



VNIVERSITAT  VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

Mecanismes d'especificitat funcional dels complexes Cdk-Ciclins Cln

Inma Quilis Bayarri

Tesi Doctoral 2011



VNIVERSITAT  VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

**Mecanismes d'especificitat funcional dels
Complexes Cdk-Ciclins Cln**

Memòria presentada per
Inma Quilis Bayarri
Per a optar al grau de Doctora
per la Universitat de València

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

CERTIFICA que Inma Quilis Bayarri, Llicenciada en Bioquímica per la Universitat de València ha realitzat sota la seua direcció el treball que amb el títol “**Mecanismes d’especificitat funcional dels complexos Cdk-Ciclins Cln**” presenta per a optar al grau de Doctora per la Universitat de València.

Burjassot, Juliol de 2011

Dr. Juan Carlos Igual García

A mon iaio

Gràcies a tots aquells que han contribuït d'una forma o d'altra a la realització i presentació d'aquest treball.

Gràcies al Dr. Juan Carlos Igual, director de la tesi, per la seua supervisió i ajuda en cada etapa del treball, des del disseny experimental i l'anàlisi dels resultats fins a la correcció i edició d'aquest manuscrit.

Gràcies a tots els membres del Laboratori de Cicle Cel.lular per la seua contribució al funcionament del laboratori i per la seua ajuda incondicional.

Gràcies a tot el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular pels mitjans tècnics i humans que han facilitat aquest treball i pels consells i l'experiència de tots els que l'integren. Gràcies especialment al PAS: Juan Ramón, Pedro, María i la resta de Secretaria per la seua eficiència.

Gràcies a les estudiants que han participat en la realització d'algun experiment durant la seua tesi de màster: Berenice Juárez, Magda Gays i Raquel Sanz.

Gràcies a Quique i Vicent de Reprografia per l'ajuda.

Gràcies a tots els investigadors i grups que ens han facilitat materials o protocols o han col.laborat amb nosaltres d'alguna manera.

Gràcies a la Universitat de València i al Ministeri d'Educació i Ciència per la financiació d'aquest treball.

Els que consideren que la realització de la tesi doctoral implica només un aprenentatge científic ja han acabat de llegir. A tots aquells que, com jo, consideren que va lligat a un creixement personal els dedique la pàgina següent.

Gràcies de nou a Juan Carlos per deixar-me conèixer-lo un poc i per saber mantindre la meua admiració fins al final.

Gràcies a M^aCarmen per la seua alegria, per la seua facilitat per a llevar ferro a les coses i per la seua amistat.

Gràcies a Maria per ser la millor companya que podria haver tingut i per voler-me tant.

Gràcies a Carlos per la seua amabilitat i el seu companyerisme.

Gràcies a totes les meues ex-companyes de laboratori per haver sigut un exemple per a mi: Ethel, de capacitat de treball; Bárbara, de força i claredat d'idees; M^a Àngels, de constància, voluntat i transparència i Elena, d'optimisme i de tantes coses.

Gràcies als del laboratori veí que ens fan companyia en el segon pis. Gràcies a les meues amigues Lore i Ele que començaren aquest camí amb mi quan vam acabar Bioquímica i amb les que he compartit el millor i el pitjor d'aquesta història, sense vosaltres no haguera sigut el mateix. Gràcies a Paco Estruch per ser el primer en ensenyar-me un laboratori quan només era una estudiant i per moltes de les coses que han vingut després. Gràcies a Marce per la seua forma de ser i fer. Gràcies a Natalia i a Mercé per la seua ajuda i la seua naturalitat i capacitat d'escoltar.

Gràcies a Paula i Elena del pis de baix, que sempre estan disposades a ajudar científicament i amb les que sempre es pot mantindre una bona conversa extra-científica.

Gràcies a tots els vells companys amb que he compartit bons moments en tots aquests anys i als nous que fan cada dia més agradable, dins i fora del laboratori, especialment a Manolo, Raquel i Nerea que és com si formaren part del nostre grup.

Gràcies als meus companys de carrera que em van ajudar a disfrutar-la, especialment a Laura, a Salva i a Hugo.

Gràcies a les meues amigues de tota la vida, Carol i Laura que sempre s'interessen pel que faig i pel que em preocupa encara que de vegades no entenguen els rotllos que els pegue.

I falten els més importants:

Gràcies a tota la meua família, que m'ajuda sempre en tot el que pot i en més, i que, abans de que aquest treball estiguera acabat, ja sabien que eixiria bé. Gràcies per la vostra confiança.

Gràcies, per últim, a Jordi i a Laia. Simplement per estar amb mi, cada dia, donant-li sentit i perspectiva a les coses i per fer-me tan feliç.

ÍNDEX

1.Introducció	1
El cycle cel.lular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
Reguladors clau del cycle cel.lular.....	3
CDKs.....	3
Ciclins.....	4
CKIs.....	5
Dinàmica del cycle cel.lular.....	5
La transició G1-S.....	9
Regulació de la transcripció d'Start.....	9
Processos post-Start.....	13
La duplicació del SPB.....	13
El procés de gemmació.....	15
La replicació del DNA.....	19
Mecanismes d'especificitat funcional de ciclins.....	20
Les ciclins Cln1 i Cln2.....	25
Transport de proteïnes entre nucli-citoplasma i cycle cel.lular.....	27
Receptors de transport o carioferines.....	28
La via clàssica d'importació.....	31
L'exportina Xpo1.....	32
L'exportina Msn5.....	32
2.Materials i Mètodes	35
Tècniques en <i>Escherichia Coli</i>	35
Soques d' <i>E.Coli</i> i condicions de creixement.....	35
Protocol de transformació.....	35
Mutagènesi dirigida.....	36
Tècniques en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
Soques de <i>S.cerevisiae</i>	36
Condicions de creixement.....	36
Protocol de transformació.....	37

Vectors i esquemes de clonació.....	40
Assaig de pèrdua de plàsmid.....	43
Determinació del volum cel.lular.....	44
Determinació de l'índex de gemmació.....	44
Anàlisi del contingut de DNA.....	44
Coimmunoprecipitació.....	44
Tècniques de microscopia de fluorescència.....	45
Immunofluorescència indirecta.....	45
Tinció de nuclis.....	45
Localització de proteïnes amb marcatge GFP.....	45
<i>Western blot</i>	46
<i>Northern blot</i>	47

3.Base molecular de l'especificitat funcional de Cln2 respecte a Cln1.....	49
Determinació de la regió de la ciclina Cln2 responsable de la seua funcionalitat específica.....	49
La regió entre els aminoàcids 225 i 299 de Cln2 és necessària per a la seua funcionalitat específica.....	53
La regió entre els aminoàcids 225 i 299 de Cln2 és suficient per conferir a Cln1 la funcionalitat específica de Cln2.....	57
El nivell proteic de les ciclines no està relacionat amb la seua funcionalitat.....	63
Regulació espacial de les ciclines Cln1 i Cln2.....	64
Cln1 presenta una major acumulació nuclear que Cln2.....	64
Carioferines implicades en la importació i exportació de les ciclines Cln1 i Cln2.....	66
Rastreig de la regió implicada en l'exportació de la ciclina Cln2.....	72
Rastreig de la regió implicada en la importació de la ciclina Cln2.....	76
Regulació espacial de la ciclina Cln1.....	79

Implicació de mecanismes de regulació espacial en l'especificitat funcional de Cln1 i Cln2.....	81
Discussió.....	85
4.Degradació de les ciclines Cln1 i Cln2.....	92
Anàlisi de la degradació de les ciclines Cln1 i Cln2.....	92
Vies de degradació de les ciclines Cln1 i Cln2.....	93
Anàlisi funcional de les PEST.....	98
Anàlisi del nivell de les ciclines Cln1 i Cln2 en els mutants en carioferines.....	108
Discussió.....	116
5.Regulació espacial de Cdc24.....	125
Paper de Cdc24 en la funcionalitat específica de Cln2.....	125
L'eixida del nucli de Cdc24 es veu retrasada en un mutant <i>cln2</i>	125
El retràs en gemmació que s'observa en el mutant <i>cln2</i> és independent del defecte en l'eixida del nucli de Cdc24.....	128
Regulació espacial de Cdc24.....	130
Vies d'importació i exportació de Cdc24.....	130
Senyals de localització nuclear (NLS) i exportació (NES) en Cdc24.....	133
Discussió.....	139
6.Caracterització dels mutants en carioferines.....	145
7.Conclusions.....	161
8.Bibliografia.....	163

1. Introducció

Una de les preguntes clau que s'ha fet la biologia des que es va conèixer la cèl.lula és com una cèl.lula és capaç de dividir-se per a donar un altra cèl.lula tant en organismes unicel.lulars com en éssers pluricel.lulars simples o complexs, ja que la reproducció cel.lular és fonamental per al desenvolupament i funcionament de tota forma de vida. En organismes unicel.lulars, la divisió cel.lular genera un nou organisme complet. En el desenvolupament dels organismes pluricel.lulars, in comptables divisions transformen una única cèl.lula original en les diverses poblacions cel.lulars que constitueixen teixits i òrgans. En organismes adults, la divisió cel.lular proporciona les cèl.lules que substitueixen a aquelles que moren per causes naturals o per danys ambientals.

La resposta a la pregunta de com es divideixen les cèl.lules s'ha buscat en diferents organismes i ha resultat ser una sola per a tots ells: el cicle cel.lular, la successió ordenada de processos pels quals una cèl.lula creix i es divideix en dos, 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. En l'intent de d'esbrinar la complexa xarxa de mecanismes que governen el cicle cel.lular, un model ideal és aquell més senzill. Els sistemes més importants en l'estudi dels mecanismes

bàsics de control del cicle cel.lular han estat els llevats unicel.lulars de gemmació i de fissió i l'embrió de granota. La mosca de la fruita, el ratolí i les cèl.lules de mamífer en cultiu s'han emprat com a model d'organismes pluricel.lulars. En concret *Saccharomyces cerevisiae*, el llevat de gemmació, per la facilitat del seu cultiu i de modificació del seu genoma, ha esdevingut un dels organismes de més utilitat en la comprensió de 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 es segreguen els cromosomes i es divideixen les cèl.lules, i dos fases G1 i G2 (*gap*) que separen a les anteriors. Al final d'un cicle la cèl.lula ha completat quatre processos: créixer, replicar el DNA, segregar els cromosomes en dos conjunts iguals i dividir-se. En eixe moment la cèl.lula es troba de nou en fase G1 on resideix el màxim punt de control del cicle, anomenat Start (punt crític també per a 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 crescut suficient i les condicions mediambientals són les apropiades. A més, 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) parar el cicle en G1, entrant llavors a la fase G0; 3) en el cas de cèl.lules haploides respondre a la presència de feromones parant el cicle i activant el procés de conjugació (reproducció sexual); o 4) en el cas de cèl.lules diploides l'esperulació en condicions de limitació de nutrients.

Una vegada executat Start es posen en marxa els diferents processos post-Start: la gemmació, la duplicació del SPB (*spindle pole body*), l'equivalent en cèl.lules de llevat al centrosoma, i l'inici de la replicació del DNA. La formació de la gemma implica la polarització del citoesquelet d'actina i la secreció direccional de components necessaris per a formar la paret cel.lular. L'aparició i el tamany de la gemma han sigut molt útils com marcadors morfològics de les diferents fases de cicle cel.lular.

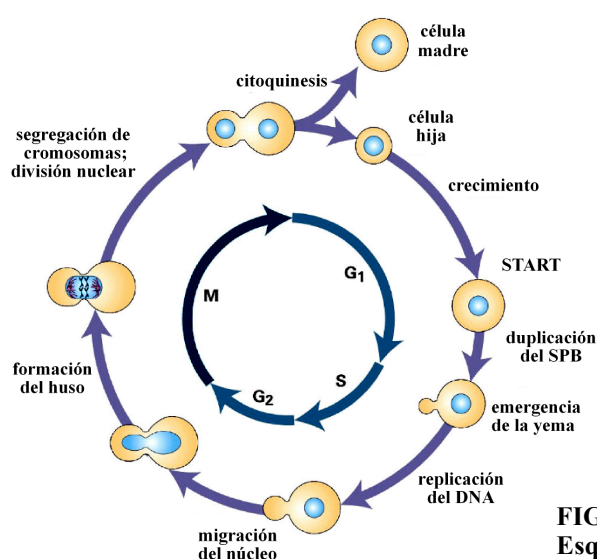


FIGURA 1.1.
Esquema del cicle cel·lular de *S. Cerevisiae*, (adaptada de Lodish *et al.*, 2004).

Reguladors clau del cicle cel·lular

En el centre dels mecanismes que regulen el cicle es situa una família de quinases denominades CDK (*cyclin-dependent kinases* o quinases dependents de ciclina) (Morgan, 1997; Roberts, 1999; Murray, 2004; Morgan, 2007; Enserink i Kolodner, 2010). L'activitat quinasa de les CDKs oscil·la al llarg del cicle i depèn 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 cicle) i a CKIs (proteïnes inhibidores).

CDKs

Saccharomyces cerevisiae té 5 CDKs però només una, Cdc28, és essencial en la regulació del cicle cel·lular sent la màxima responsable del control de les transicions G₁/S i G₂/M (Mendenhall i Hodge, 1998). Aquesta CDK rep el nom de Cdk1 en mamífers i és la responsable de la transició

G2/M, ja que el cicle cel.lular de mamífers està regulat per més CDKs, sent Cdk2 la màxima responsable de la transició G1/S. Les cèl.lules de mamífers contenen 2 CDKs més, Cdk4 i Cdk6, que són importants en la regulació de l'entrada al cicle cel.lular en resposta a factors extracel.lulars (Malumbres i Barbacid, 2005) No obstant, estudis recents amb “knock-outs” de ratolins han proposat que, de la mateixa forma que en *Saccharomyces cerevisiae*, només una CDK, Cdk1, és essencial per al manteniment del cicle cel.lular en la major part de les cèl.lules somàtiques, estant necessàries la resta de CDKs només en poblacions cel.lulars concretes (Santamaría *et al.*, 2007).

La CDK monomèrica no té activitat proteïna quinasa i la seua activació requereix 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 denominades CKIs (*CDK kinase inhibitors* o inhibidores de CDKs) 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* (Booher *et al.* 1993).

Ciclins

Les ciclins es defineixen com proteïnes amb capacitat d'unir i activar a la CDK. Presenten gran variabilitat, ja que només tenen un únic domini comú conservat denominat “caixa ciclina”. En *S.cerevisiae* existeixen nou ciclins diferents que formen complexos amb Cdc28 implicades en la regulació de la progressió del cicle cel.lular (Mendehall i Hodge, 1998 ; Andrews i Measday, 1998 ; Breeden, 2000 ; Miller i 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 i M (Clb1, Clb2, Clb3 i Clb4). Totes les ciclins són de síntesi periòdica i els seus nivells oscil·len fortament al llarg del cicle, excepte Cln3; el gen *CLN3* només presenta xicotets canvis en la seua expressió i els nivells de proteïna Cln3 són pràcticament constants al llarg del cicle cel.lular. A més d'activar a Cdc28 les ciclins participen aportant funcions específiques als complexos Cdc28-ciclina pel reconeixement de substrats o localitzant a la quinasa en

llocs concrets (Cross *et al.* 1999, Miller i Cross, 2000; Miller i Cross, 2001 ; Edgington i Futcher, 2001 ; Loog i Morgan, 2005).

CKIs

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 (Schwob *et al.* 1994; Schneider *et al.* 1996; Henchoz *et al.* 1997). Far1 és un inhibidor dels complexos Cdc28-Cln, però és inactiu front als complexos Cdc28-Clb (Tyers i Futcher, 1993; Peter i Herskowitz, 1994). 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 i Peter, 2001). Per la seua part, Sic1 és l'inhibidor dels complexos Cdc28-Clb, estant inactiu per als Cdc28-Cln (Mendenhall, 1993). Controla l'inici de la fase S (Schwob *et al.* 1994; Lengronne i Schwob, 2002) i és important per a l'eixida de mitosi (Visintin *et al.* 1998).

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. (Nashmyth, 1996; Mendenhall i 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. Al final de la fase G1, Cdc28-Cln3 promou l'entrada en una nova ronda de divisió en activar la transcripció mediada pels factors SBF i MBF (Constanzo *et al.* 2004; de Bruin *et al.* 2004), responsables de la transcripció periòdica de, entre d'altres, els gens *CLN1* i *CLN2*, i *CLB5* i *CLB6* respectivament. La síntesi de Cln1 i Cln2 promou l'aparició brusca de l'activitat quinasa Cdc28-Cln1/2 que estimula els processos post-Start, indueix la degradació de l'inhibidor Sic1 i inactiva la degradació de ciclins Clb (Tyers, 1996; Schneider *et al.*, 2004). Com a conseqüència apareixen les activitats quinasa de fase S Cdc28-Clb5 i Cdc28-Clb6, que s'encarreguen de controlar la síntesi de DNA (Epstein i Cross, 1992; Schwob i Nasmyth, 1993; Donaldson *et al.*, 1998; Weinreich *et al.*,

2001). Posteriorment, sorgeix l'activitat quinasa associada a les ciclines Clb3 i Clb4 controlant la formació del fus acromàtic. Durant la fase G2/M s'acumulen les activitats quinasa Cdc28-Clb1/2 que controlen la segregació de cromàtides i l'elongació del fus acromàtic (Surana *et al.*, 1991; Richardson *et al.*, 1989; Fitch *et al.*, 1992; Grandin i Reed, 1993; Surana *et al.*, 1993) i promouen el canvi de creixement polaritzat a isotròpic de la gemma (Lew i Reed 1993 ; Grandin i Reed, 1993 ; Surana *et al.*, 1993; Tjandra *et al.*, 1998). L'activitat Cdc28-Clb controla el progrés de la mitosi (Azzam *et al.*, 2004; Sullivan i Morgan, 2007; Enserink i Kolodner, 2010). Finalment, la inactivació de les quinases Cdc28-Clb per l'activació de la degradació de les ciclines Clb i l'acumulació de l'inhibidor Sic1 origina l'eixida de mitosi i la tornada a l'estat de baixa activitat quinasa (Yeong *et al.*, 2001; Wasch i Cross, 2002; Stegmeier i Amon, 2004).

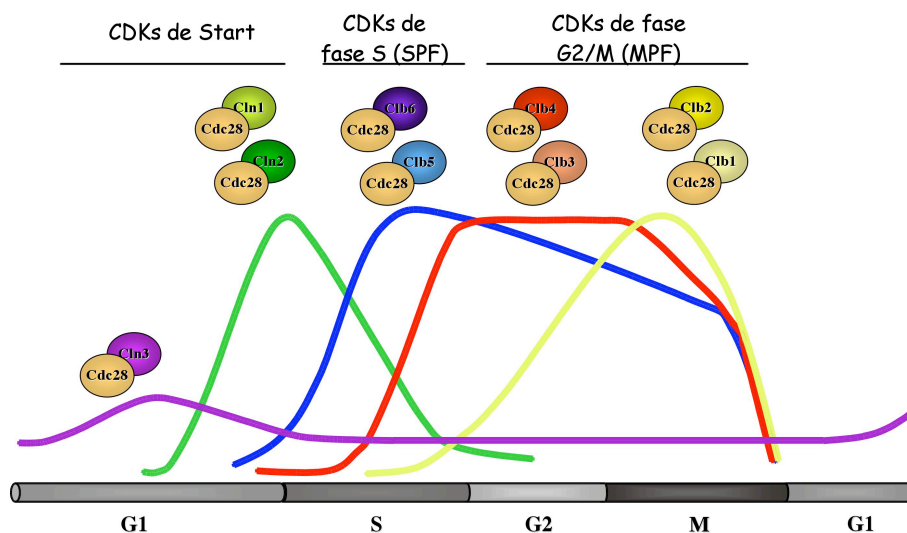


FIGURA 1.2. Ones d'activitat quinasa al llarg del cicle cel·lular.

L'activació dels diversos complexos CDK-ciclina al llarg del cicle estarà determinada pels nivells existents de ciclines i d'inhibidors en cada

moment. Dos mecanismes moleculars seran 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 és una estratègia molt freqüent en *S.cerevisiae*. Aquests gens estan normalment implicats en processos específics del cicle cel.lular i el seu pic d'expressió coincideix en la majoria de casos amb el moment en què es necessiten els seus productes. Existeixen varies 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. Esta transcripció periòdica està regulada per factors de transcripció que són expressats també periòdicament i estan interrelacionats de tal forma que contribueixen a organitzar les ones d'expressió (Simon *et al.*, 2001; Breeden, 2003; Bähler, 2005). En cadascuna de les ones d'expressió es sintetitzen reguladors clau per a controlar el progrés en el cicle cel.lular.

El segon mecanisme implicat en el control dels nivells cel.lulars de reguladors del cicle cel.lular és la proteòlisi per ubiquïtilliació de proteïnes i degradació en el proteosoma (Jorgensen i Tyers, 1999; Koepp *et al.*, 1999; Tyers i Jorgensen, 2000; Murray, 2004; Reed, 2006; Konstantinova *et al.*, 2008). El procés d'ubiquïtilliació d'una proteïna és complex i actua com a centre de la regulació de la degradació selectiva de proteïnes. Inicialment la ubiquïtina ha d'unir-se a l'enzim activador d'ubiquïtina (E1). Aquesta molècula d'ubiquïtina és transferida a l'enzim conjugador d'ubiquïtina (E2) i d'aquest, amb la participació d'un enzim ubiquïtina-ligasa (E3), serà transmesa al grup ϵ -amino d'una lisina de la proteïna diana. Posteriorment s'afegirà una nova molècula d'ubiquïtina a la unitat recentment incorporada repetint-se aquest procés fins assolir una cadena d'ubiquïtines suficientment llarga per ser reconeguda pel proteosoma. Existeixen dues ubiquïtina-ligases que tenen un paper molt important en la regulació del cicle cel.lular de *S.cerevisiae*: els complexos SCF i APC.

El complex SCF (*Skp1-Cullina-Proteïna amb caixa F*) està format per quatre subunitats: Skp1, Cdc53, Rbx1 i una proteïna adaptadora amb "caixa F" que és la subunitat responsable del reconeixement del substrat i que en el cas dels substrats del cicle pot ser Cdc4, Grr1 i Met30 (Willems et

al, 2004). Aquest complex interacciona amb l'E2 Cdc34 via Rbx1 i amb diferents substrats via la proteïna amb caixa F que presenta diferents dominis d'interacció proteïna-proteïna com les repeticions riques en leucina LRR de Grr1 o els dominis WD40 de Cdc4 i Met30. Una regió de les proteïnes substrat rica en prolina, glutàmic, serina i treonina anomenada PEST és la responsable de la seua inestabilitat. SCF està sempre actiu al llarg del cicle però la susceptibilitat del substrat per a ser ubiquïtilat es controla per fosforilació: només substrats fosforilats poden ser reconeguts per les proteïnes adaptadores. SCF participa principalment en el control de la transició G1/S (DeSalle i Pagano, 2001): SCF^{Grr1} degrada les ciclines Cln1 i Cln2 (Barral *et al.*, 1995), mentre que SCF^{Cdc4} degrada els inhibidors de CDK Far1 (Blondel *et al.*, 2000) i Sic1 (Verma *et al.*, 1997) i també Cdc6 (Perkins *et al.*, 2001) i Clb6 (Jackson *et al.*, 2006), encara que també participa en altres fases del cicle (Blondel *et al.*, 2005).

El complex APC (*anaphase promoter complex* o complex promotor de l'anafase) és responsable de la degradació d'inhibidors d'anafase i de ciclines mitòtiques. Controla la transició metafase-anafase i l'eixida de mitosi (Morgan, 1999; Zachariae i Nasmyth, 1999; Peters, 2002). És un complex d'elevada masa molecular en què participen al menys 13 subunitats. El correcte funcionament del complex APC depén de les proteïnes adaptadores Cdc20 o Cdh1, les quals s'encarreguen d'unir els substrats. La ubiquïtilació mediada per APC depén d'uns elements de seqüència característics presents en el substrat: la caixa destructora i la caixa KEN. Al contrari del que passa en la ruta SCF, en aquesta via de degradació es controla l'activitat del complex APC mitjançant fosforilació i la regulació dels nivells de Cdc20 i Cdh1: en G2 es sintetitza Cdc20 que s'uneix a APC i el complex és activat per l'actuació de la quinasa polo (Cdc5 en *S.cerevisiae*) junt amb Clb-Cdc28 en mitosi; Cdh1 és desfosforilada per Cdc14, fet que activa a APC^{Cdh1}. La ruta només està activa des de la transició metafase-anafase fins la transició G1/S. Fora d'aquest període els substrats degradats per esta via són estables.

Una vegada descrit el funcionament general del cicle ens centrarem amb més detall en els processos més relacionats amb el present treball.

La transició G1/S

L'execució d'Start a nivell bioquímic implica l'activació de Cdc28 per les ciclines de G1 Cln, que són el factor crític i limitant. Encara que són parcialment redundants en el sentit de que la presència d'alguna d'elles és suficient per al progrés en el cicle, les ciclines Cln tenen papers diferents en la transició G1/S. L'inici de la nova ronda de divisió comença amb l'activació de la quinasa Cdc28-Cln3. Cln3 està present durant tot el cicle en nivells pràcticament constants però el complex només s'activa al final de la fase G1. Una vegada activada, la quinasa Cdc28-Cln3 posa en marxa el programa de transcripció específic de la fase G1 tardana mediat pels factors de transcripció SBF i MBF. SBF i MBF són factors heterodimèrics formats per una subunitat reguladora comú, Swi6, i una proteïna, diferent però homòloga, amb afinitat específica pel DNA, Swi4 i Mbp1 respectivament (Breedon, 1996 i 2003, Bean *et al.*, 2005). Aquest sistema transcripcional és essencial per a la viabilitat cel·lular ja que les dobles mutacions *swi4mbp1* i *swi4swi6* són letals. El factor SBF controla l'expressió dels gens *CLN1*, *CLN2* i gens relacionats amb la biosíntesi de paret cel·lular. Per la seua banda, MBF és responsable de l'expressió periòdica dels gens *CLB5* i *CLB6* i de molts gens de síntesi de DNA.

Regulació de la transcripció d'Start

L'activació de la transcripció d'Start depèn de la quinasa Cdc28-Cln3 (Dirick *et al.*, 1995; Stuart i Wittenberg, 1995). Tot i estar units als promotors durant G1, SBF i MBF no són transcripcionalment actius (Cosma, 2002) degut a l'acció inhibidora dels repressors Whi5 i Stb1 (Costanzo *et al.*, 2004; de Bruin *et al.*, 2004 i 2008). També durant G1 el complex Cdc28-Cln3 es troba retengut al reticle endoplàsmic per un mecanisme que implica a la proteïna Whi3 i Ssa1. L'alliberament del complex Cdc28-Cln3 per la *xaperona* Ydj1 permetrà l'entrada d'aquest al nucli on desencadenarà Start

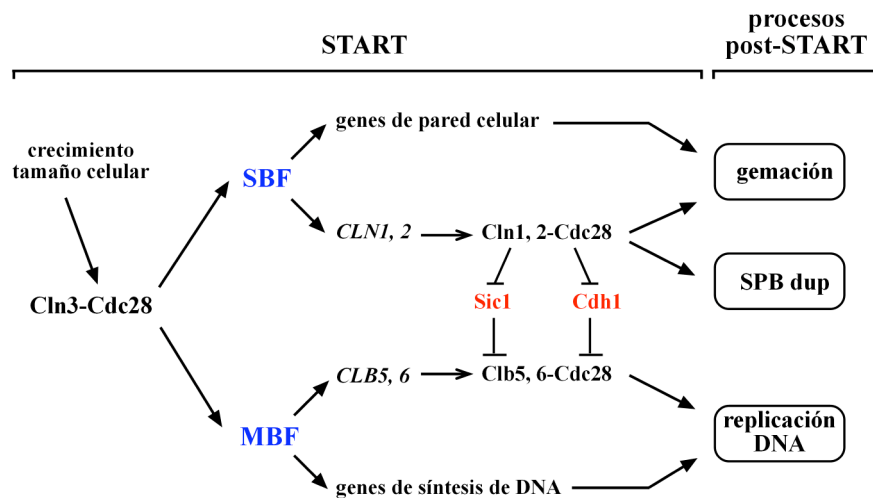


FIGURA 1.3. Esquema d'Start.

en inhibir al repressor Whi5 (Garí *et al.*, 2001; Vergés *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2004). Cdc28-Cln3 fosforilarà Whi5 i SBF/MBF i ocasionarà que l'inhibidor es solte dels factors de transcripció que així podran començar la transcripció de gens del reguló G1-S (Costanzo *et al.*, 2004; de Bruin *et al.*, 2004). Fruit d'aquesta transcripció apareixen entre d'altres proteïnes, les ciclines Cln1 i Cln2, les quals formant complex amb Cdc28 actuaran sobre Whi5, SBF i MBF i establiran un circuit de retroalimentació positiu, que donarà coherència a la transició G1-S (Skotheim *et al.*, 2008). La transició G1-S és el punt on es coordina el cicle cel·lular i el creixement. El fet que una *xaperona* participe a desencadenar Start podria ser la base d'aquest mecanisme. Així, conforme la cèl·lula anara creixent s'aniria acumulant Ydj1 fins a assolir un nivell suficient per mitjançar l'alliberament de Cln3. Altra qüestió pendent és entendre com canvis relativament xicotets en la concentració de Cln3 es tradueixen en un canvi dramàtic que posa en marxa Start. La resposta pot residir en el gran nombre de llocs de fosforilació presents en Whi5. No obstant això, estudis amb mutants en llocs de fosforilació de Whi5 revelen que aquests mutants no mostren defectes de regulació d'Start a no ser combinats amb mutacions en llocs de fosforilació

per CDK en Swi6 (Wagner *et al.*, 2009). D'altra banda Stb1 s'ha descrit com un component estable tant de SBF com de MBF que s'uneix a promotors específics de G1 via Swi6 durant la fase G1. La inactivació d'Stb1 produeix una inducció transcripcional màxima durant el final de la fase G1 i desreprimeix l'expressió gènica abans de l'activació transcripcional dependent de Cln3 (de Bruin *et al.*, 2008). L'últim model que es proposa per a la regulació d'Start integra l'acció de Whi5 i Stb1 (Wang *et al.*, 2009, Takahata *et al.*, 2009). En el cas de SBF Whi5 és reclutat per la interacció amb Swi4 i Stb1 i FACT (complex remodelador de la cromatina) són reclutats per interacció amb Swi6. Així mateix es recluta el complex Rpd3 (histona desacetilasa) assistit per Whi5 i/o Stb1. De forma dependent de creixement és reclutat el complex Cln3-Cdc28. Aquesta CDK fosforila Whi5, Stb1 i, possiblement, Swi6, provocant l'eliminació del complex Rpd3 i de Whi5. El domini activador de la transcripció d'Swi6 queda llavors exposat com a conseqüència de la funció activadora de fosfo-Stb1. Per tant, Swi6 recluta directament o indirecta complexes als promotors que són responsables de facilitar (FACT) o dificultar (Rpd3) l'accessibilitat a la cromatina, i també s'encarrega de reclutar la CDK que activa Start. En el cas de MBF Whi5 no és reclutat però la resta de components funcionarien de forma idèntica.

Tot i que en condicions fisiològiques Cdc28-Cln3 és el principal activador de la transició G1-S, sembla existir una via alternativa d'activació que jugaria un paper secundari en la qual participaria Bck2, una proteïna de funció desconeguda requerida per l'activació basal de la transcripció d'una fracció dels gens diana de SBF i MBF inclosos els gens *CLN1* i *CLN2* (Di Como *et al.*, 1995). La descripció d'aquesta via va ampliant-se en treballs recents en què s'han tractat d'identificar dianes de Bck2 per estudis globals (Ferrezuelo *et al.*, 2009). Bck2 és capaç d'activar una selecció de gens regulats pel cicle cel·lular de totes les fases del cicle. A més, Bck2 activa molts gens de forma independent de Swi6, i podria fer-ho via Ste12 i Mcm1. També s'han identificat nous reguladors com Ccr4 que pareix actuar per baix de Bck2, de forma independent de Cln3, modulant l'estabilitat dels mRNAs

de Whi5 i influint així en l'inici de la transcripció de *CLN1* i *CLN2* i en el tamany cel·lular (Manukyan *et al.*, 2008).

Poc després de l'activació d'Start s'inicia l'apagat de la transcripció dependent de SBF i MBF. En el cas de SBF el pas clau és l'acumulació d'activitat Cdc28-Clb2 que, en fosforilar a Swi4, afavoreix que aquest es solte dels promotors (Amon *et al.*, 1993; Koch *et al.*, 1996). En el cas de la transcripció dependent de MBF l'apagat transcripcional no depèn de Clb2 sinó d'un circuit de retroinhibició mitjançat pel correpressor Nrm1 (de Bruin *et al.*, 2006). Entre els gens transcrits per MBF es troba el gen que codifica per Nrm1, el qual s'unirà a MBF bloquejant la seva activitat transcripcional.

L'activitat de SBF i MBF es regula a diferents nivells. Per una part l'expressió del gen *SWI4* està regulada presentant un pic de transcripció just abans de Start (McInerney *et al.*, 1997) no ocorrent així amb *SWI6* que és d'expressió constant. Per altra part, mentre la localització subcel·lular de Mbp1 i Swi4 és sempre nuclear, Swi6 presenta un mecanisme que controla la seva localització. Swi6 entra al nucli des de finals de mitosi fins la fase G1 tardana, moment en el qual l'activitat Cdc28-Cln bloquejarà la importació en fosforilar la serina 160 (Sidorova *et al.*, 1995). Durant la fase G2 romandrà nuclear fins que a G2-M l'activitat quinasa Cdc28-Clb6 i la carioferina Msn5 mitjancen la seva sortida al citosol (Geymonat *et al.*, 2004; Queralt i Igual, 2003). Finalment, a la sortida de mitosi, la defosforilació de S160 a mans de Cdc14 permetrà que Swi6 torne a assolir la localització nuclear (Geymonat *et al.*, 2004).

Whi5 també presenta regulació espacial al llarg del cicle cel·lular: és nuclear des de final de mitosi fins a Start (Constanzo *et al.*, 2004). La seua importació al nucli depèn de la via clàssica d'importació i és mitjançada per dues NLS clàssiques funcionalment redundants. La importació al nucli no és regulada al llarg del cicle. L'exportació de Whi5 és assistida per la carioferina Msn5. La regió dels aminoàcids 51 a 167 de Whi5 dirigeix l'exportació, la qual depèn de la fosforilació de residus específics de Ser. Cdc14 és la fosfatasa responsable de l'acumulació nuclear de Whi5 (Taberner *et al.*, 2009).

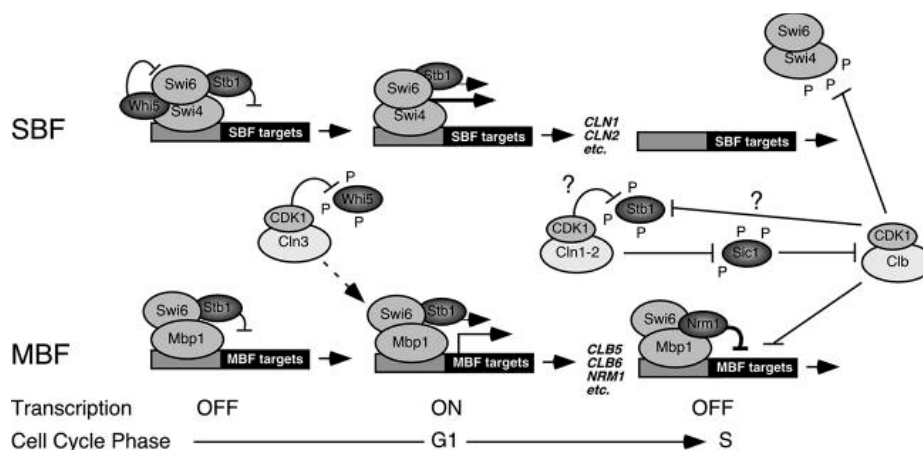


FIGURA 1.4. Regulació de la transcripció en G1 (Adaptada de de Bruin et al., 2008)

Processos post-Start

La duplicació del SPB (*Spindle pole body*)

La funció central de la mitosi consisteix en segregar les cromàtides germanes que estan presents en la cèl.lula després de la fase S. La segregació dels cromosomes la realitza una complexa maquinària: el fus acromàtic. El fus acromàtic està format per una xarxa de microtúbuls, polímers dinàmics que continuament polimeritzen i despolimeritzen de forma regulada per diferents proteïnes que s'uneixen als extrems o costats dels microtúbuls. Aquestes inclouen les proteïnes motores, que poden viatjar al llarg dels microtúbuls i tenen papers importants en l'ensamblatge i estabilitat dels microtúbuls i en el moviment dels cromosomes en el fus. Junt amb aquestes proteïnes motores, les proteïnes reguladores de microtúbuls presents en els cinetòcors dels braços de les cromàtides també regulen el creixement dels microtúbuls i l'ensamblatge del fus (Segal i Bloom, 2001).

En *S.cerevisiae*, el fus és construït completament a l'interior del nucli, que roman intacte durant la mitosi, i és organitzat per òrgans

proteïcs anomenats *spindle pole bodies* (SPB) que estan embeguts en la membrana nuclear. Malgrat que els centrosomes animals i els SPB de llevat presenten distintes estructures, les característiques generals del seu cicle són les mateixes. Les cèl.lules en G1 contenen un únic centrosoma o SPB que s'encarrega de la nucleació de la majoria de microtúbuls de la cèl.lula. Quan la cèl.lula entra en un nou cicle, el centrosoma o SPB és duplicat en un procés poc conegut. Els dos centrosomes o SPBs romanen associats estretament fins al principi de la mitosi, quan la seua separació permet la formació de la xarxa bipolar de microtúbuls entre ells. Després de la segregació de les cromàtides germanes a la fi de la mitosi, la citoquinesi divideix la cèl.lula a través del llarg eix del fus acromàtic, deixant cadascuna de les cèl.lules resultants amb un únic centrosoma o SPB de nou (Jaspersen i Winey, 2004).

En *S.cerevisiae*, la duplicació del SPB és iniciada per les ciclins Cln1 i Cln2. Les ciclins Clb5 i Clb6 també promouen la duplicació del SPB quan són activades en fase S. El que s'ha descrit és que la Cdk fosforila diferents proteïnes del SPB incloent una component del *core* anomenada Spc42 (Jaspersen *et al.*, 2004). Estudis amb una versió mutada no fosforilable de Spc42 suggereixen que la fosforilació per Cdc28-Cln1/2 estimularia la incorporació de Spc42 en el nou SPB. Addicionalment, una proteïna quinasa, Mps1, també pot fosforilar i activar Spc42 i altres proteïnes del SPB, i la fosforilació de Mps1 per part de Cdc28-Cln1/2 pareix estimular la seua capacitat per dur a terme aquestes fosforilacions. No obstant, encara queda molt per conèixer de la funció exacta d'aquestes proteïnes i de la resta de substrats de la Cdk presents en el SPB.

El procés de gemmació

Les cèl.lules de *S.cerevisiae* estan sota creixement polaritzat durant diverses fases del seu cicle vital. Un d'aquests períodes és el procés de gemmació. El procés de polarització del creixement durant el cicle cel.lular està controlat tant temporalment com espacialment. 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 redistribueixen aleatòriament sobre la superfície de la gemma. Aquest període de creixement, on la gemma creix en totes 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*.

La polarització i reorganització del citoesquelet en totes les cèl·lules eucariotes estan regulades per les proteïnes Rho, una família de proteïnes d'unió a GTP de xicotet tamany (Jaffe i 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 i Bi, 2007). La Rho GTPasa essencial Cdc42 és el factor crucial en el control de la polarització en totes les cèl·lules eucariotes (Etienne-Manneville i Hall, 2002). Com totes les GTPases, Cdc42 cicla entre un estat actiu unida a GTP i un 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) que són: Bem2, Bem3, Rga1/Dbm1 i Rga2. Una de les qüestions principals en el funcionament de Cdc42 és entendre com s'aconsegueix activar localitzadament i com es manté dita activació. La GTPasa Bud1 és la intermediària entre la maquinària de proteïnes marcadores espacials que especifiquen el lloc per a polaritzar el creixement i la maquinària de polarització (Park i Bi, 2007). En la localització polaritzada al còrtex de Cdc42 intervenen l'F-actina, la proteïna Bem1 i un complex proteic anomenat polarisoma. Bem1 col·localitza amb Cdc42 i Cdc24 en els llocs de creixement polaritzat facilitant l'unió de Cdc24-Cdc42 a altres proteïnes com l'F-actina o la quinasa Cla4 (Butty *et al.*, 2002). Cla4, activat per Cdc42, fosforilarà activant Cdc24, establint-se un mecanisme de retoalimentació

positiva que resulta en un acúmulo de proteïnes Cdc42 i Cdc24 actives en els llocs de creixement polaritzat. Pel que fa al polarisoma, és un complex multiproteic localitzat en els llocs de creixement polaritzat format per diverses proteïnes relacionades físicament i genètica (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; Shih *et al.*, 2005; Tcheperegine *et al.*, 2005). Una vegada activada en el lloc de creixement polaritzat, Cdc42 regularà a través de diversos efectors l'organització del citoesquelet d'actina.

Cdc24 és el principal regulador de Cdc42. En els últims anys s'ha aprofundit en el seu estudi paral·lelament a la resta de proteïnes implicades en la regulació del creixement polaritzat. Cdc24 presenta una localització dinàmica al llarg del cicle cel·lular (Toenjes *et al.*, 1999; Nern i Arkowitz, 2000; Shimada *et al.*, 2000): Cdc24 es localitza al nucli durant la fase G1, quan s'executa Start passa a localitzar-se en els llocs de creixement polaritzat, és a dir, en el lloc d'emergència de la gemma, durant S i G2-M roman en l'extrem de la gemma i passarà a localitzar-se en el coll entre la mare i la filla durant la fase M. A final de mitosi tornarà a acumular-se en el nucli. Cdc24 és segregat en el nucli per l'inhibidor Far1. S'ha proposat que l'entrada al nucli de Cdc24 siga formant complex amb Far1 però existeix certa controvèrsia sobre aquest fet. Recentment s'ha descrit que Cdc24 oligomeritza i que aquesta oligomerització pot regular la seua localització: Cdc24 podria associar-se en oligòmers en el nucli, que s'haurien de dissociar per garantir una eficient exportació del nucli. La oligomerització podria també estar regulant la capacitat d'associació amb diferents proteïnes reguladores (Mionnet *et al.*, 2008). Tanmateix es desconeixen els senyals i les carioferines implicades en el transport de Cdc24. Cdc24 uneix un ampli rang de proteïnes directament o indirecta, entre elles: Rsr1, Bem1, Cdc42, Cla4, Far1, Ste4, Ste5, Bem4, Tos2, Boi2, Sec15 i Ste20 (Bose *et al.*, 2001; Butty *et al.*, 2002; Nern i Arkowitz, 1998 i 1999; Park *et al.*, 1997; Peterson *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2005; Drees *et al.*, 2001; Gavin *et al.*, 2002; Kozminski *et al.*, 2003). Algunes d'aquestes interaccions són crítiques per a

la localització de Cdc24. Per exemple, Rsr1 i Bem1 es requereixen per a l'inicial reclutament o el sosteniment de la localització al lloc de creixement polaritzat. També s'ha descrit un paper per a Boi2, Ent2, Hua1 i Tos2, així com de determinades fosforilacions en Cdc24 (en concret en Ser697, Thr704 i Tyr 200) en la regulació de la seua localització en els llocs de creixement polaritzat (Cole *et al.*, 2009). Paradòjicament, estudis del mateix any descarten un paper de la fosforilació de Cdc24 en la regulació de la seua activitat ja que la mutació dels llocs consens de fosforilació no causa defectes observables de creixement o morfologia (Wai *et al.*, 2009).

El paper de Cdc28-Cln1/2 en gemmació comença a ser comprés a nivell molecular. El procés clau consisteix en activar a la GTPasa Cdc42. L'activació de Cdc42 depèn del reclutament a la membrana del seu factor bescanviador de nucleòtids Cdc24. Com s'ha comentat prèviament, en la fase G1, Cdc24 està segrestada en el nucli per la seua associació a Far1. L'activació dels complexos Cdc28-Cln1/2 desencadena la fosforilació i posterior degradació de Far1 alliberant a Cdc24, el qual pot eixir llavors al citoplasma i activar a Cdc42 (Gulli i Peter, 2001; Andrews i Moffat, 2003; Chang i Peter, 2003). Es considerava que a més d'aquesta funció principal, es continuava necessitant l'activitat Cdc28-Cln en el citosol per a que la gemmació es produïra eficientment. Estudis recents han proposat noves funcions per als complexos Cdc28-Cln1/2 en gemmació. En primer lloc, un estudi proteòmic va identificar nombroses interaccions entre distintes proteïnes i complexos CDK-ciclina (Archambault *et al.*, 2004). Per al cas de Cdc28-Cln2 es va descriure la interacció amb algunes proteïnes implicades en processos de morfogènesi com Ste20, Rga1 o Bem3. Rga1 i Bem3 són, com s'ha descrit, dues GAPs (proteïnes activadores de GTPasa) que funcionen estimulants la hidròlisi de GTP per la GTPasa Cdc42 durant l'establiment de la polarització. La fosforilació d'aquestes proteïnes pel complex Cdc28-Cln2 podria implicar un nou nivell de control del complex durant el creixement polaritzat. Posteriorment es van descriure proteïnes implicades en el procés de gemmació que eren específicament fosforilades pel complex Cdc28-Cln2 (McCusker *et al.*, 2007). Aquestes proteïnes eren Cdc24, Rga2 i Boi1 que són GEF, GAP i andamiatge de Cdc42 i juguen un

paper fonamental en l'anomenat polarisoma. La fosforilació d'aquestes proteïnes pot justificar la necessitat del complex Cdc28-Cln2 en el citosol durant la gemmació. Finalment s'ha proposat que Whi3 es requereix per a la localització apical de Cdc28-Cln2 durant el creixement de la gemma i per a promoure l'activació de Cdc42 i els seus efectors en el lloc de polarització (Colomina *et al.*, 2009).

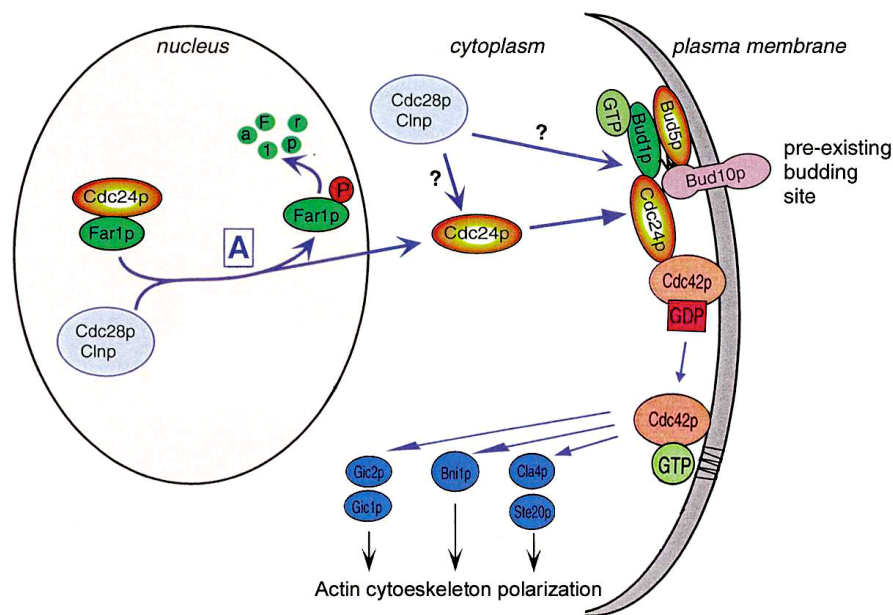


FIGURA 1.5. Regulació del procés de gemmació per Cdc28-Cln (adaptada de Gulli i Peter, 2001).

La replicació del DNA

En el genoma de *S.cerevisiae* hi ha uns 400 orígens de replicació del DNA. Aquests orígens inicien la síntesi del DNA a diferents temps al llarg de la fase S, alguns són disparats més aviat i altres més tard. El primer pas de l'inici de la replicació consisteix en l'ensamblatge del complex de pre-replicació (pre-RC), la principal diana de regulació d'aquesta etapa. Els seus components són ORC, Cdc6 que és reclutada per ORC i Ctd1-MCM que és reclutat per ORC i Cdc6 conjuntament. Després del reclutament de MCM al DNA, ORC i Cdc6 ja no són necessaris per a la unió MCM-DNA. MCM no és activa com a DNA helicasa fins que és activada per components addicionals de Cdc45 i GINS que formen amb ella un complex en la transició G1-S.

Vàries activitats CDK estan implicades en el procés de replicació. Cdc28-Cln1/2 condueix a la destrucció de l'inhibidor Sic1 permetint l'activació dels complexos Cdc28-Clb5/6 que són els responsables directes de l'activació dels orígens de replicació. S'han descrit diferències entre Clb5 i Clb6. Clb6 pareix capaç d'activar només orígens primerencs mentre que Clb5 activa tant orígens primerencs com orígens tardans. No obstant, en absència de Clb5 i Clb6 la replicació continua produint-se per l'acció de les ciclins mitòtiques, encara que amb un cert retràs. L'activitat CDK es requereix per a l'inici de la replicació per a l'activació del pre-RC i d'altres proteïnes com Sld2 i Sld3.

La separació de l'ensamblatge i l'activació del pre-RC en diferents fases del cicle permet previndre que un origen es dispare més d'una vegada en una mateixa cèl.lula. L'ensamblatge del pre-RC té lloc al final de la fase M i principi de la fase G1 quan l'activitat CDK és baixa. L'elevada activitat CDK impedeix l'ensamblatge del complex per fosforilació dels seus components, fosforilació que inhibeix la seua activitat proteica. Diferents mecanismes garanteixen la regulació de l'inici de la replicació: Cdc6 s'expressa només en fase G1 i es degrada més tard en el cicle. Ctd1 i MCM estan presents durant tot el cicle però només es localitzen en el nucli a final de mitosi i principi de fase G1. Després de començar la replicació, Ctd1 i MCM són exportades al citoplasma (Sun i Kong , 2010).

Mecanismes d'especificitat funcional de ciclines

En *S.cerevisiae*, una única CDK, Cdc28, s'associa amb nou ciclines diferents per dirigir la progressió al llarg del cicle cel.lular. El mecanisme pel qual la ciclina confereix especificitat funcional al complex de què forma part ha estat fruit d'un debat intens en les últimes dècades. Podem resumir el paper de les ciclines en dues funcions principals: activar enzimàticament la CDK i dirigir-la a substrats específics per una combinació de factors que inclueixen la seua expressió temporal, la seua degradació, la seua capacitat d'interacció amb dianes i inhibidors i la seua localització subcel.lular, estant tots ells relacionats entre sí per aconseguir una fina regulació dels processos que dirigeixen el cicle. Aquesta acurada regulació, no obstant, és compatible amb la redundància funcional entre diferents ciclines que assegura la progressió en condicions desfavorables i en última instància la supervivència cel.lular.

La controvèrsia contraposava dos punts de vista aparentment oposats: la ciclina seria irrelevant per a la funció del complex excepte com a activador general de l'activitat enzimàtica de la CDK o l'alternativa proposava que la identitat de la ciclina era essencial per a desenvolupar les diferents funcions del complex CDK-ciclina. En el primer cas es tractava del que es va anomenar model quantitatiu segons el qual la correcta alternança de fases al llarg del cicle seria conseqüència de l'acumulació de diferents quantitats de complex CDK-ciclina actiu (Nasmyth, 1996; Stern i Nurse, 1996). D'acord amb aquest model l'aparent especificitat funcional de les diferents ciclines residiria només en diferències en el moment de la seua expressió, ja que de fet existeix una clara correlació entre el moment d'expressió i la fase en què es requereix la funció de la ciclina. La pregunta era si quan s'eliminava la regulació temporal, les ciclines continuaven o no conferint especificitat funcional al complex. Nombrosos anàlisis genètics de deleció o sobreexpressió de ciclines recolçaren la idea de la redundància funcional de les ciclines. No obstant aquesta redundància genètica no deu ser interpretada com redundància funcional *in vivo*. L'alternativa constituïa el model qualitatiu, del qual es van anar acumulant nombroses evidències que demostraven que encara que es poguera mantindre la progressió al llarg del

cicle en absència de determinades ciclines, el camí pel que s'aconseguia no era sempre el mateix i que moltes funcions no podien ser emulades per cap altra ciclina.

Per il·lustrar la convivència d'ambdós models es pot prendre com exemple la comparació funcional entre les ciclines Clb en el control de la replicació del DNA. Existeix un solapament considerable en les especificitats funcionals de les ciclines S i M. Cèl·lules sense Clb5 o Clb6 però amb ciclines Clb1-2-3-4 presenten un retràs en l'inici de la replicació però aquesta és duta a terme. El retràs existent, no obstant, es deu a alguna diferència entre les ciclines S i M. La possibilitat simple, d'acord amb els models anteriors és que les ciclines mitòtiques puguin ser perfectament capaces d'activar els orígens de replicació però no són expressades fins més tard en el cicle. Tanmateix aquesta no pareix ser la resposta, ja que si s'expressa Clb2 sota el control del promotor de *CLB5*, en cèl·lules sense Clb5, la fase S continua presentant un retràs. Per tant, Clb5 és més eficient en l'activació dels orígens de replicació (Cross *et al.*, 1999). La causa d'aquesta diferència qualitativa ve donada per la diferent capacitat de reconeixement de substrats per part de les dues ciclines. Aquesta capacitat diferencial resideix, almenys en part, en el domini HP (*hydrophobic patch*) de Clb5. L'especificitat de Clb5 depèn d'una interacció entre el domini HP i una seqüència curta del substrat, el motiu RXL o Cy. Quan es compara la fosforilació de substrats de Cdk1 per part de Cdc28-Clb5 i Cdc28-Clb2, el 24% són fosforilats més eficientment per part de Cdc28-Clb5, entre ells molts de gran importància en fase S com Sld2, Cdc6, Orc6, Mcm3 i Cdh1 (Cross *et al.*, 1999 ; Donaldson, 2000 ; Loog i Morgan, 2005). Cdc28-Clb2 pareix menys específic de substrat però presenta una major activitat quinasa que li permet l'eficient fosforilació d'un ampli rang de dianes mitòtiques. Així que Clb2 podria més que conferir especificitat de substrat a la CDK, activar-la de forma més eficient (Loog i Morgan, 2005).

