

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA
MOLECULAR

CARACTERITZACIÓ BIOQUÍMICA I FUNCIONAL DE
ROT1, UNA PROTEÏNA ESSENCIAL DE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE

M^a ÀNGELES JUANES ORTIZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 20 de
Febrer de 2008 davant un tribunal format per:

- D. Martí Aldea Malo
- D^a. Rosa Aligué Alemany
- D. Josep Clotet Erra
- D. Pascual Sanz Bigorra
- D. Ismael Mingarro Muñoz

Va ser dirigida per:

D^a. M^a Carmen Bañó Aracil

D. Juan Carlos Igual García

©Copyright: Servei de Publicacions

M^a Ángeles Juanes Ortiz

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7072-8

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115



VNIVERSITAT Æ VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

**Caracterització bioquímica i funcional de
Rot1, una proteïna essencial de
*Saccharomyces cerevisiae***

Maria Angeles Juanes Ortiz

Tesi Doctoral 2007



VNIVERSITAT Æ VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

**Caracterització bioquímica i funcional de Rot1, una
proteïna essencial de *Saccharomyces cerevisiae***

Memòria presentada per
Maria Angeles Juanes Ortiz
Per a optar al grau de Doctora
per la Universitat de València

MARI CARMEN BAÑÓ ARACIL, Doctora en Ciències Biològiques i
Professora Titular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
de la Universitat de València i

JUAN CARLOS IGUAL GARCÍA, Doctor en Ciències Químiques i
Professor Titular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
de la Universitat de València,

CERTIFIQUEN que Maria Angeles Juanes Ortiz, Llicenciada en
Farmàcia per la Universitat de València ha realitzat sota la seua
direcció el treball que amb el títol “**Caracterització bioquímica i
funcional de Rot1, una proteïna essencial de *Saccharomyces
cerevisiae***” presenta per a optar al grau de Doctora per la Universitat
de València.

Burjassot, Octubre de 2007

Dra. Mari Carmen Baño Aracil

Dr. Juan Carlos Igual García

*A la meua família
i a tots els “meus”*

AGRAÏMENTS

La vida està plena de records, bons i mals i qui oblida els seus records perd part de la seva vida. Per aquest motiu, aquesta tesi no s'haguera pogut realitzar sense la generosa col.laboració de moltes persones vinculades a mi.

Perquè *“quan la vida m’ha demostrat una raó per a plorar, totes aquestes persones me n’han recordat mil i una per riure; perquè els bons amics, la família i els companys són com estrelles, estan ahí ... encara que no els veges o estiguen lluny, perquè de vegades entre certa gent sobren les paraules, amb una simple mirada hi ha prou per poder contar tota una vida, perquè com una vegada em digueren indirectament: **l’esforç, la constància, la música i l’esport són complements ideals per a solventar ingeniosament qualsevol repte**”*.

Per tot açò, vull agrair a tota la gent que durant aquest període de temps ha sabut brindar-me allò que amb diners no es pot comprar (*calor, amor, comprensió, afecte, paciència, recolçament moral, autoestima, tolerància i tot allò que amb una senzilla paraula es resumeix en AJUDA*). A tot aquell/a que s’identifique amb aquest cercle de corrent positiu, vull fer constar que ocupen un lloc preferent al meu cor, ja que sense l’aportació d’eixe gra d’arena que dia rere dia m’heu donat, jo hui no haguera aplegat fins ací.

ÍNDIX

| | |
|--|----------|
| 1. Introducció | 1 |
| El cicle cel.lular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 2 |
| Reguladors clau del cicle cel.lular | 4 |
| Transcripció i proteòlisi en el control del cicle cel.lular | 5 |
| Dinàmica del cicle cel.lular | 7 |
| La polarització del creixement | 11 |
| Creixement polaritzat en el cicle cel.lular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 12 |
| Regulació espacial del creixement polaritzat | 14 |
| Paper de Cdc42 en la polarització del creixement ... | 14 |
| Rho1, la ruta d' integritat cel.lular i Tor2 | 20 |
| Altres Rho GTPases | 22 |
| Regulació temporal del creixement polaritzat | 22 |
| La divisió cel.lular: citoquinesi i septació | 25 |
| El procés de la divisió cel.lular en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 25 |
| Coordinació de la citoquinesi/septació amb l'eixida de mitosi | 28 |
| Translocació de proteïnes al reticle endoplasmàtic i modificació posttraduccional | 29 |
| Mecanismes de translocació a través de la membrana del reticle endoplasmàtic | 30 |
| Glicosilació de proteïnes del reticle endoplasmàtic | 33 |
| Degradació de proteïnes associada al reticle endoplasmàtic | 35 |

| | |
|--|-----------|
| Rot1, una proteïna essencial de <i>S. cerevisiae</i> amb funció desconeguda | 36 |
| Objectius | 38 |
| 2. Materials i mètodes | 39 |
| Soques i condicions de creixement | 39 |
| <i>Escherichia coli</i> | 39 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 40 |
| Transformació de bactèria | 44 |
| Transformació de llevat | 45 |
| Construcció de plasmidis | 45 |
| Construcció dels plasmidis <i>pROT1-CEN</i> , <i>pROT1-2μ</i> , <i>pROT1-HA-CEN</i> , <i>pROT1-HA-2μ</i> i <i>pGALI:ROT1-HA</i> | 45 |
| Construcció dels plasmidis <i>pROT1-HA^{Δ229-256}-CEN</i> , <i>pROT1-HA^{Δ229-256}-2μ</i> , <i>pROT1-HA^{Δ200-256}-CEN</i> i <i>pROT1-HA^{Δ200-256}-2μ</i> | 46 |
| Construcció dels plasmidis <i>pROT1-HA^{Δ229-256}-18L</i> i <i>pROT1-HA^{Δ229-256}-18L-2μ</i> | 46 |
| Construcció dels plasmidis <i>pROT1^{N-x-Q}</i> | 47 |
| Assajos de creixement | 48 |
| Comptatge de cèl.lules | 48 |
| Determinació de l'índex de gemmació | 48 |
| Anàlisi de cèl.lules per microscopia de fluorescència | 49 |

| | |
|---|----|
| Tinció d'F-actina, quitina, nuclis i membranes | 49 |
| Localització de proteïnes mitjançant immunofluorescència indirecta | 49 |
| Localització de proteïnes amb marcatge GFP | 50 |
| Extractes proteics i anàlisi per <i>Western blot</i> | 50 |
| Fraccionament subcel.lular | 51 |
| Assajos d'estabilitat de proteïnes | 52 |
| Assaig de sensibilitat a proteïnasa K | 52 |
| Tractament amb fosfolipasa C específica de fosfatidil-inositol | 53 |
| Tractament amb endoglicosidasa H | 54 |
| Assaig d'activitat β -galactosidasa | 55 |
| | |
| 3. Caracterització funcional de Rot1 _____ | 57 |
| | |
| Construcció d'un mutant <i>rot1</i> condicional | 57 |
| <i>ROT1</i> és necessari per al creixement apical de la gemma | 60 |
| Interaccions genètiques entre <i>ROT1</i> i gens reguladors de la polarització d'actina | 62 |
| La sobreexpressió de <i>ROT1</i> suprimeix el defecte de creixement de la soca mutant <i>cdc42-1</i> | 62 |
| Connexió entre Rot1 i la ruta PKC | 64 |
| Defectes en el cicle cel.lular en el mutant <i>rot1</i> | 66 |
| Estudi de la divisió citoplasmàtica en el mutant <i>rot1</i> | 69 |
| Estudi de la funcionalitat de l'anell d'actomiosina | 71 |
| Estudi de la septació en el mutant <i>rot1</i> | 74 |

| | |
|--|------------|
| Rot1 controla la polarització del citoesquelet d'actina al coll entre la mare i la filla | 75 |
| Localització de proteïnes de la maquinària de polarització en el mutant <i>rot1</i> | 82 |
| Rot1 afecta específicament els processos de creixement polaritzat regulats per Clb2 | 87 |
| La pèrdua de <i>CLB2</i> suprimeix parcialment la letalitat del mutant <i>rot1</i> | 88 |
| <i>ROT1</i> interacciona genèticament amb gens implicats en la degradació de proteïnes de la ruta APC | 92 |
| <i>ROT1</i> controla l'estabilitat de la proteïna Clb2 | 94 |
| Rot1 pot afectar el citoesquelet d'actina en absència de Clb2 | 98 |
| Interaccions genètiques entre <i>ROT1</i> i gens de la ruta SCF | 100 |
| Estudi del paper de Rot1 en altres vies de degradació de proteïnes pel proteasoma | 103 |
| 4. Caracterització bioquímica de Rot1 _____ | 107 |
| Localització subcel.lular de Rot1 | 107 |
| Topologia de la proteïna Rot1 | 112 |
| Anàlisi de les modificacions posttraduccional de la proteïna Rot1 | 114 |
| És Rot1 una proteïna ancorada a la membrana per un grup GPI? | 114 |
| Determinació de l'estat de glicosilació de Rot1 | 115 |

| | |
|--|------------|
| Anàlisi funcional de l'extrem carboxilo terminal de Rot1 | 120 |
| Anàlisi funcional de l'extrem amino terminal de Rot1 | 125 |
| Rastreig de la seqüència senyal d'importació al reticle | 128 |
| Mecanisme d'inserció al reticle per a Rot1 | 134 |
| Estabilitat de la proteïna Rot1 | 136 |
| Paper del domini amino terminal en l'estabilitat de Rot1 | 136 |
| Anàlisi de la ruta implicada en la degradació de Rot1 | 139 |
| 5. Discussió _____ | 143 |
| 6. Conclusions _____ | 159 |
| 7. Bibliografia _____ | 163 |

1. Introducció

Tant en organismes unicel·lulars com en èssers pluricel·lulars simples o complexos, una cèl·lula és capaç de dividir-se per a donar com a resultat dues cèl·lules amb la mateixa identitat. El fet de com una maquinària tan complexa és capaç de reproduir-se a ella mateixa ha sigut-és un dels misteris de la biologia molecular. La successió ordenada de processos pels quals una cèl·lula creix i es divideix en dues s'anomena cicle cel·lular. El cicle cel·lular es regeix pels mateixos principis generals en tots els organismes eucariotes i les principals proteïnes implicades han estat molt conservades al llarg de l'evolució. *Saccharomyces cerevisiae* ha sigut un dels organismes model de més utilitat en l'estudi dels diferents aspectes del cicle cel·lular.

EL CICLE CEL·LULAR DE *Saccharomyces cerevisiae*

El cicle cel·lular s'ha dividit històricament en quatre fases: la fase S (síntesi) durant la qual es replica el DNA, la fase M (mitosi) en què se segreguen els cromosomes i es divideixen les cèl·lules, i dues fases G1 i G2 (*gap*) que separen a les anteriors (Figura 1.1). Al final d'un cicle la cèl·lula ha completat quatre processos bàsics: créixer, replicar el DNA, segregar els cromosomes en dos conjunts iguals i dividir-se. En aqueix moment la cèl·lula es troba de nou en fase G1 on resideix el punt màxim de control del cicle, anomenat START (punt de restricció en les cèl·lules de mamífer). En START es coordina el creixement amb la divisió cel·lular. La cèl·lula només entrarà en un nou cicle si ha assolit un tamany crític i les condicions mediambientals són les apropiades. En aquest punt de control de la fase G1 la cèl·lula decideix entre les diferents opcions de desenvolupament: 1) executar START i comprometre's amb una nova ronda de divisió; 2) aturar el cicle en G1, entrant llavors a la fase de quiescència o G0; 3) respondre a la presència de feromones aturant el cicle i activant el procés de conjugació (en el cas de cèl·lules haploides); o 4) respondre a la limitació de nutrients activant l' esporulació (en el cas de cèl·lules diploides).

Una vegada executat START la cèl·lula de *S. cerevisiae* posa en marxa diferents processos post-START: la gemmació, la duplicació del SPB ("spindle pole body") que és l'equivalent en llevat al centrosoma i l'inici de la replicació del DNA. En el procés de gemmació del llevat, la formació de la gemma implica la polarització del citoesquelet d'actina i la secreció direccional dels components necessaris per a formar la paret cel·lular. L'aparició i el tamany de la gemma serveixen com a marcadors de les diferents fases del cicle cel·lular. En quant a la mitosi, es subdivideix en 4 parts: profase, metafase, anafase i telofase. En *S. cerevisiae*, a diferència dels eucariotes superiors, la mitosi es caracteritza per ser tancada ja que la

membrana nuclear no desapareix; a més a més la formació del fus acromàtic és premitòtica. Al final de la mitosi es realitza la citoquinesi. Durant la citoquinesi es produeix la contracció d'un anell contràctil d'actomiosina i la formació d'un septe entre les cèl.lules mare i filla. Finalment, la hidròlisi de la quitina del septe dóna lloc a la separació de les dues cèl.lules, sent la cèl.lula filla un poc més petita que la mare.

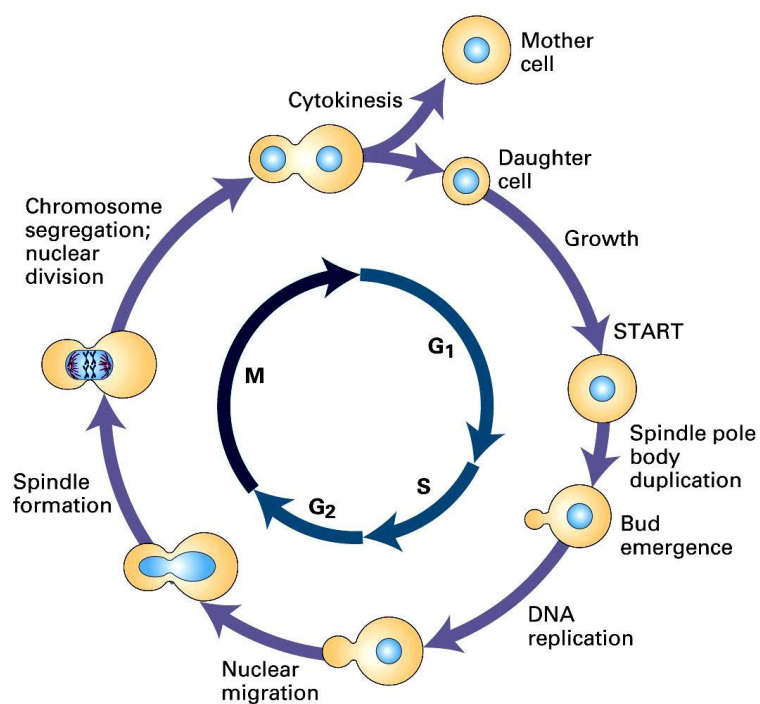


Figura 1.1. Esquema del cicle cel·lular de *S. cerevisiae* (Lodish et al., 2004, *Molecular Cell Biology*. New York: W.H.Freeman and company)

Reguladors clau del cycle cel.lular

Els reguladors clau del cycle cel.lular són les CDKs (*cyclin-dependent kinases* o quinases dependents de ciclina) (Morgan, 1997; Roberts, 1999; Murray, 2004). L'activitat de les CDKs oscil.la al llarg del cycle. Aquesta oscil.lació depén de l'associació de les CDKs a les ciclins (proteïnes reguladores que han rebut aquesta denominació perquè són proteïnes inestables que generalment presenten una abundància variable segons la fase del cycle) i de la presència d'inhibidors de CDKs (denominats CKIs, *CDK kinase inhibitors* o inhibidores de CDKs).

Saccharomyces cerevisiae té cinc CDKs però només una, Cdc28, és essencial en la regulació del cycle cel.lular sent la màxima responsable del control de les transicions G1/S i G2/M (Mendenhall and Hodge, 1998). La CDK monomèrica no té activitat com a proteïna quinasa i la seua activació requereix de dos processos: la unió a la ciclina i la fosforilació d'un residu de Thr (Thr-169 en Cdc28). Aquesta activació es reverteix per la unió de proteïnes inhibidores CKIs i per fosforilació d'un residu de Tyr (Tyr-19 en el cas de Cdc28). L'estat de fosforilació de la Tyr-19 està controlat per la quinasa Wee1 (Swe1 en *S. cerevisiae*) i la fosfatasa Cdc25 (Mih1 en *S. cerevisiae*).

Les ciclins es defineixen com proteïnes amb capacitat d'unir i activar la CDK. Presenten gran variabilitat, ja que només tenen un únic domini comú conservat denominat "caixa ciclina". En *S. cerevisiae* hi ha nou ciclins diferents que formen complexos amb Cdc28 per a regular la progressió en el cycle cel.lular (Andrews and Measday, 1998; Breeden, 2000; Miller and Cross, 2001). Aquestes ciclins poden dividir-se en tres grups: ciclins de fase G1 (Cln1, Cln2 i Cln3), ciclins de fase S (Clb5 i Clb6) i ciclins de fase G2/M (Clb1, Clb2, Clb3 i Clb4). Totes les ciclins són de síntesi periòdica i els seus nivells oscil.len fortament al llarg del cycle, excepte Cln3 que només presenta xicotets canvis en la seua expressió i els

seus nivells són pràcticament constants al llarg del cicle cel.lular. A més d'activar Cdc28, les ciclins aporten funcions específiques als complexos Cdc28-ciclina com el reconeixement de substrats o localitzant a la quinasa en llocs concrets (Miller and Cross, 2000; Edgington and Futcher, 2001; Loog and Morgan, 2005). Respecte als inhibidors de ciclins, en *S. cerevisiae* s'han descrit dos CKIs de Cdc28: Far1 i Sic1. Els dos es sintetitzen al final de la mitosi i es degraden en la transició G1/S (McKinney et al., 1993; Schwob et al., 1994; Schneider et al., 1996; Henchoz et al., 1997). Far1 és un inhibidor dels complexos Cdc28-Cln (Peter and Herskowitz, 1994; Tyers and Futcher, 1993) que intervé en la coordinació entre creixement i cicle cel.lular (Alberghina et al., 2004), en el procés de gemmació i en la resposta a feromones (Peter et al., 1993; Gulli and Peter, 2001). Per la seua part, Sic1 és l'inhibidor dels complexos Cdc28-Clb, controla l'inici de la fase S (Schwob et al., 1994; Lengronne and Schwob, 2002) i és important per a l'eixida de mitosi (Visintin et al., 1998).

Transcripció i proteòlisi en el control del cicle cel.lular

L'activació dels diversos complexos CDK-ciclina al llarg del cicle cel.lular estarà determinada pels nivells existents de ciclins i d'inhibidors en cada moment. Dos mecanismes moleculars van a ser bàsics per al control dels nivells d'aquests reguladors del cicle: la regulació de la transcripció gènica i el control de l'estabilitat de proteïnes.

L'expressió coordinada de diferents grups de gens al llarg del cicle cel.lular és una estratègia molt freqüent en *S. cerevisiae*. Diversos estudis genòmics indiquen que els gens d'expressió periòdica representen del 15 al 20% del conjunt global de gens (Cho et al., 1998; Spellman et al., 1998; Iyer et al., 2001). Aquests gens estan normalment implicats en processos específics del cicle cel.lular i el seu pic d'expressió coincideix normalment amb el moment en què es necessiten els seus productes. Hi ha diverses ones

d'expressió periòdica al llarg del cicle: en la transició M/G1, al principi de la fase G1, en la transició G1/S (START) i en les fases S, G2 i M. Aquesta transcripció periòdica està regulada per factors de transcripció que freqüentment s'expressen també periòdicament i estan interrelacionats de tal forma que contribueixen a organitzar les ones d'expressió (Simon et al., 2001; Breeden, 2003; Bahler, 2005).

El segon mecanisme implicat en el control dels nivells cel·lulars dels reguladors del cicle cel·lular és la proteolisi per ubiquitinació de proteïnes i degradació en el proteasoma (Hochstrasser et al., 1999). Aquest procés de degradació es porta a terme per una sèrie de reaccions. En primer lloc, la ubiquitina ha de ser activada per acció dels enzims activadors d'ubiquitina (E1). Una vegada la ubiquitina està activada, s'uneix a la proteïna denominada conjugativa (E2), encarregada de transferir la ubiquitina al substracte. El reconeixement de substrat per part del complex E2 requereix el complex ubiquitina-ligasa E3, que és un element crític de la proteòlisi dependent d'ubiquitina. L'unió d'una única molècula d'ubiquitina a la proteïna diana per la proteïna ubiquitina-ligasa pot catalitzar successives transferències de moltes molècules d'ubiquitina donant lloc a una cadena de poliubiquitines en la proteïna diana. Aquestes ubiquitines marquen la proteïna dirigint-la a un gegant complex proteasa, el proteasoma. Les proteïnes que formen el proteasoma s'encarregaran d'unir la proteïna ubiquitinada i de la seua proteòlisi.

El procés d'ubiquitinació de proteïnes i degradació en el proteasoma és clau per al control de la progressió en el cicle cel·lular. En *S. cerevisiae* existeixen dues ubiquitina-ligases (E3) que tenen un paper molt important en la regulació del cicle cel·lular: els complexos SCF (*Skp1-Cullina-Proteïna amb caixa F*) i APC (*anaphase promoter complex* o complex promotor de l'anafase) (Jorgensen and Tyers, 1999; Morgan, 1999; Zachariae and Nasmyth, 1999; Tyers and Jorgensen, 2000; DeSalle and Pagano, 2001; Peters, 2002; Murray, 2004). Aquests complexos ubiquitina-ligasa són

indispensables per a les transicions G1/S i metafase-anafase-eixida de mitosi. La ubiquitinació i proteòlisi en la transició G1/S la porta a terme la ubiquitina-ligasa SCF. El complex SCF està format per quatre subunitats: Skp1, Cdc53 (un membre de la família de les cullines), una proteïna petita Rbx1 amb un domini RING i una proteïna adaptadora amb “caixa F” que és la subunitat responsable del reconeixement del substrat. Aquest complex és responsable de la degradació de ciclines de G1 (Cln) i dels inhibidors de CDKs. La transició metafase-anafase i eixida de mitosi és promoguda pel complex APC que és un complex d'elevada massa molecular on participen almenys 13 subunitats incloent dues subunitats activadores responsables de la unió dels substrats: Cdc20 i Cdh1. El complex APC és responsable de la degradació d'inhibidors d'anafase i de ciclines Clb. Una diferència important entre aquestes dues vies és la seua regulació. Mentre que el complex SCF està constitutivament actiu al llarg de tot el cicle cel.lular i la degradació per aquesta via és regulada per la fosforilació de les proteïnes diana imprescindible per a què siguin reconegudes per SCF, la degradació de proteïnes per la via APC es controla regulant l'activitat del complex APC mitjançant fosforilació per la CDK i la quinasa polo, i per la regulació de Cdc20 i Cdh1. D'aquesta manera la via de degradació per APC sols està activa en mitosi (per APC/C^{Cdc20}) i en G1 (per APC/C^{Cdh1}).

Dinàmica del cicle cel.lular

El cicle cel.lular està controlat per l'activació dels diferents complexos CDK-ciclina al llarg del cicle. Aquests complexos apareixen en ones successives d'activitat quinasa garantint l'ordre i l'alternança dels processos (Nasmyth, 1996; Mendenhall and Hodge, 1998).

En la fase G1 la cèl.lula es troba en un estat de baixa activitat quinasa Cdc28 i és Cln3 l'única ciclina present en la cèl.lula. L'inici de la

nova ronda de divisió comença amb l'activació de la quinasa Cdc28-Cln3. Cln3 està present durant tot el cicle amb nivells pràcticament constants però el complex només s'activa i entra al nucli al final de la fase G1 quan la proteïna acompanyant Ydj1 allibera el complex Cdc28-Cln3 de la seua associació a la membrana del reticle endoplasmàtic (Gari et al., 2001; Wang et al., 2004; Verges et al., 2007). L'entrada al nucli de la quinasa Cdc28-Cln3 promou l'entrada en una nova ronda de divisió cel·lular en activar el programa de transcripció d'START específic regulat pel factors de transcripció SBF i MBF (Costanzo et al., 2004; de Bruin et al., 2004). Com a conseqüència de l'activació d'aquest programa transcripcional es produeix la síntesi de les ciclins Cln1, Cln2, Clb5 i Clb6 (Figura 1.2). Aquestes ciclins s'uneixen a Cdc28 apareixent bruscament l'activitat quinasa Cdc28-Cln1 i Cdc28-Cln2 però estant inactius els complexos Cdc28-Clb5 i Cdc28-Clb6 per la presència de l'inhibidor Sic1. Les quinases Cdc28-Cln1/Cln2 posen en marxa els processos post-START: la polarització del citoesquelet i la gemmació (Benton et al., 1993; Lew and Reed, 1993; Cvrckova and Nasmyth, 1993; Gulli et al., 2000; Moffat and Andrews, 2004; McCusker et al., 2007), la duplicació i/o separació del centrosoma (Haase et al., 2001) i indirectament, la iniciació de la replicació del DNA per la degradació de l'inhibidor Sic1 amb la conseqüent aparició de l'activitat de les quinases de fase S Cdc28-Clb5,6 (Tyers, 1996).

Les quinases de fase S Cdc28-Clb5 i Cdc28-Clb6 s'encarreguen de controlar la síntesi de DNA (Epstein and Cross, 1992; Schwob and Nasmyth, 1993; Donaldson et al., 1998; Drury et al., 2000; Weinreich et al., 2001; Wilmes et al., 2004). Posteriorment, sorgeix l'activitat quinasa associada a les ciclins Clb3 i Clb4 controlant la formació del fus acromàtic. Durant la fase G2/M s'acumulen les activitats quinasa Cdc28-Clb1 i Cdc28-Clb2 que promouen, especialment la segona, el canvi de creixement polaritzat a

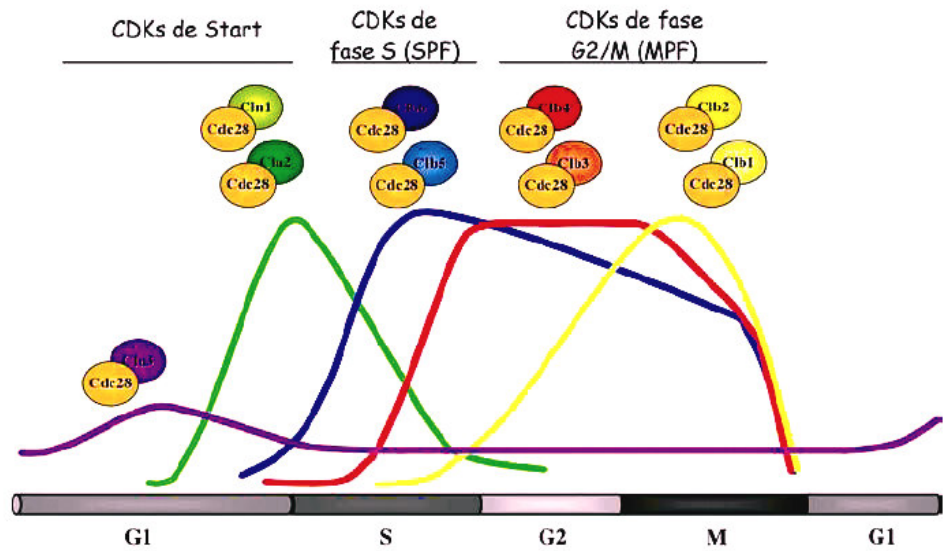


Figura 1.2. Ones d'activitat quinasa al llarg del cicle cel·lular

creixement isotròpic de la gemma (Lew and Reed, 1995b; Tjandra et al., 1998) i controlen el progrés de la mitosi (Surana et al., 1991; Fitch et al., 1992; Grandin and Reed, 1993; Lindqvist et al., 2007). Finalment, una vegada les cèl·lules estan en telofase es requereix la inactivació de les quinases Cdc28-Clb per l'eixida de mitosi i la citoquinesi, tornant a l'estat de baixa activitat quinasa (Yeong et al., 2000; Wasch and Cross, 2002; Stegmeier and Amon, 2004; Bosl and Li, 2005).

En la inactivació de l'activitat quinasa Cdc28-Clb al final del cycle cel.lular intervenen dos mecanismes: l'activació de Sic1 (l'inhibidor de l'activitat Cdc28-Clb) i la ubiquitinació i degradació de Clb pel complex APC i pel proteasoma. En els dos casos, l'esdeveniment responsable és l'activació de la proteïna fosfatasa Cdc14 (Figura 1.3) (Simanis, 2003; D'Amours and Amon, 2004; Stegmeier and Amon, 2004; Bosl and Li, 2005). Cdc14 està segregada al nuclèol la major part del cycle cel.lular unida a la proteïna d'ancoratge Net1/Cfi1. La seua alliberació i activació està controlada seqüencialment per dues rutes, FEAR (*cdc Fourteen Early Anaphase Release*) i MEN (*mitotic exit network*). La ruta FEAR formada per la separasa Esp1, Slk19, Spo12 i la quinasa polo Cdc5, és responsable de l'alliberació transitòria de Cdc14 a l'inici de l'anafase (Stegmeier et al., 2002; Azzam et al., 2004; Queralt et al., 2006). Aquesta alliberació de Cdc14 és limitada i transitòria, requerint-se la posterior activació de MEN (composta per la GTPasa Tem1, la seua GEF Lte1 i la seua GAP Bfa1-Bub2, Cdc15 i Dbf2-Mob1) per a la total alliberació de Cdc14 per tota la cèl.lula.

Una vegada totalment alliberada, Cdc14 promou la inactivació de l'activitat CDK desfosforilant i activant entre altres substrats Sic1, Swi5 i Cdh1. La desfosforilació de Sic1 impedeix la seua degradació, mentre que la desfosforilació del factor transcripcional Swi5 permet la seua entrada en el nucli activant la transcripció del gen *SIC1*. En quant a Cdh1, la seua desfosforilació per Cdc14 origina l'activació del complex APC/C^{Cdh1} encarregat-se de la degradació completa de les ciclins mitòtiques. Tots aquests fets provoquen per una banda l'eliminació de les ciclins Clb i per l'altra l'acumulació de l'inhibidor Sic1. La conseqüent inactivació de les CDK mitòtiques origina l'eixida de mitosi i dona pas a la fase G1 tornant a l'estat de baixa activitat quinasa. Finalment, diversos mecanismes apaguen la maquinària d'eixida de mitosi inactivant les rutes FEAR i MEN i deixant les cèl.lules a punt per començar un nou cycle cel.lular.

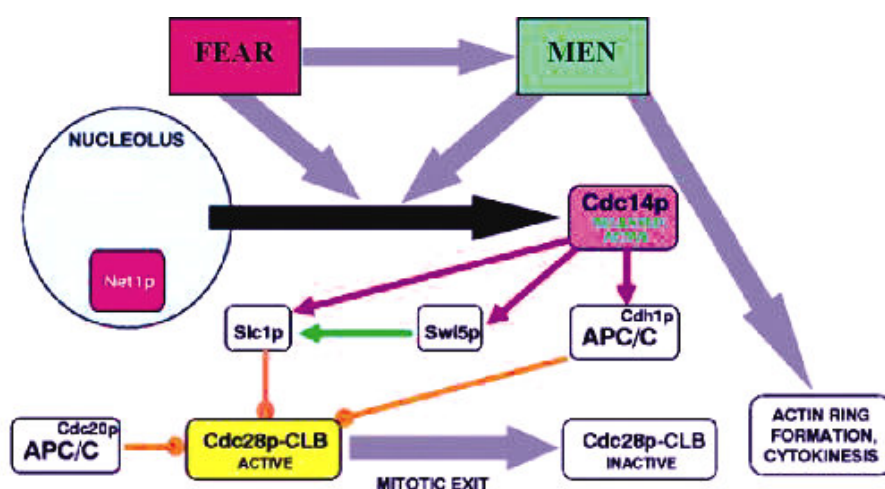


Figura 1.3. Cdc14 i eixida de mitosi en *S. cerevisiae* (adaptada de Simanis, 2003)

LA POLARITZACIÓ DEL CREIXEMENT

El creixement polaritzat és un fenomen que ocorre pràcticament en totes les cèl·lules, des de procariots fins a organismes pluricel·lulars sent fonamental per a nombrosos processos cel·lulars incloent la proliferació, diferenciació i morfogènesi. Totes les cèl·lules eucariotes segueixen essencialment el mateix esquema general en el control del seu creixement

polaritzat (Drubin and Nelson, 1996; Nelson, 2003). En resposta a senyals externs o interns s'estableix un lloc de polarització en la superfície cel.lular i a aquest lloc es recluten les proteïnes específiques responsables de la polarització del citoesquelet per a proporcionar els components cel.lulars necessaris que inicien i mantenen el creixement polaritzat a la superfície cel.lular.

Creixement polaritzat en el cicle cel.lular de *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae és un organisme model particularment atractiu per a estudiar aquests processos perquè disposa d'una pronunciada polarització cel.lular en resposta a diferents senyals. En *S. cerevisiae* una característica molt important és que pràcticament tots els aspectes del creixement polaritzat deriven de la polarització del citoesquelet d'actina, el qual està altament regulat (Moseley and Goode, 2006; Park and Bi, 2007). Els filaments d'actina (F-actina) formen tres estructures diferents bioquímicament i morfològicament. Els *patches* corticals són estructures mòbils i discretes riques en F-actina, associades amb invaginacions de la membrana plasmàtica, formats per la nucleació de l'actina pel complex Arp2/3. El segon gran component del citoesquelet d'actina són els cables, llargs feixos de F-actina ensamblats per l'activitat nucleadora de les formines Bni1 i Bnr1. Durant el creixement polaritzat, els *patches* d'actina es concentren i els extrems dels cables d'actina s'orienten cap al lloc en creixement polaritzat. Finalment, l'altra estructura on es troba l'F-actina és formant part de l'anell contràctil d'actomiosina responsable de la citoquinesi.

Les cèl.lules de *S. cerevisiae* estan sota creixement polaritzat durant diverses fases del seu cicle vital, com la gemmació i la citoquinesi durant el creixement vegetatiu o el creixement filamentós, i la conjugació entre cèl.lules haploides de diferent sexe (Pruyne and Bretscher, 2000b; Pruyne

and Bretscher, 2000a; Park and Bi, 2007). El procés de polarització del creixement durant el cicle cel.lular està controlat tant temporalment com espacialment (Figura 1.4). Quan comença un nou cicle, durant la fase G1, el llevat selecciona un lloc de gemmació en un lloc específic del còrtex cel.lular. Al final de la fase G1, després d'executar-se START, s'activa l'emergència de la gemma en el lloc prèviament marcat. Mentre emergeix la gemma, els *patches* i cables d'actina convergeixen en el lloc en creixement per mantenir el creixement polaritzat. Aquest període on la gemma creix des de la punta s'anomena període de creixement apical. Més tard, els *patches* corticals es redistribuïxen aleatòriament sobre la superfície de la gemma. Aquest període de creixement on la gemma creix en totes les direccions s'anomena període de creixement isotròpic. El resultat d'aquesta forma de creixement polaritzat és la forma típica el·lipsoïdal de les cèl.lules de *S. cerevisiae*. De fet, defectes en el creixement polaritzat provoquen una morfologia anormal de les cèl.lules caracteritzada o bé per presentar gemmes molt allargades (conseqüència de l'excés de creixement apical) o bé per presentar gemmes esfèriques o arrodonides (conseqüència d'un defecte en el manteniment del creixement apical) (Sheu et al., 2000). En les cèl.lules d'algunes soques de llevat s'indueix una morfologia alternativa (creixement filamentós o pseudohifal) com a conseqüència d'una prolongació del creixement apical generant-se cèl.lules molts allargades (Kron and Gow, 1995; Madhani and Fink, 1998). Al final del creixement de la gemma o bé filamentós o bé vegetatiu, els *patches* corticals i els cables d'actina es redistribuïxen aleatòriament en la mare i en la gemma. A continuació, l'F-actina s'ensambla amb un anell de miosina prèviament establert entre la mare i la filla formant un anell d'actomiosina. La contracció d'aquest anell provoca la divisió citoplasmàtica. Seguidament, es produeix la repolarització dels *patches* corticals i cables d'actina al coll entre la mare i la gemma filla. La secreció polaritzada en aquesta regió dona lloc a la formació d'un septum compost de paret cel.lular, principalment per quitina, que ajudarà a la divisió

de les dues noves cèl.lules. La hidròlisi de la quitina per acció de la quitinasa donarà lloc a dues cèl.lules independents.

Regulació espacial del creixement polaritzat

La polarització i reorganització del citoesquelet en totes les cèl.lules eucariotes estan regulades per una família de proteïnes petites d'unió a GTP (Jaffe and Hall, 2005). En *S. cerevisiae* hi ha 6 GTPases tipus-Rho anomenades Cdc42 i Rho1-5, que participen en molts aspectes de la polaritat cel.lular, secreció i biosíntesi de la paret cel.lular (Chant, 1999; Park and Bi, 2007).

Paper de Cdc42 en la polarització del creixement

La Rho GTPasa essencial Cdc42 és el factor crucial en el control de la polarització en totes les cèl.lules eucariotes (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Com totes les GTPases, Cdc42 cicla entre un estat actiu unida a GTP i en altre estat inactiu unida a GDP. L'unió a GTP requereix el factor bescanviador de nucleòtids de guanina (GEF) Cdc24, el qual controlarà l'activació local de Cdc42 en els llocs de creixement. La inactivació de Cdc42 es produeix per la hidròlisi del GTP, regulada per les proteïnes activadores de l'activitat GTPasa Cdc42 (GAPs). En concret en Cdc42 són Bem2, Bem3, Rga1/Dbm1 i Rga2.

En llevat (igual que en altres organismes multicel.lulars), el punt clau per a polaritzar el creixement és el reclutament i l'activació local de Cdc42 en llocs específics de la membrana plasmàtica (Ziman et al., 1993; Richman et al., 2002). Cdc42 és una proteïna ancorada en la membrana plasmàtica per modificacions lipídiques a l'extrem C-terminal. En resposta a marques espacials Cdc42 es concentra en els llocs de creixement polaritzat, primer en el lloc on es produeix la gemmació, més tard en la punta de la

gemma en creixement i finalment en el coll entre la mare i la filla en la citoquinesi. Per la seua part, Cdc24 també és una proteïna de localització dinàmica al llarg del cycle cel.lular (Toenjes et al., 1999). Cdc24 es localitza al nucli durant la fase G1, però quan comença un nou cycle cel.lular o s'inicia el procés de conjugació i al final de la citoquinesi es localitza als llocs de creixement polaritzat per interacció amb un complex multiproteic

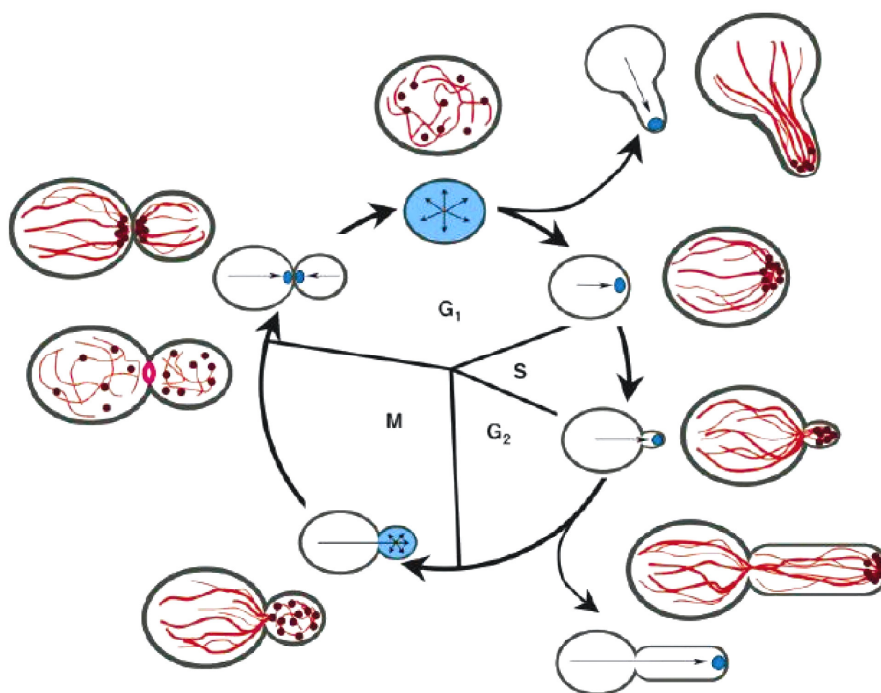


Figura 1.4. Dinàmica del citoesquelet d'actina al llarg del cycle cel.lular (Pruyne and Brestcher, 2000b)

específic que dirigeix Cdc24 a la membrana plasmàtica. Moltes altres proteïnes relacionades amb el citoesquelet es localitzen en els llocs de creixement, però per contra a la major part d'elles, la polarització de Cdc42 s'estableix de manera independent a l'actina (encara que necessite el citoesquelet d'actina per al seu manteniment en aquests llocs) (Irazoqui et al., 2003; Wedlich-Soldner et al., 2004; Irazoqui et al., 2005). Aquest fet suggereix que la posició en el còrtex d'aquesta GTPasa defineix l'eix de la polarització del citoesquelet.

Una de les qüestions principals en el funcionament de Cdc42 en la polarització del creixement és entendre com s'aconsegueix activar localitzadament Cdc42 i com es manté la seua polarització. Durant el procés de gemmació l'activació polaritzada de Cdc42 es produeix en un lloc concret de la membrana plasmàtica determinat per la maquinària de selecció del lloc de gemmació (Figura 1.5A). En funció del tipus cel.lular, el patró de gemmació és diferent: les cèl.lules haploides (a o α) presenten un patró axial (la gemma naix al costat del lloc on prèviament s'havia produït la divisió cel.lular) i les diploides presenten un patró de gemmació bipolar (la gemma naix al costat contrari d'on s'havia produït la divisió cel.lular) (Chant and Pringle, 1995; Casamayor and Snyder, 2002). Aquest diferent patró de gemmació ocorre en resposta a proteïnes marcadores que recluten i activen localment la GTPasa de la família Ras Bud1/Rsr1 (Park and Bi, 2007). Bud1 fa d'intermediària entre la maquinària de proteïnes marcadores espacials que especifiquen el lloc per a polaritzar el creixement i la maquinària de polarització, ja que Bud1 activat guia a Cdc24 i Cdc42 cap al lloc de creixement polaritzat on s'activa la GTPasa Cdc42.

En el manteniment de la localització polaritzada al còrtex de Cdc42 durant el procés de gemmació intervenen l'F-actina, la proteïna Bem1 i un complex de proteïnes anomenat el polarisoma. Com s'ha comentat abans, l'F-actina no és necessària per a establir la localització polaritzada de Cdc42, però atès que Cdc42 és una proteïna altament dinàmica, per endocitosi

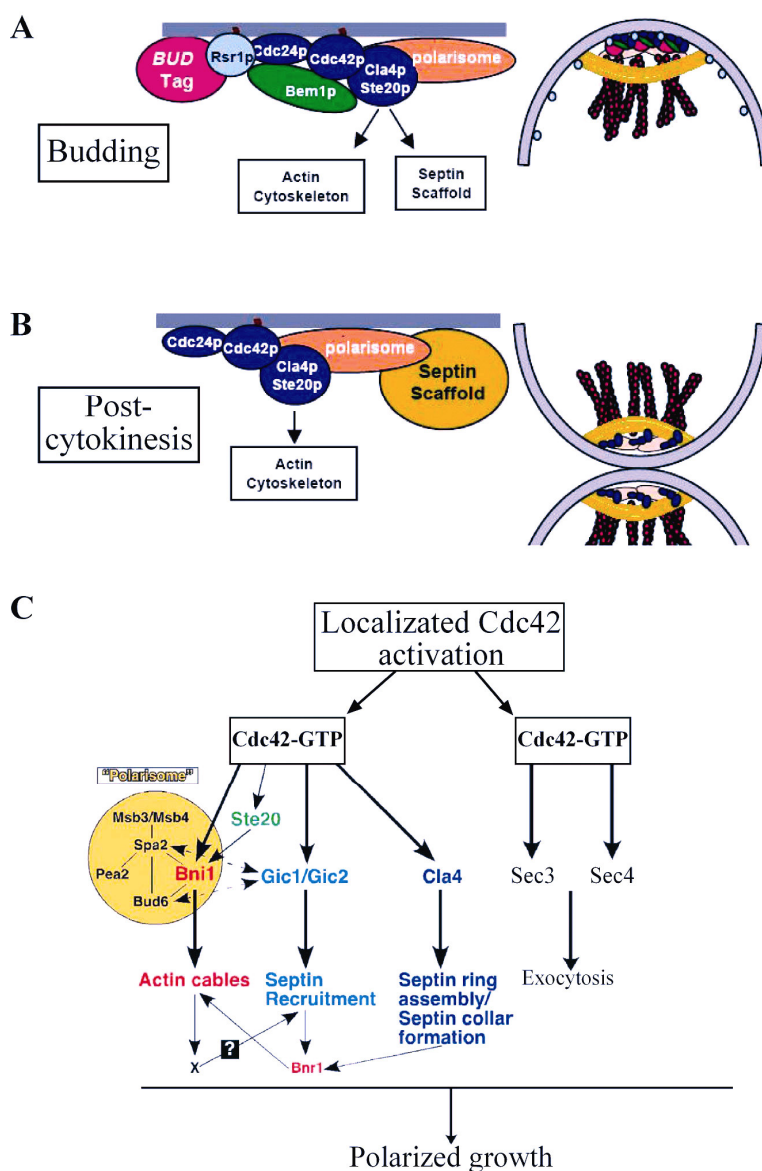


Figura 1.5. Localització, activació i funcions de Cdc42 al llarg del cicle cel.lular (adaptada de Pruyne and Brestcher; 2000a, Park and Bi, 2007)

polaritzada és ràpidament retirada del lloc de polarització i per açò, per al seu manteniment en aquests llocs és necessari que hi haja exocitosi polaritzada a través del citoesquelet d'actina (Irazoqui et al., 2005). Per la seua part, la proteïna Bem1 col.localitza amb Cdc42 i Cdc24 en els llocs de creixement polaritzat facilitant l'unió de Cdc24-Cdc42 a altres proteïnes implicades en la polarització com a l'F-actina i a la quinasa Cla4 (Butty et al., 2002). Cla4, activat per Cdc42, fosforilarà activant Cdc24, establint-se un mecanisme de retroalimentació positiva que resulta en un acúmulo de proteïnes Cdc42 i Cdc24 activades en els llocs de creixement polaritzat.

En quant al polarisoma, és un complex multiproteic localitzat en els llocs de creixement polaritzat format per diverses proteïnes relacionades físicament i genèticament (Fujiwara et al., 1998; Sheu et al., 1998). Spa2 és considerada la proteïna ancoradora del polarisoma perquè interacciona amb altres proteïnes que formen part del complex com són Bni1, Sph1, Pea2 i Bud6 (Ozaki-Kuroda et al., 2001; Sheu et al., 1998; Shih et al., 2005; Tcheperegine et al., 2005). A més a més, Spa2 també interacciona amb altres proteïnes que participen en el citoesquelet d'actina com la MAP Kinasa Slt2 de la ruta PKC (van Drogen and Peter, 2002). El polarisoma regula el creixement polaritzat en *S. cerevisiae* per dos mecanismes coordinats: l'activació local de les GTPases Cdc42 i Rho1, i la regulació de l'exocitosi (Shih et al., 2005; Tcheperegine et al., 2005). El polarisoma no és essencial, però en absència de les proteïnes del polarisoma les cèl.lules presenten fenotips relacionats amb defectes de polaritat com un reduït creixement apical (que origina cèl.lules amb forma esfèrica de les gemmes), defectes en l'elongació filamentosa, en la resposta a feromones (Bidlemaier and Snyder, 2004), i defectes en citoquinesi (Shih et al., 2005; Snyder et al., 1991).

Just abans de la divisió cel.lular, es produeix la repolarització de l'actina al coll entre la mare i la filla (Figura 1.5B). Aquest procés està també regulat per la GTPasa Cdc42 i el polarisoma, el qual transloca els seus

components a la regió del coll entre la mare i la filla. En aquest procés el marcador espacial al coll està constituït per una família de proteïnes que participen en diferents aspectes morfogènètics i en la citoquinesi, les septines (Versele and Thorner, 2005; Lindsey and Momany, 2006). Al principi del cicle cel·lular, quan naix la gemma, les septines s'organitzen en forma d'anell al voltant del lloc de gemmació sent responsables de molts successos morfogènètics però sense intervindre directament en la polarització. No obstant això, les septines sí que són requerides per a la reorientació dels *patches* corticals i cables d'actina al coll entre la mare i la filla abans de la divisió cel·lular mitjançant el reclutament de la proteïna del polarisoma Spa2 per interacció amb la septina Shs1 (Iwase et al., 2007).

Una vegada activat en el lloc de creixement polaritzat, Cdc42 regularà a través de diversos efectors l'organització del citoesquelet d'actina mitjançant la nucleació dels *patches* i els cables d'actina (Figura 1.5C). Actuant a través de les proteïnes quinases tipus PAK Ste20, Cla4 i Skm1, Cdc42 regula l'activitat del complex Arp2/3, responsable amb altres proteïnes de la formació dels *patches* d'actina. Pel que fa als cables de F-actina, Cdc42 controla la seua polarització a través de la regulació de l'activitat de les formines Bni1 i Bnr1 per dues vies paral·leles (Evangelista et al., 1997; Evangelista et al., 2002). Una ruta, conservada en cèl·lules eucariotes implica el polarisoma i la formina Bni1, la qual és activada per Cdc42 bé per interacció directa o bé indirectament a través de la quinasa PAK Ste20. L'altra ruta, específica de llevat, implica a les proteïnes Gic1/Gic2 (Brown et al., 1997; Chen et al., 1997), les quals controlen a través de les septines l'activitat de la formina Bnr1.

A més a més del seu paper en la polarització del citoesquelet d'actina, Cdc42 també té altres funcions cel·lulars. Així, juga un paper directe en les etapes finals de l'exocitosi interaccionant amb proteïnes implicades en la maquinària de secreció com la GTPasa Sec4, implicada en el transport de vesícules de secreció, o la proteïna Sec3 de l'*exocyst*,

complex multiproteic implicat en la fusió i ancoratge de vesícules en els llocs de secreció (Zhang et al., 2001; Adamo et al., 2001; Roumanie et al., 2005). Cdc42 també controla un altre aspecte crucial en la morfogènesi cel.lular com és la regulació de les septines. A través de Gic1, Gic2 i Bni1 recluta a les septines mentre que a través de Cla4 controlarà la formació de l'anell de septines (Iwase et al., 2006; Park and Bi, 2007). Com hem comentat abans, les septines no intervenen directament en la polarització en les etapes inicials del cicle cel.lular però sí al final del cicle cel.lular on tenen un paper important en la citoquinesi.

