional en las células *kap123* Δ , al menos en lo que se refiere a la regulación de la expresión génica. Los defectos en la expresión de genes necesarios para la biosíntesis de la pared celular, como el gen *FKS1*, explican los defectos en la integridad celular observados en las células *kap123* Δ .

En una segunda aproximación, se estudió si las células mutantes *kap123* Δ muestran defectos de activación de la MAP quinasa Slt2. Para ello, se analizó el grado de fosforilación de la MAP quinasa Slt2 en cepas salvaje y mutantes *kap123* Δ . Tal como se observa en la figura 5.8., la inactivación de *kap123* Δ produce una activación constitutiva de Slt2, presentando las células *kap123* Δ un incremento importante en el nivel de fosforilación de Slt2 en relación a lo observado en la cepa salvaje, especialmente a 25°C.

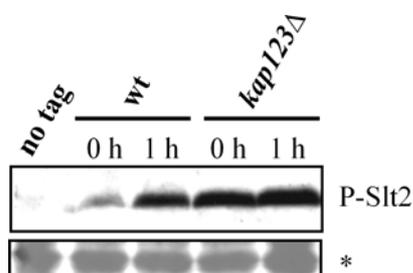


Figura 5.8. Análisis de la activación de Slt2 en el mutante *kap123* Δ . Análisis por *western* de la fosforilación de Slt2 en extractos de células de las cepas salvaje (W303-1a) y *kap123* Δ (JCY663). Las células se cultivaron en YPD a 25°C y se incubaron a 37°C los tiempos que se indica en la figura. Se incluye un control de la cepa mutante *slt2* Δ (JCY464). El asterisco indica una banda de la tinción de la membrana con Ponceau que se muestra como control de carga.

Es conocido que cuando existen daños en la pared celular la ruta de integridad celular se encuentra constitutivamente activa. A esta respuesta se la ha denominado mecanismo compensatorio (Martin *et al.*, 1996; de Nobel *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2000). Probablemente, en base al mecanismo compensatorio, los defectos en la integridad celular descritos en el mutante *kap123*, dan lugar a la activación constitutiva de Slt2.

Los resultados obtenidos indican que Kap123 participa en el mantenimiento de la integridad celular. El hecho de que Slt2 sea fosforilada, indica que no existen defectos en la función de la cascada MAP quinasa o proteínas anteriores de la ruta. Sin embargo, aunque existe activación de Slt2, no se produce una adecuada respuesta transcripcional, como indica la deficiente expresión del gen *FKS1*. La proteína Kap123 es una carioferina que transporta proteínas entre el núcleo y el citoplasma, por lo que su función más probable será participar en la correcta localización de algún componente de la ruta PKC. El haber detectado una interacción entre Kap123 y Slt2, sugiere que Slt2 puede ser la diana de Kap123. Se ha demostrado que existe una rápida translocación de Slt2 entre núcleo y citoplasma (van Drogen y Peter, 2002), aunque su localización es mayoritariamente nuclear (Kamada *et al.*, 1995; Baetz *et al.*, 2001; Hahn y Thiele, 2002). Además, es conocido que Slt2 interacciona con varios factores de transcripción, como SBF y Rlm1. De hecho en esta tesis hemos localizado a Slt2 asociada al promotor del gen *FKS1*. Aunque no se ha demostrado la importancia de la localización subcelular de Slt2, parece lógico pensar que la entrada al núcleo de Slt2 sea un requisito para la activación de la expresión génica. La hipótesis más factible es que Kap123 sea la importina de Slt2, de manera que aunque en un mutante *kap123Δ* se produzca la activación de la ruta dando lugar a la fosforilación de Slt2, la quinasa no puede ser importada al núcleo. En consecuencia, se producen deficiencias en la expresión de genes de pared lo que da lugar a los claros defectos de las mutantes *kap123Δ* en el mantenimiento de su integridad. En

un futuro próximo se realizarán experimentos de inmunofluorescencia de Slt2 en cepas salvaje y mutante *kap123Δ* y también ensayos de copurificación de Slt2 y Kap123 con la finalidad de comprobar nuestra hipótesis.

6. Relación de la ruta PKC con la ciclina Cln2

En células de mamíferos, la proteína quinasa C juega un papel fundamental en el control del crecimiento y la proliferación celular. En *Saccharomyces cerevisiae*, la función principal de la ruta PKC es el mantenimiento de la integridad celular. Sin embargo, tal como se ha comentado en la introducción, diversos estudios han relacionado a la ruta PKC con el control del ciclo celular. En primer lugar, se ha descrito que la ruta PKC se activa en la transición G1/S (Marini *et al.*, 1996; Zarzov *et al.*, 1996). Además, se han descrito interacciones genéticas entre la ruta PKC y el factor de transcripción de Start SBF (Iguar *et al.*, 1996; Gray *et al.*, 1997; Madden *et al.*, 1997) y de hecho SBF es un sustrato de Slt2 (Madden *et al.*, 1997; Baetz *et al.*, 2001). También se ha descrito que la ruta PKC participa en el *checkpoint* de morfogénesis: la MAP quinasa Slt2 reprime la entrada de la célula en mitosis mediante la inactivación indirectamente, de Cdc28-Clb (Mizunuma *et al.*, 1998; Harrison *et al.*, 2001; Mizunuma *et al.*, 2001). Por último, resultados obtenidos en nuestro grupo habían determinado una interacción genética entre PKC y la ciclina Clb5 y entre la ruta PKC y el *checkpoint* de integridad del DNA (Queralt e Iguar, 2005).

Tomando en cuenta estas consideraciones, en el presente capítulo se ha investigado la relación funcional existente entre la ruta PKC y las ciclinas de G1, Cln1 y Cln2.

INTERACCIONES GENÉTICAS ENTRE *CLN2* Y LA RUTA PKC

En un primer experimento, se estudió el efecto que la inactivación de Cln1 o Cln2 tenía en el crecimiento de la cepa mutante *pkc1-8*. La cepa *pkc1-8* muestra un crecimiento defectuoso a temperatura elevada en comparación con una cepa salvaje; sin embargo el doble mutante *pkc1-8 cln2Δ* es capaz de crecer a 37°C de manera similar a la cepa salvaje (Figura 6.1A). La introducción de un plásmido centromérico conteniendo el gen *CLN2* en el mutante *pkc1-8 cln2Δ* causó nuevamente un crecimiento defectivo de las células. Por tanto, la inactivación de *CLN2* suprime los defectos de crecimiento de las células *pkc1-8* a alta temperatura. Es interesante resaltar que ésta es una característica específica de la ciclina Cln2 que no se reproduce con la ciclina Cln1 ya que la delección del gen *CLN1* no alivió los defectos de crecimiento de las células *pkc1-8* (Figura 6.1A). Cln1 y Cln2 son ciclinas estrechamente relacionadas en estructura, regulación y función; sin embargo, nuestro grupo ha descrito que Cln2 juega el papel preponderante en el control del proceso de gemación durante el ciclo celular (Queralt e Igual, 2004). El hecho de que la inactivación de Cln2 pero no la de Cln1 tenga un efecto en el crecimiento del mutante *pkc1-8* es consistente con el papel preferente de Cln2 en morfogénesis.

Existen diversas funciones de Pkc1 independientes de la cascada de MAPK. Con la finalidad de comprobar si la interacción detectada entre *PKC1* y *CLN2* implicaba también a la cascada MAPK, se obtuvo el doble mutante *slt2Δ cln2Δ*. Las células mutantes *slt2Δ* apenas crecen a 35°C, sin embargo, cuando se combina la mutación *slt2Δ* con una mutación en *cln2Δ* las cepas muestran un crecimiento a 35°C comparable al de la cepa salvaje (Figura 6.1B). La supresión del fenotipo de crecimiento de *slt2Δ* no se produce si se combina con una mutación en *cln1Δ* (datos no mostrados). Estos resultados confirman que la inactivación de Cln2 suprime los defectos en el crecimiento de mutantes en la ruta PKC.

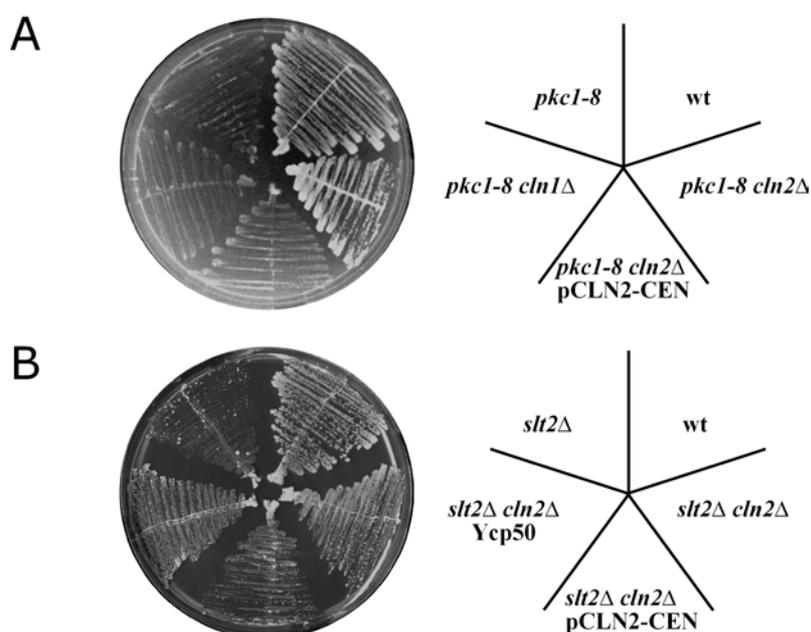


Figura 6.1. Análisis de la supresión de la termosensibilidad de los mutantes *pkc1-8* y *slt2Δ* por la mutación *cln2Δ*. A) Las cepas salvaje (W303-1a), *pkc1-8* (JCY63a), *pkc1-8 cln1Δ* (JCY398), *pkc1-8 cln2Δ* (JCY409) y *pkc1-8 cln2Δ* (JCY409) transformada con un plásmido centromérico con el gen *CLN2*, se sembraron en placas de YPD y se incubaron a 37°C durante 2 días. B) Las cepas salvaje (W303-1a), *slt2Δ* (JCY464), *slt2Δ cln2Δ* (JCY612) y *slt2Δ cln2Δ* (JCY612) transformada con un plásmido centromérico con el gen *CLN2* o el plásmido control Ycp50, se sembraron en placas de YPD y se incubaron a 35°C durante 3 días.

Debido a que la mutación en el gen *CLN2* conseguía rescatar el crecimiento defectuoso de las mutaciones en los genes *PKC1* y *SLT2*, nos preguntamos si recíprocamente la sobreexpresión del gen *CLN2* acentuaría los defectos de crecimiento de las cepas mutantes en los genes *PKC1* y *SLT2*. Para investigar dicha hipótesis, se transformó la cepa salvaje W303-1a

y las mutantes *pkc1-8* y *slt2Δ* con el plásmido *ptetO₂::CLN2* que expresa el gen *CLN2* bajo el control de un promotor regulable por doxiciclina (Gari *et al.*, 1997; Belli *et al.*, 1998). En presencia de doxiciclina la cepa sólo expresa la copia genómica del gen *CLN2*, pero cuando se elimina la doxiciclina del medio se activa el promotor *tetO₂* obteniéndose altos niveles de Cln2. En la Figura 6.2A, se muestra el crecimiento a 37°C de las cepas salvaje y mutante *pkc1-8*. Aunque en una cepa salvaje la sobreexpresión de la ciclina Cln2 produce hiperpolarización de las células (datos no mostrados), dicho efecto no origina un defecto aparente en la tasa de crecimiento. Sin embargo, en un fondo genético *pkc1-8* la sobreexpresión de Cln2 acentúa gravemente los defectos de crecimiento siendo las células incapaces de crecer a 37°C. El análisis de la sobreexpresión de Cln2 en una cepa mutante *slt2Δ* proporcionó resultados similares (ver Figura 6.2B): la sobreexpresión de *CLN2* resultaba letal a 35°C en las células sin actividad Slt2.

Una de las características de los mutantes en proteínas de la ruta PKC es que su fenotipo de lisis celular se puede remediar mediante la adición al medio de cultivo de estabilizadores osmóticos, como el sorbitol. La cepa *pkc1-8 ptetO₂::CLN2* cultivada a 37°C en ausencia de doxiciclina muestra claros defectos de crecimiento, sin embargo la adición de sorbitol al medio de cultivo rescata el crecimiento hasta un nivel comparable a la cepa salvaje (Figura 6.2C). En la cepa *slt2Δ ptetO₂::CLN2* se obtuvieron resultados similares, produciéndose un rescate del crecimiento al adicionar sorbitol al medio de cultivo. La reversión por la adición sorbitol de los defectos de crecimiento que provoca la sobreexpresión de la ciclina Cln2, sugiere que dicho defecto de crecimiento es debido a que se agrava el fenotipo de lisis celular debido a los problemas en la síntesis de pared celular que muestran los mutantes en la ruta PKC y no porque existan defectos asociados a otros procesos celulares.