Un mecanisme addicional refina l'especificitat funcional de les ciclines B: la seua sensibilitat diferencial a la quinasa de la família Wee1, Swe1 (Hu i Aparicio, 2005). Clb2-Cdc28, quan és forçada a actuar durant fase S, presenta una menor activitat quinasa perquè és més sensible que

Clb5-Cdc28 a la inhibició per Swe1. De fet, el complex Clb2-Cdc28 pot activar tots els substrats essencials de Clb-Cdc28 en una soca sense altres Clbs ni Swe1. La capacitat d'Swe1 d'inhibir l'activitat de les ciclines Clb en l'inici de la replicació correlaciona amb l'ordre d'actuació d'aquestes: no pareix inhibir *in vivo* Clb5 i Clb6, inhibeix de forma moderada Clb3 i Clb4 i de forma forta Clb2. Açò pareix deure's a la combinació de la unió protectora de l'inhibidor Sic1 a Clb5-Cdc28 i a una més lenta fosforilació i més ràpida desfosforilació d'aquest complex front a Clb2-Cdc28. El resultat és que la fase S pot anar progressant encara que s'activen els *checkpoints* que actuen via fosforilació de la Tyr de la CDK (Keaton *et al.*, 2007).

Les diferències quantitatives vénen donades per l'equilibri entre transcripció i degradació de les ciclines. Aquest equilibri pot ser desplaçat en un sentit o altre mitjançant diferents mecanismes per crear diferències de nivell proteic entre ciclines molt semblants. Com hem comentat s'han descrit diferències entre Clb5 i Clb6. Clb6 pareix capaç d'activar només orígens primerencs mentre que Clb5 activa tant orígens primerencs com orígens tardans. La regulació de la seua estabilitat és el mecanisme que explica la distinció funcional entre Clb5 i Clb6: Clb5 és estable durant tota la fase S i és capaç d'activar els orígens tardans, mentre que Clb6 és degradat en les etapes inicials de fase S. Açò es deu a la presència en la regió N-terminal de Clb6 de seqüències degró reconegudes per SCF^{Cdc4}. Les ciclines Clb es degraden per APC. Clb6 presenta variacions en la *destruction box* reconeguda per APC que roman intacta en Clb5. Una versió hiperestabilitzada de Clb6 és capaç de rescatar el defecte en fase S d'un mutant *clb5* (Jackson *et al.*, 2006), demostrant que les diferències funcionals entre Clb5 i Clb6 es deuen a diferències quantitatives causades per la seua diferent degradació.

Un mecanisme a destacar per generar especificitat de forma qualitativa consisteix en conferir a la CDK una localització determinada. Un exemple és la ciclina Clb2. Clb2 és principalment nuclear i presenta una NLS bipartita reconeguda per la via clàssica d'importació. No obstant, es localitza en certs punts del citosol de forma dependent de dues NES riques en leucines (Hood *et al.*, 2001 and 2007). Clb2-Cdc28 citoplàsmic es

requereix per a la inactivació d'Swe1 en la transició G2/M i el posicionament de Clb2 en el coll de la gemma contribueix a l'eficiència d'aquest procés. Clb2 citoplàsmica també pareix ser important per a la repressió del creixement filamentós (Hood *et al.*, 2007). En els darrers anys s'ha avançat en la caracterització de les funcions associades a cada compartiment, ja que els mutants de Clb2 que no presenten importació o exportació estan afectats en diferents funcions. S'han descrit com a funcions citosòliques la regulació del citoesquelet i del creixement polaritzat de forma independent de la regulació transcripcional de les ciclines G1, mentre que es considera una funció nuclear la iniciació de l'anafase (Eluère *et al.*, 2007). Per tant, a més d'activar a la CDK, la ciclina Clb2 actuaria posicionant el complex en les localitzacions subcel·lulars adequades per dur a terme les diferents funcions que realitza. A més, cal destacar que la localització de Clb2 influeix en la seva degradació, que és específica de fase (Eluère *et al.*, 2007).

Un altre exemple d'especificitat funcional assolida per regulació de la localització és la de les ciclines G1. El primer que es va descriure va ser que Cln2 (representant al parell Cln1/Cln2 d'elevada homologia) i Cln3 provocaven l'entrada en el cicle cel·lular per diferents mecanismes (Dirick i Nasmyth, 1991; Koch i Nasmyth, 1994; Stuart i Wittenberg, 1995; Benton *et al.*, 1993; Cvrcuková i Nasmyth, 1993; Lew i Reed, 1993). L'especificitat funcional de Cln2, comparada amb Cln3, està demostrada pel fet que Cln2 i Cln3 difereixen en la seua capacitat de mantindre la viabilitat en certs fons genètics, fins i tot quan ambdues són expressades sota el control del promotor de *CLN3* (Levine *et al.*, 1996). Aquesta especificitat pot explicar-se principalment per diferències en la localització subcel·lular de les dues ciclines: Cln3 és principalment nuclear, mentre que Cln2 és principalment citoplàsmica i pot localitzar-se en els llocs de creixement polaritzat. Aquest patró de localització contribueix a la capacitat de Cln2 i Cln3 de regular diferents substrates. El paper de Cln3 en promoure la transcripció per fosforilació i exclusió nuclear del repressor transcripcional Whi5 està probablement determinat per la localització nuclear de Cln3. De fet, la introducció d'una NES en Cln3 provoca que el complex Cln3-Cdc28 no siga

funcional en aquest paper. Pel que respecta a Cln2, la seua localització forçada en el nucli o en el citosol s'associa a la capacitat de realitzar funcions diferencials: Cln2 nuclear és capaç de complementar un mutant *cln1cln2clb5clb6* i un mutant *cln1cln2kar3*, indicant que aquesta localització podria ser necessària per a processos com la síntesi de DNA o la duplicació del SPB. D'altra banda Cln2 citoplàsmica és capaç de complementar els mutants *cln1cln2pcl1pcl2* i *cln1cln2bud2*, la qual cosa fa pensar en un paper en gemmació. No obstant, cap de les dues formes és capaç de rescatar la letalitat d'un mutant *swi4swi6*, el que suggereix que algunes funcions de la ciclina Cln2 podrien implicar l'existència de *shuttling* entre el nucli i el citosol (Miller i Cross, 2000 i 2001; Edgington i Futcher, 2001).

Si es revisen els mecanismes d'especificitat descrits aplicats a organismes superiors trobem que els mecanismes han estat conservats al llarg de l'evolució per determinar una especificitat cada vegada major dels complexs CDK-ciclina: el mecanisme que controla l'estabilitat de les ciclins de fase S en mamífers podria ser equivalent al de *S.cerevisiae*, la ciclina A seria equivalent a Clb5 i la ciclina E seria equivalent a Clb6 (Ekholm i Reed, 2000; Erlandsson *et al.*, 2000; Geley *et al.*, 2001; Strohmaier *et al.*, 2001; Jackson *et al.*, 2006); el CKI p27^{Kip1} pareix protegir (de manera similar a Sic1 en el cas de Clb5-Cdc28) al complex CiclinaA-Cdk2 de Wee1 (Russo *et al.*, 1996; Barberis *et al.*, 2005; Keaton *et al.*, 2007); la ciclina D1 és exportada del nucli al citoplasma a l'inici de la replicació del DNA, la qual cosa induïx la seua degradació en el proteosoma (Diehl *et al.*, 1998); les ciclins B1 i B2 es localitzen de forma diferencial, B1 presenta *shuttling* entre citosol i nucli mentre que B2 es localitza en l'aparell de Golgi, i la seua localització determina la seua funcionalitat (Draviam *et al.*, 2001). Així mateix s'han intentat determinar en els últims anys substrats específics de cada complex CDK-ciclina, tant en *S.cerevisiae* com en organismes superiors, principalment en mamífers (Archambault *et al.*, 2004; Errico *et al.*, 2010). Aquests estudis poden donar llum a les dianes particulars dels diferents complexos que seran les que en última instància determinen les funcions específiques de cada complex.

Les ciclins Cln1 i Cln2

Cln1 i Cln2 presenten un 57% d'identitat, un percentatge que augmenta fins el 72% en la zona N-terminal on es troba la caixa ciclina. La part C-terminal, més divergent, conté les seqüències PEST responsables de la degradació de les ciclins via ubiquïtillació per SCF, dues seqüències en el cas de Cln1 i només una en el cas de Cln2 (Hadwiger *et al.*, 1989). Cln1 i Cln2 i les seues activitats quinasa associades tenen nivells màxims en Start (Wittenberg *et al.*, 1990; Tyers *et al.*, 1992). Els nivells de les dues proteïnes estan controlats pels mateixos mecanismes moleculars: els gens *CLN1* i *CLN2* són expressats periòdicament en la transició G1/S pel factor transcripcional SBF (Nashmyth i Dirick 1991; Ogas *et al.*, 1991; Bean *et al.*, 2005), i les proteïnes Cln1 i Cln2 són degradades per SCF^{Grr1} (Barral *et al.*, 1995; Skowryra *et al.*, 1997, Scheweitzer *et al.*, 2005). Encara que els mutants senzills no presenten alteracions fenotípiques importants, el doble mutant *cln1Δcln2Δ* creix lentament, presenta formes aberrants i retrasa l'inici de la gemmació i de la síntesi de DNA (Dirick *et al.*, 1995, Stuart i Wittenberg, 1995). Per altra banda, al·lels hiperestables de *CLN2* acceleren el pas per Start i originen inestabilitat genòmica (Hadwiger *et al.*, 1989, Tanaka i Diffley, 2002). Els complexos Cdc28-Cln estimulen els processos post-Start de polarització del citoesquelet i gemmació (Benton *et al.*, 1993; Cvrckova *et al.*, 1993; Gulli *et al.*, 2000; Lew i Reed, 1993). També participen en la duplicació i/o separació del SPB (Haase *et al.*, 2001) i, indirectament, en l'inici de la síntesi de DNA en facilitar la proteòlisi de l'inhibidor de CDK Sic1 (Schneider *et al.*, 1996; Schwob *et al.*, 1994). Aquests i altres estudis funcionals han dut a considerar aquestes dues ciclins equivalents. De fet funcions estudiades només en una d'elles, com el paper de Cln2 en l'activació de Cdc42 durant el procés de gemmació per reclutament de Cdc24 a la membrana (Gulli *et al.*, 2000) o el paper de Cln1 en meiosi i esporulació (Mai i Breeden, 2000) s'han considerat extensibles a l'altra ciclina.

A més dels nombrosos estudis que destaquen la similaritat entre Cln1 i Cln2, també s'han observat algunes diferències. Així, Cln1 és més eficient adaptant el tamany cel·lular a noves fonts de carboni després de

condicions pobres, però açò pareix deure's a diferències de promotor (Flick *et al.*, 1998). També s'ha descrit que Cln1 es requereix per al desenvolupament pseudohifal mentre Cln2 és dispensable, però en aquest cas també pareix tractar-se de diferències d'expressió i no d'una diferència intrínseca entre les ciclines (Loeb *et al.*, 1999 ; Madhani *et al.*, 1999). D'altra banda Cln2 s'ha considerat més activa reprimint la transició de divisió cel.lular mitòtica a diferenciació meiòtica, però si es té en compte que s'ha d'assolir un tamany crític per entrar en meiosi potser que siga un efecte indirecte per alteració del tamany cel.lular, de manera que mutants *cln2* per ser més grans inicien més ràpid meiosi que mutants *cln1* (Purnapatre *et al.*, 2002). Per últim, estudis recents del nostre laboratori han demostrat una diferència funcional entre aquestes ciclines ja que: la inactivació de *CLN2*, però no de *CLN1*, condueix a un augment del tamany cel.lular; l'expressió ectòpica de *CLN2*, però no de *CLN1*, suprimeix la letalitat d'un mutant *swi4swi6* i *cdc28*; la pèrdua de Cln2 provoca un retràs en gemmació i, només la mutació *cln2* és letal sintètica amb la mutació *cdc42* i hipersensible a latrunculina B (inhibidor de la polimerització dels filaments d'actina). Tot això indica que Cln2 realitza la funció predominant en el control de la transició G1/S i en els processos morfogenètics que condueixen a la gemmació, de forma que Cln1 només és rellevant quan no està Cln2 (Queralt i Igual, 2004).

TRANSPORT DE PROTEÏNES ENTRE NUCLI-CITOPLASMA I CICLE CEL.LULAR

Les cèl.lules eucariotes es caracteritzen per presentar diferents compartiments envoltats per membrana impermeables a les macromolècules. Per això han desenvolupat sistemes específics de transport per a permetre el tràfic entre aquests compartiments. Diferents treballs realitzats en els últims anys han ressaltat la importància del control de la localització subcel.lular de diverses proteïnes reguladores del cicle cel.lular. Aquesta "regulació espacial" inclou la correcta localització de proteïnes per a realitzar la seua funció, el segrestament de reguladors en altres compartiments fins que hagen

de ser funcionals o la necessitat d'un tràfic entre compartiments per a que es complete una funció. Aquests processos són vitals per a la replicació del DNA, la mitosi o la citoquinesi.

El tràfic de macromolècules a través de la membrana nuclear és essencial per a funcions cel·lulars bàsiques. El transport entre el nucli i el citoplasma es produeix a través dels complexos del porus nuclear (NPCs) formats per conjunts de proteïnes anomenades nucleoporines (Cook *et al.*, 2007). Un grup d'aquestes nucleoporines presenten unes repeticions de residus fenilalanina i glicina (repeticions FG) que jugaran un paper important en el procés de transport (Doye i Hurt, 1997). Els NPCs consten d'un canal que travessa la membrana nuclear al qual es concentren nombroses repeticions FG de diferents nucleoporines. A la vessant citosòlica del canal es presenta un sistema de filaments anomenat fibrilles citosòliques, mentre que a la vessant nuclear del porus trobem una estructura anomenada cistella nuclear. Tot i que pot semblar que el NPC és una estructura estàtica algunes evidències mostren que és un complex macromolecular dinàmic i adaptatiu els components del qual influeixen el transport que es dona a través d'aquest (Tran i Wente, 2006). Pels NPCs difonen de forma passiva els ions, alguns RNAs i proteïnes de baix pes molecular (20-40 kDa dependent de l'estructura tridimensional). Per contra, les partícules de major pes molecular (proteïnes, diversos tipus de RNA ...) requereixen un transport actiu dependent d'energia. Aquest tràfic de macromolècules entre nucli i citoplasma està mitjançat per receptors solubles de transport que assegurin la selectivitat i especificitat del sistema: només s'han de transportar les mercaderies adequades en el sentit i moment que calga.

Receptors de transport o carioferines

La cèl·lula disposa d'una bateria de proteïnes transportadores denominades carioferines que transporten activament proteïnes entre el nucli i el citoplasma (revisat en: Macara, 2001; Weis, 2003; Mosammapparast i Pemberton, 2004; Stewart, 2007). La Importina β 1 de mamífers dona nom a la família més importat, la de carioferines β . En *S.cerevisiae* s'han descrit 14 carioferines β : Kap104, Kap108, Kap114, Kap119, Kap120, Kap122,

Kap123, Los 1, Msn5, Kap95, Cse1, Xpo1, Pse1, Mtr10 (Görlich *et al.*, 1997; Ström i Weis, 2001). Tots els membres presenten certa similitud de seqüència amb ella i un patró estructural semblant. Les carioferines d'aquesta família contenen múltiples repeticions consecutives de motius HEAT (al voltant de 20) que ocasionen que la carioferina assolisca una estructura superhelicoidal corbada (Cook *et al.*, 2007). Quan transporten proteïnes al nucli es defineixen com importines i si ho fan del nucli al citoplasma s'anomenen exportines. Cada carioferina reconeix específicament senyals de localització nuclear (NLS) o senyals d'exportació nuclear (NES) de la seua càrrega, directament o a través de proteïnes adaptadores. Aquests senyals específics de transport contribueixen a mantindre la fidelitat del procés: els NLS direccionen les proteïnes a l'interior del nucli i els NES marquen el transport de les proteïnes cap al citoplasma (Macara, 2001; Weis, 2003; Mossamaparast i Pemberton, 2004). Les carioferines interaccionen amb les nucleoporines, interacció essencial per a la seva funció ja que aquests contactes de caràcter transitori permeten el seu desplaçament a través de la superfície de repeticions FG molt abundants al canal del NPC (Peters, 2005). Cada carioferina s'uneix a diferents conjunts de nucleoporines existint rutes de transport específiques per a cadascuna (Weis, 2003).

Actualment s'accepta que tant la unió/alliberament de cargos com la direccionalitat del transport depèn de les interaccions que estableixen les carioferines amb la GTPasa Ran (Fried i Kutay, 2003; Kuersten *et al.*, 2001). La proteïna GTPasa Ran (Gsp1 en *S.cerevisiae*) funciona com un interruptor molecular i experimenta canvis conformationals entre les seues formes unides a GDP o GTP. En el nucli, Ran es presenta majoritàriament en la forma unida a GTP mentre que en el citoplasma es troba unida a GDP originant-se un gradient de RanGTP a través del porus nuclear. Açò es deu a que el factor bescanviador de nucleòtids de guanina RanGEF (Prp20), està localitzat al nucli, mentre que la proteïna activadora de GTPasa RanGAP (Rna1) està localitzada al citoplasma. Aquesta separació espacial de les dues formes de Ran serà crucial per al mecanisme de transport entre nucli i citoplasma. Les carioferines formen un complex amb Ran només quan té

unit GTP. En el procés d'importació, les carioferines uneixen la proteïna a transportar en el citoplasma, entren al nucli per interacció amb les nucleoporines i, una vegada en el nucli, la seua interacció amb RanGTP provoca l'alliberament de la càrrega. Aleshores el complex importina-RanGTP eix al citoplasma i allí el GTP s'hidrolitza quedant la importina de nou disponible. En el cas de les exportines es formen complex ternaris proteïna a transportar-exportina-RanGTP en el nucli, aquest complex eix al citoplasma i allí s'hidrolitza el GTP alliberant-se la càrrega i quedant lliure l'exportina per a tornar de nou al nucli (revisat en: Ström i Weis, 2001; Macara, 2001; Weis, 2003; Mossamaparast i Pemberton, 2004).

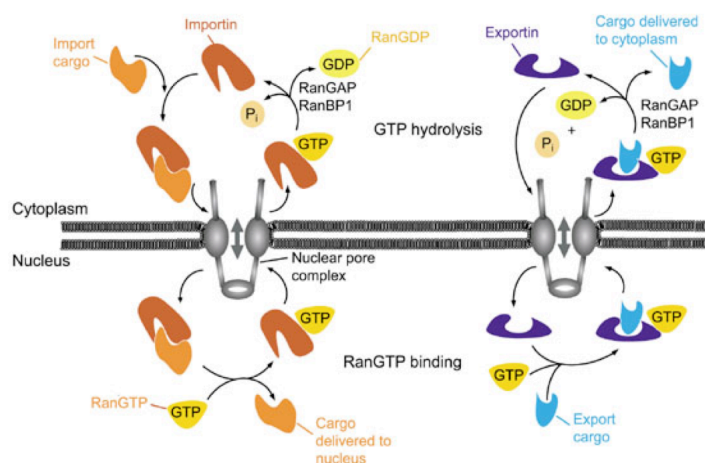


FIGURA 1.6. Esquema de la importació i exportació de proteïnes a través del NPC (adaptada de Ström i Weis, 2001).

Recentment s'ha descrit un paper més ampli per a Ran relacionat amb diferents funcions cel·lulars. En primer lloc s'ha descrit com factor regulador de l'*spindle* mitòtic i els microtúbuls astrals (Ciciarello *et al.*, 2007, Kalab i Heald, 2008; Clarke i Zhang, 2008). En eucariotes superiors aquest paper en l'ensamblatge de l'*spindle* es creu que deu implicar la unió de Ran-GTP a carioferines. Durant la mitosi, Rcc1, una Ran-GEF, facilita la

conversió de Ran-GDP a Ran-GTP prop dels cromosomes, conduint a l'establiment d'un gradient de concentració creixent de Ran-GTP en regions adjacents als cromosomes mitòtics. Aquest gradient es proposa que pot proporcionar informació espacial a les carioferines del lloc exacte on alliberar els factors que importen assegurant una correcta localització i activació de les proteïnes transportades. En *S.cerevisiae*, mutacions en la ruta de Ran causen defectes en la captura dels cinetòcors pels microtúbuls que parteixen del SPB, un fenotip també observat en soques mutants en gens que codifiquen proteïnes associades a microtúbuls (MAPs) (Tanaka *et al.*, 2005). Si Ran regula la localització d'alguna MAP encara es desconeix. Pocs *cargos* implicats en la funció dels microtúbuls s'ha descrit que depenguen de Ran en llevat. En *S.pombe* s'ha identificat Alp7, que és importada i alliberada en l'SPB de forma dependent de Ran i s'encarrega de reclutar Alp14, una polimerasa de microtúbuls que promou l'ensamblatge de l'*spindle* bipolar (Sato i Toda, 2007).

També s'ha descrit un paper antagònic de Ran i de la carioferina $\beta 1$ en l'ensamblatge de la membrana nuclear i de complexos del porus nuclear (NPCs) basat en estudis en *Xenopus* (Walther *et al.*, 2003; Harel *et al.*, 2003). La funció del sistema Ran en l'ensamblatge del NPCs també s'ha observat en llevat (Ryan *et al.*, 2003). Cal destacar la capacitat de les Kaps d'actuar com *xaperones* dependents de Ran-GTP. Com exemple es pot citar el paper descrit per a Crm1 durant fase S. Crm1 inhibeix la re-replicació del DNA per unió i inactivació del complex helicasa Mcm2-7 en presència de Ran-GTP (Yamaguchi i Newport, 2003). Per tant, el paper de les carioferines en la cèl.lula pot ser més complex del que inicialment es creia (Mosammaparast i Pemberton, 2004).

La via clàssica d'importació.

La ruta clàssica d'importació és la principal via d'entrada de proteïnes al nucli, entre d'altres és la via responsable de la importació al nucli de nombrosos reguladors del cicle cel.lular (Lange *et al.*, 2007, Hahn *et al.*, 2008). De fet, mutants en carioferines implicades en la ruta presenten

fenotips de parada del cicle cel·lular, tant en G2/M com en G1/S (Loeb *et al.*, 1995; Taberner i Igual, 2010).

Kap95 (Importina β 1 en mamífers) és la carioferina β implicada en la via clàssica d'importació. Kap95 presenta una peculiaritat si es compara amb la resta de carioferines de la família: no sol reconèixer directament les proteïnes que transporta, per la qual cosa requereix en la major part del casos la participació d'una proteïna adaptadora. En mamífers s'han descrit diverses subunitats adaptadores entre les que s'inclou Importina α o Snurportin1 (Cook *et al.*, 2007). En llevat Kap60, l'equivalent a Importina α de mamífers, és l'única proteïna adaptadora descrita fins a la data. Importina α presenta almenys dos dominis ben definits. Un es troba a l'extrem C-terminal i és el domini d'unió a Importina β (domini IBB). L'altre és el domini d'unió dels NLS constituït per les repeticions armadillo (ARM) que substitueixen en el cas d' Importina α a les característiques repeticions HEAT.

Un cicle d'importació de la via clàssica començaria al citosol amb el reconeixement i interacció de la proteïna a transportar (*cargo*) amb Kap60. Aquest complex per sí mateix és incapaç de travessar el NPC. Per la seva part Kap95 uneix i estabilitza el complex Kap60-*cargo* a més de facilitar el seu moviment a través del porus nuclear en sentit al nucli. Al nucli la unió de Ran-GTP a Kap95 desestabilitza el complex d'importació alliberant el *cargo*. Un cop alliberat el *cargo*, tant Kap95 com Kap60 han de tornar al citosol per participar en un nou cicle d'importació. Mentre que Kap95 torna al citosol sense assistència, l'exportació de Kap60 requereix de la participació d'un altra carioferina β , l'exportina Cse1 (Lange *et al.*, 2007).

Les proteïnes transportades per aquesta via presenten seqüències de caràcter bàsic anomenades NLS clàssiques que es classifiquen com monopartites (si consten d'un tram de residus bàsics) o bipartites (dos trams de residus bàsics separats per una regió espaiadora de 10-12 aminoàcids) (Cook *et al.*, 2007; Lange *et al.*, 2007). La seqüència senyal de l'antigen-T del virus SV40 (PKKKRK) i de la nucleoplasmina (KRPAATKK AGQAKKKLD) són els prototipus dels senyals NLSs mono i bipartits presents en moltes proteïnes diferents. Tanmateix, moltes proteïnes nuclears

no contenen els senyals clàssics i presenten senyals alternatius o s'associen a proteïnes amb un NLS clàssic.

Kap95 pot funcionar també fora de la via clàssica d'importació. Tot i que el complex amb proteïnes adaptadores és la forma més freqüent de transport mitjançat per Importina β , s'han descrit casos on aquesta seria capaç de transportar directament algunes proteïnes com Asr1 o Pik1 en *S.cerevisiae* (Fries *et al.*, 2007; Strahl *et al.*, 2005). Kap95 pot unir proteïnes que contenen un nou NLS (R/KxxL(x)nV/YxxV/LxK/RxxxK/R), també reconegut i importat per altres carioferines com Kap114, Pse1, Kap123 o Kap104 (Fries *et al.*, 2007).

L'exportina Xpo1

El senyal d'exportació més important es va identificar en l'inhibidor de la proteïna quinasa A (PKI), en la proteïna Rev del virus de la immunodeficiència humana (HIV), en RanBP1, i en una dotzena més de proteïnes. Una seqüència rica en leucina, LxxxLxxLxL, és el prototipus de senyal d'exportació, NES, encara que uns altres residus hidrofòbics poden substituir a alguns residus de leucina i el nombre de residus pot canviar. L'exportina Xpo1 (o Crm1) és l'encarregada de reconèixer proteïnes amb aquest tipus de NES i exportar-les a l'exterior del nucli, entre elles diferents reguladors del cicle cel·lular (Maurer *et al.*, 2001). Exemples d'aquestes proteïnes són: Hog1 (Ferrigno *et al.*, 1998), Yap1 (Yan *et al.*, 1998), Dbp5 (Kuge *et al.*, 1998), Ssb1 (Shulga *et al.*, 1999).

L'exportina Msn5

La proteïna Msn5 fou inicialment aïllada com un supressor multicòpia de mutants de llevat defectuosos en la proteïna quinasa Snf1 (Estruch i Carlson, 1990). Va passar posteriorment a ser identificada com un membre de la família de carioferines tipus Importina β en base a la similitud de seqüència (Görlich *et al.*, 1997). La seva mutació origina fenotips diversos com defectes en la utilització d'algunes fonts de carboni, en el procés de conjugació, sensibilitat a elevades concentracions d'ions i a pH

elevats (Alepez *et al.*, 1997). De fet, al llarg dels anys nombrosos estudis han implicat a Msn5 en l'exportació del nucli al citoplasma de proteïnes implicades en diversos processos cel·lulars. Entre les proteïnes exportades per Msn5 es troben activadors transcripcionals com Pho4 (Kaffman *et al.*, 1998), Mig1 (DeVit i Johnston, 1999), Crz1 (Boustany i Cyert, 2002), Msn2/4 (Görner *et al.*, 2002), i Rtg1/3 (Komeili *et al.*, 2000); el repressor de la transcripció de la RNAPolIII Maf1 (Towpik *et al.*, 2008); proteïnes com Ste5 (Mahanty *et al.*, 1999) la quinasa Pik1 (Demmel *et al.*, 2008) i l'endonucleasa HO (Kaplun *et al.*, 2003) i reguladors del cicle cel·lular com l'inhibidor de CDK Far1 (Blondel *et al.*, 1999), la subunitat de reconeixement de substrat Cdh1 de la ubiquitinil·ligasa APC (Jaquenoud *et al.*, 2002) i els factors de transcripció Swi6 (Queralt i Igual, 2003) i Whi5 (Taberner *et al.*, 2009). L'exportació de dites proteïnes vinculen a Msn5 en processos cel·lulars tan diversos com la repressió per catabòlit, senyalització per calci, metabolisme del fosfat, regulació de l'expressió de tRNAs i cicle cel·lular. Tot i que alguns estudis apuntaven que Msn5 podria actuar també com importina regulant l'entrada al nucli de Rfa2 (Yoshida i Blobel, 2001), estudis posteriors qüestionaren aquesta opció (Belanger *et al.*, 2004).

A diferència d'altres carioferines com Kap95-Kap60 i Xpo1, la regió que reconeix Msn5 en el *cargo* no s'ha pogut determinar amb detall. Les regions que mitjancen l'exportació per Msn5 es caracteritzen per tindre una grandària de 60 a 120 aminoàcids, aquest fet planteja la possibilitat de que Msn5 podria estar reconeixent un motiu estructural més que no pas una seqüència específica (Kaplun *et al.*, 2003; Bakhrat *et al.*, 2008; Taberner *et al.*, 2009). No obstant, per al cas de l'endonucleasa HO s'ha identificat una regió de 13 residus capaç d'interaccionar amb Msn5 *in vitro* i de dirigir l'exportació depenent de Msn5 de GFP *in vivo*. Però una mutació puntual d'aquesta seqüència no impedeix la interacció de la proteïna amb Msn5, el que suggereix que la carioferina pot establir nombrosos contactes amb el seu *cargo* (Bakhrat *et al.*, 2008). En alguns casos, com els de Pho4 (Kaffman *et al.*, 1998), Mig1 (DeVit i Johnston, 1999), Crz1 (Boustany i Cyert, 2002) o Whi5 (Taberner *et al.*, 2009), l'exportació de la proteïna diana depèn de

l'estat de fosforilació de residus de serina que es troben a la NES i que semblen regular l'afinitat de l'exportina pel *cargo*.

A més del seu paper en l'exportació de proteïnes, tot i que de manera indirecta, Msn5 podria participar en l'exportació de tRNAs (Takano *et al.*, 2005). La carioferina encarregada principalment d'exportar els tRNA és Exportina-t (Los1 en *S. Cerevisiae*) (Arts *et al.*, 1998). Tot i això, el mutant *los1* sols mostra defectes moderats en l'exportació de tRNA (Sarkar i Hopper, 1998), i sols en combinació de la mutació *msn5* s'aprecien defectes significatius en l'exportació de tRNAs madurs. Consistent amb un paper en l'exportació de tRNAs, s'ha descrit que Msn5, igual que el seu ortòleg en mamífers, Exportina-5, pot unir tant tRNA com d'altres RNAs (Shibata *et al.*, 2006).

OBJECTIUS

1. Determinar el mecanisme que confereix a Cln2 la seua funcionalitat específica diferencial respecte de Cln1.
2. Estudiar la regulació espacial de les ciclines Cln1 i Cln2 :carioferines que participen en el seu transport i senyals de localització.
3. Analitzar comparativament la degradació de les ciclines Cln1 i Cln2.
4. Analitzar el paper de Cdc24 en la funció de Cln2 en gemmació i estudiar la seua regulació espacial identificant les carioferines que participen en el seu transport i senyals de localització.
5. Caracteritzar els fenotips dels mutants en carioferines de la família de la Importina β relacionats amb el cicle cel.lular.

2. Materials i Mètodes

Tècniques en *Escherichia Coli*

Soques d'E.Coli i condicions de creixement

La soca emprada va ser la DH5 α . Les cèl.lules es van créixer en medi LB (extracte de llevat 0.5%, triptona 2%, NaCl 1%). Les soques resistents a ampicilina es van créixer en medi LB suplementat amb 50 μ g/mL d'ampicilina i 50 μ g/mL de nafcilina. Per a la preparació de plaques en medi sòlid es va afegir agar al 2%. Tots els medis s'esterilitzaren en autoclau 20 minuts a 1 atm de pressió i 121°C. Els cultius es van créixer a 37°C en agitació.

Protocol de transformació

Les cèl.lules DH5 α es van produir pel mètode d'obtenció de cèl.lules competents. Les transformacions es dugueren a terme amb un electroporador BIORAD E.coli pulser aplicant una constant d'1.8. Una vegada electroporades es van deixar recuperar les cèl.lules en medi ric SOC (triptona 2%, extracte de llevat 0.5%, NaCl 10mM, KCl 2.5mM, MgCl₂

10mM, MgSO₄ 10mM, glucosa 20mM) durant 1h abans de sembrar-les en plaques d'LB agar suplementat amb ampicilina. Es deixen créixer tota la nit a 37°C.

Mutagènesi dirigida

Per introduir mutacions puntuals de canvi de bases sobre un plasmidi, es va utilitzar el kit *QuikChange® Site-directed Mutagenesis Kit* d'Agilent Technologies. Es va utilitzar el protocol que facilita la casa comercial, modificant el protocol de transformació. Les parelles d'oligonucleòtids complementaris utilitzats per a cada canvi van ser sintetitzats per *Thermo scientific*.

Tècniques en *Saccharomyces cerevisiae*

Soques de S.cerevisiae

Les soques de llevat emprades en aquest treball es descriuen en la Taula 2.1. Les interrupcions dels gens es realitzaren utilitzant cassettes de disrupció (Longtine *et al.*,1998) o obtinguts per amplificació per PCR de cassettes presents en altres soques. Els canvis de promotor a *tetO₇* es realitzaren utilitzant el plasmidi pCM225 (Belli *et al.*,1998). La introducció del tTR' (superrepressor) es va realitzar per transformació amb el plasmidi pCM244 previament digerit amb *EcoRV* i posterior selecció dels transformants amb capacitat de créixer en medi mínim SD-leu.

Condicions de creixement

Les cèl.lules es van créixer en medi YPD (1% d'extracte de llevat, 2% peptona bacteriològica, 2% glucosa), YPGal (2% galactosa en lloc de glucosa) o medi mínim sintètic (0.67% yeast nitrogen base, 2% glucosa) suplementat amb els aminoàcids apropiats a 40 mg/mL per a la selecció de plasmidis. Per a la preparació de plaques de medi sòlid es va afegir agar al

2%. Les soques resistents a geneticina es van créixer en plaques d'YPD amb 200 mg/L de G418 (geneticina). Per a reprimir el promotor *tetO₇* es va afegir doxiciclina a 5µg/mL o 0.5µg/mL si la repressió havia de ser parcial. Les cèl.lules es creixen a 28°C en agitació o a 25°C si són termosensibles.

En sectors: es va sembrar una quantitat equivalent de cada soca en plaques adequades i es van deixar créixer durant 2 o 3 dies a 28°C o a 25°C (temperatura permissiva) o 37°C (temperatura restrictiva) si es tracta de soques termosensibles.

En gotejos: es van preparar dilucions seriades (1:10, 1:100, 1:1000) de cultius en fase exponencial de les diferents soques després d'igualar concentracions al voltant de $1.5 \cdot 10^6$ cèl.lules. Les gotes corresponen a 3-5µl del cultiu directe i de cadascuna de les dilucions. La temperatura i temps de creixement són els mateixos que per als sectors.

Protocol de transformació

Les transformacions amb plasmidis i productes de PCR es realitzaren seguint el mètode de transformació amb acetat de liti. Les transformacions en què la selecció era resistència a geneticina les cèl.lules es deixaren recuperant en YPD abans de sembrar-les en plaques amb geneticina.

Taula 2.1. Soques de *S.cerevisiae*

Soca	Genotip	Procedència
W303	<i>MATa ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-52 can1</i>	
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
CEN.PK	<i>MATa his3Δ1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289</i>	Euroscarf
<i>cdc53^{ts}</i>	<i>MATa ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-52 cdc53-1</i>	M.Aldea
<i>cdc4^{ts}</i>	<i>MATa ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1 cdc4-1</i>	M.Aldea
<i>swi4^{ts}swi6</i>	<i>MATa swi4-29(ts) swi6::TRP1 ho:lacZ ura3 ade2-1 can1-100 met his3 leu2 trp1</i>	Aquest grup

<i>cdc28^{ts}</i>	<i>MATa bar1 ade1 his2 leu2-3,111 trp1 ura3Δ cdc28-13</i>	M.Aldea
<i>kap95^{ts}</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1, leu2-3,112, can1-100 kap95Δ::HIS3 covered by pkap95-L63A</i>	Thorner lab
<i>srp 1-31</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-63, leu2-3,112 can1-100 srp1-31</i>	Fink lab
JCY135	<i>tetO₇:CLB5-kanMX4</i> en W303	Aquest grup
JCY313	<i>TRP1- GAL:HA-MSN5</i> en W303	Aquest grup
JCY678	<i>los1::kanMX4</i> en BY4741	Euroscarf
JCY679	<i>kap122::kanMX4</i> en BY4741	Euroscarf
JCY680	<i>kap120::kanMX4</i> en BY4741	Euroscarf
JCY681	<i>kap119::HIS3</i> en CEN.PK	Euroscarf
JCY684	<i>msn5::HIS3</i> en <i>cdc53-1</i>	Aquest grup
JCY845	<i>cln1::kan^r</i> en W303	Aquest treball
JCY846	<i>cln2::TRP</i> en W303	Aquest treball
JCY847	<i>cln1::kan^r cln2::TRP</i> en W303	Aquest treball
JCY852	<i>kap108::kanMX4</i> en BY4741	Euroscarf
JCY853	<i>kap114::kanMX4</i> en BY4741	Euroscarf
JCY854	<i>kap123::kanMX4</i> en BY4741	Euroscarf
JCY864	<i>cln2::LEU</i> en W303	Aquest treball
JCY866	<i>cln1::kan^r cln2::LEU</i> en W303	Aquest treball
JCY943	<i>CDC24-HA::URA</i> en JCY970	Aquest treball
JCY945	<i>CDC24-HA::URA</i> en JCY972	Aquest treball
JCY947	<i>CDC24-HA::URA</i> en JCY978	Aquest treball
JCY959	<i>kap120::kanMX4</i> en W303	Aquest treball
JCY970	<i>tTR[']::LEU tetO₇:KAP95-kanMX</i> en W303	Aquest treball
JCY971	<i>tTR[']::LEU tetO₇:PSE1-kanMX</i> en W303	Aquest treball
JCY972	<i>tTR[']::LEU tetO₇:CSE1-kanMX</i> en W303	Aquest treball
JCY976	<i>tTR[']::LEU tetO₇:MTR10-kanMX</i> en W303	Aquest treball
JCY978	<i>tTR[']::LEU tetO₇:XPO1-kanMX</i> en W303	Aquest treball
JCY981	<i>kap119::HIS3</i> en BY4741	Euroscarf
JCY1010	<i>tTR[']::LEU tetO₇:KAP104-kanMX</i> en W303	Aquest treball
JCY1018	<i>msn5Δ3::HIS3</i> en W303	Aquest grup

JCY1042	<i>tetO:MTR10-kanMX</i> en BY4741	Aquest treball
JCY1048	<i>cln1::kan^r cln2::LEU</i> en <i>cdc28-13</i>	Aquest treball
JCY1049	<i>CDC24-HA::URA</i> en <i>cdc28-13</i>	Aquest treball
JCY1051	<i>cln1::kan^r</i> en JCY1049	Aquest treball
JCY1053	<i>cln2::LEU</i> en JCY1049	Aquest treball
JCY1055	<i>cln2::LEU</i> en JCY1051	Aquest treball
JCY1071	<i>CDC24-HA::URA</i> en W303	Aquest treball
JCY1072	<i>far1::ADE2</i> en JCY1071	Aquest treball
JCY1105	<i>far1::ADE2</i> en JCY978	Aquest treball
JCY1106	<i>CDC24-HA::URA</i> en JCY1105	Aquest treball
JCY1125	<i>CLN2^{l-225}-HA-HIS3</i> en JCY1381	Aquest treball
JCY1128	<i>CLN2^{l-370}-HA-HIS3</i> en JCY1381	Aquest treball
JCY1342	<i>msn5::kanMX</i> en W303	Aquest treball
JCY1357	<i>CLN2-HA-TRP1</i> en W303	Aquest treball
JCY1359	<i>msn5Δ3::HIS3</i> en JCY1357	Aquest treball
JCY1361	<i>CLN2^{l-370}-HA-HIS3</i> en W303	Aquest treball
JCY1363	<i>CLN2^{l-225}-HA-HIS3</i> en W303	Aquest treball
JCY1365	<i>CLN2^{l-181}-HA-HIS3</i> en W303	Aquest treball
JCY1366	<i>msn5::TRP1</i> en W303	Aquest treball
JCY1367	<i>msn5::TRP1</i> en JCY1361	Aquest treball
JCY1369	<i>msn5::TRP1</i> en JCY1363	Aquest treball
JCY1371	<i>msn5::TRP1</i> en JCY1365	Aquest treball
JCY1378	<i>vts1::kanMX</i> en JCY1357	Aquest treball
JCY1379	<i>vts1::kanMX</i> en JCY1359	Aquest treball
JCY1381	<i>kanMX-GAL1:CLN2-HA-TRP1</i> en W303	Aquest treball
JCY1385	<i>CLN2^{l-299}-HA-HIS3</i> en JCY1381	Aquest treball
JCY1389	<i>CLN2^{l-132}-HA-HIS3</i> en JCY1381	Aquest treball
JCY1392	<i>kanMX-GAL1:CLN2^{Al-132}</i> en JCY1363	Aquest treball
JCY1393	<i>kanMX-GAL1:GFP-CLN2^{Al-132}</i> en JCY1363	Aquest treball
JCY1400	<i>far1::ADE2</i> en JCY1125	Aquest treball
JCY1415	<i>CLN2^{l-299}-HA-HIS3</i> en W303	Aquest treball
JCY1417	<i>msn5::TRP1</i> en JCY1415	Aquest treball
JCY1457	<i>maf1::HIS3</i> en JCY1357	Aquest treball

JCY1459	<i>msn5::kanMX</i> en JCY1457	Aquest treball
JCY1517	<i>kanMX-GAL1:CLN2¹⁻²²⁶-HA-HIS3</i> en JCY303	Aquest treball
JCY1518	<i>kanMX-GAL1:CLN2¹⁻¹³⁰-HA-HIS3</i> en JCY303	Aquest treball
JCY1520	<i>kanMX-GAL1:CDC24</i> en W303	Aquest treball
JCY1524	<i>CDC24¹⁻⁷³⁰-HA-HIS3</i> en W303 amb <i>pCDC24-GFP</i>	Aquest treball
JCY1526	<i>CDC24¹⁻⁴⁹⁹-HA-HIS3</i> en W303 amb <i>pCDC24-GFP</i>	Aquest treball
JCY1530	<i>FAR1¹⁻⁷⁵⁶-GFP</i> en JCY1051	Aquest treball
JCY1531	<i>FAR1¹⁻⁷⁵⁶-GFP</i> en JCY1053	Aquest treball
JCY1534	<i>cln1::TRP1 cln2::LEU</i> en JCY135	Aquest treball
JCY1535	<i>tetO :BUD2-kanMX</i> en W303	Aquest treball
JCY1538	<i>cln1::TRP1 cln2::HIS3</i> en JCY1535	Aquest treball
JCY1539	<i>grr1::LEU</i> en W303	Aquest treball

Vectors i esquemes de clonació

Construcció dels plasmidis de les ciclins quimèriques entre *Cln1* i *Cln2*

El vector YCplac33 va ser emprat per a la construcció de les quimeres. L'estratègia seguida va ser la mateixa per a les Quimeres 1, 2 i 3: un fragment de longitud creixent corresponent a l'extrem C-terminal del gen *CLN1* (que incloïa una seqüència codificadora de tres còpies de l'epítot HA en C-terminal) es va amplificar per PCR incluint llocs de restricció *XbaI* en 5' i *HindIII* en 3', i va ser clonat en el vector Ycplac33 digerit amb *XbaI* i *HindIII* en un primer pas; el segon pas va ser obtenir un fragment de longitud decreixent corresponent a l'extrem N-terminal del gen *CLN2* també amplificat per PCR incluint el lloc de restricció *XbaI* en 3', digerir-lo amb *KpnI* (lloc intern del gen -604) i *XbaI* per a clonar-lo en la construcció obtinguda al primer pas. Els fragments corresponents a *CLN2* i *CLN1* s'inclouen a la Taula 2.2. La Quimera 4 es va obtenir clonant un fragment C-terminal de la QUIMERA 2 amplificat per PCR incluint llocs de restricció *SphI* en 5' i *HindIII* en 3' en el vector Ycplac33 digerit *SphI* i *HindIII* en un primer pas; i en un segon pas es va clonar un fragment N-terminal de *CLN1* amplificat per PCR incluint el lloc de restricció *SphI* en 3' i digerit *KpnI*

(lloc intern del gen -333) i *SphI* en la construcció obtinguda en el primer pas.

Taula 2.2. CICLINES QUIMÈRIQUES ENTRE CLN1 I CLN2

Nom de la quimera	Fragment de CLN2*	Fragment de CLN1*
QUIMERA 1	-604 - +1427	+1428 - +1638
QUIMERA 2	-604 - +897	+936 - +1638
QUIMERA 3	-604 - +792	+831 - +1638
QUIMERA 4	+673 - +897	-333 - +678 +936 - +1638

* Seqüències nucleotídiques corresponents als fragments de *CLN1* i *CLN2*.

Els plasmidis d'origen d'on es van obtenir els fragments són el pCM137 i pCM239, que contenen versions de *Cln1* i *Cln2* etiquetades amb HA en C-terminal respectivament amablement cedits pel grup d'E. Herrero i M. Aldea de la Universitat de Lleida.

Tots els plasmidis construïts es van comprovar per seqüenciació i en els anàlisis es van emprar 2 clons independents en cada cas.

Construcció dels plasmidis pADH_P-CLN1-HA, pADH_P-CLN2-HA, pADH_P-Cln2¹⁻³⁷⁰-GFP pADH_P-Cln2¹⁻²²⁴-GFP, pNLS^{SV40}-Cln2²²⁵⁻²⁹⁹-GFP₄, pNLS^{SV40}-Cdc24¹⁻⁷⁰-GFP₄.

El plasmidi pNLS^{SV40}-GFP s'obtingué introduint el promotor *ADHI*, la NLS del antigen T gran del virus SV40, una còpia de la GFP i el terminador *ADH* al plasmidi YCplac33. El plasmidi pNLS^{SV40}-GFP₄ s'obtingué addicionant de forma consecutiva tres còpies de GFP al plasmidi pNLS^{SV40}-GFP (Taberner *et al.*, 2009). Aquests plasmidis es van emprar per a construir els següents.

El plasmidi *pADH_P-CLN1-HA* es va obtenir clonant el gen *CLN1* (que incloïa una seqüència codificadora de tres còpies de l'epítot HA en C-terminal) amplificat per PCR incluint els llocs de restricció *KpnI* en 5' i *Sall* en 3' en el plasmidi pNLS^{SV40}-GFP digerit amb *KpnI* i *Sall*.

El plasmidi *pADH_P-CLN2-HA* es va obtenir clonant el gen *CLN2* (que incloïa una seqüència codificadora de tres còpies de l'epítot HA en C-

terminal) amplificat per PCR incluint els llocs de restricció *KpnI* en 5' i *Sall* en 3' en el plasmidi pNLS^{SV40}-GFP digerit amb *KpnI* i *Sall*.

El plasmidi *pADH_p-Cln2¹⁻³⁷⁰-GFP* es va obtenir clonant la regió del gen de *CLN2* que correspon als aminoàcids 1 al 370 amplificada per PCR incluint els llocs de restricció *KpnI* en 5' i *BamHI* en 3' en el plasmidi pNLS^{SV40}-GFP digerit amb *KpnI* i *BamHI*.

El plasmidi *pADH_p-Cln2¹⁻²²⁴-GFP* es va obtenir clonant la regió del gen de *CLN2* que correspon als aminoàcids 1 al 224 amplificada per PCR incluint els llocs de restricció *KpnI* en 5' i *BamHI* en 3' en el plasmidi pNLS^{SV40}-GFP digerit amb *KpnI* i *BamHI*.

El plasmidi *pNLS^{SV40}-Cln2²²⁵⁻²⁹⁹-GFP₄* es va obtenir clonant la regió del gen de *CLN2* que correspon als aminoàcids 225 al 299 amplificada per PCR incluint els llocs de restricció *KpnI* en 5' i *BamHI* en 3' en el plasmidi pNLS^{SV40}-GFP₄ digerit amb *KpnI* i *BamHI*. En el oligonucleòtid forward s'inclou la seqüència de la NLS SV40 ja que amb aquest esquema de clonació és eliminada la seqüència clonada previament en el vector.

El plasmidi *pNLS^{SV40}-Cdc24¹⁻⁷⁰-GFP₄* es va obtenir clonant la regió del gen de *CDC24* que correspon als aminoàcids 1 al 70 amplificada per PCR incluint els llocs de restricció *KpnI* en 5' i *BamHI* en 3' en el plasmidi pNLS^{SV40}-GFP₄ digerit amb *KpnI* i *BamHI*. En el oligonucleòtid forward s'inclou la seqüència de la NLS SV40 ja que amb aquest esquema de clonació és eliminada la seqüència clonada previament en el vector.

Construcció del plasmidi pCLN2_p-Cln2¹⁸¹⁻²²⁴-GFP

El plasmidi *pCLN2_p-Cln2¹⁸¹⁻²²⁴-GFP* s'obtingué clonant el fragment de DNA que codifica la regió 181-224 de *Cln2* en el plasmidi *pCLN2_p:GFP* (Tesi F.Taberner). Dita seqüència s'amplificà per PCR a partir del genoma de la soca silvestre amb oligonucleòtids que introduïen els llocs de restricció *KpnI*-*BamHI*.

Construcció dels plasmidis de les versions mutants de Cdc24

Tots els plasmidis que contenen versions mutants de Cdc24 es van obtenir per mutagènesi dirigida del plasmidi *pCYC_p-CDC24-GFP* amablement cedit per Dr. Christine Rupp.

Taula 2.3. VERSIONS MUTANTS DE Cdc24

Plàsmid	Proteïna Cdc24
<i>pCYC_p-CDC24^{NES1A}-GFP</i>	Cdc24 ^{L60A}
<i>pCYCP-CDC24^{NES2A}-GFP</i>	Cdc24 ^{L60A,L64A}
<i>pCYC_p-CDC24^{NES3A}-GFP</i>	Cdc24 ^{L60A,L64A,L54A}
<i>pCYC_p-CDC24^{NES4A}-GFP</i>	Cdc24 ^{L60A,L64A,L54A,L57A}
<i>pCYC_p-CDC24^{NLS1-1A}-GFP</i>	Cdc24 ^{K533A}
<i>pCYC_p-CDC24^{NLS1-3A}-GFP</i>	Cdc24 ^{K533A,K534A,K535A}
<i>pCYC_p-CDC24^{NLS2-1A}-GFP</i>	Cdc24 ^{K734A}
<i>pCYC_p-CDC24^{NLS2-3A}-GFP</i>	Cdc24 ^{K734A,R735A,R736A}
<i>pCYC_p-CDC24^{NLS1-1A NLS2-1A}-GFP</i>	Cdc24 ^{K533A,K734}
<i>pCYC_p-CDC24^{NLS1-3A NLS2-1A}-GFP</i>	Cdc24 ^{K533A,K534A,K535A,K734A}
<i>pCYC_p-CDC24^{NLS1-1A NLS2-3A}-GFP</i>	Cdc24 ^{K533A,K734A,R735A,R736A}
<i>pCYC_p-CDC24^{NLS1-3A-NLS2-3A}-GFP</i>	Cdc24 ^{K533A,K534A,K535A,K734A,R735A,R736A}

Assaig de pèrdua de plàsmid

Es van transformar les soques corresponents amb el plasmidi centromèric pASZ11 que conté el gen *ADE2* (Ugolini i Bruschi, 1996). Els transformants es van créixer en medi de selecció fins a fase exponencial i es van sembrar 100-200 cèl.lules (soca silvestre) o 400-500 cèl.lules (mutant *kap123*) en plaques de YPD. Després de 2-3 dies es fan rèpliques de les colònies en plaques de medi mínim sense adenina i es recompten les mitjes

colònies (colònies en què el plasmidi es va perdre en la primera divisió mitòtica).

Determinació del volum cel.lular

El tamany cel.lular es va determinar en cultius exponencials ($2-8 \cdot 10^6$ cèl.lules/mL), després d'una breu sonicació per a dispersar les cèl.lules, amb un *Particle count and Size Analyzer Z2* (Coulter Inc.).

Els resultats són la mitjana mòbil dels valors obtinguts a partir de, com a mínim, 3 cultius independents de cada soca.

Determinació de l'índex de gemmació

L'índex de gemmació ("*budding index*") es va determinar, en cultius exponencials ($2-8 \cdot 10^6$ cèl.lules/mL) sonicats, per recompte al microscopi de cèl.lules amb i sense gemma. Els resultats són la mitjana de, com a mínim, 3 recomptes diferents (100 cèl.lules/recompte).

Anàlisi del contingut de DNA

Aproximadament $1 \cdot 10^7$ cèl.lules sonicades es van fixar amb etanol 70% durant 5 minuts a T^a ambient. Després es van tractar amb RNasa A 1mg/mL en tampó Tris-HCl 50mM p.H 7.5 durant almenys 1 h a 37°C. A continuació s'incubaren amb pepsina 5 mg/mL 5 minuts a T^a ambient. Finalment es tenyiren amb iodur de propidi 50 µg/mL (Sigma) preparat en una solució de MgCl₂ 70mM, Tris-HCl 180mM p.H 7.5, i NaCl 180mM. El contingut de DNA es va analitzar en un citòmetre *EPICS XL* de Coulter Inc.