Rho1, la ruta d'integritat cel.lular i Tor2

Tant la proteïna essencial Rho1 com Rho2 (proteïna no essencial parcialment redundat amb Rho1) estan implicades en la polarització del citoesquelet d'actina. Rho1 es localitza en els llocs de creixement polaritzat on regula múltiples processos implicats en la biogènesi de la paret cel.lular, l'organització del citoesquelet d'actina i l'exocitosi actuant a través de tres efectors: la β -1,3-glucano sintasa (Fks1 i Fks2), la proteïna quinasa C (Pkc1) i la formina Bni1 (Jaffe and Hall, 2005). Per una banda, Rho1 estimula la síntesi de paret cel.lular directament com a subunitat reguladora de la glucano sintasa i indirectament a través de l'activació de la proteïna quinasa C. Per altra banda, Rho1 afecta el citoesquelet d'actina mitjançant la regulació de la formina Bni1 i mitjançant l'activació de la proteïna quinasa C. A més a més, Rho1 és imprescindible per a l'ensamblatge i l'activitat de l'anell contràctil d'actomiosina en el lloc de divisió cel.lular (Dong et al., 2003; Tolliday et al., 2002; Yoshida et al., 2006). Finalment, Rho1 també regula l'exocitosi polaritzada interaccionant amb el component de l'exocyst Sec3 (Guo et al., 2001).

Rho1 i Pkc1 formen part de l'anomenada ruta d'integritat cel.lular o ruta PKC. El nucli de la ruta PKC està constituït per una cascada de MAP

quinases que es fosforilen i activen seqüencialment: la proteïna Pkc1 (activada per la GTPasa Rho1) activa la MAPKKK Bck1 i aquesta les MAPKK redundants, Mkk1 i Mkk2 que s'encarreguen d'activar l'últim element de la cascada, la MAPK Slt2/Mpk1 (Levin, 2005). Front alteracions en la paret cel·lular generades per diferents estressos o durant els períodes de creixement polaritzat, a través de sensors de membrana s'indueix la fosforilació i activació de Slt2, essencial per a mantindre la integritat cel·lular. El manteniment de la integritat de la paret cel·lular implica la biosíntesi de components de la paret cel·lular mitjançant el control del factor de transcripció Rlm1 implicat en l'expressió de gens de paret cel·lular. Per altra banda, diversos estudis han suggerit que la ruta PKC controla la polarització del citoesquelet d'actina dirigint les vesícules de secreció al lloc de creixement en la superfície cel·lular (Breton et al., 2001; Costigan et al., 1992; Mazzoni et al., 1993; Nanduri and Tartakoff, 2001; Valdivia and Schekman, 2003). De fet s'ha descrit que mutacions en diversos membres de la ruta PKC produeixen una distribució aberrant del citoesquelet d'actina i una acumulació de les vesícules de secreció. Diverses proteïnes d'aquesta ruta com la pròpia Rho1, Slt2, Mkk1 i Mkk2 (MAP quinases activadores de Slt2) es localitzen en llocs de creixement polaritzat. Aquesta localització depèn del polarisoma (Fujiwara et al., 1998; Sheu et al., 1998; van Drogen and Peter, 2002).

Una altra proteïna relacionada amb el citoesquelet d'actina i la ruta d'integritat cel·lular és Tor2 (*Target of rapamycin*). Tor2 és una proteïna essencial amb activitat Ser/Thr quinasa que forma part dels complexos: TORC1 i TORC2 (Loewith et al., 2002). Formant part del complex TORC1, comparteix amb la proteïna homòloga Tor1, una funció essencial regulant el creixement en resposta a nutrients. A banda d'aquesta funció, Tor2 (formant part del complex TORC2) té una funció específica i essencial en l'organització del citoesquelet d'actina mitjançant la regulació de la ruta

d'integritat cel.lular (Fadri et al., 2005; Helliwell et al., 1998a; Helliwell et al., 1998b; Schmidt et al., 1996; Schmidt et al., 1997).

Altres Rho GTPases

Les proteïnes Rho-GTPases Rho3 i Rho4 participen conjuntament en el manteniment de la polarització d'actina i formació de la gemma (Matsui and Toh, 1992), compartint una funció essencial en l'activació directa de les formines Bni1 i Bnr1 (Dong et al., 2003). A més de per la seua interacció amb les formines, Rho3 i Rho4 estan implicades en la secreció, ja que interaccionen amb components de l'*exocyst* Sec3 i Exo70 (Adamo et al., 1999; Robinson et al., 1999). Rho3 també participa en el transport de vesícules a través dels cables d'actina interaccionant directament amb la miosina Myo2. En quant a Rho5, s'ha suggerit que regula la depolarització de l'actina i que podria funcionar reprimint la ruta d'integritat de la paret cel.lular (Schmitz et al., 2002).

Regulació temporal del creixement polaritzat

El procés de la polarització del creixement no sols està controlat espacialment sinó que també està coordinat temporalment, de manera que ocorre només en uns moments determinats del cicle cel.lular (Lew and Reed, 1995b; Pruyne and Bretscher, 2000b; Pruyne and Bretscher, 2000a; Park and Bi, 2007). Hi ha una dependència dinàmica del citoesquelet d'actina amb la maquinària que controla el cicle cel.lular i així els processos morfogènics com l'aparició de la gemma o la repolarització de l'actina al coll al final de mitosi estan governats en últim terme per les activitats CDKs. No obstant, els mecanismes moleculars d'eixa regulació no estan esclarits.

Durant la transició G1/S, Cdc28 associada a les ciclines de fase G1 Cln polaritzen el citoesquelet per a emergir la gemma. Així, la inhibició de

les proteïnes Cln bloqueja l'emergència de la gemma, mentre que la sobreexpressió d'aquestes ciclines hiperpolaritzen el creixement (Lew and Reed, 1993) (Figura 1.6). Com s'ha comentat abans, el procés de gemmació està regulat per l'activitat de Cdc42. L'activació de Cdc42 depèn del reclutament a la membrana de la seua GEF Cdc24. Durant la fase G1, Cdc24 està segrestada en el nucli associada a la proteïna Far1. L'activació

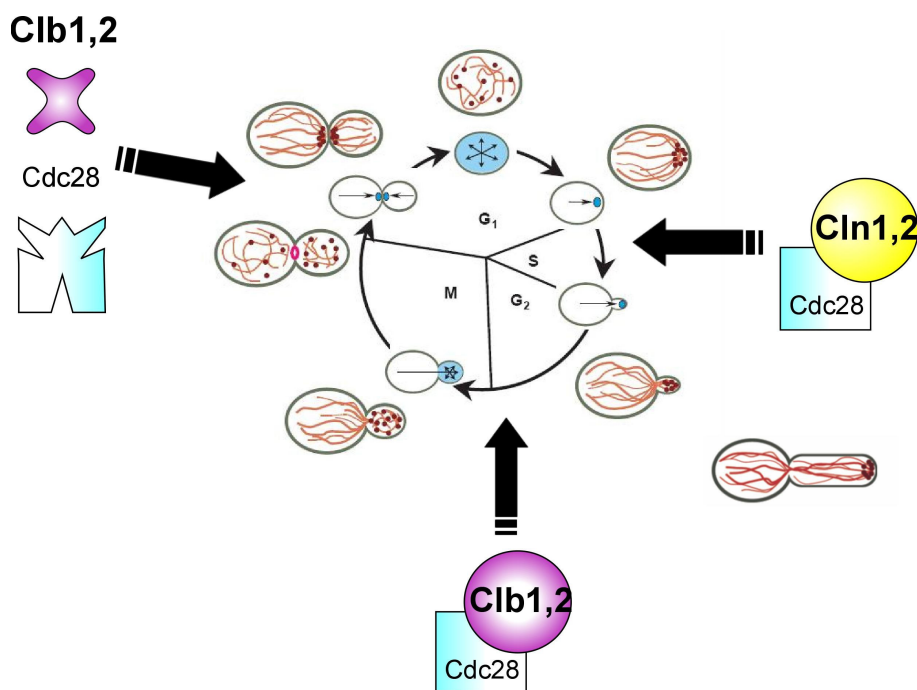


Figura 1.6. Regulació del citoesquelet d'actina al llarg del cicle cel·lular per les CDK (adaptada de Pruyne and Brestcher, 2000b)

dels complexos Cdc28-Cln1/2 desencadena la degradació de Far1 alliberant Cdc24, el qual pot eixir llavors al citoplasma i activar Cdc42 (Gulli et al., 2000; Gulli and Peter, 2001; Chang and Peter, 2003). D'altra banda, els complexos Cdc28-Clb promouen la depolarització de l'actina durant el canvi de creixement apical a isotròpic de la gemma (Grandin and Reed, 1993; Lew and Reed, 1993; Surana et al., 1993; Tjandra et al., 1998). Així, els mutants en ciclins Clb1,2 presenten gemmes hiperpolaritzades pel defecte en apagar el creixement apical, mentre que la sobreexpressió de Clb1 i Clb2 accelera el canvi a isotròpic. No es coneix exactament com la quinasa controla aquest procés encara que s'ha descrit que està implicada la Cdc42-GTPasa (Tjandra et al., 1998). A més a més, Cdc28-Clb2 intervé impedint la repolarització del citoesquelet d'actina al coll (Lew and Reed, 1993). Sols al final d'anafase, una vegada activada la degradació proteolítica de les ciclins Clb i acumulat l'inhibidor Sic1, la quinasa Cdc28-Clb2 s'inactiva i el citoesquelet d'actina es direcciona al coll. La inactivació de Cdc28-Clb2 també permetrà la translocació de la quitina sintasa 2 (implicada en la formació del septe) des del reticle endoplasmàtic al coll entre la mare i la filla (VerPlank and Li, 2005; Zhang et al., 2006) i l'ensamblatge d'un nou lloc de gemmació amb la translocació al còrtex dels components del polarisoma implicats en aquest ensamblatge (Padmashree and Surana, 2001), processos que estan bloquejats per l'activitat quinasa.

Una altra connexió entre el citoesquelet d'actina i la maquinària de control del cycle cel.lular ve reflectida pel *checkpoint* de morfogènesi (Lew and Reed, 1995a; Lew, 2000). Aquest mecanisme respon a perturbacions del citoesquelet d'actina que afecten a la formació de la gemma mitjançant l'activació de l'inhibidor de CDK Swe1, una proteïna quinasa que fosforila inhibint així a la CDK. Així, es retarda la transició G2/M fins que es recupera el citoesquelet d'actina i es completa eficientment la formació de la gemma.

LA DIVISIÓ CEL·LULAR: CITOQUINESI I SEPTACIÓ

El procés de la divisió cel·lular en *S. cerevisiae*

La idea bàsica del procés de divisió cel·lular ha estat conservada des de bactèries a plantes, animals i fongs, i implica la contracció d'un anell d'actomiosina que invagina la membrana plasmàtica. La contracció d'aquesta estructura genera la força requerida per a dividir el citoplasma en dos, de manera que la cèl·lula en divisió se separarà en dues cèl·lules. Les cèl·lules on la membrana plasmàtica es troba envoltada per una paret cel·lular rígida, com és el cas de *S. cerevisiae*, es troben amb una complicació més ja que entre elles s'ha de dipositar el material necessari per a formar un septe de paret cel·lular. Per tant, una característica de *S. cerevisiae* és que la divisió cel·lular es porta a terme per l'acció coordinada d'un anell contràctil d'actomiosina i la formació d'un septe ric en quitina entre les dues cèl·lules en divisió.

En *S. cerevisiae* la posició del plànol de divisió de la cèl·lula s'estableix en el moment de gemmació. La cèl·lula es dividirà per l'estretament del coll que es troba entre la cèl·lula mare i la filla. El coll és el lloc on els diferents components requerits per a la divisió es localitzaran en diferents moments del cicle cel·lular. Les primeres proteïnes que apleguen, fins i tot abans d'emergir la gemma, són les septines (Kinoshita, 2006; Joo et al., 2005; Spiliotis and Nelson, 2006). Les septines estan implicades en l'organització estructural del coll formant un anell que funciona com una barrera de difusió en el coll i reclutant factors implicats en morfogènesi. Un d'aquests factors és la quitina sintasa 3, encarregada de la formació d'un anell de quitina al coll en el moment de la gemmació el qual és essencial per a la integritat estructural del coll (Schmidt et al., 2003; Shaw et al., 1991) Altre factor que recluten les septines és Myo1 (Bi et al., 1998), l'única miosina tipus II del llevat. Myo1 es localitza en el lloc de divisió de la

cèl.lula abans d'emergir la gemma. Una vegada emergeix la gemma, Myo1 roman en el coll i al final d'anafase s'incorpora l'F-actina per formar l'anell d'actomiosina funcional (Bi et al., 1998; Lippincott and Li, 1998; Tolliday et al., 2002). A més a més, les septines com abans hem descrit també són requerides per a la reorientació del citoesquelet d'actina al coll mitjançant l'interacció amb el polarisoma (Iwase et al., 2007).

Deprés de completar-se la mitosi, una sèrie estricta de processos van a afectar a les estructures que es localitzen en el coll entre la mare i la filla. Primer, l'anell de septines es dividirà en dos i la quitina sintasa 2 es translocarà des del reticle endoplasmàtic al coll. Seguidament, es produirà la contracció de l'anell d'actomiosina per un mecanisme dependent del direccionament i activació local en el coll de Rho1 (Yoshida et al., 2006). La contracció de l'anell espenta i invagina la membrana plasmàtica. Simultàniament, la quitina sintasa 2 va dipositant quitina per a formar el septe primari que ajuda a espentar la membrana plasmàtica fins estrangular-la (Cabib et al., 2001; Cabib, 2004). A continuació, l'anell contràctil desapareix i les membranes de les dues noves cèl.lules formades es tanquen. En aquest punt, la citoquinesi s'ha completat però el procés de septació encara no ha finalitzat ja que faltaria la construcció d'un septe secundari entre la mare i la filla de composició semblant a la de la paret cel.lular en la formació del qual intervé la quitina sintasa 3. La funció del septe secundari és protegir a les dues cèl.lules durant la separació. Per últim, les dues cèl.lules se separen per l'acció d'enzims hidrolítics com la β -1-3-glucanasa i especialment la quitinasa, encarregada d'hidrolitzar el septe primari. La reparació de la paret durant la separació cel.lular porta a terme una altra quitina sintasa, la Chs 1 (Cabib, 2004) (Figura 1.7).

En *S. cerevisiae* la contracció de l'anell d'actomiosina i la formació del septe primari són part integral del mateix procés citoquinètic. Aquests dos processos són interdependents i es necessiten recíprocament per a completar correctament la citoquinesi (Cabib, 2004; Schmidt et al., 2002).

Ara bé, ni la contracció de l'anell ni la formació del septe primari és essencial per a la viabilitat cel.lular perquè sense un procés o altre es produeix la citoquinesis i la septació, encara que de manera anormal. En els dos casos es forma un septe aberrant que és un septe secundari ric en quitina sintetitzada per la quitina sintasa 3 que espenta la membrana plasmàtica fins estrangular-la.

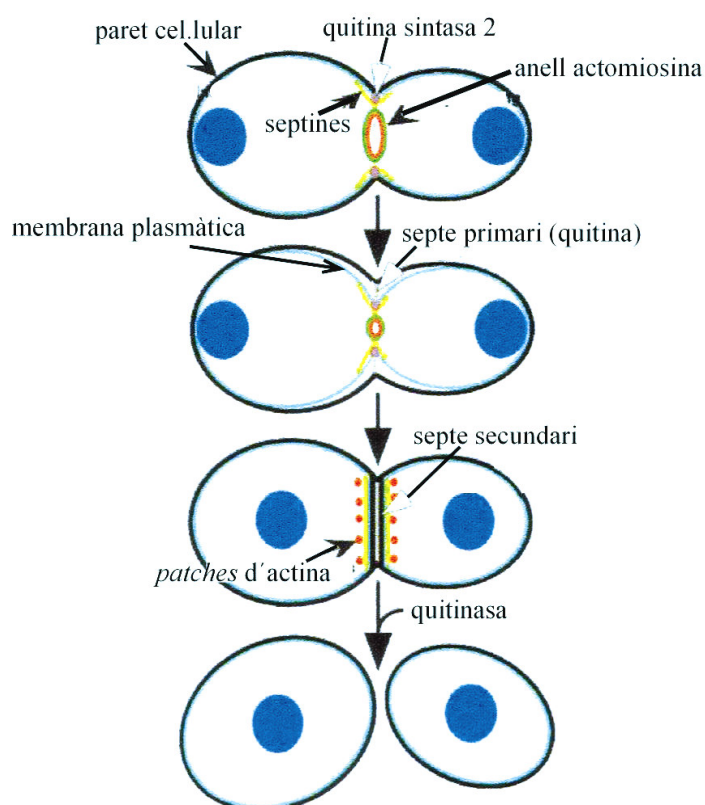


Figura 1.7. La citoquinesi en *S. cerevisiae* (Adaptada de Erfei Bi, 2001)

Coordinació de la citoquinesi/septació amb l'eixida de mitosi

En *S. cerevisiae*, els processos morfogènètics que ocorren al final de la divisió cel·lular estan coordinats amb l'eixida de mitosi. Com hem comentat abans, l'eixida de mitosi implica la inactivació de la CDK, una inactivació que es produeix per l'activació de la fosfatasa Cdc14 per la ruta MEN. L'anàlisi de mutants *men* en condicions que permeten a les cèl·lules eixir de mitosi va revelar que les proteïnes MEN, a més a més de en eixida de mitosi, també van a intervindre en la funció de l'anell contràctil d'actomiosina, en la reorientació del citoesquelet d'actina al coll i el procés de septació (Corbett et al., 2006; Lee et al., 2001; Lippincott et al., 2001; Luca et al., 2001). No obstant, mentre el paper de la ruta MEN en eixida de mitosi està ben establert, els mecanismes moleculars pels quals MEN controla la citoquinesi i la septació no estan clars. En qualsevol cas, el procés clau és la translocació de components de MEN des de l'SPB al coll entre la mare i la filla (Frenz et al., 2000; Luca et al., 2001; Molk et al., 2004; Visintin and Amon, 2001; Xu et al., 2000; Yoshida and Toh-e A, 2001), procés que ocorre una vegada s'inactiven les CDKs (Hwa et al., 2003). En resum, el requeriment de les proteïnes de la ruta MEN per a la correcta citoquinesi/septació, la seua translocació del SPB al coll entre mare i filla i l'activació d'aquesta translocació només quan s'inactiva la quinasa mitòtica són punts crítics que uneixen temporal i mecanísticament la citoquinesi a l'eixida de mitosi.

Finalment, l'interrelació d'eixida de mitosi i morfogènesi no sols es reflecteix en la implicació de proteïnes MEN en la citoquinesi i en la septació sino també en què proteïnes de polaritat com Cdc42 afecten la ruta MEN. En concret, Cdc42 controla l'activació de la GTPasa Tem1 regulant per una banda l'unió i activació de la GEF Lte1 al còrtex i per altra banda inhibint la GAP Bub2-Bfa1, induint així l'activació de la ruta MEN (Hofken and Schiebel, 2004; Hofken and Schiebel, 2002).

TRANSLOCACIÓ DE PROTEÏNES AL RETICLE ENDOPLASMÀTIC I MODIFICACIÓ POSTTRADUCCIONAL

En general, proteïnes destinades a la superfície cel·lular, membranes internes o a compartiments de vies de secreció són inicialment translocades al lumen o integrades en la membrana del reticle endoplasmàtic (RE). Totes aquestes proteïnes utilitzen la mateixa maquinària de translocació: un canal hidrofílic conductor de proteïnes format pel complex heterotrimèric Sec61 conegut com el translocó (Rapoport, 2007). No obstant això, mentre que les proteïnes de secreció creuen la membrana completament, el procés d'integració de les proteïnes de membrana és més complicat. Aquestes proteïnes poden tenir un o més segments transmembrana i la maquinària d'integració és capaç de crear diverses topologies, cadascuna de les quals és dictada d'alguna manera per la seqüència de la proteïna (Goder and Spiess, 2001; Rapoport et al., 2004; Rapoport, 2007). Com aquestes proteïnes s'integren en la bicapa i adopten les diferents topologies és una qüestió encara no resolta.

Per al procés de localització en el RE les proteïnes utilitzen un senyal constituït per un domini curt d'aminoàcids que dirigeixen el seu transport des del citosol a la membrana del RE. Normalment, les seqüències senyal es localitzen en l'extrem N-terminal; no obstant això, també poden localitzar-se dins de la proteïna o en l'extrem C-terminal (von Heijne and Manoil, 1990). Aquestes seqüències varien en la composició i longitud, però totes elles contenen una regió N-terminal carregada, una regió central hidrofòbica (essencial per a la translocació de la proteïna) i una regió polar (amb un lloc de reconeixement per a peptidases). Recentment, s'ha descrit que l'alta variabilitat observada podria permetre a la cèl·lula regular selectivament la translocació de proteïnes al RE (Kang et al., 2006). Aquestes seqüències senyal poden ser processades (eliminades) per les peptidases de llevat

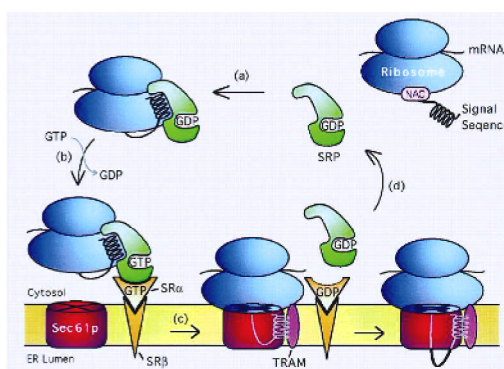
després o durant la translocació de la proteïna o també a vegades, poden servir per unir la proteïna a la membrana (High and Dobberstein, 1992).

Mecanismes de translocació a través de la membrana del reticle endoplasmàtic

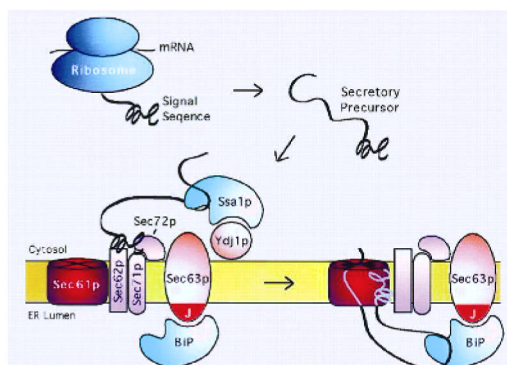
En el procés de translocació de les proteïnes a través de la bicapa lipídica s'ha descrit que el canal conductor de proteïnes format per Sec61 actua com un porus passiu permetent a la cadena polipeptídica lliscar-se en els dos sentits a través del canal. Per això, el canal necessita associar-se amb complexos proteics col.laboradors que proporcionen l'energia per a la translocació. En eucariotes, dependent del complex col.laborador i de si la síntesi proteica s'ha completat o no, el canal funciona translocant les proteïnes de dues maneres diferents: cotraduccional o posttraduccionalment (Rapoport, 2007).

En el cas de la translocació cotraduccional, que és la forma de translocació majoritària, el ribosoma és el principal complex associat i la translocació al RE té lloc mentre la proteïna encara està sintetitzant-se. De fet comença només la seqüència senyal de la cadena polipeptídica emergeix del ribosoma. Immediatament, un factor citosòlic (la partícula de reconeixement de la seqüència senyal o SRP), s'uneix al complex format pel ribosoma i la cadena naixent. Aquest complex cadena naixent-ribosoma-SRP es dirigeix al lloc de la membrana on es localitza el seu receptor de membrana (receptor SRP o SR) (Halic and Beckmann, 2005; Lührink and Sinning, 2004) produint-se dues interaccions: d'una banda, el ribosoma interacciona amb el translocó Sec61 i d'altra banda, la SRP interacciona amb el receptor SRP (SR) iniciant-se la translocació de la proteïna per la membrana i continuant-se la síntesi de proteïna (Figura 1.8).

cotraduccional
dependent de SRP



posttraduccional
independent de SRP
dependent Sec62/Sec63



posttraduccional
independent de SRP
dependent de TRC

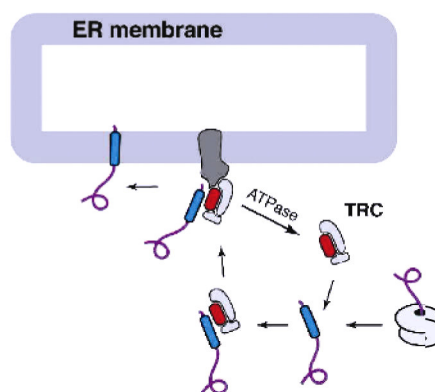


Figura 1.8. Mecanismes de translocació en la membrana del reticle endoplasmàtic (adaptada de Corsi and Shekman, 1996 i (Mandon and Gilmore, 2007)

En la translocació posttraduccional, la proteïna s'ha sintetitzat totalment abans de contactar amb la membrana del RE. Les proteïnes que utilitzen aquest mecanisme d'inserció aparentment encara requereixen una seqüència senyal però és menys hidrofòbica i per tant escapa de la interacció amb la SRP (Ng et al., 1996). En aquest mode de translocació, el translocó Sec61 interacciona amb altre complex Sec62/Sec63 i la proteïna del lumen del RE de la família de les ATPases Hsp70 (BiP en mamífers, Kar2 en llevat). En aquest procés de translocació, mentre la proteïna travessa el canal també podria lliscar en qualsevol direcció però la unió de la cadena polipeptídica amb la proteïna Kar2 dins del lumen del RE estimula la seua activitat ATPasa proporcionant l'energia necessària per a dirigir el desplaçament del polipèptid per un mecanisme seqüencial (Matlack et al., 1999; Plath and Rapoport, 2000) impedit així el moviment cap arrere, cap al citosol.

A més, s'ha descrit un altre mecanisme de translocació exclusivament per a proteïnes ancorades a la membrana per un domini en l'extrem C-terminal (*C-tail anchored proteins*) (Steel et al., 2002; Yabal et al., 2003). Aquestes proteïnes tenen només un punt d'ancoratge a la membrana localitzat dins dels 50 aminoàcids de l'extrem C-terminal, de manera que l'extrem N-terminal queda orientat cap al citosol. En aquest cas, també es tracta d'una translocació posttraduccional ja que la traducció de la proteïna es completa abans d'ancorar-se a la membrana però el procés és independent de la maquinària Sec. (Stefanovic and Hegde, 2007) han demostrat que aquestes proteïnes són reconegudes per un complex que es troba en el citosol, el TRC (*transmembrane domain recognition complex*). Aquest TRC funciona com un receptor dirigint i unint les proteïnes a la membrana del RE. El TRC consta de diverses subunitats, sent la TRC40 (Arr4/Get3 en en *S. cerevisiae*) la subunitat essencial que coordina el direccionament i inserció en la membrana.

Glicosilació de proteïnes en el reticle endoplasmàtic

Moltes proteïnes translocades al RE són glicosilades. En general, la glicosilació és una modificació co o posttraduccional de proteïnes que serveix per a expandir la diversitat del proteoma. Les proteïnes glicosilades estan implicades en molts processos cel.lulars incloent direccionament i reconeixement intracel.lular, plegament i estabilitat de les proteïnes (Mitra et al., 2006; Weerapana and Imperiali, 2006). Hi ha tres tipus de glicosilació de proteïnes acoblades a la ruta secretora en llevat (Herscovics and Orlean, 1993): l'N-glicosilació (addició de sucres a una Asn), l'O-glicosilació (addició de sucres a residus de Ser o Thr) i la modificació per GPI (addició d'un glicosilfosfatidil inositol a l'extrem C-terminal d'una proteïna).

L'N-glicosilació és la modificació predominant en cèl.lules eucariotes i ha sigut àmpliament estudiada particularment en llevat (Chavan et al., 2005). En aquest procés, conforme la proteïna naixent entra en el lumen del RE a través del translocó Sec61, la seua seqüència és escanejada per l'oligosacariiltransferasa (OST) que rastreja les Asn localitzades en motius Asn-X-Ser/Thr de la proteïna (podent ser X qualsevol aminoàcid excepte Pro). Aquestes Asn són modificades covalentement per l'addició d'un *core* preformat de glicans compost per tres residus de glucosa, nou manoses i dues N-acetilglucosamines (Glc₃Man₉GlcNAc₂). Posteriorment, en proteïnes de secreció, aquest *core* de glicans pot sofrir un procés de maduració per glicosidases i glicosiltransferases del Golgi.

L'OST és un complex multimèric localitzat en la membrana de RE amb el lloc actiu orientat cap al lumen (Kelleher and Gilmore, 2006). Aquest complex enzimàtic es troba associat al translocó, ja que la transferència dels sucres a la Asn determinada de la proteïna pot ocórrer mentre la proteïna encara està sintetitzant-se i per tant, encara està emergent pel translocó. Només en què s'ha translocat al lumen del RE de 12 a 15 aminoàcids de la proteïna naixent, la OST ja pot funcionar (Nilsson and von Heijne, 2000).

De fet, la glicosilació es produeix solament quan una Asn susceptible de ser glicosilada es localitza com a mínim a 12 aminoàcids abans o 14 aminoàcids després d'un segment transmembrana. Atès que la glicosilació de les proteïnes ocorre en el RE de manera específica, concretament en el compartiment luminal del RE, el fet que una proteïna es glicosile proporciona informació topològica de la proteïna (van Geest M. and Lolkema, 2000).

Un altre tipus de glicosilació de les proteïnes és l'*O*-glicosilació (Peter-Katalinic, 2005). Les proteïnes modificades per *O*-glicosilació presenten la característica comuna que els sucres s'addicionen a una Ser o Thr pròxima a una Pro i a més a més, el lloc acceptor sol presentar una conformació beta. El primer pas en l'*O*-glicosilació comença en el RE amb la transferència d'una mannosina al grup hidroxil de Ser o Thr i continua en el Golgi on s'uneixen més carbohidrats. L'*O*-glicosilació és catalitzada per proteïnes anomenades mannosiltransferases (proteïnes Pmt). En *S. cerevisiae* existeixen almenys 6 gens PMT (Gentsch and Tanner, 1997; Strahl-Bolsinger et al., 1999; Ecker et al., 2003; Girrbach and Strahl, 2003).

Una altra modificació posttraduccional per glicosilació que poden sofrir les proteïnes una vegada translocades al RE és la modificació pel grup glicosilfosfatidil inositol (GPI) (Ikezawa, 2002). Aquesta modificació es troba en totes les cèl·lules d'eucariotes. En el cas de *S. cerevisiae*, les proteïnes descrites modificades per un grup GPI solen ser proteïnes localitzades en la membrana plasmàtica o proteïnes que formen part de la paret cel·lular. Els precursors de les proteïnes per a ser modificades per un grup GPI es caracteritzen perquè contenen dues seqüències hidrofòbiques: una, en l'extrem N-terminal que és la seqüència senyal que dirigeix la proteïna al reticle endoplasmàtic, i altra, en l'extrem C-terminal per retindre la proteïna en la membrana del RE fins que es produïska la modificació per GPI (Caro et al., 1997; Ikezawa, 2002; Frieman and Cormack, 2003; Frieman and Cormack, 2004). En aquest procés de modificació primer

s'elimina la seqüència senyal de l'extrem N-terminal i seguidament l'extrem C-terminal es processa per un complex transamidasa, quedant la proteïna amb un nou aminoàcid C-terminal denominat lloc ω . Els aminoàcids més eficients com a lloc ω són Asn i Gly que s'uneixen mitjançant un enllaç amida al grup etanolamina del glicolípid preformat. El grup inositol funciona com un ancoratge hidrofòbic que permet a la proteïna unir-se a la membrana. Les proteïnes que s'ancoren a la membrana per un grup GPI es poden identificar mitjançant l'ús de fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) que hidrolitza específicament els àcids grassos que mantenen ancorada la proteïna a la bicapa lipídica dissociant així la proteïna de la membrana (Nuoffer et al., 1991).

Degradació de proteïnes associada al reticle endoplasmàtic

Les proteïnes són translocades al RE en un estat desplegat per a després modificar-se i plegar-se fins adquirir la seua conformació biològicament activa (Kostova and Wolf, 2003). Aquestes proteïnes són sotmeses a un estricte control de qualitat dins del RE que discrimina entre proteïnes plegades adequada o inadequadament. Així, les proteïnes defectuoses són seleccionades i translocades de nou a través del translocó però en sentit contrari, des del RE al citosol (retrotranslocació), on es degraden pel sistema ubiquitina-proteasoma. Tot aquest procés es coneix com a degradació de proteïnes associada al reticle endoplasmàtic o ruta ERAD (Romisch, 2005; Meusser et al., 2005; McCracken and Brodsky, 1996). S'han descrit almenys dues ubiquitin-ligases E3 (Hrd1-Der3 i Doa10) localitzades en la membrana de RE que organitzen diferents complexos proteics que s'encarreguen de rebre i processar les proteïnes mal plegades. Aquests complexos defineixen diferents rutes que reconeixen lesions en els dominis citosòlics (ERAD-C), dominis transmembrana (ERAD-M) i dominis luminals (ERAD-L) dels sustrats (Kawaguchi and Ng, 2007). L'energia

necessària per al transport dels substrats a través de la membrana del reticle és subministrada per l'ATPasa Cdc48 junt amb alguns cofactors. Finalment els substrats poliubiquitinats, ja en el citosol són reconeguts per un altre complex proteic on intervé Rad23 que lliura el substrat al proteasoma.

Encara que la ruta ERAD va ser originalment descrita com una via de degradació de proteïnes mal plegades, té una funció més general. Així està clar que aquesta via és necessària per al control de l'activitat d'altres substrats proteics localitzats al RE com per exemple l'enzim clau de la ruta del mevalonat (3-hidroxi 3-metilglutaril coenzim A reductasa HMGR) (Hampton, 2002). A més a més, (Hitchcock et al., 2003) identificaren un conjunt de proteïnes associades a membrana que són ubiquitinades en resposta a mutacions en la maquinaria de ERAD entre les quals es troben proteïnes de la membrana del RE, permeases de la membrana plasmàtica, receptors, enzims i sorprenentment, components del citoesquelet d'actina com la pròpia Act1, suggerint que algunes d'aquestes proteïnes són substrats d'ERAD. Més recentment s'ha demostrat que components de la ruta ERAD participen en la degradació de proteïnes que no es localitzen en el RE o en membranes sinó que són proteïnes solubles tant del citosol com del nucli (Deng and Hochstrasser, 2006).

Rot1, UNA PROTEÏNA ESSENCIAL DE *S. cerevisiae* AMB FUNCIO DESCONEGUDA

En els darrers anys s'han realitzat moltes anàlisis globals mitjançant tècniques proteòmiques i genòmiques que han permès el descobriment de productes de nous gens, portant a un millor enteniment del funcionament cel·lular, especialment en *S. cerevisiae*. Hi ha bases de dades de llevat en les quals s'organitza tota la informació que es coneix sobre els gens i les

proteïnes. Malgrat açò, la funció molecular d'alguns gens encara és deconeguda. Aquest és el cas de *ROT1* (reversal of *tor2*), un gen essencial de llevat. El gen *ROT1* es va identificar en un rastreig genètic on es buscaven mutacions supressores de la letalitat de la soca mutant *tor2^{ts}* (Bickle et al., 1998). *TOR2* està implicat en el control del creixement cel·lular i en l'organització del citoesquelet d'actina i com que *ROT1* suprimeix a la mutació *tor2*, podria ser que *ROT1* estiguera relacionat amb aquestes funcions. S'ha descrit que el mutant *rot1* pot créixer en presència d'un estabilitzador osmòtic com és el sorbitol, indicant que aquest mutant presenta alteracions en la paret cel·lular (Machi et al., 2004). De fet, la proteïna Rot1 és requerida per a mantenir nivells normals de 1,3- β -glucans i 1,6- β -glucans i quitina, components de la paret cel·lular (Bickle et al., 1998; Machi et al., 2004). També s'ha identificat Rot1 en un rastreig de supressors en la soca mutant en la dolicol quinasa Sec59 defectuosa en la formació del dolicol fosfat i l'ensamblatge de la paret cel·lular (Orlowski et al., 2007). Per altra banda, en una anàlisi a gran escala d'interaccions genètiques s'ha agrupat a *ROT1* en la categoria funcional de gens implicats en la formació de paret cel·lular, biosíntesi de GPI i modificacions de proteïnes per *O*-glicosilació (Schuldiner et al., 2005). A més a més, en una anàlisi global de búsqueda d'activitats proteiques de llevat s'ha identificat a Rot1 com una proteïna capaç d'unir fosfatidilinositol (PI) (Zhu et al., 2001). El PI és un constituent de membranes cel·lulars i també serveix com a segon missatger que regula processos relacionats amb el citoesquelet i amb el trànsit de membranes. Recentment, s'ha publicat que Rot1 podria funcionar junt amb Kar2 en el correcte plegament de les proteïnes en el reticle endoplasmàtic i possiblement també podria estar implicat en la lisi dels cossos autofàgics (Takeuchi et al., 2006a; Takeuchi et al., 2006b). La informació actual sobre la possible funció de Rot1 es completa amb assajos de doble híbrid a nivell genòmic on es descriu una interacció física amb Nas2, una proteïna homòloga d'una subunitat reguladora del proteasoma de

mamífers (Watanabe et al., 1998). S'ha descrit que Nas2 interacciona amb subunitats del proteasoma i també amb proteïnes del polarisoma (Drees et al., 2001). Malgrat tota aquesta informació, la funció molecular de Rot1 encara no està esclarida.

OBJECTIUS

Atès que la funció molecular del gen essencial *ROT1* de *Saccharomyces cerevisiae* encara és desconeguda i que podria estar relacionada amb els processos de morfogènesi i proliferació cel·lular es proposa com a objectius d'aquest treball portar a terme la:

1. Caracterització funcional de la proteïna Rot1.

Aquesta caracterització funcional de Rot1 s'abordarà utilitzant una soca mutant condicional en *ROT1*. La inactivació del gen permetrà l'estudi del fenotip del mutant, determinar interaccions genètiques amb altres gens de *S. cerevisiae*, així com l'estudi de possibles defectes del cicle cel·lular en aquesta soca mutant.

2. Caracterització bioquímica de Rot1.

Per a entendre millor l'activitat de la proteïna Rot1 i la seua funció molecular, es proposa com a segon objectiu una anàlisi exhaustiva de la bioquímica de Rot1. Així, s'estudiarà la localització subcel·lular de Rot1, el mecanisme de localització subcel·lular, possibles modificacions posttraduccionals i dominis funcionals de la proteïna. A més a més, s'analitzarà l'estabilitat de la proteïna en la cèl·lula.

2. Materials i mètodes

Soques i condicions de creixement

Escherichia coli

Durant tot el treball realitzat, la soca d'*Escherichia coli* emprada va ser la DH5 α . Les cèl.lules es varen créixer en medi LB (0.5% d'extracte de llevat, 1% de triptona, 1% de NaCl) o en medi 2xYT (1% d'extracte llevat, 2% de triptona, 1% de NaCl). Les soques resistents a ampicilina es varen créixer en medi LB o 2xYT suplementat amb 50 $\mu\text{g/mL}$ d'ampicil.lina i 50 $\mu\text{g/mL}$ de nafcil.lina (anomenats LBA o 2xYTA respectivament). Per a la preparació de plaques en medi sòlid es va afegir agar bacteriològic al 2%.

Tots els medis es varen esterilitzar en autoclau 20 min a 1 atm de pressió i 120°C. Els cultius es varen créixer a 37°C en agitació.

Saccharomyces cerevisiae

Les soques de llevat utilitzades en aquest treball es descriuen en les taules 2.1 i 2.2. Les interrupcions del gens es varen realitzar utilitzant plasmidis amb casset de disrupció o bé obtenint els cassets de disrupció per PCR a partir d'altres soques o a partir de plasmidis segons es descriu en (Longtine et al., 1998). Els marcatges de les proteïnes amb diferents epítops i la substitució del promotor del gen pel promotor *GALI* es va realitzar integrant fragments de DNA amplificats per PCR (Longtine et al., 1998). La substitució del promotor del gen pel promotor *tetO₇* es va realitzar integrant fragments de DNA amplificats per PCR a partir del plasmidi pCM225 i la introducció del superrepressor tTR^{es} es va realitzar per integració del plasmidi pCM244 digerit amb EcoRV (Belli et al., 1998). Posteriorment els transformants es varen seleccionar per créixement en el medi de selecció i es varen comprovar per PCR amb els oligonucleòtids corresponents.

Les cèl.lules de llevat es varen créixer en medi YPD (1% d'extracte de llevat, 2% de peptona bacteriològica, 2% de glucosa), YPGal (1% d'extracte de llevat, 2% de peptona bacteriològica, 2% de galactosa) o medi mínim sintètic (0.67% *yeast nitrogen base*, amb 2% de glucosa -SD-, 2% de galactosa -SGal- o 2% de rafinosa -SRaf- com a font de carboni) suplementat amb 40 µg/mL dels aminoàcids apropiats per a la selecció de transformants. Per a la preparació de plaques en medi sòlid es va afegir agar bacteriològic al 2%. Les soques resistents a la kanamicina es varen créixer en plaques de YPD o YPGal amb 200 µg/mL de genèticina G418. Per a reprimir el promotor *tetO₇* es va afegir doxiciclina a concentració final de 5 µg/mL (repressió total) o de 0.5 µg/mL (repressió parcial). Les cèl.lules es

Taula 2.1. Soques de llevat utilitzades en el capítol 3

| Soca | Genotip | Origen |
|----------------|---|--------------|
| W303-1a | <i>MATa ade2 trp1 leu2 his3 ura3 can1</i> | Aquest grup |
| 1783 | <i>MATa ade2 trp1 leu2 his3 ura3 sucΔ9</i> | D.Levin |
| CML240 | <i>MATa ade2 ura3 leu2 his3 trp1 can1</i> <i>CMV p(tetR'-SSN6)::LEU2</i> | E.Herrero |
| CD104-2c | <i>MATa clb2::LEU2 ura3 leu2 his3 trp1 ade2 can1</i> <i>ssd1-d</i> | B.Futcher |
| <i>cdc15-2</i> | <i>cdc15-2</i> en W303 | Nashmyth |
| <i>cdc16</i> | <i>MATa cdc16-1 leu2 his7 ura3 gal1</i> | L.Hartwell |
| <i>cdc20</i> | <i>MATa ade2 trp1 leu2 his3 ura3 can1 cdc20</i> | F.Ulmann |
| DJTD2-16D | <i>MATα cdc42-1 leu2 ura3 trp1 his4 gal2</i> | J.C.Pringle |
| DL454 | <i>slt2::TRP1</i> en 1783 | D.Levin |
| HTY600 | <i>cdc34-2</i> en W303-1a | L.H.Johnston |
| HNY21-Y323 | <i>rho1-104</i> en OHNY1 | Y.Takai |
| JC6-3a | <i>MATa pkc1-8 ade2 ura3 his3 leu2 trp1 can1 met</i> | Aquest grup |
| KTM200U | <i>MATa apc2::HIS7 ura3 leu2 trp1 papc2-8-TRP1</i> | L.H.Johnston |
| MTY740 | <i>cdc53-1</i> en W303-1a | M.Tyers |
| OHNY1-Y324 | <i>MATa ade2 trp1 leu2 his3 ura3</i> | Y.Takai |
| WCG4α | <i>MATα his3 leu2 ura3</i> | D.H.Wolf |
| WCG4-11/22 | <i>pre1-1 pre2-2</i> en WCGα | D.H.Wolf |
| JCY216 | <i>kanMX4-tetO7::ROT1</i> en CML240 | Aquest grup |
| JCY255 | <i>kanMX4-tetO7::ROT1</i> en CD104-2c | Aquest grup |
| JCY431 | <i>kanMX4-tetO7::ROT1</i> en DL454 | Aquest grup |
| JCY433 | <i>kanMX4-tetO7::ROT1</i> en JC6-3a | Aquest grup |
| JCY553 | <i>kanMX4-tetO7::ROT1</i> en <i>cdc16</i> | Aquest grup |

| | | |
|--------|--|----------------|
| JCY555 | <i>kanMX4-tetO₇:ROT1</i> en KTM200U | Aquest grup |
| MCY10 | <i>ROT1-3HA-TRP1</i> en CML240 | Aquest treball |
| MCY26 | <i>kanMX4-tetO₇:ROT1</i> en MTY740 | Aquest treball |
| MCY32 | <i>kanMX4-tetO₇:ROT1</i> en WCG4-11/22 | Aquest treball |
| MCY68 | <i>kanMX4-tetO₇:ROT1</i> en W303-1a | Aquest treball |
| MCY92 | <i>kanMX4-tetO₇:ROT1</i> en DJTD2-16D | Aquest treball |
| MCY100 | <i>kanMX4-tetO₇:ROT1</i> en HTY600 | Aquest treball |
| MCY123 | <i>CLB2-3HA-HIS3 SIC-13myc-TRP1</i> en <i>cdc15-2</i> | Aquest treball |
| MCY125 | <i>kanMX4-tetO₇:ROT1</i> en WCG4 α | Aquest treball |
| MCY139 | <i>kanMX4-tetO₇:ROT1</i> en <i>cdc20</i> | Aquest treball |
| MCY151 | <i>kanMX4-tetO₇:ROT1</i> <i>CMVp(tetR'-SSN6)::LEU2</i> en MCY123 | Aquest treball |
| MCY158 | <i>kanMX4-tetO₇:ROT1</i> en HNY21 | Aquest treball |
| MCY186 | <i>kanMX4-tetO₇:ROT1</i> en 1783 | Aquest treball |
| MCY188 | <i>clb2::LEU2</i> en DJTD2-16D | Aquest treball |
| MCY189 | <i>clb2::LEU2</i> en MCY92 | Aquest treball |
| MCY192 | <i>kanMX4-tetO₇:ROT1</i> en JCY216 | Aquest treball |
| MCY198 | <i>MYO1-GFP-TRP1</i> en JCY216 | Aquest treball |
| MCY200 | <i>kanMX4-tetO₇:ROT1</i> en OHNY1 | Aquest treball |

Taula 2.2. Soques de llevat utilitzades en el capítol 4.

| Soca | Genotip | Origen |
|---------|---|-------------|
| W303-1a | <i>MATa ade2 trp1 leu2 his3 ura3 can1</i> | Aquest grup |
| CML240 | <i>MATa ade2 ura3 leu2 his3 trp1 can1</i> <i>CMVp (tetR'-SSN6)::LEU2</i> | E.Herrero |
| CYC209 | <i>MATa trp1 leu2 his3 ura3 tTA-LEU2 KAR2-FLAG-Kan</i> | M.Aldea |

| | | |
|---------------|--|----------------|
| CYC211 | <i>MATa trp1 leu2 his3 ura3 tTA-LEU2 SEC62-FLAG-Kan</i> | M.Aldea |
| BY4741 | <i>MAT a his3 leu2 met15 ura3</i> | Euroscarf |
| <i>cdc20</i> | <i>MATa ade2 trp1 leu2 his3 ura3 can1 cdc20</i> | F.Ulmann |
| KTM200U | <i>MATa apc2::HIS7 ura3 leu2 trp1 papc2-8-TRP1</i> | L.H.Johnston |
| MHY1631 | <i>MATα his3 leu2 trp1 ura3 trp1 lys2 hrd1Δ::LEU2 doa10Δ::HIS3</i> | M.Hochstrasser |
| MTY740 | <i>cdc53-1</i> en W303-1a | M.Tyers |
| MWY50 | <i>MAT α ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1 KANMX4-PMET:SEC62</i> | C.J.Stirling |
| <i>pmt1</i> | <i>ydl095w::kanMX4</i> en BY4741 | Euroscarf |
| <i>pmt2</i> | <i>yal023c::kanMX4</i> en BY4741 | Euroscarf |
| <i>pmt3</i> | <i>yor321w::kanMX4</i> en BY4741 | Euroscarf |
| <i>pmt5</i> | <i>ydl093w::kanMX4</i> en BY4741 | Euroscarf |
| <i>pmt6</i> | <i>ygr199w::kanMX4</i> en BY4741 | Euroscarf |
| XMA0-4T | <i>MATα ura3 leu2 his3 trp1 lys2 suc2 pmt4::TRP1</i> | S.Strahl |
| WCG4 α | <i>MATα his3 leu2 ura3</i> | D.H.Wolf |
| WCG4-11/22 | <i>pre1-1 pre2-2</i> en WCG α | D.H.Wolf |
| JCY216 | <i>kanMX4-tetO₇:ROT1</i> en CML240 | Aquest grup |
| JCY526 | <i>KanMX6-GAL1:HA-ROT1</i> en W303 | Aquest grup |
| JCY1012 | <i>cdh1::kanMX4</i> en W303-1a | Aquest grup |
| MCY62 | <i>kanMX6-GAL1-3HA-ROT1 rot1 (Δ1-25)</i> en W303-1a pROT1 | Aquest treball |
| MCY175 | <i>kanMX6-GAL1-3HA-ROT1 rot1 (Δ1-60)</i> en W303-1a pROT1 | Aquest treball |
| MCY215 | <i>kanMX4-tetO₇:SEC61 CMVp(tetR'-SSN6)::LEU2</i> en W303-1a | Aquest treball |
| MCY217 | <i>kanMX4-tetO₇:SEC65 CMVp(tetR'-SSN6)::LEU2</i> en W303-1a | Aquest treball |
| MCY222 | <i>TRP1 ROT1 (Δ200-256)</i> en MCY175 | Aquest treball |

| | | |
|--------|---|----------------|
| MCY223 | <i>TRP1 ROT1</i> ($\Delta 200-256$) en MCY232 | Aquest treball |
| MCY232 | <i>kanMX6-GAL1-3HA-ROT1 rot1</i> ($\Delta 1-90$) en W303-1a pROT1 | Aquest treball |
| MCY238 | <i>TRP1 ROT1</i> ($\Delta 229-256$) en MCY62 | Aquest treball |
| MCY240 | <i>TRP1 ROT1</i> ($\Delta 229-256$) en MCY175 | Aquest treball |
| MCY241 | <i>TRP1 ROT1</i> ($\Delta 229-256$) en MCY232 | Aquest treball |
| MCY243 | <i>TRP1 ROT1</i> ($\Delta 200-256$) en MCY62 | Aquest treball |

varen créixer en agitació a 28°C o a 25°C en cas de ser soques termosensibles.

Per a sincronitzar cultius amb factor α , es va afegir el factor α a una concentració final de 5 $\mu\text{g/mL}$ a cultius exponencials de cèl.lules *MATa* crescudes en YPD. Després de 2 hores, vàrem tornar a afegir 2.5 $\mu\text{g/mL}$ de factor α i es va deixar incubant 2 hores més. El factor α s'elimina del medi per filtració ràpida llavant-se les cèl.lules amb abundant medi fresc. Finalment les cèl.lules es varen resuspendre per sonicació i es varen incubar en medi fresc a 28°C. En el cas de les soques *tetO₇:ROT1*, es varen afegir 5 $\mu\text{g/mL}$ de doxiciclina durant la incubació amb el factor α i després d'alliberar de l'aturada.