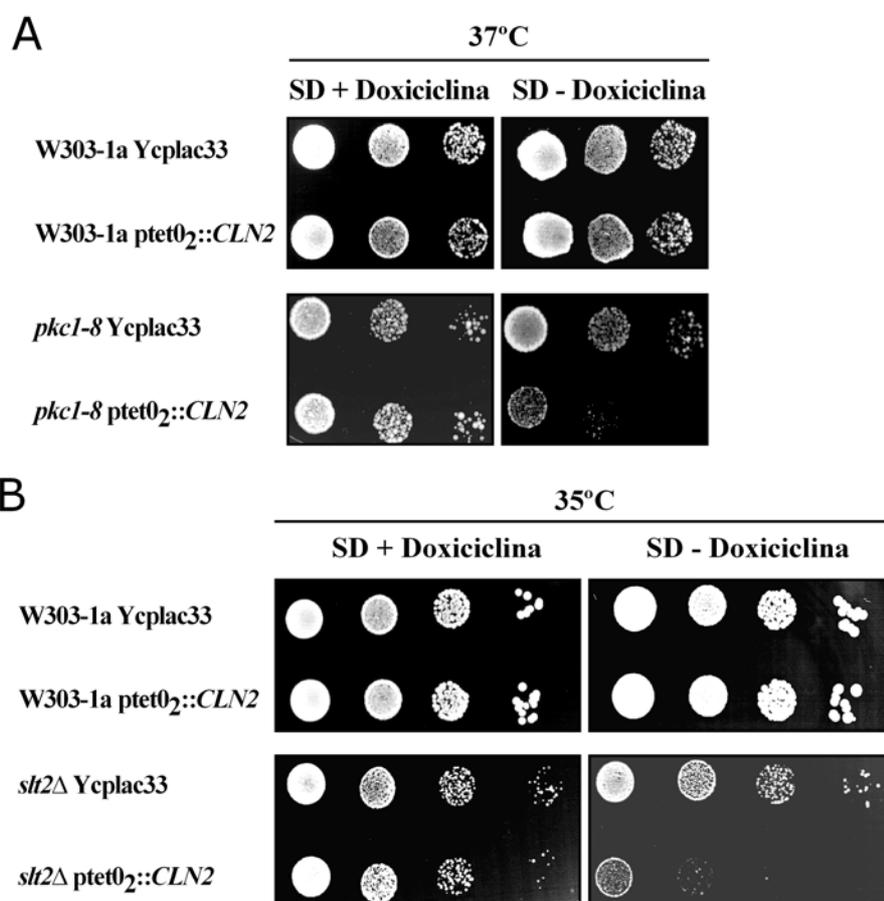
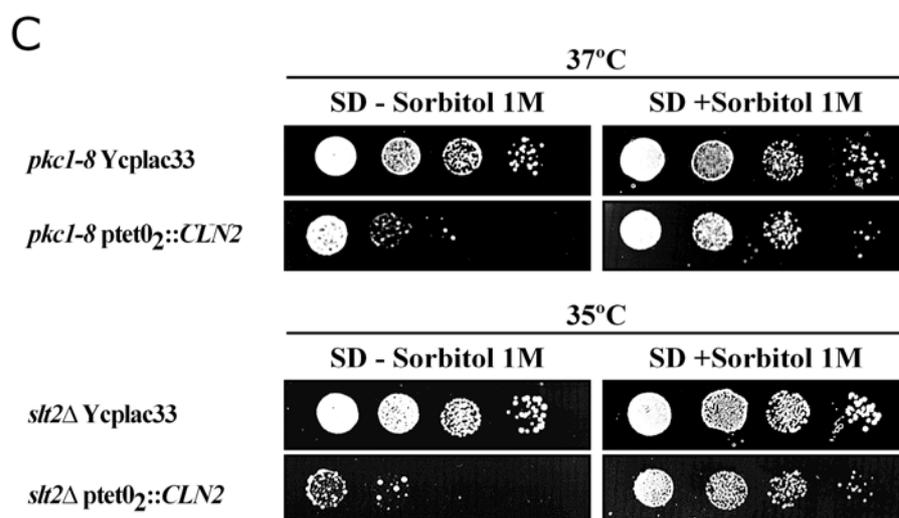


Figura 6.2. Efecto de la sobreexpresión de la ciclina Cln2 en cepas mutantes *pkc1-8* y *slt2Δ*. Diluciones seriadas de cultivos de las cepas salvaje (W303-1a) y mutantes *pkc1-8* (JCY63a) y *slt2Δ* (JCY464) transformadas con los plásmidos ptetO₂:CLN2 (expresión de CLN2 regulable por doxyciclina) o el control Ycplac33, se sembraron en placas de SD con o sin doxyciclina (A y B), con o sin Sorbitol 1M (C) y se incubaron durante 3 días a la temperatura indicada en la figura.



Con el objeto de determinar si el efecto de Cln2 era específico de los defectos de crecimiento a elevada temperatura, también se analizaron las consecuencias de la inactivación o sobreexpresión de *CLN2* en el crecimiento de la cepa *pkc1-8* en presencia de estaurosporina. La estaurosporina es un potente inhibidor de la proteína quinasa C. Como cabía esperar, las células *pkc1-8* mostraron hipersensibilidad a esta droga. Es importante destacar que mientras que la delección del gen *CLN2* suprimió la hipersensibilidad del mutante *pkc1-8* a la estaurosporina, creciendo las células *pkc1-8 cln2Δ* de manera similar a las células salvajes, la sobreexpresión de Cln2 aumentaba la hipersensibilidad del mutante *pkc1-8* a la estaurosporina (Figura 6.3). Estos resultados son análogos a los observados en los ensayos de crecimiento a temperatura elevada.

En conclusión, hemos demostrado que la ausencia de Cln2 alivia los defectos de crecimiento de células mutantes en la ruta PKC, mientras que la

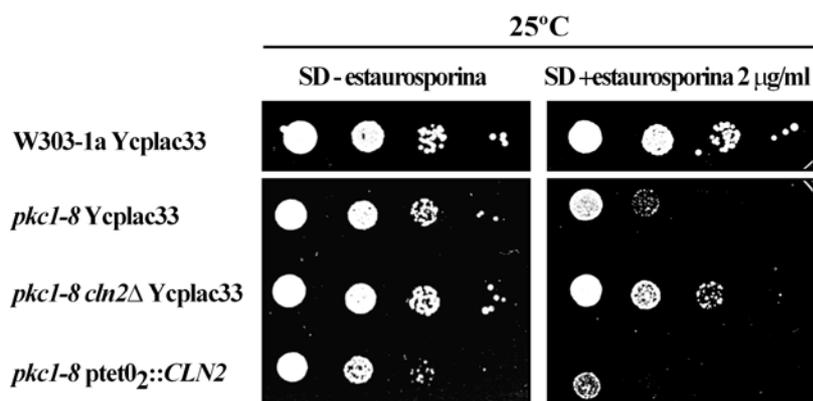


Figura 6.3. Efecto de la inactivación o sobreexpresión de *CLN2* en la sensibilidad a estaurosporina del mutante *pkc1-8*. Diluciones seriadas de cultivos de las cepas salvaje (W303-1a) y mutantes *pkc1-8* (JCY63a) y *pkc1-8 cln2Δ* (JCY409) transformadas con el plásmido control Ycplac33 y de la cepa *pkc1-8* (JCY63a) transformada con el plásmido ptetO₂:*CLN2* (expresión de *CLN2* regulable por doxiciclina), se sembraron en placas de SD con o sin estaurosporina y se incubaron durante 3 días a la temperatura indicada en la figura.

acumulación de Cln2 exagera dichos defectos. Estos resultados indican por tanto un antagonismo funcional entre la actividad de la ruta PKC y la actividad de la ciclina Cln2.

¿REGULA LA CICLINA CLN2 LA ACTIVIDAD DE LA RUTA PKC?

Los resultados obtenidos en los apartados anteriores indican una interacción entre la ruta PKC y la ciclina de fase G1 Cln2. Cabía la posibilidad de que existiera algún tipo de regulación directa entre las dos

actividades. Se realizaron por ello diversos experimentos con la finalidad de averiguar si la ciclina Cln2 afecta directamente a la actividad de la ruta PKC.

En primer lugar, se analizaron los niveles de Pkc1 en cepas salvaje y mutante *cln2Δ*. Para facilitar la detección de Pkc1, se fusionó a la proteína el epítipo TAP. El epítipo TAP es muy voluminoso, por lo que se comprobó mediante crecimiento en placa y ensayos de activación transcripcional mediada por la ruta que el marcaje genómico *PKC1-TAP* no afecta a la actividad de Pkc1 (datos no mostrados). No se observaron diferencias importantes en la cantidad de la proteína Pkc1-TAP en la cepa *cln2Δ* respecto de la cepa salvaje (Figura 6.4). Así pues, la presencia o ausencia de la ciclina Cln2 no afecta al nivel de proteína Pkc1.

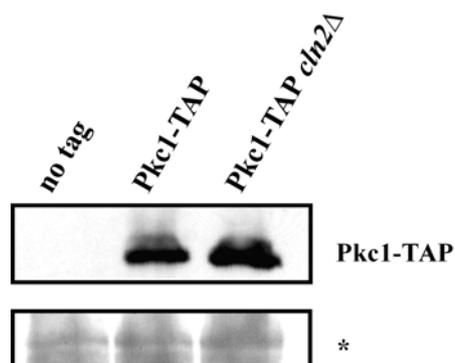


Figura 6.4. Análisis de los niveles de la proteína Pkc1 en el mutante *cln2Δ*. Extractos de las cepas salvaje (JCY514) y mutante *cln2Δ* (JCY611) que expresan la proteína Pkc1 marcada con el epítipo TAP se analizaron por *western*. Se incluye un control de la cepa salvaje W303-1a sin marcar (no tag). Las células se cultivaron a 25°C en medio YPD. El asterisco indica una banda de la tinción de la membrana con Ponceau que se muestra como control de carga.

En segundo lugar, se analizó la actividad quinasa de la proteína Pkc1. A partir de cepas salvaje y mutante *cln2Δ* portando el marcaje genómico *PKC1-TAP*, se inmunoprecipitó Pkc1-TAP y el purificado se utilizó en la realización de ensayos quinasa usando MBP (*myelin basic protein*), como sustrato específico de Pkc1. No se observaron diferencias significativas en la actividad quinasa de Pkc1-TAP en la cepa *cln2Δ* respecto de la cepa salvaje (Figura 6.5). Este resultado indica que la mutación en el gen *CLN2* no afecta a la actividad quinasa de Pkc1.

En tercer lugar, se analizó el grado de fosforilación de Slt2, en cepas salvaje y mutantes *cln2Δ*. La activación de la ruta PKC se traduce en un incremento en la fosforilación de la MAP quinasa Slt2. Para detectar dicha activación se determinó la cantidad de Slt2 activa mediante un anticuerpo antifosfo-p44/p42, que reconoce la fosforilación dual en los residuos conservados Thr202/Tyr204. El mutante *cln2Δ* no muestra un grado de fosforilación significativamente mayor que la cepa salvaje (Figura 6.6A). En resumen, todos los resultados indicaban que la inactivación de *CLN2* no altera los niveles de actividad de la ruta PKC.

La inactivación de Cln2 no afecta a la actividad de la ruta PKC en las células salvajes. Sin embargo, la inactivación de Cln2 suprimía los defectos en el crecimiento de los mutantes en la ruta PKC. Para investigar si dicha supresión se debía a una recuperación de la actividad de la ruta se analizó el efecto en la función de la ruta PKC de la delección del gen *CLN2* en un fondo genético *pkc1-8*. Como se observa en la Figura 6.6B, las células *pkc1-8 cln2Δ* muestran niveles de fosforilación de Slt2 similares a los observados en las células *pkc1-8*. En ambos casos, los niveles de Slt2 activa son sensiblemente menores que los detectados en la cepa salvaje, lo cual indica defectos en la ruta PKC. Por tanto, el rescate del fenotipo asociado a las mutaciones en la ruta PKC que se produce al mutar el gen *CLN2*, no es debido a que se recupere la actividad de la quinasa Slt2.

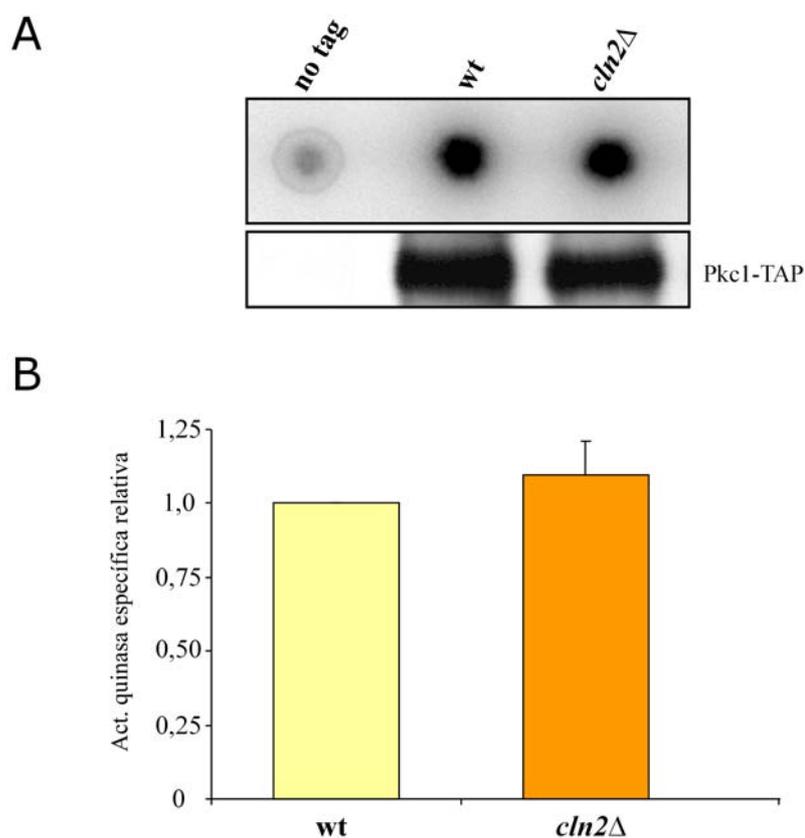


Figura 6.5. Determinación de la actividad quinasa Pkc1 en el mutante *cln2Δ*

A) Extractos de células cultivadas a 25°C en medio YPD de las cepas salvaje (JCY514) y mutante *cln2Δ* (JCY611), que expresan la proteína Pkc1 marcada con el epítipo TAP, se inmunoprecipitaron con IgG agarosa. La mitad del purificado se utilizó para determinar mediante análisis por *western* la cantidad de proteína Pkc1-TAP y la otra mitad para el análisis de la actividad quinasa de Pkc1. Se incluye un control de la cepa salvaje W303-1a sin marcar (no tag). En la figura, se muestra en la parte superior la imagen correspondiente al ensayo de actividad quinasa y en la parte inferior la imagen correspondiente al western de Pkc1-TAP. B) Se muestra la media de la actividad quinasa específica de Pkc1 respecto a la cepa salvaje obtenida a partir de tres experimentos independientes.

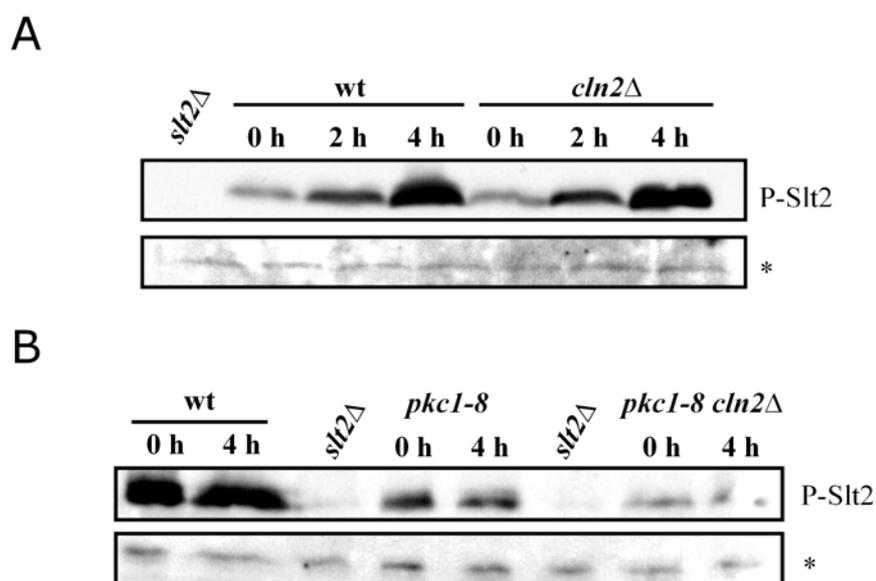


Figura 6.6. Análisis de la activación de Slt2 en mutantes *cln2Δ*. Análisis por *western* de la fosforilación de Slt2 en extractos de células de las cepas salvaje (W303-1a) y *cln2Δ* (JCY296) (A) y salvaje (W303-1a), *pkc1-8* (JCY63a) y *pkc1-8 cln2Δ* (JCY409) (B). Las células se cultivaron en YPD a 25°C y se incubaron a 37°C los tiempos que se indica en la figura. Se incluye un control de la cepa mutante *slt2Δ* (JCY464). El asterisco indica una banda inespecífica que se muestra como control de carga.