Coimmunoprecipitació

Aproximadament $5 \cdot 10^8$ cèl.lules es van resuspendre en 100µL de 50mM Tris-HCl, pH 8, 250 mM NaCl, 5mM EDTA, 0,1% Triton X-100, 1mM PMSF i 5µg/mL Complete mixture (Roche Applied Science) i es van trencar agitant vigorosament en presència de perles de vidre. Es van eliminar les perles i les restes cel.lulars i es va clarificar el sobrenadant centrifugant a

13.000xg durant 5 minuts. 50 µL de perles magnètiques Dynabeads Protein G es van llavar dues vegades amb tampó fosfat que conté Tween 0,02% i es van incubar amb anticòs monoclonal rat anti-HA 3F10 durant 20 min a 25°C en agitació. Després es van llavar i es van incubar amb l'extracte cel.lular de nou durant 20 minuts a 25°C en agitació. Després de llavar les perles, les proteïnes immunoprecipitades van ser eluides bollint les perles en presència de loading buffer durant 5 minuts a 95°C. Les mostres van ser analitzades per *western blot*.

Tècniques de microscopia de fluorescència

Les mostres es visualitzaren amb un microscopi de fluorescència *Axioskop 2 de Zeiss inc.* Les fotografies es realitzaren amb una càmera *AxioCam MRm (Zeiss Inc)* i el software *AxioVision v4.7 (Zeiss Inc)*.

Immunofluorescència indirecta

Es va partir de 1.10^7 - 1.10^8 cèl.lules procedents de cultius exponencials. Es fixaren amb un tampó A amb formaldehid (100mM fosfat potàssic p.H 6.4, MgCl₂ 0.5mM, 3.7% formaldehid) durant 2h a 30°C (o tota la nit a 4°C). Després es llavaren amb un tampó B (mateixa composició que el tampó A però en lloc de formaldehid, s'afegeix sorbitol 1.2M). Per a l'obtenció d'esferoplasts s'incubaren les cèl.lules amb el tampó B amb β-mercaptoetanol 0.1% i zimoliasa 20-T 200µg/mL durant 20 min. Es llavaren els esferoplasts amb tampó B. Mostres de 5-10 µL d'aquests esferoplasts es van distribuir en portas multi-pouet on van ser incubades amb els anticossos. El bloqueig es va fer amb PBS BSA 1% així com els llavats entre anticossos. L'anticòs primari és l'anti-Ha High Affinity 3F10 (Roche), dilució 1:50, i la incubació és de 3h a 4°C. L'anticòs secundari és l'anti-rat conjugat amb Alexa546 (Molecular Probes), dilució 1:500, incubació 1h a 4°C. Per amplificar el senyal en alguns casos es va emprar una cascada d'anticossos incluint un tercer anticòs, en aquest cas les condicions eren: anticòs primari High Affinity 3F10 (Roche), dilució 1:50, o/n a 4°C; anticòs secundari goat anti-rat conjugat amb Alexa546 (Molecular Probes), dilució 1:250, incubació 1h a 4°C; anticòs terciari donkey anti-goat conjugat amb Alexa546 (Molecular Probes), dilució 1:500, incubació 1h a 4°C. Per a tenyir els

nuclis es va emprar DAPI (Sigma) 0.1 µg/mL, incubant 2 minuts en acabar els llavats dels anticossos. Els pouets es cobriren amb glicerol 50% i es segellà el cubre.

Tinció de nuclis

10⁷ cèl.lules procedents de cultius exponencials, sonicades, es van fixar amb etanol 70% durant 5 minuts a T^aambient. Després es tenyiren amb 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 0.1 mg/mL (Sigma).

Localització de proteïnes amb marcatge GFP

Les proteïnes etiquetades amb GFP es van visualitzar en cèl.lules vives crescudes en el medi sintètic corresponent fins a fase exponencial.

Western blot

Els extractes totals de proteïnes per a l'anàlisi per *western* es van preparar a partir de 10⁸ cèl.lules de cultius en fase exponencial. Les cèl.lules es van llavar amb aigua i es van resuspendre en 100µL d'H₂O i 100µL de NaOH 0.2M agitant en vòrtex. Es deixaren 5 min. a T^a ambient i després es centrifugaren a 12.000rpm durant 1 min. Es va descartar el sobrenadant i al pellet s'afegiren 50µL de SDS-PAGE loading buffer + DTT per a resuspendre'l abans de posar-lo 5 min. a 95 °C. Es va centrifugar a 3000 rpm 10 min. i es va transferir el sobrenadant a un tub nou. La concentració de proteïna es va determinar pel mètode de Bradford emprant el reactiu "Dye Reagent" de Bio-Rad. Concentracions equivalents de proteïna total es van separar per SDS-PAGE i es van transferir a membranes de nitrocel.lulosa mitjançant electrotransferència amb un "Transblot SD semi-dry transfer cell" de Bio-Rad. Les membranes es van bloquejar amb TBS-T (Tris-HCl 0.1M p.H 7.5, NaCl 0,125M, Tween-20 0,1%) durant 1h i s'incubaren amb l'anticòs primari tota la nit a 4°C. Després de llavar amb TBS-T, es van incubar amb anticòs secundari durant 1h a 4°C i es tornaren a llavar amb TBS-T. La detecció es realitzà utilitzant els reactius "ECL Western blotting" (Amersham Biosciences) seguint les instruccions del fabricant.

Taula 2.4. Anticossos emprats per a western blot

ANTICOS 1 ^{ari}	ANTICOS 2 ^{ari}
Anti-HA monoclonal mouse (12CA5) (ROCHE) 1:20000	ECL TM Anti-mouse IgG Peroxidase linked (from sheep) 1:30000
Anti-HA monoclonal rat High Affinity (3F10) (ROCHE) 1:6000	ECL TM Anti-rat IgG Peroxidase linked (from goat) 1:20000
Anti-GFP (ROCHE) 1:20000	ECL TM Anti-mouse IgG Peroxidase linked (from sheep) 1:40000
Rat Anti- α Tubulin (Serotec) 1:25000	ECL TM Anti-rat IgG Peroxidase linked (from goat) 1:40000
Kap95(yN-15) (Santa Cruz) 1:2000	Anti-goat IgG Peroxidase linked 1:50000

Northern blot

Els extractes de RNA total es van obtenir partint d'aproximadament 10^8 cèl·lules. Es van resuspendre en 500 μ L de tampó LETS (LiCl 0.1 M, EDTA 10 mM, SDS 0,2%, Tris-HCl 10 mM pH 7.4). Les cèl·lules resuspenses es mesclaren amb 500 μ L de fenol:cloroform isoamílic (5:1) per a RNA i perles de vidre. A continuació es trencaren les cèl·lules al *FastPrep (BIO101)* amb quatre polsos de 30 segons a una velocitat de 5,5. Després de centrifugar es va extraure l'RNA del sobrenadant dues vegades consecutives amb un volum (V) de fenol:cloroform isoamílic (5:1). Després de la última extracció l'RNA del sobrenadant es va precipitar afegint 0,1V LiCl 5M i 2,5V de EtOH 100% fred i incubant durant 3 hores a -20°C . Es va sedimentar l'RNA per centrifugació i es va rentar amb EtOH 70% per finalment resuspendre'l en 30 μ L d'aigua lliure de RNases. El RNA de les mostres es va quantificar al *Bio Photometer (Eppendorf)*. Per a l'anàlisi per *Northern blot* es van utilitzar 5 μ g d'RNA i les mostres es van preparar afegint a l'RNA 5 μ L de formamida desionitzada al 100%, 2 μ L de formaldehid al 37%, 1,5 μ L de tampó MOPS 10X (MOPS 200 mM, NaOAc 50 mM, EDTA 10 mM, pH 7,0) i aigua lliure de RNases fins 12 μ L. Una vegada preparades, les mostres

s'incubaren a 65 °C durant 10 minuts i seguidament es van deixar en gel 2 minuts. Es va afegir a cada mostra 2 µL del tampó de càrrega 6X (blau de bromofenol 0,25% (p/v), xilen cianol 0,25% (p/v), glicerol 30% (v/v)) que contenia 1% (v/v) de bromur d'etidi (Merck) i es va carregar el volum total de la mostra en el gel MOPS d'electroforesi (agarosa a l'1% (p/v), 20 mL de formaldehid al 37%, 10 mL de tampó MOPS 10X i 70 mL d'aigua). El tampó d'electroforesi és MOPS 1X i l'electroforesi es va realitzar a voltatge constant de 80 V durant aproximadament 2 hores. L'RNA es va transferir a una membrana de nylon *N-Hybond* (GE Healthcare) utilitzant com a dissolució de transferència SSC 6X (NaCl 0,9 M i citrat sòdic 0,09 M). La transferència es va realitzar o/n i l'RNA es va fixar a la membrana de nylon irradiant llum UV amb l'entrecruador BLX-312 Vilber Lourmat. Per al marcatge de sondes amb l'isòtop [α -³²P] dCTP ([α -³²P] dCTP; 3000 Ci/mmol, Perkin Elmer), aproximadament 25 ng de DNA es van desnaturalitzar a 95 °C durant 5 minuts. Per a un volum final de 20 µL, es van afegir al DNA 4µL del reactiu *High Prime* (Roche) i 2,5 µL de [α -³²P] dCTP i es va incubar la mescla durant 10 minuts a 37 °C. La reacció es va parar afegint 2 µL d'EDTA a pH 8,0 i 50 µL d'aigua desionitzada. La sonda es va purificar utilitzant una columna MicroSpin S-300 HR (GE Healthcare). Les membranes es van pre-hibridar a 65 °C durant 1 hora i 30 minuts en NaPO₄ 0,5 M a pH 7,2, EDTA 1 mM i SDS al 7%. La hibridació es va realitzar durant tota la nit a 65 °C amb la mateixa dissolució a la que es va afegir la sonda previament desnaturalitzada. Després de la hibridació, es van realitzar 2 llavats de les membranes amb solució de llavat (SSC 0,5X i SDS 0,1% (v/v)), un ràpid a temperatura ambient i un altre de 10 minuts a 65 °C. Els filtres es van sotmetre a anàlisi autorradiogràfic. Els filtres es van col·locar en un *Hypercassette* (GE Healthcare) i es van exposar a una pel·lícula fotogràfica (Fuji Medical X-Ray Film 100NIF Super RX) o a una pantalla IP *Phosphorimager* (Fujifilm Imaging Plate, BAS-IP MS 2025,) durant el temps apropiat (des de horas a dies). L'anàlisi de la pantalla IP per a la quantificació de la radiactivitat es va realitzar amb un sistema d'autoradiografia *Phosphorimager* FLA3000 (Fujifilm). L'anàlisi de la imatge es va realitzar amb el programa *Image Gauge* 4.0 (Fujifilm).

3. Base molecular de l'especificitat funcional de Cln2 respecte a Cln1

DETERMINACIÓ DE LA REGIÓ DE LA CICLINA Cln2 RESPONSABLE DE LA SEUA FUNCIONALITAT ESPECÍFICA.

Les ciclins Cln1 i Cln2 controlen la transició G1/S. Encara que aquestes ciclins han estat considerades equivalents en base a la seua homologia de seqüència, regulació i funció, en el nostre grup es va descriure una diferència funcional entre elles caracteritzant-se a Cln2 com la principal responsable dels processos morfogènics de la transició G1/S (Queralt i Igual, 2004). En aquest treball s'aborda la caracterització dels mecanismes responsables de l'especialització de Cln2 respecte de Cln1.

La primera pregunta a respondre per tal de caracteritzar un mecanisme d'especificitat funcional entre les ciclins Cln1 i Cln2 era si existien elements en la seua seqüència proteïca responsables de dita especificitat. L'aproximació experimental utilitzada per tractar de donar resposta a aquesta pregunta va consistir en la construcció de ciclins quimera en les quals es van intercanviar dominis de les dues ciclins. La identitat de la regió N-terminal és del 72% però aquesta identitat es relaxa en la meitat C-terminal (Figura 3.1), així que es van substituir fragments creixents de la

Les quimeres construïdes van ser les següents: la QUIMERA 1 que unia els aminoàcids de l'1 al 476 de Cln2 amb els aminoàcids del 477 al 546 de Cln1; la QUIMERA 2 que unia els aminoàcids de l'1 al 299 de Cln2 amb els aminoàcids del 313 al 546 de Cln1; i la QUIMERA 3 que unia els aminoàcids de l'1 al 225 de Cln2 amb els aminoàcids del 227 al 546 de Cln1. En l'esquema de la Figura 3.2 es mostren les construccions i s'indiquen les seqüències PEST (responsables de la inestabilitat de les proteïnes) i les caixes ciclina de totes les ciclins. Totes les quimeres estan clonades en plasmidis centromèrics sota el control del promotor de *CLN2*.

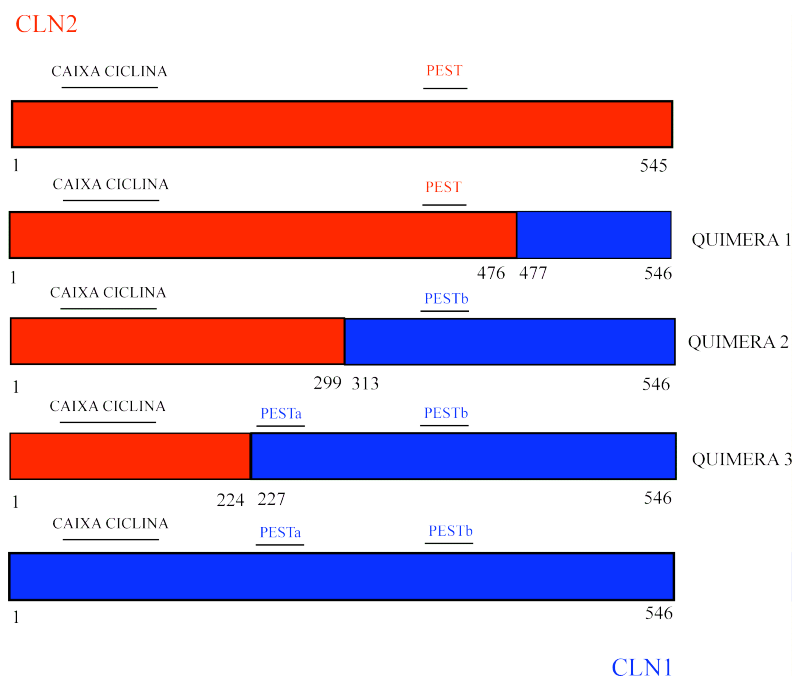


FIGURA 3.2. Esquema de construcció de les ciclins quimera entre Cln1 i Cln2.

En primer lloc es va testar si les quimeres construïdes eren funcionals com a ciclines. Amb aquest propòsit es va analitzar el creixement del mutant *cln1cln2* transformat amb les quimeres. Els mutants senzills *cln1* i *cln2* no presenten defectes importants de creixement però el doble mutant *cln1cln2* creix lentament, de forma més evident si s'augmenta la temperatura (Dirick *et al.*, 1995, Stuart i Wittenberg, 1995). Si el mutant *cln1cln2* superava els seus defectes de creixement a 35°C en transformar-lo amb les quimeres permetria demostrar que eren funcionals com ciclines independentment de que la seua funció fóra tipus Cln1 o tipus Cln2. El resultat que es va obtenir es mostra en la Figura 3.3. La comparació del creixement per al mutant transformat amb les quimeres respecte del vector control permet afirmar que les quimeres són funcionals com ciclines.

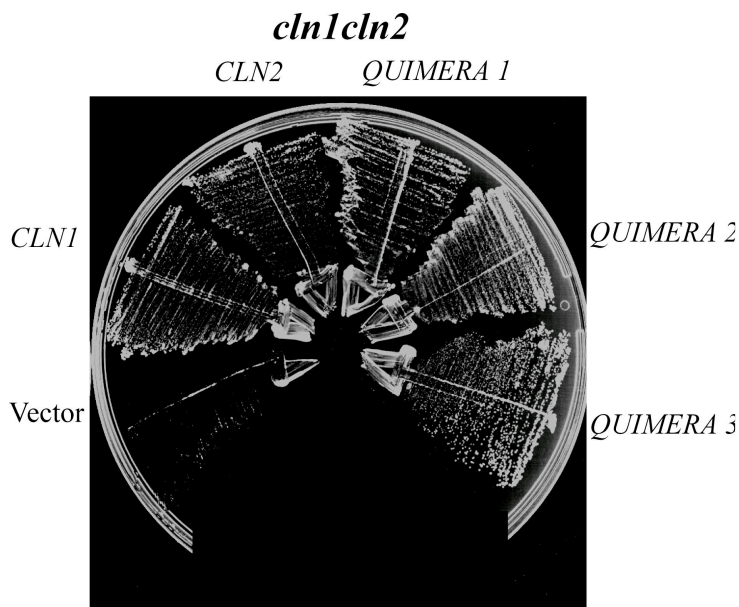


FIGURA 3.3. Comprovació de la funcionalitat de les quimeres. La soca mutant *cln1cln2* (JCY847), transformada amb un vector control (Yep_{lac33}) o amb els plasmidis que contenen *CLN1* (pCM137), *CLN2* (pCM239) o les *QUIMERES 1, 2* i *3* es va sembrar en medi mínim (SD-ura) i es va incubar durant 2 dies a 35°C.

La regió entre els aminoàcids 225 i 299 de Cln2 és necessària per a la seua funcionalitat específica.

Una vegada construïdes les quimeres es va analitzar si presentaven funcionalitat tipus Cln1 o Cln2 mitjançant tres aproximacions diferents.

En el primer experiment es va assajar el tamany cel.lular de soques mutants *cln2* i *cln1cln2* en què s'havien introduït les quimeres. Estava descrit (Queralt i Igual, 2004), i així es reproduceix en la Figura 3.4^a, que aquestes soques presentaven un tamany cel.lular major que la soca silvestre. Com es pot observar en el gràfic, la soca mutant *cln1* no presentava cap diferència de tamany respecte de la soca silvestre, la soca mutant *cln2* presentava un major tamany i la soca mutant *cln1cln2* presentava un augment de tamany encara més gran que el mutant simple *cln2*. La introducció de Cln2 permet que les cèl.lules de les soques mutants *cln2* i *cln1cln2* presenten un tamany similar al silvestre però quan s'introdueix Cln1 el tamany continua augmentat. Calia esperar doncs que les quimeres que presentaren funcionalitat tipus Cln2 provocaren que aquestes soques presentaren un tamany cel.lular similar a la soca silvestre. Com es pot observar en la Figura 3.4B i 3.4C, en introduir les Quimeres 1 o 2 en els mutants *cln2* i *cln1cln2* aquests presentaven un tamany cel.lular similar a la soca silvestre, el que suggereix que no hi ha diferències funcionals entre aquestes quimeres i Cln2. Tanmateix la introducció de la Quimera 3 tot i produir una lleugera reducció del tamany cel.lular dels mutants, no tenia el mateix efecte que Cln2 o les Quimeres 1 i 2. Per tant la funcionalitat específica de Cln2 que permet la reducció de tamany cel.lular observada en els mutants es veia afectada en la Quimera 3.

L'experiència anterior, a més, reforça la conclusió de que totes les quimeres són funcionals, ja que per a totes s'observa una reducció de tamany cel.lular del mutant *cln1cln2* respecte a l'observat per a la introducció del vector control.

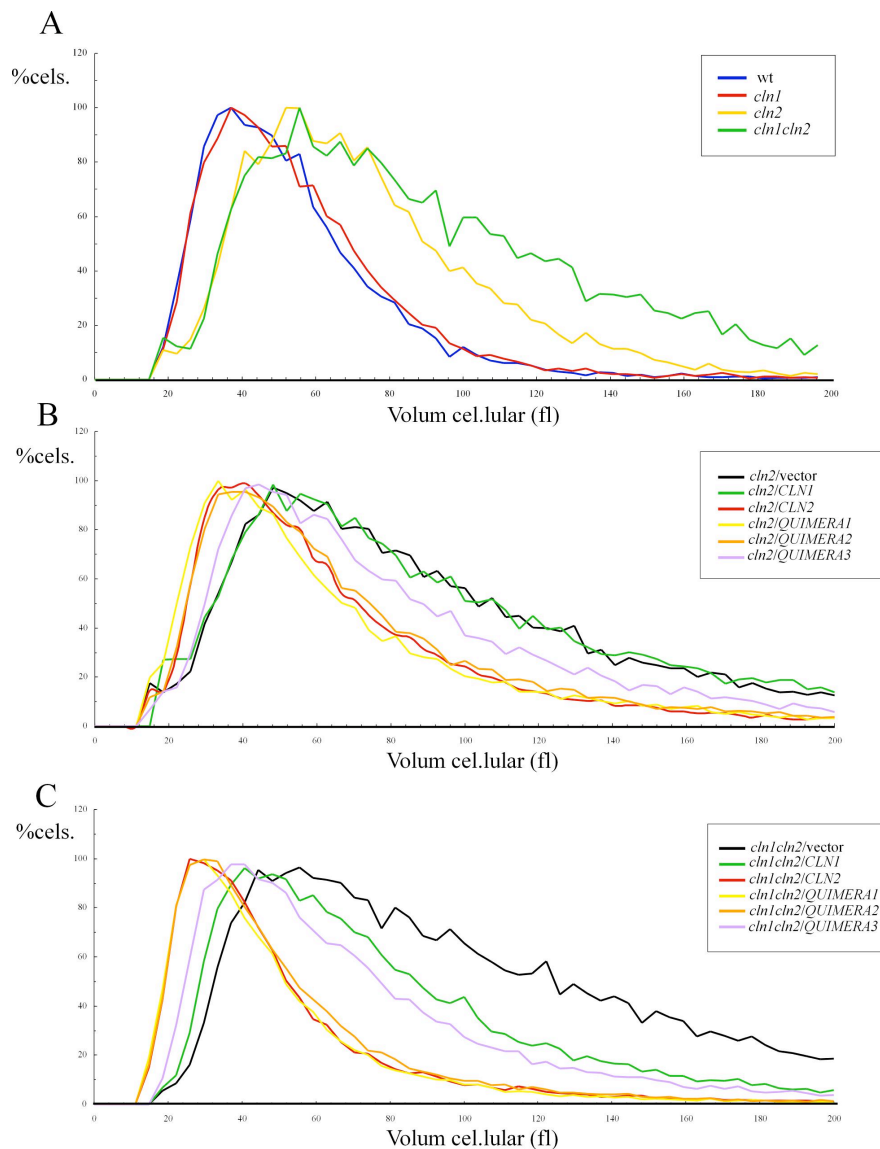


FIGURA 3.4. Anàlisi de la regulació del tamany cel.lular per les quimeres. (A) Tamany cel.lular en cultius en fase exponencial en medi mínim de les soques silvestre (W303), *cln1* (JCY845), *cln2* (JCY846) i *cln1cln2* (JCY847). (B) Tamany cel.lular del mutant *cln2* transformat amb un plasmidi contro l (Ycplac33), o un

Una segona aproximació en l'anàlisi funcional de les quimeres va consistir en estudiar la sensibilitat a Latrunculina B del mutant *cln2* transformat amb els plasmidis que contenen *CLN1*, *CLN2* o les *QUIMERES 1*, *2* i *3*. Estava descrit que el mutant *cln2*, en comparació amb el mutant *cln1*, presenta hipersensibilitat a la perturbació del citoesquelet d'actina provocada per la presència en el medi de Latrunculina B (Queralt i Igual, 2004). Calia esperar, doncs, que aquelles quimeres que presentaren funcionalitat tipus Cln2 permetrien al mutant *cln2* millorar el seu creixement en presència de la droga. En la Figura 3.5 s'observen els resultats que es van obtenir. La introducció de *CLN2* però no de *CLN1* permetia al mutant *cln2* superar la hipersensibilitat a la Latrunculina B. La introducció de les *QUIMERES 1* i *2* va permetre un creixement molt semblant a l'observat en introduir *CLN2*. Tanmateix, en introduir la *QUIMERA 3*, el mutant *cln2*, encara que creixia millor que quan introduïem *CLN1*, continuava presentant certa hipersensibilitat a la droga. Per tant la funcionalitat pròpia de Cln2 en la *QUIMERA 3* de nou pareixia veure's afectada en aquest assaig.

Per últim, es va estudiar la capacitat de supressió per part de les quimeres de la letalitat condicional de la soca mutant d'Start *swi4^{ts}swi6*. Aquesta soca es capaç de créixer a temperatura permissiva (28°C) però no a temperatura restrictiva (>35°C). Es va veure que la introducció de *CLN2* en un plasmidi centromèric suprimia la letalitat de la mutació a temperatura restrictiva de 35°C mentre que la introducció de *CLN1* no era capaç de fer-ho. Així doncs, es disposava d'una nova prova de funcionalitat específica de Cln2 per sotmetre a anàlisi a les quimeres. Els resultats mostrats en la Figura 3.6 permetien concloure que les *QUIMERES 1* i *2* suprimien la letalitat del mutant *swi4^{ts}swi6* a 35°C mentre que la *QUIMERA 3* és incapaç de fer-ho, la qual cosa ens permet afirmar que la *QUIMERA 3* ha perdut la funcionalitat específica de Cln2.

plasmidi que conté *CLN1* (pCM137), *CLN2* (pCM239) o les *QUIMERES 1*, *2*, o *3*. (C) Tamany cel.lular del mutant *cln1cln2* transformat amb un plasmidi control (Ycplac33), o un plasmidi que conté *CLN1* (pCM137), *CLN2* (pCM239) o les *QUIMERES 1*, *2*, o *3*.

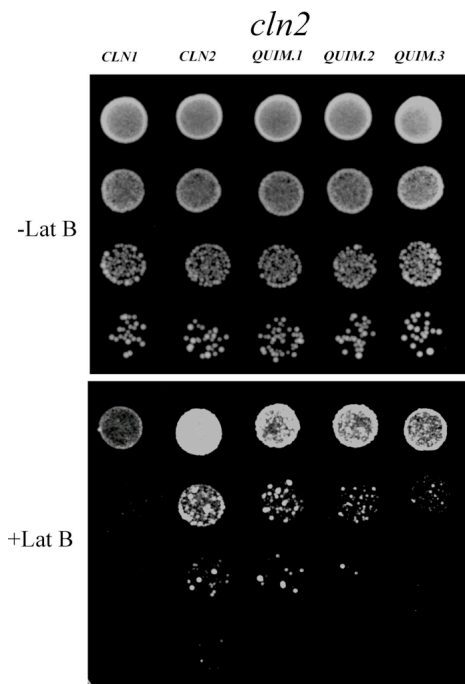


FIGURA 3.5. Supressió dels defectes de creixement del mutant *cln2* en presència de Latrunculina B. Dilucions seriadades de cultius en fase exponencial de la soca mutant *cln2* (JCY846), transformada amb un plasmidi que conté *CLN1* (pCM137), *CLN2* (pCM239) o les *QUIMERES 1, 2* o *3* es van sembrar en medi YPD suplementat amb Latrunculina B 25µM i es van incubar durant 2 dies a 28°C.

En resum, els resultats de les tres aproximacions presentades, tant de l'anàlisi del tamany cel.lular de mutants *cln2* i *cln1cln2*, com del creixement del mutant *cln2* en presència de Latrunculina B, com de l'estudi de la supressió de la letalitat del mutant *swi4^{ts}swi6*, són consistents i permeten afirmar que tant la Quimera 1 com la Quimera 2 presenten funcionalitat tipus Cln2 però, la Quimera 3 ha perdut aquesta funcionalitat específica, si més no parcialment. Si recordem com havien estat construïdes les quimeres podem, per tant, concloure que la regió entre els aminoàcids 225 i 299 de la ciclina Cln2 és necessària per a la seua funció específica.

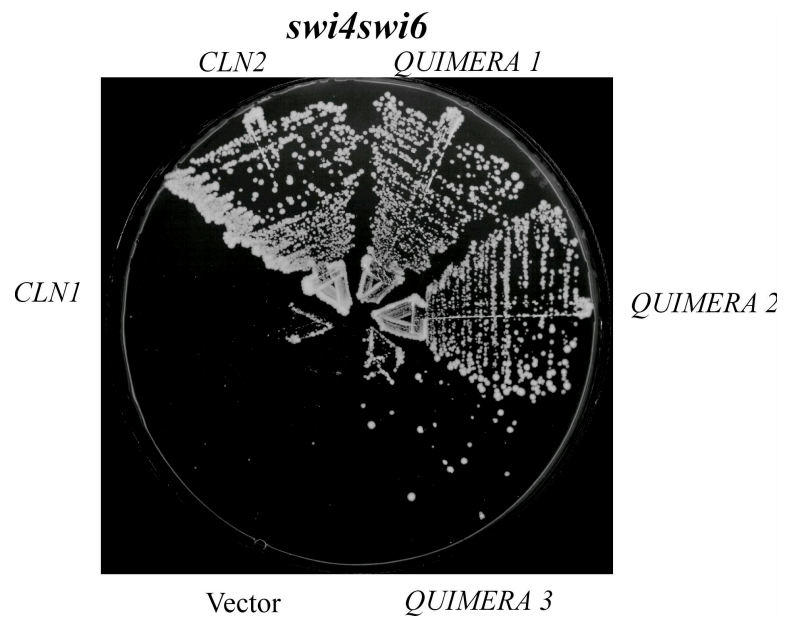


FIGURA 3.6. Supressió de la letalitat del mutant *swi4^{ts}swi6* (JCY073) per les quimeres. La soca mutant *swi4^{ts}swi6*, transformada amb un vector control (YCplac33) o amb el plasmidi que conté *CLN1* (pCM137), *CLN2* (pCM239) o les QUIMERES 1, 2 o 3 es va sembrar en YPD i es va incubar durant 3 dies a 35°C.

La regió entre els aminoàcids 225 i 299 de Cln2 és suficient per conferir a Cln1 la funcionalitat específica de Cln2.

Una vegada acotada una regió necessària per a la funcionalitat específica de Cln2 calia comprovar si la introducció d'eixa regió en Cln1 era suficient per conferir-li la funcionalitat pròpia de Cln2. Amb aquesta intenció es va construir la *QUIMERA 4* que unia els aminoàcids de l'1 al 224 de Cln1 amb els aminoàcids del 225 al 299 de Cln2 i els aminoàcids del 313 al 546 de Cln1. L'esquema pot observar-se en la Figura 3.7.

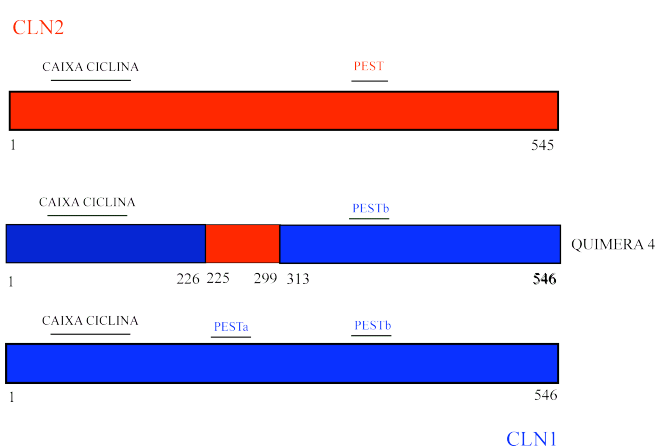


FIGURA 3.7. Esquema de construcció de la ciclina quimera 4.

Es va testar la funcionalitat de la *QUIMERA 4* començant per l'anàlisi de la supressió de la letalitat del mutant *swi4^{ts}swi6*. Es va transformar la soca mutant amb plasmidis que contenen *CLN1*, *CLN2* o la *QUIMERA 4*. Com s'observa en la Figura 3.8., la introducció de la *QUIMERA 4* és capaç de suprimir la letalitat de la soca *swi4^{ts}swi6* a temperatura restrictiva.

A la vista d'aquest resultat es va procedir a realitzar la resta de proves de funcionalitat. En la Figura 3.9 es mostra el creixement del mutant *cln2* transformat amb *CLN1*, *CLN2* o la *QUIMERA 4* en absència i presència de Latrunculina B. Es pot veure que la introducció de la *QUIMERA 4* permet al mutant *cln2* millorar la seua resistència a Latrunculina B.

Aquest resultat junt amb l'anterior ens permetia confirmar que la regió entre els aminoàcids 225 i 299 de *Cln2* és no només necessària sinó suficient per otorgar a *Cln2* la seua funcionalitat específica.

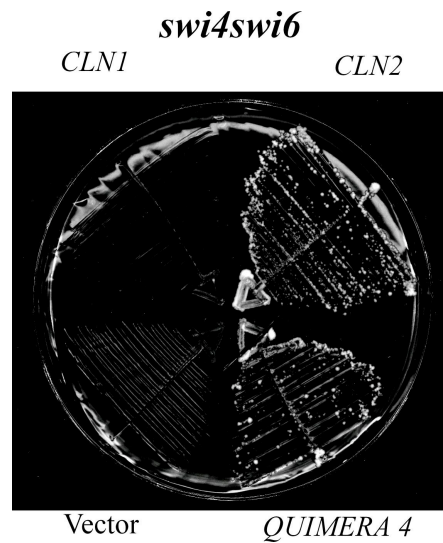


FIGURA 3.8. Supressió de la letalitat del mutant *swi4^{ts}swi6* per la *QUIMERA 4*. La soca mutant *swi4^{ts}swi6* (JCY073), transformada amb un vector control (YCplac33) o amb un plàsmid que conté *CLN1* (pCM137), *CLN2* (pCM239) o la *QUIMERA 4* es va sembrar en YPD i es va incubar durant 3 dies a 35°C.

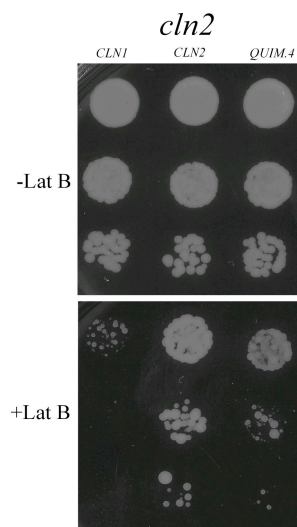


FIGURA 3.9. Supressió dels defectes de creixement del mutant *cln2* en presència de LatrunculinaB per la *QUIMERA 4*. Dilucions seriades de cultius en fase exponencial de la soca mutant *cln2* (JCY846), transformada amb un plàsmid que conté *CLN1* (pCM137), *CLN2* (pCM239) o la *QUIMERA 4* es van sembrar en medi YPD suplementat amb Latrunculina B 25µM i es van incubar durant 2 dies a 28°C.

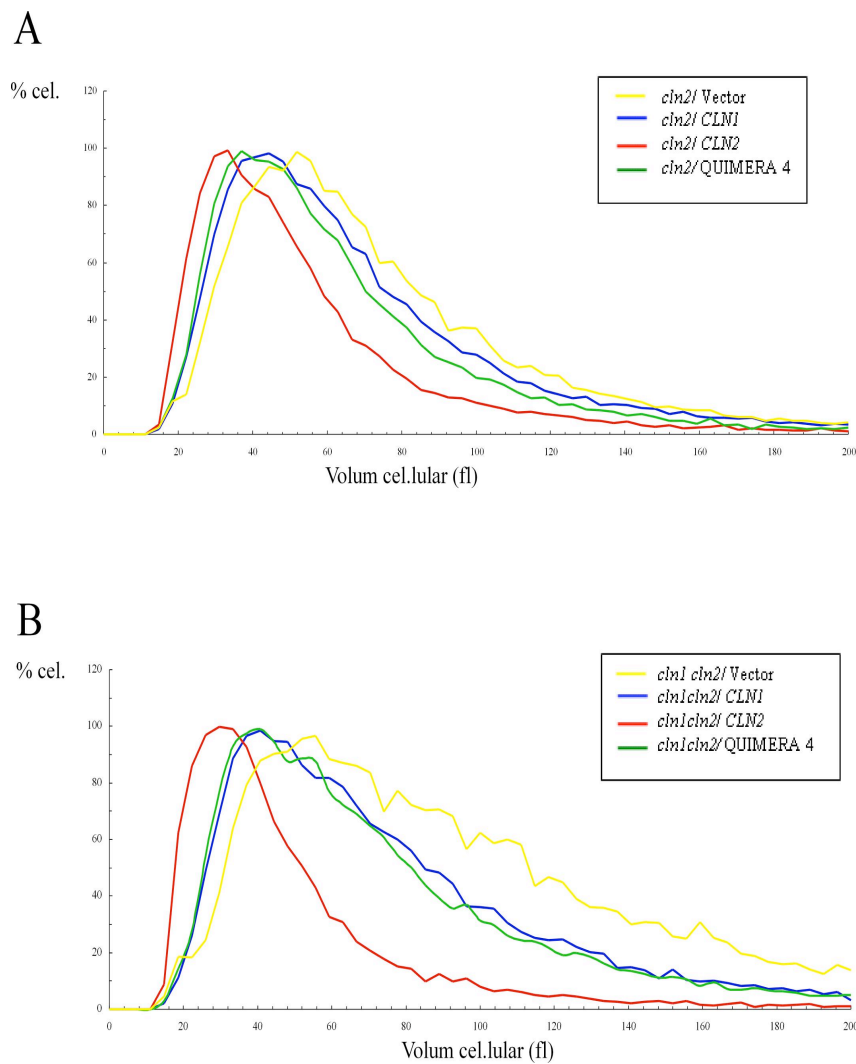


FIGURA 3.10. Anàlisi de la regulació del tamany cel.lular per la QUIMERA 4. (A) Tamany cel.lular del mutant *cln2* (JCY846) transformat amb un plasmidi control (Ycplac33), o un plasmidi que conté *CLN1* (pCM137), *CLN2* (pCM239) o la QUIMERA 4. (B) Tamany cel.lular del mutant *cln1cln2* (JCY847) transformat amb un plasmidi control (Ycplac33), o un plasmidi que conté *CLN1* (pCM137), *CLN2* (pCM239) o la QUIMERA 4.

També es va realitzar l'anàlisi de tamany de les soques *cln2* i *cln1cln2* transformades amb la *QUIMERA 4* (Figura 3.10). La introducció de la *QUIMERA 4* provocava el mateix efecte que la introducció de *CLN1*. Per tant, per aquesta prova de funcionalitat la introducció de la regió entre els aminoàcids 225 i 299 de Cln2 en Cln1 no era suficient per conferir-li la funcionalitat responsable de la reducció del tamany de les soques *cln2* i *cln1cln2*. Aquest fet conduïa a la hipòtesi de que diferents proves de funcionalitat reflectien diferents capacitats de Cln2 per a realitzar funcions que Cln1 era incapaç de realitzar. Per això es va decidir testar la funcionalitat de la *QUIMERA 4* amb noves proves de funcionalitat.

En treballs anteriors el nostre grup havia establert que l'absència de Cln2 es traduïa en un retardament específic de la gemmació d'uns 10 minuts, mentre que no s'observaven defectes en l'activació del programa transcripcional d'Start ni en l'inici de la replicació del DNA (Queralt i Igual, 2004). Si Cln2 és el factor limitant per a l'inici de la gemmació una prova de funcionalitat consistiria en comprovar si la *QUIMERA 4* era capaç de suprimir el retràs en gemmació observat quan no està present dita ciclina.

L'experiment dissenyat va consistir en seguir l'índex de gemmació en cultius sincronitzats d'un mutant *cln1cln2* transformat amb plasmidis que contenen *CLN1*, *CLN2* o la *QUIMERA 4*. La sincronització es va assolir per dues vies diferents: emprant un fons genètic *cdc28^{ts}*, que permetia obtenir una parada en G1 a temperatura restrictiva de 37°C, i emprant factor α , que permetia afegint-lo al medi de cultiu aconseguir la parada en G1. Una vegada comprovat el fenotip de parada per observació al microscopi s'alliberaven els cultius passant-los a 25°C o eliminant el factor α del medi, respectivament. Llavors es realitzava el seguiment de l'índex de gemmació del cultiu durant 60 minuts. Els resultats es mostren en la Figura 3.11, A i B respectivament. S'havia descrit un retràs en la gemmació del mutant *cln2* respecte a una soca silvestre, retràs que no es produïa en un mutant *cln1* (Queralt i Igual, 2004). En els gràfics pot observar-se, com era esperable, que les cèl·lules *cln1cln2* transformades amb *CLN1* (equivalents a un mutant *cln2*) presenten un retràs en gemmació respecte de les transformades amb *CLN2* (equivalents a un mutant *cln1*). En les dues aproximacions

experimentals es va comprovar que la introducció de la *QUIMERA 4* produïa el mateix efecte que la introducció de *CLN2*, és a dir s'aconseguia la supressió del retràs en gemmació.

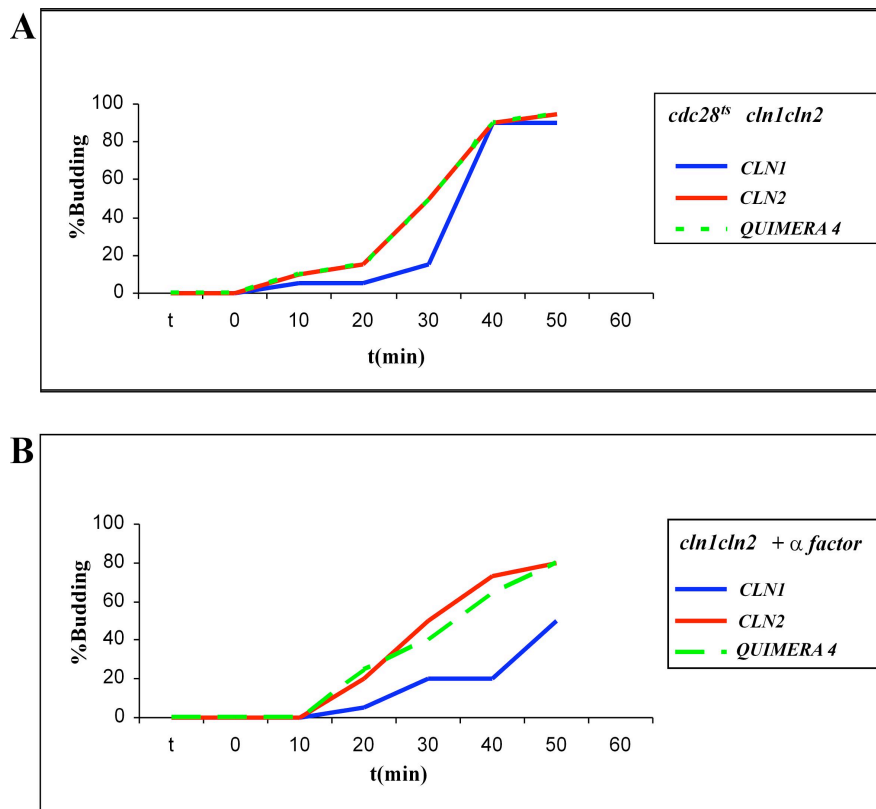


FIGURA 3.11. Anàlisi del control de la gemmació per la *QUIMERA 4*. (A) Cultius en fase exponencial de creixement del mutant *cdc28^{ts}cln1cln2* (JCY1048), transformat amb un plasmidi que conté *CLN1* (pCM137), *CLN2* (pCM239) o *QUIMERA 4* s'incubaren a 37°C durant 3h. Després de ser transferits de nou a 25°C es va determinar l'índex de gemmació als temps indicats. (B) Cultius en fase exponencial de creixement del mutant *cln1cln2* (JCY847), transformat amb un plasmidi que conté *CLN1* (pCM137), *CLN2* (pCM239) o *QUIMERA 4* s'incubaren en presència de factor α durant 3h. Després de ser alliberats de la parada en G1, es va determinar l'índex de gemmació als temps indicats.

D'aquest experiment es pot concloure que la regió entre els aminoàcids 225 i 299 de Cln2 és necessària i suficient per conferir a la ciclina la seua funció específica durant el procés de gemmació. Aquest paper en gemmació havia estat caracteritzat com la funció principal que Cln2 era capaç de realitzar de forma específica front a Cln1. El següent pas a donar era determinar el mecanisme pel que ho fa.

El nivell proteic de les ciclines no està relacionat amb la seua funcionalitat.

S'havia observat repetidament que el nivell de Cln2 era significativament superior al de Cln1 en un anàlisi per *western blot*. Per tant el primer mecanisme a analitzar pel qual la regió caracteritzada poguera regular la funcionalitat específica de la ciclina Cln2 era que controlara els nivells de proteïna. Tanmateix quan es van observar les distintes quimeres es va veure que el nivell proteic de les Quimeres 1 y 2 (equivalents funcionalment a Cln2) és inferior al de Cln2 mentre que el nivell de la Quimera 3 (amb defectes en la funcionalitat específica tipus Cln2) es més similar al de Cln2 (Figura 3.12). Així mateix, el més determinant és que es va constatar que el nivell de la Quimera 4 és igual al de Cln1, mentre que presenta funcionalitat específica tipus Cln2. No existeix, doncs, relació directa entre nivell proteic i funcionalitat (Figura 3.12).

Quan es van observar aquests resultats es va detectar una diferència en la migració electroforètica de les diferents ciclines. Possiblement existeix un patró de modificació comú per a Cln2 i les Quimeres 1, 2 i 3 i un altre diferent per a Cln1 i la Quimera 4. La natura i relevància d'aquest patró de modificació no s'ha estudiat en el present treball, però en base a que d'una banda el patró de modificació de la Quimera 3 es correspon al de Cln2, i d'altra banda el patró de modificació de la Quimera 4 es correspon amb el de Cln1, podem deduir que tampoc hi ha correlació entre el patró de modificació i la funcionalitat tipus Cln2.

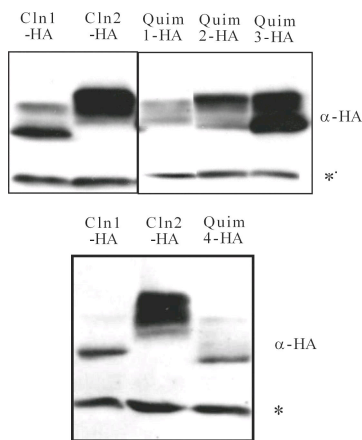


FIGURA 3.12. Anàlisi dels nivells proteics de ciclins i quimeres per western blot. Anàlisi de nivells proteics en extractes de cultius de la soca W303 transformada amb un plàsmid que conté *CLN1*, *CLN2* o les quimeres etiquetades amb HA. Com a control de càrrega es mostra la banda inespecífica (*) que s'obté en revelar amb 12C5A.

REGULACIÓ ESPACIAL DE LES CICLINES Cln1 i Cln2.

Cln1 presenta una major acumulació nuclear que Cln2.

Estudis preliminars del nostre grup havien descrit una diferència entre la localització de Cln1 i Cln2 (Queralt i Igual, 2004). Per això es va decidir caracteritzar amb detall la regulació espacial de les ciclins. El primer objectiu era comprovar dita diferència, per la qual cosa es van localitzar les ciclins per immunofluorescència indirecta sota l'expressió del promotor ectòpic *tetO₂* per tal d'obtenir un nivell proteic suficient. Després de repetides observacions la quantificació mostra que encara que es detecta senyal corresponent a les dues ciclins tant en el nucli com en el citosol, Cln1 presenta una major acumulació nuclear que Cln2 (Figura 3.13).

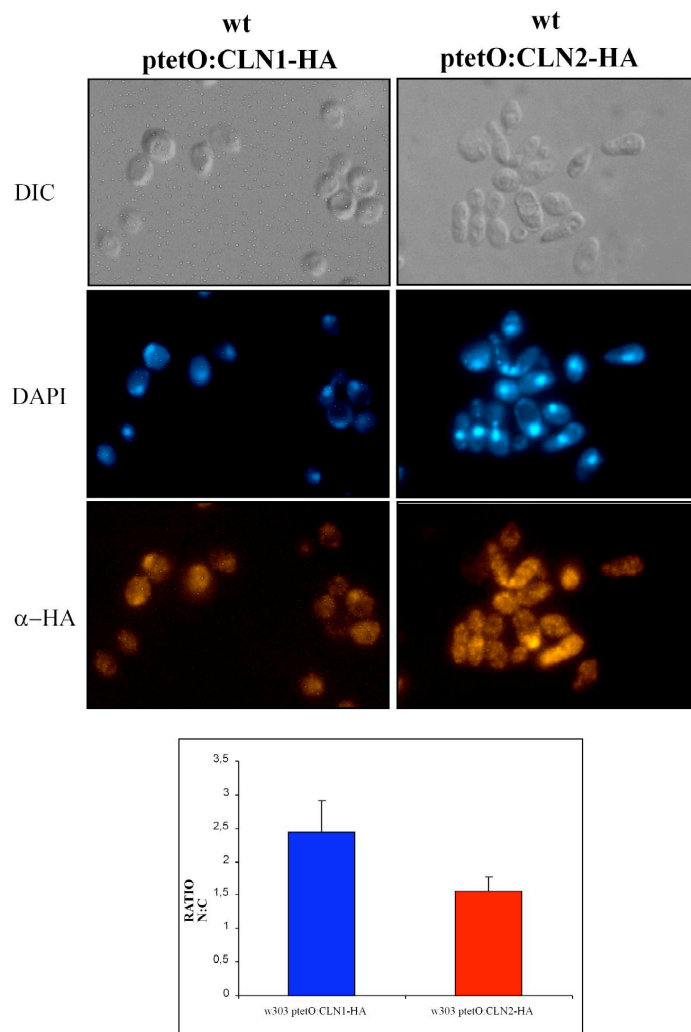


FIGURA 3.13. Localització subcel·lular de *Cln1* i *Cln2*. Cèl·lules de cultius en fase exponencial de la soca silvestre W303 transformada amb els plasmidis *ptetO₂:CLN2-HA* (pCM250) o *ptetO₂:CLN1-HA* (pCM258) van ser analitzades per immunofluorescència indirecta. Es mostren imatges de DIC, tinció del DNA amb DAPI i senyal corresponent a *Cln1-HA* i *Cln2-HA* (anti-HA). La distribució relativa de *Cln1* i *Cln2* entre el nucli i el citoplasma (ratio N/C) es va determinar calculant la relació entre la intensitat fluorescent mitjana d'àrees nuclears i citosòliques de la cèl·lula ($n > 60$ cèl·lules).

Carioferines implicades en la importació i exportació de les ciclins Cln1 i Cln2

Dins de l'anàlisi de la localització de les ciclins calia fer un estudi del transport de Cln2 i Cln1 entre el nucli i el citoplasma. El laboratori va recopilar una col·lecció de tots els mutants en carioferines de la família de la importina β . Es van adquirir d'*EUROSCARF* tots els que presentaven mutacions viables (9 dels 14 totals): *kap104*, *kap108*, *kap114*, *kap119*, *kap120*, *kap122*, *kap123*, *msn5* i *los1*. Es van construir els 5 mutants corresponents a les carioferines essencials mitjançant la substitució del seu promotor pel promotor *tetO₇*, regulable per doxyciclina: *tetO₇:KAP95*, *tetO₇:CSE1*, *tetO₇:XPO1*, *tetO₇:PSE1* i *tetO₇:MTR10*. Es va realitzar un anàlisi sistemàtic de la localització de les ciclins, sobreexpressades de forma no regulada al llarg del cicle, en totes les soques mutants en carioferines. Les soques mutants en carioferines no essencials van ser transformades amb els plasmidis *ptetO₂:CLN1-HA* i *ptetO₂:CLN2-HA*. Les soques mutants en carioferines essencials van ser transformades amb els plasmidis *pADHI:CLN1-HA* i *pADHI:CLN2-HA*, ja que no podia emprar-se el promotor *tetO₇* per estar regulant l'expressió del gen de la carioferina corresponent.

El primer resultat a destacar és que per a les dues ciclins es detectava senyal nuclear en tots els mutants en carioferines excepte en els mutants *tetO₇:KAP95* i *tetO₇:CSE1* en presència de doxyciclina (Figura 3.14 i resultats no mostrats). Kap95, Kap60 i Cse1 conformen l'anomenada via clàssica d'importació. Kap60 s'encarrega de reconèixer els senyals clàssics d'importació de les proteïnes transportades pel tàndem Kap95-Kap60. Cse1 és l'exportina encarregada d'exportar al citosol a Kap60. Els resultat obtingut apuntava, per tant, a un possible paper de la via clàssica d'importació en l'entrada al nucli tant de Cln1 com de Cln2.