Transformació de bactèria

Les transformacions de bactèria es varen realitzar amb cèl.lules electrocompetents de la soca DH5 α d'*E. coli* seguint el mètode de transformació per electroporació. Es va utilitzar un electroporador *E. coli* Pulser (Biorad), en condicions de 1,8 kV, 25 μF , 200 Ω . Una vegada sotmeses al pols de corrent, es deixaren recuperar en medi SOC (0.5 %

d'extracte de llevat, 0.5 % de triptona, 20 mM de glucosa, 10 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄) durant una hora a 37°C i posteriorment es varen sembrar en plaques de LBA.

Transformació de llevat

Les transformacions amb plasmidis i productes de PCR es varen realitzar seguint el mètode de transformació amb acetat de liti. Es varen resuspendre $1-2 \times 10^8$ cèl.lules amb 50 µL de solució LiAc/TE (0.01 M Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 M AcLi). Es va afegir esperma de salmó desnaturalitzat (3.5 µg/µL de cèl.lules), el DNA a transformar i 300 µL de solució LiAc/TE amb 40 % de polietilenglicol. Les cèl.lules es varen incubar a 30° C durant 30 minuts i després es varen sotmetre a xoc tèrmic de 42°C durant 15 minuts i es varen sembrar en el medi SD en absència de l'aminoàcid adequat. Les transformacions en les que la selecció era resistència a kanamicina es va seguir el mateix protocol amb algunes modificacions, després del xoc tèrmic, les cèl.lules es varen centrifugar i es varen incubar en 4 mL de YPD en agitació durant 4 hores abans de sembrar-les en plaques amb geneticina.

Construcció de plasmidis

Construcció dels plasmidis pROT1-CEN, pROT1-2µ., pROT1-HA-CEN, pROT1-HA-2µ i pGAL1:ROT1-HA

El plasmidi pROT1-CEN es va obtenir per clonatge d'un fragment de DNA des del nucleòtid - 430 fins al nucleòtid + 955 del gen *ROT1* amplificat per PCR en el vector pRS314 digerit amb els enzims de restricció EcoRI-BamHI. Seguidament, el fragment de restricció EcoRI-BamHI obtés

d'aquest plasmidi es va subclonar al vector Yeplac112 per a obtenir el plasmidi pROT1-2 μ .

El plasmidi pROT1-HA-CEN conté tres còpies de la seqüència que codifica l'epítop HA integrades en pauta de lectura entre els aminoàcids 181 i 182 de la regió codificant de *ROT1*. Aquest plasmidi es va construir en dues etapes. Primer, es va amplificar per PCR un fragment de la seqüència de *ROT1* des del nucleòtid - 430 fins al + 543 utilitzant un oligonucleòtid revers que contenia la seqüència codificant per a una còpia de l'epítop HA i es va clonar en el vector Ycplac22 digerit amb els enzims de restricció EcoRI-BamHI. A continuació es va amplificar per PCR el fragment de la seqüència del gen *ROT1* des del nucleòtid + 544 fins al + 955, utilitzant un oligonucleòtid directe que contenia la seqüència codificant per a dues còpies de l'epítop HA i es va clonar en el plasmidi anterior digerit amb els enzims de restricció BamHI-SphI, obtenint el plasmidi pROT1-HA-CEN. Finalment, el fragment de restricció EcoRI-SphI obtingut del plasmidi pROT1-HA-CEN va ser subclonat en YEplac112 per a obtenir el plasmidi pROT1-HA-2 μ i en YCplac33 per a generar el plasmidi pROT1-HA-URA3.

El plasmidi pGAL1:ROT1-HA es va obtenir substituint el promotor de *ROT1* pel promotor *GAL1* en el plasmidi pROT1-HA-CEN integrant un fragment amplificat per PCR a partir del plasmidi pFA6a-kanMX6-PGAL1 (Longtine et al., 1998).

Construcció dels plasmidis pROT1-HA ^{Δ 229-256}-CEN, pROT1-HA ^{Δ 229-256}-2 μ , pROT1-HA ^{Δ 200-256}-CEN i pROT1-HA ^{Δ 200-256}-2 μ

Un fragment de DNA des del nucleòtid - 430 fins al + 684 o fins al + 600 amplificat per PCR a partir del plasmidi pROT1-HA-CEN, es va clonar en el vector pRS314 digerit amb els enzims de restricció EcoRI-XhoI o en

els vectors YEplac112 i YCplac22 digerit amb EcoRI-SalI per a obtenir els plasmidis pROT1-HA^{Δ229-256}-CEN, pROT1-HA^{Δ229-256}-2μ i pROT1-HA^{Δ200-256}-CEN respectivament. Seguidament, el fragment de restricció EcoRI-SalI obtingut a partir del plasmidi pROT1-HA^{Δ200-256}-CEN es va subclonar en el vector YEplac112 obtenint el plasmidi pROT1-HA^{Δ200-256}-2μ.

Construcció del plasmidi pROT1-HA^{Δ229-256}-18L, pROT1-HA^{Δ229-256}-18L-2μ

El plasmidi pROT1-HA^{Δ229-256}-18L es va construir en dues etapes. Primer, es va amplificar per PCR un fragment de la seqüència de *ROT1* des del nucleòtid - 430 fins al + 684 utilitzant com a motlle el plasmidi pROT1-HA i es va clonar en el vector YCplac50 digerit amb els enzims de restricció EcoRI-PstI. A continuació, es va amplificar per PCR un fragment del gen *ROT1* des del nucleòtid + 772 fins al + 955 utilitzant un oligonucleòtid directe que contenia la seqüència codificant per a una cua de 18 polileucines i es va clonar en pauta de lectura en el plasmidi anterior digerit amb els enzims de restricció PstI-SphI per a obtenir el plasmidi pROT1-HA^{Δ229-256}-18L. Després, el fragment de restricció EcoRI-SphI obtingut del plasmidi centromèric pROT1-HA^{Δ229-256}-18L va ser subclonat en YEplac112 per a obtenir el plasmidi pROT1-HA^{Δ229-256}-18L-2μ.

Construcció dels plasmidis pROT1^{N-x-Q}

Els plasmidis pROT1^{N87Q}, pROT1^{N103Q}, pROT1^{N107Q}, pROT1^{N139Q}, pROT1^{N103,139Q}, pROT1^{N103,107,139Q} deriven del plasmidi pROT1-HA-CEN per mutagènesi dirigida utilitzant un sistema comercial *PCR mutagenesi Kit QuikChange (Stratagene)* seguint les instruccions del fabricant.

Assajos de creixement

Per analitzar el creixement de soques de llevat en sectors es va sembrar una quantitat equivalent de cada soca en plaques adequades i es varen deixar creixent durant 2-3 dies a la temperatura indicada.

Per analitzar el creixement de soques de llevat en gotejos es varen preparar dilucions seriades (1:10, 1:100, 1:1000) de cultius en fase exponencial ($2-8 \times 10^6$ cèl.lules/mL) de les diferents soques després d'igualar concentracions (normalment a 5×10^6 cèl.lules). De cadascuna de les dilucions es varen sembrar 5 µL en placa amb el medi de cultiu apropiat i les plaques es varen incubar a la temperatura indicada.

Comptatge de cèl.lules

La concentració cel.lular dels cultius es va determinar afegint de 10 a 100 µL de cultiu a 10 mL d'isoton en cultius en fase exponencial i després d'una breu sonicació per dispersar les cèl.lules es va determinar el nombre de cèl.lules utilitzant un *Particle Count and Size Analyser Z₂* (Coulter Inc.).

Determinació de l'índex de gemmació

L'índex de gemmació (*budding index*) es va determinar en cultius exponencials ($2-8 \times 10^6$ cèl.lules/mL), després d'una breu sonicació, per recompte al microscopi de les cèl.lules sense gemma, amb gemma o regemmades. Els resultats són la mitjana d'almenys tres recomptes diferents (100 cèl.lules/recompte).

Anàlisi de cèl.lules per microscopia de fluorescència

Tinció d'F-actina, quitina, nuclis i membranes

La tinció d'F-actina es va realitzar utilitzant cèl.lules fixades durant tota la nit a 4°C en 4% de formaldehid. Per a visualitzar l'F-actina es resuspenen les cèl.lules en una dissolució 0.1mg/mL d'Alexa Fluor 488 phalloidin (*Molecular Probes*). La tinció de quitina i de nuclis es varen realitzar utilitzant cèl.lules fixades durant 5 minuts a temperatura ambient amb etanol 70%. Per a visualitzar la quitina i els nuclis es resuspenen les cèl.lules en una dissolució 0.1 mg/mL de *Calcofluor White* (*Sigma*) o 0.1 mg/mL de 4,6-diamidino-2-fenilindol, DAPI (*Sigma*) respectivament. Per a la tinció de membranes cel.lulars, les cèl.lules es varen resuspendre en 95% d'etanol que contenia 0.1 mg/mL 1,1-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametil-indocarbocianina perclorat (DiI, *Promega*). Després de 20 minuts d'incubació a 37° C, les cèl.lules es varen llavar dues vegades amb aigua.

Localització de proteïnes mitjançant immunofluorescència indirecta

Aproximadament 10^8 cèl.lules es varen fixar amb un tampó A (100 mM de KH_2PO_4 pH 6.4, 0.5 mM MgCl_2) amb 3.7% de formaldehid i es varen incubar durant 2 hores a 30°C. Després es varen llavar amb un tampó B (d'igual composició que el tampó A amb 1.2 M de sorbitol). Per a l'obtenció dels esferoplasts es varen incubar les cèl.lules amb el tampó B afegint 0.1% β -mercaptoetanol i zimoliasa 20T a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durant 20 minuts a 37°C en agitació i després es varen llavar amb tampó B. Alíquotes de 5-10 μL de la suspensió d'aquests esferoplasts es varen distribuir en portes de microscopi amb pouets, on varen ser tractades amb un agent bloquejant, PBS (150 mM NaCl, 40 mM Na_2HPO_4 i 10 mM NaH_2PO_4)-BSA 0.1% durant 20 minuts 4°C. Després, es varen afegir 10 μL d'una dilució 0.4

µg/mL d'anticòs primari anti-HA *High Affinity 3F10 (Roche)* o 10 µL d'una dilució 0.4 µg/mL d'anticòs α-tubulina (*Serotec Ltd.*) en PBS-BSA durant 2 hores a 4°C. Es va llavar l'anticòs primari amb PBS-BSA i es va incubar amb l'anticòs secundari Alexa Fluor 546 anti-rat IgG (*Molecular Probes*) durant 1 hora a 4°C en obscuritat. Després de llavar els esferoplasts, el DNA es va tenyir amb DAPI 0.1µg/mL en PBS.

Localització de proteïnes amb marcatge GFP

Les proteïnes etiquetades amb GFP es varen visualitzar en cèl.lules vives crescudes en el medi sintètic corresponent.

Les mostres es varen analitzar en un microscopi de fluorescència *Axioskop 2 de Zeiss Inc.* i les fotografies es varen obtindre amb una càmera *SPOT de Diagnostic Instruments Inc.* Les anàlisis per microscopia confocal es varen realitzar en un microscopi confocal *Leica TCS* obtenint sèries de seccions amb un interval de 140 nm i les imatges es varen processar amb el *Leica Confocal Software (LCS)*.

Extractes proteics i anàlisi per *Western blot*

Els extractes totals de proteïnes es varen preparar a partir de 10⁸ cèl.lules de cultius en fase exponencial. Les cèl.lules es varen llavar amb aigua i es varen resuspendre amb 100 µL d'H₂O i 100 µL de NaOH 0.2M agitant en vòrtex. Després d'incubar 10 minuts a temperatura ambient es varen centrifugar a 12.000 rpm durant 1 minut. El *pellet* es va resuspendre en 50 µL de dissolvent de mostres SDS-PAGE amb DTT i després d'incubar a 95°C durant 5 minuts. L'extracte es va clarificar per centrifugació a 3.000 rpm durant 10 minuts. Concentracions equivalents de proteïna total es varen separar per SDS-PAGE i es varen transferir a membranes de nitrocel.lulosa

mitjançant electrotransferència en humit a 100 V durant 40 minuts. Les membranes es varen blocar amb TBS-T (0.1M Tris-HCl pH 7.5, 0,125M NaCl, 0.01% Tween-20) suplementat amb agent bloquejant al 2% durant 1 h a temperatura ambient i a continuació es varen incubar amb l'anticòs primari durant tota la nit a 4°C. L'excés d'anticòs primari va eliminar amb tres llavats de 15 minuts amb TBS-T. Les membranes es varen incubar amb anticòs secundari durant 45 minuts a 4°C. Després de llavar amb TBS-T es varen revelar les membranes utilitzant els reactius *ECL Advance Western blotting* (GE Healthcare) seguint les instruccions del fabricant. Els anticossos utilitzats varen ser anti-HA 12CA5 de Roche, anti-HA 3F10 de Roche, anti-c-myc 9E10 de Roche, anti-GST de GE Healthcare, anti-FLAG de GE Healthcare, anti-GFP d'Invitrogen, anti-Cdc2-p34 (anti-PSTAIRE) de Santa Cruz i antitubulina de Molecular Probes.

Fraccionament subcel·lular

Extractes totals de proteïnes es varen preparar a partir de 5×10^8 cèl·lules de cultius en fase exponencial. Les cèl·lules es varen llavar amb aigua, es varen resuspendre amb 500 µL de tampó de lisi (0.1 M sorbitol, 50 mM KOAc, 2 mM EDTA, 20 mM HEPES pH 7.5 i 1 mM DTT) suplementat amb inhibidors de proteases (Roche) i es varen lisar mitjançant agitació vigorosa amb perles de vidre a 4°C durant sis polsos d'1 minut. Els extractes es varen centrifugar a 700 x g durant 5 minuts per separar les restes cel·lulars del sobrenadant. Aquest sobrenadant es va dividir en diferents al·líquotes que es varen sotmetre als següents tractaments durant 1 hora en gel: 0.5 M NaCl, 2,5 M urea, 0.1 M Na₂CO₃ (pH 11.5) o 1% Triton X-100 amb 0.5 M NaCl. Després de la incubació, les mostres es varen centrifugar a 100.000 x g (rotor TLA-55 Beckman) durant 1 hora a 4°C per tal de separar la fracció soluble (S) de la fracció de membranes o *pellet* (P). Quantitats equivalents de

proteïna de les diverses fraccions es varen separar per SDS-PAGE i es varen analitzar per *western blot*.

Assajos d'estabilitat de proteïnes

Les soques CML240 i JCY216 transformades amb el plasmidi pGAL1:CLB2-3HA o pGAL1:CLN2-3HA es varen créixer en medi sintètic amb rafinosa (SRaf) en presència de 5 µg/mL de doxiciclina durant 8 hores. Després es va afegir galactosa a concentració final del 2% (SGal) per induir la transcripció dels gens sota el promotor *GALI* durant 30 minuts. Les cèl.lules es varen recollir i resuspendre en medi sintètic amb glucosa (SD). Finalment, les cèl.lules es varen arreplegar a diferents temps durant 120 minuts i els extractes proteics es varen analitzar per *western*.

En el cas de l'anàlisi de l'estabilitat de Clb2 en cèl.lules sincronitzades en G1, les cèl.lules es varen créixer en SRaf i es varen bloquejar amb factor α en presència de 5 µg/mL de doxiciclina. Després de 4 hores es va afegir galactosa per induir el promotor *GALI* i després de 30 minuts es va afegir cicloheximida per a bloquejar la síntesi de proteïnes.

En el cas de l'anàlisi de l'estabilitat de Rot1, les diferents soques transformades amb el plasmidi pGAL1:ROT1-3HA es varen créixer en medi sintètic amb galactosa (SGal) o medi complet amb galactosa (YPGal) durant tota la nit. Les cèl.lules es varen recollir i resuspendre en medi sintètic amb glucosa (SD) o en medi complet amb glucosa (YPD). Finalment, les cèl.lules es varen arreplegar a diferents temps durant 120 minuts i els extractes proteics es varen analitzar per *western*.

Assaig de sensibilitat a proteïnasa K

Extractes totals de proteïnes es varen preparar en condicions que permeten mantenir la integritat dels microsomes. 50 O.D. de cèl.lules de

cultius en fase exponencial es varen llavar amb aigua i després amb 500 µL de tampó sorbitol (0.7 M sorbitol, 50 mM Tris-HCl pH 7.5). Les cèl.lules es varen resuspendre amb 150 µL del tampó sorbitol suplementat amb inhibidors de proteases i es varen lisar mitjançant agitació amb perles de vidre a 4°C durant dos polsos d'un minut. Seguidament es varen centrifugar a 700 x g durant 5 minuts a 4°C. La concentració de proteïnes del sobrenadant es va determinar pel mètode de Bradford utilitzant el reactiu *Dye Reagent* de *Bio-Rad*. L'extracte proteic es va dividir en diferents alíquotes: una alíquota control, una segona alíquota amb 0.1 mg/mL proteïnasa K, i una tercera alíquota amb proteïnasa K i 1% Triton-X100. Totes les mostres es varen incubar durant 20 minuts en gel. Seguidament, per aturar la reacció es va afegir PMSF dissolt amb DMSO a una concentració final de 5mM i es varen precipitar les proteïnes amb 15% (v/v) d'àcid tricloro-acètic (TCA). Els *pellets* es varen solubilitzar amb dissolvent de mostres SDS-PAGE, incubar a 95°C durant 5 minuts i centrifugar a 13.000 x rpm durant 10 minuts a 4°C. Les proteïnes solubles es varen detectar per *western* amb els anticossos corresponents.

Tractament amb fosfolipasa C específica de fosfatidil-inositol

Extractes totals de proteïnes es varen preparar a partir de 5×10^8 cèl.lules de cultius en fase exponencial. Les cèl.lules es varen llavar amb aigua, resuspendre amb 500 µL de tampó de lisi (0.3 M sorbitol, 0.1 M NaCl, 5mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH7.4, 1 mM EDTA) suplementat amb inhibidors de proteases i es varen lisar mitjançant agitació vigorosa amb perles de vidre a 4°C durant sis polsos d'un minut. Per a clarificar el lisat cel·lular es va centrifugar a 2000 x g durant 5 minuts a 4°C i després aquest sobrenadant es va centrifugar a 100.000 x g (rotor TLA-55 Beckman) durant

1 hora a 4°C per tal de separar la fracció soluble (S) de la fracció de membranes o *pellet* (P). La fracció de membranes es va resuspendre amb 500 µL de tampó d'incubació (100 mM Tris-HCl pH7.4, 5 mM EDTA) suplementat amb inhibidors de proteases i es va dividir en dues alíquotes que varen ser incubades durant 1 hora a 30°C amb o sense 0.5U de PI-PLC. Els assajos es varen realitzar amb dues PI-PLC diferents, una de *Bacillus cereus* (*Sigma*) i altra de *Bacillus thuringiensis* (*ICN Biomedicals*). Després del tractament les mostres es varen centrifugar a 100.000 x g (rotor TLA-55 Beckman) durant 1 hora a 4°C i les proteïnes de les fases solubles es varen precipitar amb 15% (v/v) de TCA. Totes les mostres es varen separar per SDS-PAGE i posteriorment varen ser detectades per *western* amb els anticossos corresponents.

Tractament amb endoglicosidasa H

Extractes totals de proteïnes es varen preparar a partir de 1×10^8 cèl.lules de cultius en fase exponencial. Les cèl.lules es varen llavar amb aigua, es varen resuspendre amb tampó 50 mM Tris-HCl a pH 7.5 suplementat amb inhibidors de proteases i es varen lisar mitjançant agitació vigorosa amb perles de vidre a 4°C durant tres polsos d'un minut. El lisat es va clarificar de les restes cel.lulars per centrifugació a 2000 x g durant 5 minuts a 4°C. El sobrenadant es va desnaturalitzar per addició d'un volum de tampó de desnaturalització (1 mM Tris-Cl pH 7.5, 40 mM DTT, 0.5% SDS) i es va incubar durant 5 minuts a 95°C. Les mostres es varen diluir a la mitat ajustant a una concentració final de 0.2 mM d'acetat amònic a pH 5.5 i es varen separar en dues alíquotes que varen ser incubades durant 2 hores a 37°C amb o sense 50mU d'endoglicosidasa H (*Roche*). Les proteïnes es varen separar per SDS-PAGE i posteriorment es varen detectar per *western*.

Assaig d'activitat β -galactosidasa

L'activitat β -galactosidasa es va determinar a partir de 5×10^7 - 10^8 cèl.lules. Una vegada recollides i llavades amb aigua, es varen resuspendre amb 200 μ L de tampó Z (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 0.1% de β -mercaptoetanol, pH 7) contenint 1mg/mL de zimoliasa 20T. Després de 20 minuts a 30°C es varen clarificar els extractes per centrifugació. Quantitats adequades d'extracte (2-180 μ L) es varen ajustar amb un tampó Z fins un volum final de 900 μ L i es varen afegir 180 μ L d'ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopirànòsid) a una concentració de 4 mg/ml. Les mostres es varen incubar a 30°C fins que desenvoluparen color groc. Les reaccions es varen detenir addicionant 450 μ L de Na_2CO_3 1 M i es va determinar l'absorbància a 420nm. L'activitat s'expressa en U/mg proteïna total, on 1U es defineix com $A_{420} \cdot 10^3$ /min d'incubació. La concentració de proteïna total es va quantificar pel mètode de Bradford.

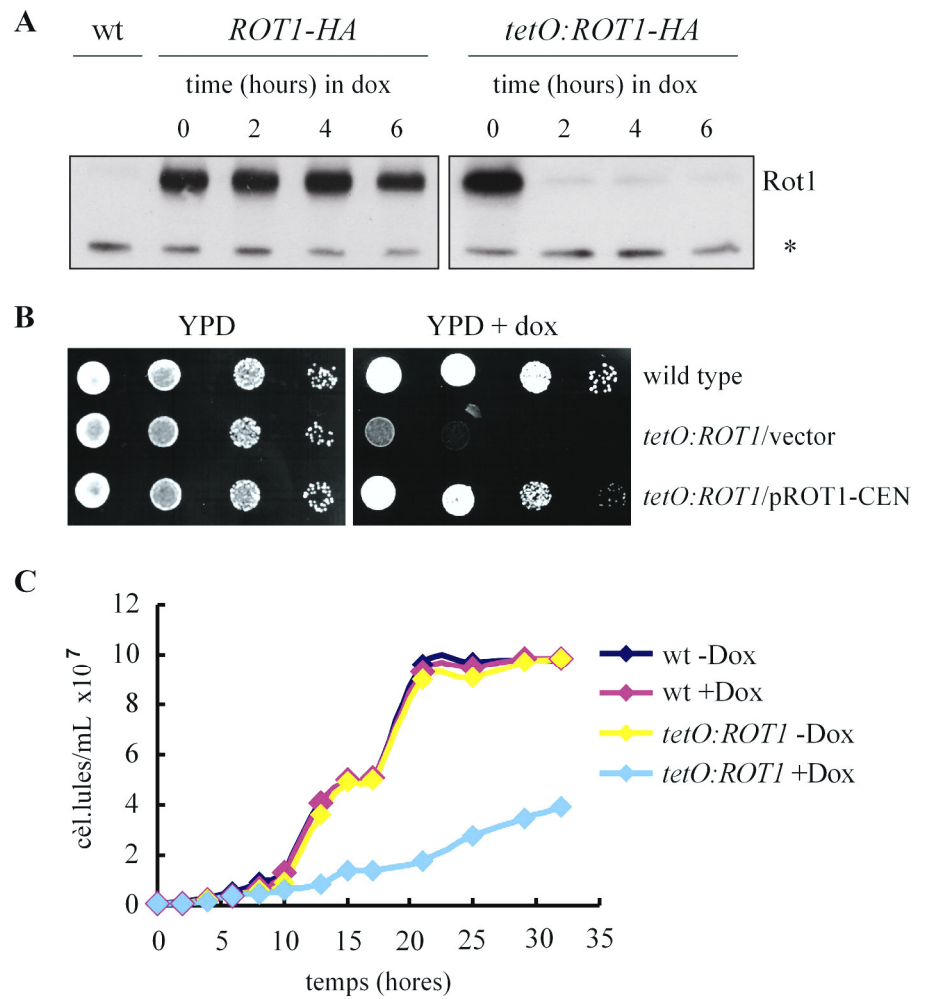
3. Caracterització funcional de Rot1

CONSTRUCCIÓ D'UN MUTANT *rot1* CONDICIONAL

El gen *ROT1* és un gen essencial. Per a poder investigar la funció molecular de la proteïna Rot1 vàrem construir una soca mutant condicional que expressa el gen *ROT1* sota el control del promotor *tetO₇* regulat per doxiciclina. Vàrem realitzar diversos experiments amb la finalitat d'averiguar si el promotor *tetO₇* regula correctament l'expressió del gen *ROT1*. Es va etiquetar Rot1 en l'extrem C-terminal amb l'epítot HA i es va analitzar el nivell de proteïna Rot1 en les cèl.lules crescudes en absència o presència de 5 µg/mL de doxiciclina. Com s'observa en la figura 3.1A, a les 2 hores de créixer les cèl.lules amb 5 µg/mL de doxiciclina, l'expressió del

gen *ROT1* ja està totalment reprimida. A més a més, es pot observar també que el nivell de proteïna en la soca *tetO₇:ROT1* en condicions de no-repressió és 1.6 vegades major que en la soca silvestre. Com s'esperava, atès que és un gen essencial, les cèl.lules *tetO₇:ROT1* són inviables en medi YPD suplementat amb doxiciclina (Figura 3.1B). Aquest defecte del creixement es suprimeix a l'introduir un plasmidi que conté el gen *ROT1*. També es va analitzar si les cèl.lules mutants *rot1* presentaven defectes en la viabilitat en cultius líquids per la qual cosa es va fer una corba de creixement. En la gràfica 3.1C, s'observa que les cèl.lules mutants *rot1* creixen més lentament que les cèl.lules silvestres. Aquests resultats indiquen que el promotor regulable funciona correctament, la qual cosa ens permet disposar d'una soca mutant *rot1* condicional.

Figura 3.1. Caracterització del defecte de creixement de la soca mutant *tetO₇:ROT1*. (A) Anàlisi per *western* dels nivells de proteïna Rot1 en extractes de les soques *ROT1-HA* (MCY10) i *tetO₇:ROT1-HA* (MCY192) crescudes en YPD i incubats en presència de 5 µg/mL de doxiciclina (dox). S'inclou un extracte de la soca silvestre (CML240) sense marcar com a control negatiu (wt). Una banda inespecífica que reacciona amb l'anticòs es mostra com a control de càrrega (*). (B) Dilucions seriades de cultius en creixement exponencial de les soques silvestre (CML240) i mutant *tetO₇:ROT1* (JCY216) transformades amb un vector control o amb un plasmidi centromèric que expressa el gen *ROT1* es varen sembrar en plaques de YPD en presència o absència de 5 µg/mL de doxiciclina i es varen incubar a 28°C durant 3 dies. (C) Corba de creixement de cultius de la soca silvestre (CML240) i de la soca *tetO₇:ROT1* (JCY216) en presència o absència de 5 µg/mL de doxiciclina.



***ROT1* ÉS NECESSARI PER AL CREIXEMENT APICAL DE LA GEMMA**

En un primer intent de caracteritzar la funció de Rot1, es va afegir doxiciclina a les cèl.lules *tetO₇:ROT1* en creixement exponencial i després de 8 hores es va analitzar la morfologia cel.lular. La primera diferència que s'observa és que les cèl.lules *rot1* tenen forma esfèrica en lloc de forma el.lipsoïdal típica de la soca silvestre de *S. cerevisiae* (Figura 3.2A). Aquest defecte es pot quantificar mesurant la relació longitud-amplària de la gemma ja que aquesta relació serà superior a 1 per a cèl.lules el.lipsoïdals i al voltant d'1 per a cèl.lules redones. Tal i com s'esperava, la mitjana de la relació longitud-amplària de la gemma en cèl.lules post-anafase per al cas de les cèl.lules de la soca silvestre és d'1.2, un valor semblant al descrit per altres autors (Sheu et al., 2000). En canvi, la relació longitud-amplària de la gemma fou d'1.0 per a les cèl.lules *rot1*. Aquest fenomen s'observa més clarament quan inactivem *ROT1* en cèl.lules que presenten un fenotip hiperpolaritzat, com en el cas de la soca mutant *clb2*. Clb2 és indispensable per a una correcta activació del canvi de creixement apical a isotròpic de la gemma, i en la seua absència, la polarització del creixement de la gemma continua fins aplegar a formar-se cèl.lules molt allargades (Lew and Reed, 1993). Vàrem calcular la relació longitud-amplària de les gemmes en la soca *clb2* i en la soca doble mutant *clb2 tetO₇:ROT1*, obtenint-se una mitjana d'1.1 per al mutant *clb2 tetO₇:ROT1*, front a 1.8 en les cèl.lules *clb2* (Figura 3.2B). Així doncs, clarament la inactivació de *ROT1* origina cèl.lules més arrodonides que les de la soca silvestre. La forma el.lipsoïdal de les cèl.lules de llevat silvestre es deu principalment a l'existència d'una fase de creixement apical de la gemma i per aquest motiu, la presència de cèl.lules arrodonides s'associa a un defecte en aquest creixement apical (Sheu et al., 2000). Per tant, el resultat anterior indica que Rot1 té un paper en la polarització del creixement, especialment en el manteniment del creixement apical després d'eixir la gemma.

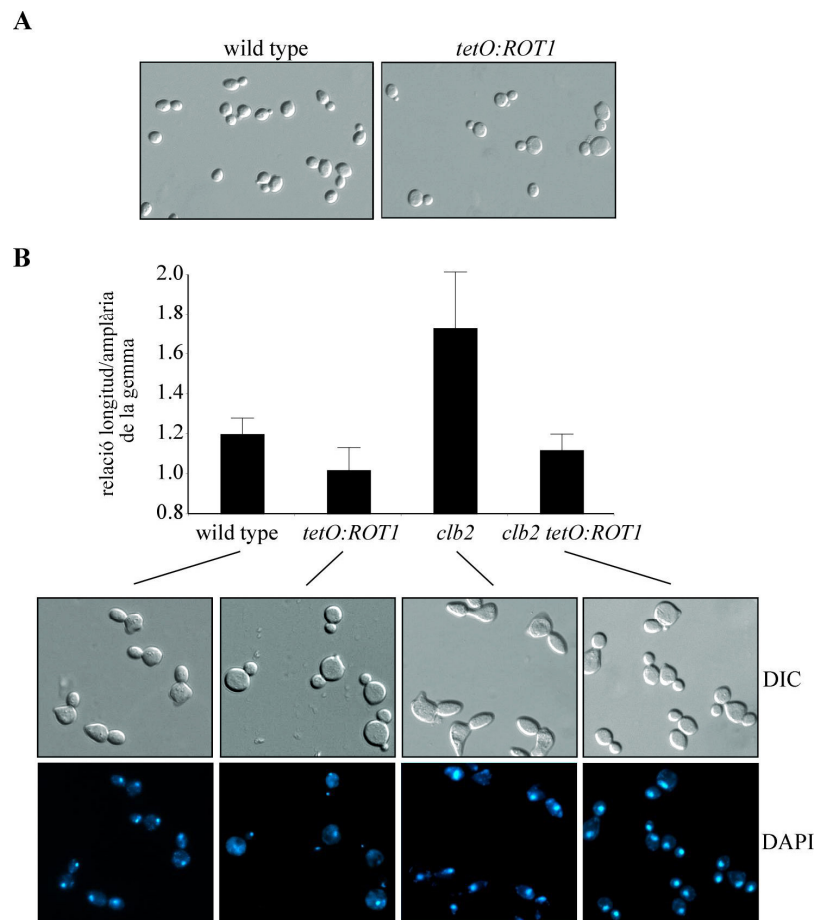


Figura 3.2. Anàlisi de la morfologia cel·lular en soques mutant *rot1*. (A) Imatge de DIC (*differential interference-contrast*) de cèl·lules de les soques silvestre (CML240) i mutant *tetO₇:ROT1* (JCY216) crescudes en fase exponencial i incubades amb presència de 5 µg/mL de doxiciclina durant 8 hores. (B) Cultius en creixement exponencial de les soques silvestre (CML240), *tetO₇:ROT1* (JCY216), *clb2* (CD104-2c) i *clb2 tetO₇:ROT1* (JCY255) es varen sincronitzar mitjançant l'addició de factor α en presència de 5 µg/mL de doxiciclina. Després d'alliberar del factor α es va mesurar la relació longitud-amplària de les gemmes en cèl·lules en anafase-telofase (com es dedueix per la presència de nuclis segregats després de la tinció del DNA amb DAPI). Els valors són la mitjana \pm s.d. (desviació estàndard) de 3 experiments independents. Es mostren imatges de cèl·lules representatives de cada soca.

INTERACCIONS GENÈTIQUES ENTRE *ROT1* I GENS REGULADORS DE LA POLARITZACIÓ D'ACTINA

La sobreexpressió de *ROT1* suprimeix el defecte de creixement de la soca mutant *cdc42-1*

La polarització del citoesquet d'actina en *S. cerevisiae* està controlada per la família de les GTP-ases Rho, que inclouen la proteïna Cdc42. Cdc42 no sols està implicada en la polarització del creixement mentre es forma la gemma i durant la citoquinesi, sino que també regula el canvi del creixement apical a isotròpic induït per Clb2 durant el creixement de la gemma (Tjandra et al., 1998; Richman et al., 2002). Per investigar si *ROT1* interacciona genèticament amb el gen *CDC42* es va introduir el gen *tetO₇:ROT1* en una soca que conté l'al·lel mutant *cdc42-1*. Es va analitzar el creixement de la soca doble mutant en condicions semi-permissives per a les dues mutacions simples (0.5 µg/mL de doxiciclina per mantenir viable al mutant *tetO₇:ROT1* i 33° C per mantindre la viabilitat de *cdc42-1*) però no vàrem detectar interaccions sintètiques entre les dues mutacions (resultats no mostrats). No obstant això, tal i com s'observa en la figura 3.3A, la soca *cdc42-1 tetO₇:ROT1* creix a 37° C, una condició on la soca mutant simple *cdc42-1* és inviable. La supressió de la letalitat del mutant *cdc42-1* és dependent de l'expressió ectòpica de *ROT1* sota el promotor *tetO₇*, ja que les cèl·lules *cdc42-1 tetO₇:ROT1* no creixen a alta temperatura a l'afegir doxiciclina al medi de cultiu (en aquest cas les cèl·lules es varen transformar amb un plasmidi centromèric que contenia el gen *ROT1* per permetre la viabilitat en presència de doxiciclina). A més a més, la introducció d'un plasmidi multicòpia que conté el gen *ROT1* també suprimeix, encara que més suaument, el defecte del creixement termosensible de la soca mutant *cdc42-1* (Figura 3.3B). Aquests resultats reforcen la idea que *ROT1* està implicat en la regulació de la polarització del citoesquelet d'actina.

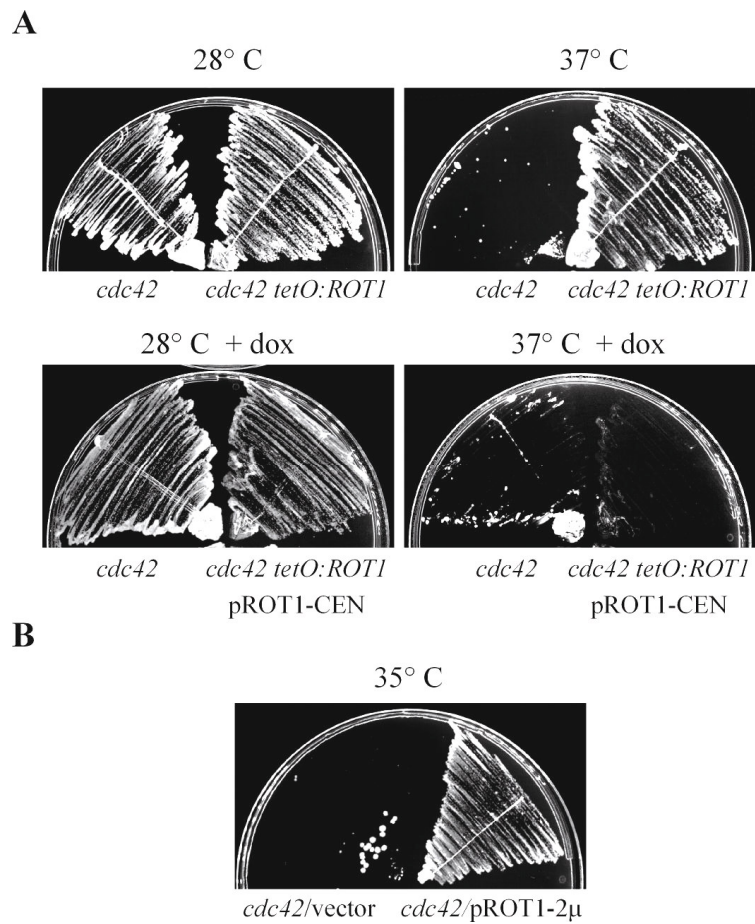


Figura 3.3. Interacció genètica entre *ROT1* i *CDC42*. (A) Les soques *cdc42-1* (DJTC2-16D) i *cdc42-1 tetO₇:ROT1* (MCY92) transformades amb un plasmidi centromèric que expressa el gen *ROT1* en els casos on s'indica, es varen sembrar en plaques de YPD en presència o absència de 5 µg/mL de doxiciclina. Les plaques es varen incubar a 28°C o a 37°C durant 3 dies. (B) La soca *cdc42-1* (DJTC2-16D) transformada amb un vector control o amb un plasmidi multicòpia que expressa el gen *ROT1* es va sembrar en plaques de YPD i es va incubar a 35°C durant 3 dies.

Connexió entre Rot1 i la ruta d'integritat cel.lular

La ruta d'integritat cel.lular o de la proteïna quinasa C (PKC) és essencial per al manteniment de la integritat cel.lular front a diverses condicions medioambientals i durant diversos processos morfogènics a través de la regulació de la biosíntesi de la paret cel.lular i del citoesquelet d'actina (Levin, 2005). Cal recordar que la mutació *rot1* es va identificar com supressora del defecte en el creixement d'una soca mutant *tor2^{ts}* que presentava defectes en el citoesquelet d'actina (Bickle et al., 1998). Tor2 és una quinasa implicada en el control del creixement junt a la quinasa Tor1 però que a més a més, té una funció específica i essencial en la regulació del citoesquelet d'actina mitjançant la regulació de les proteïnes de membrana Slm1 i Slm2 (Fadri et al., 2005; Levin, 2005), de les qual s'ha suggerit que podrien modular l'activitat o localització de la proteïna quinasa C Pkc1, la qual controla en últim terme a la MAPK Slt2/Mpk1 de la ruta. Per això, vàrem investigar l'existència d'interaccions genètiques entre *ROT1* i mutacions que afecten la ruta PKC, en concret, mutacions en la GTPasa Rho1, en Pkc1, i en la MAPK Slt2/Mpk1. Es va analitzar en les distintes soques l'efecte en el creixement de la inactivació parcial de *ROT1* (mitjançant l'addició de 0.5 µg/mL de doxiciclina) permetent nivells suficients de Rot1 per mantindre la viabilitat de la soca *tetO₇:ROT1*). Com s'observa en la figura 3.4, la inactivació parcial de *ROT1* afecta greument el creixement de les cèl.lules amb una funció de Pkc1, de la MAPK Slt2 o de la GTPasa Rho1 compromesa. A més, altres resultats del nostre grup (E. Queralt i J.C.Igual) indicaven que en el mutant *tetO₇:ROT1* es produïa un augment dràstic en la fosforilació de la MAPK Slt2, la qual cosa indica que es produeix una activació forta de la ruta PKC a l'inactivar *ROT1*. Tots aquests resultats suggereixen una connexió funcional entre la ruta PKC i la funció de *ROT1*, la qual cosa és consistent amb què *ROT1* tinga un paper en el control del citoesquelet d'actina.

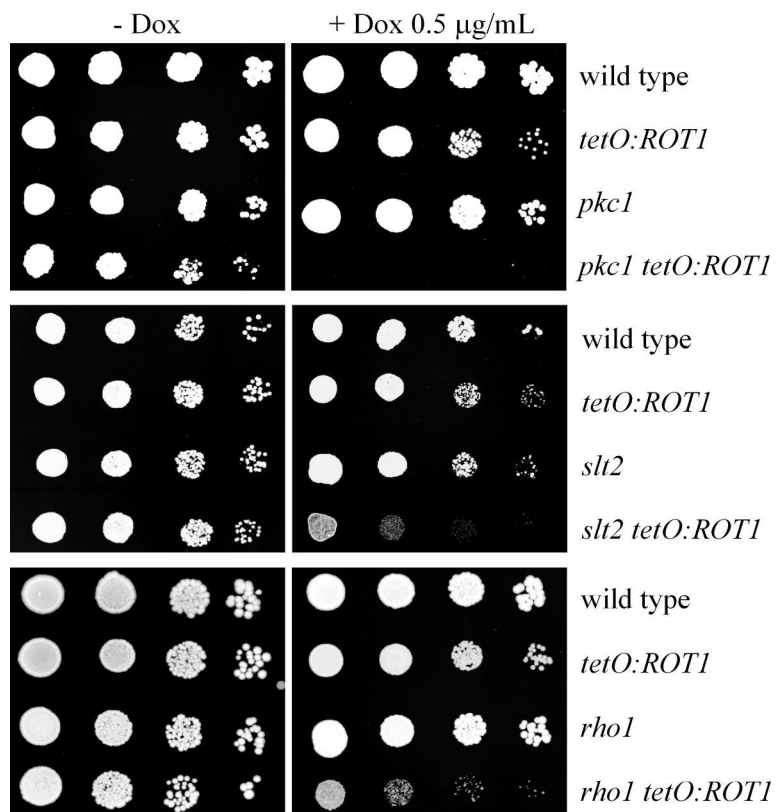
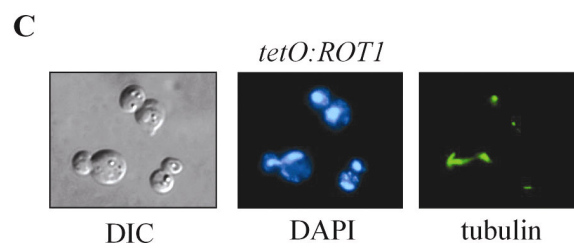
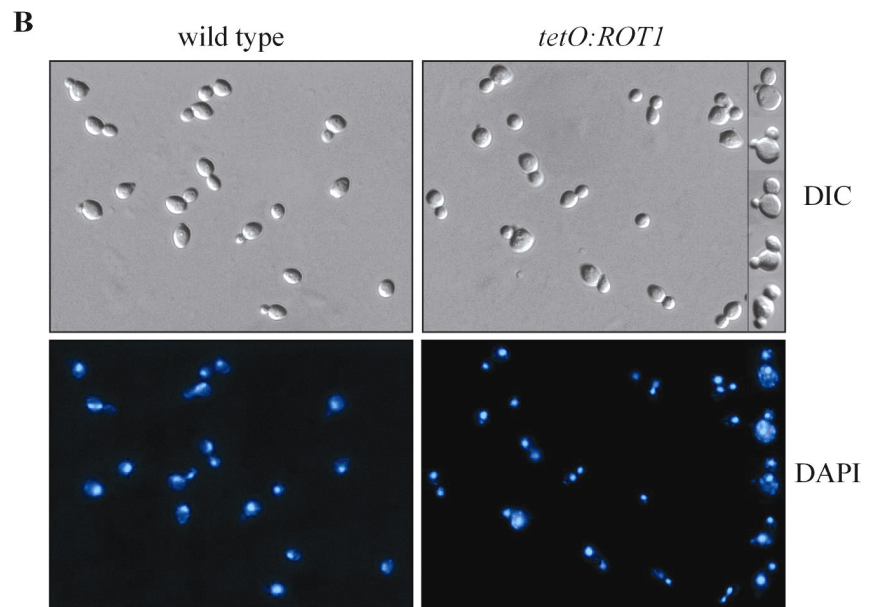
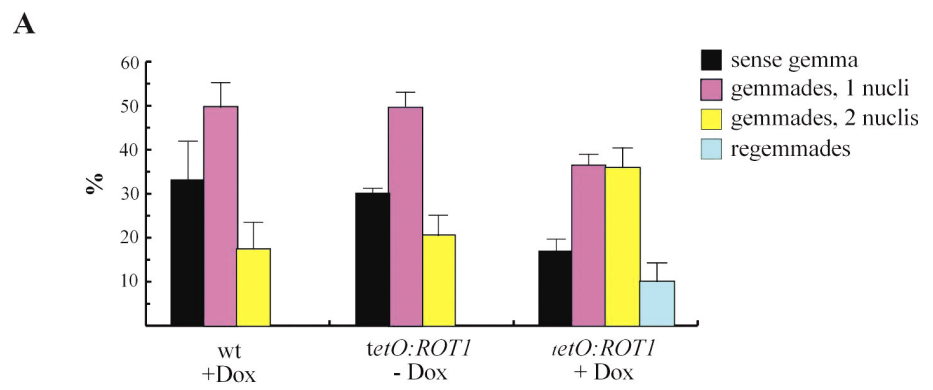


Figura 3.4. Connexió entre Rot1 i la ruta d'integritat cel·lular. Dilucions seriades de cultius en fase exponencial de les soques silvestres (W303 en el panel superior, 1783 en el panel central i OHNY1 en el panel inferior), *tetO₇:ROT1* (MCY68 en el panel superior, MCY186 en el panel central i MCY200 en el panel inferior), *pkc1* (JC6-3a), *pkc1 tetO₇:ROT1* (JCY433), *slt2* (DL454), *slt2 tetO₇:ROT1* (JCY431), *rho1* (HNY21) i *rho1 tetO₇:ROT1* (MCY158) es varen sembrar en YPD en presència o absència de 0.5 µg/mL de doxiciclina (dox) i es varen incubar a 28°C durant 3 dies.

DEFECTES EN EL CICLE CEL·LULAR EN EL MUTANT *rot1*

Per seguir caracteritzant el fenotip de *Rot1*, es va analitzar la distribució de cèl·lules *tetO₇:ROT1* al llarg del cicle cel·lular després de 8 hores d'incubació en doxiciclina. En la figura 3.5A es mostra que hi ha un augment significatiu en el percentatge de cèl·lules amb gemma: 87% en la soca *tetO₇:ROT1* front a un 67% en la soca silvestre. A més, la tinció dels nuclis amb DAPI revela un augment de cèl·lules que ja han realitzat la segregació dels cromosomes en dos nuclis (Figura 5B): 34% de cèl·lules per a la soca *tetO₇:ROT1* front a un 17% en la soca silvestre. L'anàlisi per FACS demostra que la replicació del DNA no està bloquejada (resultats no mostrats). L'anàlisi del fus acromàtic per microscopia de fluorescència després de tenyir els microtúbuls amb tubulina, indica que en les cèl·lules del mutant *rot1* gemmades amb 2 nuclis segregats el fus està ja desensamblat (Figura 3.5C), suggerint que es troben en les últimes etapes de la divisió cel·lular. A més cal destacar que les cèl·lules incubades amb doxiciclina regemmen abans de completar la divisió (aquestes cèl·lules regemmes representen un 11% del total després de 8 hores en doxiciclina).

Figura 3.5. Caracterització de la progressió del cicle cel·lular de la soca mutant *tetO₇:ROT1*. (A) Cultius en creixement exponencial de les soques W303 (CML240) i *tetO₇:ROT1* (JCY216) es varen incubar amb presència de 5 µg/mL de doxiciclina durant 8 hores. Les gràfiques mostren la distribució de les cèl·lules en els diferents estadis del cicle cel·lular. (B) D'aquests cultius es va analitzar la morfologia de les cèl·lules (DIC) i la distribució del nucli (tinció del DNA amb DAPI). En el cas de la soca *tetO₇:ROT1* (JCY216) es mostra una col·lecció de cèl·lules regemmes. (C) Imatges de DIC, tinció del DNA amb DAPI i tinció del fus acromàtic utilitzant un anticòs anti-tubulina de la soca *tetO₇:ROT1* (JCY216) incubada amb 5 µg/mL de doxiciclina durant 8 hores. (D) Cultius de les soques silvestre (CML240) i *tetO₇:ROT1* (JCY216) es varen sincronitzar mitjançant l'addició de factor α en presència de 5 µg/mL de doxiciclina. Després d'alliberar del factor α , es va seguir la progressió de les cèl·lules al llarg del cicle cel·lular.



D

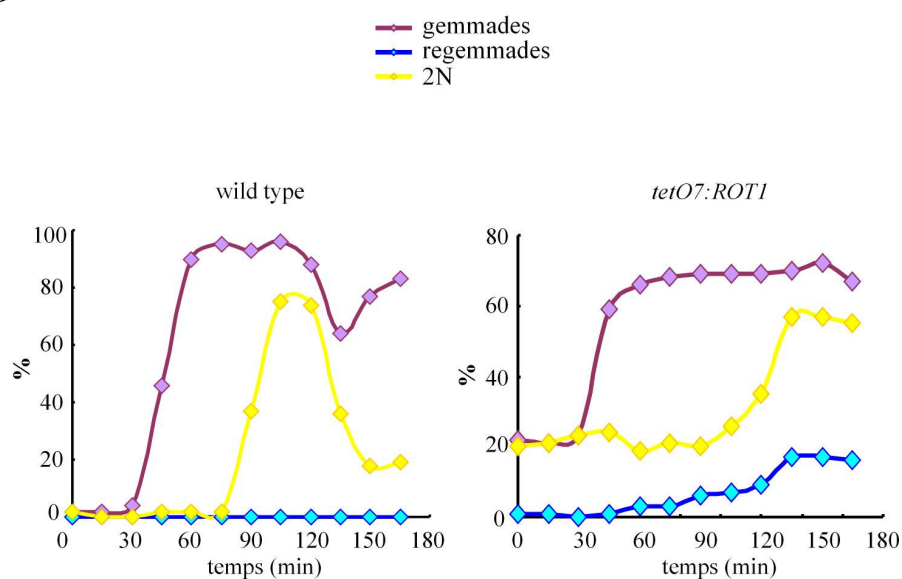


Figura 3.5. Continuació.