Por último, con el motivo de estudiar si la supresión de mutantes de la ruta PKC por la delección del gen *CLN2* se debe a la activación de la transcripción dependiente de la ruta, se estudió la expresión de una fusión génica conteniendo la secuencia codificante del gen de la β-galactosidasa bajo el control de un fragmento de -476 a-391 del promotor del gen *FKS1* (pF476-391:*FKS1*). En los mutantes *pkc1-8* y *slt2Δ* se observa una severa reducción de más de 10 veces de la actividad β-galactosidasa respecto a la

cepa salvaje (Figura 6.7). En los dobles mutantes *pkc1-8 cln2Δ* y *slt2Δ cln2Δ* no se recuperan los niveles de actividad de la cepa salvaje. Este resultado es consistente con los descritos anteriormente y confirman que la inactivación de *CLN2* no afecta a la actividad de la ruta PKC y que la supresión de los defectos de crecimiento de los mutantes de la ruta PKC por la inactivación de *Cln2* no se debe a la recuperación de la actividad de la ruta.

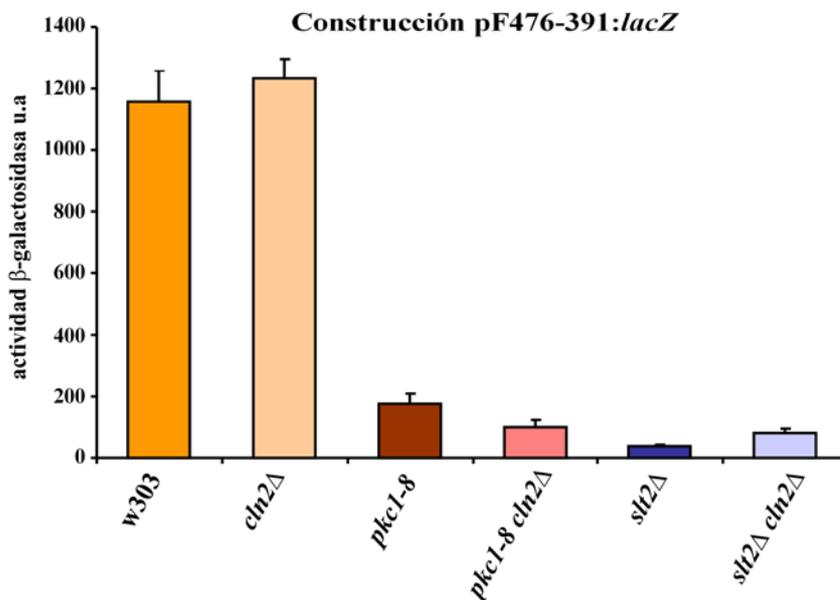


Figura 6.7. Efecto de la mutación *cln2Δ* en la expresión del gen *FKS1*. Se analizó la actividad β-galactosidasa en extractos de las cepas (W303-1a) y mutantes *cln2Δ* (JCY296), *pkc1-8* (JCY63a), *pkc1-8 cln2Δ* (JCY409), *slt2Δ* (JCY464) y *slt2Δ cln2Δ* (JCY612) transformadas con el plásmido pF476-391:*lacZ*, que contiene el gen *lacZ* bajo el control de la secuencia de -476 a -391 del promotor del gen *FKS1*. Las células se cultivaron a 25°C y se incubaron 4 h a 37°C. Los valores representan la media de tres transformantes diferentes.

¿REGULA LA RUTA PKC LA ACTIVIDAD DE LA CICLINA CLN2?

Una hipótesis alternativa para explicar las interacciones genéticas entre Cln2 y la ruta PKC es que la ruta regulara negativamente la actividad de la ciclina Cln2. En un primer lugar, se analizó si los niveles de ciclina Cln2 se ven afectados en cepas mutantes en la ruta PKC. Para ello, se determinaron los niveles celulares de Cln2 en las cepas salvaje (W303-1a) y mutantes *pkc1-8* y *slt2Δ* que expresan una versión de Cln2 marcada en el extremo carboxilo terminal con el epítipo HA. Se tomaron muestras de las células cultivadas a 25°C y también tras incubadas 4 horas a 37°C. Tal como se muestra en la Figura 6.8, no se observaron diferencias importantes en la cantidad de proteína Cln2 en ninguna de las cepas analizadas. Esto indica

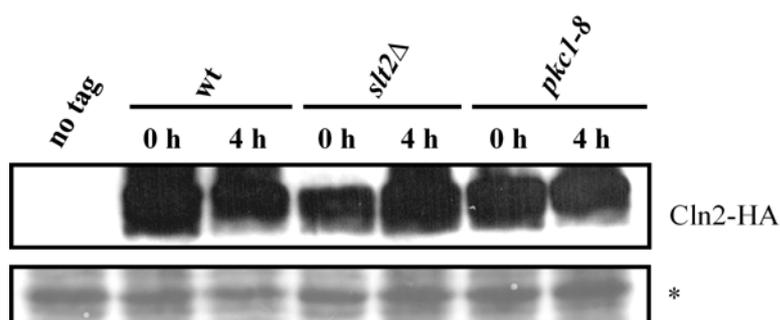


Figura 6.8. Análisis de los niveles de la ciclina Cln2 en mutantes de la ruta PKC. Extractos de las cepas salvaje (W303-1a), *pkc1-8* (JCY63a) y *slt2Δ* (JCY464) transformadas con el plásmido pCLN2-HA que expresan la ciclina Cln2 marcada con el epítipo HA se analizaron por *western*. Se incluye un control de la cepa salvaje (W303-1a) transformada con un plásmido control (no tag). Las células se cultivaron a 25°C en medio SD y se incubaron a 37°C los tiempos indicados en la figura. El asterisco indica una banda de la tinción de la membrana con Ponceau que se muestra como control de carga.

que la inactivación de la ruta PKC no afecta a la expresión de la proteína Cln2. Es necesario puntualizar que la experiencia se ha realizado con cultivos asincrónicos. La expresión del gen *CLN2* es fuertemente periódica, por lo que no se puede descartar que pudieran existir cambios en la periodicidad de la expresión de la ciclina a lo largo del ciclo celular.

Finalmente, se investigó si la ruta PKC es capaz de regular la actividad de la quinasa Cdc28-Cln2. Para ello se realizaron ensayos quinasa de Cdc28-Cln2 en una cepa mutante en *Pkc1* (Figura 6.9). A partir de extractos de células salvajes y mutantes *pkc1-8* transformadas con un plásmido que expresa la ciclina etiquetada con el epítipo HA, se inmunoprecipitó la ciclina Cln2-HA y se determinó la actividad quinasa presente en el purificado utilizando la histona H1 como sustrato. No se observaron diferencias significativas en la actividad quinasa específica de Cdc28-Cln2 en la cepa *pkc1-8* respecto de la cepa salvaje. Por tanto, la ruta PKC no parece implicada en la regulación de la actividad quinasa Cdc28-Cln2.

DISCUSIÓN

Los experimentos realizados en este capítulo nos han permitido identificar una interacción genética entre la ruta PKC y la ciclina Cln2. La inactivación de la ciclina suprime los defectos de crecimiento de mutantes en la ruta PKC mientras que su sobreexpresión es letal en estos mutantes. Estas interacciones reflejan un antagonismo funcional entre la ruta PKC y la ciclina Cln2 en las células de *S. cerevisiae*, pero: ¿cuál es la base de la interacción genética detectada?

Los resultados obtenidos en este estudio descartan la existencia de una regulación directa entre la actividad Cln2 y la ruta PKC. Por una parte,

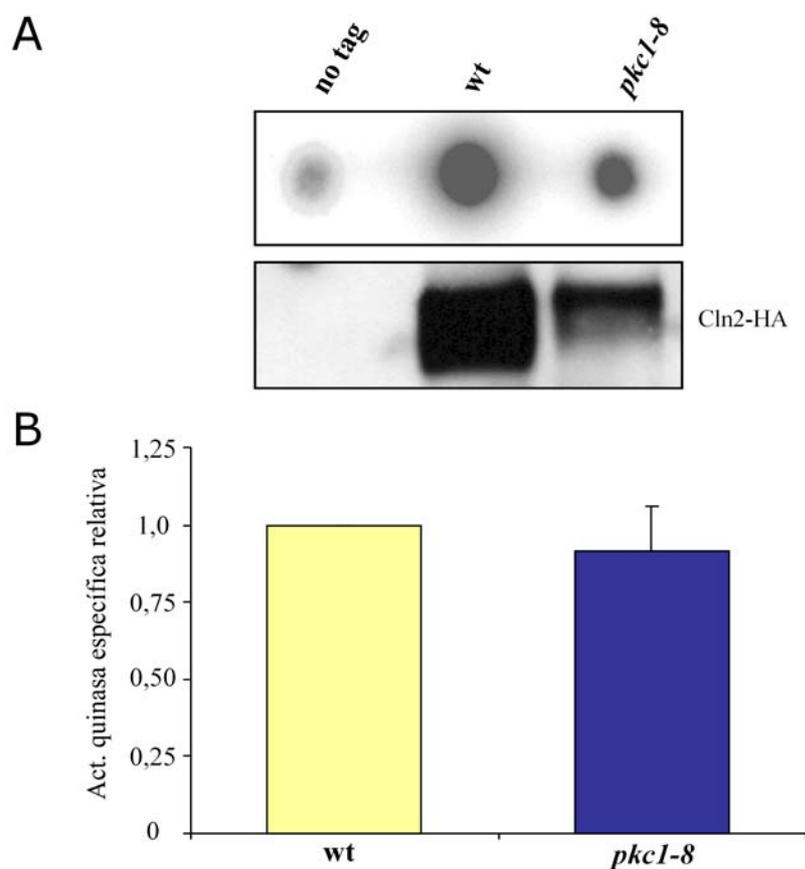


Figura 6.9. Determinación de la actividad quinasa Cdc28-Cln2 en el mutante *pkc1-8*. A) Extractos de células cultivadas a 25°C en medio SD de las cepas salvaje (W303-1a) y mutante *pkc1-8* (JCY63a) transformadas con el plásmido pCLN2-HA que expresan la ciclina Cln2 marcada con el epítipo HA, se inmunoprecipitaron con antiHA. La mitad del purificado se utilizó para determinar mediante *western* la cantidad de proteína Cln2-HA y la otra mitad se utilizó para el análisis de la actividad quinasa asociada a Cln2. Se incluye un control de la cepa salvaje (W303-1a) transformada con un plásmido control sin marcar (no tag). En la figura se muestra en la parte superior la imagen correspondiente al ensayo de actividad quinasa y en la parte inferior la imagen correspondiente al western de Cln2-HA. B) Se muestra la media de la actividad quinasa específica asociada a la ciclina Cln2 respecto a la cepa salvaje obtenida a partir de tres experimentos independientes.

los niveles celulares y la actividad quinasa asociada a Cln2 no experimentaron alteración alguna en cepas mutantes *pkc1-8*. Recíprocamente, la inactivación del gen *CLN2* no provocó modificación alguna en los niveles de proteína ni en la actividad quinasa Pkc1 ni tampoco en la activación de Slt2. Además, los niveles de la forma fosforilada de Slt2 y la transcripción del gen *FKSI*, cuya expresión depende de la ruta PKC, no se recuperan en los dobles mutantes *pkc1-8 cln2Δ* y *slt2Δ cln2Δ*. Por tanto, la supresión de los fenotipos condicionales asociados a defectos en la ruta PKC que se produce cuando se deleta el gen *CLN2* no es debida a una recuperación de la actividad de la ruta.

Los resultados obtenidos en esta tesis, junto con las evidencias obtenidas por otros grupos, nos han llevado a plantear una hipótesis que nos permita explicar el rescate de los defectos asociados a mutaciones en la ruta PKC que se produce al combinar estas mutaciones con la delección del gen *CLN2* y el agravamiento de dichos defectos por la sobreexpresión de la ciclina Cln2. Las cepas mutantes en proteínas de la ruta PKC muestran defectos asociados con fenómenos de lisis celular como sensibilidad a Blanco de Calcofluor, cafeína, SDS, temperatura elevada y otros agentes causantes de daños en la pared celular. La ruta PKC es la principal responsable de mantener la integridad celular. Por ello, las cepas con mutaciones asociadas a la ruta PKC tienen una pared celular debilitada. El paso del crecimiento isotrópico a crecimiento polarizado, como el que ocurre en la gemación o la formación de la proyección de apareamiento, produce grandes cambios en morfogénesis que suponen un estrés para la integridad de la célula. El proceso de gemación para las cepas mutantes en la ruta PKC supone un daño añadido que pone en riesgo aún más la integridad de la célula. Es conocido que la ciclina Cln2 desempeña un importante papel en la transición de crecimiento isotrópico a polarizado (Lew y Reed, 1993; Benton *et al.*, 1993; Gulli *et al.*, 2000; Queralt e Igual, 2004). Según nuestra

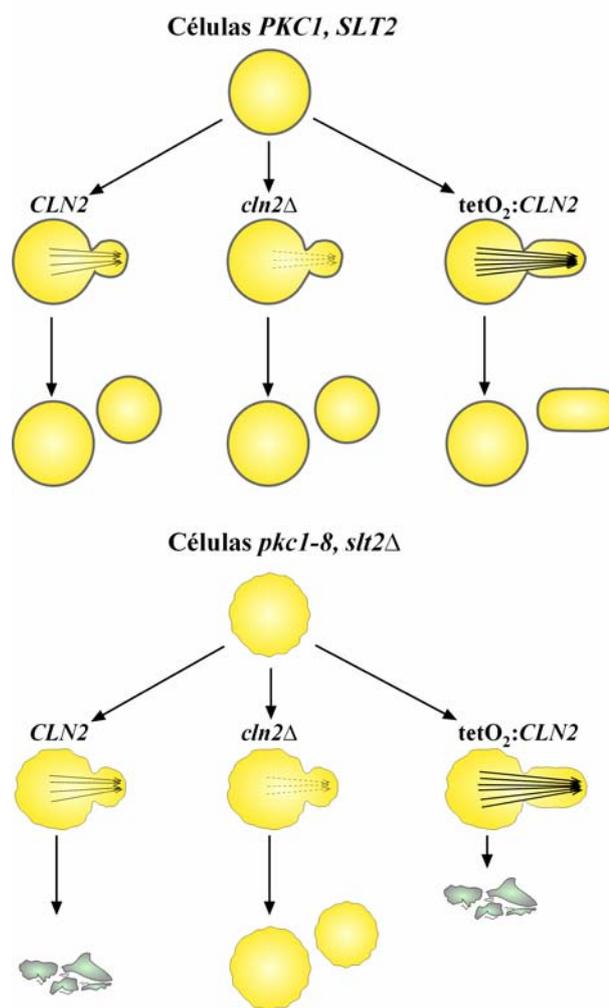


Figura 6.10. Modelo de la interacción génica entre Cln2 y la ruta PKC

hipótesis, la eliminación del gen *CLN2* en un fondo genético mutante en la ruta PKC rescata el crecimiento defectuoso asociado a las mutaciones en la ruta debido a que la actividad Cdc28-Cln2 es deficiente y el proceso de gemación se ve dificultado. El defecto o retardo en la gemación supone para las células *pkc1-8* o *slt2Δ* una reducción del estrés en la pared celular respecto a las células que geman correctamente. Por ello, la delección en el gen *CLN2* mejora la viabilidad celular en presencia de mutaciones en la ruta PKC. Por el contrario, el agravamiento del crecimiento de las cepas mutantes en la ruta PKC por la sobreexpresión del gen *CLN2* se explica de modo opuesto. Se ha observado que se produce hiperpolarización en aquellas células que sobreexpresan la ciclina Cln2 (datos no mostrados y Lew *et al.*, 1993), lo que representa un gran estrés en la pared celular. Las cepas mutantes en la ruta PKC, con la pared celular debilitada, no soportarían dicho estrés y se lisarían. La osmoremediación por adición de sorbitol al medio de cultivo de la letalidad de la sobreexpresión de *CLN2* en mutantes en la ruta PKC apoya esta hipótesis.