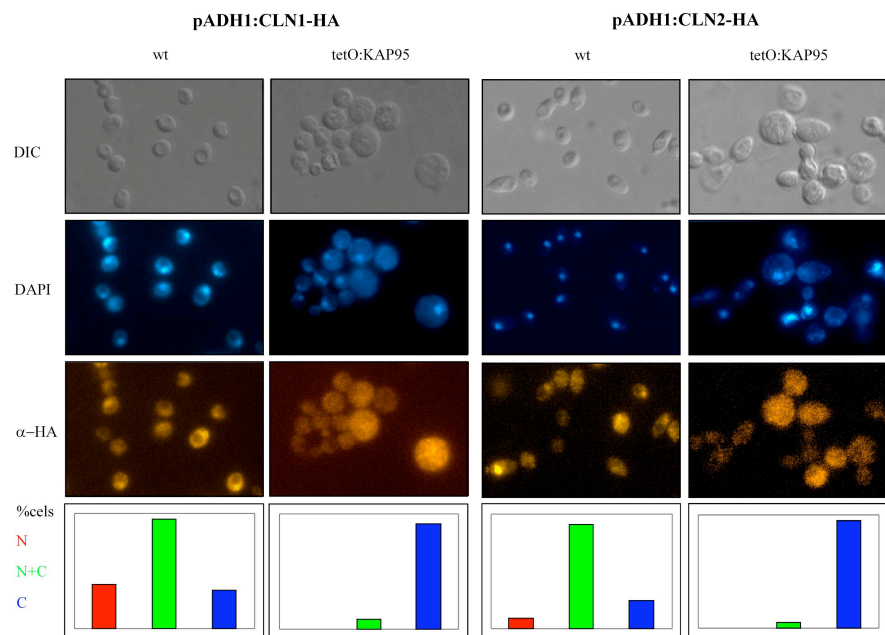
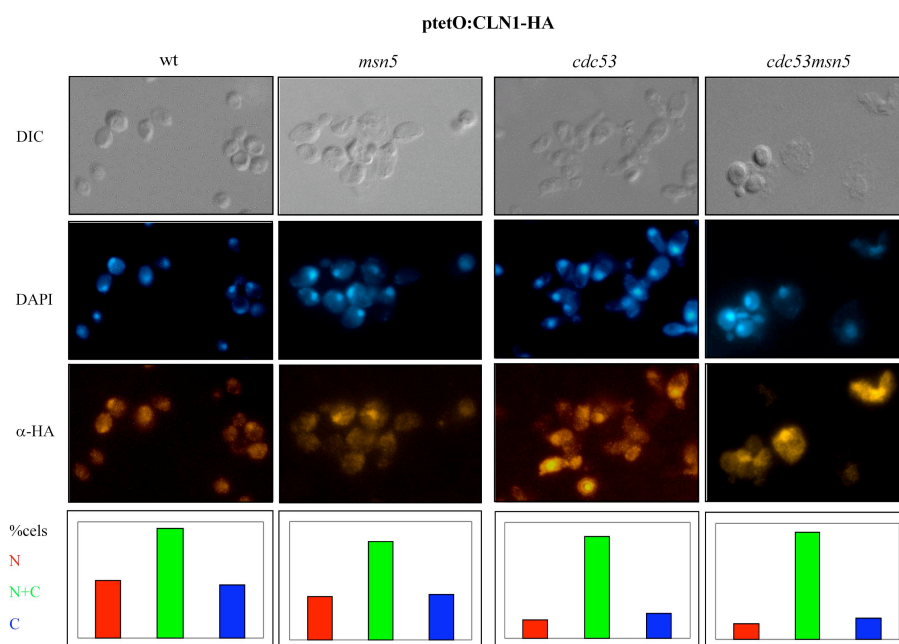
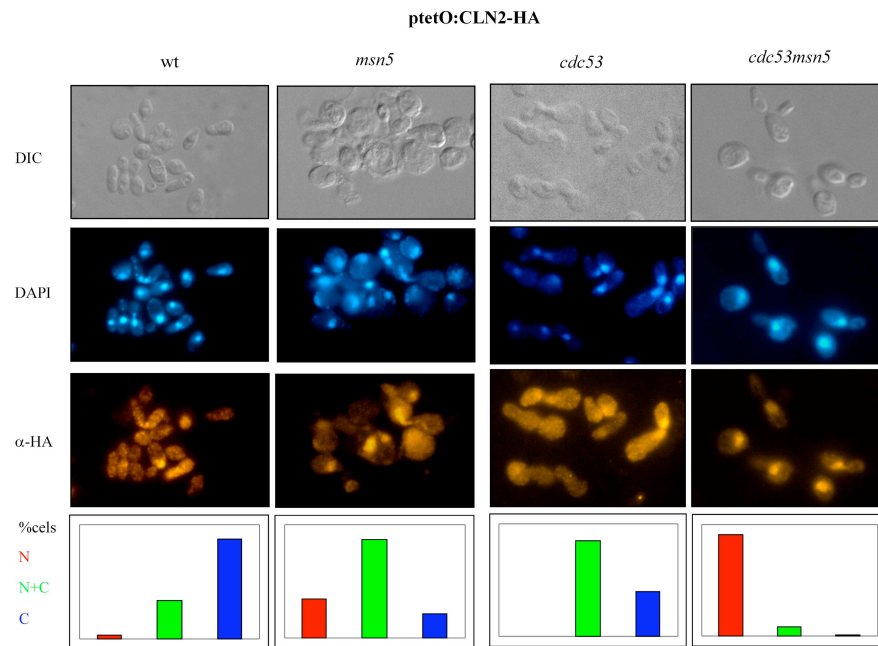


FIGURA 3.14. Estudi de la localització de *Cln1* i *Cln2* en el mutant *tetO₇::KAP95*. Cèl.lules en fase de creixement exponencial de les soques W303 i *tetO₇::KAP95* (JCY970) transformades amb el plasmidi *pADH1:CLN1-HA* o *pADH1:CLN2-HA* s'incubaren durant 8h amb Doxyciclina 0'5µg/mL i s'analitzaren per immunofluorescència indirecta. Es mostren imatges de DIC, tinció del DNA amb DAPI i senyal corresponent a *Cln1*-HA i *Cln2*-HA (anti-HA), així com la quantificació del percentatge de cèl.lules que presenten senyal nuclear (N), nuclear i citosòlic (N+C) o només citosòlic (C).

El segon resultat a destacar en l'anàlisi de la localització de les ciclins en tots els mutants en carioferines és l'acumulació nuclear que es va detectar en el mutant *msn5* per al cas de la ciclina *Cln2*. Paral·lelament al treball que estem descrivint el nostre grup havia progressat en l'estudi de la relació entre la carioferina *Msn5* i la ciclina *Cln2* (Tesis doctoral F.Taberner), el que havia dut a analitzar si *Msn5* tenia un paper en la regulació de la localització de *Cln2*. Per assolir nivells de ciclina suficients per detectar-la per immunofluorescència, en una primera aproximació es va

Base molecular de l'especificitat funcional de Cln2 respecte a Cln1



sobreexpressar la ciclina i, en una segona aproximació es va combinar la sobreexpressió amb la inactivació de la via de degradació de la ciclina (emprant la soca mutant condicional *cdc53-1*, subunitat estructural d'SCF). D'aquesta manera ja es va observar que l'absència de Msn5 ocasionava una dràstica acumulació nuclear de Cln2, i per tant es va concloure que l'exportina Msn5 era requerida per a l'exportació de Cln2 al citosol. En aquest treball es va repetir l'estudi de la localització de la ciclina Cln2 en les condicions esmentades i es va realitzar paral·lelament el de la ciclina Cln1. Es van transformar les soques W303, *msn5*, *cdc53-1* i *cdc53msn5* amb els plasmidis *ptetO₂:CLN1-HA* o *ptetO₂:CLN2-HA* i es va analitzar la localització de les ciclines per immunofluorescència indirecta (Figura 3.15). D'una banda es va comprovar l'acumulació nuclear de Cln2 que es produïa en el mutant *msn5* i d'altra banda no es van observar diferències de localització entre la soca silvestre i el mutant *msn5* per a la ciclina Cln1.

Els resultats anteriors es van obtenir en condicions de sobreexpressió de ciclines. A continuació es va analitzar el paper de Msn5 com exportina de Cln2 en condicions endògenes. L'expressió de Cln2 és fortament periòdica. Per tal d'augmentar el nombre de cèl·lules que expressaven ciclina, es van sincronitzar els cultius amb factor α i després d'alliberar-los, es van prendre mostres a diferents temps. En la Figura 3.16 es mostren imatges corresponents als 30 minuts després de l'alliberament. Es pot veure una acumulació del senyal corresponent a Cln2-HA en el nucli en el mutant *msn5* mentre que el senyal en la soca silvestre, tot i aparèixer en algunes cèl·lules en el nucli, és principalment citosòlic. Amb aquests resultats es corrobora, sense cap influència de la sobreexpressió o la manca de degradació, que l'exportina Msn5 participa en l'eixida del nucli de la ciclina Cln2.

FIGURA 3.15. Estudi de la localització de Cln1 i Cln2 en el mutant *msn5*. Cèl·lules en fase de creixement exponencial de les soques W303 i *msn5* (JCY1366) i de les soques *cdc53-1* i *cdc53msn5* (JCY684) incubades durant 4h a 37°C transformades amb el plasmidi *ptetO:CLN1-HA* o *ptetO:CLN2-HA* es van analitzar per immunofluorescència indirecta. Es mostren imatges de DIC, tinció del DNA amb DAPI i senyal corresponent a Cln1-HA i Cln2-HA (anti-HA), així com la quantificació del percentatge de cèl·lules que presenten senyal nuclear (N), nuclear i citosòlic (N+C) o només citosòlic (C).

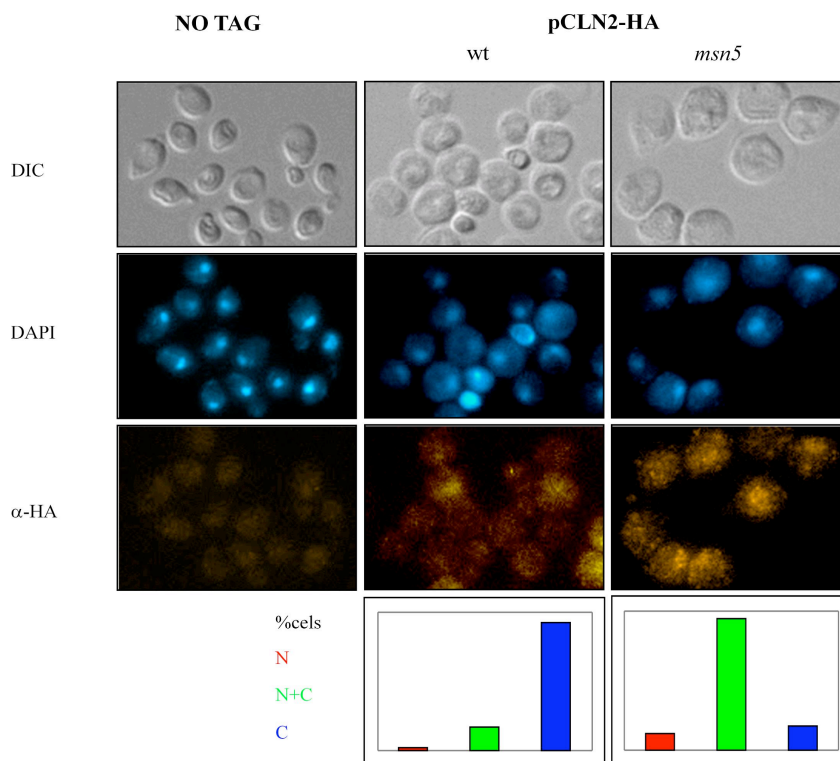


FIGURA 3.16. Estudi de la localització de *Cln2* endògena en el mutant *msn5*. Cèl.lules en fase de creixement exponencial de les soques W303 i *msn5* (JCY1366) transformades amb el plasmidi *pCLN2-HA* (pCM239) es van incubar 3h amb factor α per tal de sincronitzar-los en G1. Després d'alliberar-les es van analitzar per immunofluorescència indirecta mostres recollides a diferents temps. En la figura es mostren els resultats de la mostra de $t=30\text{min}$. Es mostren imatges de DIC, tinció del DNA amb DAPI i senyal corresponent a *Cln2*-HA (anti-HA), així com la quantificació del percentatge de cèl.lules que presenten senyal nuclear (N), nuclear i citosòlic (N+C) o només citosòlic (C).

Una vegada caracteritzades les carioferines responsables del transport de Cln2 es va decidir testar la interacció física entre Cln2 i aquestes carioferines per coimmunoprecipitació. En primer lloc es va realitzar una immunoprecipitació de Cln2-HA i es va analitzar la presència de Kap95 en la fracció purificada. Com es pot veure en la figura 3.17 la proteïna Kap95 va ser selectivament coimmunoprecipitada amb Cln2-HA. Per tant, existeix una interacció física *in vivo* entre Cln2 i Kap95 que reforça la conclusió de la participació de la via clàssica d'importació en l'entrada al nucli de la ciclina Cln2. En segon lloc es va realitzar una immunoprecipitació de Msn5-HA i es va analitzar la presència de la versió truncada estable Cln2¹⁻³⁷⁰GFP en la fracció purificada. Com es pot veure en la figura 3.18 la proteïna Cln2¹⁻³⁷⁰GFP va ser selectivament coimmunoprecipitada amb Msn5-HA. Per tant, existeix una interacció física *in vivo* entre Cln2 i Msn5 consistent amb la participació de Msn5 en l'eixida del nucli de la ciclina Cln2.

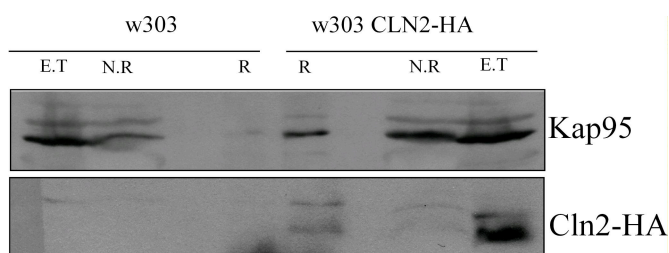


FIGURA 3.17. Interacció física entre Cln2 i Kap95. Kap95 va ser immunoprecipitada amb anticòs anti-HA (3F10) d'extractes crus de cèl.lules de la soca que expressava Cln2 etiquetada amb HA (JCY1357) o la soca control (W303). La presència de Kap95 en l'extracte total (E.T), la fracció no retinguda (N.R) i la fracció retinguda (R) va ser determinada per *western* amb un anticòs específic anti-Kap95.

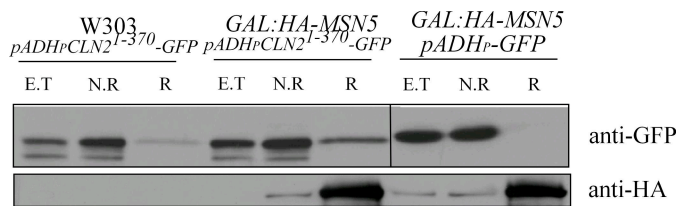


FIGURA 3.18. Interacció física entre Cln2 i Msn5. Cln2¹⁻³⁷⁰GFP va ser immunoprecipitada amb anticòs anti-HA (3F10) d'extractes crus de cèl.lules de la soca que expressava Msn5 etiquetada amb HA (JCY313) o la soca control (W303). La presència de Cln2¹⁻³⁷⁰GFP en l'extracte total (E.T), la fracció no retinguda (N.R) i la fracció retinguda (R) va ser determinada per *western* amb un anticòs anti-GFP. Com a control es mostra la immunoprecipitació de GFP.

Com a conclusió del rastreig de carioferines responsables de la localització de les ciclins Cln1 i Cln2 es poden enumerar dos resultats fonamentals. El primer és que Kap95 (i per extensió Kap60 i Cse1, components totes de la via clàssica d'importació) seria la importina d'ambdues ciclins. El segon és que Msn5 seria l'exportina de Cln2 però no de Cln1. El següent pas era tractar d'acotar els senyals de localització nuclear (NLS) i d'exportació (NES) que pugueren existir en les ciclins.

Rastreig de la regió implicada en l'exportació de la ciclina Cln2

L'estratègia emprada per rastrejar els senyals de localització de la ciclina Cln2 va ser la construcció de versions truncades de la ciclina etiquetades amb l'epítop HA i sobreexpressades sota el control del promotor *GALI* (Figura 3.19). La primera versió truncada de Cln2 corresponia a Cln2¹⁻³⁷⁰ en la qual s'havia eliminat la seqüència PEST responsable de la degradació de la ciclina i açò permetia augmentar el senyal per facilitar la detecció per immunofluorescència. Les següents versions respectaven els punts d'intercanvi de dominis escollits per a construir les ciclins quimera.

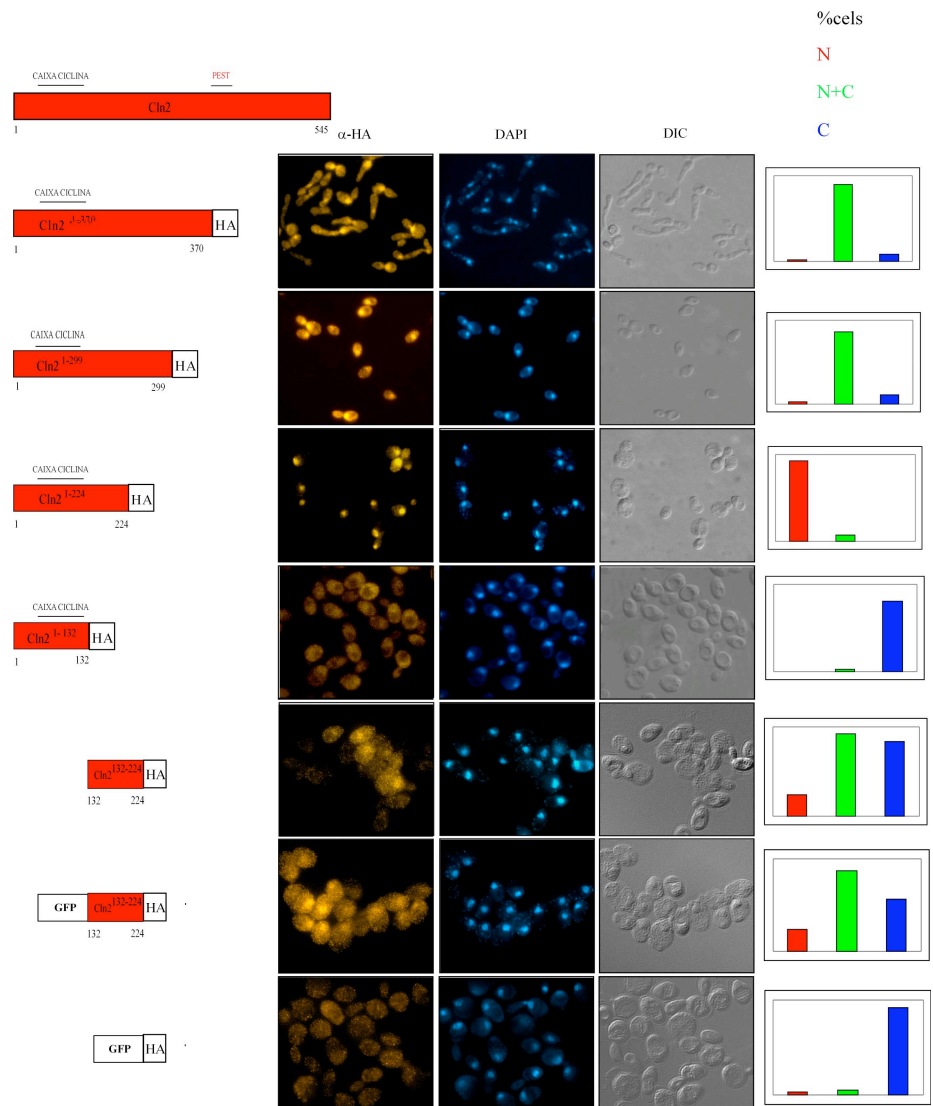


FIGURA 3.19. Localització de versions truncades de la ciclina Cln2. Cèl.lules procedents de cultius en fase exponencial de les soques *GAL:CLN2*¹⁻³⁷⁰-HA (JCY1128), *GAL:CLN2*¹⁻²⁹⁹-HA (JCY1385), *GAL:CLN2*¹⁻²²⁴-HA (JCY1125), *GAL:CLN2*¹⁻¹³²-HA (JCY1389), *GAL:CLN2*¹³²⁻²²⁴-HA (JCY1392) *GAL:GFP-CLN2*¹³²⁻²²⁴-HA (JCY1393) o *GAL:GFP-HA* es van analitzar per immunofluorescència indirecta. Es mostren imatges de DIC, DAPI i senyal corresponent a Cln2-HA, així com la quantificació del percentatge de cèl.lules que presenten senyal nuclear (N), nuclear i citosòlic (N+C) o només citosòlic (C).

L'anàlisi de la localització de Cln2¹⁻³⁷⁰ i Cln2¹⁻²⁹⁹ va revelar que ambdues proteïnes presentaven un senyal intens localitzat tant al nucli com al citosol. Tanmateix quan es va construir la versió truncada Cln2¹⁻²²⁴ es va veure que aquesta distribució del senyal per tota la cèl.lula es perdia presentant només un fort senyal nuclear, estant inexistent el senyal citosòlic. Aquestes observacions conduïen a plantejar que el senyal encarregat de l'eixida del nucli es trobava en la regió de Cln2 compresa entre els aminoàcids 225 i 299, ja que en eliminar aquesta regió la ciclina es localitzava només en el nucli.

L'aproximació escollida per comprovar el paper de la regió entre els aminoàcids 225 i 299 de Cln2 en la seua localització consistia en fusionar la hipotètica senyal d'exportació a una proteïna nuclear composta de quatre còpies de GFP fusionades a la NLS de SV40 (NLS^{SV40}-GFP₄) i veure si llavors la nova quimera resultant es localitzava també al citosol, és a dir, si era exportada. Així es va obtenir la quimera NLS^{SV40}-Cln2²²⁵⁻²⁹⁹-GFP₄. Es va observar el senyal GFP i, mentre que es detectaven només nuclis intensos en el cas del control NLS^{SV40}-GFP₄, quan s'analitzava la localització de la quimera NLS^{SV40}-Cln2²²⁵⁻²⁹⁹-GFP₄ s'apreciava un increment del senyal citosòlic. En la Figura 3.20A es mostren imatges representatives corresponents a la fusió NLS^{SV40}-Cln2²²⁵⁻²⁹⁹-GFP₄ i al control. La quantificació del ratio N(nucli):C(citosol) del senyal mostrava com es produïa una disminució clara d'aquest ratio en introduir la regió de Cln2 en la quimera NLS^{SV40}-GFP₄, resultat consistent amb que dita regió provocava l'exportació de la fusió. Un fet destacable era que quan s'analitzava la localització de la mateixa construcció en un mutant *msn5* el senyal s'acumulava en el nucli i el ratio N:C tornava a incrementar-se en disminuir el senyal citosòlic (Figura 3.20B). Per tant es pot concloure que la regió entre els aminoàcids 225 i 299 de Cln2 funciona com a NES i ho fa de forma dependent de Msn5.

Una pregunta que sorgeix en caracteritzar un mecanisme de transport d'un regulador del cycle cel.lular és si dit mecanisme està regulat al llarg de les diferents fases del cycle. Per tractar de respondre a aquesta qüestió es va analitzar la localització de NLS^{SV40}-Cln2²²⁵⁻²⁹⁹-GFP₄ en cèl.lules procedents

de cultius parats en diferents fases del cicle cel.lular. Com s'observa en la Figura 3.20C, NLS^{SV40}-Cln2²²⁵⁻²⁹⁹-GFP₄ va mostrar una localització citosòlica en tots els casos, fet que demostra que l'exportació no es depenent de la fase del cicle. La mateixa conclusió es va extreure observant les imatges d'immunofluorescència de les versions truncades Cln2¹⁻³⁷⁰ i Cln2¹⁻²⁹⁹ en les que el senyal citosòlic està present en cèl.lules en totes les fases del cicle cel.lular (Figura 3.19).

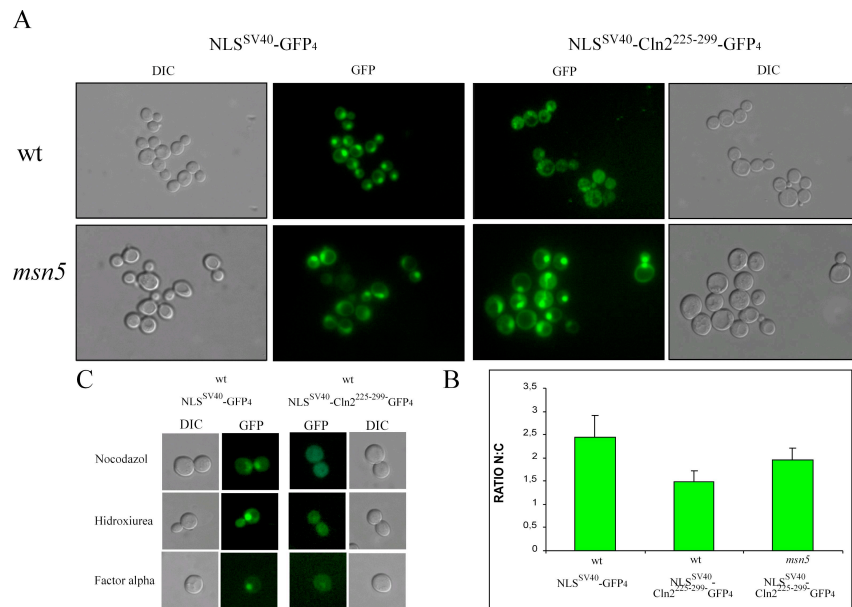


FIGURA 3.20. Paper de la regió dels aminoàcids 225-299 de *Cln2* en la seua exportació. **A.** Cèl.lules procedents de cultius en fase de creixement exponencial de les soques W303 i *msn5* (JCY1366) transformades amb el plasmidi que conté la fusió NLS^{SV40}-GFP₄ o NLS^{SV40}-Cln2²²⁵⁻²⁹⁹-GFP₄ foren observades al microscopi de fluorescència. Es mostren les imatges GFP i DIC. **B.** La distribució relativa de les proteïnes de fusió entre el nucli i el citoplasma (ratio N/C) es va determinar calculant la relació entre la intensitat fluorescent mitjana d'àrees nuclears i citosòliques de la cèl.lula (n>60 cèl.lules). **C.** Cèl.lules procedents dels mateixos cultius de la soca W303 transformada amb els plasmidis en fase exponencial van ser incubades amb Factor- α , HU o Nocodazol i foren observades al microscopi de fluorescència. Es mostren les imatges GFP i DIC.

Rastreig de la regió implicada en la importació de la ciclina Cln2

A continuació es va tractar d'identificar el NLS. La localització nuclear descrita per a la versió truncada Cln2¹⁻²²⁴ indicava que dita regió contenia la informació suficient per dirigir a Cln2 al nucli. Es van realitzar llavors noves delecions per tractar d'acotar la regió encarregada de la importació de Cln2. Es va construir la versió Cln2¹⁻¹³² i en analitzar la seua localització per immunofluorescència es va observar que el senyal nuclear es perdia totalment i només s'observava senyal citosòlic (Figura 3.19). Per tant la regió entre els aminoàcids 132 i 224 és necessària per a que Cln2 entre al nucli, ja que quan era eliminada aquesta regió la proteïna es localitzava només en el citosol.

A continuació es va truncar Cln2¹⁻²²⁴ per N-terminal per veure si la regió des de l'aminoàcid 132 fins al 224 era suficient per mitjançar el transport al nucli (Figura 3.19). Es va veure que quan s'analitzava per immunofluorescència la localització de la proteïna Cln2¹³²⁻²²⁴ presentava senyal nuclear, el que sugeria que en efecte aquest fragment conté informació suficient per dirigir la seua importació al nucli. Tanmateix, com es tractava d'un fragment de tamany xicotet podia estar produint-se difusió passiva entre el nucli i el citosol. Per descartar aquesta possibilitat es va construir la fusió GFP-Cln2¹³²⁻²²⁴ (en què es va afegir una GFP per tal d'augmentar el tamany de la proteïna i dificultar la difusió) i es va comprovar que mentre la proteïna control GFP (també etiquetada amb l'epítip HA) no mostra cap indicatiu de senyal nuclear, la proteïna GFP-Cln2¹³²⁻²²⁴ sí presenta localització nuclear (Figura 3.19). Cap de les noves construccions, no obstant, presenta una localització nuclear exclusiva com en el cas de la versió Cln2¹⁻²²⁴. D'aquests resultats podem concloure que la regió entre els aminoàcids 132 i 224 mitjança la localització nuclear de Cln2.

S'ha descrit prèviament que Cln2 és importada per Kap95. El següent pas era comprovar si el senyal acotat depenia de Kap95. No es podia treballar amb construccions sota el control del promotor *GALI* ja que la seua expressió és quasi inexistent en el mutant *kap95* (resultats no mostrats) així que s'havia de treballar en altres condicions. Donat que els resultats més clars d'acumulació nuclear eren els obtinguts en el cas de la versió truncada

Cln2¹⁻²²⁴ es va decidir testar aquest fragment. Així es va construir la fusió Cln2¹⁻²²⁴-GFP en un plasmidi sota el control del promotor *ADHI*. Quan s'analitza la localització d'aquesta fusió, es pot observar que mentre el control de GFP es distribueix per tota la cèl.lula, la proteïna Cln2¹⁻²²⁴-GFP presenta una clara acumulació nuclear (Figura 3.21A). Cal notar però que l'acumulació en el nucli no és tan dràstica com la que es podia observar en el cas de la versió truncada Cln2¹⁻²²⁴-HA. Es va aprofitar aquesta construcció per comprovar la dependència de la importació de Cln2 de la via clàssica en què participaven les carioferines Kap95, Kap60 /Srp1 i Cse1. Quan s'observava la localització de la fusió en la colecció de mutants per a aquesta via de què es disposava en cap cas es detectaven nuclis (Figura 3.21B), la qual cosa permet confirmar que les carioferines de la via clàssica d'importació participen en l'entrada al nucli de Cln2¹⁻²²⁴.

Els resultats anteriors han demostrat que la importació de Cln2¹⁻²²⁴ depèn de la via clàssica d'importació. Els senyals reconeguts per aquesta via estan molt ben caracteritzats. Açò resulta sorprenent si s'analitza detingudament la seqüència proteica que correspon a la regió entre els aminoàcids 1 i 224 de Cln2 ja que no existeix cap senyal clàssic d'importació en eixa seqüència. Si bé és cert que recentment s'han descrit senyals alternatives reconegudes per Kap95 sense necessitat de l'adaptador Kap60 (Fries *et al.*, 2007; Strahl *et al.*, 2005) no es coneix cap senyal diferent de les canòniques i conservades NLS monopartita o bipartita clàssiques per al reconeixement per part de Kap60. Aquest fet ens va conduir a preguntar-nos si existiria una proteïna adaptadora que mitjançara la interacció entre Kap60 i la ciclina Cln2. Un possible candidat era Far1, inhibidor de les ciclines, ja que s'havia descrit que la ciclina Clb5 necessita de Sic1, el seu inhibidor, per a ser importada (Rossi *et al.*, 2005). En la Figura 3.22 es mostra la localització de la versió truncada Cln2¹⁻²²⁴ en un fons silvestre i en un mutant *far1*. S'aprecia clarament que la localització nuclear no es veu alterada per l'absència de Far1, per tant l'inhibidor de la ciclina no pareix participar en la seua importació. No obstant no podem descartar l'opció de què algun altre adaptador mitjança la importació de la ciclina Cln2 al nucli.

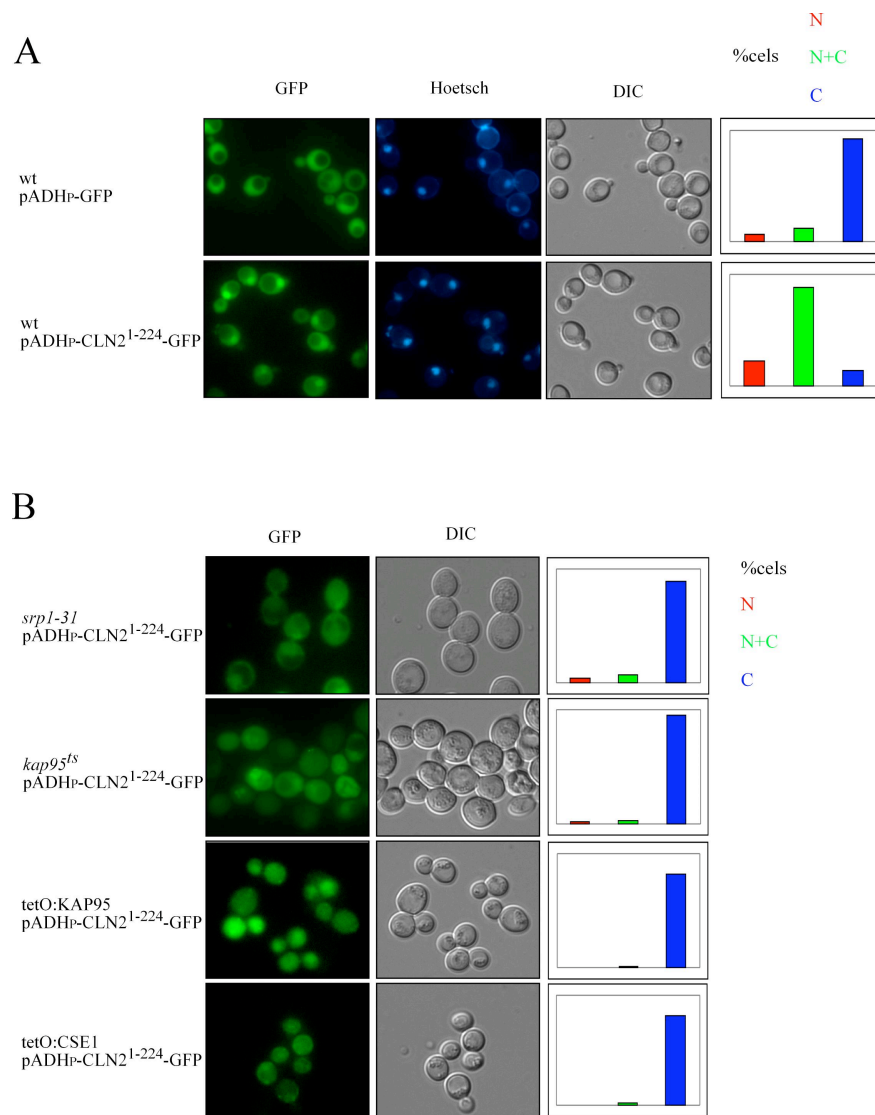


FIGURA 3.21. Localització de Cln2¹⁻²²⁴-GFP en mutants de la via clàssica d'importació. **A.** Cèl.lules procedents de cultius en fase exponencial de la soca W303 transformada amb els plasmidis *pADH_p-GFP* o *pADH_p-CLN2¹⁻²²⁴-GFP* foren observades al microscopi de fluorescència. Es mostren les imatges GFP, Hoetsch i DIC, així com la quantificació del percentatge de cèl.lules que presenten senyal nuclear (N), nuclear i citosòlic (N+C) o només citosòlic (C). **B.** Cèl.lules procedents

de cultius en fase exponencial de les soques *srp1-31* i *kap95^{ts}*, incubats 3h a 37°C, i les soques *tetO₇:KAP95* (JCY970) i *tetO₇:CSE1*(JCY972), incubats 8h amb Doxyciclina 0'5mg/mL, transformades amb el plasmidi *pADH_P-CLN2¹⁻²²⁴-GFP* foren observades al microscopi de fluorescència. Es mostren les imatges GFP i DIC, així com la quantificació del percentatge de cèl.lules que presenten senyal nuclear (N), nuclear i citosòlic (N+C) o només citosòlic (C).

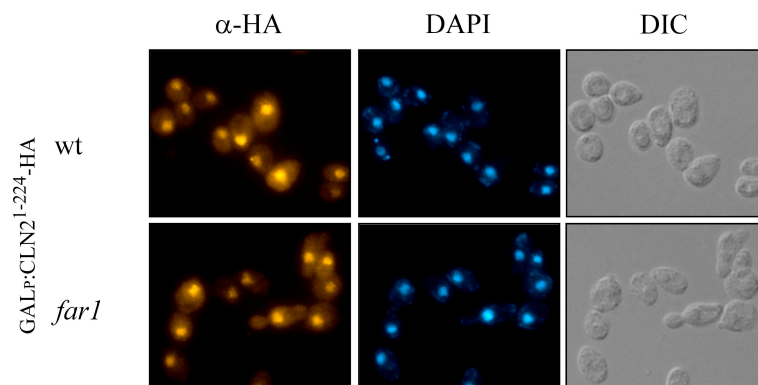


FIGURA 3.22. Localització de la versió truncada *Cln2¹⁻²²⁴-HA* en el mutant *far1*. Cèl.lules procedents de cultius en fase exponencial de les soques *GAL:CLN2¹⁻²²⁴-HA* (JCY1125) i *GAL:CLN2¹⁻²²⁴-HA far1* (JCY1400) es van fixar i analitzar per immunofluorescència indirecta. Es mostren imatges de DIC, tinció del DNA amb DAPI i senyal corresponent a *Cln2*-HA (anti-HA).

Regulació espacial de la ciclina *Cln1*

Una vegada caracteritzades les regions responsables de la localització de *Cln2* es va proposar delimitar les pròpies de *Cln1*. Les versions truncades construïdes per a la ciclina *Cln1*, seguint els mateixos criteris que per a la ciclina *Cln2* eren: *Cln1¹⁻²²⁶* i *Cln1¹⁻¹³⁰*. En el cas de la primera versió truncada, *Cln1¹⁻²²⁶* s'eliminen les dues seqüències PEST presents en la ciclina. L'anàlisi de la localització subcel.lular de *Cln1¹⁻²²⁶* revela un senyal semblant a l'observat per a *Cln1* amb altres construccions, senyal citosòlic i

clar puntejat nuclear (Figura 3.23). Cal destacar que aquesta localització és clarament distingible de la massiva acumulació nuclear observada en la versió corresponent de Cln2. Per tant, no pareix existir en tota la regió C-terminal de la ciclina Cln1 una regió que pugui mitjançar la seua eixida del nucli, ja que no es produeix una acumulació massiva del senyal nuclear en eliminar tota aquesta regió. Aquest fet ve reforçat perquè com concluïem en el primer apartat no pareix que Msn5 ni cap altra carioferina regule l'eixida del nucli de Cln1.

Per la seua part, l'anàlisi de la localització subcel·lular de Cln1¹⁻¹³⁰-HA mostra que el senyal nuclear desapareix donant lloc a un senyal exclusivament citosòlic, de forma idèntica al que s'observa en Cln2 (Figura 3.23). A la vista d'aquests resultats i recapitulant el que s'havia concluit en el primer apartat es pot proposar per a Cln1 l'existència d'una regió responsable de la seua importació al nucli, homòloga a la de Cln2, entre els aminoàcids 1 i 226, depenent de la via clàssica d'importació.

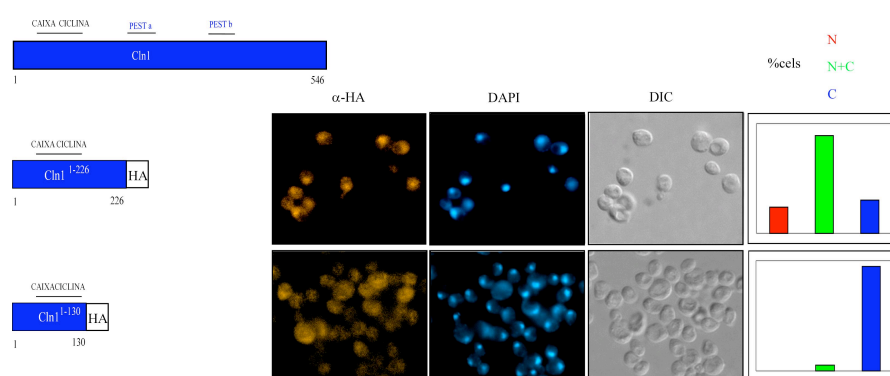


FIGURA 3.23. Localització de versions truncades per C-terminal de la ciclina Cln1. Cèl·lules procedents de cultius en fase exponencial de les soques *GAL:CLN1*¹⁻²²⁶-HA (JCY1517) i *GAL:CLN1*¹⁻¹³⁰-HA (JCY1518) es van fixar i analitzar per immunofluorescència indirecta. Es mostren imatges de DIC, tinció del DNA amb DAPI i senyal corresponent a Cln1-HA (anti-HA), així com la quantificació del percentatge de cèl·lules que presenten senyal nuclear (N), nuclear i citosòlic (N+C) o només citosòlic (C).

IMPLICACIÓ DE MECANISMES DE REGULACIÓ ESPACIAL EN L'ESPECIFICITAT FUNCIONAL DE Cln1 I Cln2.

S'han descrit amb detall diferències de localització entre Cln1 i Cln2. La pregunta que es va plantejar llavors era si eixes diferències de localització es traduïen en diferències funcionals entre les ciclins. Aquesta hipòtesi estava recolçada pel fet que la regió identificada com a NES de Cln2 i la regió responsable de la seua funcionalitat específica coincidien plenament. El primer punt va ser analitzar si aquesta regió era capaç d'alterar la regulació espacial de Cln1. Es va plantejar estudiar la localització de la Quimera 4 ja que si la regió entre els aminoàcids 225 i 299 de Cln2, introduïda en aquesta quimera, funcionava com a NES la localització de la quimera hauria de ser menys nuclear que la de la ciclina Cln1. Com ja s'ha comentat, degut a la dificultat d'observar per immunofluorescència les ciclins sota el control del seu promotor endògen, a causa de la seua peridiocitat i el seu baix nivell proteic, es va procedir a sincronitzar els cultius en G1 per després alliberar-los per agafar mostres en el punt de màxima expressió de les ciclins. D'aquesta manera es va comprovar que efectivament es podia detectar el senyal ja descrit per a la ciclina Cln1, és a dir, una localització citosòlica i nuclear amb certa acumulació del senyal en el nucli. Pel contrari no es va detectar cap senyal nuclear en el cas de la Quimera 4 (Figura 3.24). Açò recolçava l'idea de que en la Quimera 4 s'havia introduït un senyal d'exportació, que provocava que la localització de dita ciclina fóra majoritàriament citosòlica.

Seguint amb l'estudi de la localització de la Quimera 4 calia preguntar-se si en un mutant *msn5* s'acumulava en el nucli, ja que contenia la NES descrita per a Cln2 que depenia de la carioferina Msn5. En aquest cas es va comparar la localització de la Quimera 4, per immunofluorescència indirecta, en les soques *cdc53* i *cdc53msn5* per tal de facilitar la detecció de la ciclina. Com es pot observar en la Figura 3.25 el senyal nuclear corresponent a la Quimera 4 es va incrementar en la soca mutant *msn5*. Aquest resultat suggereix que Msn5 reconeix el senyal NES present en la

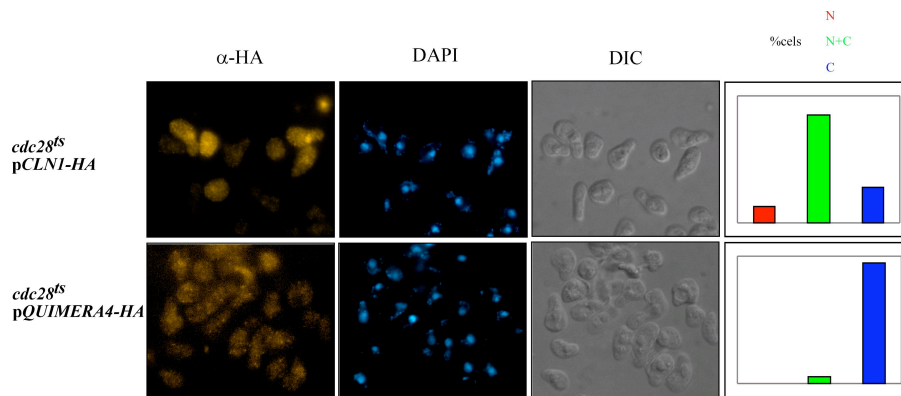


FIGURA 3.24. Estudi de la localització de Cln1 i Quimera 4. Cèl.lules en fase de creixement exponencial de la soca *cdc28^{fs}* transformada amb els plasmidis *pCLN1-HA* (pCM137) o *pQUIMERA 4-HA* es van incubar 3h a 37°C per tal de sincronitzar-los en G1. Després d'alliberar-les es van analitzar per immunofluorescència indirecta mostres recollides a diferents temps. En la figura es mostren els resultats de la mostra de t=30min. Es mostren imatges de DIC, tinció del DNA amb DAPI i senyal corresponent a Cln1-HA i Quimera 4-HA, així com la quantificació del percentatge de cèl.lules que presenten senyal nuclear (N), nuclear i citosòlic (N+C) o només citosòlic (C).

Quimera 4 participant en la seua exportació de la mateixa manera que ho fa amb la ciclina Cln2.

En el primer apartat d'aquest capítol s'ha estudiat la funcionalitat de la Quimera 4. S'ha vist que Quimera 4 era capaç de suprimir la letalitat del mutant *swi4swi6*, funció que s'ha associat a l'existència d'un mecanisme d'entrada i eixida del nucli de la ciclina Cln2 (Edgington i Futcher, 2001). Així mateix, s'ha mostrat que la introducció de Quimera 4 suprimia els defectes de creixement del mutant *cln2* en presència de Latrunculina B i el retràs en gemmació que experimenta aquest mutant. Ambdues són funcions que cal esperar que impliquen localització citosòlica per estar relacionades

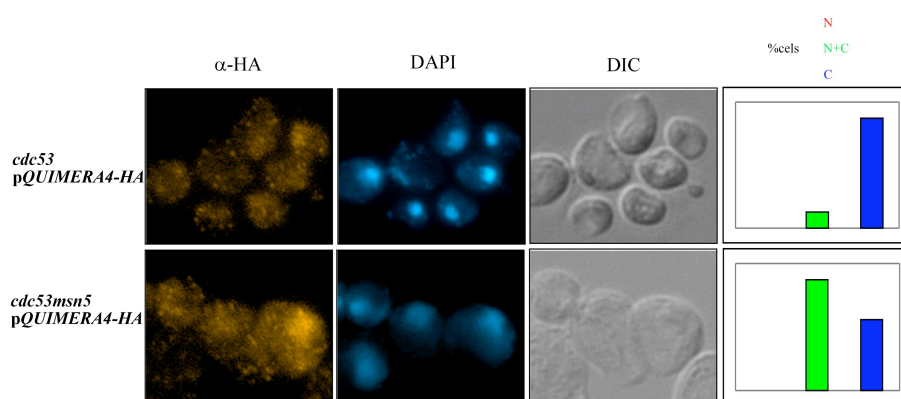


FIGURA 3.25. Estudi de la localització de la Quimera 4 en un mutant *msn5*. Cèl.lules en fase de creixement exponencial de les soques *cdc53-1* i *cdc53msn5* (JCY684) transformades amb el plasmidi pQUIMERA 4-HA es van incubar 3h a 37°C i es van analitzar per immunofluorescència indirecta. Es mostren imatges de DIC, tinció del DNA amb DAPI i senyal corresponent Quimera 4-HA, així com la quantificació del percentatge de cèl.lules que presenten senyal nuclear (N), nuclear i citosòlic (N+C) o només citosòlic (C).

amb el citoesquelet d'actina o la maquinària de polarització. Per últim, s'ha descrit que la introducció de Quimera 4 no és capaç de conferir al mutant *cln2* el tamany propi de la soca silvestre. Aquesta funció s'havia associat a una localització nuclear de *Cln2* (Miller i Cross, 2000). Aquests resultats suggereixen que amb la introducció de la NES de *Cln2* s'han conferit a *Cln1* les funcions específiques de *Cln2* que són citosòliques o impliquen eixida al citosol. Per aprofundir en aquest fet es va decidir analitzar una nova funció citosòlica i una nuclear. Estava descrita com a funció citosòlica la supressió de la letalitat del mutant *bud2* i com a funció nuclear la supressió de la letalitat de mutants en ciclins *Clb* (Miller i Cross, 2000; Edington i Fletcher, 2001). Per això es van construir les soques *tetO₇:BUD2 cln1cln2* i *tetO₇:CLB5 cln1cln2* i es transformaren amb plasmidis que contenen *CLN2*, *CLN1* o la *QUIMERA 4* per observar el seu creixement en presència de doxyciclina. En primer lloc cal ressaltar que *Cln2*, però no *Cln1*, és capaç de

suprimir els problemes de creixement del mutant *bud2* (Figura 3.26). Aquest resultat és consistent amb els de les proves de funcionalitat de resistència a Latrunculina B o de gemmació, que indicaven que Cln2 realitza alguna funció citosòlica que Cln1 no és capaç de realitzar amb la mateixa eficiència. Així mateix, la Quimera 4 era capaç de realitzar la funció citosòlica de supressió dels problemes de creixement del mutant *bud2*. Per tant, Cln1 era incapaç de realitzar la funció citosòlica relacionada amb Bud2 però la introducció de la regió entre els aminoàcids 225 i 299 de Cln2 li confereix la

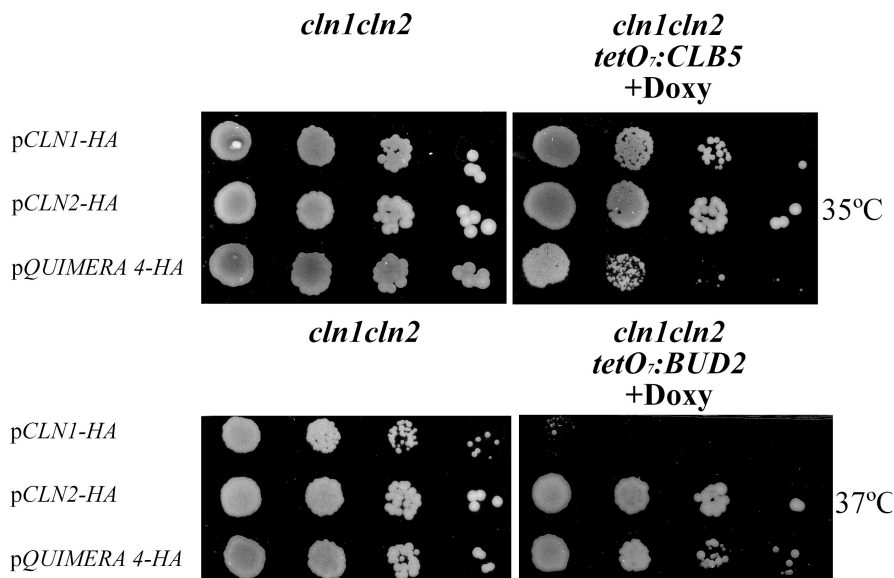


FIGURA 3.26. Supressió dels defectes de creixement dels mutants *tetO7:CLB5cln1cln2* i *tetO7:BUD2cln1cln2* per Cln1, Cln2 i la Quimera 4. Dilucions seriades de cultius exponencials de les soques mutants *tetO7:CLB5cln1cln2* (JCY1534) i *tetO7:BUD2cln1cln2* (JCY1538) transformades amb un plasmidi que conté *CLN1*, *CLN2* o la *QUIMERA 4* es van sembrar en YPD en presència de Doxyciclina 10µg/mL i es van incubar durant 2 dies a 35°C i 37°C respectivament. Com a control es mostra la soca mutant *cln1cln2* transformada amb els mateixos plasmidis i en les mateixes condicions de creixement.

capacitat de realitzar dita funció citosòlica pròpia de Cln2. D'altra banda Cln2 i Cln1 realitzen sense diferències significatives la funció nuclear relacionada amb Clb5. Curiosament, la introducció de Quimera 4 en el mutant *clb5* no permet un creixement equivalent a la introducció de Cln1. Podria ser que la Quimera 4 realitzara pitjor que Cln1 aquesta funció nuclear. Davant aquest resultat es plantejava la hipòtesi de que tal volta el fet de tindre una NES feia a la quimera permanèixer menys temps al nucli i això dificultava la realització d'algunes funcions nuclears.

En conclusió, tots aquests resultats reforcen la idea de que és la regulació espacial de les ciclines Cln1 i Cln2 la que determina la seua funcionalitat específica diferencial.

DISCUSSIÓ

En *Saccharomyces cerevisiae*, una única CDK, Cdc28, s'associa amb nou ciclines diferents per a regular la progressió al llarg del cycle cel.lular. El mecanisme pel qual la ciclina confereix a l'activitat quinasa ciclina-Cdc28 una funcionalitat específica ha estat motiu de controvèrsia històrica (revisat en Roberts, 1999; Miller i Cross, 2001). Algunes dades experimentals contradiuen una especialització intrínseca de les ciclines i proposen que és només el moment del cycle en què s'expressen el que els confereix l'aparent funcionalitat específica. Tanmateix, altres dades experimentals recolcen la idea de que la identitat de la ciclina deu ser essencial per a l'especialització dels diferents complexs CDK-ciclina perquè mediarà interaccions amb substrats específics o localitzaria les quinases en compartiments subcel.lulars diferents. En molts casos s'han conciliat ambdues visions ja que seria una combinació d'aquests mecanismes, i/o factors encara no caracteritzats el que explicaria l'especificitat tan acurada dels complexs CDK-ciclina.

Quin és el mecanisme que explica la distinció funcional existent entre els complexs Cln1-Cdc28 i Cln2-Cdc28? Les ciclines Cln1 i Cln2 s'expressen en el mateix moment del cycle, fet que fa descartar una distinció

funcional dependent del punt d'expressió. Una altra explicació podria ser la diferència de nivell proteic existent entre les dues ciclins, però aquesta hipòtesi també és descartable en aquest cas ja que la Quimera 1 i la Quimera 4, el nivell de les quals és inferior al de Cln2, presenten la funcionalitat específica de Cln2 mentre que la Quimera 3, que presenta el nivell propi de Cln2, no presenta la funcionalitat específica d'aquesta ciclina. Per tant la funcionalitat específica de Cln2 no pareix lligada a un nivell major de ciclina.