Aquests resultats s'observen més clarament quan es segueix la progressió al llarg del cicle cel.lular en cultius sincronitzats de cèl.lules mutants *rot1*. En les cèl.lules de la soca silvestre s'observa una minvació important en el percentatge de cèl.lules gemmades i de cèl.lules amb 2 nuclis que reflecta la divisió de les cèl.lules (Figura 3.5D). En canvi, en la soca mutant *rot1*, encara que la sincronització no és molt bona, es pot observar que la majoria de les cèl.lules queden aturades amb 2 nuclis ja segregats i comencen a acumular-se fins un 15% de cèl.lules regemmades, la qual cosa confirma que a l'inactivar *ROT1* es produeix un bloqueig en les últimes etapes de divisió cel.lular. Cal destacar que en aquesta experiència s'observa que les cèl.lules *tetO7:ROT1* no presenten defectes en l'inici de la gemmació, encara que després les cèl.lules progressen més lentament al llarg del cicle

amb un retardament tant en el creixement de la gemma com en la segregació dels nuclis. En resum, tots aquests resultats suggereixen que la mutació *rot1* origina un defecte en la progressió del cicle cel·lular amb una aturada parcial de les cèl·lules en les últimes etapes de divisió cel·lular a causa d'un defecte de citoquinesi.

Com s'ha comentat, la inactivació de *ROT1* produeix l'aparició de cèl·lules regemmades. Un resultat cridaner a l'observar aquestes cèl·lules és que la nova gemma es localitza aleatòriament en qualsevol posició de la superfície de la cèl·lula (veure Figura 3.1B), en compte de seguir el patró axial (al costat de la gemma anterior) característic de les cèl·lules haploides de *S. cerevisiae*. Aquest resultat indica que s'ha perdut el control per la selecció del lloc de gemmació en les cèl·lules mutants *rot1*.

ESTUDI DE LA DIVISIÓ CITOPLASMÀTICA EN EL MUTANT *rot1*

Els resultats anteriors indiquen que la inactivació de *ROT1* origina defectes en les últimes etapes de la divisió cel·lular. En *S. cerevisiae*, la divisió en dues cèl·lules es porta a terme per l'acció coordinada de l'anell contràctil d'actomiosina que provoca la invaginació de membrana plasmàtica per a dividir el citoplasma, i per la formació d'un septe mitjançant la secreció polaritzada al coll que implica entre altres coses, el dipòsit de material com quitina entre la cèl·lula mare i la cèl·lula filla. Posteriorment, la quitina serà hidrolitzada i aquesta digestió enzimàtica del septe produirà la separació física entre les dues cèl·lules.

En un primer instant, ens preguntarem si en les cèl·lules regemmades que s'acumulen en el mutant *rot1* s'havia produït la divisió del citoplasma. Les cèl·lules de llevat tenen una paret cel·lular composta entre altres per β -1-3-glucans. La digestió de la paret amb un enzim lític com la zimoliasa (que

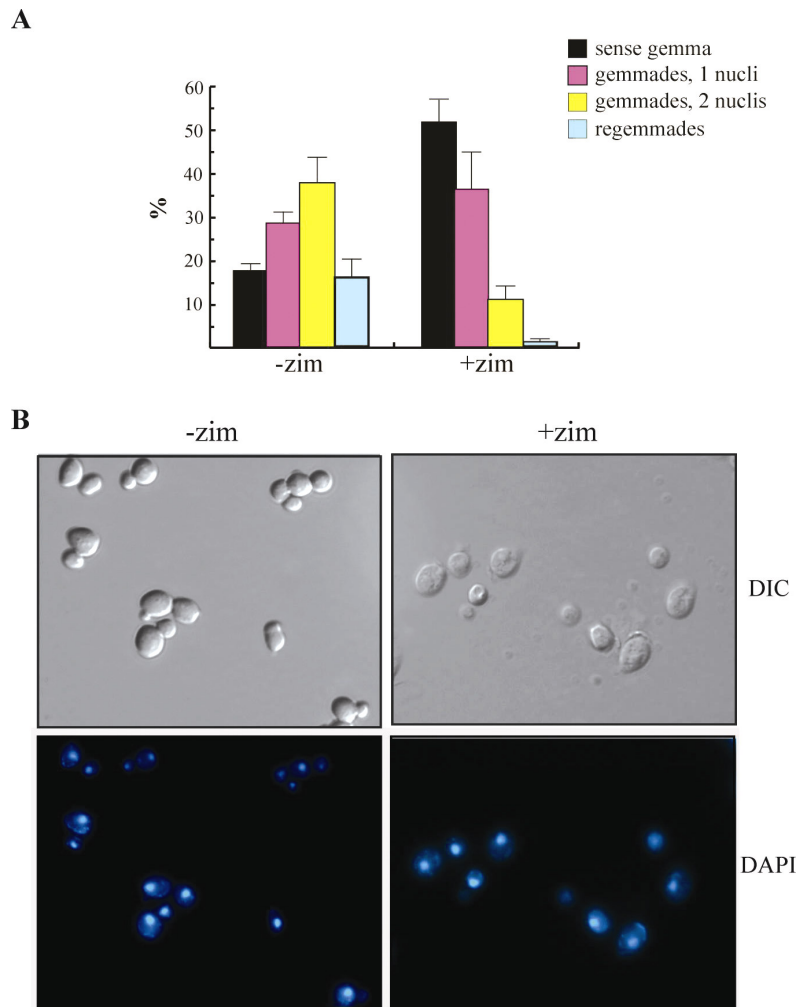


Figura 3.6. Efecte del tractament amb zimoliassa en les cèl.lules *rot1*. (A) Cultius en creixement exponencial de la soca *tetO₇:ROT1* (JCY216) es varen incubar amb presència de 5 µg/mL de doxiciclina durant 8 hores. Les cèl.lules es varen fixar i digerir amb zimoliassa en presència de sorbitol. Les gràfiques mostren la distribució de les cèl.lules en els diferents estadis del cicle cel.lular. Els valors representats són la mitjana ± s.d. de 3 experiments independents. (B) En la soca *tetO₇:ROT1* (JCY216) incubada amb presència de 5 µg/mL de doxiciclina durant 8 hores es va analitzar la morfologia de les cèl.lules (DIC) i la distribució del nuclis (tinció del DNA amb DAPI) abans i després de la digestió amb zimoliassa.

és una endo- β (1-3)-glucanasa) permeteix analitzar si hi ha o no divisió citoplasmàtica: si la cèl.lula mare i la filla ja tenen cadascuna una membrana plasmàtica independent, és a dir, tenen citoplasmes no connectats, la digestió de la paret cel.lular produeix la separació de la cèl.lula mare i filla; per contra, si entre la cèl.lula mare i la gemma encara hi ha continuïtat citoplasmàtica, es manté la unió després de la digestió de la paret. Per comprovar si hi ha divisió citoplasmàtica es va analitzar l'efecte del tractament amb zimoliasa en les cèl.lules *rot1*. Com s'observa en la figura 3.6A i B la digestió de la paret produeix un canvi dramàtic en la morfologia cel.lular, havent una severa minvació de les cèl.lules amb 2 nuclis i les cèl.lules regemmades, les quals passen de representar el 40 % i el 18 % de les cèl.lules abans del tractament a ser només el 12% i el 3 % de les cèl.lules respectivament després del tractament. Aquest fet provoca un augment significatiu en el percentatge de cèl.lules sense gemma: més de 50 % després del tractament front a un 18 % abans del tractament. Els canvis observats en la morfologia cel.lular indiquen que en les cèl.lules mutants *rot1* que s'acumulen al final del procés de divisió ja s'ha produït la divisió del citoplasma entre la cèl.lula mare i la filla.

ESTUDI DE LA FUNCIONALITAT DE L'ANEL·L D'ACTOMIOSINA

La divisió citoplasmàtica és efectuada normalment per la contracció de l'anell d'actomiosina. No obstant això, s'ha descrit que les cèl.lules de *S. cerevisiae* poden dividir-se, encara que de manera anormal, en absència d'un anell d'actomiosina funcional. Per aquest motiu, decidírem aclarir si en les cèl.lules mutants *rot1* la divisió citoplasmàtica es realitza per la contracció de l'anell d'actomiosina o no. Amb aquesta finalitat, vàrem analitzar la

localització de la proteïna Myo1 fusionada a GFP en cèl.lules de la soca *tetO₇:ROT1* sincronitzades amb factor α . S'ha descrit que en les cèl.lules silvestres, Myo1 (l'única miosina tipus II de llevat) es localitza en el lloc de gemmació només comença el cicle cel.lular i una vegada emergeix la gemma roman en el coll; en anafase l'F-actina és reclutada en el coll i es forma l'anell d'actomiosina; al final de la mitosi, aquest anell es contraurà provocant la invaginació de la membrana plasmàtica, la qual cosa es reflecteix en una reducció del tamany del senyal de Myo1-GFP; finalment el senyal de Myo1 desapareix, indicant que les membranes citoplasmàtiques de la mare i la filla estan totalment separades (Bi et al., 1998; Lippincott and Li, 1998). En la figura 3.7A i B s'observa que en les cèl.lules mutants *rot1* la proteïna Myo1-GFP es localitza en el lloc de gemmació. Als 60 minuts després d'alliberar les cèl.lules del factor α , Myo1-GFP es detecta en el coll de pràcticament totes les cèl.lules gemmades, concretament en el 90 %. Posteriorment, comencen a observar-se cèl.lules amb un senyal més curt que reflecta la contracció de l'anell d'actomiosina. Aquestes cèl.lules amb un anell en estat de contracció representen el 26 % de les cèl.lules gemmades als 80 minuts després d'alliberar del factor α i el 14 % de les cèl.lules gemmades als 100 minuts. La contracció de l'anell és molt ràpida, la qual cosa fa que no es pugui detectar simultàniament en un major percentatge de cèl.lules (Hwa et al., 2003). Finalment, el senyal desapareix del coll, sent un 62 % les cèl.lules sense senyal als 100 minuts després d'alliberar del bloqueig el cultiu. A més, si ens fixem en les cèl.lules regemmades, Myo1 reapareix en la regió del coll de la nova gemma. Aquests resultats indiquen que es produeix la contracció de l'anell d'actomiosina en absència de *ROT1*. Per tant, en les cèl.lules mutants *rot1* la divisió entre la mare i la filla és deguda al correcte funcionament de l'anell contràctil d'actomiosina.

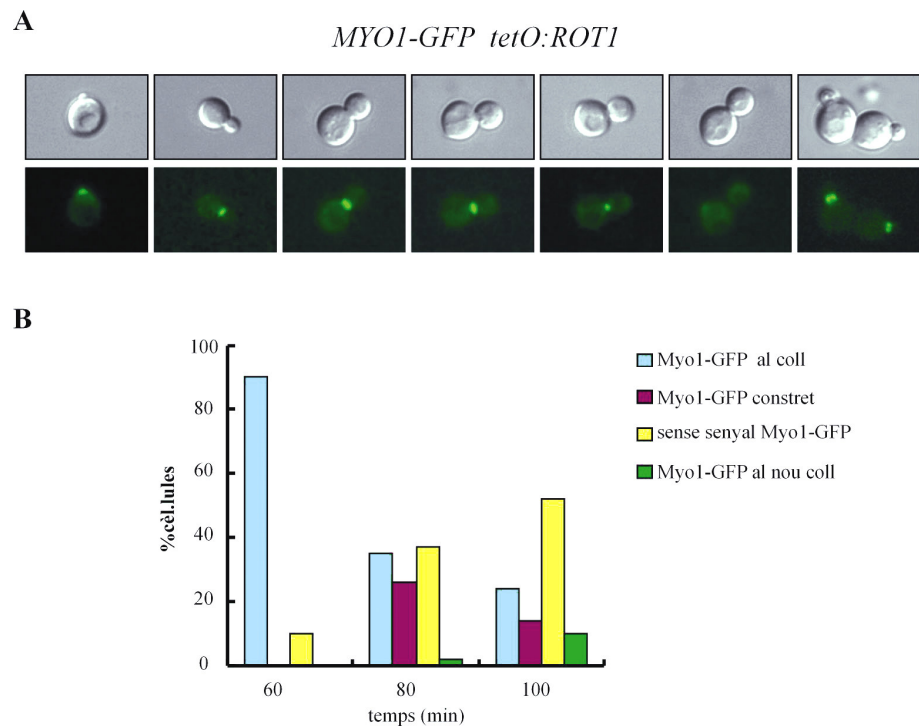


Figura 3.7. Funcionalitat de l'anell contràctil d'actomiosina en les cèl.lules *rot1*. (A) Cultius en creixement exponencial de la soca *MYO1-GFP* (MCY198) es varen sincronitzar afegint factor α en presència de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de doxiciclina. Es mostra la imatge de DIC i del senyal de GFP d'una col.lecció de cèl.lules en els diferents estadis del cicle cel.lular després de l'alliberació del factor α . (B) La gràfica mostra el percentatge de cèl.lules en funció del tipus de senyal de Myo1-GFP observat als temps indicats després de l'alliberació.

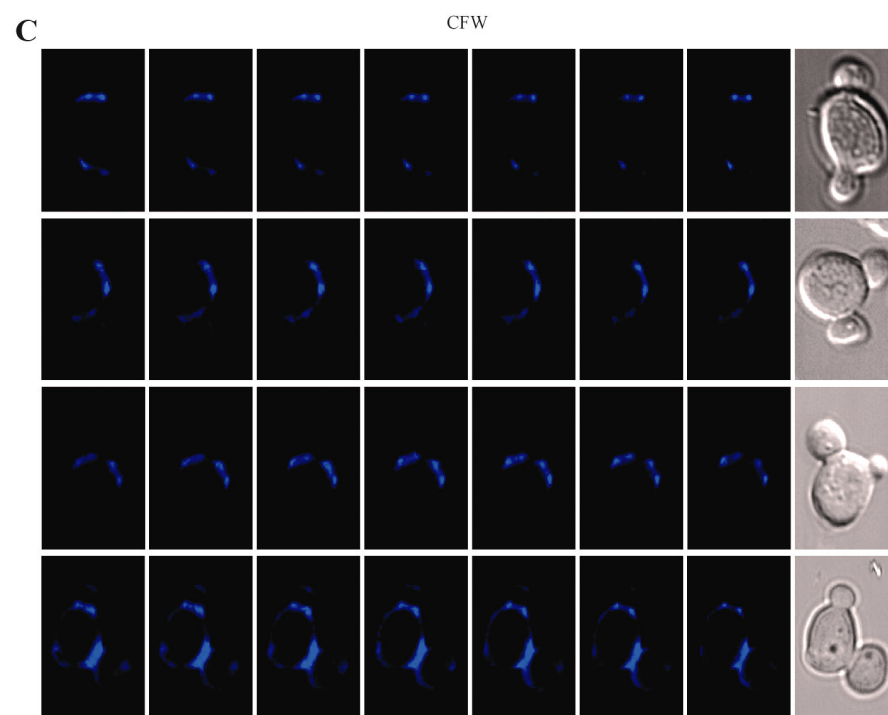
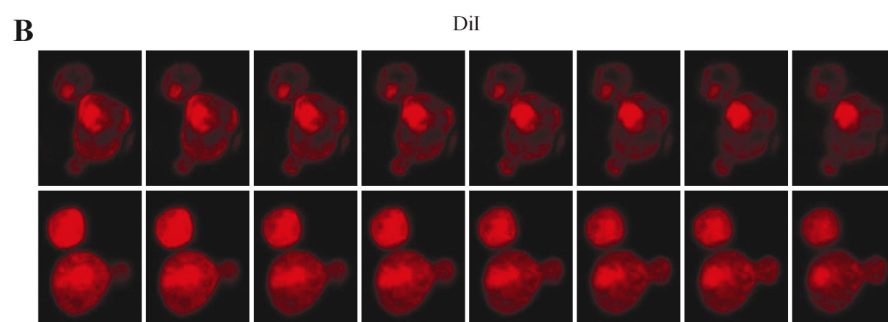
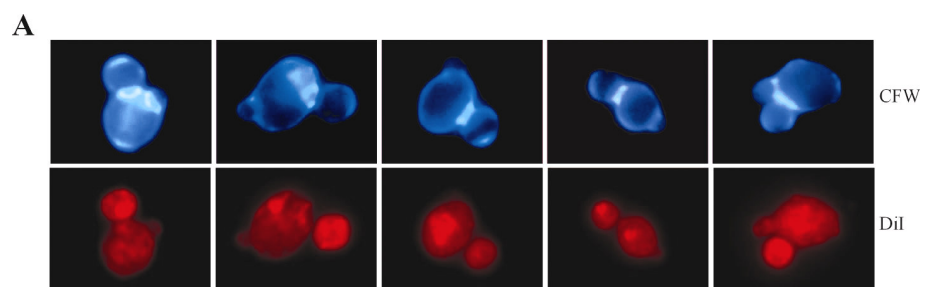
ESTUDI DE LA SEPTACIÓ EN EL MUTANT *rot1*

Com ja hem comentat, per a completar-se la divisió cel·lular no sols es requereix la contracció de l'anell d'actomiosina sino també la formació adequada del septe amb la síntesi de components de la paret cel·lular (com quitina) en la regió del coll. Una vegada comprovada que la divisió citoplasmàtica es realitza correctament en el mutant *rot1*, ens vàrem plantejar la possibilitat de si podia haver algun defecte en la formació del septe. Analitzàrem per microscopia de fluorescència la continuïtat de la membrana i el dipòsit de quitina en la regió del coll. Ens centràrem en les cèl·lules regemmades, ja que la presència d'una nova gemma indica la iniciació d'una nova ronda en el cicle cel·lular sense haver completat prèviament la divisió. La tinció de la membrana cel·lular es va fer amb 1,1'-dioctadecil-3,3,3,3'-tetrametil-indocarbocianina perclorato (DiI), que és una carbocianina lipofílica fluorescent que s'incorpora a la bicapa lipídica quedant associada a les membranes cel·lulars. Aquesta tinció revela que no hi ha connexió entre la membrana plasmàtica de les cèl·lules mare i filla en cap de les cèl·lules analitzades, la qual cosa confirma que s'ha realitzat la divisió citoplasmàtica (Figura 3.8A). Per a visualitzar el septe, vàrem incubar aquestes cèl·lules amb calcofluor que és un compost fluorescent que tincia la quitina. La quitina apareix en el coll en el moment de la gemmació en forma d'anell. Més tard, quan estan dividint-se la cèl·lula mare i la filla es diposita gran quantitat de quitina entre les cèl·lules formant el septe. Quan s'analitzen per microscopia de fluorescència les cèl·lules mutants *rot1* tenyides amb quitina, s'observa un senyal més fort només en els extrems del coll, la qual cosa suggereix la presència de l'anell de quitina però l'absència del septe; de fet, en algunes cèl·lules s'aconsegueix veure clarament l'anell de quitina ben posicionat en el coll i l'absència de quitina al llarg del coll (Figura 3.8A). Aquest resultat indica que el septe no està format, o al menys no està complet, entre mare i filla.

Per caracteritzar amb més precisió aquest resultat, s'analitzaren les cèl.lules per microscopia confocal. De les cèl.lules regemmades analitzades totes presenten divisió citoplasmàtica (n=190 cèl.lules de 5 cultius independents) (Figura 3.8B) i nombroses d'aquestes cèl.lules mancaven d'un septe tancat entre la cèl.lula mare i la filla (Figura 3.8C). Vàrem quantificar aquest defecte del septe sent en concret un $51,1 \pm 4.0$ % de les 190 cèl.lules regemmades analitzades les que mancaven d'un septe complet (Figura 3.8D). Aquest defecte és més cridaner si només ens centrem en les cèl.lules en l'etapa inicial de regemmació, on un $80,2 \pm 4.0$ % de les cèl.lules (n= 110 cèl.lules de 3 cultius independents) presenten el septe incomplet. Per tant, podem concloure que les cèl.lules mutants *rot1* presenten un defecte en la septació que impedeix finalitzar de forma correcta la divisió celular.

Rot1 CONTROLA LA POLARITZACIÓ DEL CITOESQUELET D'ACTINA AL COLL ENTRE LA MARE I LA FILLA

Els resultats obtesos fins ara indiquen per una banda una connexió de Rot1 amb la regulació del citoesquelet d'actina i per altra banda, que Rot1 es requereix per a la correcta septació. Tenint en compte que al final de la divisió es produeix la repolarització del citoesquelet al coll entre la mare i la filla per a dipositar el material necessari per a la formació del septe, vàrem considerar la possibilitat que Rot1 podria afectar la polarització del citoesquelet d'actina no sols durant el període del creixement apical sinó també al final de la mitosi i que degut als defectes en eixa polarització el procés de septació fóra defectuós. Per a testar aquesta possibilitat, tenyírem els filaments d'actina de cèl.lules mutants *rot1* de cultius asincrònics amb fal.loïdina marcada amb el fluoròfor Alexa 498. Com s'esperava, en cèl.lules



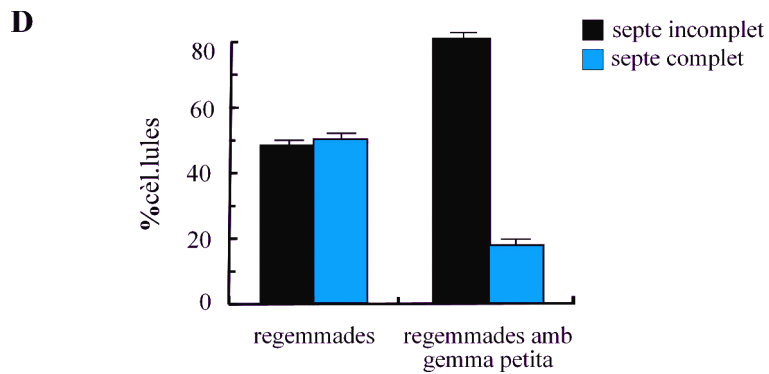


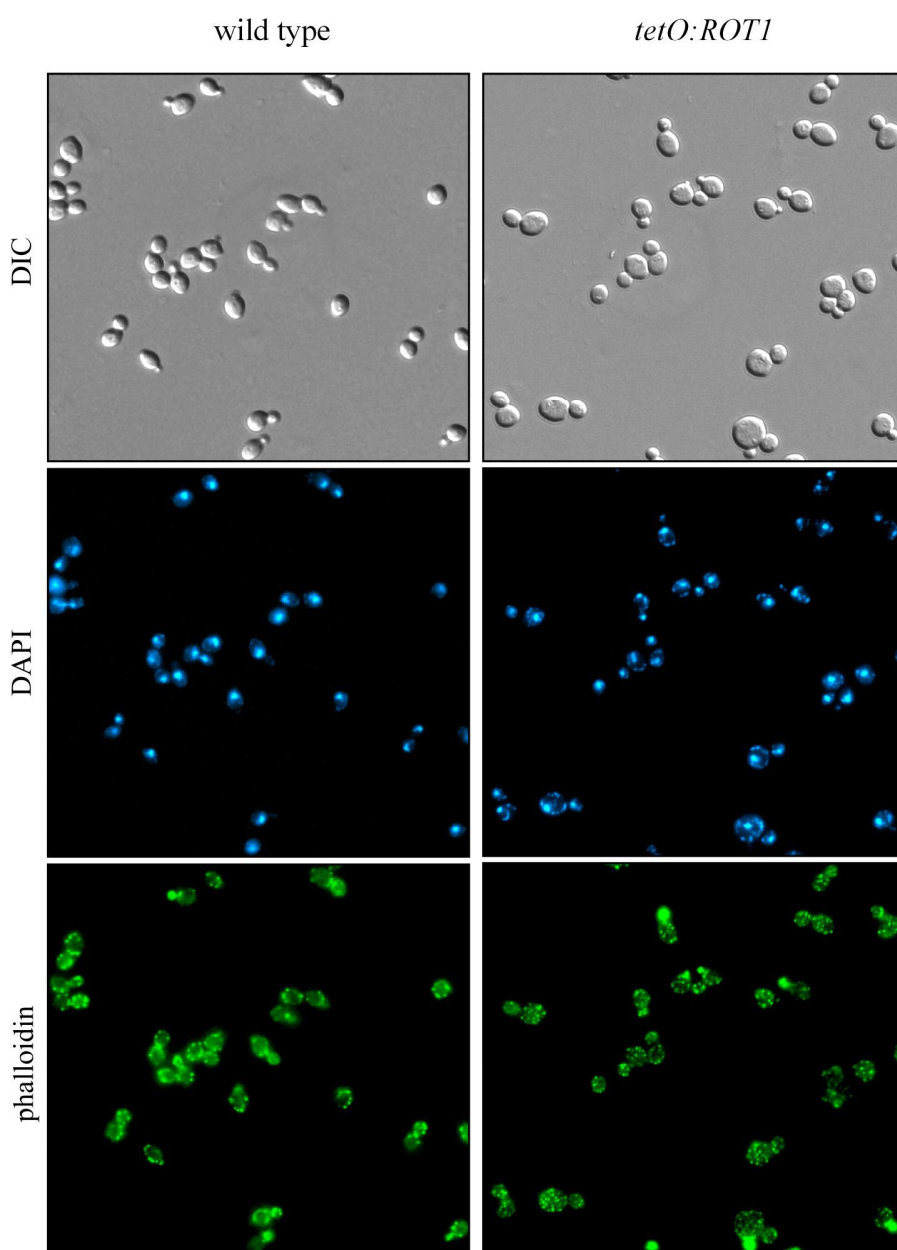
Figura 3.8. Efecte de la inactivació de *ROT1* en la formació del septe. (A) Cultius en creixement exponencial de la soca *tetO₇:ROT1* (JCY216) es varen incubar amb 5 µg/mL de doxiciclina durant 10 hores. Les cèl.lules es varen fixar i tenyir amb DiI (un colorant específic de la membrana cel.lular) i amb calcofluor (CFW) (un colorant específic de quitina) per examinar la continuïtat de la membrana i la formació del septe en cèl.lules regemmedes. En (A), les mostres es varen analitzar en un microscopi de fluorescència convencional. Es mostra una col.lecció de cèl.lules regemmedes en les quals el septe no està complet. La imatge de més a la dreta mostra un control d'una cèl.lula regemmeda amb un septe complet. En (B i C) les mostres es varen analitzar en un microscopi de fluorescència confocal amb una sèrie de seccions de 140 nm. Els senyals són discontinus en totes les cèl.lules regemmedes per al cas de la tinció amb DiI (B) o en gran part de les cèl.lules regemmedes en el cas de la tinció amb CFW (l'última fila de la imatge mostra una cèl.lula regemmeda amb un septe complet) (C). En cada cas, es mostra una selecció de les seccions òptiques obteses en una d'aquestes cèl.lules. (D) Gràfica del percentatge de cèl.lules regemmedes en funció de l'estat del septe.

de la soca silvestre s'observa la polarització dels *patches* corticals d'actina en la gemma als primers estadis de creixement i en el coll entre la mare i la filla als últims estadis de la divisió cel.lular (Figura 3.9A). Pel que fa a les cèl.lules mutants *rot1* s'observa clarament la polarització de l'actina en el lloc on naix la gemma i en les gemmes petites. No obstant això, un fet molt important és que quan les cèl.lules mutants *rot1* estan al final d'anafase/telofase (com deduïm de la tinció dels nuclis amb DAPI) no es detecta polarització del citoesquelet d'actina en el coll entre la mare i la filla.

Aquest resultat de no polaritzar l'actina al coll, s'observa més clarament quan s'utilitzen cultius sincronitzats amb factor α (Figura 3.9B). En aquests cultius, als 30 minuts d'alliberar del bloqueig amb factor α , els *patches* corticals d'actina es localitzen en la gemma naixent, tant en la soca silvestre com en la soca mutant *rot1*. Conforme avança el cicle cel.lular es produeix la despolarització del citoesquelet d'actina en les dues soques. Ara bé, quan les cèl.lules han completat la mitosi, les cèl.lules silvestres repolaritzen el citoesquelet d'actina al coll entre la mare i la filla i en canvi, en les cèl.lules mutants *rot1* no s'observa aquesta repolarització ni tan sols a temps més llargs.

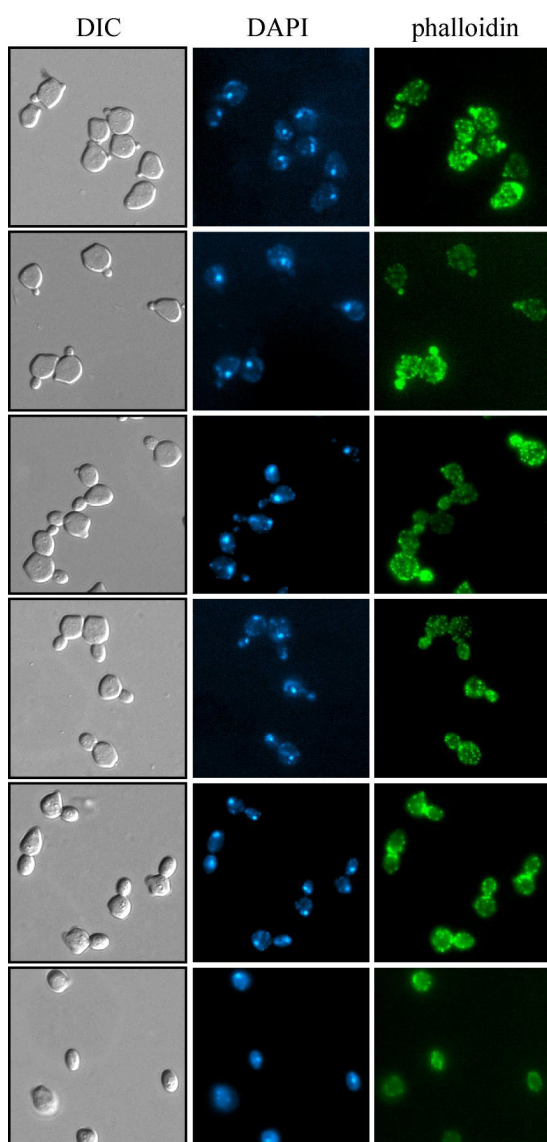
Figura 3.9. Organització del citoesquelet d'actina en la soca mutant *rot1*. (A) Cèl.lules en creixement exponencial de les soques silvestre (CML240) i *tetO₇:ROT1* 216) es varen incubar en presència de doxiciclina durant 8 hores i es varen fixar. Es mostren imatges de DIC, de la tinció del DNA amb DAPI i de la tinció de l'F-actina amb fal.loïdina marcada amb el fluoròfor Alexa 498. (B) Cultius de les soques silvestre (CML240) i *tetO₇:ROT1* (JCY216) es varen sincronitzar afegint al medi de cultiu factor α en presència de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de doxiciclina. Després d'alliberar el cultiu, es varen fixar les cèl.lules en els diferents estadis del cicle cel.lular. Es mostren imatges de DIC, la tinció del DNA amb DAPI i la tinció de l'F-actina amb fal.loïdina.

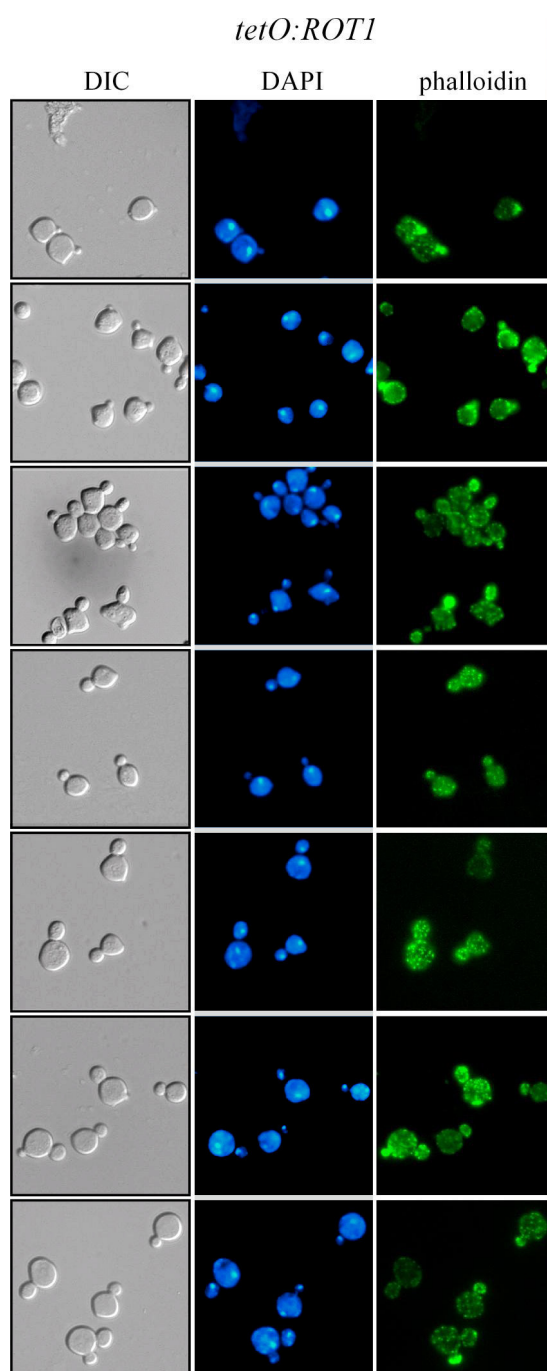
A



B

wild type





Atès que les cèl·lules mutants *rot1* regemmen, ens vàrem fixar en la polarització en la nova gemma i vàrem observar que els *patches* d'actina polaritzen en la nova gemma sense haver-se produït la repolarització d'actina al coll entre la mare i la filla al final del cicle cel·lular. Aquest resultat és important perquè indica que les cèl·lules que no han pogut repolaritzar l'actina al coll, però no han perdut la capacitat de polaritzar el citoesquelet d'actina. Per tant, podem concloure que *ROT1* no és requerit per a polaritzar el citoesquelet d'actina durant la formació de la gemma però sí que és necessari per a què la repolarització de l'actina entre la mare i la filla ocorregi al final del cicle cel·lular. Aquest fet explicaria el defecte de la divisió cel·lular provocat a l'inactivar *ROT1*.

LOCALITZACIÓ DE PROTEÏNES DE LA MAQUINÀRIA DE POLARITZACIÓ EN EL MUTANT *rot1*

La polarització del creixement en *S. cerevisiae* està controlada per una ruta complexa, que inclou diverses GTPases, proteïnes efectores de la ruta de senyalització i també proteïnes del complex anomenat polarisoma. La mutació d'un component del polarisoma com és Spa2 causa defectes en el creixement apical (Sheu et al., 2000) i en citoquinesi (Shih et al., 2005; Snyder et al., 1991) i és letal sintètic amb mutacions de la ruta PKC (Costigan et al., 1992), fenòmens semblants als descrits en altres treballs per a la mutació *rot1*. Spa2 és una proteïna dinàmica que es localitza en els llocs de creixement polaritzat on funciona com ancoradora de moltes proteïnes. Vàrem investigar si el defecte en la polarització del citoesquelet d'actina en el coll podria ser a causa d'un defecte en la localització de la proteïna Spa2. L'anàlisi de la localització de la proteïna funcional fusionada a GFP indica que Spa2-GFP està ben localitzada en les cèl·lules mutants *rot1*: de la

mateixa manera que ocorre en les cèl.lules silvestres (Arkowitz and Lowe, 1997), Spa2 es localitza en la punta de la gemma durant el naixement i creixement d'aquesta, on roman fins al final de fase S i finalment, es relocalitza en el coll entre la mare i la filla on forma una estructura en forma d'anell que més tard es divideix en dos anells (Figura 3.10A). Una vegada formats els dos anells, encara sense completar la divisió cel.lular, Spa2 en la cèl.lula mare desapareix de la regió del coll i es concentra en el còrtex en el lloc on presumptament naixerà la nova gemma. Tan prompte com es forma aquesta gemma, Spa2 es localitza de nou en la punta. Una relocalització semblant de Spa2 s'observa en la cèl.lula filla a temps llargs. Per tant, en la soca mutant *rot1* no sembla haver cap defecte en la localització de Spa2 malgrat l'existència del defecte esmentat en la polarització del citoesquelet d'actina. Per altra banda, no s'observa cap canvi en el nivell de proteïna Spa2 en cèl.lules de la soca mutant *rot1* front a les cèl.lules de la soca silvestre (Figura 3.10B).

Per continuar investigant la possible causa del defecte de la polarització del citoesquelet d'actina, també vàrem examinar la localització de la GTPasa Cdc42 i el seu bescanviador de nucleòtids (GEF) Cdc24, ja que són altres proteïnes que es relocalitzen a la regió del coll al final de la mitosi (Richman et al., 2002; Toenjes et al., 1999). Vàrem sincronitzar amb factor α cultius de cèl.lules mutants *rot1* transformades amb un plasmidi que contenia la proteïna de fusió Cdc24-GFP, la proteïna *MET*-GFP-Cdc42 o la proteïna GFP-Cdc42 expressada sota el seu promotor en un plasmidi centromèric. En les figures 3.11A i 3.12A es mostra que les dues proteïnes estan correctament localitzades en el mutant *rot1*. A més a més, el nivell de proteïna Cdc24 i Cdc42 no es troba afectat respecte el nivell que presenten en les cèl.lules silvestres (Figures 3.11B i 3.12B). En resum, Rot1 no afecta ni els nivells ni la localització dinàmica de les proteïnes de la maquinària de polarització com són Spa2, Cdc24 o Cdc42, encara que podria alterar la capacitat d'aquestes proteïnes de polaritzar l'actina en la regió del coll.

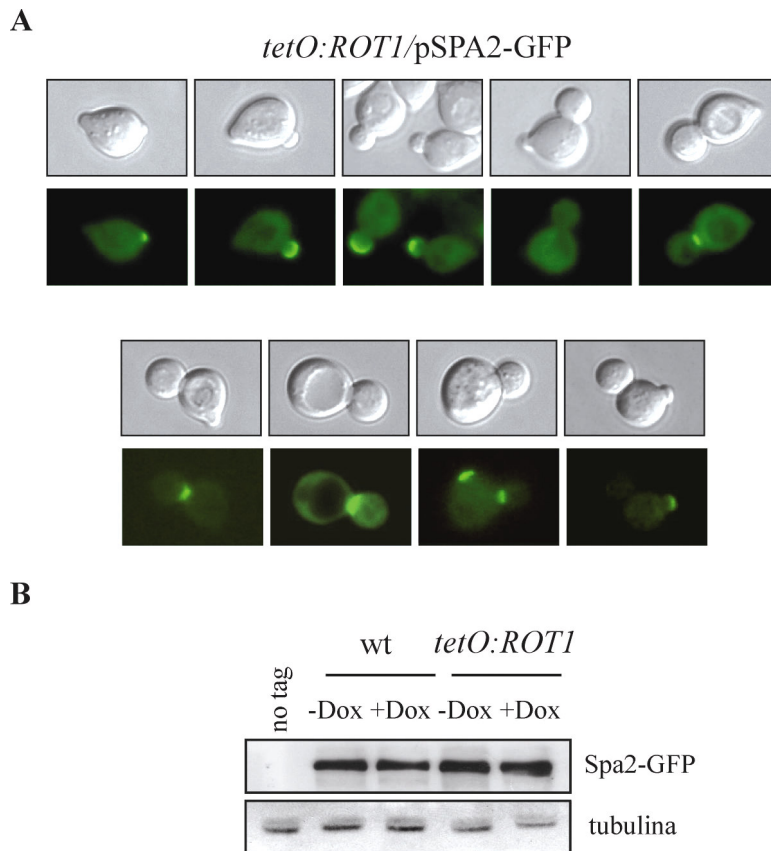


Figura 3.10. Localització subcel·lular i anàlisi dels nivells de la proteïna del polarisoma Spa2 en la soca mutant *rot1*. (A) Cultius en creixement exponencial de la soca *tetO₇:ROT1* (JCY216) transformada amb un plasmidi que expressa la proteïna Spa2 etiquetada amb GFP es varen sincronitzar afegint al medi de cultiu factor α en presència de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de doxiciclina. Es mostren imatges de DIC i del senyal de GFP d'una col·lecció de cèl·lules en els diferents estadis del cicle cel·lular. (B) Anàlisi per *western* dels nivells de proteïna Spa2 en extractes de les soques silvestre (CML240) i *tetO₇:ROT1* (JCY216) transformades en un plasmidi que expressa la proteïna Spa2-GFP incubades amb presència o absència de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de doxiciclina durant 8 hores. S'inclou un extracte obtingut de la soca silvestre (CML240) com a control negatiu (no tag). El nivell de proteïna tubulina es mostra com a control de càrrega.

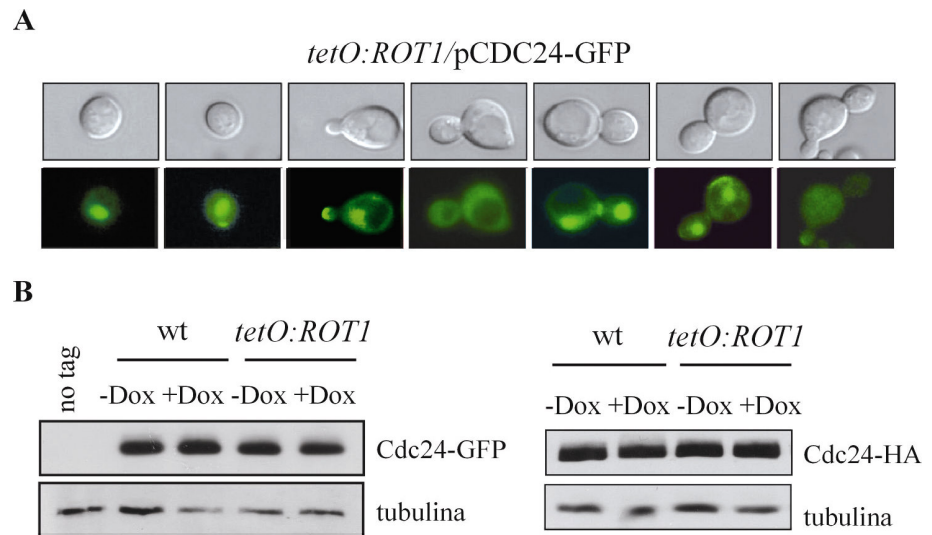


Figura 3.11. Localització subcel.lular i anàlisi dels nivells de la proteïna Cdc24 en la soca mutant *rot1*. (A) Cultius en creixement exponencial de la soca *tetO₇:ROT1* (JCY216) transformada amb un plasmidi que expressa la proteïna Cdc24 etiquetada amb GFP es varen sincronitzar afegint al medi de cultiu factor α en presència de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de doxiciclina. Es mostren imatges de DIC i del senyal de GFP d'una col.lecció de cèl.lules en els diferents estadis del cicle cel.lular. (B) Anàlisi per *western* dels nivells de proteïna Cdc24 en extractes de les soques silvestre (CML240) i *tetO₇:ROT1* (JCY216) transformades amb un plasmidi que expressa la proteïna Cdc24-GFP o la proteïna Cdc24-HA, incubades en presència o absència de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de doxiciclina durant 8 hores. S'inclou un extracte obtingut de la soca silvestre (CML240) com a control negatiu (no tag). El nivell de proteïna tubulina es mostra com a control de càrrega.

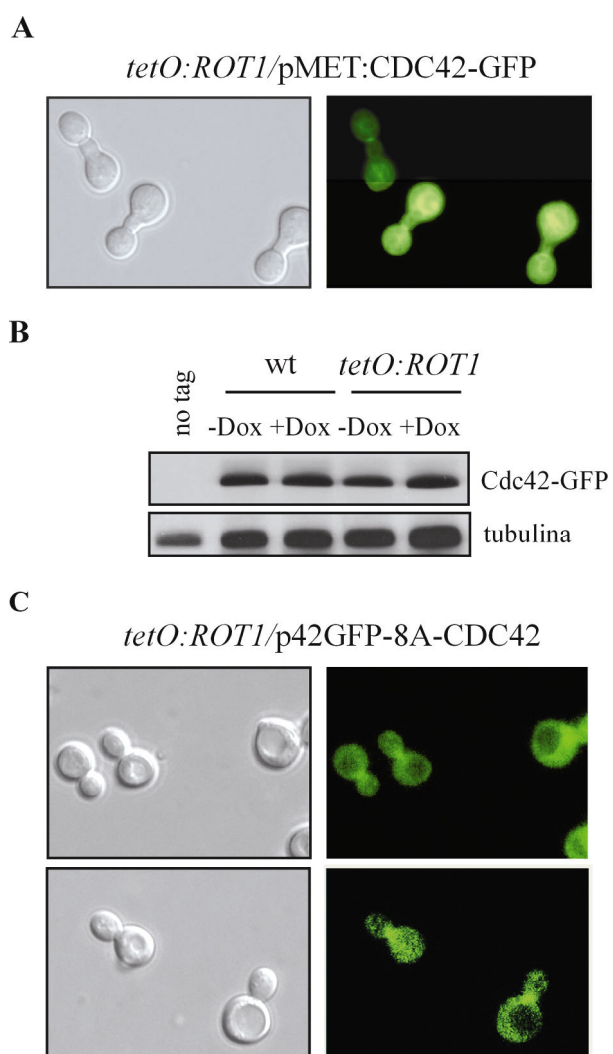


Figura 3.12. Localització subcel·lular i anàlisi del nivell de la proteïna Cdc42 en la soca mutant *tetO₇:ROT1*. (A) Cultius en creixement exponencial de la soca *tetO₇:ROT1* (JCY216) transformada amb un plasmidi que expressa la proteïna Cdc42 etiquetada amb GFP sota el control del promotor reprimible per metionina MET3 (pMET3:GFP-CDC42) es varen sincronitzar afegint al medi de cultiu factor α en presència de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de doxiciclina. Es mostra la imatge de DIC i del senyal de GFP de cèl·lules en les últimes fases del cicle cel·lular. (B) Anàlisi per *western* dels nivells de proteïna Cdc42 en extractes de les soques silvestre (CML240) i *tetO₇:ROT1* (JCY216) transformades en el plasmidi pMET3:GFP-CDC42 incubades en presència o absència de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de doxiciclina durant 8 hores. S'inclou un extracte obtingut de la soca silvestre (CML240) com a control negatiu (no tag). El nivell de proteïna tubulina es mostra com a control de càrrega. (C) Cultius en creixement exponencial de la soca *tetO₇:ROT1* (JCY216) transformades amb un plasmidi que expressa la proteïna Cdc42 etiquetada amb GFP sota el control del seu promotor (p42GFP-8A-CDC42) es varen sincronitzar afegint al medi de cultiu factor α en presència de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de doxiciclina. Es mostra la imatge de DIC i del senyal de GFP de cèl·lules en les últimes fases del cicle cel·lular.

Rot1 AFECTA ESPECÍFICAMENT ALS PROCESSOS DE CREIXEMENT POLARITZAT REGULATS PER Clb2

Tenint en compte els resultats obtinguts fins ara, Rot1 està implicat en l'activació del canvi de creixement apical a isotròpic i en la repolarització del citoesquelet d'actina a la regió del coll al final de la divisió cel·lular. En canvi, com hem demostrat, no és requerit per a la polarització del creixement durant l'emergència de la gemma. La regulació temporal d'aquests processos morfogènètics al llarg del cicle cel·lular la porten a terme les diferents activitats CDK. Tant el canvi a creixement isotròpic com la polarització del creixement al final de mitosi estan regulats per la quinasa Cdc28-Clb2 mentre que la polarització del citoesquelet durant l'emergència de la gemma està regida per la quinasa Cdc28-Cln1,2 (Park and Bi, 2007; Pruyne and Bretscher, 2000a; Pruyne and Bretscher, 2000b). Llavors, els resultats

apunten que *ROT1* deu repercutir específicament en la regulació del citoesquelet d'actina on intervé Clb2. Per a profunditzar en aquest aspecte, vàrem comparar l'efecte de la inactivació de *ROT1* en el fenotip d'hiperpolarització originat o bé per la inactivació de *clb2* o bé per la sobreexpressió de Cln2. Com s'ha comentat anteriorment, la inactivació de *ROT1* suprimeix el defecte d'hiperpolarització del mutant *clb2* (veure figura 3.2). En canvi, quan estudiàrem la morfologia de les cèl.lules transformades amb un plasmidi que contenia el gen *GALI:CLN2-HA*, vàrem observar clarament que tant les cèl.lules silvestres com les del mutant *rot1* presenten el fenotip típic d'hiperpolarització degut a la sobreexpressió de *CLN2* (Figura 3.13). D'aquests resultats, podem concloure que la inactivació de *ROT1* no suprimeix el defecte d'hiperpolarització de les cèl.lules amb sobreexpressió de *CLN2* i per tant, podem afirmar que Rot1 afecta exclusivament els processos del citoesquelet d'actina regulats per Clb2 i no per Cln2.