7. Conclusiones

Regulación de la expresión del gen *FKSI* por la ruta PKC

1. La secuencia en el promotor del gen *FKSI* responsable de la regulación mediada por la ruta PKC corresponde con un sitio Rlm1BS-like. La expresión del gen depende del factor de transcripción Rlm1, que probablemente se asocia en forma de dímero al promotor. Se ha demostrado que Rlm1 se asocia al DNA en el promotor del gen *FKSI*. La fosforilación de Rlm1 dependiente de la ruta PKC no afecta a los niveles celulares de proteína, a su localización subcelular ni a su unión al DNA.
2. Los resultados obtenidos han determinado que existe un fuerte efecto sinérgico entre los factores de transcripción Rlm1 y SBF, que cooperan en la activación de la expresión génica.
3. Se ha demostrado la asociación al DNA del promotor del gen *FKSI* de la proteína Swi6. Dicha asociación es independiente de la función de las proteínas Slt2 y Pkc1.
4. La MAP quinasa Slt2 se asocia al DNA del gen *FKSI*. Este resultado sugiere que Slt2 pudiera actuar *in situ* regulando a otros factores o a componentes de la maquinaria transcripcional.
5. La RNA polimerasa II se une a los promotores de los genes *FKSI*, *GASI* y *MNNI*, regulados por la ruta PKC. La ruta PKC no regula la asociación de la RNA polimerasa II al DNA de estos genes. En mutantes *pkc1-8* y *slt2Δ* donde la expresión de los genes *FKSI*, *GASI* y *MNNI* está severamente afectada, sorprendentemente la RNA pol II se detectó asociada al final de la zona codificante de los genes.
6. Se ha detectado que la proteína Paf1 se asocia al DNA de los genes *FKSI*, *GASI* y *MNNI*. Paf1 se asocia en la zona localizada en el ATG. La proteína Paf1 se modifica post-traduccionalmente de forma dependiente de la ruta PKC. Esta modificación no afecta a los niveles celulares de la proteína ni a su asociación al ATG de genes regulados

por la ruta PKC; sin embargo, en células mutantes *pkc1-8* y *slt2Δ* la asociación de Paf1 al final de estos genes resulta drásticamente reducida. Los resultados obtenidos sugieren que la ruta PKC podría regular la función del complejo Paf1C en elongación y/o terminación de la transcripción.

Estudio genómico de la regulación de la expresión génica por la ruta PKC

1. El análisis global de la expresión génica en un mutante *pkc1-8* mediante la utilización de macrochips de DNA determinó que 65 genes experimentan cambios significativos en su expresión en células donde la función Pkc1 no está presente. La expresión de 54 genes resultó significativamente reducida mientras que 11 genes presentaron un aumento en su expresión en la cepa mutante *pkc1-8* respecto de la cepa salvaje.
2. La clasificación funcional de los genes detectados reveló que principalmente existen tres grupos de genes cuya expresión se modifica en ausencia de la función Pkc1. Estos grupos incluyen: genes de organización y biogénesis de pared celular, genes de biosíntesis de nucleótidos de purinas y genes que participan en la respuesta celular a la limitación de fosfato. Estos resultados sugieren que la ruta PKC, además de su conocida función en la regulación de la expresión de genes de biosíntesis de pared celular, podría estar implicada en la regulación de la biosíntesis de nucleótidos de purina y en la ruta PHO de respuesta celular a la limitación de fosfato.
3. El análisis realizado determinó que la localización de las proteínas codificadas por gran parte de los genes detectados se sitúa en la pared celular, la membrana plasmática o en sitios de crecimiento polarizado. Esta observación es consistente con el papel de la ruta PKC en

regulación de la biosíntesis de pared celular y su participación en el proceso de crecimiento polarizado.

Identificación de proteínas asociadas a Pkc1 y Slt2

1. Los resultados obtenidos indicando que Pkc1 se asocia fuertemente a la fracción no soluble de las células junto con los resultados obtenidos en el análisis de filtración en gel, sugieren que Pkc1 podría asociarse con otras proteínas y estructuras celulares formando grandes complejos macromoleculares.
2. La purificación por afinidad en tándem (TAP) de Pkc1 ha permitido detectar una posible interacción con las proteínas: Ssk22, Apd1 y Rpc34. Estos resultados sugieren que la ruta PKC a través de la interacción con estas proteínas podría participar respectivamente en la función de la ruta HOG, la organización del citoesqueleto de actina y la transcripción por la RNA pol III.
3. La purificación por afinidad en tándem de Slt2 ha permitido la detección de, entre otras, las proteínas: Kap123, una carioferina implicada en la importación de proteínas al núcleo; Mot1, un represor transcripcional de unión a la caja TATA y Sec31, una proteína involucrada en el transporte mediado por vesículas.
4. La inactivación del gen *KAP123* provoca graves defectos en la integridad celular y termosensibilidad. Estos defectos son suprimibles por la adición de sorbitol al medio de cultivo. Los defectos de crecimiento del mutante *kap123Δ* no se deben a una ausencia de función de la ruta PKC, de hecho la delección del gen *KAP123* provoca una activación constitutiva de la ruta PKC. Sin embargo, la expresión del gen *FKSI* resulta severamente afectada en un mutante *kap123Δ*. Estos resultados sugieren que Kap123 participa en la ruta PKC probablemente controlando la importación al núcleo de Slt2.

Relación de la ruta PKC con la ciclina Cln2

1. La inactivación del gen *CLN2* en células mutantes *pkc1-8* y *slt2Δ* suprime la sensibilidad a temperatura elevada y a estaurosporina de estas cepas. Recíprocamente, la sobreexpresión del gen *CLN2* exacerba el defecto de crecimiento de las cepas mutantes *pkc1-8* y *slt2Δ* en dichas condiciones; la adición de sorbitol al medio de cultivo suprime este defecto, indicando que la sobreexpresión de la ciclina Cln2 provoca un aumento de la debilidad de la pared celular.
2. La ciclina Cln2 no regula los niveles celulares de Pkc1 ni la actividad quinasa de Pkc1. La activación de la MAP quinasa Slr2 y la expresión del gen *FKS1* tampoco mostraron diferencias significativas en células mutantes *cln2* respecto de células salvajes. Por tanto, la supresión de los fenotipos condicionales asociados a defectos en la ruta PKC que se produce cuando se delecta el gen *CLN2* no es debida a una recuperación de la actividad de la ruta.
3. La ruta PKC no controla los niveles celulares de ciclina Cln2 ni su actividad quinasa asociada. Los resultados obtenidos en este capítulo sugieren que el defecto en el proceso de gemación asociado a la inactivación de la ciclina Cln2 produce una disminución del estrés sobre la pared celular, lo que se traduce en la viabilidad de células con una pared celular debilitada como es el caso de las células mutantes en la ruta PKC.

8. *Bibliografĩa*

BIBLIOGRAFÍA

- Abramova, N., Sertil, O., Mehta, S., and Lowry, C. V. 2001. Reciprocal regulation of anaerobic and aerobic cell wall mannoprotein gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.*, 183(9), 2881-2887.
- Alberghina, L., Rossi, R. L., Querin, L., Wanke, V., and Vanoni, M. 2004. A cell sizer network involving Cln3 and Far1 controls entrance into S phase in the mitotic cycle of budding yeast. *J.Cell Biol.*, 167(3), 433-443.
- Alberola, T. M., Garcia-Martinez, J., Antunez, O., Viladevall, L., Barcelo, A., Arino, J., and Perez-Ortin, J. E. 2004. A new set of DNA microchips for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: features and uses. *Int.Microbiol.*, 7(3), 199-206.
- Alberts, A. S., Bouquin, N., Johnston, L. H., and Treisman, R. 1998. Analysis of RhoA-binding proteins reveals an interaction domain conserved in heterotrimeric G protein beta subunits and the yeast response regulator protein Skn7. *J.Biol.Chem.*, 273(15), 8616-8622.
- Alepuz, P. M., 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(10), 2433-2442.
- Alepuz, P. M., Jovanovic, A., Reiser, V., and Ammerer, G. 2001. Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. *Mol.Cell*, 7(4), 767-777.
- Amon, A., Irmiger, 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(7), 1037-1050.
- Amon, A., Tyers, M., Futcher, B., and Nasmyth, K. 1993. Mechanisms that help the yeast cell cycle clock tick: G2 cyclins transcriptionally activate G2 cyclins and repress G1 cyclins. *Cell*, 74(6), 993-1007.
- Andrews, B. and Measday, V. 1998. The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea. *Trends Genet.*, 14(2), 66-72.
- Andrews, P. D. and Stark, M. J. 2000. Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth. *J.Cell Sci.*, 113(15), 2685-2693.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Friedli, L., Payton, M. A., and Paravicini, G. 1994. Protein kinase C in yeast. Characteristics of the *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 gene product. *J.Biol.Chem.*, 269(24), 16821-16828.
- Ares, M. and Proudfoot, N. J. 2005. The spanish connection: transcription and mRNA processing get even closer. *Cell*, 120(2), 163-166.
- Auesukaree, C., Homma, T., Kaneko, Y., and Harashima, S. 2003. Transcriptional regulation of phosphate-responsive genes in low-affinity phosphate-transporter-defective mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 306(4), 843-850.
- Ayscough, K. R., Eby, J. J., Lila, T., Dewar, H., Kozminski, K. G., and Drubin, D. G. 1999. Sla1p is a functionally modular component of the yeast cortical actin

- cytoskeleton required for correct localization of both Rho1p-GTPase and Sla2p, a protein with talin homology. *Mol.Biol.Cell*, 10(4), 1061-1075.
- Azzam, R., Chen, S. L., Shou, W., Mah, A. S., Alexandru, G., Nasmyth, K., Annan, R. S., Carr, S. A., and Deshaies, R. J. 2004. Phosphorylation by cyclin B-Cdk underlies release of mitotic exit activator Cdc14 from the nucleolus. *Science*, 305(5683), 516-519.
- Baetz, K. and Andrews, B. 1999. Regulation of cell cycle transcription factor Swi4 through auto-inhibition of DNA binding. *Mol.Cell Biol.*, 19(10), 6729-6741.
- Baetz, K., Moffat, J., Haynes, J., Chang, M., and Andrews, B. 2001. Transcriptional coregulation by the cell integrity mitogen-activated protein kinase Slt2 and the cell cycle regulator Swi4. *Mol.Cell Biol.*, 21(19), 6515-6528.
- Belli, G., Gari, E., Aldea, M., and Herrero, E. 1998. Functional analysis of yeast essential genes using a promoter-substitution cassette and the tetracycline-regulatable dual expression system. *Yeast*, 14(12), 1127-1138.
- Belli, G., Molina, M. M., Garcia-Martinez, J., Perez-Ortin, J. E., and Herrero, E. 2004. *Saccharomyces cerevisiae* glutaredoxin 5-deficient cells subjected to continuous oxidizing conditions are affected in the expression of specific sets of genes. *J.Biol.Chem.*, 279(13), 12386-12395.
- Benton, B. K., Tinkelenberg, A. H., Jean, D., Plump, S. D., and Cross, F. R. 1993. Genetic analysis of Cln/Cdc28 regulation of cell morphogenesis in budding yeast. *EMBO J.*, 12(13), 5267-5275.
- Betz, J. L., Chang, M., Washburn, T. M., Porter, S. E., Mueller, C. L., and Jaehning, J. A. 2002. Phenotypic analysis of Paf1/RNA polymerase II complex mutations reveals connections to cell cycle regulation, protein synthesis, and lipid and nucleic acid metabolism. *Mol.Genet.Genomics*, 268(2), 272-285.
- Bickle, M., Delley, P. A., Schmidt, A., and Hall, M. N. 1998. Cell wall integrity modulates RHO1 activity via the exchange factor ROM2. *EMBO J.*, 17(8), 2235-2245.
- Bjorklund, S. and Gustafsson, C. M. 2005. The yeast Mediator complex and its regulation. *Trends Biochem.Sci.*, 30(5), 240-244.
- Booher, R. N., Deshaies, R. J., and Kirschner, M. W. 1993. Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. *EMBO J.*, 12(9), 3417-3426.
- Boorsma, A., de Nobel, H., ter Riet, B., Bargmann, B., Brul, S., Hellingwerf, K. J., and Klis, F. M. 2004. Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 21(5), 413-427.
- Brandao, R. L., Etchebehere, L., Queiroz, C. C., Tropia, M. J., Erlandes, J. R., Goncalves, T., Loureiro-Dias, M. C., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Leiper, F. C., Carling, D., and Castro, I. M. 2002. Evidence for involvement of *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C in glucose induction of HXT genes and derepression of SUC2. *FEMS Yeast Res.*, 2(2), 93-102.
- Breeden, L. 1996. Start-specific transcription in yeast. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, 208, 95-127.