Descartades aquestes hipòtesis, cabia esperar que existira alguna regió proteica en Cln2 responsable de la seua funcionalitat específica front a Cln1. Degut a l'elevada homologia entre les dues ciclins, una estratègia útil va ser la construcció de ciclins quimera intercanviant dominis entre elles. Així es va caracteritzar la regió entre els aminoàcids 225 i 299 de Cln2 que és necessària i suficient per conferir-li la seua funcionalitat específica. Paral·lelament es va identificar aquesta regió com un senyal d'exportació (NES) dependent de l'exportina Msn5. Aquesta correlació suggereix que és l'existència d'un mecanisme d'exportació el que confereix a Cln2 la seua funcionalitat específica. Aquesta conclusió està recolçada per dos fets fonamentals: el primer és que la Quimera 4 presenta una localització més citosòlica que Cln1 de manera dependent de Msn5 i el segon és que les funcions que Cln1 és capaç de realitzar en introduir-li la regió entre els aminoàcids 225 i 299 de Cln2 són justament les funcions citosòliques de Cln2. El model proposat concorda amb les diferències de localització observades entre Cln1 i Cln2: Cln1 presenta major acumulació nuclear que Cln2, és a dir, la ciclina Cln1 present en el citosol és menor, per tant la introducció d'una NES en Cln1 podria desequilibrar aquest balanç cap a un augment de Cln1 citosòlica permetent a la ciclina realitzar funcions que normalment és incapaç de realitzar. Per tant, la resposta a la pregunta que es plantejava és que és un mecanisme de regulació espacial el que garanteix l'especificitat de funció dels complexos Cdc28-Cln1 i Cdc28-Cln2. Açò suma aquest exemple a altres que han il·lustrat en els darrers anys la importància de la regulació espacial en el control del cicle cel·lular.

Tanmateix no es podia descartar que a més d'actuar com a NES la regió de Cln2 entre els aminoàcids 225 i 299 interaccionara específicament amb alguna diana del complex Cdc28-Cln2. Es va tractar d'introduir una NES diferent de la pròpia de Cln2 per veure l'efecte en la funcionalitat de Cln1. Es va triar la NES de PKI, per ser una NES molt ben caracteritzada, forta i depenent de Xpo1. La presència d'aquesta NES no va ser suficient per conferir a Cln1 la funcionalitat específica de Cln2 (resultats no mostrats). Aquest fet pot tindre diverses interpretacions. Una primera hipòtesi és que efectivament la regió entre els aminoàcids 225 i 299 de Cln2 interaccione específicament amb alguna diana del complex Cdc28-Cln2. Una segona hipòtesi és que l'equilibri entre el temps de residència en nucli i citosol s'haja de mantindre i si aquest equilibri es desplaça massa en un sentit la ciclina no siga plenament funcional, de fet estudis anteriors han destacat la importància d'un temps mínim de residència de Cln2 al nucli en els primers compassos del cicle cel.lular (Miller i Cross, 2001). I per últim, una tercera hipòtesi és que la carioferina encarregada de transportar a la ciclina siga rellevant, de tal forma que si Xpo1 substitueix a Msn5, la ciclina perd d'alguna forma la seua eficiència en la funció que ha de realitzar en el citosol. En aquest sentit Msn5 no es limita a acompanyar sinó també s'ha proposat que posiciona en els llocs de polarització altres de les proteïnes que transporta com Far1 o Ste5 durant processos com la resposta a feromones (Blondel *et al.*, 1999 ;Mahanty *et al.*, 1999).

Pel que respecta a la regulació espacial de les ciclines Cln1 i Cln2, s'havia descrit que es localitzaven en el nucli i el citosol però no s'havia aprofundit abans del present estudi en la descripció detallada de les carioferines i els senyals implicats en el seu transport. Els resultats presentats han permés descriure a Msn5 com exportina de Cln2 però no de Cln1. Així mateix s'ha identificat la via clàssica d'importació com el sistema implicat en la importació de les dues ciclines. L'altra ciclina de G1, Cln3, presenta una NLS bipartita clàssica en els últims 22 aminoàcids (Miller i Cross, 2001), la qual cosa apunta a la participació de la via clàssica d'importació en la seua entrada al nucli. Per tant, la via clàssica d'importació seria l'encarregada de l'entrada al nucli de les tres ciclines de G1.

Al no identificar cap NLS clàssic en Cln1 i Cln2 cal plantejar-se algunes alternatives. Repasant el que s'ha descrit per a ciclins de vertebrats (Yang i Kornbluth, 1999) tampoc es detecta cap NLS clàssic en rastrejar la seqüència primària de les diferents ciclins o CDKs així que s'han formulat diferents hipòtesis. Per a Ciclina E, homòloga funcional de Cln1 i Cln2, s'ha demostrat que la informació per a la importació resideix íntegrament en la ciclina. Deu tractar-se d'un senyal "clàssic" encara no descrit però reconegut per l'heterodímer importina α - β . En aquest treball s'ha demostrat la participació de la via clàssica d'importació (Kap95 i Kap60) en l'entrada al nucli de Cln2 i s'ha comprovat que Cln2 i Kap95 interaccionen físicament in vivo. Així doncs, es podria tractar d'un cas semblant al de ciclina E, és a dir, existeix en les ciclins Cln1 i Cln2 un senyal no descrit reconegut per la via clàssica d'importació. Altres ciclins necessiten interaccionar amb el seu inhibidor per a ser importades, és el cas de Clb5 i l'inhibidor Sic1 en *S.cerevisiae* o del complex Cdk4-ciclina D1 i l'inhibidor p21 en vertebrats. En aquest treball s'ha descartat la participació de l'inhibidor Far1 en la importació de Cln2. Altres ciclins (com Ciclina A de vertebrats) requereixen l'associació a la CDK per a ser importades. La influència en la localització de la ciclina Cln2 de la unió i fosforilació per part de Cdc28 s'ha estudiat ampliament (Miller i Cross, 2001).Els autors afirmen que Cln2 lliure es distribueix per tota la cèl.lula i només la localització del complex Cln2-Cdc28 està regulada. D'una banda, la unió a Cdc28 no és essencial per a l'entrada ni per a l'eixida del nucli però pareix afavorir l'acumulació nuclear. D'altra banda la fosforilació en C-terminal de Cln2 en el complex Cdc28-Cln2 es requereix per a una eficient exclusió nuclear. A més analitzen el possible paper com a NLS o NES de la regió entre els aminoàcids 291 i 545 de Cln2 (regió que conté els 7 llocs de fosforilació per part de Cdc28) i descarten que tinga cap capacitat d'actuació com a senyal de transport. Es pot concloure llavors que la unió i fosforilació de Cln2 per part de Cdc28 pot modular la seua localització però no és essencial en cap cas. La unió de Cln2 a la CDK podria afavorir el seu reconeixement per la via clàssica d'importació i augmentar l'entrada al nucli de la ciclina formant part del complex Cdc28-Cln2, encara que entrara també de forma lliure amb un altra

eficiència. La fosforilació de la ciclina Cln2 per part de Cdc28 podria regular la seua exportació, afavorint l'eixida del nucli de la ciclina o el complex en el moment adequat en què siga requerit en el citosol.

El fet d'haver aïllat en les ciclines Cln1 i Cln2 una regió encarregada de mediar la importació que no es correspon amb cap NLS clàssic i que no pot ser fàcilment modificada dificulta avançar en l'estudi i la comparació de la importació d'ambdues ciclines. Només es pot especular basant-se en la localització de versions truncades de les ciclines que la importació al nucli de Cln2 podria ser més eficient que la de Cln1, ja que quan s'elimina l'exportació de Cln2 la versió truncada de la ciclina és molt més nuclear que la versió truncada equivalent de Cln1. Caldria aprofundir amb noves aproximacions experimentals per saber si a més de l'exportació, la importació podria jugar un paper en l'especialització funcional de les ciclines.

Un altra pregunta important a respondre és: quina és la funció principal de Cln2 que és incapaç de realitzar Cln1? La participació de Cln2 en el procés d'activació de Cdc42 durant la gemmació (Gulli *et al.*, 2000) s'ha considerat extensible a Cln1, però s'ha vist que en un mutant *cln2* es veu retardat el procés de gemmació (i no els altres processos post-Start), mentre que un mutant *cln1* té el mateix comportament que la soca silvestre (Queralt i Igual, 2004). L'activació dels complexos Cdc28-Cln1/2 condueix a la degradació de Far1, segrestador de Cdc24 en el nucli. Cdc24 pot llavors eixir al citoplasma i activar a Cdc42. Podria ser Cln2, i no així Cln1, la ciclina encarregada de regular la fosforilació de Far1 en el nucli, o fer-ho de forma més eficient. No obstant, s'ha vist que després de l'alliberament, continua estant necessària l'activitat Cdc28-Cln1/2 per a l'activació de Cdc42 per part de Cdc24 (Gulli i Peter, 2001). La caracterització dels mecanismes de transport de Cdc24 entre el nucli i el citoplasma podria aclarir el possible paper de Cln2 i/o Cln1 després de l'alliberament de Cdc24 per part del seu segrestador Far1. Aquests interrogants són els que van dur a plantejar els experiments desenvolupats en el capítol 5. Però altres grups van avançar en la descripció del paper que Cln2 jugava en el procés de gemmació. En primer lloc podem destacar un estudi proteòmic que va

identificar nombroses interaccions entre distintes proteïnes i complexs CDK-ciclina (Archambault et al, 2004). Per al cas de Cdc28-Cln2 es va descriure la interacció amb algunes proteïnes implicades en processos de morfogènesi com Ste20, Rga1 o Bem3. Posteriorment es van determinar proteïnes implicades en el procés de gemmació que eren específicament fosforilades pel complex Cdc28-Cln2 (McCusker *et al.*, 2007). Aquestes proteïnes eren Cdc24, Rga2 i Boi1 que són GEF, GAP i andamiatge de Cdc42 i juguen un paper fonamental en l'anomenat polarisoma. La fosforilació d'aquestes proteïnes pot justificar la necessitat del complex Cdc28-Cln2 en el citosol durant la gemmació. Com s'havia fet tradicionalment, aquesta funció testada només per a Cln2 s'ha fet extensiva a Cln1 però vistes les dades presentades es pot proposar que el complex Cdc28-Cln1 al no ser exportat al citosol siga menys eficient per dur a terme aquestes fosforilacions i per tant, siga possiblement aquest conjunt de fosforilacions sobre la maquinària de polarització el que represente la funció de Cln2 que li otorga un paper principal durant els processos de morfogènesi.

Com a resum es proposa el següent model de funcionament dels complexs Cdc28-Cln1 i Cdc28-Cln2: Cln1 i Cln2 una vegada sintetitzades en el citosol són importades al nucli per la via clàssica d'importació en la qual participen Kap95 i Kap60. La regió proteïca implicada en aquest transport es troba entre els aminoàcids 130 i 226 de les ciclins i presenta un alt grau de plegament en α -hèlix. No podem saber si aquesta regió està implicada en la interacció amb Kap60 o si existeix una proteïna intermediària que acobla les ciclins i el complex de transport. Alguns indicis pareixen apuntar que Cln2 entraria de forma més eficient al nucli i podria ser el principal efector d'algunes funcions descrites com nuclears. Una de les funcions a realitzar per part dels complexs Cdc28-Cln1 i Cdc28-Cln2 en el nucli és la fosforilació de l'inhibidor Far1 que actua segregant a Cdc24. Una vegada fosforilat Far1, Cdc24 eix al citosol i es dirigeix al lloc de polarització de la gemma. Simultàniament Cln2, però no Cln1, o el complex Cdc28-Cln2 però no el complex Cdc28-Cln1, és exportat per la carioferina Msn5 per reconeixement de la regió de Cln2 compresa entre els aminoàcids 225 i 299. Aquesta exportació podria estar regulada per

fosforilació per part de Cdc28. Una vegada en el citosol el complex Cdc28-Cln2 actuaria fosforilant diferents proteïnes que formen part del polarisoma com la pròpia Cdc24, Rga2, Boi1 o inclús altres amb les quals s'ha descrit una interacció física però no una fosforilació directa com Rga1 o Bem3. Açò explicaria el paper en gemmació que converteix a la ciclina Cln2 en l'efector principal durant aquest procés. El fet que la gemmació es duga a terme en absència de Cln2 encara que amb retràs pot deure's a que Cln1 fosforile les proteïnes del polarisoma encara que de forma menys eficient o a la capacitat de les ciclins de fase S de fosforilar aquestes proteïnes. De fet està descrit que la fosforilació de les proteïnes associades a Cdc24 continua després de la degradació de Cln2 (McCusker et al, 2007). Cal resaltar que l'acurada especialització dels complexs Cdc28-ciclina, aconseguida per una combinació de mecanismes entre els que hem destacat la regulació espacial, no es contradia amb la redundància funcional característica dels reguladors del cycle cel.lular encarregada de preservar la correcta progressió al llarg del procés malgrat els defectes que es puguen produir.

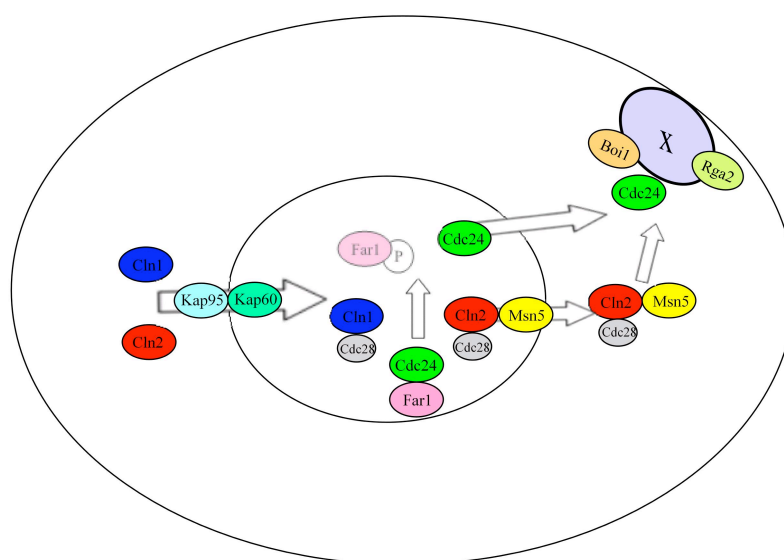


FIGURA 3.26 Model de regulació espacial de les ciclins Cln1 i Cln2.

Base molecular de l'especificitat funcional de Cln2 respecte a Cln1

4. Degradació de les ciclins Cln1 i Cln2

ANÀLISI DE LA DEGRADACIÓ DE LES CICLINES Cln1 I Cln2

Un mecanisme implicat en el control dels nivells cel.lulars de reguladors del cicle cel.lular és la proteòlisi per ubiquïtilliació de proteïnes i degradació en el proteosoma. S'havia descrit que tant Cln1 com Cln2 eren degradades per la ruta de la ubiquïtina ligasa SCF^{Grr1} (Barral *et al.*,1995 ; Skowyra *et al.*,1997). En aquests estudis només s'havien realitzat anàlisis per *western blot* emprant anticossos que reconeixien Cln2 o anticossos que reconeixien ambdues ciclins. No s'havia analitzat individualment la degradació de Cln1 ni s'havia comparat amb la de Cln2. Dins de l'estudi de la regulació de les ciclins Cln1 i Cln2 es va decidir analitzar també la seua degradació. Al llarg dels experiments descrits en el Capítol 3 es va comprovar en repetides ocasions que es detectava una diferència de nivell proteic entre Cln1 i Cln2 la causa de la qual podia ser una diferència en la degradació de les dues ciclins.

Vies de degradació de les ciclins Cln1 i Cln2

El primer objectiu va ser comparar l'estabilitat de les dues ciclins. Es van realitzar experiments d'apagat traduccional amb cicloheximida en cultius exponencials d'una soca silvestre transformada amb plasmidis que contenien Cln1 o Cln2 etiquetades amb HA i expressades sota el control del seu promotor propi o del promotor constitutiu *ADHI*. Es van recollir mostres a diferents temps durant una hora i es va analitzar el nivell de proteïna per *western blot*. En la Figura 4.1 es poden veure imatges representatives de la caiguda de nivell proteic de cada ciclina i les quantificacions corresponents a diferents repeticions. Es pot concloure que l'estabilitat de les ciclins Cln1 i Cln2 es molt similar.

El segon objectiu era tractar de determinar la proteïna F-box encarregada de reconèixer a la ciclina. En el cas de SCF les proteïnes F-box encarregades d'unir reguladors del cicle són Cdc4 i Grr1. Es van transformar amb els plasmidis que expressen Cln1 i Cln2 etiquetades amb HA sota el control del seu promotor propi soques mutants en diferents subunitats del complex SCF: *cdc53^{ts}* (Cdc53 és la subunitat d'andamiatge del complex SCF), *cdc4^{ts}* i *grr1* i es van comparar els nivells de ciclina en tots els casos respecte de la soca silvestre. Els resultats es mostren en la Figura 4.2. En primer lloc, es pot observar que els nivells de Cln2 es veuen augmentats en tots els mutants, tant en el mutant *cdc53^{ts}* com en el mutant *cdc4^{ts}* (en el qual l'increment és detectable a 37°C) com en absència de Grr1. Es va comparar també l'estabilitat de les ciclins en la soca silvestre i en els diferents mutants en subunitats d'SCF amb experiments d'apagat traduccional amb cicloheximida. Es pot comprovar com efectivament l'estabilitat de Cln2 augmenta notablement en tots els mutants (Figura 4.3). Aquests resultats pareixen indicar que Cln2 podria ser degradada tant per SCF^{Grr1} com per SCF^{Cdc4}.

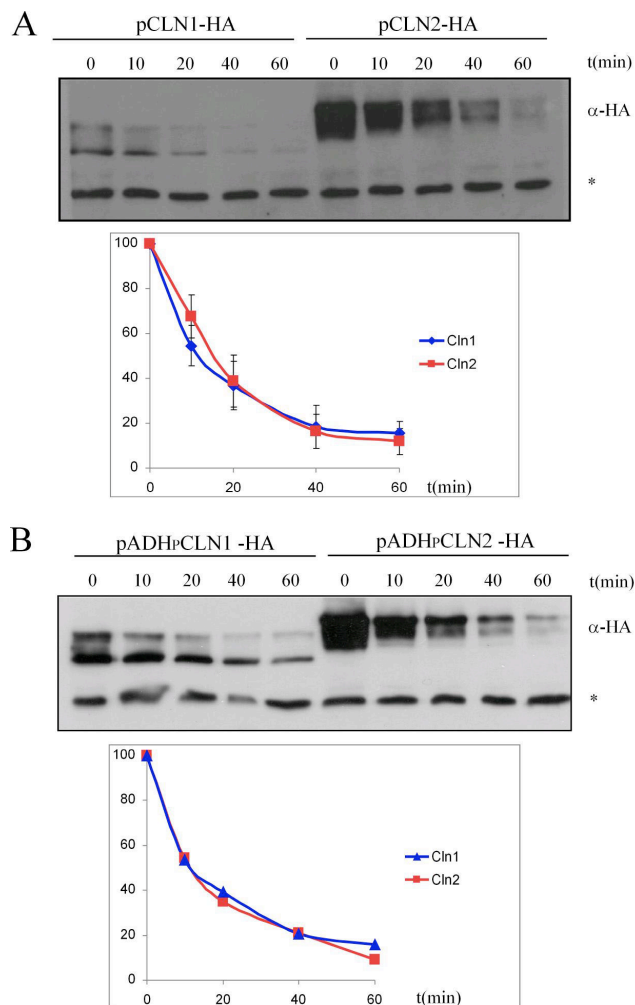


FIGURA 4.1. Anàlisi de l'estabilitat de les ciclines Cln1 i Cln2. **A.** Cultius de la soca silvestre W303 transformada amb un plasmidi que expressa Cln1 o Cln2 etiquetades amb HA sota el control del seu promotor propi (**A**) o del promotor *ADHI* (**B**) van ser incubats amb cicloheximida a una concentració final de 50µg/mL. El nivell proteic de Cln1 i Cln2 en extractes crus es va determinar als temps indicats per *western blot* amb l'anticòs anti-HA 12C5A. Com a control de càrrega (*) es presenta una banda inespecífica reconeguda per l'anticòs en les mateixes membranes. Els gràfics mostren la quantitat relativa de proteïna a cada temps respecte de la proteïna inicial a t=0.

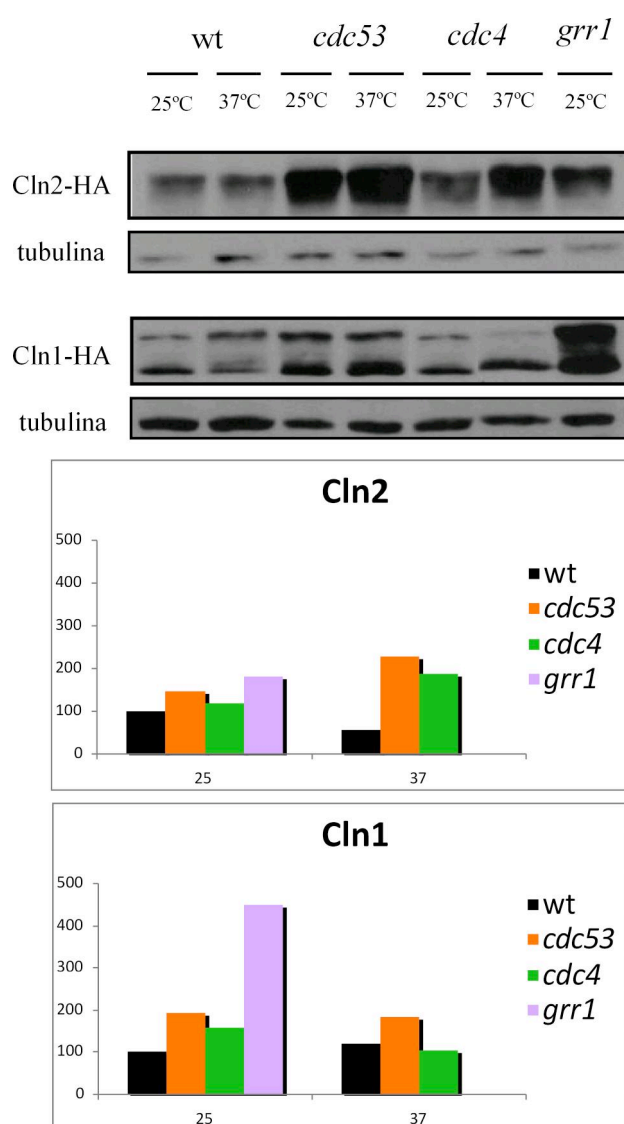


FIGURA 4.2. Anàlisi dels nivells de ciclines Cln1 i Cln2 en els mutants *cdc53^{ts}*, *cdc4^{ts}* i *grr1*. Cultius en fase exponencial de la soca silvestre W303 i les soques *cdc53-1*, *cdc4-1* i *grr1* (JCY1539) transformades amb plasmidis que expressen Cln1 o Cln2 etiquetades amb HA van ser incubats a 25°C i a 37°C durant 3h en el cas dels mutants termosensibles. El nivell proteic de Cln1 i Cln2 en extractes crus es va determinar per *western blot* amb l'anticòs anti-HA 12C5A. Com control de càrrega es presenten els nivells de tubulina. Els gràfics mostren la quantitat relativa de proteïna en els diferents mutants respecte a la soca silvestre.

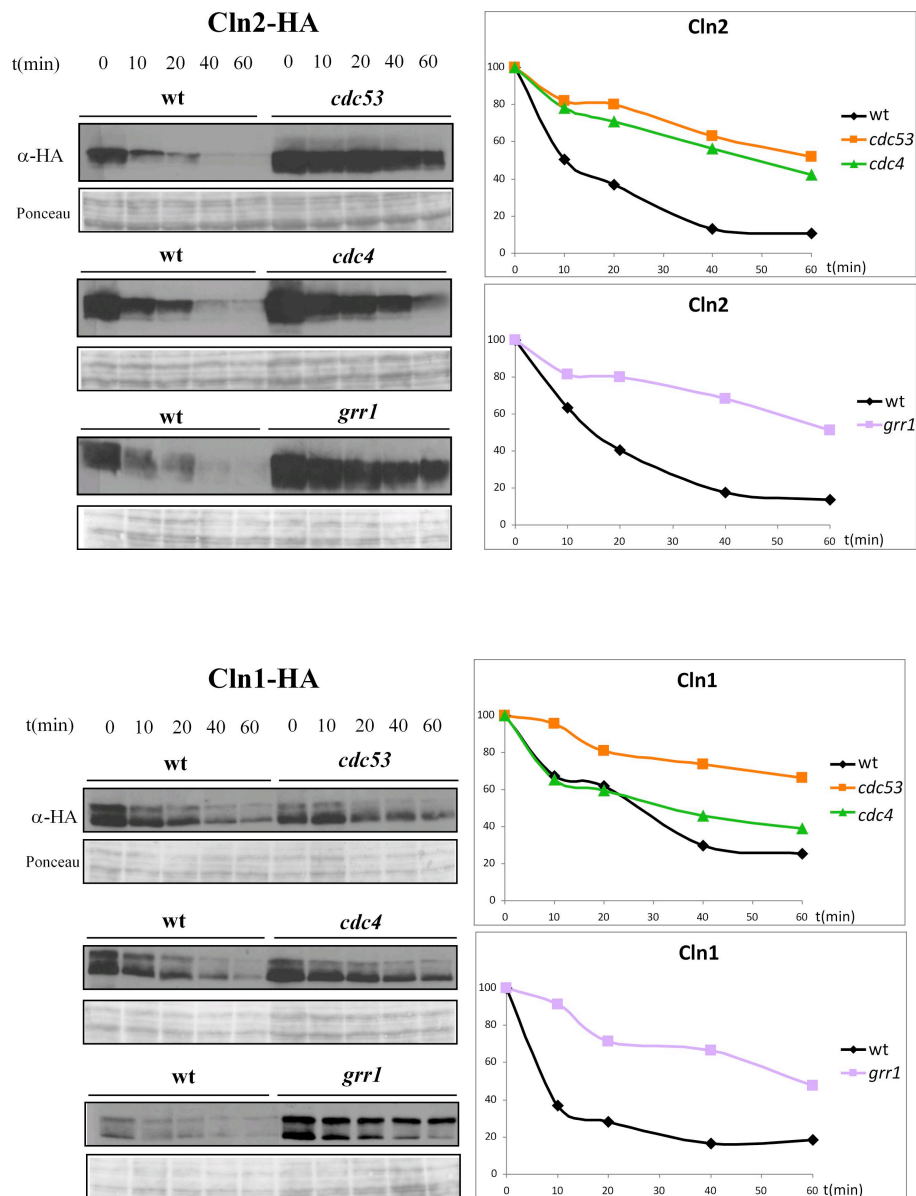
En segon lloc s'analitzaren els nivells de Cln1 en els diferents mutants. Es pot observar una diferència molt més destacada de nivell en el cas del mutant *grr1* en comparació a la soca silvestre. Per a la resta de mutants s'observen diferències més suaus en el cas de *cdc53^{ts}* i no s'observen diferències ni a 25°C ni a 37°C en el cas de *cdc4^{ts}*.

En els experiments d'apagat traduccional amb cicloheximida l'estabilitat de Cln1 augmenta especialment en el cas del mutant *grr1* (Figura 4.3). Es pot proposar que Cln1 es degradada principalment per SCF^{Grr1}. Sorprenentment no s'observa un canvi per als nivells de Cln1 equivalent a l'observat en el mutant *grr1* en el mutant *cdc53^{ts}*. Açò podria deure's a que aquest al·lel mutant presentara més afectada la ruta SCF^{Cdc4} que la ruta SCF^{Grr1}.

Dels resultats descrits podem concloure que existeix una diferència en les rutes implicades en la degradació de les dues ciclines: mentre que Cln2 seria degradada per SCF^{Cdc4} i per SCF^{Grr1}, Cln1 ho seria bàsicament per SCF^{Grr1}.

FIGURA 4.3. Anàlisi de l'estabilitat de ciclines Cln1 i Cln2 en els mutants de *cdc53^{ts}*, *cdc4^{ts}* i *grr1*. Cultius en fase exponencial de la soca silvestre W303 i les soques *cdc53-1*, *cdc4-1*, i *grr1* (JCY1539) transformades amb plasmidis que expressen Cln1 o Cln2 etiquetades amb HA van ser incubats a 25°C i a 37°C durant 3h en el cas dels mutants termosensibles. Es va afegir cicloheximida a una concentració final de 50µg/mL i es va determinar el nivell proteic de Cln1 i Cln2 en extractes crus per *western blot* als temps indicats amb l'anticòs anti-HA 12C5A. Com control de càrrega es presenta la tinció amb ponceau de les mateixes membranes. Els gràfics mostren la quantitat relativa de proteïna a cada temps respecte de la proteïna inicial a t=0.

Degradació de les ciclines Cln1 i Cln2



Anàlisi funcional de les PEST

Una diferència d'especialització de proteïnes adaptadores en la ruta de degradació pot obeir a diferents causes. Una d'aquestes causes podria ser una diferència en la funció de les seqüències reconegudes per dites proteïnes, les anomenades seqüències PEST (la seqüència PEST és una regió de les proteïnes substrat de degradació rica en prolina, serina i treonina responsable de la seua inestabilitat).

En Cln1 i Cln2 s'havien identificat tres seqüències PEST (Hadwiger et al. 1989). Es va comprovar la predicció d'aquestes seqüències i el valor amb què eren predites amb el programa PESTfind (www.at.embnnet.org/embnnet/tools/bio/PESTfind). En Cln2 existeix una PEST entre els aminoàcids 371 i 403 predita amb un valor de 6.99. En Cln1 podria existir una PEST en una regió similar, entre els aminoàcids 398 i 424 (PESTb), encara que es prediu en un valor molt baix (0.85) i una altra seqüència PEST entre els aminoàcids 234 i 275 (PESTa) exclussiva de Cln1 predita amb un valor de 14.12 (Taula 4.1).

Taula 4.1. SEQÜÈNCIES PEST PRESENTS EN LES CICLINES

PEST	Ciclina que la conté	Seqüència d'aminoàcids	Valor predit*
PESTa	Cln1	234-275	+14.12
PESTb	Cln1	398-424	+0.85
PEST	Cln2	371-403	+6.99

* Valor predit en el programa d'identificació de seqüències PEST **PESTfind**.

L'aproximació que es va plantejar va ser analitzar la degradació de les ciclines quimèriques descrites en el capítol anterior per tal de determinar la importància de les seqüències PEST així com d'altres regions presents en la ciclina en la seua degradació. En tots els casos es van analitzar en primer lloc els nivells proteics en els diferents mutants en subunitats de SCF i en

segon lloc es van realitzar experiments d'apagat traduccional amb cicloheximida per veure l'estabilitat de la ciclina en els diferents mutants.

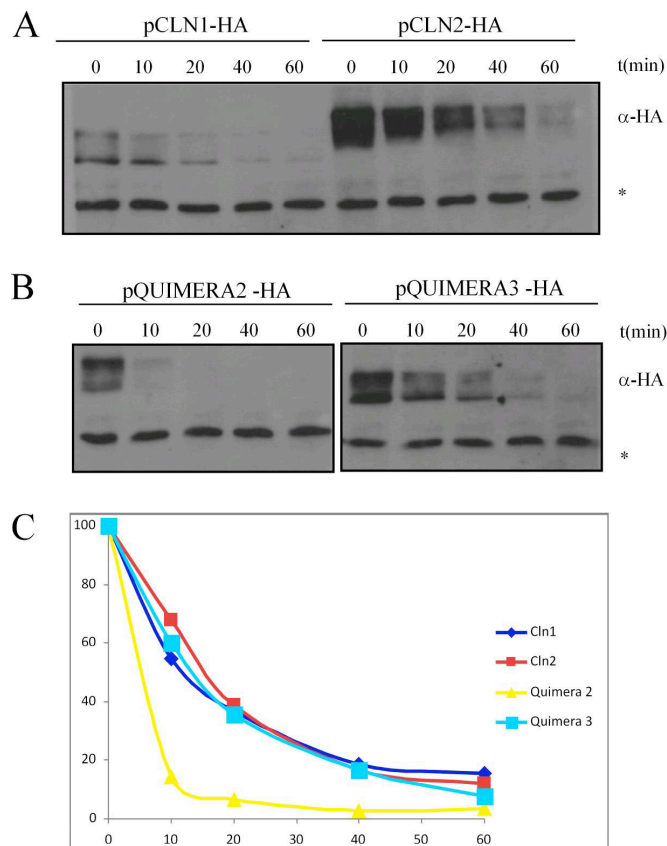


FIGURA 4.4. Anàlisi de l'estabilitat de Quimera 2 i Quimera 3. Cultius de la soca silvestre W303 transformada amb un plasmidi que expressa Cln1, Cln2 (A), Quimera 2 o Quimera 3 (B) etiquetades amb HA van ser incubats amb cicloheximida a una concentració final de 50µg/mL. El nivell proteic de les ciclines en extractes crus es va determinar als temps indicats per *western blot* amb l'anticòs anti-HA 12C5A. Com control de càrrega (*) es presenta una banda inespecífica reconeguda per l'anticòs en les mateixes membranes. C. Els gràfics presenten la quantificació del nivell proteic a cada temps.

Una primera pregunta a respondre era si la PESTb de Cln1 era funcional, ja que el seu valor de predicció era molt baix. Per tractar de respondre a aquesta qüestió es va analitzar la degradació de la Quimera 2 que estava formada per la regió dels aminoàcids de l'1 al 299 de Cln2 junt als aminoàcids del 313 al 546 de Cln1. Per tant: presentava la regió N-terminal de Cln2 així com el senyal d'exportació i havia intercanviat la PEST de Cln2 per la PESTb de Cln1. Quan s'analitza l'estabilitat de la Quimera 2 es pot veure en primer lloc que és més inestable que Cln1 i Cln2 (Figura 4.4). D'aquest fet es pot interpretar que la PESTb de Cln1 és funcional, malgrat el seu valor baix de predicció com a PEST i que podria tractar-se d'una PEST encara més eficient que la PEST de Cln2.

Quan es van analitzar els nivells de la Quimera 2 en els diferents mutants en subunitats de SCF es va observar que en el cas dels mutants *cdc53^{ts}* i *cdc4^{ts}* s'aprecia un increment de nivell proteic de Quimera 2 tant a 25°C com a 37°C i es detecta també un augment de nivell proteic de Quimera 2 en absència de Grr1 (Figura 4.5). Aquests resultats són consistents amb els resultats obtinguts en els experiments d'apagat traduccional en què s'observa una estabilització de la Quimera 2 en tots els mutants (Figura 4.6). Açò indica que Quimera 2 podria ser degradada, de la mateixa forma que Cln2, tant per SCF^{Grr1} com per SCF^{Cdc4}. El patró de degradació de la Quimera 2 es correspon amb el de Cln2 encara que ha intercanviat la PEST de Cln2 per la PESTb de Cln1. Per tant, aquestes dues PEST deuen funcionar de forma equivalent i seran altres factors els que determinen el patró de degradació de la ciclina.

A continuació es va analitzar la degradació de la Quimera 3. La Quimera 3 estava formada per la regió dels aminoàcids de l'1 al 224 de Cln2 junt als aminoàcids del 227 al 546 de Cln1. Per tant: presentava la regió N-terminal de Cln2 però no el senyal d'exportació i havia intercanviat la PEST de Cln2 per les PESTa i PESTb de Cln1. En primer lloc es va observar que l'estabilitat de la Quimera 3 era la mateixa que la de Cln1 i Cln2 (Figura 4.4). Els nivells de la Quimera 3 s'estabilitzen en tots els mutants estudiats: en el cas dels mutants *cdc53^{ts}* i *cdc4^{ts}* s'aprecia un increment de nivell proteic de Quimera 3 a 37°C, i es detecta també un augment de nivell proteic

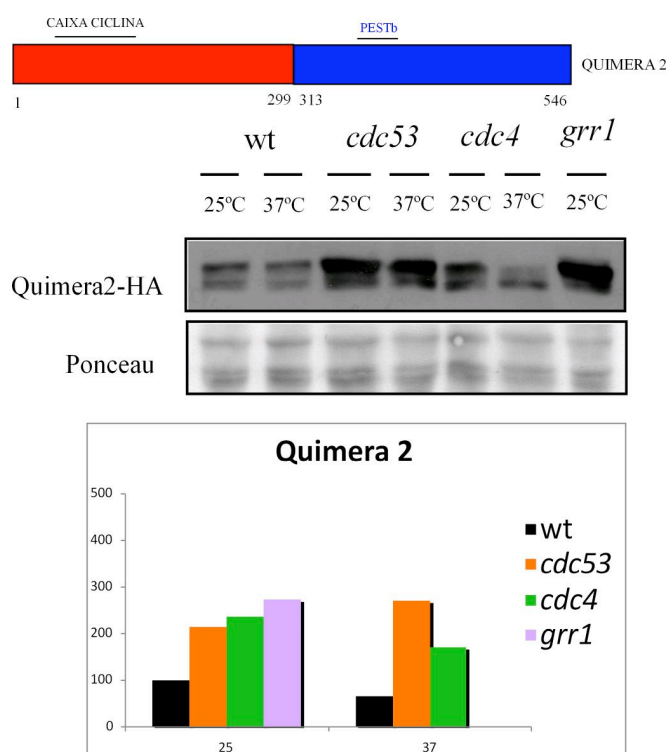


FIGURA 4.5. Anàlisi dels nivells de Quimera 2 en els mutants *cdc53^{ts}*, *cdc4^{ts}* i *grr1*. Cultius en fase exponencial de la soca silvestre W303 i les soques *cdc53-1 cdc4-1* i *grr1* (JCY1539) transformades amb un plasmidi que expressa Quimera 2 etiquetada amb HA van ser incubats a 25°C i a 37°C durant 3h en el cas dels mutants termosensibles. El nivell proteic de Quimera 2 en extractes crus es va determinar per *western blot* amb l'anticòs anti-HA 12C5A. Com control de càrrega es presenta la tinció amb Ponceau de les mateixes membranes. Els gràfics mostren la quantitat relativa de proteïna en els diferents mutants respecte a la soca silvestre.

de Quimera 3 en absència de Grr1 (Figura 4.7). Aquests resultats són consistents amb la caiguda de la proteïna en els apagats traduccionals, ja que l'estabilitat de la Quimera 3 augmenta en tots els mutants (Figura 4.8). Açò indica que Quimera 3 podria ser degradada, de la mateixa forma que *Cln2*, tant per SCF^{Grr1} com per SCF^{Cdc4} .

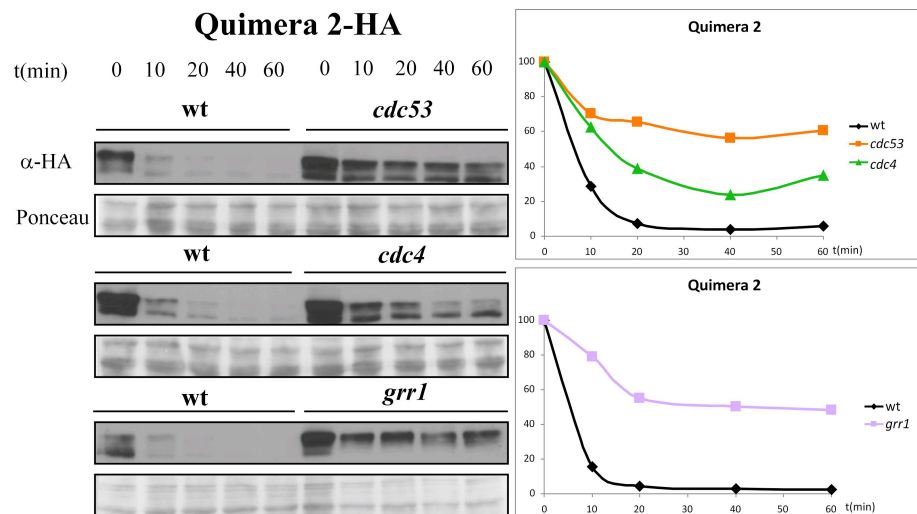


FIGURA 4.6. Anàlisi de l'estabilitat de Quimera 2 en els mutants de *cdc53^{ts}*, *cdc4^{ts}* i *grr1*. Cultius en fase exponencial de la soca silvestre W303 i les soques *cdc53-1*, *cdc4-1* i *grr1* (JCY1539) transformades amb un plasmidi que expressa Quimera 2 etiquetada amb HA van ser incubats a 25°C i a 37°C durant 3h en el cas dels mutants termosensibles. Es va afegir cicloheximida a una concentració final de 50µg/mL i es va determinar el nivell proteic de Quimera 2 en extractes crus per *western blot* als temps indicats amb l'anticòs anti-HA 12C5A. Com control de càrrega es presenta la tinció amb ponceau de les mateixes membranes. Els gràfics mostren la quantitat relativa de proteïna a cada temps respecte de la proteïna inicial a t=0.

El resultat mostrats indiquen que, sorprenentment, encara que la Quimera 3 ha intercanviat la PEST de Cln2 per les PESTa i PESTb de Cln1, el seu patró de degradació no es correspon amb el de Cln1 sinó amb el de Cln2. La única regió de Cln2 que conserva la Quimera 3 és la regió N-terminal (aminoàcids de l'1 al 224), per tant seria aquesta regió i no les PEST la responsable de que la ciclina fora degradada no sols per SCF^{Grr1} sinó també per SCF^{Cdc4}.

Degradació de les ciclins Cln1 i Cln2

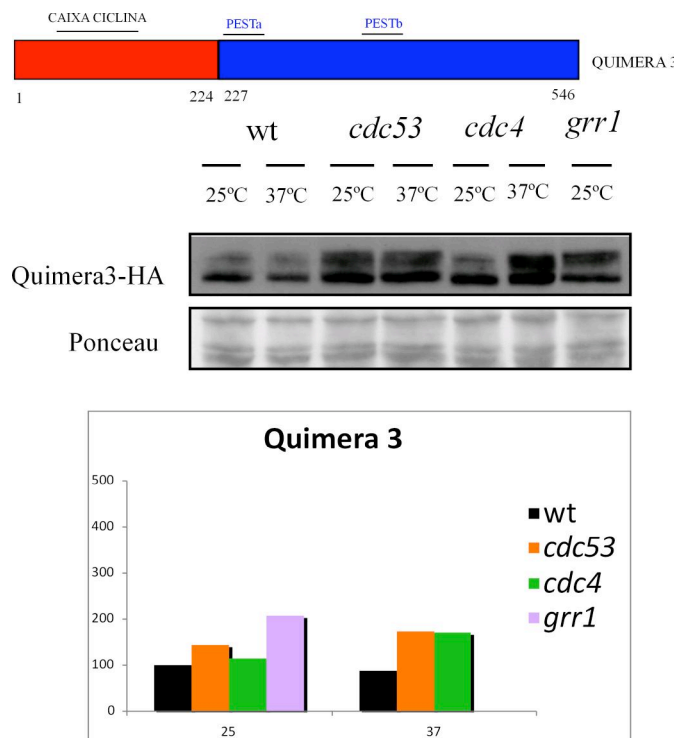


FIGURA 4.7. Anàlisi dels nivells de Quimera 3 en els mutants *cdc53^{ts}*, *cdc4^{ts}* i *grr1*. Cultius en fase exponencial de la soca silvestre W303 i les soques *cdc53-1*, *cdc4-1* i *grr1* (JCY1539) transformades amb un plasmidi que expressa Quimera 3 etiquetada amb HA van ser incubats a 25°C i a 37°C durant 3h en el cas dels mutants termosensibles. El nivell proteic de Quimera 3 en extractes crus es va determinar per *western blot* amb l'anticòs anti-HA 12C5A. Com control de càrrega es presenta la tinció amb Ponceau de les mateixes membranes. Els gràfics mostren la quantitat relativa de proteïna en els diferents mutants respecte a la soca silvestre.

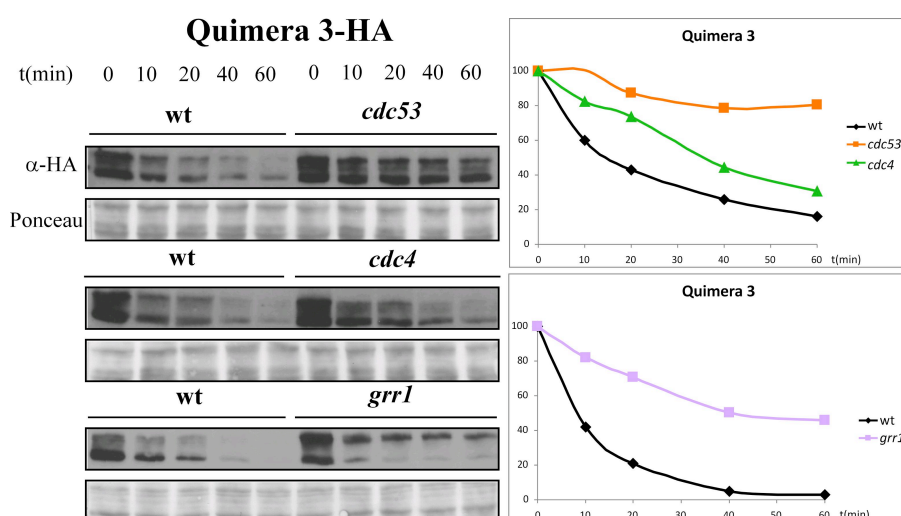


FIGURA 4.8. Anàlisi de l'estabilitat de Quimera 3 en els mutants de *cdc53^{ts}*, *cdc4^{ts}* i *grr1*. Cultius en fase exponencial de la soca silvestre W303 i les soques *cdc53-1*, *cdc4-1* i *grr1*(JCY1539) transformades amb un plasmidi que expressa Quimera 3 etiquetada amb HA van ser incubats a 25°C i a 37°C durant 3h en el cas dels mutants termosensibles. Es va afegir cicloheximida a una concentració final de 50µg/mL i es va determinar el nivell proteic de Quimera 3 en extractes crus per *western blot* als temps indicats amb l'anticòs anti-HA 12C5A. Com control de càrrega es presenta la tinció amb ponceau de les mateixes membranes. Els gràfics mostren la quantitat relativa de proteïna a cada temps respecte de la proteïna inicial a t=0.

La Quimera 4 estava formada per la regió dels aminoàcids de l'1 al 226 de Cln1 junt als aminoàcids del 225 al 299 de Cln2 i els aminoàcids 313 al 546 de Cln1. Per tant: presentava la regió N-terminal de Cln1, el senyal d'exportació de Cln2 i la PESTb de Cln1. Els nivells de la Quimera 4 s'estabilitzen principalment en absència de Grr1 (Figura 4.9). Aquest fet és consistent amb la caiguda de la proteïna en els apagats traduccional, en què només s'observa una estabilització important en el cas del mutant *grr1* (Figura 4.10). Açò pareix indicar que Quimera 4 seria degradada, de la mateixa forma que Cln1, principalment per SCF^{Grr1}. Si es comparen les

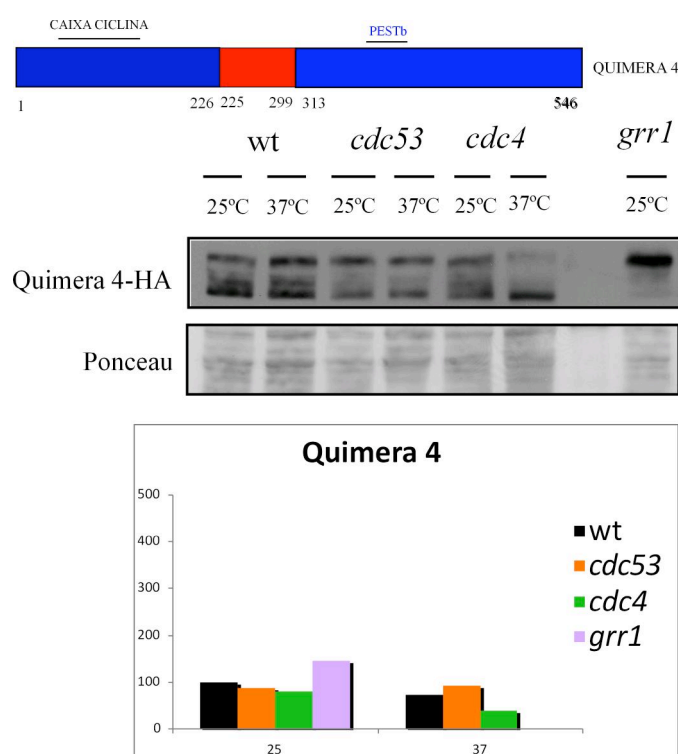


FIGURA 4.9. Anàlisi dels nivells de Quimera 4 en els mutants *cdc53^{ts}*, *cdc4^{ts}* i *grr1*. Cultius en fase exponencial de la soca silvestre W303 i les soques *cdc53-1*, *cdc4-1* i *grr1* (JCY1539) transformades amb un plasmidi que expressa Quimera 4 etiquetada amb HA van ser incubats a 25°C i a 37°C durant 3h en el cas dels mutants termosensibles. El nivell proteic de Quimera 4 en extractes crus es va determinar per *western blot* amb l'anticòs anti-HA 12C5A. Com control de càrrega es presenta la tinció amb Ponceau de les mateixes membranes. Els gràfics mostren la quantitat relativa de proteïna en els diferents mutants respecte a la soca silvestre.

Quimeres 2 i 4 ambdues presenten la PESTb de Cln1 (i el senyal d'exportació) i difereixen en la regió N-terminal. La Quimera 2, que conté la regió N-terminal de Cln2, presenta el patró de degradació de Cln2 mentre que la Quimera 4, que conté la regió N-terminal de Cln1, presenta el patró de degradació de Cln1. Aquests resultats indiquen que la regió N-terminal de la

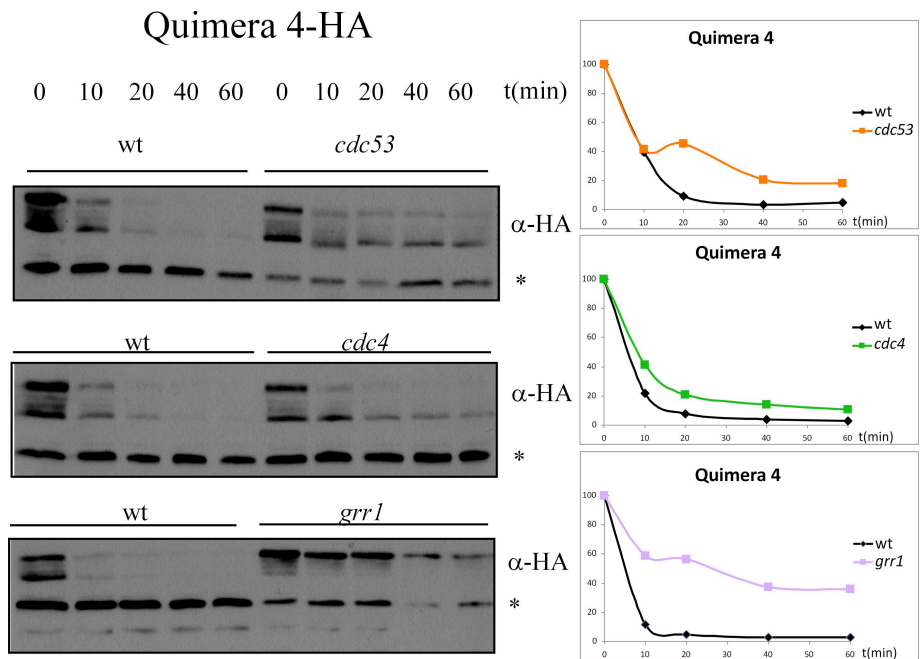


FIGURA 4.10. Anàlisi de l'estabilitat de Quimera 4 en els mutants de *cdc53^{ts}*, *cdc4^{ts}* i *grr1*. Cultius en fase exponencial de la soca silvestre W303 i les soques *cdc53-1*, *cdc4-1* i *grr1* (JCY1539) transformades amb un plasmidi que expressa Quimera 4 etiquetada amb HA van ser incubats a 25°C i a 37°C durant 3h en el cas dels mutants termosensibles. Es va afegir cicloheximida a una concentració final de 50µg/mL i es va determinar el nivell proteic de Quimera 4 en extractes crus per *western blot* als temps indicats amb l'anticòs anti-HA 12C5A. Com control de càrrega (*) es presenta una banda inespecífica reconeguda per l'anticòs en les mateixes membranes. Els gràfics mostren la quantitat relativa de proteïna a cada temps respecte de la proteïna inicial a t=0.

ciclina determina el seu patró de degradació. La regió N-terminal de Cln2 seria necessària per a que la ciclina siga degradada per SCF^{Cdc4}.

D'altra banda també es va observar en l'anàlisi de la degradació de la Quimera 4 que la seua estabilitat era menor que la de Cln1 (Figura 4.11) malgrat haver-se eliminat una seqüència PEST. La Quimera 4 presenta només la PESTb de Cln1 ja que la PESTa ha estat eliminada en intercanviar eixa regió per la de Cln2. La regió de Cln2 que s'ha introduït conté el senyal

d'exportació de Cln2. Aquest resultat apunta a que l'estabilitat de la ciclina podria estar afectada per la seua localització de manera que quan la ciclina siga exportada la seua inestabilitat augmente.

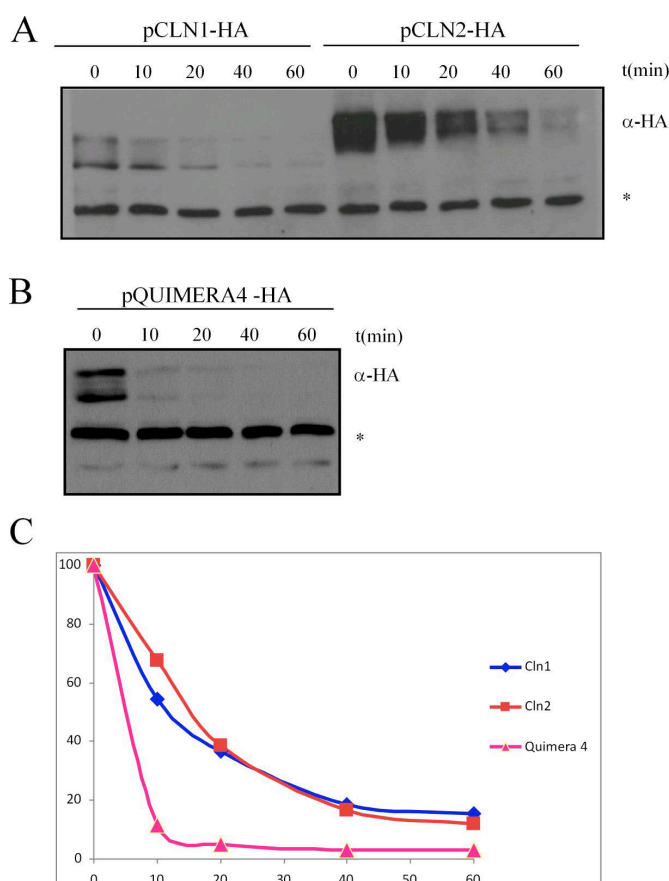


FIGURA 4.11. Anàlisi de l'estabilitat de Quimera 4. Cultius de la soca silvestre W303 transformada amb un plasmidi que expressa Cln1, Cln2 (**A**), o Quimera 4 (**B**) etiquetades amb HA van ser incubats amb cicloheximida a una concentració final de 50µg/mL. El nivell proteic de les ciclines en extractes crus es va determinar als temps indicats per *western blot* amb l'anticòs anti-HA 12C5A. Com control de càrrega (*) es presenta una banda inespecífica reconeguda per l'anticòs en les mateixes membranes. C. Els gràfics presenten la quantificació del nivell proteic a cada temps.