LA PÈRDUA DE Clb2 SUPRIMEIX PARCIALMENT LA LETALITAT DEL MUTANT *rot1*

Les cèl.lules mutants *rot1* s'acumulen en les últimes etapes del cicle cel.lular amb defectes en l'activació del canvi de creixement apical a isotròpic i amb defectes en la polarització del citoesquelet d'actina durant la citoquinesi (processos regulats per Clb2). Per a completar la divisió del cicle cel.lular s'han d'inactivar les CDK. Ens vàrem preguntar si l'acumulació de les cèl.lules mutants *rot1* al final del cicle i la incompleta formació del septo podia ser conseqüència d'un defecte en l'eliminació de la CDK mitòtica. En treballs previs, al nostre laboratori (E. Queralt i J.C. Igual) ja havien assajat els nivells de la proteïna Clb2 i l'activitat quinasa associada en les cèl.lules

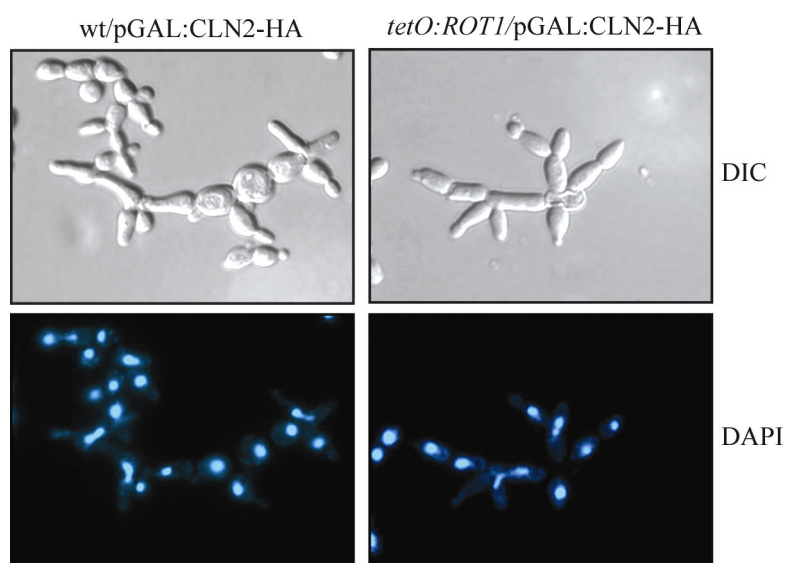


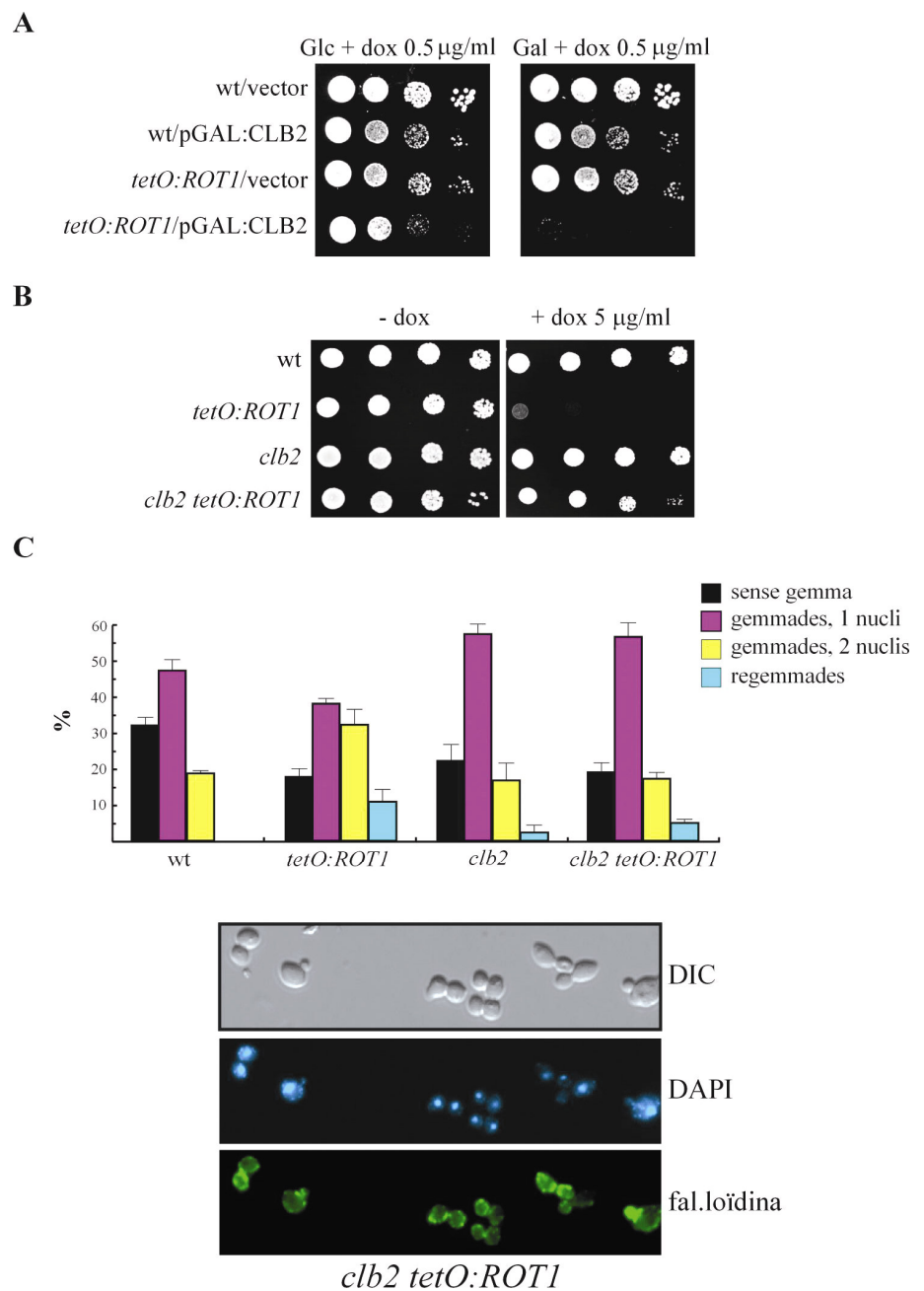
Figura 3.13. Efecte de la sobreexpressió de *CLN2* en la soca mutant *rot1*. Anàlisi de la morfologia cel·lular de cultius en fase exponencial de les soques silvestre (CML240) i *tetO₇:ROT1* (JCY216) transformades amb un plasmidi que conté el gen *GAL:CLN2-HA*. Les cèl·lules es varen créixer en galactosa i després es varen incubar en presència de 5 µg/mL de doxiciclina durant 8 hores.

tetO₇:ROT1 després d'incubar-se en presència de doxiciclina. En aquests estudis, s'havia detectat per *western-blot* que la ciclina Clb2 estava present en les cèl·lules mutants *rot1* i mitjançant assaig quinasa s'havia comprovat que la quinasa associada a Clb2 estava activa.

Amb l'objectiu de demostrar la possible relació funcional entre *CLB2* i *ROT1*, vàrem estudiar si hi havia interaccions genètiques entre ells. S'ha descrit que mutants en eixida de mitosi són hipersensibles a la sobreexpressió de Clb2 (Jaspersen et al., 1998). Vàrem transformar la soca

tetO₇:ROT1 amb un plasmidi que expressava la ciclina Clb2 sota el control del promotor *GAL1* i es va créixer en condicions d'inactivació parcial de *ROT1* (0.5 µg/mL de doxiciclina) en presència de glucosa o de galactosa (sobreexpressió de Clb2). Tal i com s'observa en la figura 3.14A, les cèl.lules amb inactivació parcial de *ROT1* tenen un fort defecte de creixement quan el gen *CLB2* s'expressa sota el promotor *GAL1*. Aquest resultat indica que nivells elevats de Clb2 són tòxics quan *ROT1* no està totalment funcional. Cal remarcar que els mutants d'eixida de mitosi es suprimeixen per la deleció del gen *CLB2*. Per aquesta raó vàrem estudiar quin efecte tenia la inactivació de *CLB2* en una soca mutant *rot1*. El resultat indica que la deleció del gen *CLB2* suprimeix la letalitat del mutant *rot1*, encara que aquesta supressió no és total ja que les cèl.lules *clb2 tetO₇:ROT1* creixen pitjor que les cèl.lules silvestres (Figura 3.14B). En conclusió, la letalitat de la soca *tetO₇:ROT1* està associada, almenys en part, a la presència de la ciclina Clb2 i apunta a un antagonisme funcional entre *CLB2* i *ROT1* durant el cicle cel.lular.

Figura 3.14. Interacció genètica entre *ROT1* i *CLB2*. (A) Dilucions seriades de cultius en fase exponencial de les soques silvestre (CML240) i mutant *tetO₇:ROT1* (JCY216) transformades amb un vector control o amb el plasmidi pGAL:CLB2 que expressa el gen *CLB2* sota el control del promotor *GAL1* es varen sembrar en plaques de YPD o YPGal amb 0.5 µg/mL de doxiciclina i es varen incubar a 28°C durant 3 dies. (B) Dilucions seriades de cultius en fase exponencial de les soques silvestre (W303), *tetO₇:ROT1* (MCY68), *clb2* (CD104-2c) i *clb2 tetO₇:ROT1* (JCY255) es varen sembrar en plaques de YPD en presència o absència de 5 µg/mL de doxiciclina i es varen incubar a 28°C durant 3 dies. (C) Cultius en creixement exponencial de les soques silvestre (W303), *tetO₇:ROT1* (MCY68), *clb2* (CD104-2c) i *clb2 tetO₇:ROT1* (JCY255) es varen incubar en presència de 5 µg/mL de doxiciclina durant de 8 hores. Les gràfiques mostren la distribució de les cèl.lules en els diferents estadis del cicle cel.lular. Els valors obtesos són la mitjana ± s.d. de 3 experiments independents. Es mostren imàgens de DIC, de la tinció del DNA amb DAPI i de la tinció dels filaments d'actina amb fal.loïdina de les cèl.lules *clb2 tetO₇:ROT1* (JCY255) incubades amb 5 µg/mL de doxiciclina durant 8 hores.



A continuació vàrem investigar si la mutació *clb2* també suprimiria els defectes de polarització de l'actina observats en el mutant *tetO₇:ROT1*. Com hem dit abans, la inactivació de *ROT1* provoca una acumulació de cèl·lules amb defectes en els últims estadis de divisió cel·lular, incloent l'aparició de cèl·lules regemmades. En canvi, a l'inactivar *ROT1* en un mutant *clb2* no s'aprecien canvis significatius en la distribució de cèl·lules excepte un lleuger augment en el percentatge de les cèl·lules regemmades (Figura 3.14C). Aquest resultat suggereix que el defecte en la polarització de l'actina a la regió del coll està, almenys en part, suprimit. De fet, en cèl·lules *clb2 tetO₇:ROT1* es pot detectar polarització d'actina en el coll entre les cèl·lules mare i filla, encara que no tan clarament com s'observa en les cèl·lules silvestres (Figura 3.14C). Per altra banda, les cèl·lules *clb2 rot1*, comparades amb les cèl·lules *rot1*, mostren cert grau de creixement apical (veure figura 3.2). D'aquests resultats podem concloure que la deleció *clb2* alleuja els defectes del citoesquelet d'actina associats a la mutació *rot1*.

ROT1 INTERACCIONA GENÈTICAMENT EN GENS IMPLICATS EN LA DEGRADACIÓ DE PROTEÏNES PER LA RUTA APC

El principal mecanisme implicat en la inactivació de la CDK al final de mitosi és la degradació de Clb2 pel proteasoma. Aquesta degradació és portada a terme per la ubiquitinació de la proteïna Clb2 per la ubiquitinligasa APC. Amb la finalitat d'estudiar la possible relació entre Rot1 i la ruta APC de degradació de proteïnes, vàrem introduir el gen *tetO₇:ROT1* en soques mutants en la maquinària de degradació de proteïnes dependent d'APC per averiguar si hi havia interaccions genètiques. El creixement de les soques doble mutant es va analitzar en condicions semi-permissives per a les dues mutacions simples (0.5 µg/mL de doxiciclina per mantenir viable al

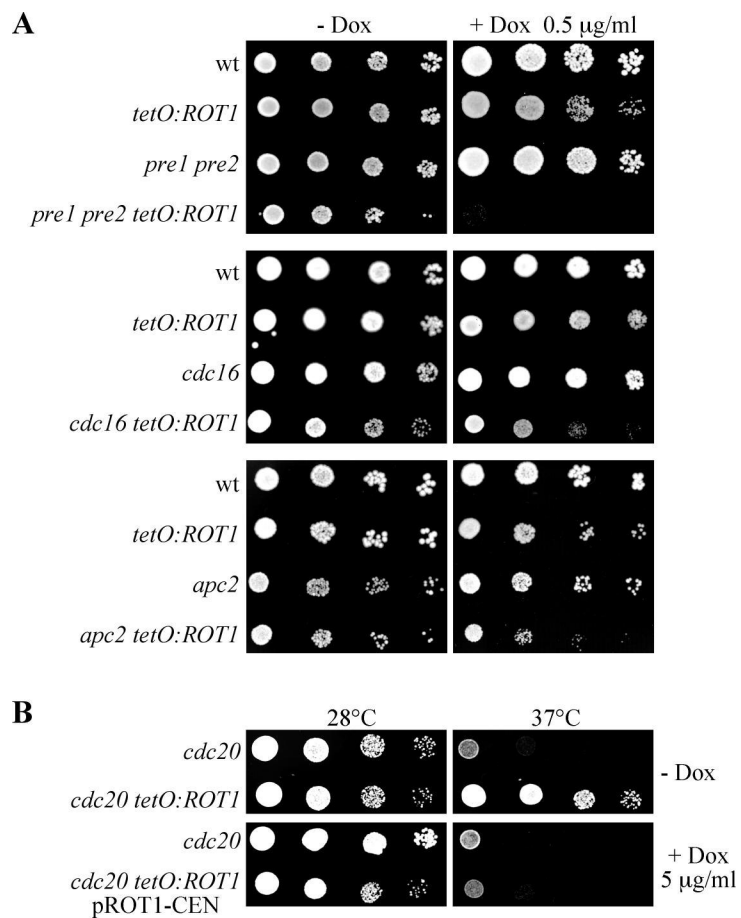


Figura 3.15. Interaccions genètiques entre el gen *ROT1* i gens del sistema ubiquitina-proteasoma. (A) Dilucions seriades de cultius en fase exponencial de les soques silvestres (WCG4 α en el panel superior o W303), mutant *tetO₇:ROT1* (MCY125 en el panel superior o MCY68), *pre1 pre2* (WCG4-11/22), *pre1 pre2 tetO₇:ROT1* (MCY32), *cdc16*, *cdc16 tetO₇:ROT1* (JCY553), *apc2* (KTM200U) i *apc2 tetO₇:ROT1* (JCY555) es varen sembrar en YPD en absència o presència de 0.5 µg/mL de doxiciclina i es varen incubar a 30°C durant 3 dies. (B) Dilucions seriades de cultius en fase exponencial de les soques *cdc20* i *cdc20 tetO₇:ROT1* (MCY139) transformades quan s'indica amb un plasmidi centromèric que expressa el gen *ROT1*, es varen sembrar en plaques de YPD en presència o absència de 5 µg/mL de doxiciclina i es varen incubar a 28°C durant 3 dies.

mutant *rot1* i 25° C per mantindre la viabilitat de les soques termosensibles *pre1 pre2*, *apc2* i *cdc16*. Com s'observa en la figura 3.15A, el creixement està reduït severament quan el gen *tetO₇:ROT1* està parcialment reprimat en cèl.lules mutants o bé en el proteasoma (*pre1 pre2*) o en subunitats d'APC (*apc2* i *cdc16*).

De la mateixa manera, vàrem estudiar si existia interacció genètica entre *CDC20*, que codifica una subunitat activadora d'APC, i *ROT1*. L'assaig de creixement revela que la soca *cdc20 tetO₇:ROT1* té capacitat de créixer a 37° C, una condició on la soca parental *cdc20* és inviable (Figura 3.15B). La supressió de la letalitat del mutant *cdc20* és dependent de l'expressió ectòpica de *ROT1* pel promotor *tetO₇*, ja que les cèl.lules *cdc20 tetO₇:ROT1* no creixen a alta temperatura a l'afegir doxiciclina al medi de cultiu (en aquest cas les cèl.lules es varen transformar amb un plasmidi centromèric que contenia el gen *ROT1* per permetre la viabilitat en presència de doxiciclina). Per tant, l'expressió ectòpica de *ROT1* sota el promotor *tetO₇* suprimeix la letalitat de la soca *cdc20* a temperatura elevada.

Aquestes interaccions genètiques entre *ROT1* i gens implicats en el proteasoma o en APC demostren una funció de Rot1 en la degradació de proteïnes pel proteasoma durant el cicle cel.lular.

Rot1 CONTROLA L'ESTABILITAT DE LA PROTEÏNA Clb2

Tenint en compte les dades obteses fins ara, ens vàrem preguntar si Rot1 podria estar implicat en la degradació de la proteïna Clb2. Vàrem estudiar l'estabilitat de Clb2 fent assajos d'apagat de promotor amb un gen *GAL1:CLB2-HA*, en el qual s'analitza la caiguda en el nivells de proteïna Clb2 mitjançant *western* una vegada el promotor *GAL1* és silenciats per

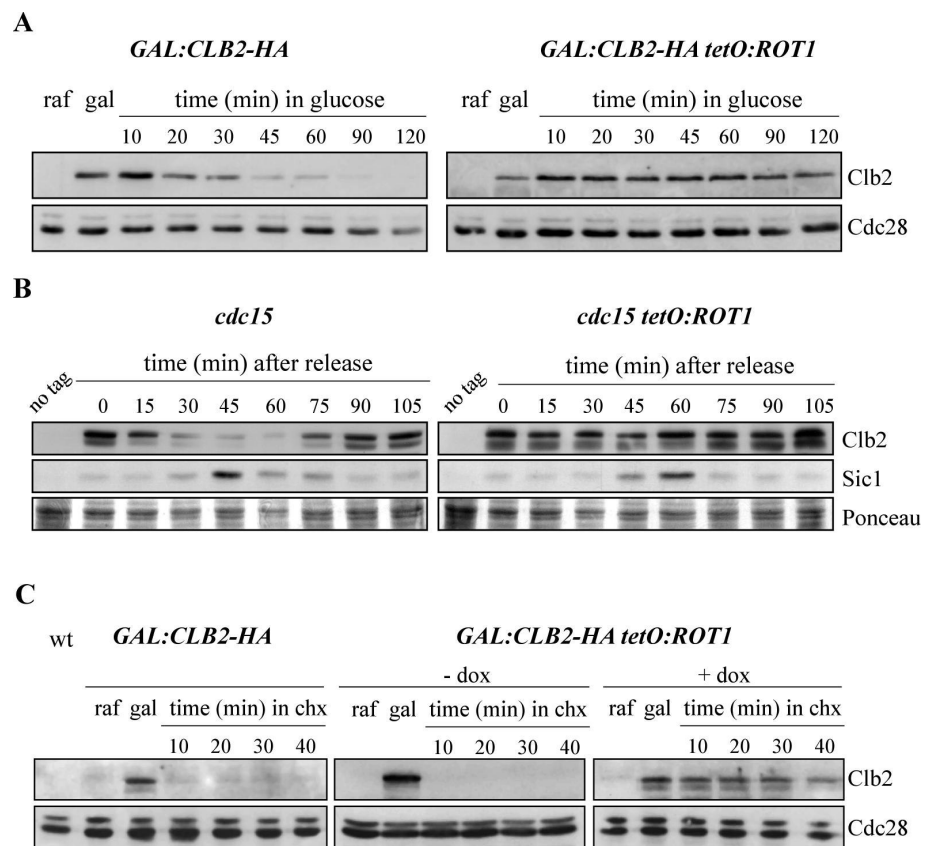
addició de glucosa al medi. En cèl·lules silvestres, Clb2 és una proteïna inestable ja que és quasi indetectable als 30 minuts després de reprimir el promotor *GAL1* (Figura 3.16A). Per contra, en cèl·lules mutants *rot1* els nivells de la proteïna Clb2 apenes minven persistint més de 120 minuts després de reprimir el promotor. Aquest resultat demostra que l'eliminació de *ROT1* estabilitza Clb2.

La degradació de la ciclina Clb2 al final de la mitosi està controlada per la fosfatasa Cdc14, activada per la ruta MEN, la qual s'encarrega de defosforilar diverses proteïnes. Per una banda, Cdc14 activa Cdh1, una subunitat activadora de APC implicada en la degradació de Clb2, originant la total eliminació de les ciclines mitòtiques. Per altra banda, Cdc14 activa el factor de transcripció Swi5 i estabilitza a l'inhibidor de CDK Sic1, originant l'acumulació de Sic1 en la cèl·lula. Calia preguntar-se si l'estabilització de Clb2 observada en cèl·lules mutants *rot1* podria deure's a la incapacitat d'activar adequadament Cdc14. No obstant, el fet que les cèl·lules mutants en *ROT1*, a diferència de cèl·lules mutants en MEN o en Cdc14, puguen completar la mitosi suggeria que la ruta MEN i Cdc14 són funcionals en absència de Rot1. Per aclarir aquest punt, vàrem analitzar els nivells de les proteïnes Clb2 i Sic1 després d'alliberar de l'aturada en telofase induïda per la mutació *cdc15* termosensible. Com s'observa en la figura 3.16B, en les cèl·lules amb Rot1, la major part de la proteïna Clb2 és degradada i la proteïna Sic1 s'acumula després d'incubar a temperatura permissiva. Aquests fets reflecten l'activació de Cdc14. Seguidament, la degradació de Sic1 i l'aparició de noves gemmes marquen la iniciació d'una nova ronda de divisió cel·lular. En el cas de les cèl·lules mutants *rot1*, el nivell de la proteïna Clb2 es manté després d'alliberar de la parada. Aquest resultat confirma que la proteïna Rot1 és necessària per a la degradació de Clb2. A més a més, un fet molt interessant que s'observa en les cèl·lules mutants *rot1* és que la proteïna Sic1 s'acumula. Aquest resultat clarament suggereix que la ruta MEN i la fosfatasa Cdc14 estan activades en les cèl·lules mutants

rot1. Cal ressaltar que malgrat el defecte de degradació de Clb2, les cèl.lules mutants *rot1* són capaces d'iniciar una nova ronda de divisió cel·lular com es pot deduir per la degradació de Sic1 i el regemmat de les cèl.lules, encara que amb un retardament respecte a les cèl.lules silvestres (veure figura 3.5D). Per tant, el defecte en la degradació de Clb2 en les cèl.lules mutants *rot1* no es deu a una funció defectuosa de la ruta MEN i Cdc14, la qual cosa suggereix que Rot1 tinga un paper específic en el control de l'estabilitat de Clb2.

Els resultats anteriors demostren que en absència de Rot1 no s'activa la degradació de Clb2. Per aprofundir en la relació de Rot1 amb el control de l'estabilitat de Clb2, ens vàrem preguntar quin efecte tindria la inactivació de *ROT1* en cèl.lules que tenen activada la via de degradació de Clb2. Per això,

Figura 3.16. Control de l'estabilitat de la proteïna Clb2 per Rot1. (A) Cultius de les soques silvestre (CML240) i *tetO₇:ROT1* (JCY216) transformades amb un plasmidi que expressa el gen *GAL:CLB2-HA* es varen créixer en rafinosa (raf), després es varen incubar en galactosa (gal) durant 30 minuts i es transferiren a medi en glucosa. La caiguda del nivell de la proteïna Clb2 es va analitzar per *western* als temps indicats. El nivell de la proteïna Cdc28 es mostra com a control de càrrega. (B) Cultius en creixement exponencial de cèl.lules *cdc15* (MCY123) i *cdc15 tetO₇:ROT1* (MCY151) expressant la proteïna Clb2 etiquetada amb HA i la proteïna Sic1 etiquetada amb myc es varen incubar a 37°C amb presència de 5 µg/mL de doxiciclina. Després de 4 hores, amb més del 95 % de les cèl.lules en telofase en els dos casos, les cèl.lules es varen transferir a 28°C i es varen analitzar els nivells de proteïna Clb2 i Sic1 per *western* als temps indicats. Com a control de càrrega es mostra la tinció de la membrana amb Ponceau. (C) Cultius de les soques silvestre (CML240) i *tetO₇:ROT1* (JCY216) transformades amb el plasmidi pGAL:CLB2-HA es varen créixer en rafinosa i es varen aturar amb factor α en presència o absència de 5 µg/mL de doxiciclina. Després de 4 hores, amb més del 96 % de les cèl.lules sense



gemma en els dos casos, es va afegir galactosa mantenint les cèl.lules aturades i, després de 30 minuts, la síntesi de proteïna es va bloquejar afegint cicloheximida (chx). El nivell de la proteïna Clb2 després d'aturar la traducció de la proteïna es va analitzar per *western* als temps indicats. El nivell de la proteïna Cdc28 es mostra com a control de càrrega.

vàrem analitzar l'estabilitat de Clb2 en cèl.lules aturades en G1 on Clb2 és molt inestable amb una vida mitjana de menys d'un minut (Amon et al., 1994). Aquesta experiència es va realitzar en cèl.lules silvestres i cèl.lules del mutant *tetO₇:ROT1* amb el plasmidi GAL:CLB2-HA bloquejant-les en G1 amb factor α i apagant la síntesi proteïca amb cicloheximida. Com era d'esperar, als 10 minuts després d'afegir la cicloheximida, la proteïna Clb2 pràcticament no es detecta en les cèl.lules silvestres (Figura 3.16C). Un resultat semblant s'observa en les cèl.lules *tetO₇:ROT1* incubades en absència de doxiciclina. En canvi, quan *ROT1* està inactivat per l'addició de doxiciclina, el nivell de proteïna Clb2 permaneceix pràcticament inalterat. Per tant, la inactivació de *ROT1* conduïx a l'estabilització de Clb2 en cèl.lules en G1, és a dir, Rot1 és necessari per a mantenir activa la degradació de Clb2, la qual cosa apunta que Rot1 té un control directe en la degradació de Clb2.

Rot1 POT AFECTAR EL CITOESQUELET D'ACTINA EN ABSÈNCIA DE Clb2

Com hem comentat abans, Clb2 intervé en l'activació del canvi de creixement apical a isotròpic i en la inhibició de la repolarització del citoesquelet d'actina, mentre que Rot1 és requerit per a mantindre el creixement apical i polaritzar el creixement al coll. Aquest antagonisme funcional es reflecteix en les interaccions genètiques descrites i podria explicar-se, almenys en part, pel fet que Rot1 controle directament l'estabilitat de Clb2. És necessari ressaltar, no obstant, que resultats mostrats anteriorment indicaven que la inactivació de *ROT1* en una soca *clb2 Δ* desactiva el creixement apical (veure figura 3.2B). Aquesta observació indica que Rot1 pot afectar el citoesquelet d'actina en absència de Clb2. Per

a confirmar-ho, es va analitzar la capacitat de la sobreexpressió de *ROT1* per a suprimir el defecte en el creixement d'un mutant *cdc42-1* en absència de Clb2. Per això, es va deletar el gen *CBL2* en les soques mutants *cdc42-1* i *cdc42-1 tetO₇:ROT1* i es va analitzar el seu creixement a temperatura restrictiva. Com s'observa en la figura 3.17, la sobreexpressió ectòpica de *ROT1* sota el promotor *tetO₇* suprimeix el defecte de creixement de la soca mutant *cdc42-1 clb2Δ*. Aquest resultat confirma que Rot1 pot controlar el citoesquelet d'actina per una via independent de Clb2.

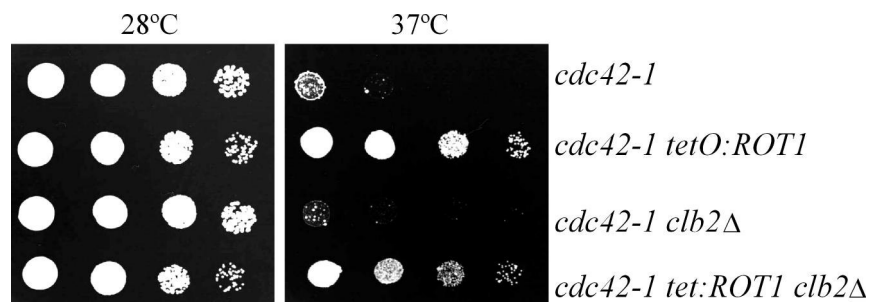


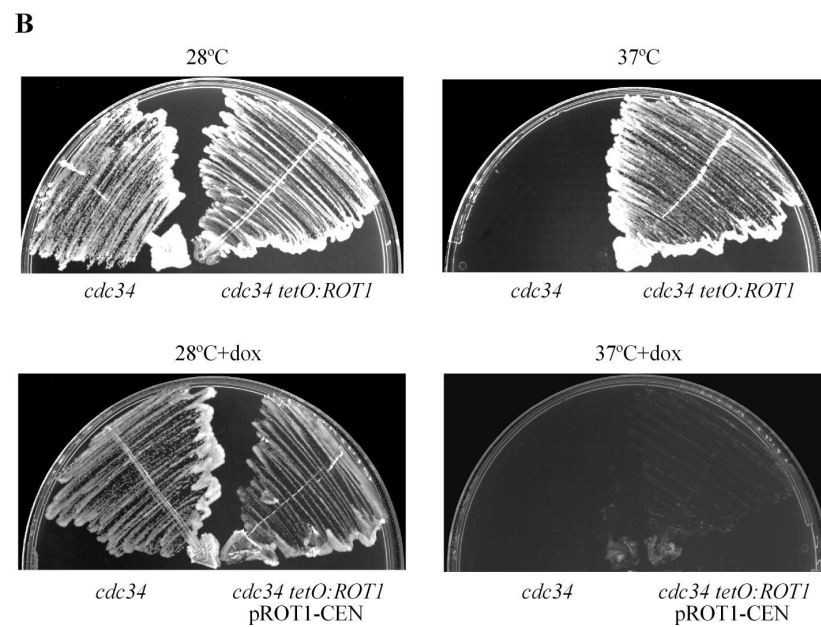
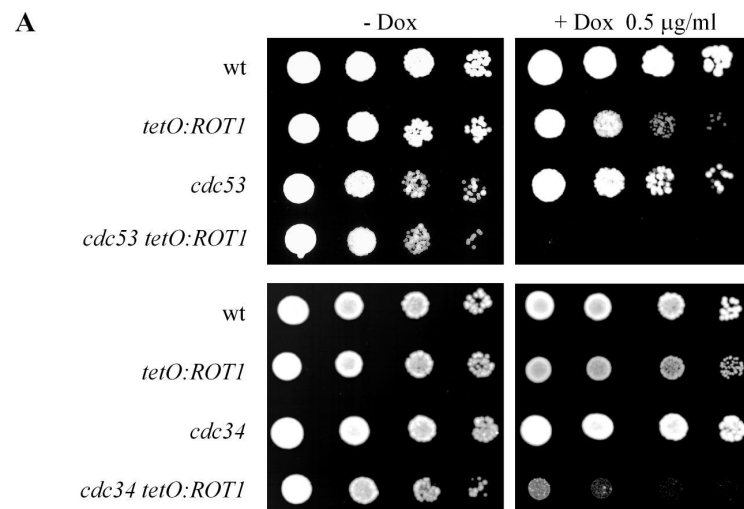
Figura 3.17. Efecte de la sobreexpressió de *ROT1* en la soca *cdc42-1* i *cdc42-1 clb2Δ*. Dilucions seriades de cultius en fase exponencial de les soques *cdc42-1* (DJTC2-16D), *cdc42-1 tetO₇:ROT1* (MCY92), *cdc42-1 clb2Δ* (MCY188) i *cdc42-1 tetO₇:ROT1 clb2Δ* (MCY189) es varen sembrar en YPD i es varen incubar a 28°C o 37°C durant 3 dies.

INTERACCIONS GENÈTIQUES ENTRE *ROT1* I GENS DE LA RUTA SCF

A més de per la ruta APC, la degradació de proteïnes reguladores del cicle cel.lular també està mediada per la ruta de la ubiquitin-ligasa SCF. SCF està activat durant tot el cicle cel.lular però els substrats més importants d'aquesta via es degraden durant la transició G1/S. No obstant això, s'ha publicat recentment que la degradació de proteïnes mitjançant SCF també és necessària per a la correcta citoquinesi (Blondel et al., 2005).

En primer lloc, vàrem analitzar si hi ha interaccions genètiques entre la mutació del gen *ROT1* i mutacions en els gens *CDC53* i *CDC34* de la ruta SCF. *Cdc53* és un component de SCF i *Cdc34* és el E2 o l'enzim conjugador d'ubiquitina de la ruta SCF. El creixement de les soques doble mutant es va analitzar en condicions semi-permissives per a les dues mutacions simples (0.5 µg/mL de doxiciclina per mantenir la viabilitat de la soca mutant *rot1* i 33° C per mantenir la viabilitat de les soques *cdc53* i *cdc34*). Com s'observa en la figura 3.18A, la inactivació parcial de *ROT1* és letal en els dos casos.

Figura 3.18. Interaccions genètiques entre el gen *ROT1* i gens de la ruta de la ubiquitina ligasa SCF. (A) Dilucions seriades de cultius en fase exponencial de les soques silvestre W303, *tetO₇:ROT1* (MCY68), *cdc53* (MTY740), *cdc53 tetO₇:ROT1* (MCY26), *cdc34* (HTY600) i *cdc34 tetO₇:ROT1* (MCY100) es varen sembrar en YPD en presència o absència de 0.5 µg/mL de doxiciclina i es varen incubar a 33°C durant 3 dies. (B) Les soques *cdc34* (HTY600) i *cdc34 tetO₇:ROT1* (MCY100) transformades en els casos on s'indica amb un plasmidi centromèric que expressa el gen *ROT1*, es varen sembrar en plaques de YPD en presència o absència de 5 µg/mL de doxiciclina. Les plaques es varen incubar a 28°C o a 37°C durant 3 dies.



Aquest resultat, demostra una letalitat sintètica entre la mutació del gen *ROT1* i mutacions en els gens *CDC53* o *CDC34*. Per altra banda, la soca *cdc34 tetO₇:ROT1* pot créixer a 37° C (Figura 3.18B), una condició on la soca mutant simple *cdc34* és inviable. La supressió de la letalitat d'un mutant *cdc34* és dependent de l'expressió ectòpica del promotor *tetO₇* de *ROT1*, ja que les cèl.lules *cdc34*, no creixen a temperatura elevada a l'afegir doxiciclina al medi de cultiu (en aquest cas les cèl.lules es varen transformar amb un plasmidi centromèric que conté el gen *ROT1* per permetre la viabilitat en presència de doxiciclina). En conclusió, *ROT1* té interaccions genètiques amb gens de la ruta SCF de degradació de proteïnes.

A continuació varem analitzar si l'estabilitat de Cln2, una ciclina que es degrada per la ruta SCF, podria estar afectada en un mutant *rot1*. Varem estudiar l'estabilitat de Cln2 fent assajos d'apagat de promotor en un gen *GALI:CLN2-HA*. En les cèl.lules silvestres, Cln2 és molt inestable amb una vida mitjana de 5-7 minuts (Willems et al., 1996), i així, és pràcticament indetectable als 10 minuts després de reprimir el promotor *GALI* en cèl.lules silvestres (Figura 3.19). En les cèl.lules mutant *tetO₇:ROT1*, hi ha una caiguda important en el nivell de proteïna Cln2 als 10 minuts, però, per contra al que ocorre en les cèl.lules silvestres, queda una quantitat residual de la proteïna que no ha desaparegut després de 60 minuts de reprimir el promotor *GALI* (Figura 3.19). Aquest resultat suggereix que Rot1 podria estar implicat en la degradació d'almenys d'una fracció de la proteïna Cln2 present en la cèl.lula.

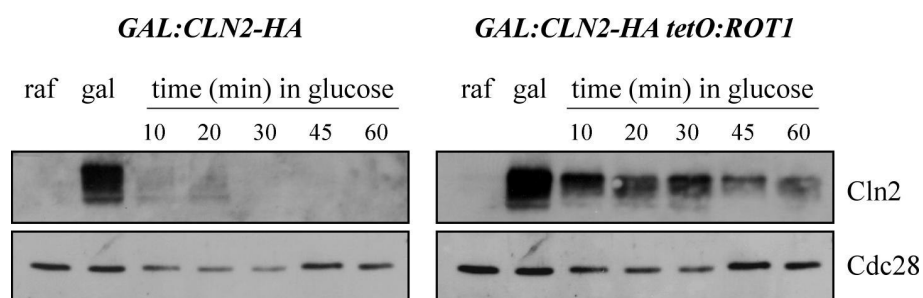


Figura 3.19. Control de l'estabilitat de la proteïna Cln2 per Rot1. Cultius de les soques silvestre (CML240) i *tetO₇:ROT1* (JCY216) transformades amb un plasmidi que expressa el gen *GAL:CLN2-HA* es varen créixer en rafinosa (raf), després es varen incubar en galactosa (gal) durant 30 minuts i es transferiren a medi en glucosa. La caiguda del nivell de la proteïna Cln2 després de la repressió del gen *CLN2* per glucosa es va analitzar per *western* als temps indicats. El nivell de la proteïna Cdc28 es mostra com a control de càrrega.

ESTUDI DEL PAPER DE *Rot1* EN ALTRES VIES DE DEGRADACIÓ DE PROTEÏNES PEL PROTEASOMA

Fins ara, hem identificat interaccions genètiques de *ROT1* amb gens implicats en la degradació de proteïnes dependents de la ruta APC i també en gens de la ruta SCF. A més a més, *Rot1* està implicat en la degradació de la proteïna Clb2 i probablement de Cln2. Ens vàrem plantejar la hipòtesi que *Rot1* tinga una funció més general en la degradació de proteïnes pel proteasoma, més enllà de les rutes de degradació relacionades amb la regulació del cicle cel.lular.

El grup de (Bachmair et al., 1986) ha desenvolupat un sistema que consisteix en l'expressió de fusions Ubi-X- β -galactosidasa, on X és

qualsevol aminoàcid. Quan la cèl.lula sintetitza aquestes proteïnes de fusió, ràpidament es desubiquïtinen i es degraden pel proteasoma. La vida mitjana de la proteïna depèn de l'aminoàcid introduït en la posició X d'acord amb la regla de l'N-terminal. Així, si X és Arg, la proteïna Arg- β -gal és molt inestable i es degrada ràpidament, mentre que pel contrari si X és Met, la proteïna Met- β -gal és estable. Un cas particular és quan s'introdueix una Pro en la posició X; en aquest cas la proteïna Ubi-Pro- β -gal no és desubiquïtinada i es degrada pel proteasoma per una via diferent, la ruta de degradació per fusió a ubiquïtina (ruta UFD) (Johnson et al., 1995). Per estudiar si *ROT1* participa en aquestes vies de degradació, vàrem analitzar l'estabilitat de tres substrats que contenen Arg, Met o Pro en la posició X. Cèl.lules de la soca silvestre i del mutant *rot1* es varen transformar amb cadascú dels plasmidis que expressaven un d'aquests substrats sota un promotor induïble per galactosa. Com a control positiu de l'experiència, vàrem utilitzar cèl.lules termosensibles mutants en el proteasoma (*pre1 pre2*) transformades amb els mateixos plasmidis. Extractes totals de diferents cultius es van utilitzar per a assajar els nivells d'activitat β -galactosidasa (Figura 3.20). Com era d'esperar, en la soca mutant en el proteasoma s'observa un augment de les activitats relatives obteses tant per a Ubi-Pro- β -galactosidasa (7 vegades) com per a Arg- β -galactosidasa (5 vegades) respecte a les activitats en la soca silvestre, fet que reflecta l'estabilització d'aquestes proteïnes en inactivar el proteasoma. En el cas de les cèl.lules del mutant *rot1*, les activitats β -galactosidasa de la proteïna Arg- β -gal i Ubi-Pro- β -gal també augmenten (en concret són 2.5 vegades majors en les cèl.lules mutants *rot1* que en les cèl.lules silvestres per als dos casos) encara que no tant com en la soca mutant en el proteasoma. Aquest resultat reflecta que les cèl.lules *rot1* presenten defectes en la degradació de proteïnes substrats del mecanisme de la regla de l'N-terminal i de la ruta de degradació per fusió a ubiquïtina, suggerint que Rot1 podria tenir un efecte general en la degradació pel proteasoma 26S.

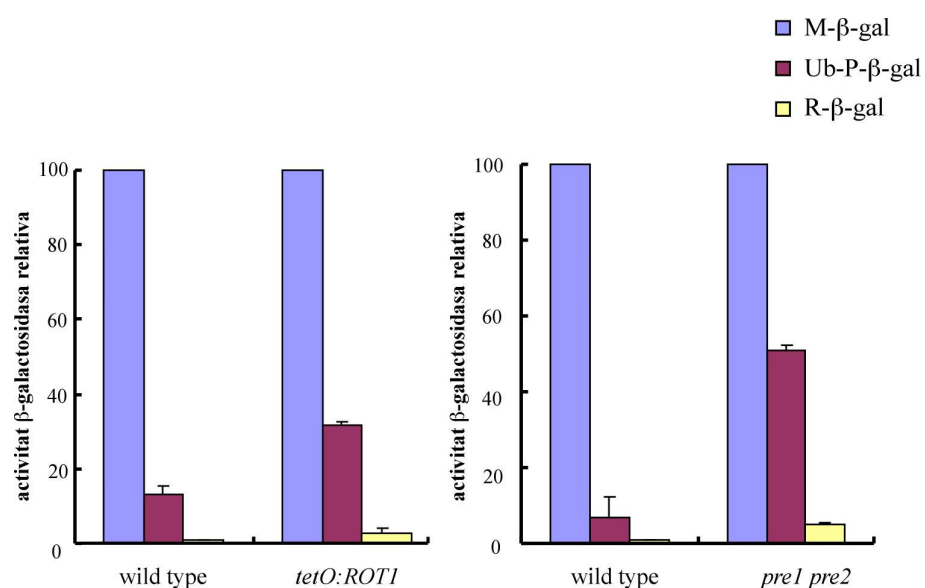


Figura 3.20. Anàlisi de la degradació de proteïnes substrats de la via de la regla de l'N-terminal i de la via per fusió a ubiquitina (UFD). Cultius de les soques silvestre (CML240 o WCG4 α) i mutant *tetO₇:ROT1* (JCE216) o *pre1 pre2* (WCG4-11/22) es varen transformar amb els plasmidis que expressen els gens que codifiquen les proteïnes de fusió Ubi-Met- β -galactosidasa, Ubi-Arg- β -galactosidasa o Ubi-Pro- β -galactosidasa sota un promotor induïble per galactosa. L'expressió de Ubi-X- β -galactosidasa (sent X Met, Arg o Pro) es va induir afegint 2 % de galactosa al medi de cultiu. Simultàniament, es va afegir 5 μ g/mL de doxiciclina i es varen incubar les cèl.lules durant 8 hores per al cas de les soques silvestre CML240 i mutant *rot1*, o es varen incubar les cèl.lules a 37°C durant 6 hores per al cas de les soques silvestre WCG4 α i mutant *pre1 pre2*. Les activitats β -galactosidasa dels extractes cel.lulars s'expressen com a valors relatius a l'activitat de la construcció Ubi-Met- β -galactosidasa (M- β -gal) en cada soca. Els valors representats són la mitjana \pm la desviació estàndard (s.d.) de tres experiments independents.

4. Caracterització bioquímica de Rot1

LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE Rot1

Segons la base de dades Saccharomyces Genome Database (SGD, <http://www.yeastgenome.org/>) Rot1 és una proteïna de 256 aminoàcids amb una massa molecular de 28.9 KDa. El programa TMHMM2.0, www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM, que utilitza un mètode basat en el model de Markov per a fer prediccions d'hèlix transmembrana (TM) en les seqüències de les proteïnes, va identificar un domini d'inserció en la membrana des de l'aminoàcid 232 al 256 a l'extrem C-terminal de la proteïna (Figura 1A). A més, els programes PSORT (<http://www.psort.org/>) i Sosui (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/>) també prediuen la presència d'un

únic domini transmembrana i una cua citoplasmàtica des de l'aminoàcid 1 fins al 239. En altre programa anomenat Signal IP, es prediu un pèptid senyal d'inserció en reticle endoplasmàtic, en l'extrem N-terminal amb un possible lloc de tall entre els aminoàcids 24 i 25.

Tenint en compte aquestes prediccions dels programes d'anàlisi de seqüència de proteïnes sobre la proteïna Rot1, ens proposàrem averiguar en primer lloc la localització subcel·lular de Rot1. Per tal de detectar fàcilment la proteïna, vàrem fusionar l'epítot HA per triplicat entre l'aminoàcid 181 i 182 de la seqüència de *ROT1* (Figura 4.1A). Vàrem etiquetar la proteïna internament per no alterar ni la seqüència de l'extrem N-terminal (on podria haver un pèptid senyal) ni la seqüència de l'extrem C-terminal (on podria haver un domini transmembrana). Aquesta etiqueta o marcatge es va col·locar en una regió de la proteïna que no presenta estructura secundària segons la informació dels programes de predicció d'estructura de proteïnes. La funcionalitat de la proteïna marcada es va comprovar utilitzant la soca mutant condicional que conté el gen *ROT1* sota el promotor *tetO₇* reprimible per doxiciclina. Tal i com s'esperava, les cèl·lules de la soca *tetO₇:ROT1* són inviables en YPD amb 5 µg/mL de doxiciclina (Figura 4.1B). En canvi les cèl·lules transformades amb un plasmidi que conté la proteïna Rot1 amb el marcatge intern amb HA són viables igual que la soca transformada amb un plasmidi centromèric que conté *ROT1*. Aquest resultat indica que la proteïna Rot1 marcada amb HA és funcional.

Una primera aproximació per determinar la localització de la proteïna Rot1-HA va ser estudiar si es trobava associada a la membrana mitjançant fraccionament subcel·lular. Les cèl·lules lisades es varen sotmetre a diversos tractaments (alta concentració de sal, medi alcalí, tractament amb urea o amb detergent i sal) i seguidament es varen sotmetre a ultracentrifugació per separar la fracció insoluble (P100) de la fracció soluble (S100) (Figura 4.2A). La proteïna P_{gk1} (fosfoglicerat quinasa)

utilitzada com a control de proteïna citosòlica es detecta sempre en la fracció soluble. La proteïna Kar2, utilitzada com a control de proteïna luminal del

A

MWSKKFTLKKLILGGYLFAQKVYCEDESNSIYGTWSSKSNQVFTGPGFY
 DPVDELLIEPSLPGLSYSFTEDGWYEEATYQVSGNPRNPTCPMASLIYQHG
 TYNISENGTLVLNPIEVDGRQLFSDPCNDDGVSTYSRYNQTTETFKEYAVGID
 PYHGIYTLQLYQYDGTMPQPLYLAYRPPMYPYDVPDYAGSYPDYDVPDYAY
PYDVPDYAMLPTETLNPTSSATSTDDPSSNKKRSLRSLVRRSLENRHKTNAI
 KRQ**NTSFLTSNAIWYISAGMLGVGSLLFLAF**

B

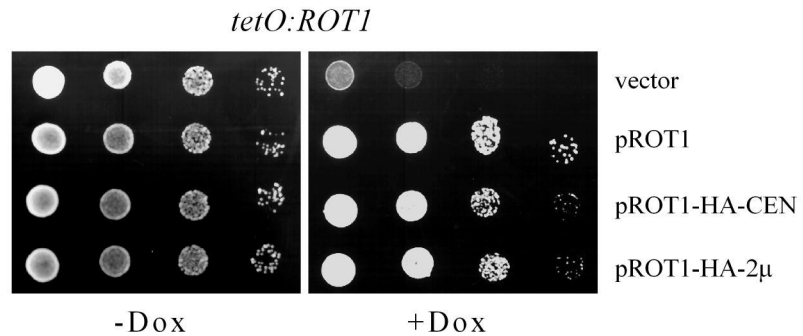
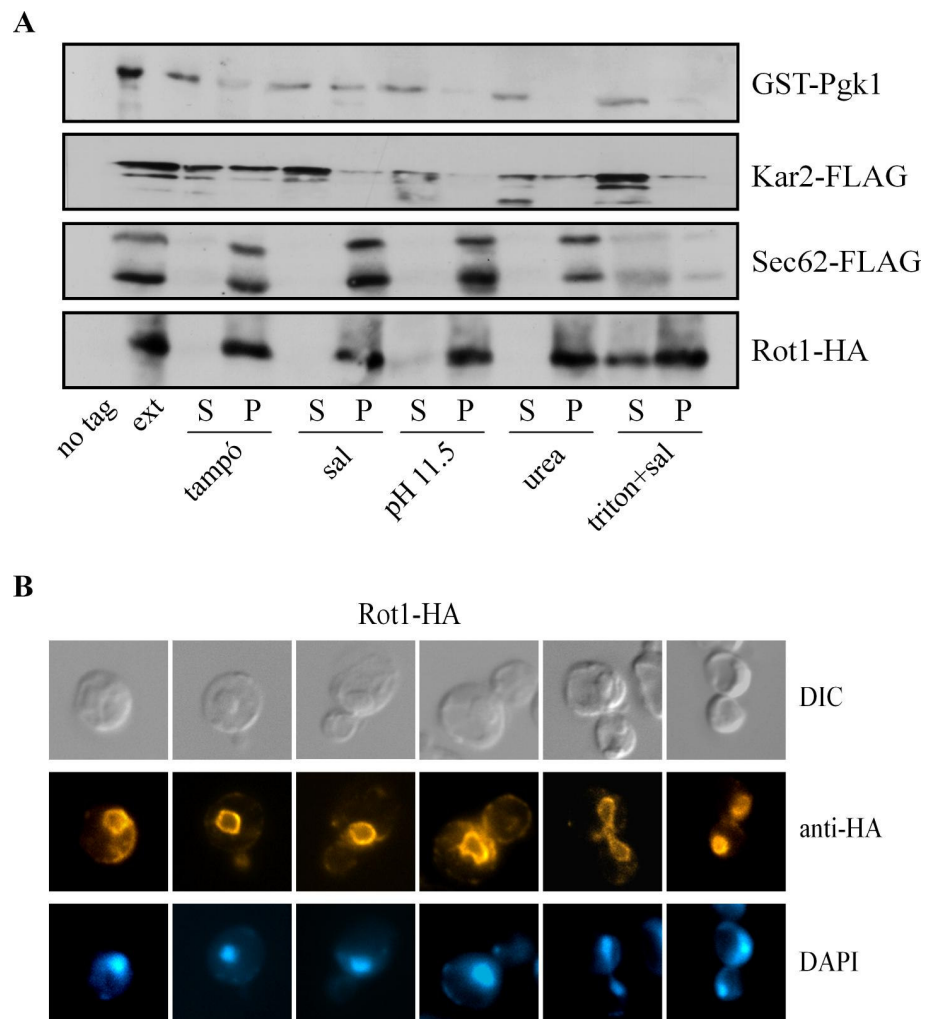


Figura 4.1. Seqüència d'aminoàcids i funcionalitat de Rot1-HA. (A) S'indica en blau la putativa seqüència senyal de l'extrem N-terminal i en roig el putatiu domini transmembrana de l'extrem C-terminal. S'indiquen subratllades les tres còpies de la seqüència de l'epítip HA que es varen introduir entre l'aminoàcid 181 i 182 de *ROT1*. (B) Dilucions seriades de cultius en creixement exponencial de la soca mutant *tetO₇:ROT1* (JCY216) transformada amb un vector control o amb un plasmidi centromèric que expressa el gen *ROT1* o amb un plasmidi centromèric o multicòpia que expressa el gen *ROT1-HA* es varen sembrar en plaques de YPD en presència o absència de 5 μg/mL de doxiciclina (Dox) i es varen incubar a 28°C durant 3 dies.

reticle endoplasmàtic, es solubilitza després dels tractaments amb carbonat sòdic a pH 11.5 o alta concentració de sal (condició que allibera tant a proteïnes del lumen del reticle com a proteïnes perifèriques de membrana). En canvi, Rot1, igual que Sec62 (proteïna utilitzada com a control de proteïna integral de membrana), apareix en la fracció insoluble després de realitzar aquests tractaments excepte quan es tracta amb detergent i sal (condició que permet la solubilització de proteïnes integrals de membrana) que s'extrau parcialment a la fracció soluble. Per tant, aquest resultat indica que Rot1 és una proteïna integral de membrana.

A continuació, per averiguar en quina o quines membranes es localitza la proteïna Rot1-HA vàrem estudiar per immunofluorescència les cèl·lules que contenen la proteïna Rot1-HA en un plasmidi multicòpia. Segons s'observa en la figura 4.2B es detecta un senyal fluorescent fort per la perifèria del nucli en totes les etapes del cicle. Aquest resultat indica que Rot1 es localitza majoritàriament en la xarxa de membranes del reticle endoplasmàtic/embolcall nuclear. Cal dir que, quan utilitzem un plasmidi centromèric que conté la proteïna Rot1-HA, el resultat és el mateix però en aquest cas el senyal fluorescent és més feble (resultats no mostrats). Amb aquests resultats podem concloure que Rot1 és una proteïna integral de membrana que es localitza principalment en la membrana del reticle endoplasmàtic/embolcall nuclear.