- Breeden, L. and Mikesell, G. 1994. Three independent forms of regulation affect expression of HO, CLN1 and CLN2 during the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 138(4), 1015-1024.
- Breeden, L. L. 2000. Cyclin transcription: Timing is everything. *Curr.Biol.*, 10(16), R586-R588.
- Breeden, L. L. 2003. Periodic transcription: a cycle within a cycle. *Curr.Biol.*, 13(1), R31-R38.
- Breton, A. M., Schaeffer, J., and Aigle, M. 2001. The yeast Rvs161 and Rvs167 proteins are involved in secretory vesicles targeting the plasma membrane and in cell integrity. *Yeast*, 18(11), 1053-1068.
- Brown, J. L., Bussey, H., and Stewart, R. C. 1994. Yeast Skn7p functions in a eukaryotic two-component regulatory pathway. *EMBO J.*, 13(21), 5186-5194.
- Bulik, D. A., Olczak, M., Lucero, H. A., Osmond, B. C., Robbins, P. W., and Specht, C. A. 2003. Chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* in response to supplementation of growth medium with glucosamine and cell wall stress. *Eukaryot.Cell*, 2(5), 886-900.
- Caro, L. H., Tettelin, H., Vossen, J. H., Ram, A. F., van Den, Ende H., and Klis, F. M. 1997. In silico identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13(15), 1477-1489.
- Casamayor, A., Torrance, P. D., Kobayashi, T., Thorner, J., and Alessi, D. R. 1999. Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Curr.Biol.*, 9(4), 186-197.
- Chadick, J. Z. and Asturias, F. J. 2005. Structure of eukaryotic Mediator complexes. *Trends Biochem.Sci.*, 30(5), 264-271.
- Chai, B., Hsu, J. M., Du, J., and Laurent, B. C. 2002. Yeast RSC function is required for organization of the cellular cytoskeleton via an alternative PKC1 pathway. *Genetics*, 161(2), 575-584.
- Chang, M., French-Cornay, D., Fan, H. Y., Klein, H., Denis, C. L., and Jaehning, J. A. 1999. A complex containing RNA polymerase II, Paf1p, Cdc73p, Hpr1p, and Ccr4p plays a role in protein kinase C signaling. *Mol.Cell Biol.*, 19(2), 1056-1067.
- Chavez, S. and Aguilera, A. 1997. The yeast HPR1 gene has a functional role in transcriptional elongation that uncovers a novel source of genome instability. *Genes Dev.*, 11(24), 3459-3470.
- Chen, J., Chiang, Y. C., and Denis, C. L. 2002. CCR4, a 3'-5' poly(A) RNA and ssDNA exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic deadenylase. *EMBO J.*, 21(6), 1414-1426.
- Cho, R. J., Campbell, M. J., Winzeler, E. A., Steinmetz, L., Conway, A., Wodicka, L., Wolfsberg, T. G., Gabrielian, A. E., Landsman, D., Lockhart, D. J., and Davis, R. W. 1998. A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol.Cell*, 2(1), 65-73.

- Choi, M. G., Park, T. S., and Carman, G. M. 2003. Phosphorylation of *Saccharomyces cerevisiae* CTP synthetase at Ser424 by protein kinases A and C regulates phosphatidylcholine synthesis by the CDP-choline pathway. *J.Biol.Chem.*, 278(26), 23610-23616.
- Collart, M. A. 1996. The NOT, SPT3, and MOT1 genes functionally interact to regulate transcription at core promoters. *Mol.Cell Biol.*, 16(12), 6668-6676.
- Collister, M., Didmon, M. P., MacIsaac, F., Stark, M. J., MacDonald, N. Q., and Keyse, S. M. 2002. YIL113w encodes a functional dual-specificity protein phosphatase which specifically interacts with and inactivates the Slr2/Mpk1p MAP kinase in *S. cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 527(1-3), 186-192.
- Cosma, M. P. 2002. Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation. *Mol.Cell*, 10(2), 227-236.
- Costanzo, M., Nishikawa, J. L., Tang, X., Millman, J. S., Schub, O., Breitkreuz, K., Dewar, D., Rupes, I., Andrews, B., and Tyers, M. 2004. CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast. *Cell*, 117(7), 899-913.
- Costigan, C., Gehrung, S., and Snyder, M. 1992. A synthetic lethal screen identifies SLK1, a novel protein kinase homolog implicated in yeast cell morphogenesis and cell growth. *Mol.Cell Biol.*, 12(3), 1162-1178.
- Costigan, C., Kolodrubetz, D., and Snyder, M. 1994. NHP6A and NHP6B, which encode HMG1-like proteins, are candidates for downstream components of the yeast SLT2 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol.Cell Biol.*, 14(4), 2391-2403.
- Cross, F. R., Hoek, M., McKinney, J. D., and Tinkelenberg, A. H. 1994. Role of Swi4 in cell cycle regulation of CLN2 expression. *Mol.Cell Biol.*, 14(7), 4779-4787.
- Cvrckova, F. and Nasmyth, K. 1993. Yeast G1 cyclins CLN1 and CLN2 and a GAP-like protein have a role in bud formation. *EMBO J.*, 12(13), 5277-5286.
- Davenport, K. R., Sohaskey, M., Kamada, Y., Levin, D. E., and Gustin, M. C. 1995. A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *J.Biol.Chem.*, 270(50), 30157-30161.
- de Bruin, R. A., McDonald, W. H., Kalashnikova, T. I., Yates, J., III, and Wittenberg, C. 2004. Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5. *Cell*, 117(7), 887-898.
- de la Torre-Ruiz, A., Torres, J., Arino, J., and Herrero, E. 2002. Sit4 is required for proper modulation of the biological functions mediated by Pkc1 and the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.*, 277(36), 33468-33476.
- de Nadal, E., Casadome, L., and Posas, F. 2003. Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase. *Mol.Cell Biol.*, 23(1), 229-237.

- de Nadal, E., Zapater, M., Alepuz, P. M., Sumoy, L., Mas, G., and Posas, F. 2004. The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoresponsive genes. *Nature*, 427(6972), 370-374.
- de Nobel, H., Ruiz, C., Martin, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M., and Klis, F. M. 2000. Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology*, 146 (Pt 9), 2121-2132.
- deHart, A. K., Schnell, J. D., Allen, D. A., Tsai, J. Y., and Hicke, L. 2003. Receptor internalization in yeast requires the Tor2-Rho1 signaling pathway. *Mol.Biol.Cell*, 14(11), 4676-4684.
- Delgado, M. L., O'Connor, J. E., Azorin, I., Renau-Piqueras, J., Gil, M. L., and Gozalbo, D. 2001. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* TDH1, TDH2 and TDH3 genes are also cell wall proteins. *Microbiology*, 147(Pt 2), 411-417.
- Delley, P. A. and Hall, M. N. 1999. Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *J.Cell Biol.*, 147(1), 163-174.
- Denis, V. and Cyert, M. S. 2005. Molecular analysis reveals localization of *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C to sites of polarized growth and Pkc1p targeting to the nucleus and mitotic spindle. *Eukaryot.Cell*, 4(1), 36-45.
- DeSalle, L. M. and Pagano, M. 2001. Regulation of the G1 to S transition by the ubiquitin pathway. *FEBS Lett.*, 490(3), 179-189.
- Dirick, L., Bohm, T., and Nasmyth, K. 1995. Roles and regulation of Cln-Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 14(19), 4803-4813.
- Dodou, E. and Treisman, R. 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol.Cell Biol.*, 17(4), 1848-1859.
- Donaldson, A. D., Raghuraman, M. K., Friedman, K. L., Cross, F. R., Brewer, B. J., and Fangman, W. L. 1998. CLB5-dependent activation of late replication origins in *S. cerevisiae*. *Mol.Cell*, 2(2), 173-182.
- Drgonova, J., Drgon, T., Roh, D. H., and Cabib, E. 1999. The GTP-binding protein Rho1p is required for cell cycle progression and polarization of the yeast cell. *J.Cell Biol.*, 146(2), 373-387.
- Drgonova, J., Drgon, T., Tanaka, K., Kollar, R., Chen, G. C., Ford, R. A., Chan, C. S., Takai, Y., and Cabib, E. 1996. Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science*, 272(5259), 277-279.
- Dudoit, S., Yang, Y. H., Callow, M. J., and Speed T.P. 2002. Statistical methods for identifying genes with differential expression in replicated cDNA microarray experiments. *Stat.Sin.*, 12(1), 111-139.
- Edgington, N. P. and Futcher, B. 2001. Relationship between the function and the location of G1 cyclins in *S. cerevisiae*. *J.Cell Sci.*, 114(Pt 24), 4599-4611.

- Edmunds, J. W. and Mahadevan, L. C. 2004. MAP kinases as structural adaptors and enzymatic activators in transcription complexes. *J.Cell Sci.*, 117(Pt 17), 3715-3723.
- Entian, K. D., Schuster, T., Hegemann, J. H., Becher, D., Feldmann, H., Guldener, U., Gotz, R., Hansen, M., Hollenberg, C. P., Jansen, G., Kramer, W., Klein, S., Kotter, P., Kricke, J., Launhardt, H., Mannhaupt, G., Maierl, A., Meyer, P., Mewes, W., Munder, T., Niedenthal, R. K., Ramezani, Rad M., Rohmer, A., Romer, A., Hinnen, A., and . 1999. Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol.Gen.Genet.*, 262(4-5), 683-702.
- Epstein, C. B. and Cross, F. R. 1992. CLB5: a novel B cyclin from budding yeast with a role in S phase. *Genes Dev.*, 6(9), 1695-1706.
- Fan, H. Y. and Klein, H. L. 1994. Characterization of mutations that suppress the temperature-sensitive growth of the hpr1 delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 137(4), 945-956.
- Farr, K. A. and Hoyt, M. A. 1998. Bub1p kinase activates the *Saccharomyces cerevisiae* spindle assembly checkpoint. *Mol.Cell Biol.*, 18(5), 2738-2747.
- Fitch, I., Dahmann, C., Surana, U., Amon, A., Nasmyth, K., Goetsch, L., Byers, B., and Futcher, B. 1992. Characterization of four B-type cyclin genes of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Biol.Cell*, 3(7), 805-818.
- Flandez, M., Cosano, I. C., Nombela, C., Martin, H., and Molina, M. 2004. Reciprocal regulation between Slit2 MAPK and isoforms of Msg5 dual-specificity protein phosphatase modulates the yeast cell integrity pathway. *J.Biol.Chem.*, 279(12), 11027-11034.
- Flick, J. S. and Thorner, J. 1998. An essential function of a phosphoinositide-specific phospholipase C is relieved by inhibition of a cyclin-dependent protein kinase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 148(1), 33-47.
- Fujiwara, T., Tanaka, K., Mino, A., Kikyo, M., Takahashi, K., Shimizu, K., and Takai, Y. 1998. Rho1p-Bni1p-Spa2p interactions: implication in localization of Bni1p at the bud site and regulation of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Biol.Cell*, 9(5), 1221-1233.
- Garcia, R., Bermejo, C., Grau, C., Perez, R., Rodriguez-Pena, J. M., Francois, J., Nombela, C., and Arroyo, J. 2004. The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J.Biol.Chem.*, 279(15), 15183-15195.
- Garcia-Gimeno, M. A. and Struhl, K. 2000. Aca1 and Aca2, ATF/CREB activators in *Saccharomyces cerevisiae*, are important for carbon source utilization but not the response to stress. *Mol.Cell Biol.*, 20(12), 4340-4349.
- Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. 1997. A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13(9), 837-848.

- Gari, E., Volpe, T., Wang, H., Gallego, C., Futcher, B., and Aldea, M. 2001. Whi3 binds the mRNA of the G1 cyclin CLN3 to modulate cell fate in budding yeast. *Genes Dev.*, 15(21), 2803-2808.
- Gasch, A. P. and Werner-Washburne, M. 2002. The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Funct.Integr.Genomics*, 2(4-5), 181-192.
- Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M. A., Copley, R. R., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G., and Superti-Furga, G. 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, 415(6868), 141-147.
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., and Woods, R. A. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 11(4), 355-360.
- Goldfarb, D. S. 1997. Nuclear transport: proliferating pathways. *Curr.Biol.*, 7(1), R13-R16.
- Gomes, K. N., Freitas, S. M., Pais, T. M., Fietto, J. L., Totola, A. H., Arantes, R. M., Martins, A., Lucas, C., Schuller, D., Casal, M., Castro, I. M., Fietto, L. G., and Brandao, R. L. 2005. Deficiency of Pkc1 activity affects glycerol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 5(8), 767-776.
- Grandin, N. and Reed, S. I. 1993. Differential function and expression of *Saccharomyces cerevisiae* B-type cyclins in mitosis and meiosis. *Mol.Cell Biol.*, 13(4), 2113-2125.
- Gray, J. V., Ogas, J. P., Kamada, Y., Stone, M., Levin, D. E., and Herskowitz, I. 1997. A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. *EMBO J.*, 16(16), 4924-4937.
- Gulli, M. P., Jaquenoud, M., Shimada, Y., Niederhauser, G., Wiget, P., and Peter, M. 2000. Phosphorylation of the Cdc42 exchange factor Cdc24 by the PAK-like kinase Cla4 may regulate polarized growth in yeast. *Mol.Cell*, 6(5), 1155-1167.
- Gulli, M. P. and Peter, M. 2001. Temporal and spatial regulation of Rho-type guanine-nucleotide exchange factors: the yeast perspective. *Genes Dev.*, 15(4), 365-379.
- Gumbs, O. H., Campbell, A. M., and Weil, P. A. 2003. High-affinity DNA binding by a Mot1p-TBP complex: implications for TAF-independent transcription. *EMBO J.*, 22(12), 3131-3141.
- Guo, W., Tamanoi, F., and Novick, P. 2001. Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. *Nat.Cell Biol.*, 3(4), 353-360.

- Gustin, M. C., Albertyn, J., Alexander, M., and Davenport, K. 1998. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, 62(4), 1264-1300.
- Haase, S. B., Winey, M., and Reed, S. I. 2001. Multi-step control of spindle pole body duplication by cyclin-dependent kinase. *Nat.Cell Biol.*, 3(1), 38-42.
- Hahn, J. S. and Thiele, D. J. 2002. Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Slr2 kinase pathway by the stress-inducible Sdp1 dual specificity phosphatase. *J.Biol.Chem.*, 277(24), 21278-21284.
- Han, H. J., Park, J. Y., Lee, Y. J., and Park, S. H. 2003. Effect of epidermal growth factor on phosphate uptake in renal proximal tubule cells: involvement of PKC, MAPK, and cPLA2. *Kidney Blood Press Res.*, 26(5-6), 315-324.
- Hardwick, K. G. 1998. The spindle checkpoint. *Trends Genet.*, 14(1), 1-4.
- Harrison, J. C., Bardes, E. S., Ohya, Y., and Lew, D. J. 2001. A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint. *Nat.Cell Biol.*, 3(4), 417-420.
- Harvey, S. L. and Kellogg, D. R. 2003. Conservation of mechanisms controlling entry into mitosis: budding yeast wee1 delays entry into mitosis and is required for cell size control. *Curr.Biol.*, 13(4), 264-275.
- Hazbun, T. R., Malmstrom, L., Anderson, S., Graczyk, B. J., Fox, B., Riffle, M., Sundin, B. A., Aranda, J. D., McDonald, W. H., Chiu, C. H., Snyderman, B. E., Bradley, P., Muller, E. G., Fields, S., Baker, D., Yates, J. R., III, and Davis, T. N. 2003. Assigning function to yeast proteins by integration of technologies. *Mol.Cell*, 12(6), 1353-1365.
- Heinisch, J. J., Lorberg, A., Schmitz, H. P., and Jacoby, J. J. 1999. The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Microbiol.*, 32(4), 671-680.
- Helliwell, S. B., Howald, I., Barbet, N., and Hall, M. N. 1998a. TOR2 is part of two related signaling pathways coordinating cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 148(1), 99-112.
- Helliwell, S. B., Schmidt, A., Ohya, Y., and Hall, M. N. 1998b. The Rho1 effector Pkc1, but not Bni1, mediates signalling from Tor2 to the actin cytoskeleton. *Curr.Biol.*, 8(22), 1211-1214.
- Henchoz, S., Chi, Y., Catarin, B., Herskowitz, I., Deshaies, R. J., and Peter, M. 1997. Phosphorylation- and ubiquitin-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor Far1p in budding yeast. *Genes Dev.*, 11(22), 3046-3060.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S. L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., Yang, L., Wolting, C., Donaldson, I., Schandorff, S., Shewnarane, J., Vo, M., Taggart, J., Goudreau, M., Muskat, B., Alfarano, C., Dewar, D., Lin, Z., Michalickova, K., Willems, A. R., Sassi, H., Nielsen, P. A., Rasmussen, K. J., Andersen, J. R., Johansen, L. E., Hansen, L. H., Jespersen, H., Podtelejnikov, A., Nielsen, E., Crawford, J., Poulsen, V., Sorensen, B. D., Matthiesen, J., Hendrickson, R. C., Gleeson, F., Pawson, T.,