Anàlisi del nivell de les ciclines Cln1 i Cln2 en els mutants en carioferines.

Una explicació de l'existència de diferències en la degradació de Cln1 i Cln2 podria residir en la diferència de localització existent entre les dues ciclines que s'ha descrit en el capítol 3. Dos indicis permetien plantejar que la localització de les ciclines poguera estar jugant un paper en la seua degradació. Primer, els resultats de la Quimera 4 que apuntaven a que l'exportació podria augmentar la inestabilitat de la ciclina. Segon, el fet de què en la regió N-terminal que s'ha descrit que determina el patró de degradació de les ciclines es troba el senyal d'importació de les ciclines Cln1 i Cln2.

Per aprofundir en la descripció del paper de la localització subcel·lular en la degradació de les ciclines es va decidir realitzar una nova aproximació: es van analitzar els nivells proteics de les ciclines Cln1 i Cln2 en els diferents mutants en carioferines. En la Figura 2.12 es mostra l'anàlisi del nivell proteic de Cln1 i Cln2 etiquetades amb HA i expressades sota el control del seu promotor propi o d'un promotor ectòpic (*tetO₂* en el cas de les carioferines no essencials i *ADH1* en el cas de les essencials), per evitar efectes indirectes deguts a la regulació de l'expressió depenent del cicle cel·lular. La primera observació a destacar és que els nivells de Cln2 i també, encara que en menor mesura, els de Cln1 es veuen disminuïts en els mutants en les carioferines essencials que participen en la via clàssica d'importació (Kap95 i Cse1). És important destacar que també ocorre amb expressió ectòpica (Figura 4.12 A i C), la qual cosa demostra que la disminució de nivell de les ciclines no està causada pels problemes de progressió al llarg del cicle cel·lular d'aquestes carioferines (un cas diferent és el del mutant *tetO₇:KAP104* per al qual s'observa una disminució del nivell de les ciclines només quan són expressades sota el control del seu promotor propi, la qual cosa demostra que es tracta d'un efecte indirecte degut a que aquest mutant presenta defectes en el pas per Start).

Per tractar de determinar si la disminució de nivell de ciclina observat en el mutant *tetO₇:KAP95* es devia a un canvi d'estabilitat de la ciclina es van analitzar els nivells d'una versió truncada de la ciclina Cln2 en

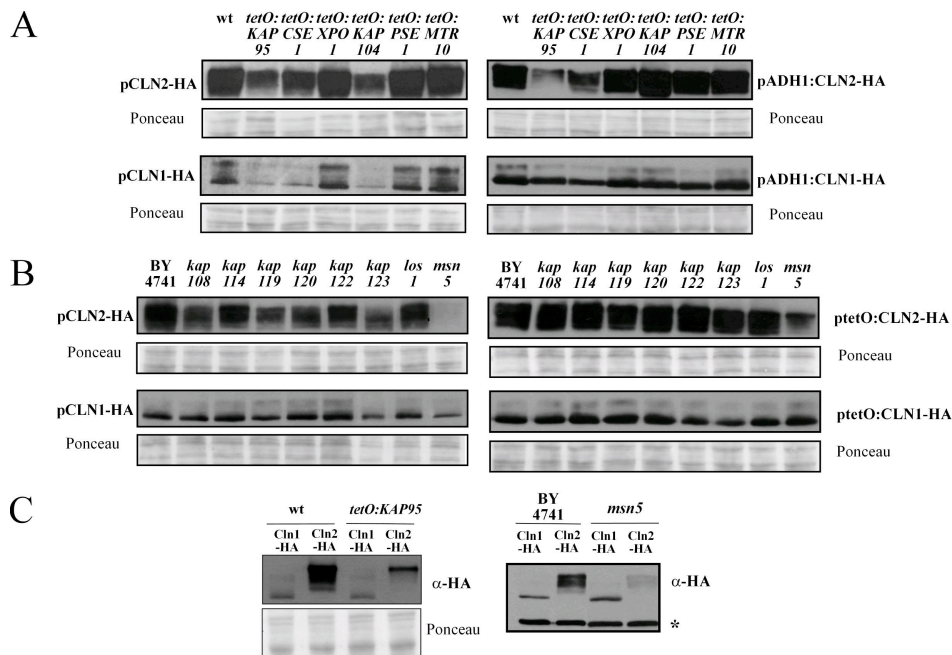


FIGURA 4.12. Anàlisi dels nivells proteics de les ciclines *Cln1* i *Cln2* en els mutants en carioferines. **A.** Cultius en fase exponencial de la soca silvestre (W303) i les soques *tetO:KAP95* (JCY970), *tetO:CSE1* (JCY972), *tetO:XPO1* (JCY978), *tetO:KAP104* (JCY1010), *tetO:PSE1* (JCY971) i *tetO:MTR10* (JCY976) transformades amb plasmidis que expressen *Cln1* o *Cln2* etiquetades amb HA sota el control del seu promotor propi o del promotor *ADH1* van ser incubats amb doxyciclina 0,5µg/mL i es va determinar el nivell proteic de les ciclines en extractes crus per *western blot* amb l'anticòs anti-HA 12C5A. **B.** Cultius en fase exponencial de la soca silvestre (BY4741) i les soques *kap108* (JCY852), *kap114* (JCY853), *kap119* (JCY681), *kap120* (JCY680), *kap122* (JCY679), *kap123* (JCY854), *los1* (JCY678) i *msn5* (JCY855) transformades amb plasmidis que expressen *Cln1* o *Cln2* etiquetades amb HA sota el control del seu promotor propi o del promotor *tetO₂* van ser emprats per determinar el nivell proteic de les ciclines en extractes crus per *western blot* amb l'anticòs anti-HA 12C5A. **C.** Cultius en fase exponencial de la soca silvestre (W303) i la soca *tetO:KAP95* transformades amb plasmidis que expressen *Cln1* o *Cln2* etiquetades amb HA sota el control del promotor *ADH1* van ser incubats amb doxyciclina 5µg/mL durant 8h junt amb cultius en fase exponencial de la soca silvestre (BY4741) i la soca mutant *msn5* transformades amb plasmidis que contenen *Cln1* o *Cln2* etiquetades amb HA sota el control del seu promotor. Es va determinar el nivell proteic de les ciclines en extractes crus per *western blot* amb l'anticòs anti-HA 12C5A comparant els seus nivells en les mateixes membranes. Com control de càrrega es presenta la tinció amb ponceau o una banda inespecífica (*) reconeguda per l'anticòs en les mateixes membranes.

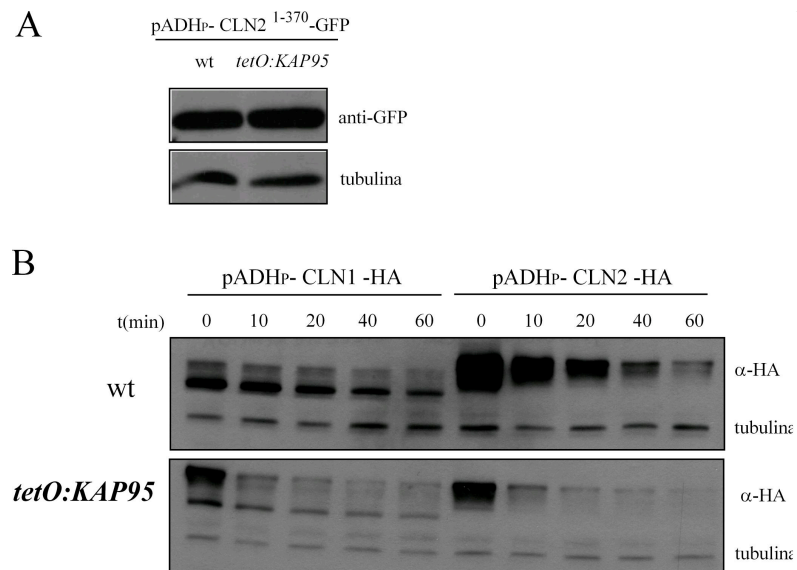


FIGURA 4.13. Anàlisi de l'estabilitat de les ciclines en el mutant *tetO*:*KAP95*.
A. Cultius de la soca silvestre W303 i el mutant *tetO*₇:*KAP95* (JCY970) transformades amb un plasmidi que expressa la versió truncada Cln2¹⁻³⁷⁰ etiquetada amb GFP sota el control del promotor *ADH1* van ser incubats en presència de Doxyciclina 0,5µg/mL i es va determinar el nivell de ciclina per *western blot*. Com a control de càrrega es presenten els nivells de tubulina **B.** Cultius de la soca silvestre W303 i el mutant *tetO*₇:*KAP95* (JCY970) transformades amb plasmidis que expressen Cln1 o Cln2 etiquetades amb HA sota el control del promotor *ADH1* van ser incubats en presència de Doxyciclina 0,5µg/mL. Es va afegir cicloheximida a una concentració final de 50µg/mL i es van determinar els nivells de les ciclines als temps indicats per *western blot*. Com a control de càrrega es presenten els nivells de tubulina

què s'havia eliminat la regió C-terminal (aminoàcids del 370 al 545 de Cln2) que contenia la PEST. Es pot observar que per a aquesta versió de Cln2 estable, la inactivació de Kap95 no produeix canvis en els nivells de la ciclina (Figura 4.13A). Per tant, es necessita una ciclina inestable per a que es produísca una reducció dels nivells de la ciclina quan es bloqueja la importació. Finalment es va realitzar un experiment d'apagat traduccional

amb cicloheximida comparant la caiguda dels nivells de Cln1 i Cln2 en la soca silvestre i en el mutant *tetO:KAP95*. Es pot veure com l'estabilitat tant de Cln1 com de Cln2 disminueix quan la importació és bloquejada (Figura 4.13B). Açò permet proposar que la inestabilitat de les ciclins seria major en el citosol, ja que augmenta quan es bloqueja la importació. Reforçant aquesta idea la inestabilitat de la ciclina augmenta quan s'introdueix un mecanisme d'exportació al que no està habitualment exposada, com s'ha vist en analitzar la degradació de la Quimera 4. Un altre resultat consistent amb aquesta idea sorgeix de comparar la Quimera 2 i la Quimera 3: quan s'elimina el senyal d'exportació de Cln2, present en la Quimera 2 i no en la Quimera 3, es perd l'augment d'inestabilitat observat en la Quimera 2.

Un altra observació destacable en comparar els nivells de les ciclins en els mutants en carioferines és que el nivell de Cln2 però no el de Cln1 es veu reduït en un mutant *msn5* (Figura 4.12B i C). El fet que Msn5 regula els nivells cel·lulars de la proteïna Cln2 ja havia estat comprovat al nostre laboratori i s'havia avançat sobre la seua explicació en estudis anteriors establint que aquesta regulació no ocorre a nivell transcripcional ni pel control de l'estabilitat de la proteïna (tesi F.Taberner). Al llarg dels experiments del Capítol 3 s'havien obtingut noves quimeres i versions truncades de Cln2 per la qual cosa es va decidir completar aquest estudi.

L'objectiu era tractar d'acotar exactament la regió responsable del control del nivell proteic de Cln2 per part de Msn5. En la regió central de Cln2 s'havia localitzat el senyal d'exportació de Cln2 reconegut per Msn5. La pregunta a respondre era si eixa mateixa regió era la responsable de la regulació del nivell de la ciclina. Es va comparar el nivell de la Quimera 3 en una soca silvestre i en un mutant *msn5*. En la Quimera 3 s'havia eliminat la NES de Cln2 en intercanviar tota la regió C-terminal, des de l'aminoàcid 225, de Cln2 per la de Cln1. Es va comprovar que seguia existint una diferència de nivell de ciclina entre les dues soques (Figura 4.14.A). Per tant la regió responsable de la caiguda de nivell de Cln2 en un mutant *msn5* no implicava la presència de la NES de Cln2 reconeguda per Msn5. La regió responsable estaria situada entre els aminoàcids 1 i 224 de Cln2.

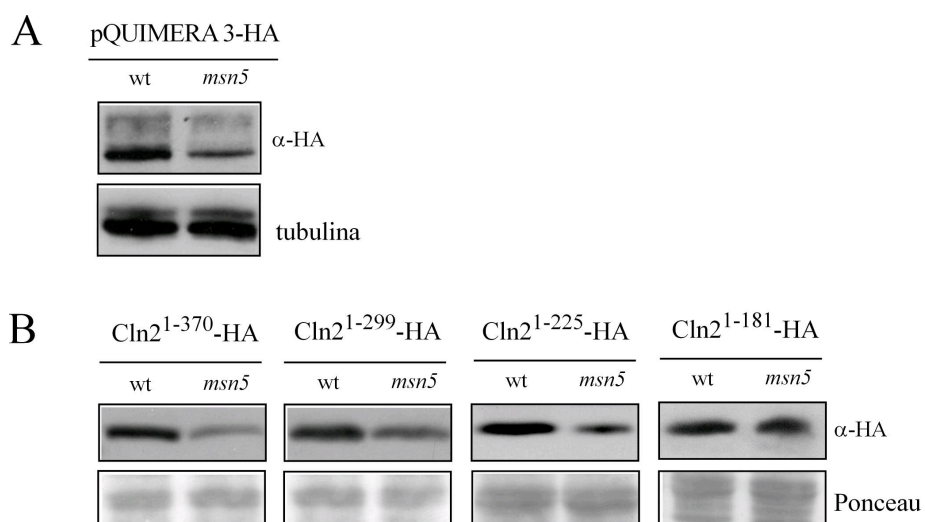


FIGURA 4.14. Control del nivell de versions mutants de Cln2 per Msn5. **A.** Cultius de la soca silvestre W303 i el mutant *msn5* (JCY1018) transformades amb un plasmidi que expressa Quimera3 etiquetada amb HA es van emprar per determinar en extractes crus el nivell de ciclina per *western blot*. Com a control de càrrega es mostra el nivell de tubulina. **B.** El nivell de ciclina es va determinar en extractes crus de cultius de les soques *CLN2*¹⁻³⁷⁰-HA (JCY1361), *msn5 CLN2*¹⁻³⁷⁰-HA (JCY1367), *CLN2*¹⁻²⁹⁹-HA (JCY1415), *msn5 CLN2*¹⁻²⁹⁹-HA (JCY1417), *CLN2*¹⁻²²⁴-HA (JCY1363), *msn5 CLN2*¹⁻²²⁴-HA (JCY1369), *CLN2*¹⁻¹⁸¹-HA (JCY1365), i *msn5 CLN2*¹⁻¹⁸¹-HA (JCY1371), per *western blot*. Com a control de càrrega es mostra la tinció amb Ponceau de la membrana.

A continuació es va construir una bateria de soques que expressaven versions truncades de la ciclina Cln2 sota el control del seu promotor propi i es va comparar el nivell proteic de les diferents versions de Cln2. Les soques eren: *CLN2*¹⁻³⁷⁰-HA, *msn5 CLN2*¹⁻³⁷⁰-HA, *CLN2*¹⁻²⁹⁹-HA, *msn5 CLN2*¹⁻²⁹⁹-HA, *CLN2*¹⁻²²⁴-HA, *msn5 CLN2*¹⁻²²⁴-HA, *CLN2*¹⁻¹⁸¹-HA i *msn5 CLN2*¹⁻¹⁸¹-HA. Es pot veure que les diferències en el nivell de la ciclina es mantenen fins que s'elimina la regió dels aminoàcids 181 a 224 de Cln2 (Figura 4.14B). Per tant es pot afirmar que la regió entre els aminoàcids 181 i 224 de Cln2 és necessària per a que es produisca el descens de nivell proteic observat en el mutant *msn5*.

A la vista del resultat anterior es va decidir fusionar aquesta regió a una proteïna heteròloga, en aquest cas GFP, per veure si la regió és també suficient per mitjançar la disminució de nivell de dita proteïna en el mutant *msn5*. La fusió es va obtenir en un plasmidi sota el control del promotor de *CLN2*. Quan es van comparar els nivells de la fusió en una soca silvestre i en un mutant *msn5* transformades amb el plasmidi i amb un plasmidi control que expressava GFP sota el control del promotor de *CLN2*, es va observar que els nivells de la fusió caïen en un mutant *msn5* (Figura 4.15A).

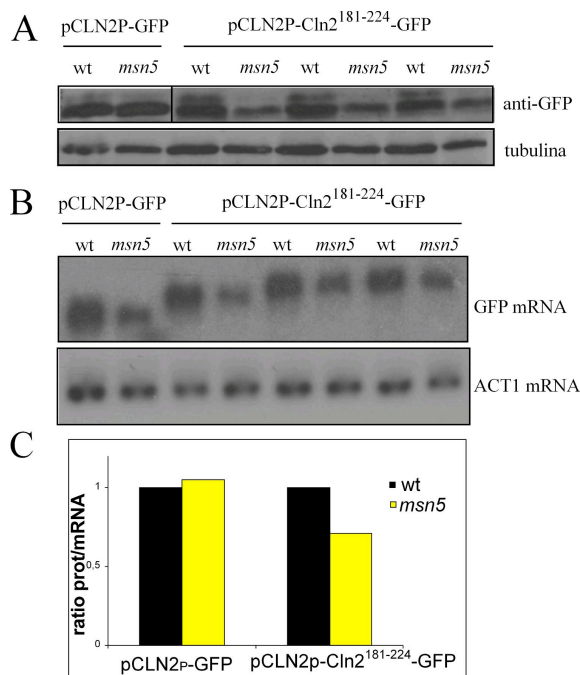


FIGURA 4.15. Anàlisi del nivell proteic de Cln2¹⁸¹⁻²²⁴-GFP en el mutant *msn5*.
A. Cultius de la soca silvestre W303 i el mutant *msn5* (JCY1018) transformades amb els plasmidis pCLN2p-GFP i pCLN2p-Cln2¹⁸¹⁻²²⁴-GFP es van recollir i es va determinar la quantitat de proteïna en extractes crus per *western blot*. Com a control de càrrega es mostra el nivell de tubulina. **B.** Els mateixos cultius van ser emprats per quantificar el nivell de mRNA per *northern blot*. Com a control de càrrega es mostra el mRNA del gen *ACT1*. **C.** El gràfic representa el ratio de proteïna (relativa front a tubulina) /mRNA (relatiu front a actina) del mutant *msn5* en relació a la soca silvestre.

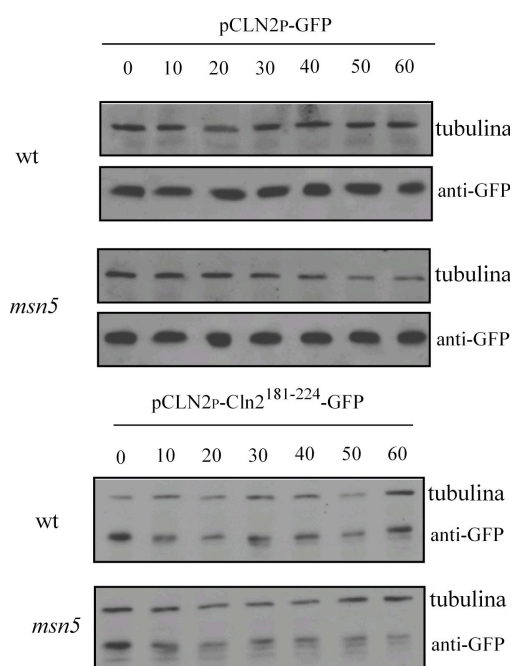


FIGURA 4.16. Estabilitat de Cln2¹⁸¹⁻²²⁴-GFP en el mutant *msn5*. Cultius de la soca silvestre W303 i el mutant *msn5* (JCY1018) transformades amb el plasmidis pCLN2_p-GFP i pCLN2_p-Cln2¹⁸¹⁻²²⁵-GFP es van incubar amb cicloheximida a una concentració final de 50µg/mL i es van determinar els nivells de les ciclines als temps indicats per *western blot*. Com a control de càrrega es presenten els nivells de tubulina.

Calia comprovar que la disminució de nivell no responia a una diferència transcripcional. Es va comparar el ratio proteïna-mRNA de la fusió Cln2¹⁸¹⁻²²⁴-GFP en una soca silvestre i en un mutant *msn5*. Mentre que el control GFP presenta el mateix ratio en la soca silvestre i en el mutant *msn5*, la fusió Cln2¹⁸¹⁻²²⁴-GFP presenta una disminució en la quantitat relativa de proteïna respecte al mRNA en el mutant *msn5* (Figura 4.15 C). Per tant aquesta regió no era només necessària sinó també suficient per a la regulació que Msn5 duia a terme dels nivells proteics de Cln2.

A continuació s'havia de testar si la disminució de nivell es devia a una menor estabilitat de la fusió en el mutant *msn5*. Es va comparar la vida mitjana de la fusió Cln2¹⁸¹⁻²²⁴-GFP en una soca silvestre i en un mutant *msn5* en un experiment d'apagat traduccional amb cicloheximida (Figura 4.16). No existia una disminució de l'estabilitat de la fusió en el mutant *msn5* el que ens duia a descartar la contribució de la degradació en el control del nivell proteic per part de Msn5. Com a resum podem concloure que la regió entre els aminoàcids 181 i 224 de Cln2 mitjança la caiguda de nivell de la ciclina en un mutant *msn5*. No pareix estar implicat cap mecanisme de degradació sinó més bé una diferència de síntesi proteica que no permet igualar el nivell proteic al de la soca silvestre.

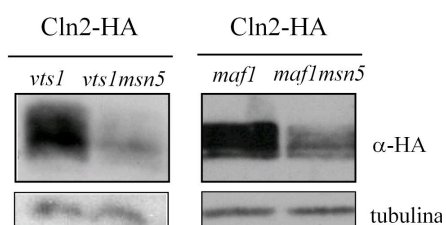


FIGURA 4.17 Anàlisi del nivell proteic Cln2 en les soques *vts1* i *vts1msn5* i en les soques *maf1* i *maf1msn5*. Es van determinar els nivells proteics de Cln2 en extractes de cultius de les soques *vts1 CLN2-HA* (JCY1378) i *vts1msn5 CLN2-HA* (JCY1379) i de les soques *maf1 CLN2-HA* (JCY1457) i *maf1msn5 CLN2-HA* (JCY1459) per *western blot*. Com a control de càrrega es presenten els nivells de tubulina.

La disminució de nivell proteic de Cln2 en el mutant *msn5* es podria deure a un efecte indirecte provocat pel fet que alguna de les proteïnes que s'ha descrit que interaccionen amb Msn5 es localitzara de forma incorrecta i poguera provocar l'efecte observat en els nivells de la ciclina. En un intent inicial de caracteritzar el mecanisme pel qual Msn5 controla els nivells de Cln2, dues candidates eren Vts1 i Maf1 que estaven relacionades amb

diferents aspectes del metabolisme del RNA (Uetz *et al.*, 2000; Aviv *et al.*, 2003 ; Towpik *et al.*, 2008). Per tal d'estudiar un possible paper d'aquestes proteïnes es van construir soques mutants per a cadascuna d'elles i després es va deletar sobre els mutants *vts1* i *maf1* el gen *MSN5*. L'objectiu era comparar el nivell proteic de Cln2 en *vts1* i *vts1msn5* i *maf1* i *maf1msn5*. Si la diferència de nivell desapareixia és que dites proteïnes participarien en la disminució de nivell de Cln2 pròpia del mutant *msn5*. Es van marcar Cln2 amb l'etiqueta HA i es va analitzar el nivell de Cln2 per *western blot* (Figura 4.17). La diferència de nivell de Cln2 es manté en els dos casos, així que es pot deduir que les proteïnes Vts1 i Maf1 no participen en la disminució de nivell de Cln2.

DISCUSSIÓ

El terme ciclina va ser escollit per descriure les clares fluctuacions d'abundància que experimentaven les subunitats reguladores de la CDK durant el cicle cel·lular. Cln1 i Cln2 s'acumulen durant G1 i el seu nivell és màxim quan s'apropa Start. L'abundància de les ciclines Cln és determinant per a que el cicle s'iniciï en el moment correcte. Les ciclines Cln són constitutivament inestables i aquesta inestabilitat és crítica per a una apropiada regulació de la progressió del cicle cel·lular. Dins de la caracterització de la regulació de les ciclines Cln1 i Cln2 es va decidir analitzar i comparar la degradació de les dues ciclines, ja que en la major part dels estudis previs, de la mateixa forma que quan s'havia analitzat la seua funcionalitat, s'havien estudiat les dues ciclines de forma conjunta o dades obtingudes per a una ciclina s'havien fet extensives a l'altra.

El primer que es va comparar va ser l'estabilitat de les dues ciclines. En estudis previs s'havia analitzat l'estabilitat de les ciclines en experiments de pols-caça amb el seu promotor endògen o en experiments d'apagat transcripcional amb promotor *GALI*. Els valors de vida mitjana descrits oscilen entre els 5 i els 15 minuts (Richardson *et al.*, 1989; Wittemberg *et al.*, 1990; Salama *et al.*, 1994; Barral *et al.*, 1995; Deshaies *et al.*, 1995; Lanker *et al.*, 1996; Willems *et al.*, 1996). En el present treball s'han emprat

experimentos d'apagat traduccional amb cicloheximida. L'estabilitat tant de Cln1 com de Cln2 sembla ser la mateixa amb valors de vida mitjana que es situen en torn als 10 minuts, coincidint amb els prèviament descrits en la bibliografia.

Les seqüències PEST han estat caracteritzades com els determinants principals de la inestabilitat de proteïnes que havien de ser degradades ràpidament per la via SCF (Rogers *et al.*, 1986; Rechsteiner i Rogers, 1996). En el treball presentat s'ha tractat d'analitzar la funcionalitat de les PEST presents en les ciclines, el que era especialment relevant en el cas de la PESTb de Cln1 donat el seu baix valor de predicció com a PEST. Les PEST que s'han estudiat són funcionals. De fet, la PEST b de Cln1 pareix conferir major inestabilitat que la PEST equivalent de Cln2 si s'analitzen els resultats obtinguts amb la Quimera 2. Açò podria deure's a la seqüència PEST en si mateixa, però també podria estar causat per regions adjacents que condicionarien la seua funcionalitat. En aquest sentit s'ha descrit per a diferents reguladors del cicle que l'eliminació o la introducció de seqüències PEST afecta a l'estabilitat però els efectes són majors si s'inclouen dominis adjacents. Aquest és el cas de Cln1, Cln2 i Cln3 ja que les versions estables estudiades d'aquestes ciclines han perdut regions amples que abarquen la PEST total o parcialment (Barral *et al.*, 1995; Yaglom *et al.*, 1995). De la mateixa forma només quan tot el domini C-terminal de Cln2 és transferit a una proteïna heteròloga s'augmenta considerablement la inestabilitat d'aquesta (Salama *et al.*, 1994; Berset *et al.*, 2002). En la regió C-terminal de Cln1 podrien existir regions en l'entorn de la PESTb que modularen la seua funcionalitat. Aquest sembla ser el cas ja que la mateixa disminució d'estabilitat observada per a la Quimera 2 es va detectar quan es va analitzar la Quimera 1, que només intercanviava un fragment C-terminal que no conté la seqüència PEST (resultats no mostrats). Cal ressaltar que la presència de l'extrem C-terminal de Cln1 augmenta la inestabilitat de la Quimera 2 i de la Quimera 4 però no de la Quimera 3 ni de la pròpia ciclina Cln1. Deu existir, per tant, un factor que determine l'increment d'inestabilitat que produeix la introducció de la regió C-terminal de Cln1. Aquest factor és probablement l'existència d'un mecanisme d'exportació, ja que Cln1 i Quimera 3 no

presenten el senyal d'exportació de Cln2 mentre que Quimera 2 i 4 que sí el presenten i són exportades al citosol són més inestables. Així doncs, la localització de les quimeres podria afectar al comportament de les seues PEST (veure més endavant).

Una altra qüestió a analitzar era la ruta de degradació de les ciclins. Està amplament acceptat que Cln1 i Cln2 són degradades per SCF^{Grr1} en base a que: l'estabilitat de Cln2 augmenta en els mutants *grr1* (Barral *et al.*, 1995), *cdc53* (Willems *et al.*, 1996) i alguns mutants *skp1* (Bai *et al.*, 1996); l'estabilitat de Cln1 també augmenta en un mutant *grr1* (Barral *et al.*, 1995); a més, Cln1 i Cln2 s'uneixen a Grr1 *in vitro* (Skowyra *et al.*, 1997). En el present treball s'ha comprovat que tant Cln1 com Cln2 són degradades per la ruta SCF^{Grr1} però també s'ha concluit que la degradació de Cln2, però no Cln1, també depén de la ruta SCF^{Cdc4}. En quant a l'estabilització de les ciclins en el mutant *cdc4* existien resultats contradictoris en la bibliografia. Alguns autors detecten estabilització de Cln1 i Cln2, les quals estudien conjuntament, en un mutant *cdc4* en experiments de pols-caça (Blondel i Mann, 1996); posteriorment altres autors no detecten eixa estabilització per a Cln2 en experiment idèntics (Patton *et al.*, 1996; Schneider *et al.*, 1998). No obstant, un dels grups presenta resultats d'apagat transcripcional amb promotor *GAL1* en els que es veu diferència d'estabilitat per a Cln2 en el mutant *cdc4* (Figura 6 de Patton *et al.*, 1996). En qualsevol cas existeix controvèrsia al voltant de la causa última de l'estabilització de les ciclins en el mutant *cdc4*. S'ha proposat que és un efecte indirecte degut a l'augment de Sic1 en un mutant *cdc4* (ja que Sic1 és degradat per SCF^{Cdc4}), i al fet que les ciclins Clb1-4 són necessàries per a la degradació de les ciclins Cln (Blondel i Mann., 1996). Tanmateix, en altres experiments s'ha demostrat que la ciclina Cln2 és inestable ja en G1 i que la seua estabilitat no varia en mutants *clb* ni en sobreexpressar Sic1 (Schneider *et al.*, 1998). Nosaltres hem detectat un augment de l'estabilitat de Cln2 en el mutant *cdc4* que implica a la ruta SCF^{Cdc4} en la degradació de Cln2. El nostre treball no pot demostrar si l'augment d'estabilitat detectat per a Cln2 en un mutant *cdc4* és un efecte directe o indirecte, però en qualsevol cas implica un mecanisme

que afecta a Cln2 i no a Cln1, establint una nova diferència de regulació entre les dues ciclins.

Una altre objectiu del treball era acotar quines regions de les ciclins són les encarregades de mitjançar el reconeixement per les diferents formes de SCF així com determinar la contribució de les PEST a aquest reconeixement. En la Taula 4.2 es mostren les diferents seqüències que formen part de cada quimera i es resumeixen els resultats obtinguts pel que respecta al patró de degradació i l'estabilitat de cada ciclina. S'havia descrit que la regió C-terminal de Cln2 que comprén la seqüència PEST i regions adjacents (aminoàcids del 376 al 545) era la responsable del reconeixement per part de SCF^{Grr1} ja que quan es fusiona aquesta regió a una versió estable de Sic1, la proteïna és reconeguda per SCF^{Grr1} (Berset *et al.*, 2002). Per tant, no és la PEST de Cln2 la que condiciona el seu reconeixement per part de SCF^{Cdc4}. De fet, quan s'intercanvia la PEST de Cln2 per la PESTb de Cln1 (Quimeres 2 i 3) el patró de degradació propi de Cln2 no varia. Així, les seqüències PEST de les dues ciclins serien equivalents a efectes de reconeixement per part de SCF. Ha de ser doncs un altra regió de la proteïna l'encarregada de determinar aquest reconeixement. Aquesta regió és pot concluir que és la regió N-terminal si s'analitzen els resultats obtinguts amb la Quimera 3. Aquesta quimera presenta la regió N-terminal de Cln2 (aminoàcids de l'1 al 224) i la regió C-terminal de Cln1 i manté el patró de degradació propi de Cln2. Aquest resultat indica que és necessària la presència de la regió N-terminal de Cln2 per a que la ciclina siga degradada per SCF^{Cdc4}. Aquesta conclusió està recolçada pels resultats obtinguts amb la Quimera 4 que si es compara amb la Quimera 2 es pot veure com malgrat que les dues contenen la PEST b de Cln1, la regió N-terminal de Quimera 4 és la de Cln1 i el seu patró de degradació coincideix amb el de Cln1, mentre que la regió N-terminal de Quimera 2 és la de Cln2 i el seu patró de degradació coincideix amb el de Cln2.

Taula 4.2

Ciclina	PEST	SCF F-box prot	N-terminal region	Export Seq (NES)	Estabilitat
Cln2	PEST Cln2	Grr1 Cdc4	Cln2 seq	Cln2	standard
Cln1	PESTa+b Cln1	Grr1	Cln1 seq	-----	standard
Quimera 2	PESTb Cln1	Grr1 Cdc4	Cln2 seq	Cln2	Menor estabilitat
Quimera 3	PESTa+b Cln1	Grr1 Cdc4	Cln2 seq	-----	standard
Quimera 4	PESTb Cln1	Grr1	Cln1 seq	Cln2	Menor estabilitat

La regió N-terminal de les ciclines conté la caixa ciclina, encarregada de la unió de la ciclina a Cdc28. Podria ser que la unió a Cdc28 condicionara la degradació de Cln1 i Cln2. S'han proposat requeriments diferents per a la degradació de Cln2 lliure i de Cln2 en complex amb Cdc28. L'experiment directe, analitzant l'estabilitat de Cln2 en el mutant *cdc28*, mostra efectes mínims o indetectables (Deshaies *et al.*, 1995; Lanker *et al.*, 1996; Peter i Herskowitz., 1994; Salama *et al.*, 1994). Pel contrari una llarga sèrie d'experiments indirectes han suggerit un requeriment de la fosforilació per part de Cdc28 en la degradació de Cln2: la ubiquïtillació de Cln2 *in vitro* requereix fosforilació per part de Cdc28 (Deshaies *et al.*, 1995), quan s'inhibeix la proteòlisi en Start Cln2 s'acumula en formes hiperfosforilades (Barral *et al.*, 1995; Willems *et al.*, 1996), i, per últim mutants en Cln2 en llocs consens de fosforilació per part de la CDK són

hiperestables (Lanker *et al.*, 1996). Lanker *et al.* suggereixen que només Cln2 en el complex Cln2-Cdc28 és degradada de forma dependent de fosforilació mentre que Cln2 lliure seria degradada de forma més lenta i independent de Cdc28. Amb aquest escenari és difícil pensar com la caixa ciclina (regió de més alta homologia entre Cln1 i Cln2) podria contribuir a la participació de SCF^{Cdc4} en la degradació de Cln2 i no de Cln1.

Un altra hipòtesi és que algun element present en la regió N-terminal fóra determinant per al reconeixement i la degradació de la ciclina per part de SCF^{Cdc4}. En les proteïnes que s'han descrit com substrats de SCF^{Cdc4}, els dominis necessaris per al reconeixement i interacció amb Cdc4 es situen en la majoria dels casos en la regió N-terminal de la proteïna i són dominis bàsics i rics en prolina (Verma *et al.*, 1997; Drury *et al.*, 1997; McKinney i Cross, 1995). En molts d'aquests casos s'ha destacat també la importància de la fosforilació per Cdc28 en aquest reconeixement. No podem descartar que una regió similar en la ciclina Cln2 siga la responsable del seu reconeixement per SCF^{Cdc4}.

A més de les anteriors, cap un altra possibilitat. En el capítol 3 es va identificar en eixa regió N-terminal el senyal d'importació dependent de la via clàssica d'importació d'ambdues ciclins. Açò permet proposar que una diferent eficiència en la importació de les ciclins determine el seu patró de degradació. Cdc4 és majoritàriament nuclear, la qual cosa pot determinar diferències d'estabilitat de les proteïnes diana en funció de la seua localització. Així, en el cas de Far1, la seua localització nuclear el destina a ser degradat per SCF^{Cdc4} mentre que quan és exportat i es troba en el citoplasma no és degradat (Blondel *et al.*, 2000). Potser el reconeixement de Cln2 per part de SCF^{Cdc4} estiga condicionat per la importació de Cln2 al nucli. No s'han descrit en el present treball diferències entre els senyals d'importació de Cln1 i Cln2 però no es pot descartar que diferències en l'eficiència de la importació podrien jugar un paper en el reconeixement de Cln2, però no de Cln1 per part de SCF^{Cdc4}.

La influència de la localització en la degradació de les ciclins podria ser més ampla ja que segons els resultats presentats el bloqueig de la importació de Cln1 i Cln2 en el mutant en la carioferina Kap95 provoca un

augment de la inestabilitat de les ciclins. Les ciclins Cln1 i Cln2 podrien, per tant, ser més inestables en el citosol. Cal destacar que els resultats obtinguts amb mutants en carioferines poden deure's a efectes indirectes provocats per alteracions en la localització de la maquinària de degradació o d'altres reguladors. Però el fet de que quan s'introdueix en Cln1 el senyal d'exportació de Cln2 (Quimera 4), malgrat eliminar una PEST, la ciclina resultant és més inestable, recolça la idea d'una inestabilització de les ciclins en el citosol. Per analitzar la importància de la localització de les ciclins en la seua degradació caldria analitzar l'estabilitat de diferents versions de Cln1 i Cln2 amb localització forçada. En eixe mateixa línia, podria analitzar-se la relevància de les diferents seqüències PEST fusionades a una proteïna heteròloga, la localització de la qual també es poguera regular.

En el capítol 3 es va detectar una diferència de nivell proteic entre Cln1 i Cln2. L'origen d'aquesta diferència no deu residir en la degradació de les ciclins ja que la seua estabilitat és la mateixa. Podria analitzar-se la regulació post-transcripcional dels missatgers de Cln1 i Cln2 així com si existeix alguna diferència entre les dues ciclins a nivell de síntesi proteica. Així mateix, no podria descartar-se que una fracció hiperinestable de Cln1 no haja estat detectada en el procediment experimental emprat. Quedaria pendent determinar si diferències a nivell transcripcional o post-transcripcional, a més de les diferències funcionals, de localització i de degradació descrites, puguen estar regulant l'activitat de les ciclins Cln1 i Cln2.

Un altre resultat analitzat en aquest capítol és la regulació dels nivells de la ciclina Cln2 per part de la carioferina Msn5. L'objectiu principal era acotar la regió responsable d'aquesta regulació. S'ha determinat que la regió entre els aminoàcids 181 i 225 de Cln2 és necessària i suficient per a que es produisca la reducció de nivell proteic observada en el mutant *msn5*. Aquesta regió no inclou el senyal d'exportació descrit per a Cln2, per tant, la regulació espacial i la regulació del nivell proteic de Cln2 per part de Msn5 serien independents.

El mecanisme de regulació dels nivells de Cln2 per part de Msn5 pareix situar-se a nivell post-transcripcional. En estudis previs (Tesi F.J Taberner) i en els experiments d'apagat traduccional amb cicloheximida realitzats amb la fusió Cln2¹⁸¹⁻²²⁴-GFP s'ha descartat la participació de la degradació en el control del nivell de Cln2 per Msn5. En la cerca d'aquest mecanisme poden plantejar-se diferents hipòtesis. Potser que l'absència de l'exportina Msn5 impedisca l'eixida del nucli de factors específics necessaris per al processament del mRNA de Cln2 o la seua traducció en el citoplasma. S'ha descrit una interacció física entre Msn5 i Vts1 (Uetz *et al.*, 2000), una proteïna capaç d'interaccionar amb RNAs (Aviv *et al.*, 2003). Tanmateix, la inactivació de Msn5 continua produint una disminució del nivell de Cln2 en absència d'Vts1. D'altra banda, Msn5 podria afectar de forma directa a l'exportació de mRNA de Cln2. Encara que l'exportació dels mRNAs depèn del receptor Mex67-Mtr2 (Stewart, 2007), s'ha descrit que Msn5 és capaç d'unir molècules de RNA *in vitro* (Shitaba *et al.*, 2006). Pel que respecta a que la traducció de determinats missatgers poguera veure's afectada per la disponibilitat de certs tRNAs en absència de Msn5, un bon candidat per a mitjançar aquest efecte és Maf1, un repressor de la RNAPol III, l'exportació del qual depèn de Msn5 (Towpik *et al.*, 2008). Però els nivells de Cln2 continuen reduint-se en el mutant *msn5* en absència de Maf1. De forma alternativa, la inactivació de Msn5 podria alterar els pools citosòlics de tRNAs per defectes en el transport directe d'alguns d'aquests tRNAs, ja que s'ha descrit que Msn5 pot unir tRNAs i participar en la seua exportació (Takano *et al.*, 2005; Shibata *et al.*, 2006).

Caldria intentar noves aproximacions per avançar en la descripció d'un mecanisme pel qual Msn5 controla els nivells d'algunes de les proteïnes que exporta. El mecanisme no és general, ja que no afecta a reguladors del cicle com Swi6, Swi4, Ace2, Whi5 i Swel. Però resultats anàlegs als obtinguts amb Cln2 s'han descrit amb Swi5 (Tesi F.Taberner). L'acumulació tant de Cln2 com de Swi5 al nucli és tòxica, per tant seria evolutivament favorable per a la cèl.lula l'existència d'un mecanisme de seguretat que permeta controlar els nivells de proteïnes tòxiques en una determinada localització quan aquesta es veu alterada.

5. Regulació espacial de Cdc24

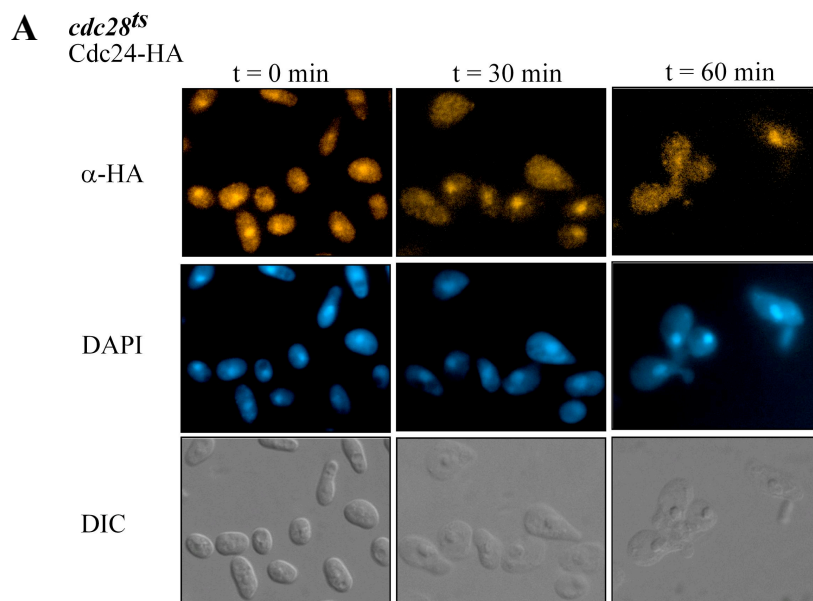
PAPER DE Cdc24 EN LA FUNCIONALITAT ESPECÍFICA DE Cln2

Al començar aquest treball es va plantejar descriure quina era la principal funció específica de Cln2 durant el procés de gemmació. Només es coneixia el paper que el complex Cdc28-Cln1/2 exercia en fosforilar l'inhibidor Far1 en el nucli permetint així l'alliberament de Cdc24 i la seua eixida al citosol (Gulli i Peter, 2001). Per això Cdc24 es va convertir en la primera diana del complex que calia estudiar per tal de definir millor l'actuació de Cln2 durant el procés de gemmació. La hipòtesi de partida era que el retràs en gemmació observat en el mutant *cln2* es deguera a un retràs en l'eixida del nucli de Cdc24.

L'eixida del nucli de Cdc24 es veu retrasada en un mutant *cln2*

El primer que es va plantejar va ser comparar la cinètica d'eixida del nucli de Cdc24 en els mutants *cln1* i *cln2*. L'experiment que es va realitzar tractava de comparar en cultius sincronitzats tant l'índex de gemmació al llarg del temps com la desaparició de Cdc24 del nucli. Les soques *cdc28^{ts}* (parental), *cdc28^{ts} cln1cln2*, *cdc28^{ts} cln1* i *cdc28^{ts} cln2* en les que la proteïna

Cdc24 s'havia etiquetat amb HA, es van créixer fins a fase exponencial, es van incubar durant 3 hores a 37°C per assolir la parada en G1 i després es van alliberar els cultius incubant-los a 25°C. Es van prendre mostres cada 5 min. durant 1 hora. Per a cada mostra es va determinar el percentatge de cèl.lules amb gemma i el percentatge de cèl.lules amb Cdc24 nuclear (Figura 5.1B). En la Figura 5.1A es mostren imatges del senyal Cdc24-HA al llarg del temps en la soca parental. Com es pot observar el senyal és intens i homogeni i permet un recompte de percentatge de cèl.lules amb Cdc24 en el nucli. Com ja s'ha descrit anteriorment existia un retràs d'uns 10 minuts en la gemmació del mutant *cln2*. El que es va veure és que existia un retràs de la mateixa duració en l'eixida de Cdc24 del nucli en el mutant *cln2* respecte del mutant *cln1*. Açò significava que quan no estava present la ciclina Cln2, l'eixida de Cdc24 del nucli experimentava un retràs.



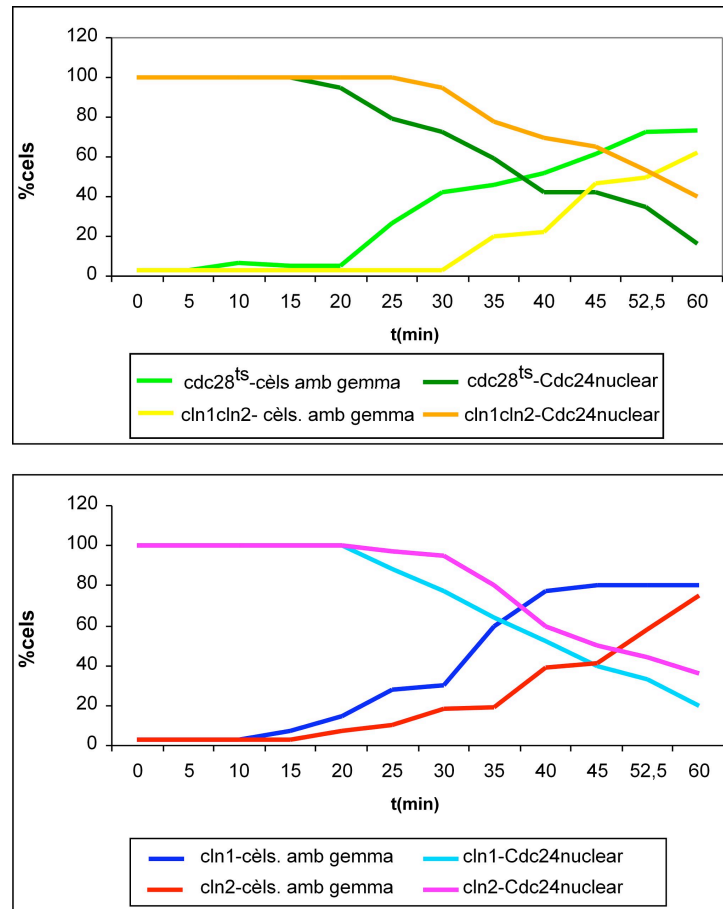
B

FIGURA 5.1. Anàlisi de l'eixida del nucli de Cdc24 en la soca *cdc28^{ts}* i en els mutants *cdc28^{ts}cln1*, *cdc28^{ts}cln2* i *cdc28^{ts}cln1cln2*. A. Cultius en fase de creixement exponencial de soques *cdc28^{ts}CDC24-HA* (JCY1049), *cdc28^{ts}clncln2CDC24-HA* (JCY1055), *cdc28^{ts}cln1CDC24-HA* (JCY1051) i *cdc28^{ts}cln2CDC24-HA* (JCY1053) s'incubaren durant 3h a 37°C per aconseguir la parada en G1 i després foren alliberats incubant-los a 25°C. Es van prendre mostres cada 5min durant 1hora i es van analitzar per immunofluorescència indirecta. Es presenten com a exemple les imatges més representatives de la soca *cdc28^{ts} CDC24-HA*. Es mostren imatges de DIC, tinció del DNA amb DAPI i senyal corresponent a Cdc24-HA. B. Recompte del percentatge de cèl.lules en gemmació i amb senyal nuclear de Cdc24-HA de les mostres descrites en A. Es van realitzar recomptes cada 5min durant 1hora d'almenys 100 cèl.lules per punt i cultiu.

Calia llavors respondre a si es devia el retràs en gemmació al retràs en l'eixida del nucli de Cdc24. Es va dissenyar un nou experiment idèntic a l'anterior en què la localització de Cdc24 fóra citosòlica per determinar si continuava o no existint un retràs en gemmació en el mutant *cln2* quan no era necessària l'exportació de Cdc24.

El retràs en gemmació que s'observa en el mutant *cln2* és independent del defecte en l'eixida del nucli de Cdc24.

Estava descrit que en absència d'interacció entre Far1 i Cdc24, la localització de Cdc24 era principalment citosòlica (Butty *et al.*, 1998) i s'havia determinat que el domini d'interacció de Far1 amb Cdc24 es trobava entre els aminoàcids 756-831 (Shimada *et al.*, 2000). Per això es van obtenir soques amb una versió truncada de Far1 incapaç d'interaccionar amb Cdc24 en les quals s'esperava que Cdc24 es localitzara en el citosol. Així que es van construir les soques *cdc28^{ts} cln1 FAR1¹⁻⁷⁵⁶* i *cdc28^{ts} cln2 FAR1¹⁻⁷⁵⁶* i es va realitzar la mateixa comparació descrita en l'apartat anterior. Com es pot veure en la Figura 5.2 A, ja a temps 0, punt en què les cèl.lules es troben parades en G1, el senyal de Cdc24-HA era totalment citosòlic i es podia observar fins i tot exclusió nuclear de dit senyal. La limitació per al procés de gemmació pel que respectava a l'eixida del nucli de Cdc24 havia desaparegut. La pregunta que quedava per respondre era si es mantenia el retràs en gemmació del mutant *cln2* respecte al mutant *cln1*. Es pot comprovar observant els gràfics com el retràs en gemmació es manté en el mutant *cln2* encara que Cdc24 es localitzi en el citosol (Figura 5.2 B). Per tant el retràs no es deu al retràs en l'eixida del nucli de Cdc24 sinó a una actuació de Cln2 que probablement és simultània a esta eixida i que pot tindre com a diana a Cdc24 o a un altra o altres proteïnes relacionades amb gemmació.

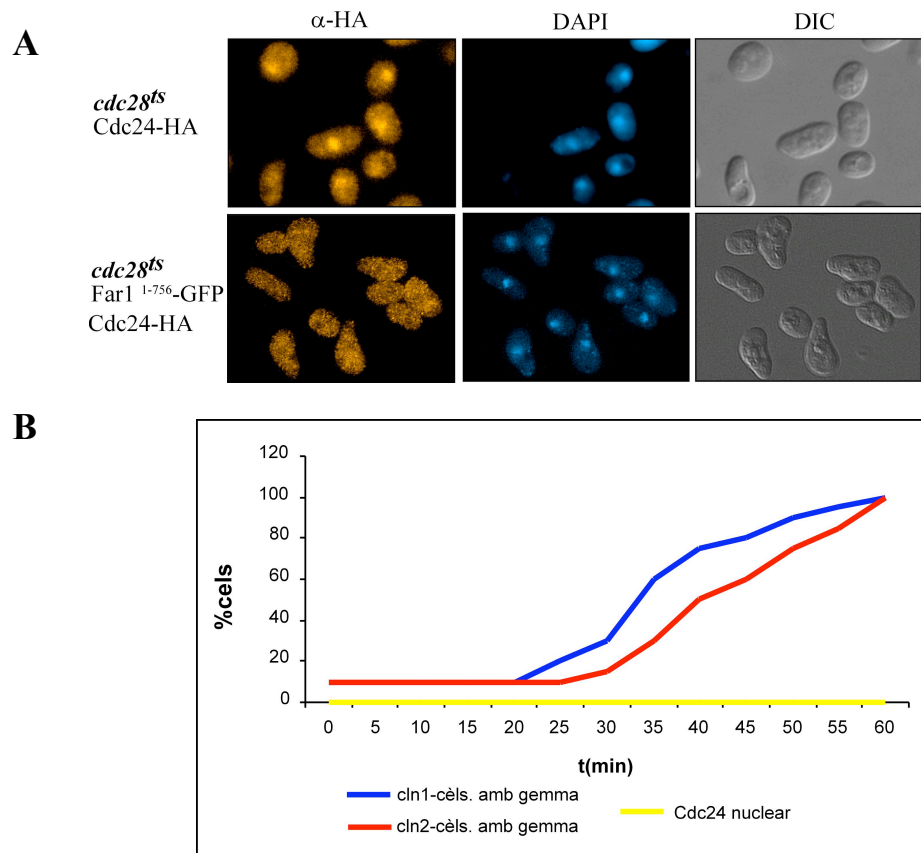


FIGURA 5.2. Anàlisi de l'eixida del nucli de Cdc24 en els mutants *cln1* i *cln2* en presència de la versió truncada Far1¹⁻⁷⁵⁶. **A.** Cèl.lules en fase de creixement exponencial de la soca *cdc28^{ts} CDC24-HA* (JCY1049) i *cdc28^{ts} CDC24-HA FAR1¹⁻⁷⁵⁶-GFP* es van analitzar per immunofluorescència indirecta. Els cultius s'incubaren durant 3h a 37°C per aconseguir la parada en G1 i després foren alliberats incubant-los a 25°C. Es presenta el temps=0min. Es mostren imatges de DIC, tinció del DNA amb DAPI i senyal corresponent a Cdc24-HA (anti-HA). **B.** Recompte del percentatge de cèl.lules en gemmació i amb senyal nuclear de Cdc24-HA en cultius en creixement exponencial de soques *cdc28^{ts} cln1 CDC24-HA FAR1¹⁻⁷⁵⁶-GFP* (JCY1530) i *cdc28^{ts} cln2 CDC24-HA FAR1¹⁻⁷⁵⁶-GFP* (JCY1531). Els cultius s'incubaren durant 3h a 37°C per aconseguir la parada en G1 i després foren alliberats incubant-los a 25°C. Es van realitzar recomptes cada 5min durant 1hora d'almenys 100 cèl.lules per punt i cultiu.