Figura 4.2. Localització subcel·lular de Rot1-HA. (A) Extractes totals de proteïnes (ext) de cultius en creixement exponencial de la soca *KAR2-FLAG* (CYC209), la soca *SEC62-FLAG* (CYC211) i la soca silvestre (CML240) transformades amb el plasmidi pGST-PGK1 o pROT1-HA-CEN es varen tractar amb tampó sorbitol o amb tampó contenint 0.5 M NaCl, 0.1 M Na₂CO₃ (pH 11.5), 2.5 M Urea, o 1% Triton-X100 més 0.5 M NaCl. Per centrifugació a alta velocitat es varen dividir en les fraccions de membranes o *pellet* (P) i soluble (S), després es varen analitzar per *western*. S'inclou un extracte obtingut de la soca silvestre



(CML240) com a control negatiu (no tag). (B) Cèl·lules en creixement exponencial de la soca silvestre (CML240) transformada amb un plasmidi multicòpia que expressa la proteïna Rot1 etiquetada amb HA internament es varen assajar per immunofluorescència indirecta com es descriu en materials i mètodes. Es mostren imatges de DIC (*differential interference-contrast*), del senyal de la fluorescència indirecta de Rot1-HA (anti HA) i de la tinció del DNA amb DAPI. En el cas de la soca silvestre sense etiquetar no es va detectar senyal fluorescent (resultat no mostrat).

TOPOLOGIA DE LA PROTEÏNA **Rot1**

La correcta orientació d'una proteïna de membrana és crucial per a portar a terme la seua funció biològica de forma adequada. Hi ha bases de dades disponibles en la xarxa on es prediu l'orientació final de la proteïna. Paradoxalment, no hi ha consens en la predicció de la topologia de Rot1 en aquests algorismes. El programa TMHMM 2.0 (www.cds.dtu.dk/services/TMHMM) prediu per a Rot1 una topologia amb l'extrem N-terminal orientat cap al citosol, mentre que el programa HMM TOP 2.0 (www.enzim.hu/hmmtop/htm/submit.html) proposa l'orientació contrària per a Rot1, és a dir, amb l'extrem N-terminal orientat cap al lumen del reticle endoplasmàtic. Amb l'objectiu d'averiguar quina de les dues possibles orientacions presentava la proteïna en les membranes del reticle, vàrem utilitzar una estratègia basada en la resistència de proteïnes presents en la fracció microsomal a ser digerides per una proteasa, en concret per la proteïnasa K (PK). En aquests assajos, si la proteïna es troba amagada dins del microsoma serà resistent a la digestió per la proteasa i podrem detectar la proteïna per *western*. En canvi, si la proteïna s'orienta cap al citosol, serà degradada. A l'afegir detergent es disgregaran les membranes i totes les proteïnes quedaran accessibles a la proteasa. Cèl.lules que contenen la proteïna Rot1 etiquetada internament amb HA es varen lisar en condicions suaus per a formar microsomes i es varen digerir amb proteïnasa K en presència o absència de detergent (Triton X-100). Aquest mateix tractament es va realitzar en cèl.lules que expressaven la proteïna Kar2-FLAG (proteïna luminal del reticle etiquetada en FLAG en l'extrem C-terminal) i en cèl.lules que expressaven la proteïna Sec62-FLAG (proteïna integral de membrana amb l'etiqueta orientada al citosol). Com s'observa en la figura 4.3, la proteïna Sec62-FLAG és digerida totalment per la proteïnasa K.

Per contra i de manera consistent amb l'orientació luminal, la proteïna Kar2-FLAG revela una protecció total front a la digestió per la proteïnasa K, ja que solament és digerida quan els microsomes es disgreguen per la presència de detergent. El mateix resultat s'obté per a Rot1-HA, ja que és clarament resistent a la digestió per la proteasa excepte quan afegim detergent. Aquest resultat indica que la proteïna Rot1 està orientada cap al lumen del reticle endoplasmàtic.

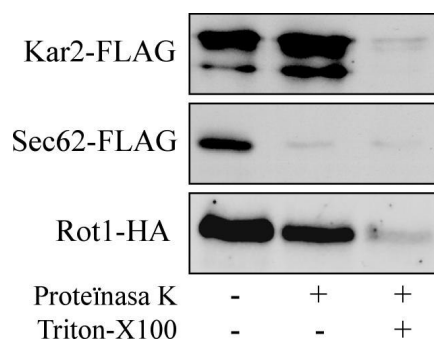


Figura 4.3. Sensibilitat a proteasa de Rot1-HA. A partir de cèl·lules que expressaven les proteïnes Kar2-FLAG, Sec62-FLAG o Rot1-HA es varen preparar extractes en condicions suaus que permeten mantenir la integritat dels microsomes i es varen incubar amb presència o absència de 0.1 mg/mL de proteïnasa K o amb 1% Triton-X100 en gel durant 20 minuts. Les proteïnes es varen precipitar i després es varen analitzar per *western* amb els anticossos corresponents.

ANÀLISIS DE LES MODIFICACIONS POSTTRADUCCIONALS DE LA PROTEÏNA Rot1

És Rot1 una proteïna ancorada a la membrana per un grup GPI?

En base a l'anàlisi de seqüència de la proteïna, s'ha suggerit que Rot1 podria estar ancorada a la membrana per un grup GPI (Caro et al., 1997). Una manera comuna de diagnosticar la presència d'un grup GPI en una proteïna és incubar la fracció de membranes amb un enzim bacterià anomenat fosfolipasa C específica de fosfatidil inositol (PI-PLC). Aquest enzim allibera els àcids grassos ancorats a la membrana lipídica dissociant la unió de la proteïna a la membrana, de tal forma que la proteïna se solubilitza. Per a testar si la proteïna Rot1-HA presentava un grup GPI vàrem realitzar un tractament amb dues PI-PLC diferents, una de *B. cereus* i altra de *B. thurigiensis*, ja que s'ha descrit que aquests enzims poden presentar especificitat de substrat i no totes les proteïnes amb GPI són igualment reconegudes per un enzim (Vossen et al., 1997). Extractes totals de cèl·lules que contenen Rot1-HA o la proteïna Yap3 fusionada a GST (una proteïna modificada per GPI) es varen sotmetre a ultracentrifugació per tal de separar la fase aquosa de la fase membranosa (S100 i P100). Seguidament, la fracció de membranes es va tractar amb PI-PLC i les mostres es varen tornar a sotmetre a centrifugació per separar de nou les fraccions S i P. La proteïna Yap3 és parcialment alliberada a la fracció soluble després del tractament amb PI-PLC, en canvi la proteïna Rot1-HA tant abans com després del tractament amb PI-PLC es detecta en la fracció de membranes (Figura 4.4). El fet que l'enzim PI-PLC siga incapaç de solubilitzar a Rot1, indica que Rot1 no és una proteïna modificada per un grup GPI.

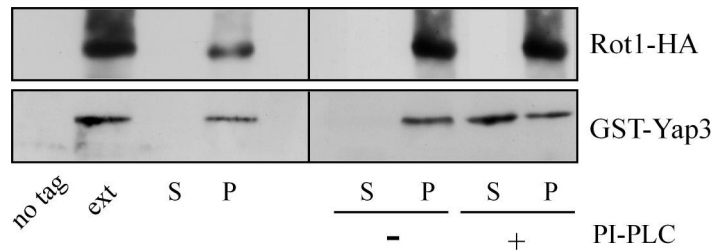


Figura 4.4. Anàlisi del possible ancoratge a la membrana de Rot1 per un grup GPI. Extractes de cèl·lules de la soca silvestre (CML240) transformada amb un plasmidi que expressa la proteïna Rot1-HA o la proteïna GST-Yap3 (proteïna utilitzada com a control positiu) es varen sotmetre a ultracentrifugació per a fraccionar la fase aquosa (S) i la fase de membranes (P) (part esquerra del panel). Les fraccions del membranes es dividiren en dues alíquotes i es varen incubar en presència o absència de 0.5 unitats de l'enzim PI-PLC de *B. cereus* a 30°C durant 1 hora. Després per ultracentrifugació les mostres es tornaren a separar en fase aquosa i fase de membranes i es varen analitzar per *western*. El mateix resultat es va obtenir utilitzant l'enzim PI-PLC de *B. thuringiensis*. S'inclou un extracte obtingut de la soca silvestre (CML240) com a control negatiu (no tag).

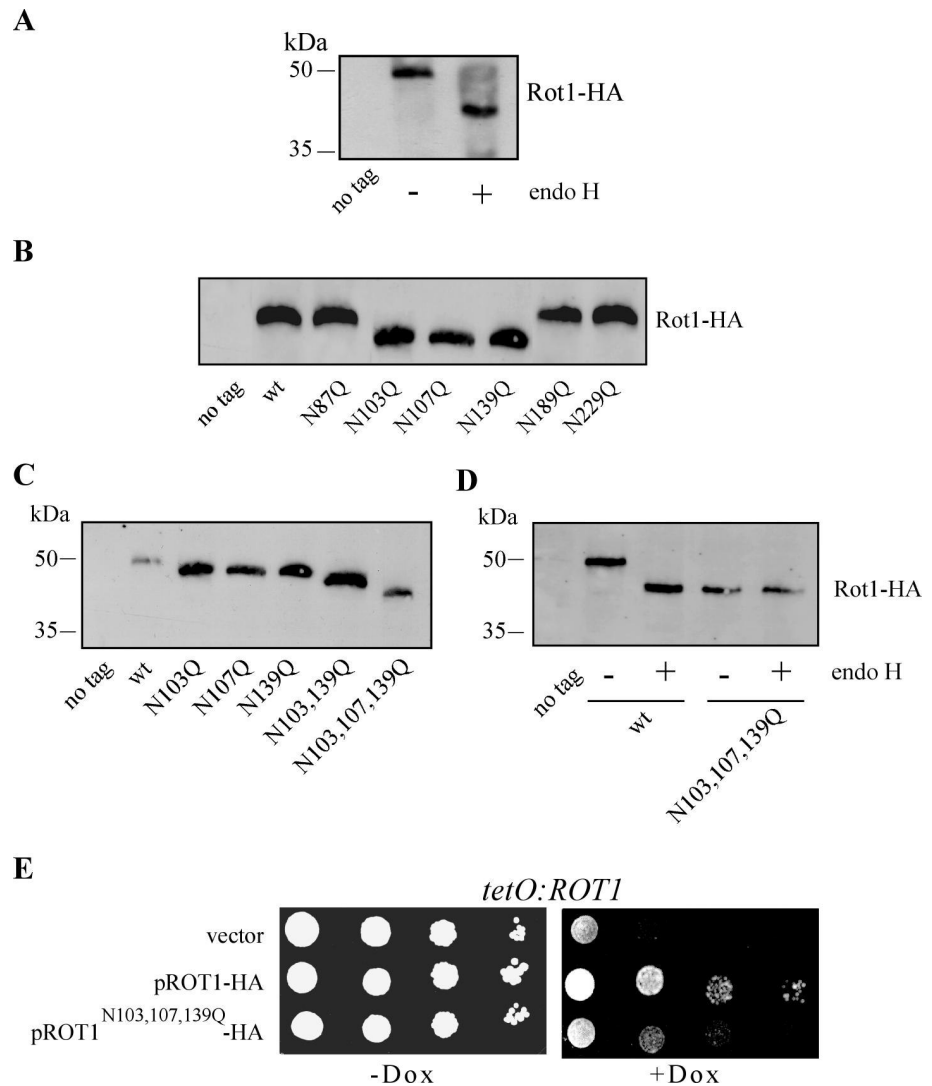
Determinació de l'estat de glicosilació de Rot1

El tamany predit segons les bases de dades per a la proteïna Rot1-HA és de 32 KDa (29 KDa més 3 KDa de la triple etiqueta HA). En canvi, en els experiments on es detecta a Rot1-HA, la proteïna presenta sorprenentment una mobilitat electroforètica corresponent a una proteïna d'aproximadament 50 KDa. Aquesta migració anòmala de Rot1-HA ens feia considerar l'existència d'altres modificacions posttraduccionalment en la proteïna. Atès que Rot1 es localitza cap al lumen del reticle endoplasmàtic,

era fàcil pensar que la proteïna podria estar modificada per glicosilació, ja que aquest tipus de modificació només té lloc en els dominis exposats cap a la cara luminal del reticle perquè és on es troben les activitats enzimàtiques encarregades d'incorporar oligosacàrids en les seqüències diana.

Amb l'objectiu de comprovar si la proteïna Rot1 està modificada per *N*-glicosilació, extractes de cèl.lules que contenen la proteïna Rot1-HA es varen sotmetre a digestió amb endoglicosidasa H (Endo H), enzim que catalitza l'eliminació dels sucres units a les Asn. La figura 4.5A mostra que Rot1-HA presenta major mobilitat electroforètica després del tractament amb Endo H. El canvi de mobilitat observat confirma una modificació per *N*-glicosilació de la proteïna Rot1. S'ha descrit que l'addició de la cadena oligosacàridica a un únic lloc de glicosilació produeix un augment en la massa molecular de la proteïna equivalent a 2.5 KDa. En el cas de Rot1, el canvi de mobilitat comporta una reducció de la massa molecular d'uns 8 KDa, apuntant aquest fet que la proteïna podria contenir possiblement tres llocs de glicosilació.

Figura 4.5. Anàlisi d'*N*-glicosilació de Rot1. (A) Anàlisi per *western* dels extractes de cèl.lules en creixement exponencial de la soca silvestre (CML240) transformada amb un plasmidi centromèric que conté el gen *ROT1-HA* incubades en absència o presència de 50 mU d'Endo H. (B i C) Anàlisi per *western* de la proteïna Rot1 en extractes de cèl.lules en creixement exponencial de la soca silvestre (CML240) transformada amb un plasmidi centromèric que conté el gen *ROT1-HA* o diverses versions de la proteïna Rot1-HA que tenen un o més residus N substituïts per Q segons s'indica. S'inclou un extracte obtingut de la soca silvestre (CML240) com a control negatiu (no tag). (D) Anàlisi per *western* dels extractes de cèl.lules en creixement exponencial de la soca silvestre (CML240) transformada amb un plasmidi centromèric que conté el gen *ROT1-HA* o *ROT1^{N103, 107, 139Q}-HA* incubats en absència o presència de 50 mU d'Endo H. (E) Dilucions seriades de cultius en



creixement exponencial de la soca mutant *tetO₇::ROT1* (JCY216) transformada amb un vector control o amb un plasmidi centromèric que expressa el gen *ROT1-HA* o *ROT1^{N103, 107, 139Q}-HA* es varen sembrar en plaques de YPD en presència o absència de 5 µg/mL de doxiciclina (Dox) i es varen incubar a 28°C durant 3 dies.

Les seqüències consens d'*N*-glicosilació estan constituïdes per tres aminoàcids: Asn-X-Ser/Thr, podent ser X qualsevol aminoàcid excepte Pro. Segons la base de dades corresponent al “Center for Biological Sequence Analysis (CBS)” <http://www.cbs.dtu.dk/services/>, la proteïna Rot1 conté sis possibles llocs potencials de *N*-glicosilació que corresponen a les Asn 87, 103, 107, 139, 189 i 229. Aquest programa assigna un baix potencial d'*N*-glicosilació a l'Asn 229 per estar molt prop de la seqüència hidrofòbica i també a les posicions 87 i 189 per estar pròximes a una prolina. Per tal d'averiguar les posicions exactes de les Asn responsables de l'*N*-glicosilació de la proteïna vàrem realitzar mutagènesi dirigida de manera independent de cadascuna de les 6 Asn susceptibles de glicosilació canviant l'Asn per Gln (aminoàcid no modificable). Vàrem investigar l'efecte de cadascuna d'aquestes substitucions observant la mobilitat electroforètica per *western* de les proteïnes mutades. Conforme s'observa en la figura 4.5B, les proteïnes mutades en les posicions 87, 189 i 229 migren igual que la proteïna silvestre, indicant aquest resultat que aquestes tres posicions no es glicosilen. Per contra en les proteïnes mutades en les Asn 103, 107 o 139 s'observa un increment en la mobilitat d'aproximadament 2.5 KDa que és el pes que cal esperar per a una modificació d'*N*-glicosilació. Aquest resultat indica que aquestes tres Asn són responsables de la modificació per *N*-glicosilació de la proteïna Rot1. Seguidament, vàrem fer construccions que expressaren la proteïna mutada en dues o en tres de les Asn modificades. El resultat obtés demostra clarament que les tres posicions es modifiquen simultàniament, ja que les mutacions Asn-Gln tenen efecte additiu sobre la migració de la proteïna (Figura 4.5C). A més a més, el canvi de mobilitat electroforètica en la proteïna amb la versió triple mutant Rot1^{N103,107,139Q} és equivalent al canvi de mobilitat que es produeix en la proteïna Rot1 silvestre després de la digestió amb Endo H (Figura 4.5D). Aquest resultat indica que no hi ha més llocs Asn que es glicosilen. En resum, podem concloure que Rot1 està modificada per *N*-glicosilació en les posicions Asn 103, 107 i 139.

Per a determinar la importància de la modificació per glicosilació de Rot1 en la funció de la proteïna, vàrem analitzar la viabilitat de la soca *tetO₇:ROT1* (en presència de doxiciclina) transformada amb el plasmidi que expressava la proteïna amb la versió triple mutant Rot1^{N103,107,139Q}. En les cèl·lules que contenen la proteïna Rot1^{N103,107,139Q} creixen molt més lentament que les cèl·lules que expressen la proteïna Rot1 silvestre, encara que així i tot són viables (Figura 4.5E). Aquest resultat indica que l'*N*-glicosilació de Rot1 no és essencial per a la viabilitat cel·lular però és requerida per a la total funcionalitat de la proteïna.

Cal ressaltar que la forma no glicosilada de Rot1 descrita no presenta encara la migració electroforètica corresponent al pes molecular teòric de la proteïna, cosa que suggereix que la proteïna sofreix altres modificacions. Així, vàrem analitzar si Rot1 podia sofrir altre tipus de glicosilació de proteïnes com és la *O*-glicosilació. El programa de predicció CBS detecta 7 llocs potencials de *O*-glicosilació per a la proteïna Rot1 encara que amb una probabilitat molt baixa. En llevat, el primer pas en la *O*-glicosilació comença en el reticle endoplasmàtic amb la transferència d'una mannosina al grup hidroxil d'una serina o treonina (Tanner and Lehle, 1987) i segueix en el Golgi. La *O*-glicosilació és catalitzada per proteïnes anomenades mannosiltransferases (proteïnes Pmt) (Strahl-Bolsinger et al., 1999). En *S. cerevisiae* existeixen diversos gens *PMT* (Ecker et al., 2003; Immervoll et al., 1995; Lussier et al., 1995; Mrsa et al., 1997; Strahl-Bolsinger et al., 1993). Per investigar si Rot1 és una proteïna *O*-glicosilada vàrem analitzar si es produïa un canvi en la mobilitat electroforètica de la proteïna en cèl·lules mutants en diferents *PMTs*. Com revela la figura 4.6, no s'observen diferències en la mobilitat de la proteïna en cap mutant *pmt*. Encara que no podem descartar la possible redundància funcional entre diferents mutants *pmt*, aquest resultat suggereix que Rot1 no és una proteïna *O*-glicosilada.

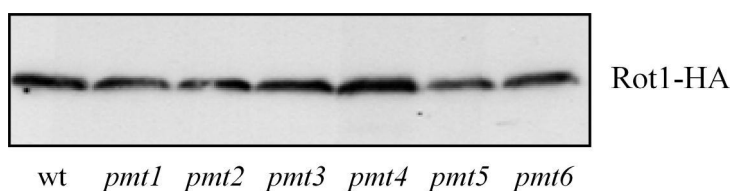


Figura 4.6. Anàlisi de la *O*-glicosilació de Rot1. Anàlisi per *western* de la proteïna Rot1-HA en extractes de cèl.lules en creixement exponencial de les soques silvestre (BY4741) o mutants *pmt1*, *pmt2*, *pmt3*, *pmt4*, *pmt5*, *pmt6* transformades amb un plasmidi centromèric que conté el gen *ROT1-HA*.

ANÀLISI FUNCIONAL DE L'EXTREM CARBOXILO TERMINAL DE Rot1

D'acord amb els resultats anteriors, Rot1 està localitzada en la membrana del reticle endoplasmàtic/embolcall nuclear amb una orientació luminal. Les bases de dades d'anàlisi de seqüència prediuen per a Rot1 un putatiu domini transmembrana en l'extrem C-terminal de la proteïna. Per investigar el paper d'aquest possible domini transmembrana de la proteïna en la localització i funció de Rot1, vàrem construir una proteïna truncada delecionant des de l'aminoàcid 229 al 256 (Rot1-HA^{Δ229-256}). Vàrem fer experiments de fraccionament subcel.lular i d'immunofluorescència amb Rot1-HA i Rot1-HA^{Δ229-256}. La proteïna truncada encara es troba associada a la fracció no soluble; no obstant això, tractaments suaus com la incubació amb carbonat sòdic a pH 11.5 o urea (condicions que alliberen proteïnes del lumen del reticle i proteïnes perifèriques de membrana) que no poden alliberar la proteïna Rot1 completa de la fracció membranosa, són capaços d'extraure a Rot1-HA^{Δ229-256} de la fracció de membranes (Figura 4.7). Per tant, aquest domini transmembrana de l'extrem C-terminal és qui determina que Rot1 siga una proteïna integral de membrana.

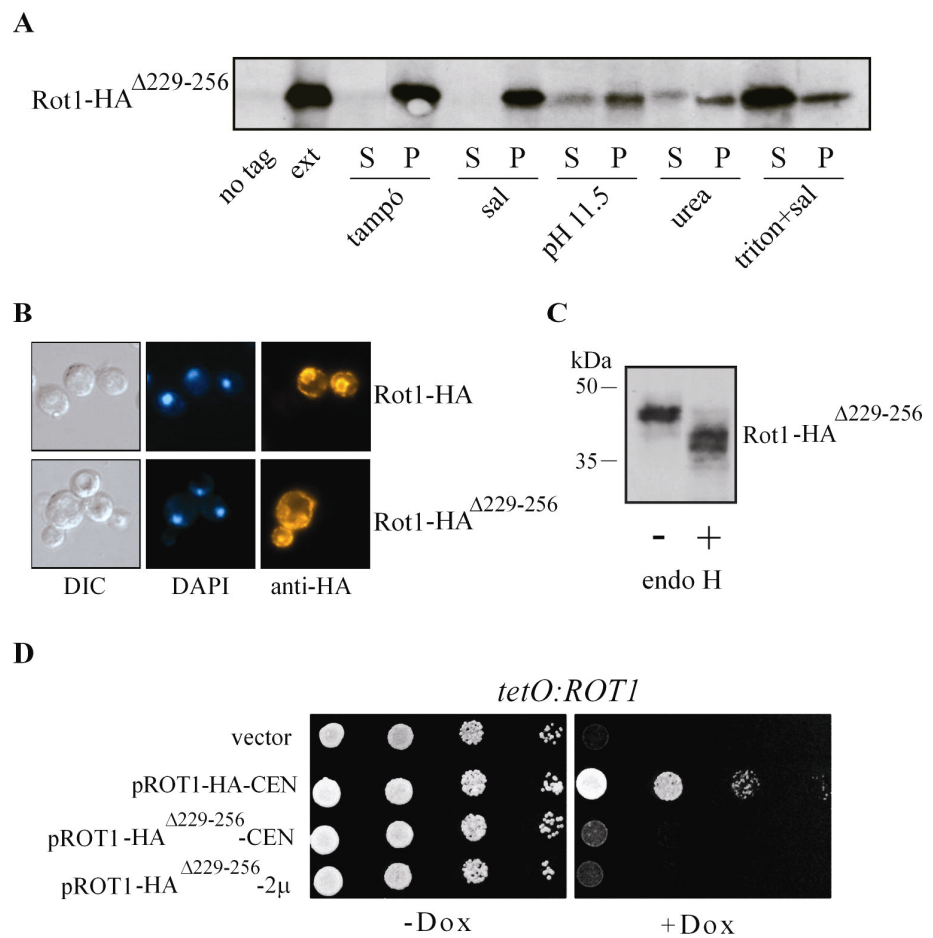


Figura 4.7. Localització i funcionalitat de la proteïna Rot1 truncada per l'extrem C-terminal. (A) Extractes (ext) de cultius en creixement exponencial de la soca silvestre (CML240) transformada amb un plasmidi centromèric que expressa la forma truncada per l'extrem C-terminal de Rot1-HA (Rot1-HA^{Δ229-256}) es va tractar amb tampó o amb tampó contenint 0.5 M NaCl, 0.1 M Na₂CO₃ (pH 11.5), 2.5 M urea, o 1% Triton-X100 més 0.5 M NaCl. Per centrifugació a alta velocitat es varen

dividir en les fraccions de membranes o *pellet* (P) i sobrenadant (S). La proteïna Rot1-HA^{Δ229-256} es va analitzar per *western*. S'inclou un extracte obtingut de la soca silvestre (CML240) com a control negatiu (no tag). (B) Immunofluorescència indirecta de cèl·lules en creixement exponencial de la soca silvestre (CML240) transformada amb un plasmidi multicòpia que expressa la proteïna Rot1-HA i Rot1-HA^{Δ229-256}. Es mostren imatges de DIC, del senyal de la fluorescència indirecta de Rot1-HA i Rot1-HA^{Δ229-256} (anti HA) i de la tinció del DNA amb DAPI. (C) Anàlisi per *western* dels extractes de cèl·lules en creixement exponencial de la soca silvestre (CML240) transformada amb un plasmidi centromèric que expressa la proteïna Rot1-HA^{Δ229-256} incubats en presència o absència de 50 mU d'Endo H. (D) Dilucions seriades de cultius en creixement exponencial de la soca mutant *tetO₇:ROT1* (JCY216) transformada amb un vector control, amb un plasmidi centromèric que conté el gen *ROT1-HA* o amb un plasmidi centromèric o multicòpia que conté *ROT1-HA*^{Δ229-256} es varen sembrar en plaques de YPD en presència o absència de 5 μg/mL de doxiciclina (Dox) i es varen incubar a 28°C durant 3 dies.

L'anàlisi per immunofluorescència també confirma un canvi en la localització de la proteïna: en lloc de detectar-se el senyal potent envoltant al nucli observat en la proteïna silvestre, en el cas de Rot1-HA^{Δ229-256} es detecta un patró més difús de les membranes internes (Figura 4.7B). És interessant ressaltar que la proteïna Rot1-HA^{Δ229-256} necessàriament s'ha translocat al reticle, ja que sí que és glicosilada com es dedueix pel canvi electroforètic observat després del tractament amb Endo H (Figura 4.7C).

Finalment es va estudiar l'efecte de la deleció del domini transmembrana en la funció de Rot1. Com es veu en la figura 4.7D, Rot1-HA^{Δ229-256} és incapaç de mantenir el creixement en les cèl·lules de la soca *tetO₇:ROT1* en presència de doxiciclina. Concloent, tots aquests resultats indiquen que el domini C-terminal no és necessari per a la translocació al reticle endoplasmàtic o l'*N*-glicosilació de la proteïna; no obstant, és

necessari per al correcte ancoratge de la proteïna en la membrana i per a la funcionalitat de Rot1.

Una hipòtesi atractiva és que la pèrdua de funcionalitat de la proteïna es deguera a l'incorrecte ancoratge de la proteïna a la membrana. Amb aquesta finalitat, a la proteïna truncada Rot1-HA^{Δ229-256} li vàrem fusionar una cua de polileucines que li conferira la capacitat de poder unir-se de nou a la membrana. L'anàlisi per *western* de la proteïna Rot1-HA^{Δ229-256} amb 18 polileucines fusionades demostra que recupera el tamany de la proteïna silvestre (Figura 4.8A). Vàrem analitzar la localització d'aquesta proteïna quimera per fraccionament subcel·lular. La proteïna Rot1-HA^{Δ229-256}-18L només s'extrau de la membrana després de realitzar el tractament amb detergent i sal, que és l'única condició on s'alliberen les proteïnes integrals de membrana (Figura 4.8B). Aquest resultat indica que la proteïna està de nou correctament ancorada a la membrana. A més a més, a diferència del que s'observa en la proteïna Rot1-HA^{Δ229-256} i de manera similar al que s'observa en la proteïna Rot1-HA silvestre, la proteïna es localitza principalment en la xarxa de membranes del reticle endoplasmàtic/embolcall nuclear (Figura 4.8C). No obstant, encara que la proteïna Rot1-HA^{Δ229-256}-18L es localitza correctament, en estudiar la funcionalitat d'aquesta proteïna quimera vàrem observar que no és capaç de recuperar la viabilitat de les cèl·lules mutants *rot1* (Figura 4.8D). Aquest resultat indica que la correcta localització de Rot1 en la membrana no és suficient per a recuperar la funcionalitat. Per tant, el domini transmembrana de l'extrem C-terminal no sols serveix per ancorar la proteïna a la membrana sinó que té altre paper clau per a la funcionalitat de Rot1.

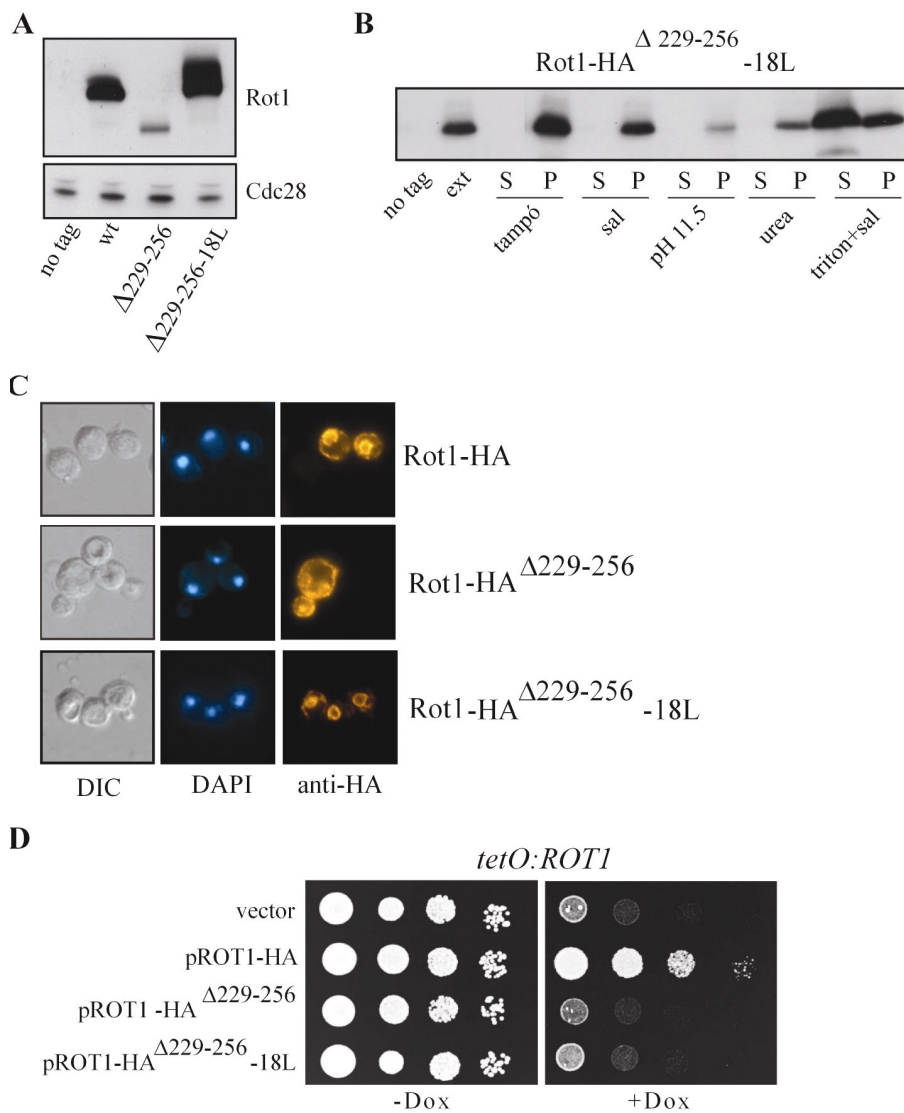


Figura 4.8. Localització i funcionalitat de Rot1-HA- $\Delta 229-256$ -18L. (A) Anàlisi per *western* dels extractes de la soca silvestre (CML240) transformada amb un plasmidi que expressa la proteïna Rot1-HA, Rot1-HA- $\Delta 229-256$ o Rot1-HA $\Delta 229-256$ -18L. S'inclou un extracte obtingut de la soca silvestre (CML240) com a control negatiu (no tag). El nivell de proteïna Cdc28 es mostra com a control de càrrega. (B) Extractes (ext) de cultius en creixement exponencial de la soca silvestre (CML240) transformada amb

un plasmidi centromèric que expressa Rot1-HA^{Δ229-256}-18L es varen tractar amb tampó o amb tampó contenint 0.5 M NaCl, 0.1 M Na₂CO₃ (pH 11.5), 2.5 M Urea, o 1% Triton-X100 més 0.5 M NaCl. Per centrifugació a alta velocitat es dividiren en les fraccions de membranes o *pellet* (P) i soluble (S). La proteïna Rot1-HA^{Δ229-256}-18L es va analitzar per *western*. S'inclou un extracte obtingut de la soca silvestre (CML240) com a control negatiu (no tag). (C) Immunofluorescència indirecta de cèl.lules en creixement exponencial de la soca silvestre (CML240) transformada amb un plasmidi multicòpia que expressa la proteïna Rot1-HA, Rot1-HA^{Δ229-256} o Rot1-HA^{Δ229-256}-18L. Es mostren imatges de DIC, del senyal de la fluorescència indirecta de Rot1-HA (anti HA) i de la tinció del DNA amb DAPI. (D) Dilucions seriades de cultius en creixement exponencial de la soca mutant *tetO₇:ROT1* (JCY216) transformada amb un vector control, amb un plasmidi centromèric que expressa la proteïna Rot1-HA, Rot1-HA^{Δ229-256} o Rot1-HA^{Δ229-256}-18L es varen sembrar en plaques de YPD en presència o absència de 5 μg/mL de doxiciclina (Dox) i es varen incubar a 28°C durant 3 dies.

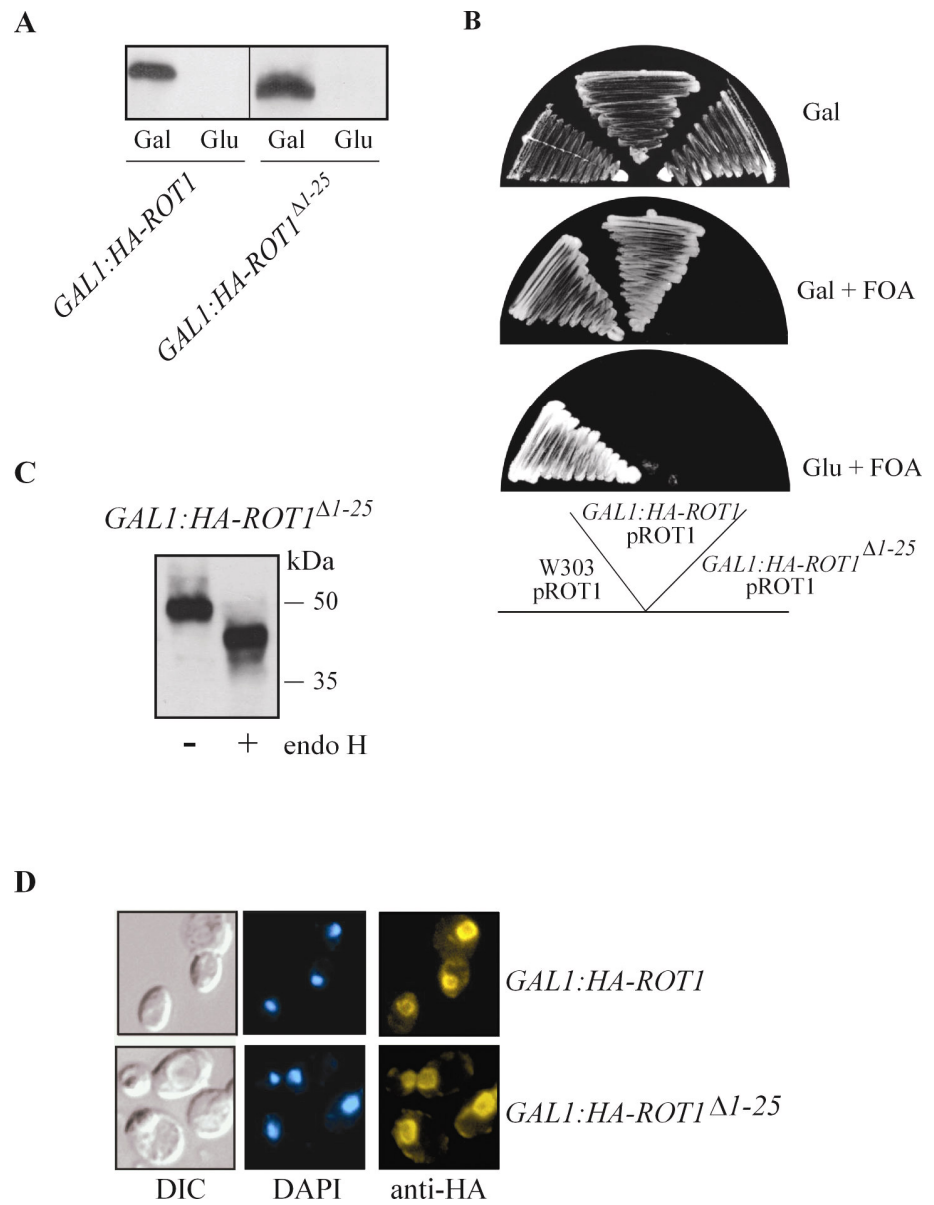
ANÀLISI FUNCIONAL DE L'EXTREM AMINO TERMINAL DE Rot1

Com ja hem anomenat abans, s'ha suggerit la possibilitat que Rot1 continga una seqüència senyal d'importació al reticle en l'extrem N-terminal. Per investigar el paper d'aquest domini N-terminal en la localització i funció de Rot1, vàrem integrar un casset *GALI:HA* al locus *ROT1* del genoma per a generar o bé la proteïna Rot1 completa o bé una proteïna truncada per l'extrem N-terminal fins l'aminoàcid 25 (Rot1^{Δ1-25}) etiquetades amb HA per l'extrem N-terminal. Al realitzar aquesta integració no vàrem obtenir cap transformant per al cas on volíem truncar la proteïna per l'extrem N-terminal. Per si la forma de la proteïna Rot1 truncada no fora funcional, vàrem decidir obtenir el gen truncat en cèl.lules que contenen un plasmidi centromèric *URA3* amb el gen *ROT1*. D'aquesta manera vàrem obtenir transformants. Tant la proteïna completa com la truncada per l'extrem N-terminal s'expressaven correctament sota el promotor *GALI* (Figura 4.9A). Vàrem comprovar que les cèl.lules que expressen la forma de

la proteïna truncada Rot1^{Δ1-25} no creixen quan el plasmidi que conté el gen *ROT1* s'elimina a l'afegir àcid 5-fluorooròtic (FOA) al medi de cultiu (Figura 4.9B). Aquest fet indica que el domini N-terminal de la proteïna Rot1 és essencial per a la viabilitat cel·lular.

El resultat anterior seria l'esperat si aquesta regió fos la seqüència senyal per a importar la proteïna al reticle. No obstant això, diferents resultats apunten contra aquesta possibilitat. El canvi en la mobilitat electroforètica observat després del tractament amb Endo H en la figura 4.9C revela que Rot1^{Δ1-25} és una proteïna N-glicosilada, la qual cosa implica que necessàriament s'ha translocat al reticle endoplasmàtic per a ser modificada. A més a més, l'anàlisi per immunofluorescència indica un patró de localització similar al de la proteïna completa, amb un senyal concentrat en la membrana del reticle endoplasmàtic/embolcall nuclear (Figura 4.9D). Per tant, podem concloure que la seqüència N-terminal de Rot1 no és necessària per a la correcta localització i glicosilació de la proteïna, encara que és requerida per a la funció essencial de Rot1 en la cèl·lula.

Figura 4.9. Localització i funcionalitat de la proteïna Rot1 truncada en l'extrem N-terminal. (A) Anàlisi per *western* de la proteïna Rot1 en extractes de cèl·lules en creixement exponencial de la soca *GALI:HA-ROT1* (JCY526) i de la soca *GALI:HA-ROT1^{Δ1-25}* (MCY62) crescudes en galactosa o després d'incubar-se durant tres hores en glucosa. (B) Cèl·lules silvestres (W303-1a), *GALI:HA-ROT1* (JCY526) i *GALI:HA-ROT1^{Δ1-25}* (MCY62) contenint un plasmidi pROT1-CEN URA3 es varen sembrar en plaques de YPGal, YPGal o YPD que contenien àcid 5-fluorooròtic (FOA). Es varen incubar a 28°C durant 3 dies. (C) Anàlisi per *western* dels extractes de cèl·lules en creixement exponencial de la soca *GALI:HA-ROT1^{Δ1-25}* (MCY62) incubats en presència o absència de 50 mU d'Endo H. (D) Immunofluorescència indirecta de cèl·lules en creixement exponencial de la soca *GALI:HA-ROT1* (JCY526) i de la soca *GALI:HA-ROT1^{Δ1-25}* (MCY62). Es mostren imatges de DIC, del senyal de la fluorescència indirecta de Rot1-HA (anti HA) i de la tinció del DNA amb DAPI.

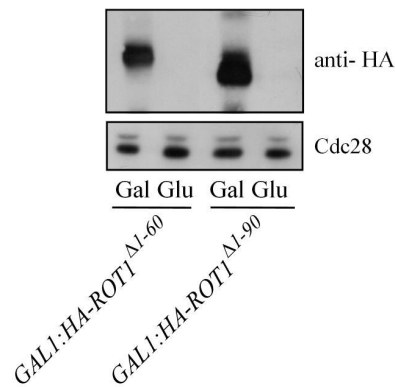


RASTREIG DE LA SEQÜÈNCIA SENYAL D'IMPORTACIÓ AL RETICLE ENDOPLASMÀTIC

Els resultats anteriors suggereixen que ni l'extrem N-terminal ni l'extrem C-terminal de Rot1 contenen la seqüència senyal per a direccionar la proteïna al reticle. Front aquests fets, ens vàrem plantejar quina és la regió de Rot1 que dirigeix la proteïna al reticle. Amb la finalitat de localitzar dita seqüència, vàrem construir versions truncades de la proteïna. En primer lloc, vàrem integrar un casset *GALI:HA* en el locus *ROT1* del genoma per a generar proteïnes truncades per l'extrem N-terminal eliminant des de l'aminoàcid 1 fins al 60 (Rot1^{Δ1-60}) o des de l'aminoàcid 1 al 90 (Rot1^{Δ1-90}). La construcció de les proteïnes truncades es va realitzar en cèl.lules que contien un plasmidi centromèric *URA3* amb el gen *ROT1*, ja que com hem vist el domini N-terminal de la proteïna Rot1 és essencial per a la viabilitat cel.lular. Vàrem comprovar que aquestes proteïnes truncades (Rot1^{Δ1-60} i Rot1^{Δ1-90}) s'expressen correctament quan les cèl.lules es creixen en condicions d'inducció de la proteïna (galactosa en el medi de cultiu) i que efectivament aquestes cèl.lules no creixen quan el plasmidi que contenia el gen *ROT1* s'eliminava a l'afegir àcid 5-fluorooròtic (FOA) (Figura 4.10A i B).

Per a comprovar si aquestes proteïnes mutants són translocades al reticle, vàrem analitzar si estaven glicosilades. El canvi en la mobilitat electroforètica que s'observa en la figura 4.10C després del tractament amb Endo H revela que les proteïnes truncades Rot1^{Δ1-60} i Rot1^{Δ1-90} es glicosilen, la qual cosa implica que necessàriament s'han translocat al reticle. A més a més, la immunofluorescència revela el senyal perinuclear característic del patró de localització de la proteïna Rot1 completa (Figura 4.10D). En conclusió, aquests resultats indiquen que la regió des de l'aminoàcid 1 fins al 90 de Rot1 no és necessària per a dirigir la proteïna al reticle endoplasmàtic.

A



B

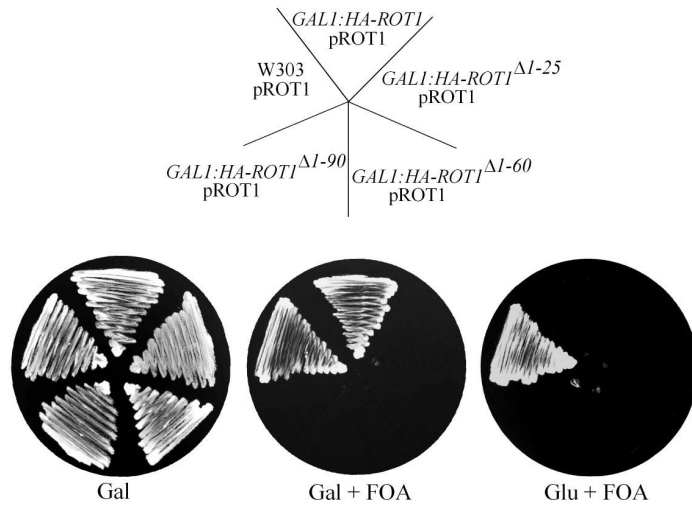


Figura 4.10. Localització i funcionalitat de proteïnes truncades de Rot1 per l'extrem N-terminal. (A) Anàlisi per *western* de la proteïna Rot1 en extractes de cèl.lules en creixement exponencial de les soques *GAL1:HA-ROT1*^{Δ1-60} (MCY174) i *GAL1:HA-ROT1*^{Δ1-90} (MCY232) crescudes en galactosa o després d'incubar-se durant tres hores en glucosa. El nivell de proteïna Cdc28 es mostra com a control de càrrega. (B) Cèl.lules silvestres (W303-1a), *GAL1:HA-ROT1* (JCY526), *GAL1:HA-ROT1*^{Δ1-25} (MCY62), *GAL1:HA-ROT1*^{Δ1-60} (MCY174) i *GAL1:HA-ROT1*^{Δ1-90} (MCY232) contenint un plasmidi pROT1-CEN URA3 es varen sembrar en plaques de YPGal, YPGal o YPD que contenien àcid 5-fluorooròtic (FOA) i es varen incubar a 28°C durant 3 dies.

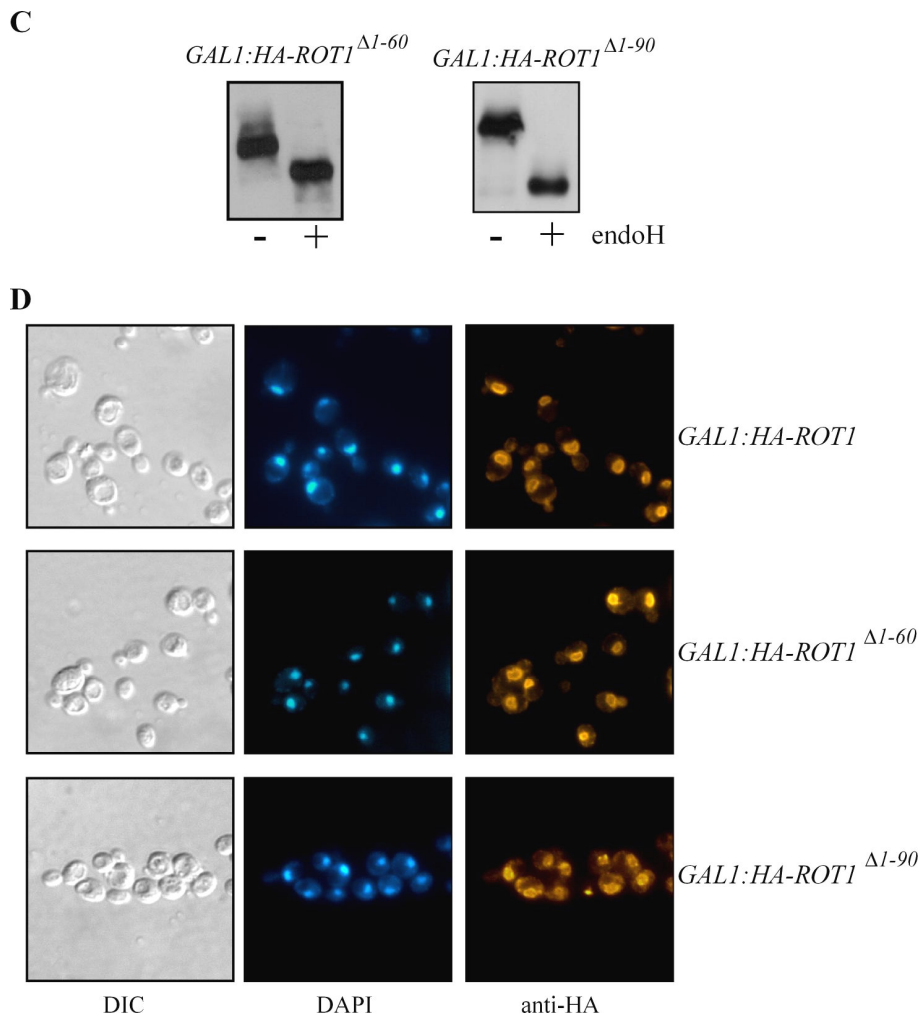


Figura 4.10. Continuació. (C) Anàlisi per *western* de Rot1 en els extractes de cèl.lules en creixement exponencial de la soca *GAL1:HA-ROT1*^{Δ1-60} (MCY174) i *GAL1:HA-ROT1*^{Δ1-90} (MCY232) incubats en presència o absència de 50 mU d'Endo H. (D) Immunofluorescència indirecta de cèl.lules en creixement exponencial de les soques *GAL1:HA-ROT1* (JCY526), *GAL1:HA-ROT1*^{Δ1-25} (MCY62), *GAL1:HA-ROT1*^{Δ1-60} (MCY174) i *GAL1:HA-ROT1*^{Δ1-90} (MCY232). Es mostren imatges de DIC, del senyal de la fluorescència indirecta de les diverses formes truncades de Rot1 (anti HA) i de la tinció del DNA amb DAPI.