- Moran, M. F., Durocher, D., Mann, M., Hogue, C. W., Figeys, D., and Tyers, M. 2002. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*, 415(6868), 180-183.
- Hohmann, S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, 66(2), 300-372.
- Horak, C. E., Luscombe, N. M., Qian, J., Bertone, P., Piccirillo, S., Gerstein, M., and Snyder, M. 2002. Complex transcriptional circuitry at the G1/S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, 16(23), 3017-3033.
- Hosotani, T., Koyama, H., Uchino, M., Miyakawa, T., and Tsuchiya, E. 2001. PKC1, a protein kinase C homologue of *Saccharomyces cerevisiae*, participates in microtubule function through the yeast EB1 homologue, BIM1. *Genes Cells*, 6(9), 775-788.
- Huang, K. N. and Symington, L. S. 1994. Mutation of the gene encoding protein kinase C 1 stimulates mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.*, 14(9), 6039-6045.
- Hughes, T. R., Marton, M. J., Jones, A. R., Roberts, C. J., Stoughton, R., Armour, C. D., Bennett, H. A., Coffey, E., Dai, H., He, Y. D., Kidd, M. J., King, A. M., Meyer, M. R., Slade, D., Lum, P. Y., Stepaniants, S. B., Shoemaker, D. D., Gachotte, D., Chakraburty, K., Simon, J., Bard, M., and Friend, S. H. 2000. Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell*, 102(1), 109-126.
- Igual, J. C. and Estruch F. 2000. Signalling Stress in Yeast. *Food technol.biotechnol.*, 38(4), 263-276.
- Igual, J. C., Johnson, A. L., and Johnston, L. H. 1996. Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *EMBO J.*, 15(18), 5001-5013.
- Inagaki, M., Schmelzle, T., Yamaguchi, K., Irie, K., Hall, M. N., and Matsumoto, K. 1999. PDK1 homologs activate the Pkc1-mitogen-activated protein kinase pathway in yeast. *Mol.Cell Biol.*, 19(12), 8344-8352.
- Inoue, S. B., Qadota, H., Arisawa, M., Watanabe, T., and Ohya, Y. 1999. Prenylation of Rho1p is required for activation of yeast 1, 3-beta-glucan synthase. *J.Biol.Chem.*, 274(53), 38119-38124.
- Irie, K., Takase, M., Lee, K. S., Levin, D. E., Araki, H., Matsumoto, K., and Oshima, Y. 1993. MKK1 and MKK2, which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Mol.Cell Biol.*, 13(5), 3076-3083.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., and Sakaki, Y. 2001. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 98(8), 4569-4574.
- Iyer, V. R., Horak, C. E., Scafe, C. S., Botstein, D., Snyder, M., and Brown, P. O. 2001. Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. *Nature*, 409(6819), 533-538.

- Johnson, D. I. 1999. Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, 63(1), 54-105.
- Johnson, D. I. and Pringle, J. R. 1990. Molecular characterization of CDC42, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J.Cell Biol.*, 111(1), 143-152.
- Jorgensen, P. and Tyers, M. 1999. Altered states: programmed proteolysis and the budding yeast cell cycle. *Curr.Opin.Microbiol.*, 2(6), 610-617.
- Jorgensen, P. and Tyers, M. 2004. How cells coordinate growth and division. *Curr.Biol.*, 14(23), R1014-R1027.
- Jung, U. S. and Levin, D. E. 1999. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol.Microbiol.*, 34(5), 1049-1057.
- Jung, U. S., Sobering, A. K., Romeo, M. J., and Levin, D. E. 2002. Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Mol.Microbiol.*, 46(3), 781-789.
- Kagami, M., Toh-e A, and Matsui, Y. 1997. SRO9, a multicopy suppressor of the bud growth defect in the *Saccharomyces cerevisiae* rho3-deficient cells, shows strong genetic interactions with tropomyosin genes, suggesting its role in organization of the actin cytoskeleton. *Genetics*, 147(3), 1003-1016.
- Kamada, Y., Jung, U. S., Piotrowski, J., and Levin, D. E. 1995. The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev.*, 9(13), 1559-1571.
- Kamada, Y., Qadota, H., Python, C. P., Anraku, Y., Ohya, Y., and Levin, D. E. 1996. Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. *J.Biol.Chem.*, 271(16), 9193-9196.
- Kapteyn, J. C., van Den, Ende H., and Klis, F. M. 1999. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim.Biophys.Acta*, 1426(2), 373-383.
- Karpova, T. S., Reck-Peterson, S. L., Elkind, N. B., Mooseker, M. S., Novick, P. J., and Cooper, J. A. 2000. Role of actin and Myo2p in polarized secretion and growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Biol.Cell*, 11(5), 1727-1737.
- Kellogg, D. R. 2003. Wee1-dependent mechanisms required for coordination of cell growth and cell division. *J.Cell Sci.*, 116(Pt 24), 4883-4890.
- Ketela, T., Green, R., and Bussey, H. 1999. *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J.Bacteriol.*, 181(11), 3330-3340.
- Khalfan, W., Ivanovska, I., and Rose, M. D. 2000. Functional interaction between the PKC1 pathway and CDC31 network of SPB duplication genes. *Genetics*, 155(4), 1543-1559.
- Kiley, S. C. and Jaken, S. 1990. Activation of alpha-protein kinase C leads to association with detergent-insoluble components of GH4C1 cells. *Mol.Endocrinol.*, 4(1), 59-68.

- Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K., and Brul, S. 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol.Rev.*, 26(3), 239-256.
- Koch, C., Moll, T., Neuberger, M., Ahorn, H., and Nasmyth, K. 1993. A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G1 to S phase. *Science*, 261(5128), 1551-1557.
- Koch, C., Schleiffer, A., Ammerer, G., and Nasmyth, K. 1996. Switching transcription on and off during the yeast cell cycle: Cln/Cdc28 kinases activate bound transcription factor SBF (Swi4/Swi6) at start, whereas Clb/Cdc28 kinases displace it from the promoter in G2. *Genes Dev.*, 10(2), 129-141.
- Koch, G., Tanaka, K., Masuda, T., Yamochi, W., Nonaka, H., and Takai, Y. 1997. Association of the Rho family small GTP-binding proteins with Rho GDP dissociation inhibitor (Rho GDI) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Oncogene*, 15(4), 417-422.
- Koepp, D. M., Harper, J. W., and Elledge, S. J. 1999. How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell*, 97(4), 431-434.
- Kornberg, R. D. 2005. Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem.Sci.*, 30(5), 235-239.
- Krause, S. A. and Gray, J. V. 2002. The protein kinase C pathway is required for viability in quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr.Biol.*, 12(7), 588-593.
- Lagorce, A., Berre-Anton, V., Aguilar-Uscanga, B., Martin-Yken, H., Dagkessamanskaia, A., and Francois, J. 2002. Involvement of GFA1, which encodes glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase, in the activation of the chitin synthesis pathway in response to cell-wall defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur.J.Biochem.*, 269(6), 1697-1707.
- Lagorce, A., Hauser, N. C., Labourdette, D., Rodriguez, C., Martin-Yken, H., Arroyo, J., Hoheisel, J. D., and Francois, J. 2003. Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.*, 278(22), 20345-20357.
- Lanker, S., Valdivieso, M. H., and Wittenberg, C. 1996. Rapid degradation of the G1 cyclin Cln2 induced by CDK-dependent phosphorylation. *Science*, 271(5255), 1597-1601.
- Lee, B. N. and Elion, E. A. 1999. The MAPKKK Ste11 regulates vegetative growth through a kinase cascade of shared signaling components. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 96(22), 12679-12684.
- Lee, K. S., Irie, K., Gotoh, Y., Watanabe, Y., Araki, H., Nishida, E., Matsumoto, K., and Levin, D. E. 1993. A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol.Cell Biol.*, 13(5), 3067-3075.
- Lee, K. S. and Levin, D. E. 1992. Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol.Cell Biol.*, 12(1), 172-182.

- Lee, Y. J., Park, S. H., Jeung, T. O., Kim, K. W., Lee, J. H., and Han, H. J. 2005. Effect of adenosine triphosphate on phosphate uptake in renal proximal tubule cells: Involvement of PKC and p38 MAPK. *J.Cell Physiol.*
- Lengronne, A. and Schwob, E. 2002. The yeast CDK inhibitor Sic1 prevents genomic instability by promoting replication origin licensing in late G(1). *Mol.Cell*, 9(5), 1067-1078.
- Levin, D. E. 2005. Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, 69(2), 262-291.
- Levin, D. E. and Bartlett-Heubusch, E. 1992. Mutants in the *S. cerevisiae* PKC1 gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J.Cell Biol.*, 116(5), 1221-1229.
- Levin, D. E., Bowers, B., Chen, C. Y., Kamada, Y., and Watanabe, M. 1994. Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol.Biol.Res.*, 40(3), 229-239.
- Levin, D. E., Fields, F. O., Kunisawa, R., Bishop, J. M., and Thorner, J. 1990. A candidate protein kinase C gene, PKC1, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell*, 62(2), 213-224.
- Lew, D. J. 2000. Cell-cycle checkpoints that ensure coordination between nuclear and cytoplasmic events in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, 10(1), 47-53.
- Lew, D. J. 2003. The morphogenesis checkpoint: how yeast cells watch their figures. *Curr.Opin.Cell Biol.*, 15(6), 648-653.
- Lew, D. J. and Burke, D. J. 2003. The spindle assembly and spindle position checkpoints. *Annu.Rev.Genet.*, 37, 251-282.
- Lew, D. J. and Reed, S. I. 1993. Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *J.Cell Biol.*, 120(6), 1305-1320.
- Lewis, B. A. and Reinberg, D. 2003. The mediator coactivator complex: functional and physical roles in transcriptional regulation. *J.Cell Sci.*, 116(Pt 18), 3667-3675.
- Li, Y., Moir, R. D., Sethy-Coraci, I. K., Warner, J. R., and Willis, I. M. 2000. Repression of ribosome and tRNA synthesis in secretion-defective cells is signaled by a novel branch of the cell integrity pathway. *Mol.Cell Biol.*, 20(11), 3843-3851.
- Lipke, P. N. and O valle, R. 1998. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J.Bacteriol.*, 180(15), 3735-3740.
- Lipschutz, J. H. and Mostov, K. E. 2002. Exocytosis: the many masters of the exocyst. *Curr.Biol.*, 12(6), R212-R214.
- Liu, H. P. and Bretscher, A. 1989. Disruption of the single tropomyosin gene in yeast results in the disappearance of actin cables from the cytoskeleton. *Cell*, 57(2), 233-242.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P. *et al.* (2004) *Molecular Cell Biology*. New York: W. H. Freeman and company.

- Longtine, M. S., McKenzie, A., III, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J. R. 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(10), 953-961.
- Loog, M. and Morgan, D. O. 2005. Cyclin specificity in the phosphorylation of cyclin-dependent kinase substrates. *Nature*, 434(7029), 104-108.
- Lopez-Ribot, J. L. and Chaffin, W. L. 1996. Members of the Hsp70 family of proteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.*, 178(15), 4724-4726.
- Lu, J. M., Deschenes, R. J., and Fassler, J. S. 2003. *Saccharomyces cerevisiae* histidine phosphotransferase Ypd1p shuttles between the nucleus and cytoplasm for SLN1-dependent phosphorylation of Ssk1p and Skn7p. *Eukaryot.Cell*, 2(6), 1304-1314.
- Luo, H. R., Saiardi, A., Yu, H., Nagata, E., Ye, K., and Snyder, S. H. 2002. Inositol pyrophosphates are required for DNA hyperrecombination in protein kinase c1 mutant yeast. *Biochemistry*, 41(8), 2509-2515.
- MacKay, V. L., Mai, B., Waters, L., and Breeden, L. L. 2001. Early cell cycle box-mediated transcription of CLN3 and SWI4 contributes to the proper timing of the G(1)-to-S transition in budding yeast. *Mol.Cell Biol.*, 21(13), 4140-4148.
- Madaule, P., Axel, R., and Myers, A. M. 1987. Characterization of two members of the rho gene family from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 84(3), 779-783.
- Madden, K., Sheu, Y. J., Baetz, K., Andrews, B., and Snyder, M. 1997. SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science*, 275(5307), 1781-1784.
- Madden, K. and Snyder, M. 1998. Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. *Annu.Rev.Microbiol.*, 52, 687-744.
- Mangus, D. A., Amrani, N., and Jacobson, A. 1998. Pbp1p, a factor interacting with *Saccharomyces cerevisiae* poly(A)-binding protein, regulates polyadenylation. *Mol.Cell Biol.*, 18(12), 7383-7396.
- Marini, N. J., Meldrum, E., Buehrer, B., Hubberstey, A. V., Stone, D. E., Traynor-Kaplan, A., and Reed, S. I. 1996. A pathway in the yeast cell division cycle linking protein kinase C (Pkc1) to activation of Cdc28 at START. *EMBO J.*, 15(12), 3040-3052.
- Martin, H., Castellanos, M. C., Cenamor, R., Sanchez, M., Molina, M., and Nombela, C. 1996. Molecular and functional characterization of a mutant allele of the mitogen-activated protein-kinase gene SLT2(MPK1) rescued from yeast autolytic mutants. *Curr.Genet.*, 29(6), 516-522.
- Martin, H., Rodriguez-Pachon, J. M., Ruiz, C., Nombela, C., and Molina, M. 2000. Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.*, 275(2), 1511-1519.