REGULACIÓ ESPACIAL DE Cdc24

El paper de Cdc24 en el procés de gemmació implica un mecanisme ja descrit (Shimada *et al.*, 2000) de regulació espacial: durant la fase G1, Cdc24 es troba segregada en el nucli per l'inhibidor Far1 i, quan s'executa Start, és alliberada per poder eixir al citoplasma on activarà a Cdc42 per desencadenar la gemmació. Aquest procés implica l'entrada i l'eixida del nucli de Cdc24. No obstant, no s'han descrit senyals de localització ni carioferines implicades en el transport de Cdc24.

Vies d'importació i exportació de Cdc24

Dins de la descripció de la regulació espacial de Cdc24, ja que es disposava de la col·lecció completa de mutants en carioferines, el primer objectiu va ser descriure les carioferines implicades en el seu transport. Es va analitzar la localització de Cdc24 tant en cultius *in vivo* com per immunofluorescència indirecta en tots els mutants en carioferines (resultats no mostrats). En tots els mutants es va observar senyal nuclear corresponent a Cdc24 en G1 i telofase excepte en els mutants *tetO₇:KAP95* i *tetO₇:CSE1* en presència de doxyciclina, en els quals no s'observava senyal nuclear en cap fase del cicle cel·lular (Figura 5.3). Aquest resultat apuntava a que la via clàssica d'importació participava en la importació de Cdc24.

En la cerca de l'exportina de Cdc24 calia esperar que quan l'exportina no estiguera present es produïra una acumulació nuclear de Cdc24 fora de la fase G1 i telofase. En el mutant *tetO₇:XPO1*, que en presència de doxyciclina deixava d'expressar Xpo1, es va detectar una clara acumulació de Cdc24 en el nucli. Degut a que el mutant *tetO₇:XPO1* presenta una acumulació de cèl·lules en G1 es feia difícil determinar si existia realment un defecte en l'eixida del nucli de Cdc24. Per tal d'aclarir la participació d'Xpo1 en l'exportació de Cdc24 calia una condició en què Cdc24 fóra citosòlic durant G1, llavors es podria inactivar Xpo1 i veure si Cdc24 s'acumulava o no en el nucli. Es va recurrir a treballar en un fons *far1*, en el qual Cdc24 es localitza en el citosol durant tot el cicle cel·lular. Es va construir la soca *tetO₇:XPO1 far1 CDC24-HA* i es va analitzar la

localització de Cdc24. Com calia esperar en el doble mutant *tetO₇:XPO1 far1* s'observa una localització citosòlica de Cdc24 mentre que quan s'afegeix al medi doxyciclina s'observava un clar senyal nuclear per a Cdc24 (Figura 5.4). D'açò es pot interpretar que Xpo1 es requereix per a exportar Cdc24.

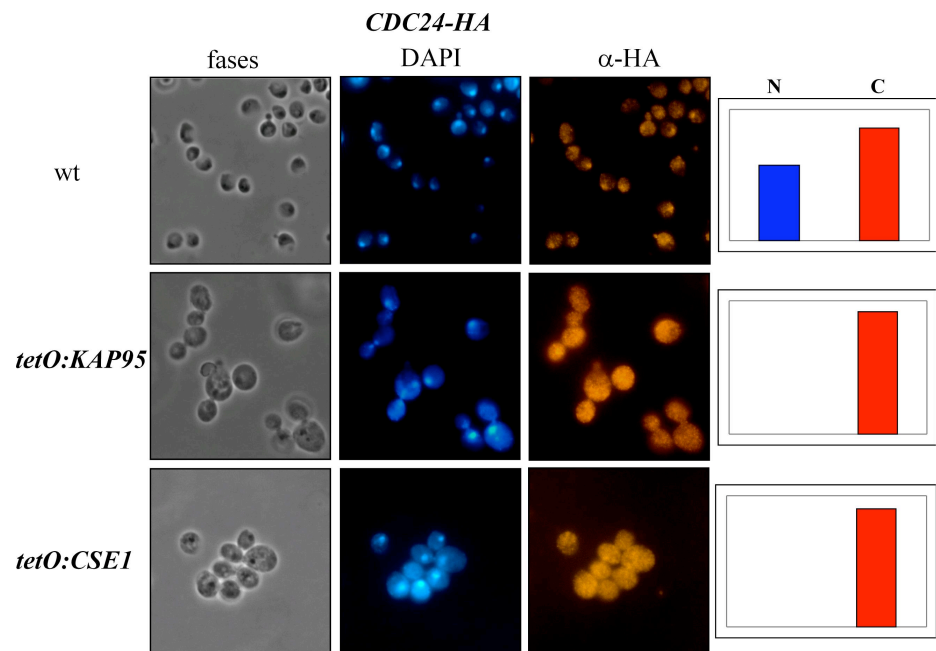


FIGURA 5.3. Anàlisi de la importació de Cdc24 per la via clàssica d'importació. Cultius en fase de creixement exponencial de les soques W303 *CDC24-HA* (JCY1071), *tetO₇:KAP95 CDC24-HA* (JCY943) i *tetO₇:CSE1 CDC24-HA* (JCY945) s'incubaren durant 8h amb Doxyciclina 0'5µg/mL i es van analitzar per immunofluorescència indirecta. Es mostren imatges de DIC, tinció del DNA amb DAPI i senyal corresponent a Cdc24-HA. Els gràfics mostren la quantificació del percentatge de cèl.lules que presenten senyal nuclear (N) o citosòlic (C).

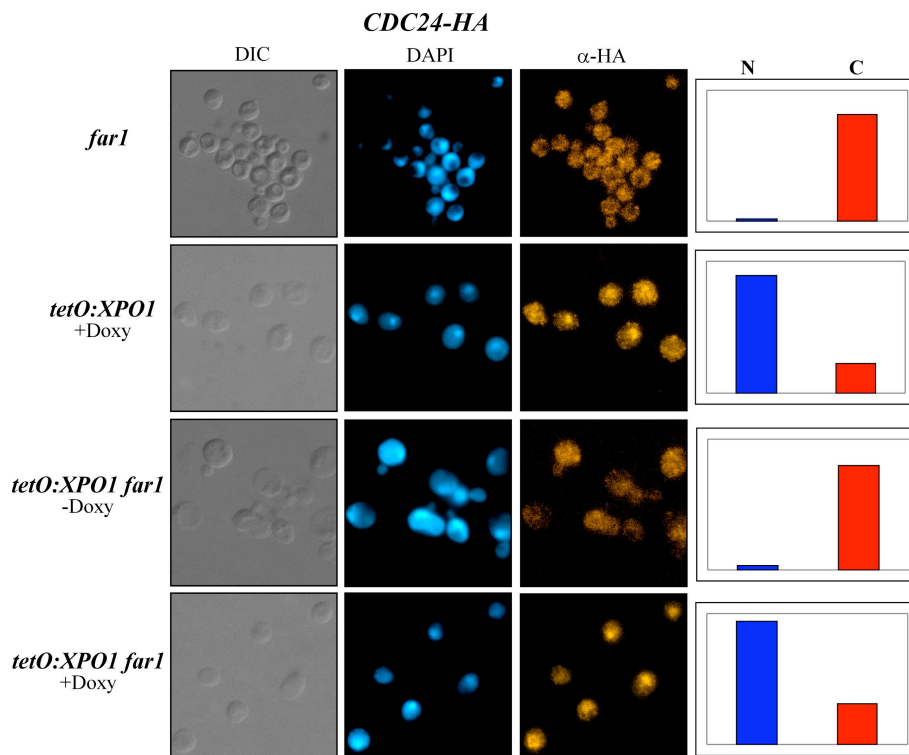


FIGURA 5.4. Anàlisi de l'exportació de Cdc24 per la carioferina Xpo1. Cèl.lules en fase de creixement exponencial de les soques *far1 CDC24-HA* (JCY1072), *tetO₇::XPO1 CDC24-HA* (JCY947) i *tetO::XPO1₇far1 CDC24-HA* (JCY1106) s'incubaren sense i amb Doxyciclina 5µg/mL durant 8 hores i van ser analitzades per immunofluorescència indirecta. Es mostren imatges de DIC, tinció del DNA amb DAPI i senyal corresponent a Cdc24-HA. Els gràfics mostren la quantificació del percentatge de cèl.lules que presenten senyal nuclear (N) o citosòlic (C).

En resum, s'han identificat les carioferines implicades en el transport de Cdc24. En la importació participen Kap95-Kap60 i Cse1, components de la via clàssica d'importació (no s'ha analitzat Kap60 però el fet de que calga la presència de la seua exportina Cse1 fa evident que Kap60 deu estar implicada en el transport de Cdc24) i en l'exportació participa Xpo1.

El següent pas era caracteritzar els senyals de localització reconeguts per aquestes carioferines.

Senyals de localització nuclear (NLS) i exportació (NES) en Cdc24

Es va començar a rastrejar els possibles senyals de localització recorrent a programes informàtics de predicció. Aquests programes prediuen l'existència d'NLS clàssics o NES rics en leucines, ja que són els senyals més estudiats. La predicció resultava útil ja que aquests senyals són els que habitualment reconeixen les carioferines que s'havien identificat. Existia un possible NES (propi de Xpo1) entre els aminoàcids 57-67 i un possible NLS monopartit clàssic (reconegut per la via clàssica d'importació) entre els aminoàcids 733-741. Un posterior rastreig manual va conduir a identificar un possible NLS bipartit entre els aminoàcids 524-538. Es va decidir testar tots aquests senyals.

MAIQTRFASGTSLSDLKPKPSATSISIPMQNVMNKPVTEQDSLFIHICANIRKR**LEVL****PQ**
LKPFLQLAYQSSEVLSEKQSLLSQKQHQELLKSNGANRDSSDLAPTLRSSSISTATSL
 MSMEGISYTNNSNPATPNMEDTLLTFSMGILPITMDCDPVTQLSOLFQQGAPLCILFNS
 VKPQFKLPVIASDDLKVCCKSIYDFILGCKKHFAFNDEELFTISDVFANSTSQLVKVLE
 VVETLMNSSPTIFPSKSKTQQIMNAENQHRHQPOQSSKKHNEYVKIIEFVATERKYV
 HDLEILDKYRQQLDSNLITSEELYMLFPNLGDAIDFQRRFLISLEINALVEPSKQRIGA
 LFMHSHKHFYEPWSIGQNAIEFLSSTLHKMRVDESQRFIINNKLELQSFYKPVQR
 LCRYPLLVKELLAESSDDNNTKELEAALDISKNIARSINENQRRTENHQVVKLYGRV
 VNWKGYRISKFGELLYFDKVFISTTNSSEPEREFVYLFEKIILFSEVVT**KKSASSLIL**
KKKSSTSASISASNITDNGSPHHSYHKRHSNSSSNNIHLSSSSAAAIHSSTNSSDNN
 SNNSSSSSLFKLSANEPKLDLRGRIMIMNLNQIIPQNNRSLNITWESIKEQGNFLLKFN
 EETRDNWSSCLQLIHDLKNEQFKARHHSSTSTSTAKSSMMSPTTTTMNTPNHHN
 SRQTHDSMASFSSSHMKRVSDVL**PKRRRTSSS**FESEIKSISENFKNSIPESILFRISYNN
 NSNNTSSSEIFTLLVEKVWNFDDLIMAINSKISNTHNNNISPITKIKYQDEDGDFVVLGS
 DEDWNVAKEMLAENNEKFLNIRLY*

FIGURA 5.5. Senyals de localització predites sobre la seqüència de Cdc24:

NES **NLS1** y **NLS2**.

Per testar el NES es va emprar el sistema ja descrit en el capítol 3 de plasmidis amb promotor *ADHI*, NLS de SV-40 i 4GFPs. El resultat que es va obtenir es mostra en la Figura 5.6. Mentre que el senyal era nuclear en les cèl·lules d'una soca silvestre transformades amb el plasmidi control *pNLS^{SV-40}-GFP₄*, passava a ser totalment citosòlic quan es fusionava a les 4GFPs el putatiu NES de Cdc24 (aminoàcids 1-70) en el plasmidi *pNLS^{SV-40}-Cdc24¹⁻⁷⁰-GFP₄*. Tanmateix quan s'observava la localització de la fusió en un mutant *tetO₇:XPO1* en presència de doxyciclina el senyal tornava a ser nuclear. Aquests resultats eren consistents amb l'existència d'un NES entre els aminoàcids 1-70 de Cdc24 que es reconegut per Xpo1.

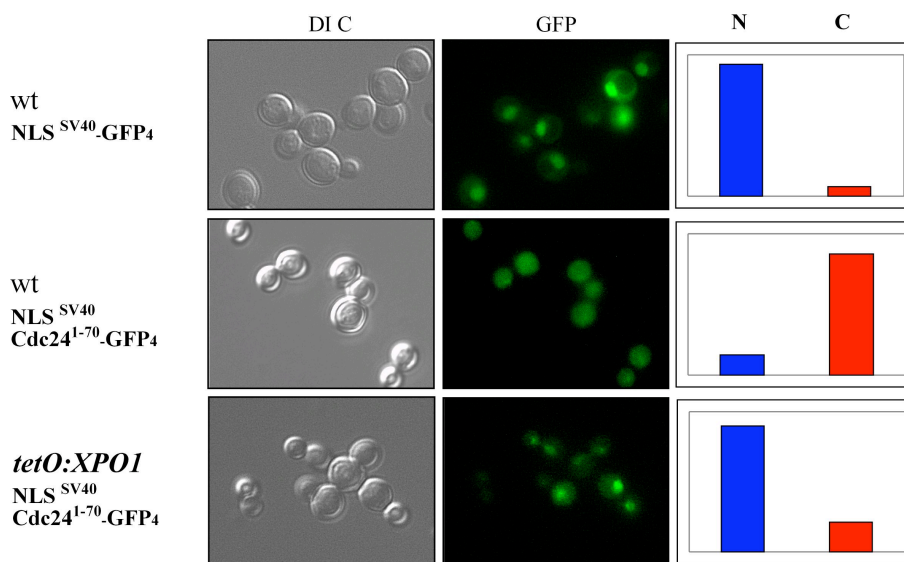


FIGURA 5.6. Anàlisi de la participació de la regió dels aminoàcids 1 al 70 de Cdc24 en l'exportació de la proteïna. Cèl·lules procedents de cultius en fase exponencial de soques W303 i *tetO₇:XPO1* (JCY978) transformades amb els plasmidis *pNLS^{SV-40}-GFP₄* i *pNLS^{SV-40}-Cdc24¹⁻⁷⁰-GFP₄* s'incubaren durant 8h amb Doxyciclina 0'5µg/mL i van ser observades al microscopi de fluorescència. Es mostren les imatges DIC i GFP. Els gràfics mostren la quantificació del percentatge de cèl·lules que presenten senyal nuclear (N) o citosòlic (C).

Per testar els putatius NLS es va decidir expressar diferents versions truncades de Cdc24 etiquetades amb HA i analitzar la seua localització per immunofluorescència indirecta. Així es van obtenir dues versions truncades de Cdc24 eliminant regions creixents per C-terminal, expressades sota el control del promotor propi de Cdc24: Cdc24¹⁻⁷³⁰-HA i Cdc24¹⁻⁴⁹⁹-HA. Es van incubar els cultius amb factor α per acumular les cèl.lules en G1, punt del cicle on ja s'ha descrit que Cdc24 és nuclear, i facilitar la detecció de canvis en la localització de la proteïna. Cabia la possibilitat de què la presència de factor α en el medi provocara l'eixida de Cdc24 al citosol però com es pot veure en la Figura 5.7 la proteïna completa amb el temps d'incubació emprat en l'experiment (que és de 3 hores) apareixia acumulada totalment en el nucli. La versió de Cdc24 en què s'havien eliminat els aminoàcids del 731 al 854, regió que inclou l'NLS monopartit trobat en la

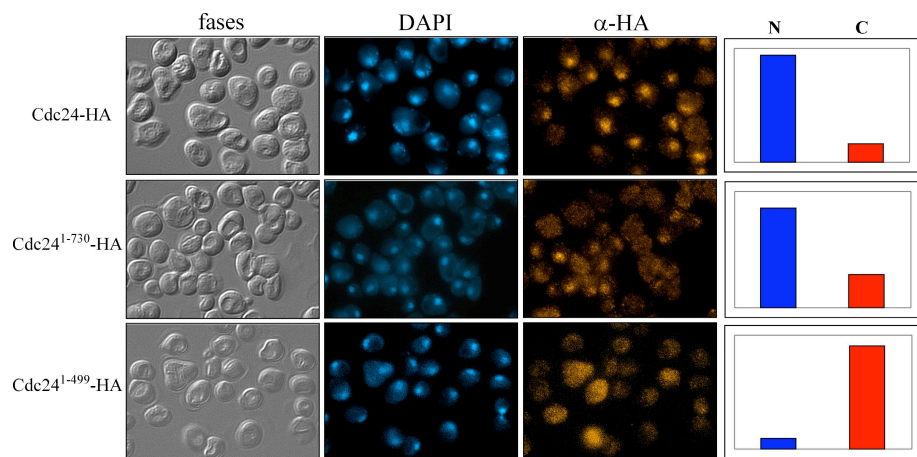


FIGURA 5.7. Anàlisi de la localització de versions truncades en C-terminal de Cdc24. Cèl.lules procedents de cultius en fase exponencial de les soques CDC24-HA (JCY1071), *CDC24¹⁻⁷³⁰-HA* (JCY1524) i *CDC24¹⁻⁴⁹⁹-HA* (JCY1526) es van fixar i analitzar per immunofluorescència indirecta. Els cultius van incubar-se durant 3h amb factor α per acumular les cèl.lules en fase G1. Es mostren imatges de DIC, tinció del DNA amb DAPI i senyal corresponent a Cdc24-HA. Els gràfics mostren la quantificació del percentatge de cèl.lules que presenten senyal nuclear (N) o citosòlic (C).

predicció, mostrava una localització menys nuclear que la proteïna completa però es continuaven veient nuclis clars, per tant Cdc24 encara podia ser importada al nucli. Tanmateix quan s'observava la versió de Cdc24 en què s'havien eliminat els aminoàcids fins al 500, desapareixia totalment el senyal nuclear (Figura 5.7). En aquest cas s'havia eliminat també el putatiu NLS bipartit que s'havia identificat. Per tant, Cdc24 podria contindre dos NLS clàssics redundants que serian reconeguts per la via clàssica d'importació i que es trobarien entre els aminoàcids 500-730 i 731-854.

Per tal d'establir la dependència real de la localització de Cdc24 dels senyals identificats el següent pas va consistir en mutar tant el NES com els NLS en la proteïna completa per mutagènesi dirigida en el plasmidi *CYC-CDC24-GFP*. En el cas del NES van mutar-se les leucines de la seqüència i en el cas dels NLS van mutar-se residus bàsics. En les taules 5.1 i 5.2 es mostren totes les versions mutants de Cdc24 que es van obtindre.

Taula 5.1

Proteïna	Seqüències NLS de Cdc24	
	NLS1	NLS2
Cdc24	KKSASSLILK ₅₃₃ K ₅₃₄ K ₅₃₅ SST	PK ₇₃₄ R ₇₃₅ R ₇₃₆ TTSSS
Cdc24 ^{NLS1-1A}	KKSASSLIL A ₅₃₃ K ₅₃₄ K ₅₃₅ SST	PK ₇₃₄ R ₇₃₅ R ₇₃₆ TTSSS
Cdc24 ^{NLS1-3A}	KKSASSLIL A ₅₃₃ A ₅₃₄ A ₅₃₅ SST	PK ₇₃₄ R ₇₃₅ R ₇₃₆ TTSSS
Cdc24 ^{NLS2-1A}	KKSASSLILK ₅₃₃ K ₅₃₄ K ₅₃₅ SST	PA ₇₃₄ R ₇₃₅ R ₇₃₆ TTSSS
Cdc24 ^{NLS2-3A}	KKSASSLILK ₅₃₃ K ₅₃₄ K ₅₃₅ SST	PA ₇₃₄ A ₇₃₅ A ₇₃₆ TTSSS
Cdc24 ^{NLS1-1A NLS2-1A}	KKSASSLIL A ₅₃₃ K ₅₃₄ K ₅₃₅ SST	PA ₇₃₄ R ₇₃₅ R ₇₃₆ TTSSS
Cdc24 ^{NLS1-3A NLS2-1A}	KKSASSLIL A ₅₃₃ A ₅₃₄ A ₅₃₅ SST	PA ₇₃₄ R ₇₃₅ R ₇₃₆ TTSSS
Cdc24 ^{NLS1-1A NLS2-3A}	KKSASSLIL A ₅₃₃ K ₅₃₄ K ₅₃₅ SST	PA ₇₃₄ A ₇₃₅ A ₇₃₆ TTSSS
Cdc24 ^{NLS1-3A NLS2-3A}	KKSASSLIL A ₅₃₃ A ₅₃₄ A ₅₃₅ SST	PA ₇₃₄ A ₇₃₅ A ₇₃₆ TTSSS

Taula 5.2

Proteïna	Seqüència NES de Cdc24
Cdc24	L ₅₄ EVL ₅₇ PQL ₆₀ KPFL ₆₄ QLA
Cdc24 ^{NES-1A}	L ₅₄ EVL ₅₇ PQL ₆₀ KPFA ₆₄ QLA
Cdc24 ^{NES-2A}	L ₅₄ EVL ₅₇ PQA ₆₀ KPFA ₆₄ QLA
Cdc24 ^{NES-3A}	A ₅₄ EVL ₅₇ PQA ₆₀ KPFA ₆₄ QLA
Cdc24 ^{NES-4A}	A ₅₄ EVA ₅₇ PQA ₆₀ KPFA ₆₄ QLA

Per a totes les versions mutants de Cdc24 es va analitzar la funcionalitat de la proteïna estudiant la viabilitat d'un mutant *GALI::CDC24* en presència de glucosa en introduir les versions mutants de Cdc24, el nivell de proteïna i la seua localització.

En el cas dels mutants en NLS tots els mutants analitzats són viables, o el que és el mateix, totes les Cdc24 mutants són funcionals, fins i tot el mutant que presenta tres residus mutats en cada NLS (Cdc24^{NLS1-3A NLS2-3A}). El nivell de proteïna no varia significativament en els distints mutants. Sorprenentment, la localització de totes les versions mutants és la mateixa que la de la soca silvestre. Per tant, la introducció de mutacions en els residus indicats dels putatius NLSs no provoca cap efecte observable (Resultats no mostrats).

Pel que respecta als mutants en el NES els resultats són més complexos. Les cèl.lules que expressen la proteïna Cdc24^{NES-1A} o Cdc24^{NES-2A} són viables. Així que els canvis de residu en la posició 60 i 64 de Cdc24 no afecten a la seua funcionalitat. Tanmateix, les cèl.lules que expressen la proteïna Cdc24^{NES-3A} mostren un defecte important de creixement. Aquest efecte s'accentua en les cèl.lules que expressen Cdc24^{NES-4} que són inviables (Figura 5.8). Per tant, Cdc24 no és funcional quan es muten les leucines 54, 57, 60 i 64. En els mutants analitzats es detecten nivells significatius de proteïna (resultats no mostrats). Per tant, la pèrdua de viabilitat que presenten els mutants Cdc24^{NES-3A} i Cdc24^{NES-4A} no es deu a un defecte en l'expressió sinó a la substitució de leucines per alanines. Aquest resultat podria deure's a que el canvi d'aquests residus podria estar afectant el NES

de Cdc24 i amb ell l'exportació de la proteïna, encara que no es poden descartar altres explicacions. La localització subcel·lular de Cdc24, com ja s'ha descrit, és nuclear al final de la fase M i durant la fase G1 fins que s'ejecuta Start. Aquesta localització no presenta variacions en els mutants Cdc24^{NES-1A} i Cdc24^{NES-2A}. Els canvis en els residus 60 i 64 per si mateixos no pareixen afectar el putatiu NES. Tanmateix, en els mutants Cdc24^{NES-3A} i Cdc24^{NES-4A} la localització es citosòlica en totes les fases del cicle cel·lular (Figura 5.9). Aquest resultat és realment sorprenent, ja que la inactivació d'un possible NES en Cdc24 era esperable que provocara la seua acumulació en el nucli i no una distribució citosòlica. En base als resultats obtinguts, es pot concloure que les leucines 54, 57, 60 i 64 són essencials per a la funcionalitat de Cdc24, tanmateix, no es pot afirmar que la regió entre els aminoàcids 54-66 de Cdc24 siga necessària per a l'exportació de Cdc24 en el context de la proteïna completa.

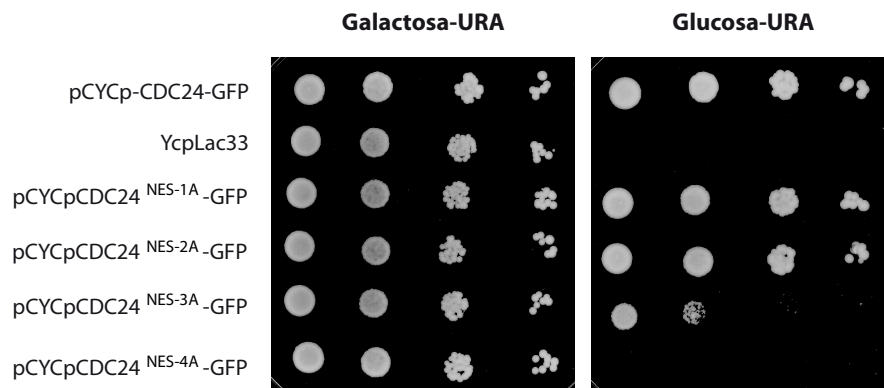


FIGURA 5.8. Anàlisi de la funcionalitat dels mutants en el putatiu NES de Cdc24. Dilucions seriades de cultius en fase exponencial de creixement de la soca *GALI: CDC24* (JCY1520) transformada amb els plasmidis pCYCp-CDC24-GFP, pCYCp-CDC24^{NES1A}-GFP, pCYCp-CDC24^{NES2A}-GFP, pCYCp-CDC24^{NES3A}-GFP, pCYCp-CDC24^{NES4A}-GFP o el vector YcpLac33, es van sembrar en plaques de medi mínim SGal-URA i SD-URA, i es van incubar a 28°C durant 2 dies.

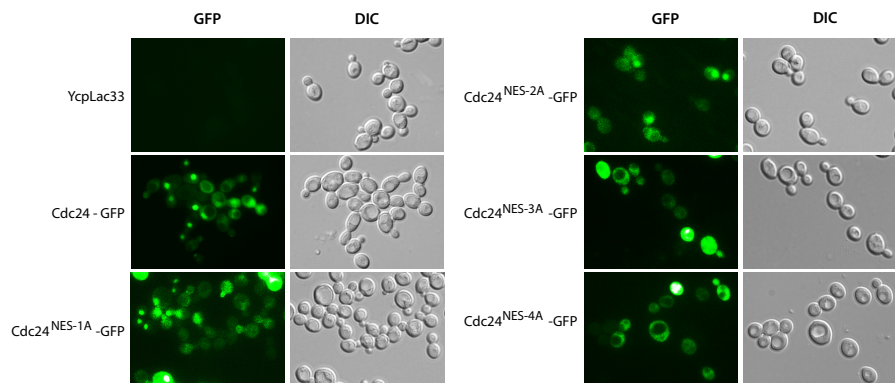


FIGURA 5.9. Localització subcel·lular de les versions mutants en el putatiu NES de Cdc24. Cèl·lules en fase de creixement exponencial de la soca W303 transformada amb els plasmidis $pCYC_P-CDC24^{NES1A}-GFP$, $pCYC_P-CDC24^{NES2A}-GFP$, $pCYC_P-CDC24^{NES3A}-GFP$, $pCYC_P-CDC24^{NES4A}-GFP$ o el vector YcpLac33 es van analitzar per observació de senyal GFP *in vivo*. Es mostren imatges DIC i del senyal GFP.

DISCUSSIÓ

Cdc24 és la GEF (factor intercanviador de guanines) de Cdc42, GTPasa clau en el procés de polarització de la gemma durant la gemmació. S'ha descrit ampliament que la seua actuació és clau durant la gemmació i que la seua activitat està sotmesa a un mecanisme de regulació espacial. No obstant, res es coneixia sobre els transportadors o els senyals implicats en aquesta regulació.

En aquest capítol hem identificat les carioferines responsables del transport de Cdc24: és importada al nucli per la via clàssica d'importació i exportada per Xpo1. El fet que la via clàssica actue en la importació de la maquinària transcripcional d'Start (Taberner i Igual, 2010), de les ciclines Cln1 i Cln2 i també de Cdc24 assegura que tots els principals efectors que assegurin un correcte pas per Start siguin regulats per una mateixa via de transport.

Un dubte que romania en la bibliografia era si l'inhibidor Far1 participava en la importació de Cdc24. A la vista dels resultats presentats es pot respondre que no és necessari ni per a la importació ni per a l'exportació de la proteïna. El disseny experimental emprat per analitzar la participació de Xpo1 en l'exportació de Cdc24 asumia que Cdc24 entrava al nucli no assistida per Far1 com a intermediari, perquè si, com altres autors havien proposat, calia Far1 per a la importació de Cdc24 no es podria veure acumulació nuclear de Cdc24, fóra o no Xpo1 l'exportina. El fet de veure acumulació nuclear de Cdc24 en el mutant *tetO₇:XPO1 far1* permet concluir que Cdc24 és importada al nucli sense cap necessitat d'assistència per part de Far1. La localització citosòlica de Cdc24 en un mutant *far1* es deu a una absència de segrest en el nucli i no a un impediment en la importació.

Pel que respecta als senyals de localització presents en Cdc24 es van identificar tres possibles senyals diferents: un NES i dos NLS. Quan es van fusionar els aminoàcids de l'1 al 70 de Cdc24 (regió que contenia el putatiu NES) a GFP es va comprovar que eixa regió permetia l'exportació de GFP de forma depenent de Xpo1. Per caracteritzar millor eixe putatiu NES de Cdc24 es van obtindre distintes versions de Cdc24 mutades en diferents residus d'eixa regió. Els mutants que expressen Cdc24^{NES-3A} i Cdc24^{NES-4A} no són viables i la seua localització és citosòlica en totes les fases del cicle cel.lular. No es pot relacionar llavors la pèrdua de viabilitat amb un defecte en l'exportació. Poden existir diferents hipòtesis per explicar aquests resultats. Una explicació implica a Far1. Com s'ha comentat Far1 reté en el nucli a Cdc24 en la fase G1 (Gulli i Peter, 2001). La retenció nuclear de Cdc24 està mitjançada pel seu extrem N-terminal (aa 1-283) (Toenjens *et al.*, 1999). La localització citosòlica de Cdc24 podria indicar que s'ha mutat el lloc d'unió a Far1 en Cdc24 i per això no és retinguda en el nucli i és continuament exportada al citosol. En qualsevol cas aquesta hipòtesi asumeix que continua existint exportació de la proteïna malgrat mutar el possible NES. Potser aquestes versions mutants de Cdc24 no són funcionals perquè siga necessària la unió de Cdc24 a Far1 o la retenció de Cdc24 en el nucli per adquirir modificacions posttraduccionals clau en la funció de la proteïna Cdc24 com GEF. No obstant, un altra possible explicació a la localització

citoplasmàtica de Cdc24 seria que les versions mutants de Cdc24 podrien no plegar-se de forma correcta per assolir l'estructura terciària adequada per ser activa i el plegament incorrecte podria provocar un defecte en la importació.

D'altra banda es van analitzar els putatius NLSs de Cdc24 mitjançant versions truncades per C-terminal de la proteïna, la localització de les quals era consistent amb l'existència de NLSs en eixa regió C-terminal. Per caracteritzar els NLSs es van obtenir diferents versions de Cdc24 mutada en distints residus d'eixes regions. Totes les versions mutants de Cdc24 presentaven una localització subcel·lular similar a la Cdc24 silvestre. Considerant que fins i tot mutant tres lisines de la NLS1 i una lisina i dos arginines de la NLS2 de Cdc24 no s'observa cap defecte en la importació, no es pot afirmar que aquestes regions funcionen com NLS. No obstant es poden plantejar diferents explicacions. Es podia pensar que la proteïna silvestre present en la cèl·lula estiguera contribuint a la importació de les versions mutants de Cdc24 ja que s'ha descrit recentment que Cdc24 requereix la formació d'oligòmers per a ser importada (Mionnet *et al.*, 2008). Però aquesta hipòtesi es va descartar quan es van obtenir resultats idèntics als descrits en una sòca *GALI:CDC24* en presència de glucosa. També podria ser que malgrat tots els canvis de residu es mantinga la funció NLS o cap la possibilitat de que puguin existir altres NLSs en el fragment dels aminoàcids 500 al 854 de Cdc24, ja que quan es trunca aquest fragment és quan es produeix un defecte total en la importació de Cdc24. Una altra hipòtesi és que Cdc24 tinga un sistema alternatiu directe o indirecte (interaccionant amb altres proteïnes) per ser importada al nucli en cas de defecte dels NLS analitzats. En qualsevol cas, un treball futur extens podria ser necessari per arribar a caracteritzar els residus importants per a la correcta localització de Cdc24. Altres treballs que han utilitzat recentment una estratègia similar de mutagènesi dirigida amb Cdc24 per tal d'establir la importància dels llocs de fosforilació presents en la proteïna en la seua funcionalitat s'han trobat sorprenentment amb què amb més de 30 mutacions en llocs consens de fosforilació la funció de la proteïna no es veu afectada (Wai *et al.*, 2009). Tanmateix, estudis funcionals que empren mutants en diferents proteïnes del polarisoma destaquen la importància de la fosforilació

per a la correcta localització i funcionalitat de Cdc24 (Cole *et al.*, 2009). Per tant, potser que Cdc24 assegure la seua correcta funcionalitat mitjançant diferents estratègies ja que la seua participació en el procés de gemmació és essencial per a la correcta progressió del cicle cel·lular.

L'altra qüestió que es plantejava era descriure el paper que representava Cdc24 en la funcionalitat específica de Cln2. Si d'una banda s'ha vist que en el mutant *cln2* existeix un retràs en l'eixida de Cdc24 que coincideix en el temps amb el retràs observable en el procés de gemmació, d'altra banda s'ha comprovat que si es situa ja durant G1 a Cdc24 en el citosol el retràs en gemmació es manté evidenciant que el retràs en l'eixida de Cdc24 no és el responsable del retràs en gemmació. Amb els resultats presentats podria completar-se el model que s'ha descrit en el capítol 3 (Figura 3.26): a més de Cln1 i Cln2, Cdc24 és importada al nucli per la via clàssica d'importació en la qual participen Kap95 i Kap60. La primera funció en gemmació a realitzar per part dels complexos Cdc28-Cln1 i Cdc28-Cln2 en el nucli és la fosforilació de l'inhibidor Far1 que actua segregant a Cdc24. Una vegada fosforilat Far1, Cdc24 és exportada al citosol per Xpo1 i es dirigeix al lloc de polarització de la gemma. Cln2 és més eficient que Cln1 facilitant l'exportació de Cdc24. Llavors Cln2, però no Cln1, o el complex Cdc28-Cln2 però no el complex Cdc28-Cln1, és exportat per la carioferina Msn5. Una vegada en el citosol el complex Cdc28-Cln2 actuaria fosforilant diferents proteïnes que formen part del polarisoma. El retràs en gemmació observable quan Cdc24 ja està al citosol es deurà probablement a que fins que Cln2 no és exportada al citosol i fosforila els diferents components del polarisoma no s'inicia la gemmació. No s'ha definit si la interacció entre Cln2 i Msn5 roman al citosol o si el complex es dissocia ràpidament. Msn5 exporta el complex Far1-Cdc24 durant la conjugació i actua interaccionant amb la maquinària de polarització (Blondel *et al.*, 1999). Potser durant la gemmació actua d'igual manera i afavoreix la interacció del complex Cdc28-Cln2 amb algun dels seus substrats fosforilables. El paper com a simple carioferina o també com a intermediari en interaccions claus per a la gemmació haurà d'esclarir-se en futurs experiments.

6. Caracterització dels mutants en carioferines

El treball dels darrers anys del nostre laboratori havia comprés l'estudi de diferents reguladors implicats en mecanismes de regulació espacial del cicle cel.lular. Per això es va decidir disposar d'una col.lecció de tots els mutants en carioferines de la família de la importina β . Es van adquirir d'*EUROSCARF* tots els que presentaven mutacions viables (9 dels 14 totals): *kap104*, *kap108*, *kap114*, *kap119*, *kap120*, *kap122*, *kap123*, *msn5* i *los1*. Es van construir els 5 restants, que en ser mutants per a carioferines essencials, expressaven els gens de les carioferines sota el control del promotor *tetO₇* que es reprimeix en presència de doxyciclina. Es tractava de: *tetO₇:KAP95*, *tetO₇:CSE1*, *tetO₇:XPO1*, *tetO₇:PSE1* i *tetO₇:MTR10*. En la Figura 6.1 es pot observar el creixement d'aquests mutants. Els mutants *tetO₇:KAP95*, *tetO₇:CSE1*, i *tetO₇:XPO1*, no eren capaços de créixer en presència de doxyciclina a una concentració de 5 μ g/mL. Els mutants *tetO₇:PSE1* i *tetO₇:MTR10* presenten un creixement afectat en presència de doxyciclina a una concentració de 10 μ g/mL, encara que són capaços de créixer. Es de suposar que la dosi en què s'expressen les proteïnes en presència de doxyciclina és suficient per a mantindre la viabilitat d'aquests mutants.

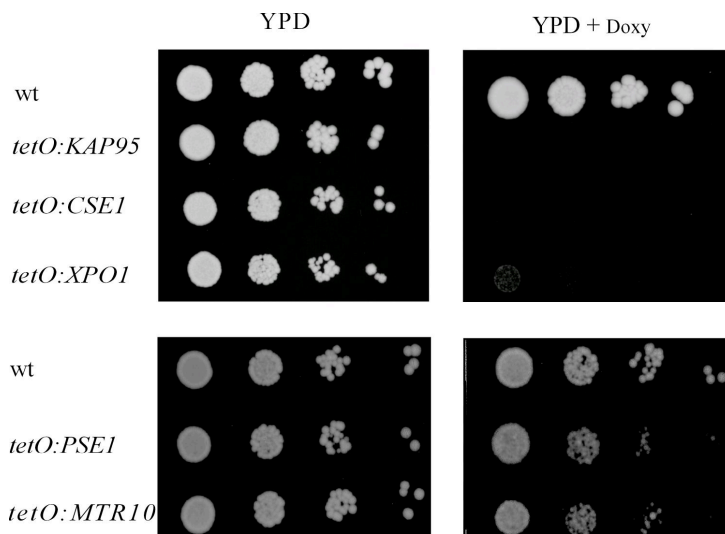


FIGURA 6.1. Creixement dels mutants en carioferines essencials. Els mutants en carioferines essencials presenten els gens de les carioferines sota el promotor *tetO₇* regulable per doxyciclina, les concentracions emprades van ser de 5µg/mL per a *tetO₇::KAP95* (JCY970), *tetO₇::CSE1*(JCY972) i *tetO₇::XPO1*(JCY978), i de 10µg/mL per a *tetO₇::PSE1*(JCY971) i *tetO₇::MTR10* (JCY976).

L'objectiu era caracteritzar tots els mutants en carioferines per tal de trobar fenotips relacionats amb defectes en el cicle cel.lular, de tal forma que es pogueren relacionar amb punts concrets del cicle, per obtindre possibles candidats per al nostre estudi o per d'altres futurs. La caracterització d'un mutant per saber si està implicat en el cicle cel.lular comprén: l'estudi del tamany cel.lular, ja que un augment de tamany pot implicar un enlentiment en el pas per Start i una disminució de tamany pot ser senyal d'un pas accelerat per aquest punt crític; l'anàlisi per citometria de fluxe del contingut de DNA, per veure possibles alteracions en replicació del DNA; el càlcul de l'índex de gemmació, que permet determinar una parada en G1 si s'observa que les cèl.lules no gemmen ; l'observació de la morfologia i l'observació dels nuclis tenyits amb DAPI per microscopia de fluorescència, que permet detectar problemes en la segregació dels cromosomes.

La caracterització dels mutants *kap108*, *kap114*, *kap120*, i *los1* va permetre concloure que es tracta de soques completament normals dins dels paràmetres estudiats ja que aquests mutants es comporten com la soca silvestre quan s'analitza el tamany cel.lular, el contingut de DNA, l'índex de gemmació o la morfologia cel.lular. Com a exemple es mostren els resultats del mutant *kap108* (Figura 6.2).

En el cas de *kap120* cal destacar un resultat complementari a la caracterització. Es conegut que la sobreexpressió de *CLN2* provoca una hiperpolarització cel.lular i així es pot observar en el cas de les soques silvestres BY4741 i W303. Però, en el cas de *kap120* no s'observa aquest fenotip d'hiperpolarització en les cèl.lules (Figura 6.3). Açò permet pensar que Kap120 es requereix per a la funció de Cln2 en polarització del creixement.

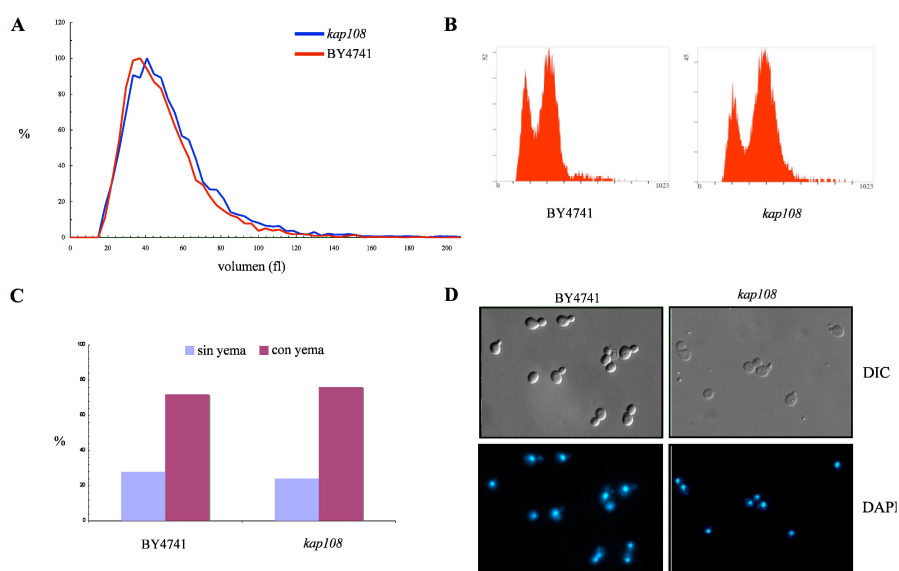


FIGURA 6.2. Caracterització del mutant *kap108* (JCY852). (A) Tamany cel.lular de la soca silvestre (roig) i de la soca mutant (blau). (B) Anàlisi per citometria de fluxe del contingut de DNA de la soca silvestre i de la soca mutant. (C) Càlcul de l'índex de gemmació de la soca silvestre i de la soca mutant. (D) Morfologia i tinció nuclear de la soca silvestre i de la soca mutant. Les tècniques emprades es descriuen en Materials i Mètodes.

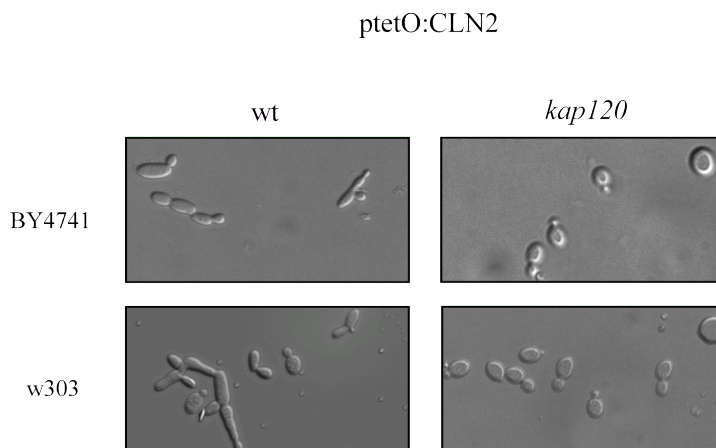


FIGURA 6.3. Efecte de la sobreexpressió de Cln2 en el mutant *kap120*. Morfologia de cèl.lules de les soques silvestres (BY4741 i W303) i les corresponents soques mutants *kap120* (JCY680 i JCY959 respectivament) en introduir el plasmidi *pCM250* que conté el gen *tetO₂:CLN2*.

Per a l'estudi del fenotip del mutant *kap104* es va construir el mutant *tetO₇:KAP104*, ja que encara que en principi no es tracta d'un gen essencial, la soca mutant per deleció presenta problemes greus de creixement. L'anàlisi d'aquesta soca (Figura 6.4) va revelar un augment clar de tamany, un augment del DNA no replicat, i un increment de cèl.lules sense gemma. Tots aquests resultats són consistents amb un defecte general d'Start.

Es va analitzar si la sobreexpressió o l'expressió ectòpica de la ciclina Cln2 era capaç de suprimir el defecte en Start del mutant *kap104*. Es va transformar el mutant amb un plasmidi multicopia que contenia el gen *CLN2* (*pCLN2*) o amb un plasmidi centromèric que expressa ectòpicament el gen *CLN2* sota el control del promotor *adh* de *S. pombe* (*padh:CLN2*). L'anàlisi de creixement en sectors va indicar que la introducció de cap dels dos plasmidis era capaç de recuperar el creixement de la soca *tetO₇:KAP104* respecte a la soca silvestre (dades no mostrades). Tanmateix, el càlcul de l'índex de gemmació va mostrar que en presència dels plasmidis amb el

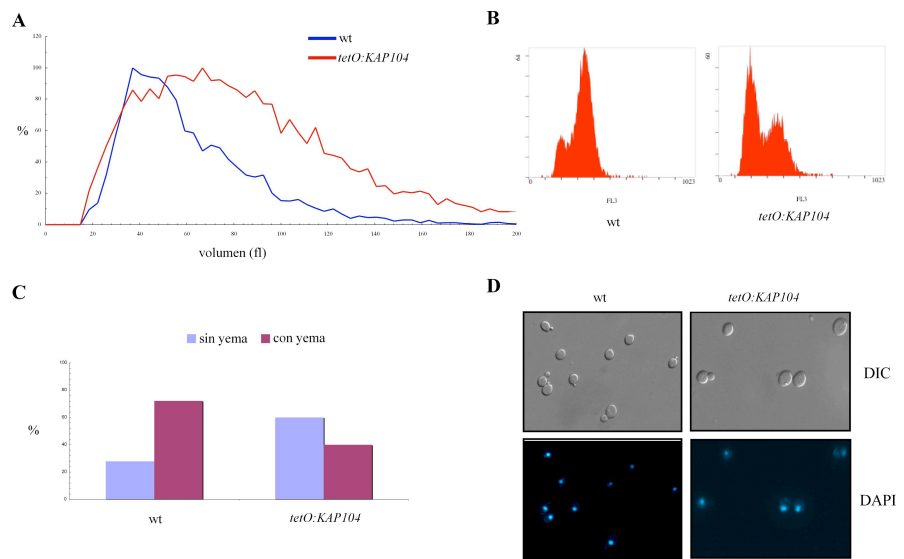


FIGURA 6.4. Caracterització del mutant *tetO7::kap104* (JCY1010). Veure peu de figura en Figura 6.2 (A) El color roig correspon a la soca mutant i el blau la soca salvatge.

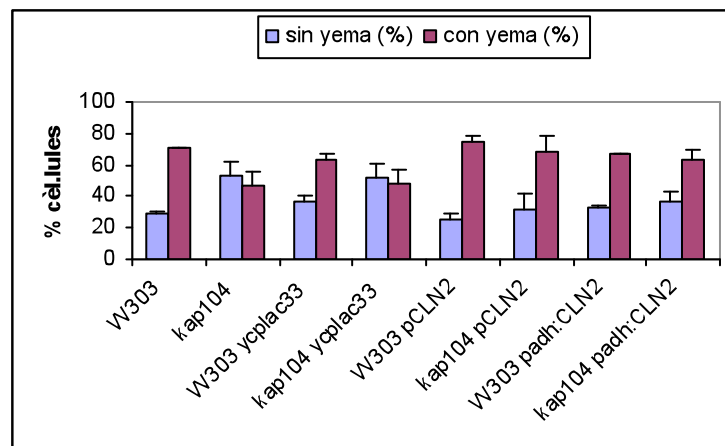


FIGURA 6.5. Efecte de la sobreexpressió de Cln2 en l'índex de gemmació del mutant *tetO7::KAP104*. Es va analitzar el percentatge de cèl·lules amb i sense gemma en cultius en fase exponencial de les soques W303 i *tetO7::KAP104* (JCY1010) transformades amb els plasmidis *Ycplac33*, *pCLN2* i *padh::CLN2* i tractats amb doxyciclina 5µg/mL o/n.

gen *CLN2* les cèl.lules mutants *kap104* presenten percentatges similars als observats per a la soca silvestre. Aquest resultat suggereix que una dosi major de la ciclina Cln2 es capaç de permetre a les cèl.lules mutants *kap104* superar el bloqueig en Start, però no és suficient per a suprimir el defecte en el creixement, el qual estaria relacionat amb defectes en altres processos essencials per a la viabilitat cel.lular (Figura 6.5).

El mutant *kap119* també va presentar un fenotip indicatiu d'un defecte en Start: es veia un fort increment del pic 1N en la citometria i un augment de les cèl.lules en G1 (cèl.lules sense gemma). També es caracteritza per una reducció del tamany cel.lular i una morfologia cel.lular allargada en alguns casos que suggereix l'existència de problemes de morfogènesi (Figura 6.6).

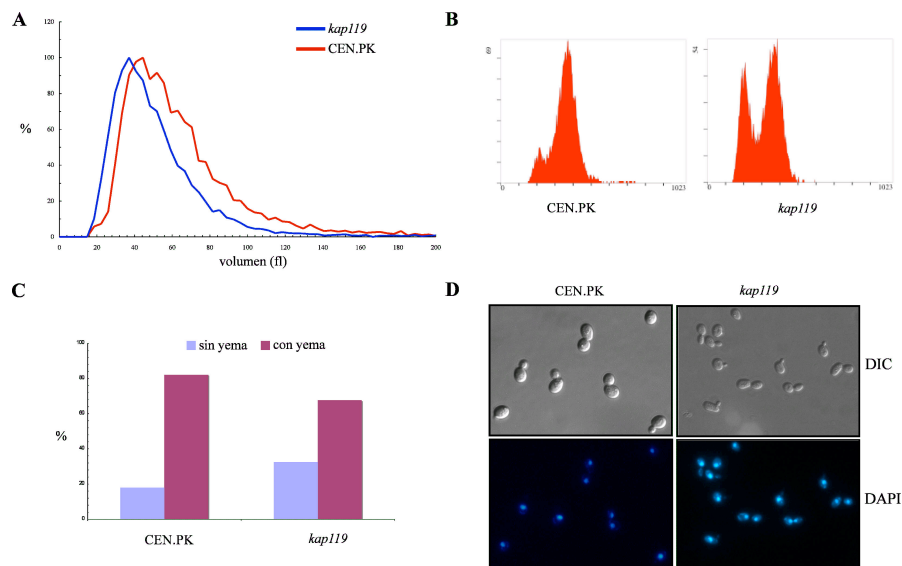


FIGURA 6.6. Caracterització del mutant *kap119* (JCY681). Veure peu de figura en Figura 6.2.

Altres fenotips relacionats amb Start a destacar són: *kap122* que presenta un fenotip de tamany inferior al normal (Figura 6.7A), també anomenat fenotip *wee*, que indica una acceleració en el pas per Start; i *msn5*, mutant ja caracteritzat anteriorment al laboratori, que presenta defectes en el pas per Start (Queralt i Igual, 2003).

Un cas a destacar és el que es va trobar en analitzar el mutant *kap123*. A més dels pics corresponents a DNA no replicat (1N) i DNA replicat (2N), es podia distingir en el mutant *kap123* un tercer pic corresponent a cèl.lules amb un contingut de DNA 4N (Figura 6.8B). El defecte de ploïdia observat en el mutant *kap123* podia deure's a una re-replicació del DNA o a defectes en la segregació dels cromosomes.