Al mateix temps vàrem construir una proteïna truncada per l'extrem C-terminal, eliminant des de l'aminoàcid 200 fins al 256 (Rot1-HA^{Δ200-256}). L'assaig per immunofluorescència de la figura 4.11A mostra que la proteïna Rot1-HA^{Δ200-256}, tal i com era d'esperar, presenta defectes de localització com ja ocorria en la proteïna truncada Rot1-HA^{Δ229-256}. Ara bé, el canvi de mobilitat després del tractament amb Endo H (Figura 4.11B) demostra que la proteïna Rot1-HA^{Δ200-256} està glicosilada i per tant també s'ha translocat necessàriament al reticle. Així, la regió entre l'aminoàcid 200 al 256 de Rot1 no és necessària per a dirigir la proteïna al reticle endoplasmàtic.

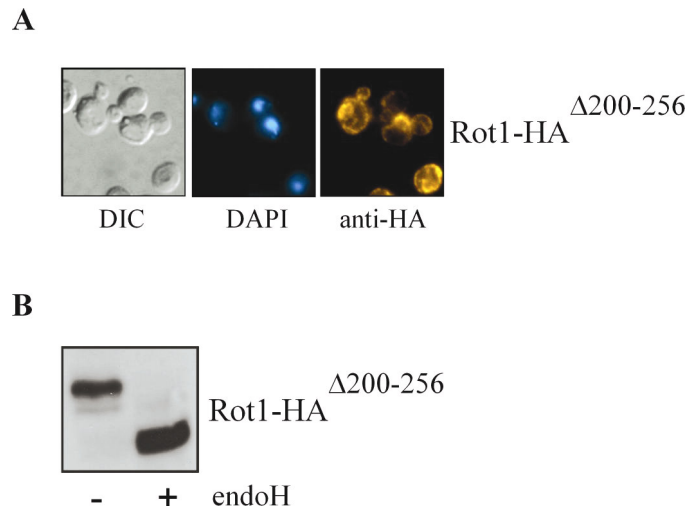


Figura 4.11. Localització i anàlisi de glicosilació de la proteïna Rot1-HA^{Δ200-256}. (A) Immunofluorescència indirecta de cèl.lules en creixement exponencial de la soca silvestre (CML240) transformada amb un plasmidi multicòpia que expressa la proteïna Rot1-HA^{Δ200-256}. Es mostren imatges de DIC, del senyal de la fluorescència indirecta de Rot1-HA^{Δ200-256} (anti HA) i de la tinció del DNA amb DAPI. (B) Anàlisi per *western* dels extractes de cèl.lules en creixement exponencial de la soca silvestre (CML240) transformada amb un plasmidi centromèric que expressa la proteïna Rot1-HA^{Δ200-256} incubats en presència o absència de 50 mU d'Endo H.

Finalment, en una aproximació per a delimitar la seqüència suficient per a dirigir a Rot1 al reticle, vàrem construir altres versions truncades de la proteïna on simultàniament deleccionàvem els dos extrems. En primer lloc, en la soca *GALI:HA-ROT1^{Δ1-25}* vàrem integrar un cassat de deleció al locus *ROT1* del genoma de forma que vàrem obtenir soques que expressen proteïnes truncades per l'extrem C-terminal des de l'aminoàcid 229 fins al 256 (Rot1^{Δ1-25, Δ229-256}) i des de l'aminoàcid 200 fins al 256 (Rot1^{Δ1-25, Δ200-256}). De la mateixa manera, partint de la soca *GALI:HA-ROT1^{Δ1-60}* vàrem obtenir les soques *GALI:HA-ROT1^{Δ1-60, Δ229-256}* i *GALI:HA-ROT1^{Δ1-60, Δ200-256}*; i a partir de la soca *GALI:HA-ROT1^{Δ1-90}* vàrem obtenir les soques *GALI:HA-ROT1^{Δ1-90, Δ229-256}* i *GALI:HA-ROT1^{Δ1-90, Δ200-256}*. En totes aquestes proteïnes doblement truncades vàrem estudiar si es translocaven al reticle analitzant si estaven modificades per *N*-glicosilació.

Anteriorment hem demostrat que ni l'extrem N-terminal ni l'extrem C-terminal són necessaris per a translocar la proteïna al reticle. No obstant, cabia la possibilitat que els dos extrems tingueren la capacitat per a dirigir independentment a Rot1 al reticle endoplasmàtic i que la presència de qualsevol d'ells fóra suficient per a la translocació de la proteïna. Tanmateix, el fet que la proteïna Rot1^{Δ1-25, Δ229-256} mostre un canvi de mobilitat després del tractament amb Endo H indica que la proteïna deleccionada en els dos extrems necessàriament ha entrat al reticle (Figura 4.12). Aquest resultat descarta definitivament que qualsevol d'aquestes dos extrems estan implicats en la translocació de Rot1 al reticle endoplasmàtic.

En el cas de les proteïnes truncades Rot1^{Δ1-25, Δ200-256}, Rot1^{Δ1-60, Δ229-256} i Rot1^{Δ1-90, Δ229-256} també s'observa un canvi de mobilitat electroforètica després del tractament amb Endo H, indicant que aquestes proteïnes s'han glicosilat i per tant s'han translocat al reticle (Figura 4.12). No obstant això, cal puntualitzar que un percentatge (majoritari en algun cas) d'aquestes proteïnes truncades no està glicosilat en l'extracte inicial. Aquest resultat podria suggerir que les regions entre l'aminoàcid 25 al 60 i entre el 200 al

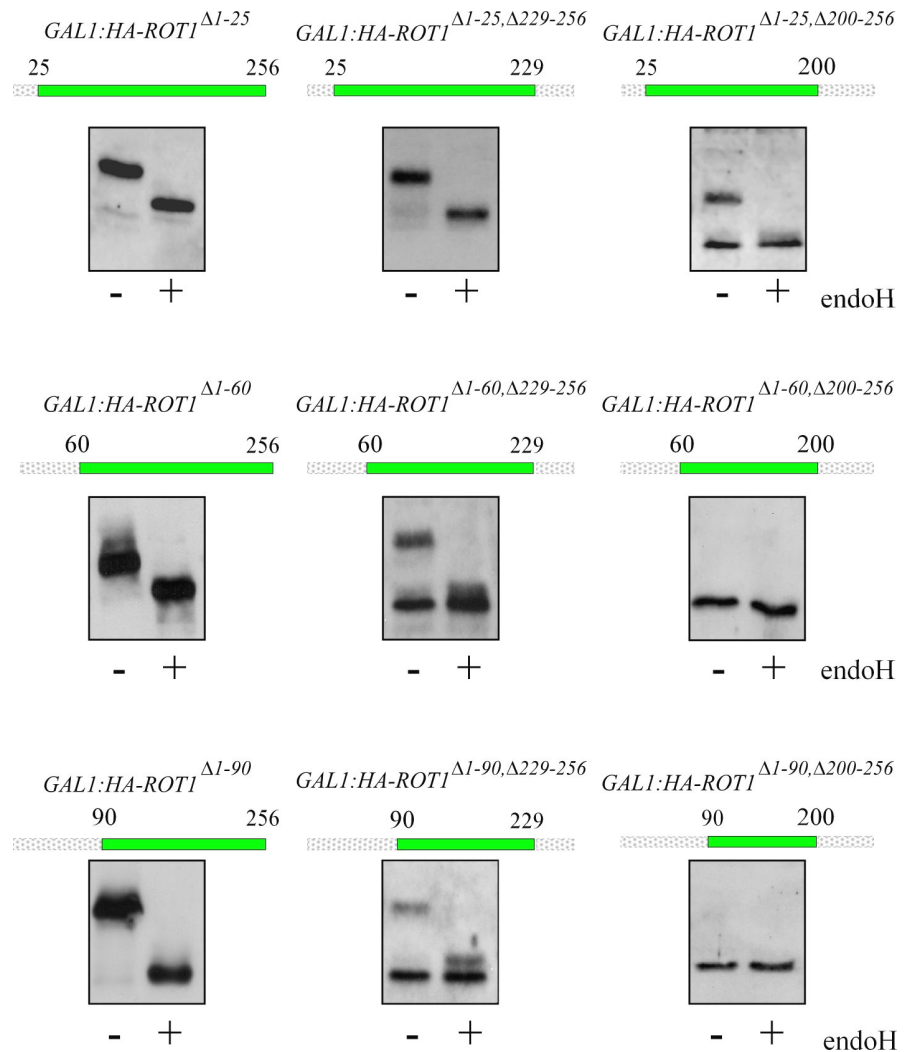


Figura 4.12. Assaig d'N-glicosilació de proteïnes Rot1 truncades. Anàlisi per *western* de Rot1 en els extractes de cèl·lules en creixement exponencial de les soques *GALI:HA-ROT1*^{Δ1-25} (MCY62), *GALI:HA-ROT1*^{Δ1-25,Δ229-256} (MCY238), *GALI:HA-ROT1*^{Δ1-25,Δ200-256} (MCY243), *GALI:HA-ROT1*^{Δ1-60} (MCY174), *GALI:HA-ROT1*^{Δ1-60,Δ229-256} (MCY240), *GALI:HA-ROT1*^{Δ1-60,Δ200-256} (MCY222), *GALI:HA-ROT1*^{Δ1-90} (MCY232), *GALI:HA-ROT1*^{Δ1-90,Δ229-256} (MCY241), *GALI:HA-ROT1*^{Δ1-90,Δ200-256} (MCY223) incubats en presència o absència de 50 mU d'Endo H.

229 són importants per a una eficient translocació al reticle. De fet, a l'eliminar simultàniament aquestes regions en les proteïnes Rot1^{Δ1-60,Δ200-256} i Rot1^{Δ1-90,Δ200-256} ja no s'observa glicosilació de les proteïnes (Figura 4.12). No obstant, cal ser cautelós en la interpretació d'aquests resultats ja que la presència de proteïna no glicosilada podria reflectir no un problema en la translocació sinó en la glicosilació d'aquestes proteïnes truncades. Futurs experiments de fraccionament subcel.lular esclariran aquest punt.

MECANISME D'INSERCIÓ AL RETICLE ENDOPLASMÀTIC PER A Rot1

En cèl.lules eucariotes, la translocació de les proteïnes al reticle ocorre en el translocó o complex Sec61, un canal o estructura preformada que organitza el transport i maduració dels polipèptids en la membrana del reticle endoplasmàtic (Rapoport, 2007). El direccionament dels precursors de les proteïnes de membrana al translocó pot ocórrer per dues rutes diferents (Wilkinson et al., 1997). La ruta majoritària és la ruta cotraduccional, dependent de la partícula de reconeixement de senyal (SRP). L'altra ruta alternativa és la ruta posttraduccional, independent de la SRP i en la qual intervé el complex Sec62/ Sec63.

Per investigar si Rot1 es dirigeix a la membrana del reticle pel mecanisme cotraduccional o posttraduccional, vàrem analitzar l'estat d'*N*-glicosilació de Rot1 en diverses soques mutant en cadascuna de les rutes. En concret, es va utilitzar una soca mutant en el gen *SEC65* (que codifica un component del complex SRP), una soca mutant en el gen *SEC62* (essencial per al direccionament posttraduccional independent de SRP) i també una soca mutant en el gen *SEC61* (que codifica una subunitat del translocó i per tant està implicat en la translocació cotraduccional i posttraduccional). En aquestes soques, els gens *SEC65* i *SEC61* estan sota el control del promotor

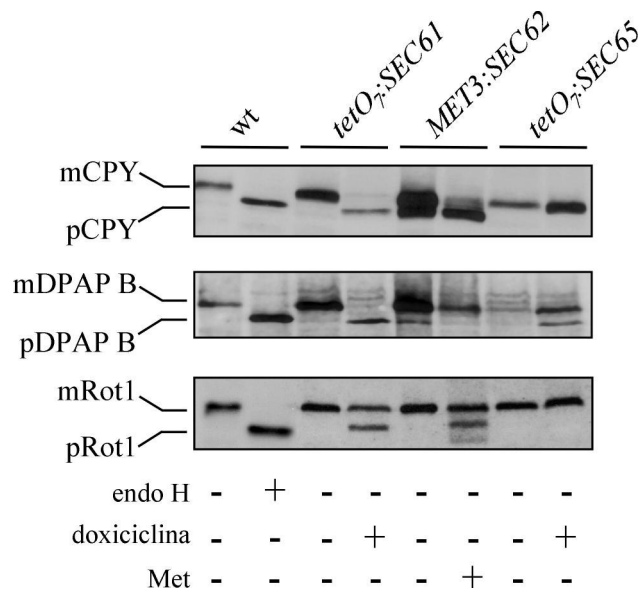


Figura 4.13. Mecanisme de translocació de Rot1 al reticle endoplasmàtic. Cultius de cèl.lules en creixement exponencial de la soca *tetO₇:SEC61* (MCY215), *MET3:SEC62* (MWY50) i *tetO₇:SEC65* (MCY217) transformades amb els plasmidis pGAL1:CPY-HA, pGAL1:DPAP B-HA o pGAL1:HA-ROT1 es varen incubar tota la nit en presència o absència de 4mM metionina (en el cas del mutant *sec62*) o de 10µg/mL doxiciclina (en els cas dels mutant *sec61* i *sec65*). Per a induir l'expressió de les proteïnes etiquetades es va afegir 2% de galactosa durant 20 minuts al medi de cultiu. Els extractes cel.lulars es varen analitzar per *western*. S'inclou com a control els extractes de cèl.lules de la soca silvestre (CML240) transformada amb els mateixos plasmidis abans i després de la digestió amb EndoH. Les formes madures (glicosilades) i precursors (no glicosilades) de les proteïnes estan marcades amb les lletres m i p respectivament.

tetO₇, de manera que la transcripció del gen pot apagar-se per doxiciclina, mentre que la soca mutant en *SEC62* conté aquest gen sota el promotor *MET3* reprimible per metionina. Com a control de proteïna que segueix el mecanisme cotraduccional dependent de la SRP es va utilitzar la proteïna

dipeptidilaminopeptidasa B (DPAP B) i com a control de proteïna que segueix el mecanisme posttraduccional independent de la SRP es va utilitzar la proteïna carboxipeptidasa Y (CPY). Per abordar l'estudi de glicosilació, les diferents soques es varen transformar amb els plasmidis que expressen els gens que codifiquen les proteïnes Rot1, DPAP B o CPY etiquetades amb HA sota el control del promotor *GAL1*. Vàrem realitzar assajos apagant primerament la transcripció dels gens *SEC65*, *SEC62* o *SEC61* i activant seguidament la transcripció de les proteïnes Rot1, DPAP B o CPY. Tal i com era d'esperar, a l'analitzar el *western* s'observa que la forma precursora no glicosilada de la proteïna DPAP B s'acumula en el mutant *sec65* (mutant en la ruta cotraduccional SRP dependent) i en el mutant del tranlocó *sec61*, mentre que la forma precursora no glicosilada de la proteïna CPY s'acumula en els mutants *sec62* (mutant en la ruta posttraduccional SRP independent) i *sec61* (mutant del tranlocó) (Figura 4.13). Pel que fa a la proteïna Rot1 no s'observen defectes en la glicosilació en la soca mutant *sec65*, la qual cosa indica que la seua translocació no està afectada en un mutant en la ruta cotraduccional SRP dependent. En canvi, tant la inactivació de *SEC62* com de *SEC61* provoquen l'acumulació de la forma precursora no glicosilada de Rot1. Aquests resultats indiquen que la proteïna Rot1 és dirigida a la membrana del reticle endoplasmàtic a través del translocó Sec61 per un mecanisme posttraduccional independent de SRP i dependent de Sec62.

ESTABILITAT DE LA PROTEÏNA Rot1

Paper del domini N-terminal en l'estabilitat de Rot1

Durant l'estudi mostrat en l'apartat anterior, vàrem observar que totes les soques truncades per l'extrem N-terminal *GAL1:HA-ROT1^{Δ1-25}*,

GALI:HA-ROT1^{Δ1-60} i *GALI:HA-ROT1^{Δ1-90}* presenten nivells de proteïna Rot1 molt més elevats que els detectats per a la proteïna Rot1 completa encara que el promotor utilitzat és el mateix en tots els casos (Figura 4.14). Per tant, és evident que l'eliminació dels aminoàcids 1 al 25 origina un increment en el nivell d'aquestes proteïnes truncades, pel que podríem suggerir que aquests aminoàcids tinguen algun paper en l'estabilitat de la proteïna Rot1.

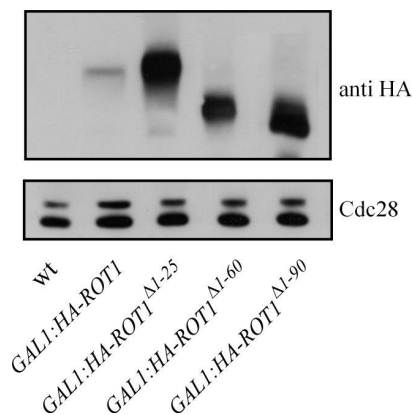


Figura 4.14. Comparació dels nivells cel·lulars de les diferents proteïnes Rot1 truncades en l'extrem N-terminal. Anàlisi per *western* de la proteïna Rot1 en extractes de cèl·lules en creixement exponencial de les soques silvestre, *GALI:HA-ROT1* (JCY526), *GALI:HA-ROT1^{Δ1-25}* (MCY62), *GALI:HA-ROT1^{Δ1-60}* (MCY174) i *GALI:HA-ROT1^{Δ1-90}* (MCY232) crescudes en galactosa. El nivell de proteïna Cdc28 es mostra com a control de càrrega.

Per analitzar aquest fet, vàrem estudiar l'estabilitat de la proteïna Rot1 fent assajos d'apagat del promotor per addició de glucosa a cèl·lules de les soques *GALI:HA-ROT1* i *GALI:HA-ROT1^{Δ1-25}* crescudes tota la nit en

galactosa. Com s'observa en la figura 4.15, les cèl·lules que contenen la forma completa de Rot1 presenten baixos nivells de proteïna als 45 minuts després de reprimir l'expressió del gen per glucosa, sent la proteïna pràcticament indetectable després de 60 minuts. En canvi, en les cèl·lules de la soca *GALI:HA-ROT1^{Δ1-25}*, el nivell de la proteïna Rot1^{Δ1-25} roman pràcticament inalterat després d'apagar la transcripció del gen. Els mateixos resultats es varen obtenir en experiències similars en les quals després de créixer les cèl·lules en rafinosa, es va activar transitòriament la transcripció dels gens *ROT1* i *ROT1^{Δ1-25}* addicionant galactosa al medi de cultiu i apagant el promotor amb glucosa després de 30 minuts (resultats no mostrats). Aquest resultat confirma que els primers 25 aminoàcids de Rot1 són responsables de la inestabilitat de la proteïna en la cèl·lula.

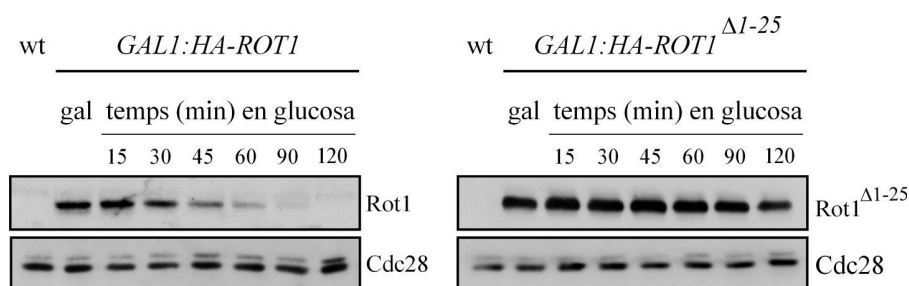


Figura 4.15. Anàlisi d'estabilitat de la proteïna Rot1 truncada en N-terminal. Cultius de les soques *GALI:HA-ROT1* (JCY526) transformada amb un plasmidi centromèric pROT1-CEN i *GALI:HA-ROT1^{Δ1-25}* (MCY62) crescudes en galactosa (gal) durant tota la nit es transferiren a medi en glucosa per reprimir l'expressió del gen *ROT1* i *ROT1^{Δ1-25}*. La caiguda del nivell de la proteïna Rot1 es va analitzar per *western* als temps indicats. S'inclou un extracte obtingut de la soca silvestre (W303) com a control negatiu (no tag). El nivell de la proteïna Cdc28 es mostra com a control de càrrega.

Anàlisi de la ruta implicada en la degradació de Rot1

La principal via de degradació de proteïnes en la cèl.lula és la via de degradació del sistema ubiquitina-proteasoma. Per comprovar si Rot1 es degradava en el proteasoma, vàrem fer assajos d'apagat de promotor en una soca mutant en les subunitats del proteasoma *pre1pre2* transformada amb un plasmidi que contenia el gen *GALI:ROT1-HA*. A diferència del que ocorre en les cèl.lules silvestres, el nivell de la proteïna Rot1 es manté pràcticament constant en les cèl.lules mutants *pre1pre2* (Figura 4.16). Aquest resultat indica que Rot1 es degrada pel proteasoma.

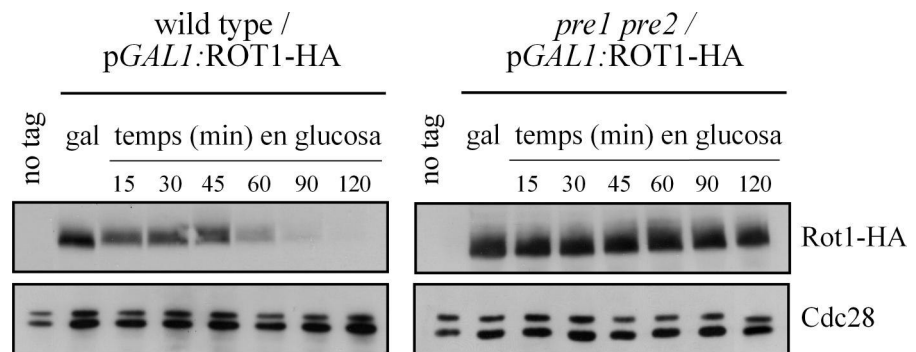


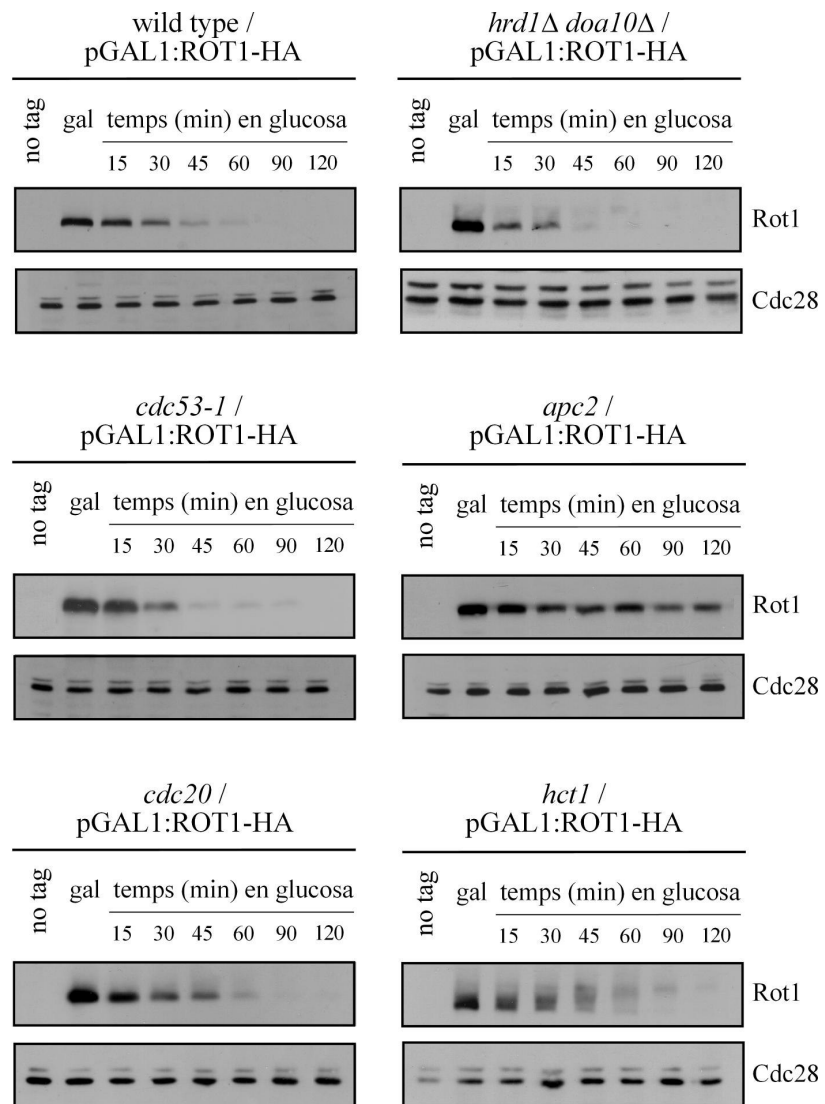
Figura 4.16. Anàlisi de l'estabilitat de la proteïna Rot1 en la soca mutant en el proteasoma *pre1 pre2*. Cultius de les soques silvestre (WCG4 α) i mutant *pre1 pre2* (WCG4-11/22) transformades amb un plasmidi que conté la proteïna Rot1-HA sota el promotor *GALI* crescudes en galactosa (gal) durant tota la nit es transferiren a medi en glucosa. Els nivells de la proteïna Rot1 després de la repressió del gen *ROT1* per glucosa es va analitzar per *western* als temps indicats. S'inclou un extracte obtingut de la soca silvestre (W303) com a control negatiu (no tag). El nivell de la proteïna Cdc28 es mostra com a control de càrrega.

Atès que Rot1 és una proteïna localitzada en el reticle endoplasmàtic i una ruta de degradació del sistema ubiquitina-proteasoma associada al reticle és la ruta ERAD, resultava interessant averiguar si Rot1 es degradava per la ruta ERAD. Vàrem realitzar assajos d'apagat de promotor en una soca mutant en les dues ubiquitines-ligases (E3), de la ruta ERAD (*hrd1Δ doa10Δ*) transformada amb un plasmidi que contenia el gen *GALI:ROT1-HA*. Tant en les cèl·lules *hrd1Δ doa10Δ* com en les cèl·lules silvestres, Rot1 és pràcticament indetectable als 30 minuts després de reprimir el promotor *GALI* (Figura 4.17). Aquest resultat suggereix que Rot1 no es degrada per la ruta ERAD.

Com hem vist en aquest treball, Rot1 es requereix per a la correcta progressió en el cicle cel·lular i en la regulació del cicle cel·lular es troben implicades dues ubiquitines-ligases, els complexos SCF i APC, vàrem investigar si algun d'aquests complexos controlaven la degradació de Rot1. Vàrem realitzar assajos d'apagat de promotor en soques mutant en una subunitat del complex SCF (*cdc53-1*) o del complex APC (*apc2*) transformades amb un plasmidi que contenia el gen *GALI:ROT1-HA*. Tant en les cèl·lules *cdc53-1* com en les cèl·lules silvestres, Rot1 és pràcticament indetectable als 45 minuts després de reprimir el promotor *GALI* (Figura 4.17). En canvi, en les cèl·lules *apc2*, la proteïna Rot1 es manté relativament

Figura 4.17. Anàlisi de l'estabilitat de la proteïna Rot1 en soques mutants en les rutes de degradació SCF i APC. Anàlisi per *western* dels nivells de proteïna Rot1 a diferents temps en extractes de cèl·lules en creixement exponencial de les soques silvestre (W303), mutant *hrd1Δ doa10Δ*, *cdc53* (MTY740), *apc2* (KTM200U), *cdc20* i *cdh1* (JCY1012) transformades amb un plasmidi conté el gen *GALI:ROT1-HA* crescudes en galactosa durant tota la nit i després transferides a medi en glucosa.

S'inclou un extracte obtingut de la soca silvestre (W303) com a control negatiu (no tag). El nivell de proteïna Cdc28 es mostra com a control de càrrega.



estable durant almenys dues hores. Els mateixos resultats es vàrem obtenir al realitzar aquests assajos d'apagat de promotor en soques *cdc53* i *apc2* amb el gen *GALI:ROT1-HA* integrat en el genoma (resultats no mostrats). Aquest resultat suggereix que Rot1 es degrada per la ruta APC.

APC presenta dues subunitats activadores responsables del reconeixement de substrat: Cdc20 i Cdh1. Per averiguar quina de les dues subunitats participa en la degradació de Rot1, vàrem realitzar de nou assajos d'apagat del promotor del gen *GALI:ROT1-HA* en soques mutants *cdc20* o *cdh1*. Sorprenentment, el nivell de proteïna Rot1 decau en els dos casos de forma semblant a la soca silvestre, la qual cosa indica que Rot1 és degradada correctament en aquests mutants (Figura 4.17).

5. Discussió

En aquest estudi hem caracteritzat de forma detallada el fenotip de la soca mutant *tetO₇:ROT1* amb la finalitat d'investigar la funció cel.lular del gen essencial *ROT1*.

Aquest treball ha revelat la participació de Rot1 en el procés de morfogènesi cel.lular al llarg de la progressió en el cicle cel.lular. La regulació correcta de la morfogènesi és essencial per a molts processos cel.lulars en eucariotes, com per exemple la divisió cel.lular. En *S. cerevisiae*, diversos processos morfogenètics que impliquen el citoesquelet d'actina ocorren al llarg del cicle cel.lular. Aquests processos inclouen l'emergència de la gemma al principi del cicle cel.lular, el control de la forma de la gemma durant el creixement d'aquesta mitjançant l'activació del

canvi de creixement apical a isotròpic, l'actuació d'un anell contràctil d'actomiosina que estrangula la membrana plasmàtica durant la citoquinesi i la polarització del citoesquelet a la regió del coll per a formar el septe i completar la divisió cel·lular. En aquest treball hem caracteritzat que *Rot1* afecta el citoesquelet d'actina a dos nivells. Una primera connexió de *ROTI* amb el citoesquelet d'actina s'ha demostrat per la forma arrodonida de les gemmes que presenta el mutant *rot1*. Aquest fet indica que *ROTI* és requerit per al manteniment del creixement apical durant el creixement de la gemma. Diversos gens implicats en el polarisoma han estat relacionats en el manteniment del creixement apical (Sheu et al., 2000). Cèl·lules mutants en aquests gens, com *SPA2*, presenten gemmes arrodonides i probablement com a conseqüència d'aquest defecte apical presenten un patró de gemmació alterat, ja que tenen un patró aleatori en lloc del patró axial característic de les cèl·lules haploids de *S. cerevisiae*. Curiosament, les cèl·lules *rot1* regemmades també presenten un patró aleatori en la nova gemma. Aquest comportament de la soca mutant *tetO₇:ROTI* suggereix una estreta relació entre la funció de *Rot1* i proteïnes de polaritat com el polarisoma.

Una segona connexió de *ROTI* amb el citoesquelet d'actina s'ha demostrat pel fet que les cèl·lules mutants en *ROTI* no poden polaritzar el citoesquelet d'actina a la regió del coll al final de mitosi. Com hem comprovat per diferents aproximacions (tinció de membranes amb DiI i digestió amb zimoliasa) entre la mare i la filla s'ha produït la divisió citoplasmàtica entre la cèl·lula mare i la filla. Però, a l'inactivar *ROTI*, la pèrdua de creixement polaritzat provoca un defecte en la formació del septe i la incapacitat de completar correctament la divisió cel·lular. Cal recordar que la formació del septe no està totalment abolida en les cèl·lules *rot1*, ja que aproximadament un 50% de les cèl·lules *rot1* regemmades presenten un septe aparentment complet. Podríem pensar que aquest fet fora perquè quedara certa activitat residual del gen *tetO₇:ROTI*. No obstant, el fet que no s'observe la polarització del citoesquelet d'actina a la regió del coll en les

cèl.lules mutants *rot1* analitzades anul·la aquesta possibilitat. Per tant, aquesta observació suggereix que *ROT1* no és estrictament necessari per a formar el septe, sinó més bé, que *ROT1* és necessari per a formar un septe complet a temps en el moment que li pertoca durant el cicle cel·lular (els components requerits per a formar el septe serien dirigits a la regió del coll més lentament en l'absència de creixement polaritzat). El fet que el percentatge de cèl.lules amb el septe incomplet augmenta significativament si només tenim en compte les cèl.lules en els primers estadis de regemmació, recolza aquesta interpretació.

S'ha descrit que la contracció de l'anell d'actomiosina i la formació del septe primari són processos interdependents encara que no necessaris ja que quan fallen es produeix la citoquinesi i la septació encara que de manera anormal (Schmidt et al., 2002). En les cèl.lules mutants *rot1*, l'anell contràctil d'actomiosina funciona correctament, pel que en principi cabria pensar que el septe primari deu haver-se format correctament. No obstant, no detectem un septe de quitina tancat entre la mare i la filla en el mutant *rot1*. Aquest fet podria indicar que la interdependència entre anell contràctil i septe primari s'haja perdut. Ara bé, també és possible que el septe primari s'haja format correctament però amb les tècniques de microscopia utilitzades i la presència de l'anell de quitina impedeixen la seua detecció. Per altra banda, en els experiments realitzats només s'ha analitzat la presència del senyal de l'anell de quitina en el septe per la qual cosa no podem descartar que altres components del septe secundari no estiguen afectats, de manera que el defecte de septació en el mutant *rot1* fora específic de quitina i no afectara a altres estructures del septe secundari. No obstant, diferents observacions suggereixen que aquest no és el cas. Les cèl.lules mutants *rot1* tenen nivells de quitina en la paret cel·lular més alts que les cèl.lules silvestres (Machi et al., 2004). A més a més, l'anell de quitina en el coll, format per la mateixa quitina sintasa (Chs3) que forma el septe secundari, no està afectat i estudis preliminars realitzats al nostre laboratori han localitzat

correctament a Chs3 en el coll. Més bé cal esperar que la fallida en la polarització del citoesquelet d'actina al coll en el mutant *rot1* origine un defecte global del septe. Estudis per microscopia electrònica ajudaran a esclarir la naturalesa precisa del defecte de septació en el mutant *rot1*.

La implicació de Rot1 en el citoesquelet d'actina està reforçada per la interacció genètica entre *ROT1* i *CDC42*. La GTPasa Cdc42 és el regulador principal del citoesquelet d'actina, així, les soques mutant *cdc42* són defectuoses en l'establiment de la polaritat del citoesquelet o activació del canvi del creixement apical a isotròpic (Adams et al., 1990; Richman et al., 1999). La supressió de la soca *cdc42-1* per la sobreexpressió de *ROT1* indica clarament que dosis elevades de Rot1 poden compensar el defecte en Cdc42 d'induir la polarització del citoesquelet d'actina. Aquesta interacció genètica de *ROT1* i *CDC42* junt a les interaccions sintètiques entre *rot1* i mutacions en la Rho GTPasa Rho1, Pkc1 i Slt2 (proteïnes implicades en la regulació del citoesquelet d'actina) recolzen un paper de Rot1 en el citoesquelet d'actina. Resultats publicats anteriorment també indiquen que Rot1 podria estar implicat en la morfogènesi cel·lular. El gen *ROT1* es va identificar en un rastreig de mutacions supressores d'una soca *tor2^{ts}* defectuosa en el control del citoesquelet d'actina (Bickle et al., 1998). A més, s'ha descrit que soques mutants en *ROT1* presenten defectes de paret cel·lular (Bickle et al., 1998; Machi et al., 2004). Se sap que els defectes en la paret cel·lular activen la ruta PKC mitjançant un mecanisme compensatori (Levin, 2005), i de fet, altres treballs al nostre laboratori demostren que les cèl·lules *rot1* presenten un fort augment en l'estat de fosforilació de la MAP quinasa Slt2 (E. Queralt i J.C.Igual). És plausible pensar que defectes en la funció del citoesquelet d'actina a causa de la inactivació de *ROT1* donen lloc a defectes en la paret cel·lular i a l'activació de la ruta d'integritat de la paret cel·lular.

Com comentàvem abans, en *S. cerevisiae* diferents processos morfogènics implicats en el citoesquelet d'actina són regulats

temporalment durant la progressió del cicle cel·lular. Els resultats obtesos indiquen que Rot1 està específicament implicat en inhibir l'activació del canvi apical a isotròpic i en la polarització del citoesquelet d'actina al coll al final de la divisió cel·lular. En canvi, no és requerit ni per al creixement polaritzat durant l'emergència de la gemma ni per a la funció de l'anell contràctil d'actomiosina. El fet que les cèl·lules *rot1* siguin capaces de polaritzar el creixement durant l'emergència de la gemma indica que Rot1 no és necessari per a la polarització del citoesquelet d'actina *per se*. Així doncs, *ROT1* ha de repercutir sobre funcions o proteïnes específicament implicades en la regulació del citoesquelet d'actina durant l'activació del canvi apical a isotròpic i durant la repolarització a la regió del coll. S'ha descrit que la maquinària bàsica implicada en la polarització del citoesquelet d'actina durant l'emergència de la gemma i al final de la mitosi és similar i implica el reclutament al lloc de creixement polaritzat del polarisoma i de les proteïnes Cdc24 i Cdc42, amb la subseqüent activació local de Cdc42, la qual cosa fa sorprenent que Rot1 afecte a un procés i no a l'altre i més encara estant aquestes proteïnes de polarització ben localitzades tant en la gemma com en el coll en el mutant *rot1*. No obstant, cal destacar que la regulació temporal d'aquests processos al llarg del cicle cel·lular es porten a terme per diferents activitats CDK: mentre la polarització del citoesquelet d'actina durant l'emergència de la gemma és governada per la quinasa Cdc28-Cln1,2, l'activació del canvi de creixement apical a isotròpic i la repolarització al final de mitosi és regulada per la quinasa Cdc28-Clb2. Per tant, les cèl·lules mutants en *ROT1* són específicament defectuoses en les funcions del citoesquelet d'actina regulades per Cdc28-Clb2. De fet, la inactivació de *ROT1* suprimeix el defecte d'hiperpolarització en les cèl·lules *clb2* però no en les cèl·lules que sobreexpressen *CLN2*. Els trets fenotípics i les interaccions genètiques indiquen clarament que els gens *ROT1* i *CLB2* funcionen antagònicament en la regulació del citoesquelet d'actina: Clb2 és requerit per a l'activació del canvi de creixement apical a isotròpic (Tjandra

et al., 1998) i reprimeix la repolarització a la regió del coll (Lew and Reed, 1993), mentre que Rot1 és requerit per al manteniment del creixement apical i per al creixement polaritzat al coll (Figura 5.1). Les bases moleculars d'aquest antagonisme estan començant a esclarir-se. Els nostres resultats indiquen que Rot1 està implicat en la degradació de Clb2, la qual cosa fa pensar que Rot1 podria controlar el citoesquelet d'actina, almenys en part, mitjançant la regulació del nivell de la proteïna Clb2. No obstant, el fet que la inactivació de *ROT1* suprimeix el creixement apical en una soca mutant *clb2* i que la sobreexpressió de *ROT1* suprimeix el defecte de creixement d'una soca termosensible *cdc42-1 clb2Δ* indica que *ROT1* pot afectar el citoesquelet d'actina independentment de *CLB2*. No es pot descartar que en absència de Clb2, Rot1 pugui afectar al citoesquelet mitjançant el control redundant de la ciclina Clb1. No obstant, Rot1 podria també actuar sobre el citoesquelet d'actina mitjançant altres proteïnes diferents de les ciclines Clb.

Rot1 es localitza en les membranes del RE que envolten el nucli. Pels resultats presentats en aquest treball, podem pensar diferents formes de com Rot1 podria participar en la morfogènesi cel·lular. Rot1 podria per exemple, afectar la ruta de secreció que és necessària per a dirigir a la superfície cel·lular activitats enzimàtiques implicades en la biosíntesi de la paret cel·lular i, tal vegada, podria afectar senyals corticals implicats en la polarització de l'actina. De fet, el direccionament de la carboxipeptidasa Y al Golgi es troba afectat en una soca mutant *rot1* (Takeuchi et al., 2006a), la qual cosa està d'acord amb un defecte en el tràfic de proteïnes. Una hipòtesi alternativa, però no mutuament exclusiva, sorgeix per la connexió entre Rot1 i la proteòlisi mediada pel sistema ubiquitina-proteasoma. De fet, hem detectat interaccions sintètiques entre el gen *ROT1* i gens implicats en la degradació de proteïnes en el proteasoma i en les ubiquitines-ligases APC i SCF. La implicació de *ROT1* en la degradació de Clb2 i probablement Cln2 i substrats del mecanisme de la regla de l'N-terminal i de la ruta de degradació per fusió a ubiquitina (UFD), suggereixen que Rot1 podria tenir un efecte

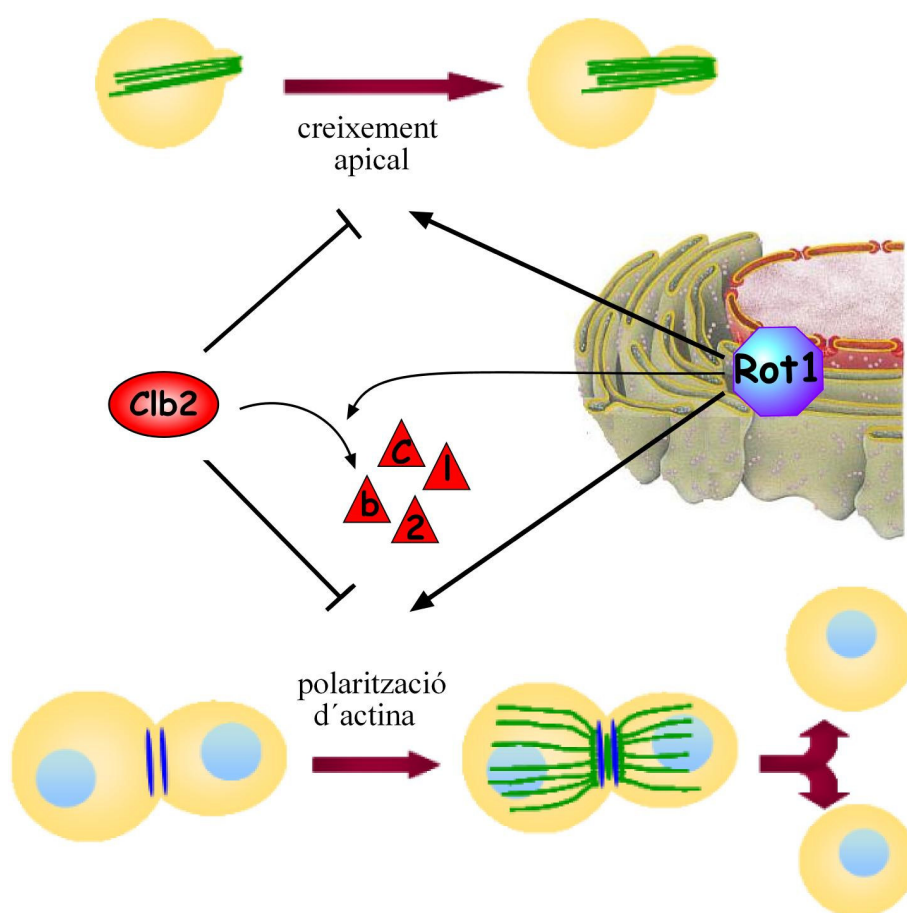


Figura 5.1. Control del citoesquelet d'actina per Rot1 i Clb2 al llarg del cicle cel.lular. La proteïna del reticle endoplasmàtic Rot1 i la ciclina Clb2 controlen antagonicament el citoesquelet d'actina al llarg del cicle cel.lular. Rot1 juga un paper positiu en la polarització del citoesquelet d'actina tant mantenint el creixement apical de la gemma com induint la repolarització de l'actina al coll, mentre que Clb2 juga un paper negatiu en aquests processos induint el canvi de creixement apical a isotròpic en la gemma i bloquejant la repolarització de l'actina al coll al final del cicle cel.lular. Aquest antagonisme pot explicar-se en part pel fet que Rot1 està implicat en la degradació de Clb2, encara que també afecta el citoesquelet per vies independents de Clb2.

general en la degradació de proteïnes en el proteasoma. A més, la interacció descrita entre Rot1 i Nas2 (Ito et al., 2001) que és una proteïna de llevat homòloga a p27 (subunitat moduladora del proteasoma en mamífers (Russell et al., 1999)) també recolza la connexió entre Rot1 i la degradació de proteïnes proteasomal. Una de les principals rutes de degradació de proteïnes per ubiquitinació es localitza en el RE: la ruta ERAD (*endoplasmic reticulum-associated degradation*). S'ha descrit una interacció sintètica entre les mutacions *rot1* i *kar2* (Takeuchi et al., 2006a), la qual cosa és coherent amb què Rot1 actue en la ruta ERAD. És interessant resaltar que algunes proteïnes relacionades amb el citoesquelet d'actina són proteïnes ubiquitinades associades a membranes i algunes d'elles podrien ser substrats de la ruta ERAD (Hitchcock et al., 2003). A més a més, la proteïna Nas2, que com hem comentat interacciona amb Rot1 i amb el proteasoma, també ha sigut relacionada en proteïnes de polaritat (Drees et al., 2001), la qual cosa recolza una connexió del proteasoma amb la regulació del citoesquelet d'actina. Atès que Rot1 té un paper en el citoesquelet d'actina i en el proteasoma, una hipòtesi atractiva seria que Rot1 podria estar afectant la funció del citoesquelet d'actina mitjançant la ruta ERAD. Per altra banda, tenint en compte el paper de Rot1 en l'estabilitat de Clb2, i probablement d'altres substrats, és necessari recordar que recentment s'ha demostrat que components la ruta ERAD no sols estan implicats en la degradació de proteïnes localitzades en el RE sinó també en la degradació de proteïnes solubles citoplasmàtiques i nuclears (Deng and Hochstrasser, 2006; Ravid et al., 2006). Aquestes observacions plantegen la possibilitat que l'estabilitat de reguladors claus en el cicle cel·lular com les ciclines Clb2 i potser Cln2 estiguen afectades per funcions associades al reticle endoplasmàtic.

Un aspecte aparentment sorprenent del seu fenotip és com les cèl·lules mutants *rot1* ixen de mitosi donada la presència de Clb2. La eixida de mitosi implica la inactivació de la CDK, la qual cosa s'aconsegueix en condicions normals mitjançant la degradació de les ciclines Clb i

l'acumulació de l'inhibidor Sic1, processos controlats per la ruta MEN (Stegmeier and Amon, 2004; Bosl and Li, 2005). Els nostres resultats indiquen que encara que no es degrada Clb2 la ruta MEN és funcional en les cèl.lules *rot1* ja que s'observa l'aparició de Sic1. En absència de proteolisi de Clb2 les cèl.lules podrien eixir de mitosi per acumulació d'elevats nivells de l'inhibidor Sic1. No obstant, en el cas de les cèl.lules mutants *rot1* és dubtosa aquesta explicació perquè aparentment no existeix una forta acumulació de Sic1. És possible pensar que altre inhibidor de la CDK, la quinasa Swe1, poguera estar participant en la inactivació de la CDK en el mutant *rot1*, sobretot tenint en compte que la quinasa Swe1 inactiva la CDK en resposta a defectes en el citoesquelet d'actina dins del mecanisme del checkpoint de morfogènesi (Lew and Reed, 1995b; Lew, 2000). Una vegada inactivada la CDK, les cèl.lules podrien eixir de mitosi. En aquest cas, el defecte en la polarització del citoesquelet de les cèl.lules *rot1* podria reflectir una funció de la ciclina Clb2 independent de l'activitat quinasa, de manera que la presència de proteïna Clb2 no interferisca en l'eixida de mitosi però sí en la polarització del citoesquelet d'actina. De totes formes, és possible que la CDK no siga inactivada o almenys no totalment en les cèl.lules mutants *rot1*. De fet, s'ha vist que l'activitat CDK en cèl.lules *rot1* asincròniques és semblant a la de les cèl.lules silvestres (E. Queralt i J.C. Igual). Per entrar i progressar en la mitosi es produeix un augment gradual de l'activitat de la CDK (Lindqvist et al., 2007), pel que cap la possibilitat que per eixir de mitosi, produir-se la citoquinesi i la septació també es produisca una minvació gradual de l'activitat de la CDK. De fet, s'ha descrit que cèl.lules *cdh1Δ sic1Δ* poden realitzar almenys alguns processos d'eixida de mitosi com el desensamblatge del fus acromàtic en presència d'activitat CDK (Wasch and Cross, 2002).

Així, podria ser que en les cèl.lules mutants *rot1* la CDK s'inactivara suficientment per a permetre l'eixida de mitosi però no per a realitzar correctament la septació. A més a més, recentment s'ha descrit que les

diferents funcions de la ciclina depenen de la localització de la proteïna en llocs específics (Eluere et al., 2007). Així, la fracció de la proteïna Clb2 nuclear controla els processos d'eixida de mitosi mentre que la fracció citoplasmàtica controla els processos morfogènètics (inhibeix la repolarització al coll i activa el canvi de creixement apical a isotròpic). Cabria la possibilitat que Rot1 no afectara la fracció nuclear de Clb2 i en canvi, sí repercutira sobre la fracció citosòlica de Clb2. Així, en el mutant *rot1* Clb2 i Cdc28-Clb2 nuclear es trobarien inactivades, per això les cèl.lules ixen bé de mitosi. Pel contrari, Clb2 i Cdc28-Clb2 citoplasmàtica no estarien inactivades, potenciant-se les funcions morfogènètiques de Clb2 d'impedir la repolarització al coll i d'activar el canvi de creixement apical a isotròpic, que són els fenotips observats en el mutant *rot1*. Caldria realitzar un seguiment del nivell i localització de Clb2 i la quinasa Cdc28-Clb2 en les cèl.lules mutants *rot1* en cultius sincronitzats.

En aquest treball també hem iniciat la caracterització bioquímica de Rot1 amb la finalitat de conèixer la localització subcel.lular de la proteïna així com les possibles modificacions posttraduccionals i dominis funcionals relacionant-ho amb la funció cel.lular. Per assajos de fraccionament subcel.lular i immunofluorescència hem demostrat que Rot1 és una proteïna integral de membrana localitzada en la xarxa de membranes del reticle endoplasmàtic/embolcall nuclear. En diferents bases de dades d'anàlisi de seqüència es prediu l'existència d'un domini transmembrana en l'extrem C-terminal. Els nostres resultats concorden amb aquesta predicció ja que una versió truncada de Rot1 sense l'extrem C-terminal no és capaç d'ancorar-se a la membrana. Cèl.lules amb aquesta versió truncada de Rot1 perden la viabilitat cel.lular. En principi aquest resultat podria suggerir que l'ancoratge a la membrana pel seu domini C-terminal és clau per a la funcionalitat de la proteïna. No obstant això, quan la proteïna es localitza de nou en la membrana a l'incorporar una cua de polileucines no es recupera la viabilitat cel.lular. Per tant, podem concloure que l'extrem C-terminal no sols actua

com un domini d'ancoratge a la membrana sinó que és clau per la funcionalitat de Rot1 probablement per interaccionar amb altres proteïnes en la membrana. De fet, s'ha descrit que alguns dominis transmembrana són importants per a establir complexos en la membrana a través d'interaccions hèlix-hèlix (Lemmon and Engelman, 1994; Orzaez et al., 2000).