- Martin-Yken, H., Dagkessamanskaia, A., Basmaji, F., Lagorce, A., and Francois, J. 2003. The interaction of Slf2 MAP kinase with Knr4 is necessary for signalling through the cell wall integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Microbiol.*, 49(1), 23-35.
- Martin-Yken, H., Dagkessamanskaia, A., Talibi, D., and Francois, J. 2002. KNR4 is a member of the PKC1 signalling pathway and genetically interacts with BCK2, a gene involved in cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr.Genet.*, 41(5), 323-332.
- Martinez-Anaya, C., Dickinson, J. R., and Sudbery, P. E. 2003. In yeast, the pseudohyphal phenotype induced by isoamyl alcohol results from the operation of the morphogenesis checkpoint. *J.Cell Sci.*, 116(Pt 16), 3423-3431.
- Masmoudi, A., Labourdette, G., Mersel, M., Huang, F. L., Huang, K. P., Vincendon, G., and Malviya, A. N. 1989. Protein kinase C located in rat liver nuclei. Partial purification and biochemical and immunochemical characterization. *J.Biol.Chem.*, 264(2), 1172-1179.
- Masuda, T., Tanaka, K., Nonaka, H., Yamochi, W., Maeda, A., and Takai, Y. 1994. Molecular cloning and characterization of yeast rho GDP dissociation inhibitor. *J.Biol.Chem.*, 269(31), 19713-19718.
- Matsui, Y. and Toh, E. 1992. Yeast RHO3 and RHO4 ras superfamily genes are necessary for bud growth, and their defect is suppressed by a high dose of bud formation genes CDC42 and BEM1. *Mol.Cell Biol.*, 12(12), 5690-5699.
- Mattison, C. P., Spencer, S. S., Kresge, K. A., Lee, J., and Ota, I. M. 1999. Differential regulation of the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast by the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3. *Mol.Cell Biol.*, 19(11), 7651-7660.
- Mazzoni, C., Zarov, P., Rambourg, A., and Mann, C. 1993. The SLT2 (MPK1) MAP kinase homolog is involved in polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.*, 123(6), 1821-1833.
- Mead, J., Bruning, A. R., Gill, M. K., Steiner, A. M., Acton, T. B., and Vershon, A. K. 2002. Interactions of the Mcm1 MADS box protein with cofactors that regulate mating in yeast. *Mol.Cell Biol.*, 22(13), 4607-4621.
- Mendenhall, M. D. 1993. An inhibitor of p34CDC28 protein kinase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 259(5092), 216-219.
- Mendenhall, M. D. and Hodge, A. E. 1998. Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, 62(4), 1191-1243.
- Millar, J. B. 1999. Stress-activated MAP kinase (mitogen-activated protein kinase) pathways of budding and fission yeasts. *Biochem.Soc.Symp.*, 64, 49-62.
- Miller, M. E. and Cross, F. R. 2000. Distinct subcellular localization patterns contribute to functional specificity of the Cln2 and Cln3 cyclins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.*, 20(2), 542-555.
- Miller, M. E. and Cross, F. R. 2001. Cyclin specificity: how many wheels do you need on a unicycle? *J.Cell Sci.*, 114(Pt 10), 1811-1820.

- Mizunuma, M., Hirata, D., Miyahara, K., Tsuchiya, E., and Miyakawa, T. 1998. Role of calcineurin and Mpk1 in regulating the onset of mitosis in budding yeast. *Nature*, 392(6673), 303-306.
- Mizunuma, M., Hirata, D., Miyaoka, R., and Miyakawa, T. 2001. GSK-3 kinase Mck1 and calcineurin coordinately mediate Hsl1 down-regulation by Ca²⁺ in budding yeast. *EMBO J.*, 20(5), 1074-1085.
- Mochly-Rosen, D., Henrich, C. J., Cheever, L., Khaner, H., and Simpson, P. C. 1990. A protein kinase C isozyme is translocated to cytoskeletal elements on activation. *Cell Regul.*, 1(9), 693-706.
- Moffat, J. and Andrews, B. 2004. Late-G1 cyclin-CDK activity is essential for control of cell morphogenesis in budding yeast. *Nat. Cell Biol.*, 6(1), 59-66.
- Morgan, D. O. 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 13, 261-291.
- Morgan, D. O. 1999. Regulation of the APC and the exit from mitosis. *Nat. Cell Biol.*, 1(2), E47-E53.
- Mosammaparast, N., Guo, Y., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and Pemberton, L. F. 2002. Pathways mediating the nuclear import of histones H3 and H4 in yeast. *J. Biol. Chem.*, 277(1), 862-868.
- Mueller, C. L. and Jaehning, J. A. 2002. Ctr9, Rtf1, and Leo1 are components of the Paf1/RNA polymerase II complex. *Mol. Cell Biol.*, 22(7), 1971-1980.
- Mueller, C. L., Porter, S. E., Hoffman, M. G., and Jaehning, J. A. 2004. The Paf1 complex has functions independent of actively transcribing RNA polymerase II. *Mol. Cell*, 14(4), 447-456.
- Muldrow, T. A., Campbell, A. M., Weil, P. A., and Auble, D. T. 1999. MOT1 can activate basal transcription in vitro by regulating the distribution of TATA binding protein between promoter and nonpromoter sites. *Mol. Cell Biol.*, 19(4), 2835-2845.
- Murray, A. W. 2004. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*, 116(2), 221-234.
- Nanduri, J. and Tartakoff, A. M. 2001a. Perturbation of the nucleus: a novel Hog1p-independent, Pkc1p-dependent consequence of hypertonic shock in yeast. *Mol. Biol. Cell*, 12(6), 1835-1841.
- Nanduri, J. and Tartakoff, A. M. 2001b. The arrest of secretion response in yeast: signaling from the secretory path to the nucleus via Wsc proteins and Pkc1p. *Mol. Cell*, 8(2), 281-289.
- Nasmyth, K. 1996. At the heart of the budding yeast cell cycle. *Trends Genet.*, 12(10), 405-412.
- Nonaka, H., Tanaka, K., Hirano, H., Fujiwara, T., Kohno, H., Umikawa, M., Mino, A., and Takai, Y. 1995. A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 14(23), 5931-5938.

- O'Rourke, S. M. and Herskowitz, I. 2004. Unique and redundant roles for HOG MAPK pathway components as revealed by whole-genome expression analysis. *Mol.Biol.Cell*, 15(2), 532-542.
- O'Rourke, S. M., Herskowitz, I., and O'Shea, E. K. 2002. Yeast go the whole HOG for the hyperosmotic response. *Trends Genet.*, 18(8), 405-412.
- Ogawa, N., DeRisi, J., and Brown, P. O. 2000. New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol.Biol.Cell*, 11(12), 4309-4321.
- Ogawa, N., Saitoh, H., Miura, K., Magbanua, J. P., Bun-Ya, M., Harashima, S., and Oshima, Y. 1995. Structure and distribution of specific cis-elements for transcriptional regulation of PHO84 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Gen.Genet.*, 249(4), 406-416.
- Ozaki, K., Tanaka, K., Imamura, H., Hihara, T., Kameyama, T., Nonaka, H., Hirano, H., Matsuura, Y., and Takai, Y. 1996. Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 15(9), 2196-2207.
- Paravicini, G., Cooper, M., Friedli, L., Smith, D. J., Carpentier, J. L., Klig, L. S., and Payton, M. A. 1992. The osmotic integrity of the yeast cell requires a functional PKC1 gene product. *Mol.Cell Biol.*, 12(11), 4896-4905.
- Paravicini, G. and Friedli, L. 1996. Protein-protein interactions in the yeast PKC1 pathway: Pkc1p interacts with a component of the MAP kinase cascade. *Mol.Gen.Genet.*, 251(6), 682-691.
- Pardo, M., Ward, M., Bains, S., Molina, M., Blackstock, W., Gil, C., and Nombela, C. 2000. A proteomic approach for the study of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall biogenesis. *Electrophoresis*, 21(16), 3396-3410.
- Park, H. and Lennarz, W. J. 2000. Evidence for interaction of yeast protein kinase C with several subunits of oligosaccharyl transferase. *Glycobiology*, 10(7), 737-744.
- Park, T. S., O'Brien, D. J., and Carman, G. M. 2003. Phosphorylation of CTP synthetase on Ser36, Ser330, Ser354, and Ser454 regulates the levels of CTP and phosphatidylcholine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.*, 278(23), 20785-20794.
- Perez, P. and Calonge, T. M. 2002. Yeast protein kinase C. *J.Biochem.(Tokyo)*, 132(4), 513-517.
- Peter, M., Gartner, A., Horecka, J., Ammerer, G., and Herskowitz, I. 1993. FAR1 links the signal transduction pathway to the cell cycle machinery in yeast. *Cell*, 73(4), 747-760.
- Peter, M. and Herskowitz, I. 1994. Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. *Science*, 265(5176), 1228-1231.
- Peters, J. M. 2002. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol.Cell*, 9(5), 931-943.

- Peterson, J., Zheng, Y., Bender, L., Myers, A., Cerione, R., and Bender, A. 1994. Interactions between the bud emergence proteins Bem1p and Bem2p and Rho-type GTPases in yeast. *J.Cell Biol.*, 127(5), 1395-1406.
- Philip, B. and Levin, D. E. 2001. Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol.Cell Biol.*, 21(1), 271-280.
- Popolo, L., Gilardelli, D., Bonfante, P., and Vai, M. 1997. Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the ggp1delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.*, 179(2), 463-469.
- Porter, S. E., Penheiter, K. L., and Jaehning, J. A. 2005. Separation of the *Saccharomyces cerevisiae* Paf1 complex from RNA polymerase II results in changes in its subnuclear localization. *Eukaryot.Cell*, 4(1), 209-220.
- Posas, F., Chambers, J. R., Heyman, J. A., Hoeffler, J. P., de Nadal, E., and Arino, J. 2000. The transcriptional response of yeast to saline stress. *J.Biol.Chem.*, 275(23), 17249-17255.
- Posas, F. and Saito, H. 1998. Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J.*, 17(5), 1385-1394.
- Posas, F., Takekawa, M., and Saito, H. 1998. Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast. *Curr.Opin.Microbiol.*, 1(2), 175-182.
- 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(5), 1123-1133.
- Proft, M. and Serrano, R. 1999. Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated ENA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol.Cell Biol.*, 19(1), 537-546.
- Proft, M. and Struhl, K. 2002. Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol.Cell*, 9(6), 1307-1317.
- Proudfoot, N. J., Furger, A., and Dye, M. J. 2002. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell*, 108(4), 501-512.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. 2001. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*, 24(3), 218-229.
- Qadota, H., Python, C. P., Inoue, S. B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D. E., and Ohya, Y. 1996. Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science*, 272(5259), 279-281.
- Queralt, E. and Igual, J. C. 2003. Cell cycle activation of the Swi6p transcription factor is linked to nucleocytoplasmic shuttling. *Mol.Cell Biol.*, 23(9), 3126-3140.

- Queralt, E. and Igual, J. C. 2004. Functional distinction between Cln1p and Cln2p cyclins in the control of the *Saccharomyces cerevisiae* mitotic cycle. *Genetics*, 168(1), 129-140.
- Queralt, E. and Igual, J. C. 2005. Functional connection between the Clb5 cyclin, the PKC pathway and the Swi4 transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*.
- Rajavel, M., Philip, B., Buehrer, B. M., Errede, B., and Levin, D. E. 1999. Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 19(6), 3969-3976.
- Ram, A. F., Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Caro, L. H., Douwes, J. E., Baginsky, W., Mazur, P., van Den, Ende H., and Klis, F. M. 1998. Loss of the plasma membrane-bound protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of beta1,3-glucon into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. *J. Bacteriol.*, 180(6), 1418-1424.
- Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J. M., and Hohmann, S. 2000. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J. Biol. Chem.*, 275(12), 8290-8300.
- Rep, M., Reiser, V., Gartner, U., Thevelein, J. M., Hohmann, S., Ammerer, G., and Ruis, H. 1999. Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Mol. Cell Biol.*, 19(8), 5474-5485.
- Reynolds, T. B., Hopkins, B. D., Lyons, M. R., and Graham, T. R. 1998. The high osmolarity glycerol response (HOG) MAP kinase pathway controls localization of a yeast golgi glycosyltransferase. *J. Cell Biol.*, 143(4), 935-946.
- Richardson, H., Lew, D. J., Henze, M., Sugimoto, K., and Reed, S. I. 1992. Cyclin-B homologs in *Saccharomyces cerevisiae* function in S phase and in G2. *Genes Dev.*, 6(11), 2021-2034.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.*, 17(10), 1030-1032.
- Roberts, B. T., Farr, K. A., and Hoyt, M. A. 1994. The *Saccharomyces cerevisiae* checkpoint gene BUB1 encodes a novel protein kinase. *Mol. Cell Biol.*, 14(12), 8282-8291.
- Roberts, C. J., Nelson, B., Marton, M. J., Stoughton, R., Meyer, M. R., Bennett, H. A., He, Y. D., Dai, H., Walker, W. L., Hughes, T. R., Tyers, M., Boone, C., and Friend, S. H. 2000. Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science*, 287(5454), 873-880.
- Roberts, J. M. 1999. Evolving ideas about cyclins. *Cell*, 98(2), 129-132.
- Roelants, F. M., Torrance, P. D., Bezman, N., and Thorner, J. 2002. Pkh1 and pkh2 differentially phosphorylate and activate ypk1 and ykr2 and define protein

- kinase modules required for maintenance of cell wall integrity. *Mol.Biol.Cell*, 13(9), 3005-3028.
- Roelants, F. M., Torrance, P. D., and Thorner, J. 2004. Differential roles of PDK1- and PDK2-phosphorylation sites in the yeast AGC kinases Ypk1, Pkc1 and Sch9. *Microbiology*, 150(Pt 10), 3289-3304.
- Romeo, M. J., Angus-Hill, M. L., Sobering, A. K., Kamada, Y., Cairns, B. R., and Levin, D. E. 2002. HTL1 encodes a novel factor that interacts with the RSC chromatin remodeling complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.*, 22(23), 8165-8174.
- Roumanie, O., Weinachter, C., Larrieu, I., Crouzet, M., and Doignon, F. 2001. Functional characterization of the Bag7, Lrg1 and Rgd2 RhoGAP proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 506(2), 149-156.
- Rupes, I. 2002. Checking cell size in yeast. *Trends Genet.*, 18(9), 479-485.
- Sagot, I., Klee, S. K., and Pellman, D. 2002a. Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat.Cell Biol.*, 4(1), 42-50.
- Sagot, I., Rodal, A. A., Moseley, J., Goode, B. L., and Pellman, D. 2002b. An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat.Cell Biol.*, 4(8), 626-631.
- Saito, H. and Tatebayashi, K. 2004. Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *J.Biochem.(Tokyo)*, 136(3), 267-272.
- Salama, N. R., Chuang, J. S., and Schekman, R. W. 1997. Sec31 encodes an essential component of the COPII coat required for transport vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Mol.Biol.Cell*, 8(2), 205-217.
- Salgado, A. P., Schuller, D., Casal, M., Leao, C., Leiper, F. C., Carling, D., Fietto, L. G., Tropia, M. J., Castro, I. M., and Brandao, R. L. 2002. Relationship between protein kinase C and derepression of different enzymes. *FEBS Lett.*, 532(3), 324-332.
- Saracino, F., Bassler, J., Muzzini, D., Hurt, E., and Agostoni Carbone, M. L. 2004. The yeast kinase Swel is required for proper entry into cell cycle after arrest due to ribosome biogenesis and protein synthesis defects. *Cell Cycle*, 3(5), 648-654.
- Schafer, W. R. and Rine, J. 1992. Protein prenylation: genes, enzymes, targets, and functions. *Annu.Rev.Genet.*, 26, 209-237.
- Schmelzle, T., Helliwell, S. B., and Hall, M. N. 2002. Yeast protein kinases and the RHO1 exchange factor TUS1 are novel components of the cell integrity pathway in yeast. *Mol.Cell Biol.*, 22(5), 1329-1339.
- Schmidt, A., Bickle, M., Beck, T., and Hall, M. N. 1997. The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. *Cell*, 88(4), 531-542.
- Schmidt, A. and Hall, M. N. 1998. Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, 14, 305-338.