Durant la caracterització de Rot1, hem investigat diferents tipus de modificacions posttraduccionals que podrien afectar la funció de la proteïna. L'N glicosilació de proteïnes és una característica freqüent de les proteïnes de membrana d'eucariotes. Hem demostrat que la proteïna Rot1 presenta tres llocs N glicosilats: les Asn 103, 107 i 139. En el cas de Rot1, mutacions als tres llocs de glicosilació que impedeixen la modificació de la proteïna no són letals però desencadenen defectes significatius de creixement. Per tant, encara que l'N glicosilació de Rot1 no és estrictament essencial per al manteniment de la viabilitat cel·lular és important per a la seua funcionalitat. Com l'estat de glicosilació pot afectar la funció de Rot1? En alguns casos, les proteïnes mutants no glicosilades presenten una estabilitat molt reduïda (Cai et al., 2005); no obstant, aquest no és el cas de Rot1 perquè els nivells de proteïna detectats en extractes de cèl·lules silvestres i cèl·lules que expressen la versió triple mutant Rot1^{N103,107,139Q} són semblants. Una anàlisi de l'estructura secundària sobre llocs d'N glicosilació suggereix que els glicans són localitzats en posicions on canvia l'estructura secundària (Popov et al., 1997) i que de vegades, la inhibició de la glicosilació resulta en l'agregació o mal plegament de les proteïnes dirigint a un estat final no funcional (Mitra et al., 2006). Aquestes observacions suggereixen que els N glicans poden directament participar en el plegament de proteïnes com a conseqüència de les interaccions proteïna-glicans. Un defecte en l'eficiència del correcte plegament de la proteïna podria justificar la baixa funcionalitat observada en la proteïna Rot1^{N103, 107, 139Q}. La presència d'una fracció petita

de la proteïna que pogués plegar-se adequadament en absència de glicosilació, mantindria la viabilitat cel·lular.

Cal remarcar que el tractament amb Endo H de la proteïna Rot1^{N103, 107, 139Q} no recupera la mobilitat electroforètica teòrica esperada per a Rot1. Aquest fet suggereix que l'N glicosilació no siga l'única modificació posttraduccional de Rot1. Hem estudiat si altres tipus de modificacions podrien ser conseqüència d'aquesta mobilitat alterada de Rot1. El fet que no s'altere la mobilitat electroforètica en els diferents mutants d'O-glicosilació suggereix que Rot1 no està O-glicosilada encara que en principi no es podria descartar totalment aquesta possibilitat si hi hagués redundància funcional entre diferents proteïnes Pmt. No obstant, un resultat que recolza que la proteïna Rot1 no està O-glicosilada és que en les soques mutant *sec61* i *sec62* en les que Rot1 no es transloca al reticle endoplasmàtic i per tant no es glicosila, el canvi de mobilitat electroforètica és el mateix a l'observat quan s'elimina l'N-glicosilació per digestió amb Endo H, la qual cosa descarta l'existència d'altres modificacions per glicosilació. Per altra banda, en l'estudi on per primera vegada es va identificar Rot1 (Bickle et al., 1998) es comenta que la seqüència de Rot1 anotada en la base de dades conté una errada i que la presència d'un nucleòtid addicional al final de l'extrem 3' extendria la seqüència de proteïnes predita en 58 aminoàcids. No obstant això, (Machi et al., 2004) i nosaltres hem seqüenciat aquesta regió de *ROTI* i hem comprovat que la seqüència descrita en la base de dades és correcta. Encara que la presència d'altre tipus de modificació no es pot descartar, la migració anòmala de la proteïna podria deure's a l'estructura d'aquesta, ja que Rot1 és una proteïna relativament electronegativa amb un nombre elevat de prolines.

El fet que Rot1 siga una proteïna glicosilada és molt útil per a desvetlar la topologia de la proteïna en la membrana. En cèl·lules eucariotes, l'activitat de glicosilació la porta a terme l'enzim oligosiltransferasa (OST) localitzada en el lumen del RE (Knauer and Lehle, 1999). Per a què un lloc

potencial d'N glicosilació s'utilitza, s'ha de localitzar dins del lumen del RE i el tamany del *loop* hidrofílic deu ser almenys de 33 aminoàcids de longitud (Landolt-Marticorena and Reithmeier, 1994; Nilsson and von Heijne, 1993). A més a més, per a què la OST pugui N glicosilar, es requereix un espai adequat des de la superfície de la membrana del lloc acceptor fins el *loop* luminal de la proteïna de membrana: el residu N es localitza com a mínim 12 residus per davant i 14 residus per darrere del segment transmembrana (van Geest M. and Lolkema, 2000). En aquest treball, hem demostrat clarament que Rot1 és una proteïna glicosilada en les Asn 103, 107 i 139, la qual cosa implica que almenys la regió central de la proteïna, que va des de l'aminoàcid 91 fins al 153, deu tenir orientació luminal. Seria possible que la proteïna tinguera un llaç citosòlic per davant (entre els aminoàcids 1 i 91) o per darrere (entre els aminoàcids 151 al 256) d'aquesta regió. No obstant, si aquest fora el cas en la proteïna hauria d'existir un altre domini transmembrana i l'anàlisi de seqüència de la proteïna indica que aquest no és el cas. De fet, els assajos de protecció a la proteïnasa K confirmen l'orientació luminal de la proteïna Rot1.

Un aspecte important de Rot1 és com la proteïna es dirigeix i transloca al reticle endoplasmàtic. La translocació de polipèptids al RE ocorre en el translocó que és una estructura en forma de canal (Rapoport, 2007). El direccionament de proteïnes cap al translocó ocorre per dues rutes diferents: per un mecanisme cotraduccional dependent de SRP (ruta majoritària) o per un mecanisme independent de SRP que és capaç de dirigir els polipèptids a la membrana del RE de forma posttraduccional (ruta minoritària). Aquest últim procés pot ocórrer per mecanismes diferents: a través d'una ruta que implica el complex Sec62/Sec63 o a través d'una ruta on participa el complex TRC per la qual s'ancoren les proteïnes anomenades *tail-anchored proteins*. Aquestes últimes proteïnes ancorades en la membrana per l'extrem C-terminal s'orienten amb l'extrem N-terminal cap al citosol. És evident que encara que Rot1 s'ancora en la membrana per

l'extrem C-terminal no correspon al grup de *tail-anchored proteins* ja que s'orienta cap al lumen del reticle endoplasmàtic. De fet, els nostres resultats demostren que Rot1 es dirigeix a la membrana del RE per un mecanisme posttraduccional independent de SRP que implica el complex Sec62/Sec63. Aquest resultat podria ser sorprenent ja que normalment les proteïnes N-glicosilades s'inserten de forma cotraduccional en la membrana del RE. No obstant, cal destacar que recentement s'han descrit proteïnes N-glicosilades que són insertades posttraduccionalment com el factor VII de la coagulació en humans (Bolt et al., 2005) i la proteïna gran de la coberta del virus de l'hepatitis B (HBV) (Lambert and Prange, 2007).

Una qüestió queda oberta en la localització de Rot1: quina és la seqüència senyal reconeguda en el transport posttraduccional de la proteïna? Les proteïnes contenen seqüències senyal que normalment se situen en el domini N-terminal (encara que poden localitzar-se en qualsevol altra regió de la proteïna) que dirigeixen els polipèptids o bé cotraduccionalment o posttraduccionalment a la membrana del reticle endoplasmàtic. En el cas de Rot1, s'ha predit per anàlisi de la seqüència l'existència d'una seqüència senyal processable a l'extrem N-terminal de la proteïna. No obstant, els nostres resultats contradiuen aquesta possibilitat, ja que la proteïna truncada per l'extrem N-terminal és capaç de translocar-se al reticle. Hem demostrat que la seqüència senyal de Rot1 no està ni en l'extrem N-terminal ni en l'extrem C-terminal perquè les proteïnes truncades independentment o simultàniament en aquests extrems estan glicosilades i per tant s'han translocat al reticle. Per tant, Rot1 deu tenir el senyal de direccionament en la regió central de la proteïna entre l'aminoàcid 26 i el 228, ja que la proteïna Rot1 que conté aquesta regió central de Rot1 es transloca eficientment al reticle endoplasmàtic. Quan s'eliminen les seqüències entre l'aminoàcid 25 al 60 i entre l'aminoàcid 200 al 229 de la proteïna observem un defecte en la glicosilació, la qual cosa podria suggerir que existira un defecte en la translocació. No obstant, és necessari continuar aquest estudi analitzant la

localització subcel·lular ja que també seria possible que el procés afectat en aquestes proteïnes no fora la translocació sinó directament la glicosilació.

Durant aquest treball, hem observat que Rot1 és relativament inestable i hem demostrat que la seua degradació es porta a terme en el proteasoma. Dins de les diferents vies del sistema ubiquitina-proteasoma estudiades hem vist que Rot1 es degrada independentment de la ruta ERAD i de la ruta SCF però el procés és dependent de la ruta APC ja que Rot1 és estable en una soca mutant *apc2*. Sorprenentment, Rot1 es degrada en els mutants de les subunitats activadores del complex APC Cdc20 o Cdh1. Es podria pensar que l'activitat de qualsevol d'aquestes subunitats fóra suficient per a degradar Rot1, però s'ha d'aclarir que en un mutant *cdc20*, la subunitat Cdh1 encara no s'ha activat per la qual cosa la cèl·lula està mancant d'ambdues activadores. Es podria pensar que en la degradació de Rot1 estiguera implicada altra subunitat activadora del complex APC desconeguda fins ara. Per altra banda, en assajos *in vitro* han determinat que determinades proteïnes del complex APC són capaces d'ubiquitinar substrats inespecíficament en absència de les proteïnes activadores (Tang et al., 2001), pel que també es podria plantejar la possibilitat que la degradació de Rot1 no requerira ninguna subunitat activadora.

Per altra banda, hem identificat que la regió des de l'aminoàcid 1 al 25 és responsable de la inestabilitat de Rot1. L'eliminació d'aquests 25 aminoàcids de Rot1 afecta la viabilitat cel·lular, la qual cosa indica que el domini N-terminal de la proteïna és essencial per a la seua funció. Una hipòtesi atractiva que es deriva d'aquest resultat és que el control de l'estabilitat de Rot1 podria ser important per a la seua funcionalitat.

6. Conclusions

1. La inactivació de *ROT1* origina un defecte en la progressió del cicle cel.lular amb l'acumulació de cèl.lules en les últimes etapes de divisió cel.lular i l'aparició de cèl.lules regemmades. Encara que el correcte funcionament de l'anell contràctil d'actomiosina origina la divisió citoplasmàtica entre les cèl.lules mare i filla, les cèl.lules mutants *rot1* no finalitzen correctament la divisió cel.lular per un defecte en la septació.

2. Rot1 està implicat en el funcionament del citoesquelet d'actina. Encara que no és necessari per al procés de gemmació, Rot1 és essencial per al manteniment del creixement apical en la gemma i per a la repolarització del citoesquelet d'actina al coll entre la cèl.lula mare i filla al final de la mitosi. La supressió del mutant *cdc42* per la sobreexpressió de *ROT1* i la letalitat sintètica entre la mutació *rot1* i mutacions en la ruta d'integritat cel.lular (ruta PKC) reforcen la connexió entre Rot1 i el citoesquelet d'actina.

3. Les funcions del citoesquelet d'actina afectades en el mutant *rot1* i el fet que la inactivació de *ROT1* suprimeix el defecte d'hiperpolarització del mutant *clb2* però no la hiperpolarització de cèl.lules que sobreexpressen *CLN2*, indica que Rot1 afecta exclusivament els processos del citoesquelet d'actina regulats per Clb2 i no per Cln2.

4. Dades genètiques i fenotípiques reflecten un antagonisme funcional entre Rot1 i Clb2 en el control del citoesquelet d'actina al llarg del cicle cel.lular. Les cèl.lules *rot1* són hipersensibles a la sobreexpressió de Clb2 mentre que la seua letalitat se suprimeix per la deleció *clb2*. A més a més, les mutacions *rot1* i *clb2* originen efectes contraris en la funció del citoesquelet d'actina, de fet, aquests efectes es compensen en les cèl.lules doble mutant *clb2 rot1*.

5. Rot1 controla l'estabilitat de la ciclina Clb2. En les cèl.lules mutants *rot1* s'activa la ruta MEN i la fosfatasa Cdc14 però no la degradació de Clb2. De fet, la inactivació de *ROT1* en cèl.lules que estan degradant activament Clb2 origina l'estabilització de la ciclina.

6. A més del control de la degradació de Clb2, les interaccions sintètiques de *ROT1* amb gens implicats en el proteasoma, les ubiquitin-ligases APC o SCF, i la possible participació de Rot1 en la degradació de Cln2 i substrats de les rutes de degradació de la regla de l'N-terminal i UFD suggereixen una connexió funcional entre Rot1 i el sistema d'ubiquitinació i degradació de proteïnes pel proteasoma.

7. Rot1 és una proteïna integral de membrana localitzada principalment en la membrana del reticle endoplasmàtic/embolcall nuclear. L'estudi topològic indica que la proteïna presenta una orientació luminal.

8. Rot1 és una proteïna modificada per *N*-glicosilació en les posicions Asn 103, 107 i 139. La glicosilació no és essencial per a la viabilitat cel.lular però és requerida per a la total funcionalitat de la proteïna. A més, Rot1 no està modificada per un grup GPI ni *O*-glicosilada.

9. L'extrem C-terminal (aminoàcids 229-256) és necessari per a l'ancoratge de la proteïna a la membrana i a més té un paper essencial per a la funció de la proteïna.

10. L'extrem N-terminal (aminoàcids 1-25) és essencial per la funcionalitat de Rot1 però no és necessari per a la translocació, descartant-se per tant la presència d'una suposada seqüència senyal en aquest extrem.

11. Rot1 s'inserta en el reticle endoplasmàtic a través del translocó Sec61 per un mecanisme posttraducciona l independent de SRP i dependent del complex Sec62/Sec63. L'anàlisi de diferents versions truncades de la proteïna Rot1 indica que ni la regió des de l'aminoàcid 1 fins al 90 ni la regió des del 200 fins al 256 són necessàries per a dirigir la proteïna al reticle. Aquest estudi suggereix que les regions entre l'aminoàcid 25 al 60 i entre l'aminoàcid 200 al 229 són importants per a l'eficient translocació de Rot1 al reticle endoplasmàtic.

12. Rot1 es una proteïna relativament inestable. Els 25 primers aminoàcids de Rot1 són responsables de la inestabilitat de la proteïna en la cèl.lula. Rot1 es degrada pel sistema ubiquitina-proteasoma. La degradació de Rot1 no depèn de la ruta ERAD ni de la ruta SCF pero sí del complex APC, encara que no de les seues subunitats activadores Cdc20 i Cdh1.

Conclusions

7. Bibliografia

- Adamo, J.E., Moskow, J.J., Gladfelter, A.S., Viterbo, D., Lew, D.J., and Brennwald, P.J. (2001). Yeast Cdc42 functions at a late step in exocytosis, specifically during polarized growth of the emerging bud. *J. Cell Biol.* *155*, 581-592.
- Adamo, J.E., Rossi, G., and Brennwald, P. (1999). The Rho GTPase Rho3 has a direct role in exocytosis that is distinct from its role in actin polarity. *Mol. Biol. Cell* *10*, 4121-4133.
- Adams, A.E., Johnson, D.I., Longnecker, R.M., Sloat, B.F., and Pringle, J.R. (1990). CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* *111*, 131-142.
- 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*, 433-443.

- Amon,A., Irniger,S., and Nasmyth,K. (1994). Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins in the next cycle. *Cell* 77, 1037-1050.
- Andrews,B. and Measday,V. (1998). The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea. *Trends Genet.* 14, 66-72.
- Arkowitz,R.A. and Lowe,N. (1997). A small conserved domain in the yeast Spa2p is necessary and sufficient for its polarized localization. *J. Cell Biol.* 138, 17-36.
- 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, 516-519.
- Bachmair,A., Finley,D., and Varshavsky,A. (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234, 179-186.
- Bahler,J. (2005). Cell-cycle control of gene expression in budding and fission yeast. *Annu. Rev. Genet.* 39, 69-94.
- 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, 1127-1138.
- 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, 5267-5275.
- Bi,E., Maddox,P., Lew,D.J., Salmon,E.D., McMillan,J.N., Yeh,E., and Pringle,J.R. (1998). Involvement of an actomyosin contractile ring in *Saccharomyces cerevisiae* cytokinesis. *J. Cell Biol.* 142, 1301-1312.
- 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, 2235-2245.
- Bidlingmaier,S. and Snyder,M. (2004). Regulation of polarized growth initiation and termination cycles by the polarisome and Cdc42 regulators. *J. Cell Biol.* 164, 207-218.

- Blondel,M., Bach,S., Bamps,S., Dobbelaere,J., Wiget,P., Longaretti,C., Barral,Y., Meijer,L., and Peter,M. (2005). Degradation of Hof1 by SCF(Grr1) is important for actomyosin contraction during cytokinesis in yeast. *EMBO J.* *24*, 1440-1452.
- Bolt,G., Kristensen,C., and Steenstrup,T.D. (2005). Posttranslational N-glycosylation takes place during the normal processing of human coagulation factor VII. *Glycobiology* *15*, 541-547.
- Bosl,W.J. and Li,R. (2005). Mitotic-exit control as an evolved complex system. *Cell* *121*, 325-333.
- Breedeen,L.L. (2003). Periodic transcription: a cycle within a cycle. *Curr. Biol.* *13*, R31-R38.
- Breedeen,L.L. (2000). Cyclin transcription: Timing is everything. *Curr. Biol.* *10*, R586-R588.
- 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*, 1053-1068.
- Brown,J.L., Jaquenoud,M., Gulli,M.P., Chant,J., and Peter,M. (1997). Novel Cdc42-binding proteins Gic1 and Gic2 control cell polarity in yeast. *Genes Dev.* *11*, 2972-2982.
- Butty,A.C., Perrinjaquet,N., Petit,A., Jaquenoud,M., Segall,J.E., Hofmann,K., Zwahlen,C., and Peter,M. (2002). A positive feedback loop stabilizes the guanine-nucleotide exchange factor Cdc24 at sites of polarization. *EMBO J.* *21*, 1565-1576.
- Cabib,E. (2004). The septation apparatus, a chitin-requiring machine in budding yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* *426*, 201-207.
- Cabib,E., Roh,D.H., Schmidt,M., Crotti,L.B., and Varma,A. (2001). The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J. Biol. Chem.* *276*, 19679-19682.
- Cai,G., Salonikidis,P.S., Fei,J., Schwarz,W., Schulein,R., Reutter,W., and Fan,H. (2005). The role of N-glycosylation in the stability, trafficking and GABA-uptake of GABA-transporter 1. Terminal N-glycans facilitate efficient GABA-uptake activity of the GABA transporter. *FEBS J.* *272*, 1625-1638.

- Caro,L.H., Tettelin,H., Vossen,J.H., Ram,A.F., van den,E.H., and Klis,F.M. (1997). In silico identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *13*, 1477-1489.
- Casamayor,A. and Snyder,M. (2002). Bud-site selection and cell polarity in budding yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* *5*, 179-186.
- Chang,F. and Peter,M. (2003). Yeasts make their mark. *Nat. Cell Biol.* *5*, 294-299.
- Chant,J. (1999). Cell polarity in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *15*, 365-391.
- Chant,J. and Pringle,J.R. (1995). Patterns of bud-site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* *129*, 751-765.
- Chavan,M., Yan,A., and Lennarz,W.J. (2005). Subunits of the translocon interact with components of the oligosaccharyl transferase complex. *J. Biol. Chem.* *280*, 22917-22924.
- Chen,G.C., Kim,Y.J., and Chan,C.S. (1997). The Cdc42 GTPase-associated proteins Gic1 and Gic2 are required for polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* *11*, 2958-2971.
- 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*, 65-73.
- Corbett,M., Xiong,Y., Boyne,J.R., Wright,D.J., Munro,E., and Price,C. (2006). IQGAP and mitotic exit network (MEN) proteins are required for cytokinesis and re-polarization of the actin cytoskeleton in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Cell Biol.* *85*, 1201-1215.
- 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*, 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*, 1162-1178.

- 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*, 5277-5286.
- D'Amours,D. and Amon,A. (2004). At the interface between signaling and executing anaphase--Cdc14 and the FEAR network. *Genes Dev.* *18*, 2581-2595.
- 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*, 887-898.
- Deng,M. and Hochstrasser,M. (2006). Spatially regulated ubiquitin ligation by an ER/nuclear membrane ligase. *Nature* *443*, 827-831.
- DeSalle,L.M. and Pagano,M. (2001). Regulation of the G1 to S transition by the ubiquitin pathway. *FEBS Lett.* *490*, 179-189.
- 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*, 173-182.
- Dong,Y., Pruyne,D., and Bretscher,A. (2003). Formin-dependent actin assembly is regulated by distinct modes of Rho signaling in yeast. *J. Cell Biol.* *161*, 1081-1092.
- Drees,B.L., Sundin,B., Brazeau,E., Caviston,J.P., Chen,G.C., Guo,W., Kozminski,K.G., Lau,M.W., Moskow,J.J., Tong,A., Schenkman,L.R., McKenzie,A., III, Brennwald,P., Longtine,M., Bi,E., Chan,C., Novick,P., Boone,C., Pringle,J.R., Davis,T.N., Fields,S., and Drubin,D.G. (2001). A protein interaction map for cell polarity development. *J. Cell Biol.* *154*, 549-571.
- Drubin,D.G. and Nelson,W.J. (1996). Origins of cell polarity. *Cell* *84*, 335-344.
- Drury,L.S., Perkins,G., and Diffley,J.F. (2000). The cyclin-dependent kinase Cdc28p regulates distinct modes of Cdc6p proteolysis during the budding yeast cell cycle. *Curr. Biol.* *10*, 231-240.
- Ecker,M., Mrsa,V., Hagen,I., Deutzmann,R., Strahl,S., and Tanner,W. (2003). O-mannosylation precedes and potentially controls the N-glycosylation of a yeast cell wall glycoprotein. *EMBO Rep.* *4*, 628-632.
- Edgington,N.P. and Futcher,B. (2001). Relationship between the function and the location of G1 cyclins in *S. cerevisiae*. *J. Cell Sci.* *114*, 4599-4611.

- Eluere,R., Offner,N., Varlet,I., Motteux,O., Signon,L., Picard,A., Bailly,E., and Simon,M.N. (2007). Compartmentalization of the functions and regulation of the mitotic cyclin Clb2 in *S. cerevisiae*. *J. Cell Sci.* *120*, 702-711.
- 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*, 1695-1706.
- Etienne-Manneville,S. and Hall,A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* *420*, 629-635.
- Evangelista,M., Blundell,K., Longtine,M.S., Chow,C.J., Adames,N., Pringle,J.R., Peter,M., and Boone,C. (1997). Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science* *276*, 118-122.
- Evangelista,M., Pruyne,D., Amberg,D.C., Boone,C., and Bretscher,A. (2002). Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat. Cell Biol.* *4*, 32-41.
- Fadri,M., Daquinag,A., Wang,S., Xue,T., and Kunz,J. (2005). The pleckstrin homology domain proteins Slm1 and Slm2 are required for actin cytoskeleton organization in yeast and bind phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and TORC2. *Mol. Biol. Cell* *16*, 1883-1900.
- 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*, 805-818.
- Frenz,L.M., Lee,S.E., Fesquet,D., and Johnston,L.H. (2000). The budding yeast Dbf2 protein kinase localises to the centrosome and moves to the bud neck in late mitosis. *J. Cell Sci.* *113 Pt 19*, 3399-3408.
- Frieman,M.B. and Cormack,B.P. (2004). Multiple sequence signals determine the distribution of glycosylphosphatidylinositol proteins between the plasma membrane and cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* *150*, 3105-3114.
- Frieman,M.B. and Cormack,B.P. (2003). The omega-site sequence of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae* can determine distribution between the membrane and the cell wall. *Mol. Microbiol.* *50*, 883-896.

- 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, 1221-1233.
- 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, 2803-2808.
- Gentzsch,M. and Tanner,W. (1997). Protein-O-glycosylation in yeast: protein-specific mannosyltransferases. *Glycobiology* 7, 481-486.
- Girrbach,V. and Strahl,S. (2003). Members of the evolutionarily conserved PMT family of protein O-mannosyltransferases form distinct protein complexes among themselves. *J. Biol. Chem.* 278, 12554-12562.
- Goder,V. and Spiess,M. (2001). Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. *FEBS Lett.* 504, 87-93.
- 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, 2113-2125.
- 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, 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, 365-379.
- Guo,W., Tamanoi,F., and Novick,P. (2001). Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. *Nat. Cell Biol.* 3, 353-360.
- 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, 38-42.
- Halic,M. and Beckmann,R. (2005). The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 116-125.
- Hampton,R.Y. (2002). Proteolysis and sterol regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 345-378.

- 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*, 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*, 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*, 3046-3060.
- Herscovics,A. and Orlean,P. (1993). Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB J.* *7*, 540-550.
- High,S. and Dobberstein,B. (1992). Mechanisms that determine the transmembrane disposition of proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* *4*, 581-586.
- Hitchcock,A.L., Auld,K., Gygi,S.P., and Silver,P.A. (2003). A subset of membrane-associated proteins is ubiquitinated in response to mutations in the endoplasmic reticulum degradation machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 12735-12740.
- Hochstrasser,M., Johnson,P.R., Arendt,C.S., Amerik,A.Y., Swaminathan,S., Swanson,R., Li,S.J., Laney,J., Pals-Rylaarsdam,R., Nowak,J., and Connerly,P.L. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* ubiquitin-proteasome system. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* *354*, 1513-1522.
- Hofken,T. and Schiebel,E. (2004). Novel regulation of mitotic exit by the Cdc42 effectors Gic1 and Gic2. *J. Cell Biol.* *164*, 219-231.
- Hofken,T. and Schiebel,E. (2002). A role for cell polarity proteins in mitotic exit. *EMBO J.* *21*, 4851-4862.
- Hwa,L.H., Yeong,F.M., and Surana,U. (2003). Inactivation of mitotic kinase triggers translocation of MEN components to mother-daughter neck in yeast. *Mol. Biol. Cell* *14*, 4734-4743.
- Ikezawa,H. (2002). Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. *Biol. Pharm. Bull.* *25*, 409-417.

- Immervoll,T., Gentsch,M., and Tanner,W. (1995). PMT3 and PMT4, two new members of the protein-O-mannosyltransferase gene family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11, 1345-1351.
- Iraoqui,J.E., Gladfelter,A.S., and Lew,D.J. (2003). Scaffold-mediated symmetry breaking by Cdc42p. *Nat. Cell Biol.* 5, 1062-1070.
- Iraoqui,J.E., Howell,A.S., Theesfeld,C.L., and Lew,D.J. (2005). Opposing roles for actin in Cdc42p polarization. *Mol. Biol. Cell* 16, 1296-1304.
- 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, 4569-4574.
- Iwase,M., Luo,J., Bi,E., and Toh,E. (2007). Shs1 plays separable roles in septin organization and cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*.
- Iwase,M., Luo,J., Nagaraj,S., Longtine,M., Kim,H.B., Haarer,B.K., Caruso,C., Tong,Z., Pringle,J.R., and Bi,E. (2006). Role of a Cdc42p effector pathway in recruitment of the yeast septins to the presumptive bud site. *Mol. Biol. Cell* 17, 1110-1125.
- 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, 533-538.
- Jaffe,A.B. and Hall,A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 247-269.
- Jaspersen,S.L., Charles,J.F., Tinker-Kulberg,R.L., and Morgan,D.O. (1998). A late mitotic regulatory network controlling cyclin destruction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 9, 2803-2817.
- Johnson,E.S., Ma,P.C., Ota,I.M., and Varshavsky,A. (1995). A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J. Biol. Chem.* 270, 17442-17456.
- Joo,E., Tsang,C.W., and Trimble,W.S. (2005). Septins: traffic control at the cytokinesis intersection. *Traffic.* 6, 626-634.
- Jorgensen,P. and Tyers,M. (1999). Altered states: programmed proteolysis and the budding yeast cell cycle. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 610-617.

- Kang,S.W., Rane,N.S., Kim,S.J., Garrison,J.L., Taunton,J., and Hegde,R.S. (2006). Substrate-specific translocational attenuation during ER stress defines a pre-emptive quality control pathway. *Cell* 127, 999-1013.
- Kawaguchi,S. and Ng,D.T. (2007). SnapShot: ER-associated protein degradation pathways. *Cell* 129, 1230.
- Kelleher,D.J. and Gilmore,R. (2006). An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology* 16, 47R-62R.
- Kinoshita,M. (2006). Diversity of septin scaffolds. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 54-60.
- Knauer,R. and Lehle,L. (1999). The oligosaccharyltransferase complex from yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1426, 259-273.
- Kostova,Z. and Wolf,D.H. (2003). For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *EMBO J.* 22, 2309-2317.
- Kron,S.J. and Gow,N.A. (1995). Budding yeast morphogenesis: signalling, cytoskeleton and cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 845-855.
- Lambert,C. and Prange,R. (2007). Posttranslational N-glycosylation of the hepatitis B virus large envelope protein. *Virol. J.* 4, 45.
- Landolt-Marticorena,C. and Reithmeier,R.A. (1994). Asparagine-linked oligosaccharides are localized to single extracytosolic segments in multi-span membrane glycoproteins. *Biochem. J.* 302 (Pt 1), 253-260.
- Lee,S.E., Frenz,L.M., Wells,N.J., Johnson,A.L., and Johnston,L.H. (2001). Order of function of the budding-yeast mitotic exit-network proteins Tem1, Cdc15, Mob1, Dbf2, and Cdc5. *Curr. Biol.* 11, 784-788.
- Lemmon,M.A. and Engelman,D.M. (1994). Specificity and promiscuity in membrane helix interactions. *FEBS Lett.* 346, 17-20.
- 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, 1067-1078.
- Levin,D.E. (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 262-291.

- Lew,D.J. (2000). Cell-cycle checkpoints that ensure coordination between nuclear and cytoplasmic events in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *10*, 47-53.
- Lew,D.J. and Reed,S.I. (1995b). Cell cycle control of morphogenesis in budding yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *5*, 17-23.
- Lew,D.J. and Reed,S.I. (1993). Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *J. Cell Biol.* *120*, 1305-1320.
- Lew,D.J. and Reed,S.I. (1995a). A cell cycle checkpoint monitors cell morphogenesis in budding yeast. *J. Cell Biol.* *129*, 739-749.
- Lindqvist,A., van,Z.W., Karlsson,R.C., and Wolthuis,R.M. (2007). Cyclin B1-Cdk1 activation continues after centrosome separation to control mitotic progression. *PLoS. Biol.* *5*, e123.
- Lindsey,R. and Momany,M. (2006). Septin localization across kingdoms: three themes with variations. *Curr. Opin. Microbiol.* *9*, 559-565.
- Lippincott,J. and Li,R. (1998). Sequential assembly of myosin II, an IQGAP-like protein, and filamentous actin to a ring structure involved in budding yeast cytokinesis. *J. Cell Biol.* *140*, 355-366.
- Lippincott,J., Shannon,K.B., Shou,W., Deshaies,R.J., and Li,R. (2001). The Tem1 small GTPase controls actomyosin and septin dynamics during cytokinesis. *J. Cell Sci.* *114*, 1379-1386.
- Loewith,R., Jacinto,E., Wullschleger,S., Lorberg,A., Crespo,J.L., Bonenfant,D., Oppliger,W., Jenoe,P., and Hall,M.N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell* *10*, 457-468.
- 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*, 953-961.
- Loog,M. and Morgan,D.O. (2005). Cyclin specificity in the phosphorylation of cyclin-dependent kinase substrates. *Nature* *434*, 104-108.

- Luca, F.C., Mody, M., Kurischko, C., Roof, D.M., Giddings, T.H., and Winey, M. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* Mob1p is required for cytokinesis and mitotic exit. *Mol. Cell Biol.* *21*, 6972-6983.
- Luirink, J. and Sinning, I. (2004). SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim. Biophys. Acta* *1694*, 17-35.
- Lussier, M., Gentsch, M., Sdicu, A.M., Bussey, H., and Tanner, W. (1995). Protein O-glycosylation in yeast. The PMT2 gene specifies a second protein O-mannosyltransferase that functions in addition to the PMT1-encoded activity. *J. Biol. Chem.* *270*, 2770-2775.
- Machi, K., Azuma, M., Igarashi, K., Matsumoto, T., Fukuda, H., Kondo, A., and Ooshima, H. (2004). Rot1p of *Saccharomyces cerevisiae* is a putative membrane protein required for normal levels of the cell wall 1,6-beta-glucan. *Microbiology* *150*, 3163-3173.
- Madhani, H.D. and Fink, G.R. (1998). The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. *Trends Cell Biol.* *8*, 348-353.
- Mandon, E.C. and Gilmore, R. (2007). The tail end of membrane insertion. *Cell* *128*, 1031-1032.
- Matlack, K.E., Misselwitz, B., Plath, K., and Rapoport, T.A. (1999). BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* *97*, 553-564.
- 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*, 5690-5699.
- 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*, 1821-1833.
- McCracken, A.A. and Brodsky, J.L. (1996). Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *J. Cell Biol.* *132*, 291-298.
- McCusker, D., Denison, C., Anderson, S., Egelhofer, T.A., Yates, J.R., III, Gygi, S.P., and Kellogg, D.R. (2007). Cdk1 coordinates cell-surface growth with the cell cycle. *Nat. Cell Biol.* *9*, 506-515.

- McKinney, J.D., Chang, F., Heintz, N., and Cross, F.R. (1993). Negative regulation of FAR1 at the Start of the yeast cell cycle. *Genes Dev.* *7*, 833-843.
- 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*, 1191-1243.
- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., and Sommer, T. (2005). ERAD: the long road to destruction. *Nat. Cell Biol.* *7*, 766-772.
- 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*, 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*, 1811-1820.
- Mitra, N., Sinha, S., Ramya, T.N., and Surolia, A. (2006). N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends Biochem. Sci.* *31*, 156-163.
- 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*, 59-66.
- Molk, J.N., Schuyler, S.C., Liu, J.Y., Evans, J.G., Salmon, E.D., Pellman, D., and Bloom, K. (2004). The differential roles of budding yeast Tem1p, Cdc15p, and Bub2p protein dynamics in mitotic exit. *Mol. Biol. Cell* *15*, 1519-1532.
- 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*, E47-E53.
- Moseley, J.B. and Goode, B.L. (2006). The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *70*, 605-645.
- Mrsa, V., Seidl, T., Gentzsch, M., and Tanner, W. (1997). Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *13*, 1145-1154.
- Murray, A.W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* *116*, 221-234.

- Nanduri,J. and Tartakoff,A.M. (2001). The arrest of secretion response in yeast: signaling from the secretory path to the nucleus via Wsc proteins and Pkc1p. *Mol. Cell* 8, 281-289.
- Nasmyth,K. (1996). At the heart of the budding yeast cell cycle. *Trends Genet.* 12, 405-412.
- Nelson,W.J. (2003). Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* 422, 766-774.
- Ng,D.T., Brown,J.D., and Walter,P. (1996). Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J. Cell Biol.* 134, 269-278.
- Nilsson,I. and von Heijne,G. (2000). Glycosylation efficiency of Asn-Xaa-Thr sequons depends both on the distance from the C terminus and on the presence of a downstream transmembrane segment. *J. Biol. Chem.* 275, 17338-17343.
- Nilsson,I.M. and von Heijne,G. (1993). Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* 268, 5798-5801.
- Nuoffer,C., Jenö,P., Conzelmann,A., and Riezman,H. (1991). Determinants for glycosylphospholipid anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* GAS1 protein to the plasma membrane. *Mol. Cell Biol.* 11, 27-37.
- Orlowski,J., Machula,K., Janik,A., Zdebska,E., and Palamarczyk,G. (2007). Dissecting the role of dolichol in cell wall assembly in the yeast mutants impaired in early glycosylation reactions. *Yeast* 24, 239-252.
- Orzaez,M., Perez-Paya,E., and Mingarro,I. (2000). Influence of the C-terminus of the glycoporphin A transmembrane fragment on the dimerization process. *Protein Sci.* 9, 1246-1253.
- Ozaki-Kuroda,K., Yamamoto,Y., Nohara,H., Kinoshita,M., Fujiwara,T., Irie,K., and Takai,Y. (2001). Dynamic localization and function of Bni1p at the sites of directed growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 21, 827-839.
- Padmashree,C.G. and Surana,U. (2001). Cdc28-Clb mitotic kinase negatively regulates bud site assembly in the budding yeast. *J. Cell Sci.* 114, 207-218.
- Park,H.O. and Bi,E. (2007). Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 48-96.

- 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, 747-760.
- Peter, M. and Herskowitz, I. (1994). Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. *Science* 265, 1228-1231.
- Peter-Katalinic, J. (2005). Methods in enzymology: O-glycosylation of proteins. *Methods Enzymol.* 405, 139-171.
- Peters, J.M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell* 9, 931-943.
- Plath, K. and Rapoport, T.A. (2000). Spontaneous release of cytosolic proteins from posttranslational substrates before their transport into the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 151, 167-178.
- Popov, M., Tam, L.Y., Li, J., and Reithmeier, R.A. (1997). Mapping the ends of transmembrane segments in a polytopic membrane protein. Scanning N-glycosylation mutagenesis of extracytosolic loops in the anion exchanger, band 3. *J. Biol. Chem.* 272, 18325-18332.
- Pruyne, D. and Bretscher, A. (2000a). Polarization of cell growth in yeast. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 4), 571-585.
- Pruyne, D. and Bretscher, A. (2000b). Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 3), 365-375.
- Queralt, E., Lehane, C., Novak, B., and Uhlmann, F. (2006). Downregulation of PP2A(Cdc55) phosphatase by separase initiates mitotic exit in budding yeast. *Cell* 125, 719-732.
- Rapoport, T.A. (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* 450, 663-669.
- Rapoport, T.A., Goder, V., Heinrich, S.U., and Matlack, K.E. (2004). Membrane-protein integration and the role of the translocation channel. *Trends Cell Biol.* 14, 568-575.
- Ravid, T., Kreft, S.G., and Hochstrasser, M. (2006). Membrane and soluble substrates of the Doa10 ubiquitin ligase are degraded by distinct pathways. *EMBO J.* 25, 533-543.

- Richman,T.J., Sawyer,M.M., and Johnson,D.I. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* Cdc42p localizes to cellular membranes and clusters at sites of polarized growth. *Eukaryot. Cell* 1, 458-468.
- Richman,T.J., Sawyer,M.M., and Johnson,D.I. (1999). The Cdc42p GTPase is involved in a G2/M morphogenetic checkpoint regulating the apical-isotropic switch and nuclear division in yeast. *J. Biol. Chem.* 274, 16861-16870.
- Roberts,J.M. (1999). Evolving ideas about cyclins. *Cell* 98, 129-132.
- Robinson,N.G., Guo,L., Imai,J., Toh,E., Matsui,Y., and Tamanoi,F. (1999). Rho3 of *Saccharomyces cerevisiae*, which regulates the actin cytoskeleton and exocytosis, is a GTPase which interacts with Myo2 and Exo70. *Mol. Cell Biol.* 19, 3580-3587.
- Romisch,K. (2005). Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 435-456.
- Roumanie,O., Wu,H., Molk,J.N., Rossi,G., Bloom,K., and Brennwald,P. (2005). Rho GTPase regulation of exocytosis in yeast is independent of GTP hydrolysis and polarization of the exocyst complex. *J. Cell Biol.* 170, 583-594.
- Russell,S.J., Steger,K.A., and Johnston,S.A. (1999). Subcellular localization, stoichiometry, and protein levels of 26 S proteasome subunits in yeast. *J. Biol. Chem.* 274, 21943-21952.
- 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, 531-542.
- 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, 13780-13785.
- Schmidt,M., Bowers,B., Varma,A., Roh,D.H., and Cabib,E. (2002). In budding yeast, contraction of the actomyosin ring and formation of the primary septum at cytokinesis depend on each other. *J. Cell Sci.* 115, 293-302.
- Schmidt,M., Varma,A., Drgon,T., Bowers,B., and Cabib,E. (2003). Septins, under Cla4p regulation, and the chitin ring are required for neck integrity in budding yeast. *Mol. Biol. Cell* 14, 2128-2141.

- Schmitz,H.P., Huppert,S., Lorberg,A., and Heinisch,J.J. (2002). Rho5p downregulates the yeast cell integrity pathway. *J. Cell Sci.* *115*, 3139-3148.
- Schneider,B.L., Yang,Q.H., and Futcher,A.B. (1996). Linkage of replication to start by the Cdk inhibitor Sic1. *Science* *272*, 560-562.
- Schuldiner,M., Collins,S.R., Thompson,N.J., Denic,V., Bhamidipati,A., Punna,T., Ihmels,J., Andrews,B., Boone,C., Greenblatt,J.F., Weissman,J.S., and Krogan,N.J. (2005). Exploration of the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell* *123*, 507-519.
- 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*, 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*, 1160-1175.
- Shaw,J.A., Mol,P.C., Bowers,B., Silverman,S.J., Valdivieso,M.H., Duran,A., and Cabib,E. (1991). The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell Biol.* *114*, 111-123.
- Sheu,Y.J., Barral,Y., and Snyder,M. (2000). Polarized growth controls cell shape and bipolar bud site selection in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* *20*, 5235-5247.
- 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*, 4053-4069.
- Shih,J.L., Reck-Peterson,S.L., Newitt,R., Mooseker,M.S., Aebersold,R., and Herskowitz,I. (2005). Cell polarity protein Spa2P associates with proteins involved in actin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* *16*, 4595-4608.
- Simanis,V. (2003). Events at the end of mitosis in the budding and fission yeasts. *J. Cell Sci.* *116*, 4263-4275.
- 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*, 697-708.
- Snyder, M., Gehrung, S., and Page, B.D. (1991). Studies concerning the temporal and genetic control of cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* *114*, 515-532.
- 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*, 3273-3297.
- Spiliotis, E.T. and Nelson, W.J. (2006). Here come the septins: novel polymers that coordinate intracellular functions and organization. *J. Cell Sci.* *119*, 4-10.
- Steel, G.J., Brownsword, J., and Stirling, C.J. (2002). Tail-anchored protein insertion into yeast ER requires a novel posttranslational mechanism which is independent of the SEC machinery. *Biochemistry* *41*, 11914-11920.
- Stefanovic, S. and Hegde, R.S. (2007). Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. *Cell* *128*, 1147-1159.
- Stegmeier, F. and Amon, A. (2004). Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation. *Annu. Rev. Genet.* *38*, 203-232.
- Stegmeier, F., Visintin, R., and Amon, A. (2002). Separase, polo kinase, the kinetochore protein Slk19, and Spo12 function in a network that controls Cdc14 localization during early anaphase. *Cell* *108*, 207-220.
- Strahl-Bolsinger, S., Gentsch, M., and Tanner, W. (1999). Protein O-mannosylation. *Biochim. Biophys. Acta* *1426*, 297-307.
- Strahl-Bolsinger, S., Immervoll, T., Deutzmann, R., and Tanner, W. (1993). PMT1, the gene for a key enzyme of protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 8164-8168.
- 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*, 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, 145-161.
- Takeuchi,M., Kimata,Y., Hirata,A., Oka,M., and Kohno,K. (2006a). *Saccharomyces cerevisiae* Rot1p is an ER-localized membrane protein that may function with BiP/Kar2p in protein folding. *J. Biochem. (Tokyo)* 139, 597-605.
- Takeuchi,M., Kimata,Y., and Kohno,K. (2006b). Causal links between protein folding in the ER and events along the secretory pathway. *Autophagy*. 2, 323-324.
- Tang,Z., Li,B., Bharadwaj,R., Zhu,H., Ozkan,E., Hakala,K., Deisenhofer,J., and Yu,H. (2001). APC2 Cullin protein and APC11 RING protein comprise the minimal ubiquitin ligase module of the anaphase-promoting complex. *Mol. Biol. Cell* 12, 3839-3851.
- Tanner,W. and Lehle,L. (1987). Protein glycosylation in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 906, 81-99.
- Tcheperegine,S.E., Gao,X.D., and Bi,E. (2005). Regulation of cell polarity by interactions of Msb3 and Msb4 with Cdc42 and polarisome components. *Mol. Cell Biol.* 25, 8567-8580.
- Tjandra,H., Compton,J., and Kellogg,D. (1998). Control of mitotic events by the Cdc42 GTPase, the Clb2 cyclin and a member of the PAK kinase family. *Curr. Biol.* 8, 991-1000.
- Toenjes,K.A., Sawyer,M.M., and Johnson,D.I. (1999). The guanine-nucleotide-exchange factor Cdc24p is targeted to the nucleus and polarized growth sites. *Curr. Biol.* 9, 1183-1186.
- Tolliday,N., VerPlank,L., and Li,R. (2002). Rho1 directs formin-mediated actin ring assembly during budding yeast cytokinesis. *Curr. Biol.* 12, 1864-1870.
- 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, 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, 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*, 54-64.
- 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*, 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*, 1698-1703.
- van Geest M. and Lolkema,J.S. (2000). Membrane topology and insertion of membrane proteins: search for topogenic signals. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *64*, 13-33.
- Verges,E., Colomina,N., Gari,E., Gallego,C., and Aldea,M. (2007). Cyclin Cln3 is retained at the ER and released by the J chaperone Ydj1 in late G1 to trigger cell cycle entry. *Mol. Cell* *26*, 649-662.
- VerPlank,L. and Li,R. (2005). Cell cycle-regulated trafficking of Chs2 controls actomyosin ring stability during cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* *16*, 2529-2543.
- Versele,M. and Thorner,J. (2005). Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. *Trends Cell Biol.* *15*, 414-424.
- Visintin,R. and Amon,A. (2001). Regulation of the mitotic exit protein kinases Cdc15 and Dbf2. *Mol. Biol. Cell* *12*, 2961-2974.
- 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*, 709-718.
- von Heijne,G. and Manoil,C. (1990). Membrane proteins: from sequence to structure. *Protein Eng* *4*, 109-112.
- Vossen,J.H., Muller,W.H., Lipke,P.N., and Klis,F.M. (1997). Restrictive glycosylphosphatidylinositol anchor synthesis in *cwh6/gpi3* yeast cells causes aberrant biogenesis of cell wall proteins. *J. Bacteriol.* *179*, 2202-2209.
- 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*, 180-190.

- Wasch,R. and Cross,F.R. (2002). APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit. *Nature* 418, 556-562.
- Watanabe,T.K., Saito,A., Suzuki,M., Fujiwara,T., Takahashi,E., Slaughter,C.A., DeMartino,G.N., Hendil,K.B., Chung,C.H., Tanahashi,N., and Tanaka,K. (1998). cDNA cloning and characterization of a human proteasomal modulator subunit, p27 (PSMD9). *Genomics* 50, 241-250.
- Wedlich-Soldner,R., Wai,S.C., Schmidt,T., and Li,R. (2004). Robust cell polarity is a dynamic state established by coupling transport and GTPase signaling. *J. Cell Biol.* 166, 889-900.
- Weerapana,E. and Imperiali,B. (2006). Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology* 16, 91R-101R.
- 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, 11211-11217.
- Wilkinson,B.M., Esnault,Y., Craven,R.A., Skiba,F., Fieschi,J., K'epes,F., and Stirling,C.J. (1997). Molecular architecture of the ER translocase probed by chemical crosslinking of Sss1p to complementary fragments of Sec61p. *EMBO J.* 16, 4549-4559.
- Willems,A.R., Lanker,S., Patton,E.E., Craig,K.L., Nason,T.F., Mathias,N., Kobayashi,R., Wittenberg,C., and Tyers,M. (1996). Cdc53 targets phosphorylated G1 cyclins for degradation by the ubiquitin proteolytic pathway. *Cell* 86, 453-463.
- Wilmes,G.M., Archambault,V., Austin,R.J., Jacobson,M.D., Bell,S.P., and Cross,F.R. (2004). Interaction of the S-phase cyclin Clb5 with an "RXL" docking sequence in the initiator protein Orc6 provides an origin-localized replication control switch. *Genes Dev.* 18, 981-991.
- Xu,S., Huang,H.K., Kaiser,P., Latterich,M., and Hunter,T. (2000). Phosphorylation and spindle pole body localization of the Cdc15p mitotic regulatory protein kinase in budding yeast. *Curr. Biol.* 10, 329-332.
- Yabal,M., Brambillasca,S., Soffientini,P., Pedrazzini,E., Borgese,N., and Makarow,M. (2003). Translocation of the C terminus of a tail-anchored protein across the endoplasmic reticulum membrane in yeast mutants defective in signal peptide-driven translocation. *J. Biol. Chem.* 278, 3489-3496.

- Yeong,F.M., Lim,H.H., Padmashree,C.G., and Surana,U. (2000). Exit from mitosis in budding yeast: biphasic inactivation of the Cdc28-Clb2 mitotic kinase and the role of Cdc20. *Mol. Cell* 5, 501-511.
- Yoshida,S., Kono,K., Lowery,D.M., Bartolini,S., Yaffe,M.B., Ohya,Y., and Pellman,D. (2006). Polo-like kinase Cdc5 controls the local activation of Rho1 to promote cytokinesis. *Science* 313, 108-111.
- Yoshida,S. and Toh-e A (2001). Regulation of the localization of Dbf2 and mob1 during cell division of *saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet. Syst.* 76, 141-147.
- Zachariae,W. and Nasmyth,K. (1999). Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev.* 13, 2039-2058.
- Zhang,G., Kashimshetty,R., Ng,K.E., Tan,H.B., and Yeong,F.M. (2006). Exit from mitosis triggers Chs2p transport from the endoplasmic reticulum to mother-daughter neck via the secretory pathway in budding yeast. *J. Cell Biol.* 174, 207-220.
- 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, 46745-46750.
- Zhu,H., Bilgin,M., Bangham,R., Hall,D., Casamayor,A., Bertone,P., Lan,N., Jansen,R., Bidlingmaier,S., Houfek,T., Mitchell,T., Miller,P., Dean,R.A., Gerstein,M., and Snyder,M. (2001). Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* 293, 2101-2105.
- Ziman,M., Preuss,D., Mulholland,J., O'Brien,J.M., Botstein,D., and Johnson,D.I. (1993). Subcellular localization of Cdc42p, a *Saccharomyces cerevisiae* GTP-binding protein involved in the control of cell polarity. *Mol. Biol. Cell* 4, 1307-1316.