- Schmidt, A., Kunz, J., and Hall, M. N. 1996. TOR2 is required for organization of the actin cytoskeleton in yeast. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 93(24), 13780-13785.
- Schmidt, A., Schmelzle, T., and Hall, M. N. 2002. The RHO1-GAPs SAC7, BEM2 and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Microbiol.*, 45(5), 1433-1441.
- Schmitz, H. P., Huppert, S., Lorberg, A., and Heinisch, J. J. 2002a. Rho5p downregulates the yeast cell integrity pathway. *J.Cell Sci.*, 115(Pt 15), 3139-3148.
- Schmitz, H. P., Jockel, J., Block, C., and Heinisch, J. J. 2001. Domain shuffling as a tool for investigation of protein function: substitution of the cysteine-rich region of Raf kinase and PKC eta for that of yeast Pkc1p. *J.Mol.Biol.*, 311(1), 1-7.
- Schmitz, H. P., Lorberg, A., and Heinisch, J. J. 2002b. Regulation of yeast protein kinase C activity by interaction with the small GTPase Rho1p through its amino-terminal HR1 domain. *Mol.Microbiol.*, 44(3), 829-840.
- Schneider, B. L., Yang, Q. H., and Futcher, A. B. 1996. Linkage of replication to start by the Cdk inhibitor Sic1. *Science*, 272(5261), 560-562.
- Schneider, B. L., Zhang, J., Markwardt, J., Tokiwa, G., Volpe, T., Honey, S., and Futcher, B. 2004. Growth rate and cell size modulate the synthesis of, and requirement for, G1-phase cyclins at start. *Mol.Cell Biol.*, 24(24), 10802-10813.
- Schuller, C., Brewster, J. L., Alexander, M. R., Gustin, M. C., 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(18), 4382-4389.
- Schwob, E., Bohm, T., Mendenhall, M. D., and Nasmyth, K. 1994. The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell*, 79(2), 233-244.
- Schwob, E. and Nasmyth, K. 1993. CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, 7(7A), 1160-1175.
- Sekiya-Kawasaki, M., Abe, M., Saka, A., Watanabe, D., Kono, K., Minemura-Asakawa, M., Ishihara, S., Watanabe, T., and Ohya, Y. 2002. Dissection of upstream regulatory components of the Rho1p effector, 1,3-beta-glucan synthase, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 162(2), 663-676.
- Sherman, F., Fink, G.R., and Hicks, J.B. (1986) *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor, New York.
- Sheu, Y. J., Santos, B., Fortin, N., Costigan, C., and Snyder, M. 1998. Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Mol.Cell Biol.*, 18(7), 4053-4069.

- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal.Chem.*, 68(5), 850-858.
- Shi, X., Chang, M., Wolf, A. J., Chang, C. H., Frazer-Abel, A. A., Wade, P. A., Burton, Z. F., and Jaehning, J. A. 1997. Cdc73p and Paf1p are found in a novel RNA polymerase II-containing complex distinct from the Srbp-containing holoenzyme. *Mol.Cell Biol.*, 17(3), 1160-1169.
- Shi, X., Finkelstein, A., Wolf, A. J., Wade, P. A., Burton, Z. F., and Jaehning, J. A. 1996. Paf1p, an RNA polymerase II-associated factor in *Saccharomyces cerevisiae*, may have both positive and negative roles in transcription. *Mol.Cell Biol.*, 16(2), 669-676.
- Shimada, Y., Wiget, P., Gulli, M. P., Bi, E., and Peter, M. 2004. The nucleotide exchange factor Cdc24p may be regulated by auto-inhibition. *EMBO J.*, 23(5), 1051-1062.
- Siderius, M., Van Wuytswinkel, O., Reijenga, K. A., Kelders, M., and Mager, W. H. 2000. The control of intracellular glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* influences osmotic stress response and resistance to increased temperature. *Mol.Microbiol.*, 36(6), 1381-1390.
- Sidorova, J. M., Mikesell, G. E., and Breeden, L. L. 1995. Cell cycle-regulated phosphorylation of Swi6 controls its nuclear localization. *Mol.Biol.Cell*, 6(12), 1641-1658.
- Simon, I., Barnett, J., Hannett, N., Harbison, C. T., Rinaldi, N. J., Volkert, T. L., Wyrick, J. J., Zeitlinger, J., Gifford, D. K., Jaakkola, T. S., and Young, R. A. 2001. Serial regulation of transcriptional regulators in the yeast cell cycle. *Cell*, 106(6), 697-708.
- Smits, G. J., Kapteyn, J. C., van Den, Ende H., and Klis, F. M. 1999. Cell wall dynamics in yeast. *Curr.Opin.Microbiol.*, 2(4), 348-352.
- Soler, M., Plovins, A., Martin, H., Molina, M., and Nombela, C. 1995. Characterization of domains in the yeast MAP kinase Slt2 (Mpk1) required for functional activity and in vivo interaction with protein kinases Mkk1 and Mkk2. *Mol.Microbiol.*, 17(5), 833-842.
- Souza, M. A., Tropa, M. J., and Brandao, R. L. 2001. New aspects of the glucose activation of the H(+)-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 147(10), 2849-2855.
- Spellman, P. T., Sherlock, G., Zhang, M. Q., Iyer, V. R., Anders, K., Eisen, M. B., Brown, P. O., Botstein, D., and Futcher, B. 1998. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol.Biol.Cell*, 9(12), 3273-3297.
- Springer, M., Wykoff, D. D., Miller, N., and O'Shea, E. K. 2003. Partially phosphorylated Pho4 activates transcription of a subset of phosphate-responsive genes. *PLoS.Biol.*, 1(2), E28.
- Squazzo, S. L., Costa, P. J., Lindstrom, D. L., Kumer, K. E., Simic, R., Jennings, J. L., Link, A. J., Arndt, K. M., and Hartzog, G. A. 2002. The Paf1 complex

- physically and functionally associates with transcription elongation factors in vivo. *EMBO J.*, 21(7), 1764-1774.
- Stegmeier, F. and Amon, A. 2004. Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation. *Annu.Rev.Genet.*, 38, 203-232.
- Stuart, D. and Wittenberg, C. 1995. CLN3, not positive feedback, determines the timing of CLN2 transcription in cycling cells. *Genes Dev.*, 9(22), 2780-2794.
- Surana, U., Amon, A., Dowzer, C., McGrew, J., Byers, B., and Nasmyth, K. 1993. Destruction of the CDC28/CLB mitotic kinase is not required for the metaphase to anaphase transition in budding yeast. *EMBO J.*, 12(5), 1969-1978.
- Surana, U., Robitsch, H., Price, C., Schuster, T., Fitch, I., Futcher, A. B., and Nasmyth, K. 1991. The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell*, 65(1), 145-161.
- Swanson, M. J., Qiu, H., Sumibcay, L., Krueger, A., Kim, S. J., Natarajan, K., Yoon, S., and Hinnebusch, A. G. 2003. A multiplicity of coactivators is required by Gcn4p at individual promoters in vivo. *Mol.Cell Biol.*, 23(8), 2800-2820.
- Sydorskyy, Y., Dilworth, D. J., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Wozniak, R. W., and Aitchison, J. D. 2003. Intersection of the Kap123p-mediated nuclear import and ribosome export pathways. *Mol.Cell Biol.*, 23(6), 2042-2054.
- Taba, M. R., Muroff, I., Lydall, D., Tebb, G., and Nasmyth, K. 1991. Changes in a SWI4,6-DNA-binding complex occur at the time of HO gene activation in yeast. *Genes Dev.*, 5(11), 2000-2013.
- Tatebayashi, K., Takekawa, M., and Saito, H. 2003. A docking site determining specificity of Pbs2 MAPKK for Ssk2/Ssk22 MAPKKs in the yeast HOG pathway. *EMBO J.*, 22(14), 3624-3634.
- Terashima, H., Yabuki, N., Arisawa, M., Hamada, K., and Kitada, K. 2000. Up-regulation of genes encoding glycosylphosphatidylinositol (GPI)-attached proteins in response to cell wall damage caused by disruption of FKS1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Gen.Genet.*, 264(1-2), 64-74.
- Torres, L., Martin, H., Garcia-Saez, M. I., Arroyo, J., Molina, M., Sanchez, M., and Nombela, C. 1991. A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants. *Mol.Microbiol.*, 5(11), 2845-2854.
- Tucker, M., Staples, R. R., Valencia-Sanchez, M. A., Muhlrad, D., and Parker, R. 2002. Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 21(6), 1427-1436.
- Tucker, M., Valencia-Sanchez, M. A., Staples, R. R., Chen, J., Denis, C. L., and Parker, R. 2001. The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 104(3), 377-386.

- Tyers, M. 1996. The cyclin-dependent kinase inhibitor p40SIC1 imposes the requirement for Cln G1 cyclin function at Start. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 93(15), 7772-7776.
- Tyers, M. and Futcher, B. 1993. Far1 and Fus3 link the mating pheromone signal transduction pathway to three G1-phase Cdc28 kinase complexes. *Mol.Cell Biol.*, 13(9), 5659-5669.
- Tyers, M. and Jorgensen, P. 2000. Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, 10(1), 54-64.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S., and Rothberg, J. M. 2000. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 403(6770), 623-627.
- Valdivia, R. H. and Schekman, R. 2003. The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 100(18), 10287-10292.
- van Drogen, F. and Peter, M. 2002. Spa2p functions as a scaffold-like protein to recruit the Mpk1p MAP kinase module to sites of polarized growth. *Curr.Biol.*, 12(19), 1698-1703.
- Verna, J., Lodder, A., Lee, K., Vagts, A., and Ballester, R. 1997. A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 94(25), 13804-13809.
- Visintin, R., Craig, K., Hwang, E. S., Prinz, S., Tyers, M., and Amon, A. 1998. The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol.Cell*, 2(6), 709-718.
- Wang, H., Gari, E., Verges, E., Gallego, C., and Aldea, M. 2004. Recruitment of Cdc28 by Whi3 restricts nuclear accumulation of the G1 cyclin-Cdk complex to late G1. *EMBO J.*, 23(1), 180-190.
- Wasch, R. and Cross, F. R. 2002. APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit. *Nature*, 418(6897), 556-562.
- Watanabe, D., Abe, M., and Ohya, Y. 2001. Yeast Lrg1p acts as a specialized RhoGAP regulating 1,3-beta-glucan synthesis. *Yeast*, 18(10), 943-951.
- Watanabe, M., Chen, C. Y., and Levin, D. E. 1994. *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 encodes a protein kinase C (PKC) homolog with a substrate specificity similar to that of mammalian PKC. *J.Biol.Chem.*, 269(24), 16829-16836.
- Watanabe, Y., Irie, K., and Matsumoto, K. 1995. Yeast Rlm1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slf2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol.Cell Biol.*, 15(10), 5740-5749.
- Watanabe, Y., Takaesu, G., Hagiwara, M., Irie, K., and Matsumoto, K. 1997. Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1

- (Slf2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell Biol.*, 17(5), 2615-2623.
- Weinreich, M., Liang, C., Chen, H. H., and Stillman, B. 2001. Binding of cyclin-dependent kinases to ORC and Cdc6p regulates the chromosome replication cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98(20), 11211-11217.
- White, J. H., Barker, D. G., Nurse, P., and Johnston, L. H. 1986. Periodic transcription as a means of regulating gene expression during the cell cycle: contrasting modes of expression of DNA ligase genes in budding and fission yeast. *EMBO J.*, 5(7), 1705-1709.
- Wittenberg, C. and Flick, K. (2003) Cell cycle regulation during G1 phase in yeast: decisions, decisions, decision. In *G1 Phase Progression*. J. BOONSTRA (ed.) Georgetown, TX.: Landes Biosciences, pp. 14-39.
- Xiao, T., Kao, C. F., Krogan, N. J., Sun, Z. W., Greenblatt, J. F., Osley, M. A., and Strahl, B. D. 2005. Histone H2B ubiquitylation is associated with elongating RNA polymerase II. *Mol. Cell Biol.*, 25(2), 637-651.
- Yamochi, W., Tanaka, K., Nonaka, H., Maeda, A., Musha, T., and Takai, Y. 1994. Growth site localization of Rho1 small GTP-binding protein and its involvement in bud formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, 125(5), 1077-1093.
- Yang, S. H., Sharrocks, A. D., and Whitmarsh, A. J. 2003. Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene*, 320, 3-21.
- Yang, W. L., Bruno, M. E., and Carman, G. M. 1996. Regulation of yeast CTP synthetase activity by protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, 271(19), 11113-11119.
- Yang, W. L. and Carman, G. M. 1995. Phosphorylation of CTP synthetase from *Saccharomyces cerevisiae* by protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, 270(25), 14983-14988.
- Yeong, F. M., Lim, H. H., Wang, Y., and Surana, U. 2001. Early expressed Clb proteins allow accumulation of mitotic cyclin by inactivating proteolytic machinery during S phase. *Mol. Cell Biol.*, 21(15), 5071-5081.
- Zachariae, W. and Nasmyth, K. 1999. Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev.*, 13(16), 2039-2058.
- Zalewski, P. D., Forbes, I. J., Giannakis, C., Cowled, P. A., and Betts, W. H. 1990. Synergy between zinc and phorbol ester in translocation of protein kinase C to cytoskeleton. *FEBS Lett.*, 273(1-2), 131-134.
- Zarrov, P., Mazzoni, C., and Mann, C. 1996. The SLT2(MPK1) MAP kinase is activated during periods of polarized cell growth in yeast. *EMBO J.*, 15(1), 83-91.
- Zhang, X., Bi, E., Novick, P., Du, L., Kozminski, K. G., Lipschutz, J. H., and Guo, W. 2001. Cdc42 interacts with the exocyst and regulates polarized secretion. *J. Biol. Chem.*, 276(50), 46745-46750.
- Zhao, C., Jung, U. S., Garrett-Engele, P., Roe, T., Cyert, M. S., and Levin, D. E. 1998. Temperature-induced expression of yeast FKS2 is under the dual control of protein kinase C and calcineurin. *Mol. Cell Biol.*, 18(2), 1013-1022.

- Zheng, Y., Hart, M. J., Shinjo, K., Evans, T., Bender, A., and Cerione, R. A. 1993. Biochemical comparisons of the *Saccharomyces cerevisiae* Bem2 and Bem3 proteins. Delineation of a limit Cdc42 GTPase-activating protein domain. *J.Biol.Chem.*, 268(33), 24629-24634.
- Zufferey, R., Knauer, R., Burda, P., Stagljar, I., te, Heesen S., Lehle, L., and Aebi, M. 1995. STT3, a highly conserved protein required for yeast oligosaccharyl transferase activity in vivo. *EMBO J.*, 14(20), 4949-4960.