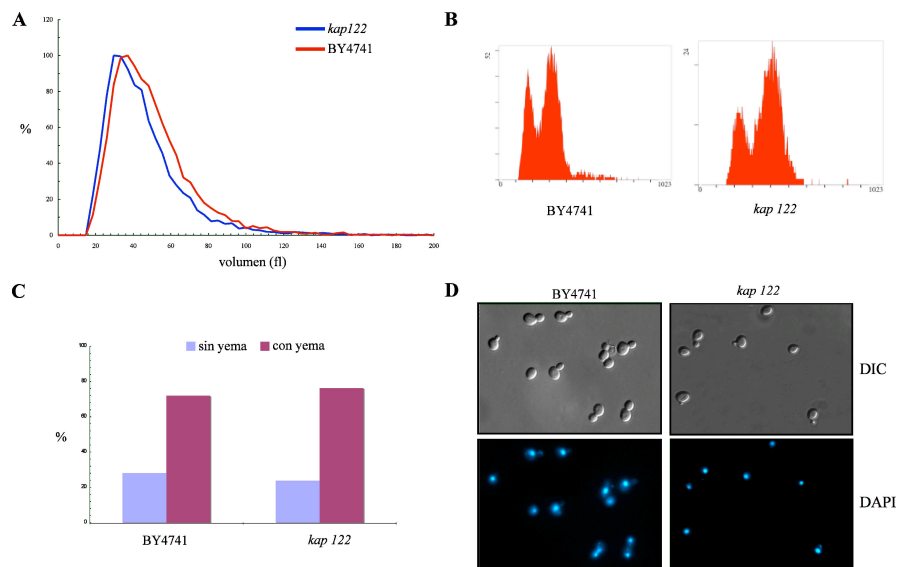


FIGURA 6.7. Caracterització del mutant *kap122* (JCY679). Veure peu de figura en Figura 6.2.

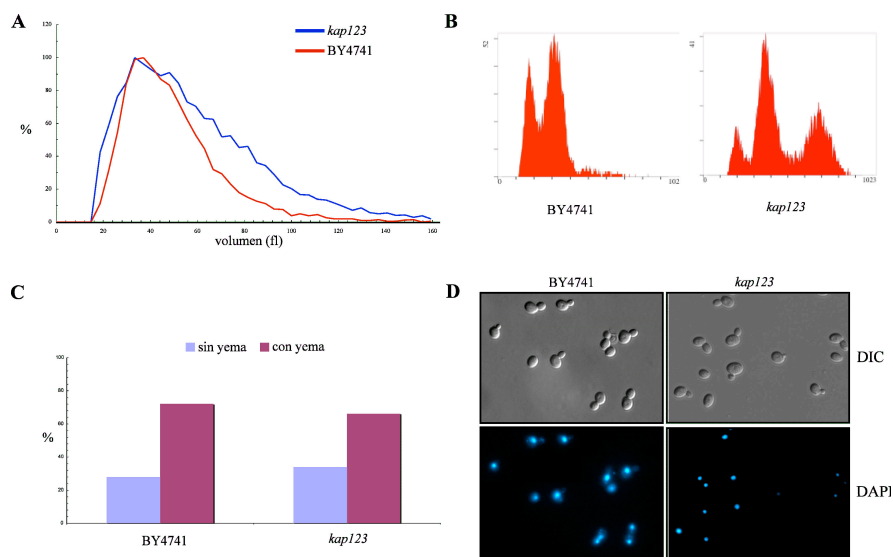


FIGURA 6.8. Caracterització del mutant *kap123* (JCY854). Veure peu de figura en Figura 6.2.

L'avaluació de defectes en la segregació de cromosomes podia fer-se en analitzar els nuclis tenyits amb DAPI de les cèl.lules mutants *kap123*. Es van recomptar 4 categories d'aberracions: cèl.lules amb un únic nucli localitzat en la cèl.lula filla, cèl.lules amb dos nuclis en la mare, cèl.lules amb dos nuclis en la filla i cèl.lules sense nuclis (Figura 6.9A). La inactivació de Kap123 origina un increment important en la presència de cèl.lules amb aberracions tant en el fons genètic BY4741 com en el W303-1a. Aquests defectes poden explicar l'acumulació de cèl.lules amb contingut genètic 4N al quedar dos complements genòmics en el mateix cos cel.lular. Per confirmar les aberracions a nivell de segregació cromosòmica en el mutant *kap123* es van transformar les cèl.lules amb el plasmidi centromèric pASZ11 i es va analitzar la freqüència de pèrdua d'aquest plasmidi en medis no selectius. Aquest experiment és útil per a seguir events genètics com

pèrdua cromosòmica, estabilitat del plasmidi i aneuploidies (Ugolini i Bruschi, 1996). Es van créixer les cèl.lules en plaques de medi ric YPD i es van realitzar rèpliques en plaques de selecció en les quals les cèl.lules no poden créixer si s'ha produït la pèrdua del plasmidi. És possible avaluar la taxa de pèrdua de plasmidi a partir del percentatge de mitjes colònies ja que representen les cèl.lules que han perdut el plasmidi durant la primera divisió cel.lular que va donar lloc a la colònia. Com s'observa en la figura 6.9B, existeix un increment important en la taxa de pèrdua del plasmidi en el mutant *kap123* (9,84%) respecte a la soca silvestre (4,12%). Aquest resultat és consistent amb el defecte en la morfologia nuclear descrit i confirma la presència de problemes en el mutant *kap123* durant la segregació dels cromosomes. Aquest defecte ha estat confirmat per la publicació d'un estudi recent d'altres autors en què descriuen el paper de la carioferina Kap123 en el control de l'estabilitat dels microtúbuls (Ptak *et al.*, 2009). Els autors proposen que Kap123 i Caj1, un membre de la família de Hsp40, jugarien un paper essencial en la funció dels microtúbuls. No descriuen cap *cargo* específic de Kap123 però proposen diferents models de participació de les dues proteïnes en el metabolisme dels microtúbuls incluint una possible funció de Kap123 com *xaperona*. Açò recolçaria el concepte de que les carioferines poden presentar funcions similars a les *xaperones* que ja s'havia apuntat en la bibliografia (Jäkel *et al.*, 2002).

Cal indicar que, a més del fenotip descrit per al mutant *kap123*, en estudis anteriors del nostre grup s'havia descrit un defecte important quan *KAP123* era inactivat tant en integritat cel.lular com en el citoesquelet d'actina. La inactivació de *KAP123* causa alteracions en el citoesquelet d'actina que provoquen hiperpolarització i resistència a l'inhibidor de la polimerització d'actina latrunculina B. De fet, el nivell de filaments d'actina es veu incrementat en el mutant *kap123*. A més, les cèl.lules mutants *kap123* mostren una paret cel.lular debilitada, lisi cel.lular i problemes de creixement en presència de SDS o a temperatures elevades, els quals són aliviats per estabilitzadors osmòtics (Martínez-Bono *et al.*, 2009). Potser el paper de Kap123 abarca funcions de regulació tant dels microtúbuls com dels filaments d'actina.

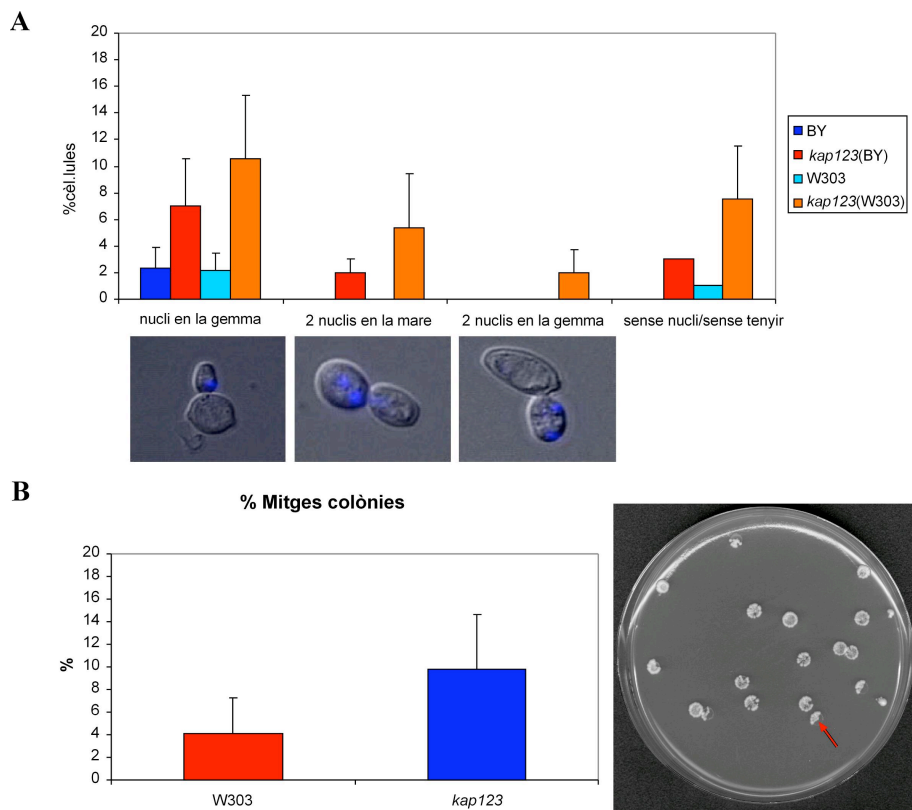


FIGURA 6.9. Anàlisi de la segregació cromosòmica en el mutant *kap123*. **A.** Cèl.lules de les soques silvestres BY4741 i W303 i els seus respectius mutants *kap123* (JCY854 i JCY871) es van tenyir amb DAPI i es va analitzar el nombre i la posició dels nuclis per microscopia de fluorescència. El gràfic mostra el percentatge de cèl.lules aberrants. Les imatges mostren exemples de dites cèl.lules amb els nuclis tenyits amb DAPI. **B.** El gràfic mostra el percentatge de cèl.lules W303 i *kap123* que han perdut el plasmidi pASZ11 en la primera divisió cel.lular. Es mostra una imatge representativa de les colònies analitzades. S'indica amb una fletxa un exemple de mitja colònia.

Es van analitzar a continuació els fenotips dels mutants en carioferines essencials. Per a *tetO₇:KAP95* es van detectar dos punts de parada en el cicle cel.lular: un majoritari en la transició G2/M per al 75% de les cèl.lules (cèl.lules amb gemmes grans, el DNA replicat i un sol nucli) descrit també en treballs previs (Hood *et al.*, 2001) i un altre minoritari en G1 per al 25% de les cèl.lules (cèl.lules redones grans sense gemma i amb el DNA sense replicar) (Figura 6.10), descrit també en treballs anteriors del nostre grup (Taberner i Igual, 2010). Per a *tetO₇:CSE1* el fenotip és el mateix que per a *tetO₇:KAP95* ja que Cse1 és l'exportina encarregada de reciclar la importina α que s'associa a Kap95 per al seu correcte funcionament (resultats no mostrats). El nostre grup va descriure que Kap95 juga un paper essencial a l'inici del cicle perquè dirigeix la importació de Whi5, Swi4, Swi6 i Mbp1 (Taberner *et al.*, 2009; Taberner i Igual, 2010). En el present treball s'ha descrit que les ciclins Cln1 i Cln2 i la proteïna Cdc24 són importades al nucli de forma dependent de Kap95. Per tant la via clàssica d'importació controla l'entrada al nucli dels principals reguladors d'Start.

En el cas de *tetO₇:XPO1* l'anàlisi del fenotip terminal indica una parada parcial en G1 perquè existeix un acúmulo clar de cèl.lules en G1, sense gemma i amb el DNA sense replicar (Figura 6.11). Açò apunta a un defecte en Start quan Xpo1 s'inactiva. En el cas de *tetO₇:PSE1* s'observa un fenotip clar de problemes en citoquinesi o separació cel.lular, ja que com s'observa en la morfologia apareixen grups de cèl.lules. Aquesta morfologia explicaria l'augment de tamany cel.lular observat, l'elevat índex de gemmació aparent i el pic 4N de DNA observat en la citometria (Figura 6.12). Per últim, l'anàlisi de *tetO₇:MTR10* va mostrar un augment del DNA sense replicar mentre que es podia apreciar una disminució de les cèl.lules sense gemma, la qual cosa apuntava a problemes en replicació del DNA. També s'observa una morfologia cel.lular allargada i deformada que podria implicar problemes de morfogènesi (Figura 6.13).

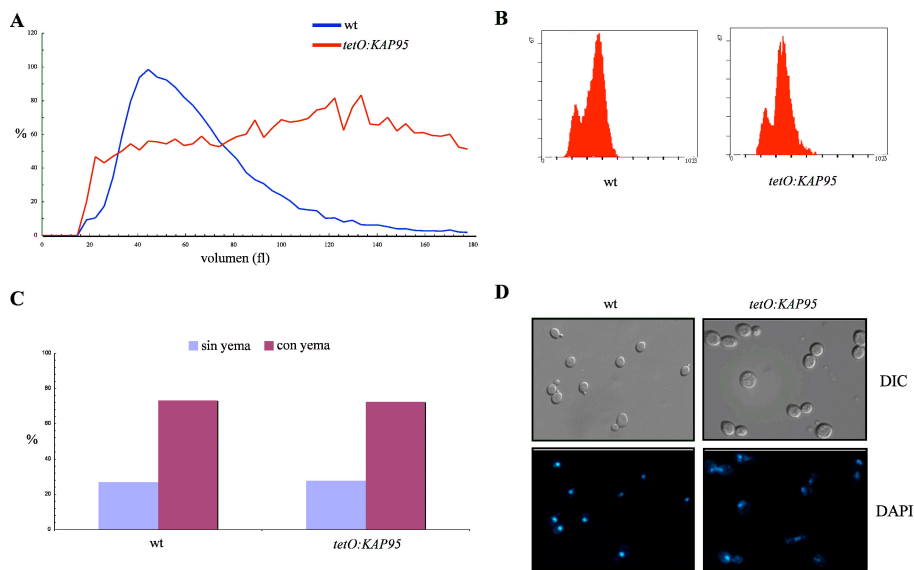


FIGURA 6.10. Caracterització del mutant *tetO₇::KAP95* (JCY970). Veure peu de figura en Figura 6.2. (A) El color roig correspon a la soca mutant i el blau la soca salvatge.

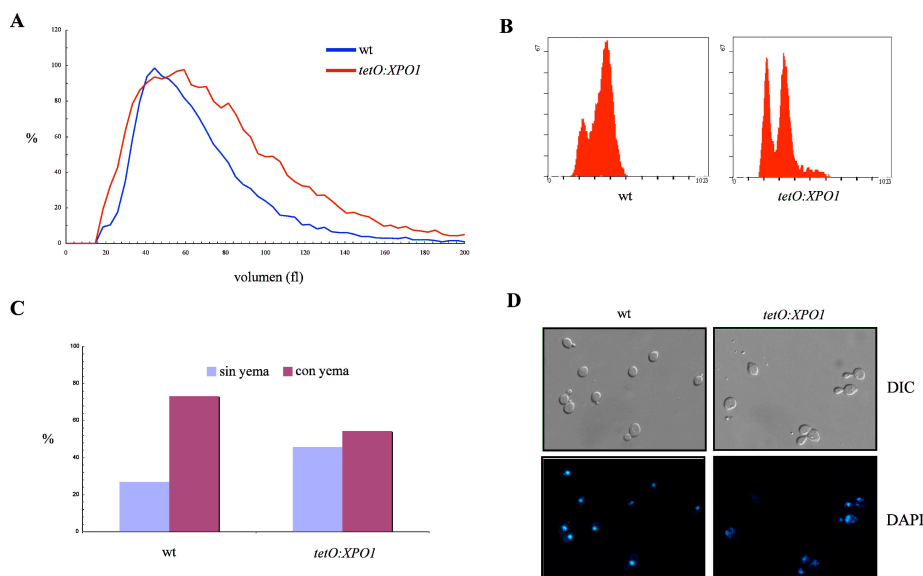


FIGURA 6.11. Caracterització del mutant *tetO₇::XPO1* (JCY978). Veure peu de figura en Figura 6.2. (A) El color roig correspon a la soca mutant i el blau la soca salvatge.

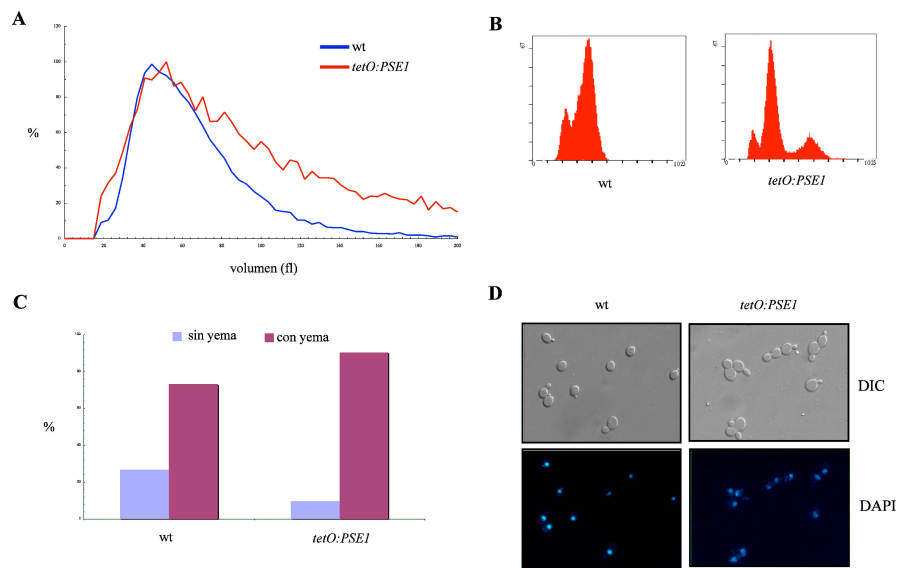


FIGURA 6.12. Caracterització del mutant *tetO₇:PSE1* (JCY971). Veure peu de figura en Figura 6.2. (A) El color roig correspon a la soca mutant i el blau la soca salvatge.

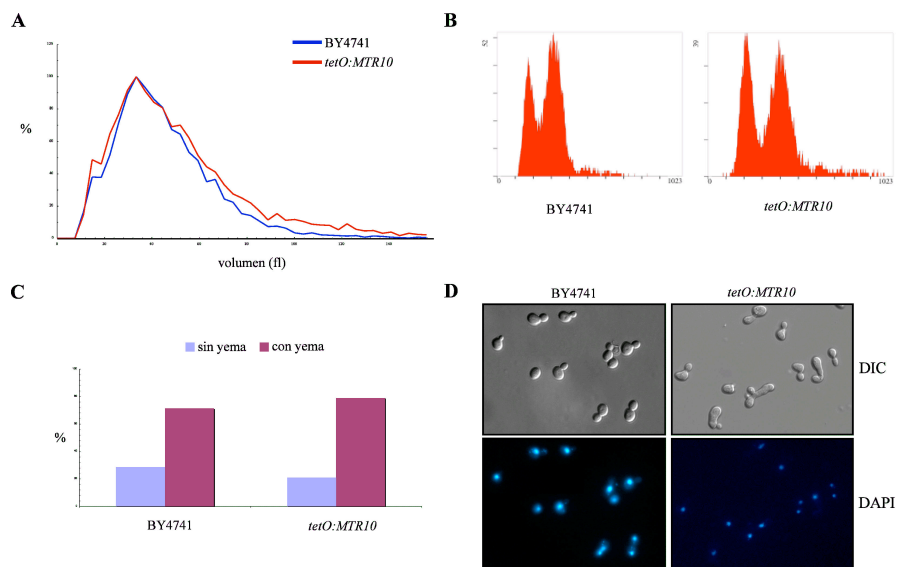


FIGURA 6.13. Caracterització del mutant *tetO₇:MTR10* (JCY1042). Veure peu de figura en Figura 6.2. (A) El color roig correspon a la soca mutant i el blau la soca salvatge.

Els resultats de la caracterització dels mutants en les diferents carioferines es resumeixen en la Taula 6.1.

Taula 6.1

Soca	Fenotip	Funció
<i>kap108</i> <i>kap114</i> <i>kap119</i>	No fenotip. No fenotip. Augment en el nombre de cèl.lules sense gemma amb el DNA sense replicar. Tamany cel.lular xicotet i morfologia allargada.	Start i morfogènesi
<i>kap120</i> <i>kap122</i> <i>kap123</i>	Defecte d'hiperpolarització quan Cln2 es sobreexpressat. Fenotip <i>wee</i> . Problemes en segregació dels cromosomes. Defecte de creixement a alta temperatura. Resistència a Lat B.	Morfogènesi Start Segregació cromosomes i morfogènesi
<i>msn5</i> <i>los1</i> <i>tetO:MTR10</i>	Augment del tamany cel.lular. No fenotip. Increment de cèl.lules amb DNA sense replicar. Augment del tamany cel.lular, morfologia elongada i deformada.	Start
<i>tetO:KAP104</i>	Increment del tamany cel.lular, les cèl.lules sense gemma i el DNA sense replicar.	Start i morfogènesi
<i>tetO:KAP95</i> <i>tetO:CSE1</i> <i>tetO:XPO1</i>	Arrest en G1 i G2/M. Igual que <i>tetO:KAP95</i> . Increment del tamany cel.lular, les cèl.lules sense gemma i el DNA sense replicar.	Start
<i>tetO:PSE1</i>	Grups de cèl.lules.	Start
		Citoquinesi o separació cel.lular

La caracterització dels mutants en les diferents carioferines de la família de la importina β va mostrar que molts dels mutants podien relacionar-se amb el cicle cel.lular. Aquest fet obre interrogants sobre quins dels *cargos* ja descrits poden justificar aquests fenotips, quines proteïnes de les que es coneix que estan regulades espacialment podrien ser càrrega de les diferents carioferines, o quins mecanismes de regulació espacial del cicle encara desconeguts s'amaguen darrere el fenotip dels mutants.

El treball del nostre grup s'ha centrat en estudiar el transport dels principals reguladors d'Start. Així s'ha descrit la regulació espacial del repressor Whi5 que és importat per la via clàssica d'importació i exportat per la carioferina Msn5 (Taberner *et al.*, 2009). També s'ha determinat el paper

de la via clàssica d'importació en el transport dels principals factors transcripcionals d'Start : Swi6, Swi4 i Mbp1 (Taberner i Igual., 2010). Swi6 és exportat del nucli també per la carioferina Msn5 (Queralt i Igual., 2003). En el present treball s'analitza el transport de les ciclines Cln1 i Cln2 i de la proteïna Cdc24. Totes elles són importades al nucli amb la participació de la via clàssica d'importació. En l'exportació de Cln2 participa Msn5 i en la de Cdc24 participa Xpo1. Per tant, s'han determinat les carioferines implicades en transportar els principals *cargos* que han de funcionar durant la transició G1-S. No obstant, queden algunes preguntes obertes que implicaran un treball futur per tractar de donar-los resposta. El mutant en la carioferina Xpo1 presenta un defecte en el pas per Start que no té una interpretació fàcil amb les dades de què es disposa. Un candidat a ser exportat per Xpo1 era Whi5 però una vegada determinat el seu transport i descartada la participació d'Xpo1 en el procés d'exportació s'ha de trobar un altre *cargo* possible que en no ser exportat pugui explicar el fenotip del mutant de bloqueig de Start. Un altre mutant relacionat amb Start que podria ser font de futurs estudis és *kap122*. El seu fenotip *wee* fa pensar que deu existir algun *cargo* importat per aquesta carioferina que en no entrar al nucli genera un pas accelerat per Start. De nou podria haver-se tractat de Whi5 però com ja s'ha comentat aquesta proteïna és importada per la via clàssica d'importació i per tant deu ser un altre regulador del cicle important, el transport del qual es desconeix encara, el responsable d'aquest fenotip. Així que la caracterització presentada podria servir de base per a futurs estudis de regulació espacial del cicle cel·lular.

7. Conclusions

1. La regió entre els aminoàcids 225 i 299 de Cln2 és necessària i suficient per conferir a la ciclina la seua funcionalitat específica diferencial respecte de Cln1. Aquesta regió controla l'exportació de Cln2 i quan s'introdueix en Cln1 la ciclina resultant presenta una distribució menys nuclear i és capaç de realitzar funcions citosòliques pròpies de Cln2. Tots aquests resultats indiquen que és un mecanisme de regulació espacial el que determina la funcionalitat diferencial de les ciclines Cln1 i Cln2.
2. Cln1 i Cln2 són importades al nucli per la via clàssica d'importació. El senyal de localització nuclear no es correspon amb cap NLS clàssic descrit i es troba en la regió dels aminoàcids del 130 al 226 d'ambdues ciclines. Cln2, però no Cln1, és exportada del nucli de forma dependent de Msn5. El senyal d'exportació es troba en la regió entre els aminoàcids 225 i 299 de Cln2.
3. Cln1 i Cln2 presenten la mateixa estabilitat. Tanmateix, mentre que Cln2 és degradada per SCF^{Grr1} i SCF^{Cdc4}, Cln1 és degradada preferentment per SCF^{Grr1}. La seqüència N-terminal de la ciclina determina el seu patró

Conclusions

de degradació: la seqüència de Cln2 és necessària per a que la proteïna siga degradada per SCF^{Cdc4}. La PESTb de Cln1 és equivalent a la PEST de Cln2 o fins i tot més eficient.

4. L'estabilitat de la ciclina depèn de la localització: la inestabilitat de Cln1 i Cln2 augmenta en el citoplasma.
5. Cln2 és més eficient que Cln1 facilitant l'exportació de Cdc24. Tanmateix el retràs en gemmació que es produeix en un mutant *cln2* es manté encara que Cdc24 es localitze en el citosol. Per tant el retràs no es deu al retràs en l'eixida del nucli de Cdc24 sinó a una actuació de Cln2 que probablement és simultània a esta eixida i que pot tindre com a diana a Cdc24 o a altres proteïnes relacionades amb gemmació.
6. S'han identificat les carioferines responsables del transport de Cdc24: és importada al nucli per la via clàssica d'importació i exportada per Xpo1. L'inhibidor Far1 no participa en la importació de Cdc24. S'han identificat tres possibles senyals de localització diferents, un NES i dos NLS, però els anàlisis de mutants en residus d'aquestes regions no han permés demostrar la dependència de la localització de la proteïna Cdc24 d'aquests senyals.
7. La caracterització dels mutants en les diferents carioferines de la família de la importina β va mostrar que molts dels mutants podien relacionar-se amb el cicle cel.lular en processos com la regulació d'Start, la replicació o la morfogènesi cel.lular.

8. Bibliografia

- Alberghina, L. et al., 2004. A cell sizer network involving Cln3 and Far1 controls entrance into S phase in the mitotic cycle of budding yeast. *The Journal of Cell Biology*, 167(3), pp.433-443.
- Alepuz, P.M., Cunningham, K.W. & Estruch, F., 1997. Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated ENA1 gene. *Molecular Microbiology*, 26(1), pp.91-98.
- Amon, A et al., 1993. Mechanisms that help the yeast cell cycle clock tick: G2 cyclins transcriptionally activate G2 cyclins and repress G1 cyclins. *Cell*, 74(6), pp.993-1007.
- Andrews, B & Measday, V., 1998. The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea. *Trends in Genetics: TIG*, 14(2), pp.66-72.
- Archambault, V. et al., 2004. Targeted proteomic study of the cyclin-Cdk module. *Molecular Cell*, 14(6), pp.699-711.
- Arts, G.J. et al., 1998. The role of exportin-t in selective nuclear export of mature tRNAs. *The EMBO Journal*, 17(24), pp.7430-7441.
- Aviv, T. et al., 2003. The RNA-binding SAM domain of Smaug defines a new family of post-transcriptional regulators. *Nature Structural Biology*, 10(8), pp.614-621.
- Azzam, R. et al., 2004. Phosphorylation by cyclin B-Cdk underlies release of mitotic exit activator Cdc14 from the nucleolus. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5683), pp.516-519.
- Bähler, J., 2005. Cell-cycle control of gene expression in budding and fission yeast.

- Annual Review of Genetics*, 39, pp.69-94.
- Bai, C. et al., 1996. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell*, 86(2), pp.263-274.
- Bakhrat, Anya et al., 2008. Nuclear export of Ho endonuclease of yeast via Msn5. *Current Genetics*, 54(5), pp.271-281.
- Barberis, M. et al., 2005. The yeast cyclin-dependent kinase inhibitor Sic1 and mammalian p27Kip1 are functional homologues with a structurally conserved inhibitory domain. *The Biochemical Journal*, 387(Pt 3), pp.639-647.
- Barral, Y, Jentsch, S. & Mann, C., 1995. G1 cyclin turnover and nutrient uptake are controlled by a common pathway in yeast. *Genes & Development*, 9(4), pp.399-409.
- Bean, J.M., Siggia, E.D. & Cross, Frederick R, 2005. High functional overlap between MluI cell-cycle box binding factor and Swi4/6 cell-cycle box binding factor in the G1/S transcriptional program in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 171(1), pp.49-61.
- Belanger, K.D. et al., 2004. The karyopherin Msn5/Kap142 requires Nup82 for nuclear export and performs a function distinct from translocation in RPA protein import. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(42), pp.43530-43539.
- Belli, G. et al., 1998. An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast. *Nucleic Acids Research*, 26(4), pp.942-947.
- Benton, B.K. et al., 1993. Genetic analysis of Cln/Cdc28 regulation of cell morphogenesis in budding yeast. *The EMBO Journal*, 12(13), pp.5267-5275.
- Berset, C. et al., 2002. Transferable domain in the G(1) cyclin Cln2 sufficient to switch degradation of Sic1 from the E3 ubiquitin ligase SCF(Cdc4) to SCF(Grr1). *Molecular and Cellular Biology*, 22(13), pp.4463-4476.
- Blondel, M & Mann, C., 1996. G2 cyclins are required for the degradation of G1 cyclins in yeast. *Nature*, 384(6606), pp.279-282.
- Blondel, M et al., 1999. Nuclear export of Far1p in response to pheromones requires the export receptor Msn5p/Ste21p. *Genes & Development*, 13(17), pp.2284-2300.
- Blondel, M et al., 2000. Nuclear-specific degradation of Far1 is controlled by the localization of the F-box protein Cdc4. *The EMBO Journal*, 19(22), pp.6085-6097.
- Blondel, Marc et al., 2005. Degradation of Hof1 by SCF(Grr1) is important for actomyosin contraction during cytokinesis in yeast. *The EMBO Journal*, 24(7), pp.1440-1452.
- Booher, R.N., Deshaies, R J & Kirschner, M.W., 1993. Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1

- and G2 cyclins. *The EMBO Journal*, 12(9), pp.3417-3426.
- Bose, I. et al., 2001. Assembly of scaffold-mediated complexes containing Cdc42p, the exchange factor Cdc24p, and the effector Cla4p required for cell cycle-regulated phosphorylation of Cdc24p. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(10), pp.7176-7186.
- Boustany, L.M. & Cyert, M.S., 2002. Calcineurin-dependent regulation of Crz1p nuclear export requires Msn5p and a conserved calcineurin docking site. *Genes & Development*, 16(5), pp.608-619.
- Breeden, L., 1996. Start-specific transcription in yeast. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 208, pp.95-127.
- Breeden, L L, 2000. Cyclin transcription: Timing is everything. *Current Biology: CB*, 10(16), pp.R586-588.
- Breeden, Linda L, 2003. Periodic transcription: a cycle within a cycle. *Current Biology: CB*, 13(1), pp.R31-38.
- de Bruin, R A M, Kalashnikova, T I, et al., 2008. DNA replication checkpoint promotes G1-S transcription by inactivating the MBF repressor Nrm1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(32), pp.11230-11235.
- de Bruin, Robertus A M, Kalashnikova, Tatyana I & Wittenberg, Curt, 2008. Stb1 collaborates with other regulators to modulate the G1-specific transcriptional circuit. *Molecular and Cellular Biology*, 28(22), pp.6919-6928.
- de Bruin, Robertus A M et al., 2006. Constraining G1-specific transcription to late G1 phase: the MBF-associated corepressor Nrm1 acts via negative feedback. *Molecular Cell*, 23(4), pp.483-496.
- de Bruin, Robertus A M et al., 2004. Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5. *Cell*, 117(7), pp.887-898.
- Butty, A.C. et al., 1998. The role of Far1p in linking the heterotrimeric G protein to polarity establishment proteins during yeast mating. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5393), pp.1511-1516.
- Butty, A.-C. et al., 2002. A positive feedback loop stabilizes the guanine-nucleotide exchange factor Cdc24 at sites of polarization. *The EMBO Journal*, 21(7), pp.1565-1576.
- Chang, F. & Peter, Matthias, 2003. Yeasts make their mark. *Nature Cell Biology*, 5(4), pp.294-299.
- Chant, J., 1999. Cell polarity in yeast. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15, pp.365-391.
- Ciciarello, M., Mangiacasale, R. & Lavia, P., 2007. Spatial control of mitosi by the GTPase Ran. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 64(15), pp.1891-1914.

- Clarke, P.R. & Zhang, C., 2008. Spatial and temporal coordination of mitosi by Ran GTPase. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(6), pp.464-477.
- Cole, K.C. et al., 2009. Multiple proteins and phosphorylations regulate *Saccharomyces cerevisiae* Cdc24p localization. *FEBS Letters*, 583(20), pp.3339-3343.
- Colomina, N. et al., 2009. Whi3 regulates morphogenesis in budding yeast by enhancing Cdk functions in apical growth. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(12), pp.1912-1920.
- Di Como, C.J., Chang, H. & Arndt, K.T., 1995. Activation of CLN1 and CLN2 G1 cyclin gene expression by BCK2. *Molecular and Cellular Biology*, 15(4), pp.1835-1846.
- Cook, A. et al., 2007. Structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Annual Review of Biochemistry*, 76, pp.647-671.
- Cosma, M.P., 2002. Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation. *Molecular Cell*, 10(2), pp.227-236.
- Costanzo, M. et al., 2004. CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast. *Cell*, 117(7), pp.899-913.
- Cross, F R et al., 1999. Specialization and targeting of B-type cyclins. *Molecular Cell*, 4(1), pp.11-19.
- Cvrcková, F. & Nasmyth, K., 1993. Yeast G1 cyclins CLN1 and CLN2 and a GAP-like protein have a role in bud formation. *The EMBO Journal*, 12(13), pp.5277-5286.
- Demmel, L. et al., 2008. Nucleocytoplasmic shuttling of the Golgi phosphatidylinositol 4-kinase Pik1 is regulated by 14-3-3 proteins and coordinates Golgi function with cell growth. *Molecular Biology of the Cell*, 19(3), pp.1046-1061.
- DeSalle, L.M. & Pagano, M., 2001. Regulation of the G1 to S transition by the ubiquitin pathway. *FEBS Letters*, 490(3), pp.179-189.
- Deshaies, R J, Chau, V. & Kirschner, M., 1995. Ubiquitination of the G1 cyclin Cln2p by a Cdc34p-dependent pathway. *The EMBO Journal*, 14(2), pp.303-312.
- DeVit, M.J. & Johnston, M., 1999. The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glucose repressor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Biology: CB*, 9(21), pp.1231-1241.
- Diehl, J.A. et al., 1998. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes & Development*, 12(22), pp.3499-3511.
- Dirick, L. & Nasmyth, K., 1991. Positive feedback in the activation of G1 cyclins in yeast. *Nature*, 351(6329), pp.754-757.

- Dirick, L., Böhm, T. & Nasmyth, K., 1995. Roles and regulation of Cln-Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 14(19), pp.4803-4813.
- Donaldson, A.D., 2000. The yeast mitotic cyclin Clb2 cannot substitute for S phase cyclins in replication origin firing. *EMBO Reports*, 1(6), pp.507-512.
- Donaldson, A.D. et al., 1998. CLB5-dependent activation of late replication origins in *S. cerevisiae*. *Molecular Cell*, 2(2), pp.173-182.
- Doye, V. & Hurt, E., 1997. From nucleoporins to nuclear pore complexes. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(3), pp.401-411.
- Draviam, V.M. et al., 2001. The localization of human cyclins B1 and B2 determines CDK1 substrate specificity and neither enzyme requires MEK to disassemble the Golgi apparatus. *The Journal of Cell Biology*, 152(5), pp.945-958.
- Drees, B.L. et al., 2001. A protein interaction map for cell polarity development. *The Journal of Cell Biology*, 154(3), pp.549-571.
- Drury, L.S., Perkins, G. & Diffley, J.F., 1997. The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast. *The EMBO Journal*, 16(19), pp.5966-5976.
- Edgington, N.P. & Futcher, B., 2001. Relationship between the function and the location of G1 cyclins in *S. cerevisiae*. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 24), pp.4599-4611.
- Eklholm, S.V. & Reed, S I, 2000. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(6), pp.676-684.
- Eluère, R. et al., 2007. Compartmentalization of the functions and regulation of the mitotic cyclin Clb2 in *S. cerevisiae*. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 4), pp.702-711.
- Enserink, J.M. & Kolodner, R.D., 2010. An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Division*, 5, p.11
- Epstein, C.B. & Cross, F R, 1992. CLB5: a novel B cyclin from budding yeast with a role in S phase. *Genes & Development*, 6(9), pp.1695-1706.
- Erlandsson, F. et al., 2000. A detailed analysis of cyclin A accumulation at the G(1)/S border in normal and transformed cells. *Experimental Cell Research*, 259(1), pp.86-95.
- Errico, A. et al., 2010. Identification of substrates for cyclin dependent kinases. *Advances in Enzyme Regulation*, 50(1), pp.375-399.
- Estruch, F. & Carlson, M., 1990. SNF6 encodes a nuclear protein that is required for expression of many genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 10(6), pp.2544-2553.
- Etienne-Manneville, S. & Hall, A., 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*,

Bibliografia

- 420(6916), pp.629-635.
- Ferrezuelo, F., Aldea, Martí & Futcher, Bruce, 2009. Bck2 is a phase-independent activator of cell cycle-regulated genes in yeast. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(2), pp.239-252.
- Ferrigno, P. et al., 1998. Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *The EMBO Journal*, 17(19), pp.5606-5614.
- Fitch, I. et al., 1992. Characterization of four B-type cyclin genes of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 3(7), pp.805-818.
- Flick, K. et al., 1998. Regulation of cell size by glucose is exerted via repression of the CLN1 promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 18(5), pp.2492-2501.
- Fried, H. & Kutay, U., 2003. Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 60(8), pp.1659-1688.
- Fries, T. et al., 2007. A novel conserved nuclear localization signal is recognized by a group of yeast importins. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(27), pp.19292-19301.
- Fujiwara, T. et al., 1998. Rho1p-Bni1p-Spa2p interactions: implication in localization of Bni1p at the bud site and regulation of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 9(5), pp.1221-1233.
- Garí, E et al., 2001. Whi3 binds the mRNA of the G1 cyclin CLN3 to modulate cell fate in budding yeast. *Genes & Development*, 15(21), pp.2803-2808.
- Gavin, A.-C. et al., 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, 415(6868), pp.141-147.
- Geley, S. et al., 2001. Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint. *The Journal of Cell Biology*, 153(1), pp.137-148.
- Geymonat, M. et al., 2004. Clb6/Cdc28 and Cdc14 regulate phosphorylation status and cellular localization of Swi6. *Molecular and Cellular Biology*, 24(6), pp.2277-2285.
- Görlich, D et al., 1997. A novel class of RanGTP binding proteins. *The Journal of Cell Biology*, 138(1), pp.65-80.
- Görner, W. et al., 2002. Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *The EMBO Journal*, 21(1-2), pp.135-144.
- Grandin, N. & Reed, S I, 1993. Differential function and expression of *Saccharomyces cerevisiae* B-type cyclins in mitosis and meiosis. *Molecular and Cellular Biology*, 13(4), pp.2113-2125.

- Gulli, M.P. & Peter, M., 2001. Temporal and spatial regulation of Rho-type guanine-nucleotide exchange factors: the yeast perspective. *Genes & Development*, 15(4), pp.365-379.
- Gulli, M.P. et al., 2000. Phosphorylation of the Cdc42 exchange factor Cdc24 by the PAK-like kinase Cla4 may regulate polarized growth in yeast. *Molecular Cell*, 6(5), pp.1155-1167.
- Haase, S B, Winey, M & Reed, S I, 2001. Multi-step control of spindle pole body duplication by cyclin-dependent kinase. *Nature Cell Biology*, 3(1), pp.38-42.
- Hadwiger, J.A. et al., 1989. A family of cyclin homologs that control the G1 phase in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(16), pp.6255-6259.
- Hahn, S. et al., 2008. Classical NLS proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology*, 379(4), pp.678-694.
- Harel, A. et al., 2003. Removal of a single pore subcomplex results in vertebrate nuclei devoid of nuclear pores. *Molecular Cell*, 11(4), pp.853-864.
- Henchoz, S. et al., 1997. Phosphorylation- and ubiquitin-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor Far1p in budding yeast. *Genes & Development*, 11(22), pp.3046-3060.
- Hood, J.K., Hwang, W.W. & Silver, P.A., 2001. The *Saccharomyces cerevisiae* cyclin Clb2p is targeted to multiple subcellular locations by cis- and trans-acting determinants. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 3), pp.589-597.
- Hood-DeGrenier, J.K., Boulton, C.N. & Lyo, V., 2007. Cytoplasmic Clb2 is required for timely inactivation of the mitotic inhibitor Swe1 and normal bud morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 51(1), pp.1-18.
- Hu, F. & Aparicio, O.M., 2005. Swe1 regulation and transcriptional control restrict the activity of mitotic cyclins toward replication proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(25), pp.8910-8915.
- Jackson, L.P., Reed, Steven I & Haase, Steven B, 2006. Distinct mechanisms control the stability of the related S-phase cyclins Clb5 and Clb6. *Molecular and Cellular Biology*, 26(6), pp.2456-2466.
- Jaffe, A.B. & Hall, A., 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, pp.247-269.
- Jäkel, S. et al., 2002. Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains. *The EMBO Journal*, 21(3), pp.377-386.
- Jaquenoud, Malika, van Drogen, F. & Peter, Matthias, 2002. Cell cycle-dependent nuclear export of Cdh1p may contribute to the inactivation of APC/C(Cdh1). *The EMBO Journal*, 21(23), pp.6515-6526.

- Jaspersen, S.L. & Winey, Mark, 2004. The budding yeast spindle pole body: structure, duplication, and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, pp.1-28.
- Jaspersen, S.L. et al., 2004. Cdc28/Cdk1 regulates spindle pole body duplication through phosphorylation of Spc42 and Mps1. *Developmental Cell*, 7(2), pp.263-274.
- Jorgensen, P. & Tyers, M, 1999. Altered states: programmed proteolysis and the budding yeast cell cycle. *Current Opinion in Microbiology*, 2(6), pp.610-617.
- Kaffman, A. et al., 1998. The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. *Nature*, 396(6710), pp.482-486.
- Kalab, P. & Heald, R., 2008. The RanGTP gradient - a GPS for the mitotic spindle. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 10), pp.1577-1586.
- Kaplun, L. et al., 2003. DNA damage response-mediated degradation of Ho endonuclease via the ubiquitin system involves its nuclear export. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(49), pp.48727-48734.
- Keaton, M.A. et al., 2007. Differential susceptibility of yeast S and M phase CDK complexes to inhibitory tyrosine phosphorylation. *Current Biology: CB*, 17(14), pp.1181-1189.
- Koch, C. & Nasmyth, K, 1994. Cell cycle regulated transcription in yeast. *Current Opinion in Cell Biology*, 6(3), pp.451-459.
- Koch, C. et al., 1996. Switching transcription on and off during the yeast cell cycle: Cln/Cdc28 kinases activate bound transcription factor SBF (Swi4/Swi6) at start, whereas Clb/Cdc28 kinases displace it from the promoter in G2. *Genes & Development*, 10(2), pp.129-141.
- Koepp, D.M., Harper, J.W. & Elledge, S.J., 1999. How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell*, 97(4), pp.431-434.
- Komeili, A. et al., 2000. Mechanism of metabolic control. Target of rapamycin signaling links nitrogen quality to the activity of the Rtg1 and Rtg3 transcription factors. *The Journal of Cell Biology*, 151(4), pp.863-878.
- Konstantinova, I.M., Tsimokha, A.S. & Mittenberg, A.G., 2008. Role of proteasomes in cellular regulation. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 267, pp.59-124.
- Kozminski, Keith G et al., 2003. Interaction between a Ras and a Rho GTPase couples selection of a growth site to the development of cell polarity in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 14(12), pp.4958-4970.
- Kuersten, S., Ohno, M. & Mattaj, I W, 2001. Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond. *Trends in Cell Biology*, 11(12), pp.497-503.
- Kuge, S. et al., 1998. Crm1 (XpoI) dependent nuclear export of the budding yeast transcription factor yAP-1 is sensitive to oxidative stress. *Genes to Cells*:

- Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 3(8), pp.521-532.
- Lange, A. et al., 2007. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(8), pp.5101-5105.
- Lanker, S, Valdivieso, M.H. & Wittenberg, C, 1996. Rapid degradation of the G1 cyclin Cln2 induced by CDK-dependent phosphorylation. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5255), pp.1597-1601.
- Lengronne, A. & Schwob, Etienne, 2002. The yeast CDK inhibitor Sic1 prevents genomic instability by promoting replication origin licensing in late G(1). *Molecular Cell*, 9(5), pp.1067-1078.
- Levine, K., Huang, K. & Cross, F R, 1996. Saccharomyces cerevisiae G1 cyclins differ in their intrinsic functional specificities. *Molecular and Cellular Biology*, 16(12), pp.6794-6803.
- Lew, D J & Reed, S I, 1993. Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *The Journal of Cell Biology*, 120(6), pp.1305-1320.
- Loeb, J.D. et al., 1999. Saccharomyces cerevisiae G1 cyclins are differentially involved in invasive and pseudohyphal growth independent of the filamentation mitogen-activated protein kinase pathway. *Genetics*, 153(4), pp.1535-1546.
- Loeb, J.D. et al., 1995. The yeast nuclear import receptor is required for mitosi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(17), pp.7647-7651.
- Longtine, M.S. et al., 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast (Chichester, England)*, 14(10), pp.953-961.
- Loog, M. & Morgan, David O, 2005. Cyclin specificity in the phosphorylation of cyclin-dependent kinase substrates. *Nature*, 434(7029), pp.104-108.
- Macara, I.G., 2001. Transport into and out of the nucleus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 65(4), pp.570-594, table of contents.
- Madhani, H.D. et al., 1999. Effectors of a developmental mitogen-activated protein kinase cascade revealed by expression signatures of signaling mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22), pp.12530-12535.
- Mahanty, S.K. et al., 1999. Nuclear shuttling of yeast scaffold Ste5 is required for its recruitment to the plasma membrane and activation of the mating MAPK cascade. *Cell*, 98(4), pp.501-512.
- Mai, B. & Breeden, L., 2000. CLN1 and its repression by Xbp1 are important for efficient sporulation in budding yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 20(2), pp.478-487.
- Malumbres, M. & Barbacid, M., 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases.

- Trends in Biochemical Sciences*, 30(11), pp.630-641.
- Manukyan, A. et al., 2008. Ccr4 alters cell size in yeast by modulating the timing of CLN1 and CLN2 expression. *Genetics*, 179(1), pp.345-357.
- Martínez-Bono, B. et al., 2010. Yeast karyopherins Kap123 and Kap95 are related to the function of the cell integrity pathway. *FEMS Yeast Research*, 10(1), pp.28-37.
- Maurer, P et al., 2001. The nuclear export receptor Xpo1p forms distinct complexes with NES transport substrates and the yeast Ran binding protein 1 (Yrb1p). *Molecular Biology of the Cell*, 12(3), pp.539-549.
- McCusker, D. et al., 2007. Cdk1 coordinates cell-surface growth with the cell cycle. *Nature Cell Biology*, 9(5), pp.506-515.
- McInerny, C.J. et al., 1997. A novel Mcm1-dependent element in the SWI4, CLN3, CDC6, and CDC47 promoters activates M/G1-specific transcription. *Genes & Development*, 11(10), pp.1277-1288.
- McKinney, J.D. & Cross, F R, 1995. FAR1 and the G1 phase specificity of cell cycle arrest by mating factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 15(5), pp.2509-2516.
- Mendenhall, M.D., 1993. An inhibitor of p34CDC28 protein kinase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5092), pp.216-219.
- Mendenhall, M.D. & Hodge, A.E., 1998. Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 62(4), pp.1191-1243.
- Miller, M.E. & Cross, F R, 2000. Distinct subcellular localization patterns contribute to functional specificity of the Cln2 and Cln3 cyclins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 20(2), pp.542-555.
- Miller, M.E. & Cross, F R, 2001. Mechanisms controlling subcellular localization of the G(1) cyclins Cln2p and Cln3p in budding yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 21(18), pp.6292-6311.
- Mionnet, C., Bogliolo, S. & Arkowitz, Robert A, 2008. Oligomerization regulates the localization of Cdc24, the Cdc42 activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(25), pp.17515-17530.
- Moffat, J. & Andrews, Brenda, 2004. Late-G1 cyclin-CDK activity is essential for control of cell morphogenesis in budding yeast. *Nature Cell Biology*, 6(1), pp.59-66.
- Morgan, D O, 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13, pp.261-291.
- Morgan, D O, 1999. Regulation of the APC and the exit from mitosis. *Nature Cell*

Biology, 1(2), pp.E47-53.

- Morgan, D O, 2007. *The Cell Cycle: Principles of Control*. New Science Press, London.
- Mosammaparast, N. & Pemberton, L.F., 2004. Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends in Cell Biology*, 14(10), pp.547-556.
- Murray, A.W., 2004. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*, 116(2), pp.221-234.
- Nasmyth, K, 1996. Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5293), pp.1643-1645.
- Nasmyth, K & Dirick, L., 1991. The role of SWI4 and SWI6 in the activity of G1 cyclins in yeast. *Cell*, 66(5), pp.995-1013.
- Nern, A. & Arkowitz, R A, 1999. A Cdc24p-Far1p-Gbetagamma protein complex required for yeast orientation during mating. *The Journal of Cell Biology*, 144(6), pp.1187-1202.
- Nern, A. & Arkowitz, R A, 1998. A GTP-exchange factor required for cell orientation. *Nature*, 391(6663), pp.195-198.
- Nern, A. & Arkowitz, R A, 2000. Nucleocytoplasmic shuttling of the Cdc42p exchange factor Cdc24p. *The Journal of Cell Biology*, 148(6), pp.1115-1122.
- Ogas, J., Andrews, B.J. & Herskowitz, I, 1991. Transcriptional activation of CLN1, CLN2, and a putative new G1 cyclin (HCS26) by SWI4, a positive regulator of G1-specific transcription. *Cell*, 66(5), pp.1015-1026.
- Ozaki-Kuroda, K. et al., 2001. Dynamic localization and function of Bni1p at the sites of directed growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 21(3), pp.827-839.
- Park, H.O. et al., 1997. Two active states of the Ras-related Bud1/Rsr1 protein bind to different effectors to determine yeast cell polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(9), pp.4463-4468.
- Park, H.-O. & Bi, Erfei, 2007. Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 71(1), pp.48-96.
- Patton, E.E. et al., 1998. Cdc53 is a scaffold protein for multiple Cdc34/Skp1/F-box protein complexes that regulate cell division and methionine biosynthesis in yeast. *Genes & Development*, 12(5), pp.692-705.
- Perkins, G., Drury, L.S. & Diffley, J.F., 2001. Separate SCF(CDC4) recognition elements target Cdc6 for proteolysis in S phase and mitosis. *The EMBO Journal*, 20(17), pp.4836-4845.

Bibliografia

- Peter, M & Herskowitz, I, 1994. Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5176), pp.1228-1231.
- Peter, M et al., 1993. FAR1 links the signal transduction pathway to the cell cycle machinery in yeast. *Cell*, 73(4), pp.747-760.
- Peters, J.-M., 2005. Cyclin degradation: don't mess with meiosis. *Current Biology: CB*, 15(12), pp.R461-463.
- Peters, J.-M., 2002. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Molecular Cell*, 9(5), pp.931-943.
- Peterson, J. et al., 1994. Interactions between the bud emergence proteins Bem1p and Bem2p and Rho-type GTPases in yeast. *The Journal of Cell Biology*, 127(5), pp.1395-1406.
- Ptak, C. et al., 2009. A role for the karyopherin Kap123p in microtubule stability. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 10(11), pp.1619-1634.
- Purnapatre, K. et al., 2002. The CLN3/SWI6/CLN2 pathway and SNF1 act sequentially to regulate meiotic initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 7(7), pp.675-691.
- Queralt, E. & Igual, J Carlos, 2003. Cell cycle activation of the Swi6p transcription factor is linked to nucleocytoplasmic shuttling. *Molecular and Cellular Biology*, 23(9), pp.3126-3140.
- Queralt, E. & Igual, J Carlos, 2004. Functional distinction between Cln1p and Cln2p cyclins in the control of the *Saccharomyces cerevisiae* mitotic cycle. *Genetics*, 168(1), pp.129-140.
- Rechsteiner, M. & Rogers, S.W., 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(7), pp.267-271.
- Reed, Steven I, 2006. The ubiquitin-proteasome pathway in cell cycle control. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 42, pp.147-181.
- Richardson, H.E. et al., 1989. An essential G1 function for cyclin-like proteins in yeast. *Cell*, 59(6), pp.1127-1133.
- Roberts, J.M., 1999. Evolving ideas about cyclins. *Cell*, 98(2), pp.129-132.
- Rogers, S., Wells, R. & Rechsteiner, M., 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science (New York, N.Y.)*, 234(4774), pp.364-368.
- Rossi, R.L. et al., 2005. Subcellular localization of the cyclin dependent kinase inhibitor Sic1 is modulated by the carbon source in budding yeast. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 4(12), pp.1798-1807.
- Russo, A.A. et al., 1996. Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature*, 382(6589), pp.325-331.
- Ryan, K.J., McCaffery, J.M. & Wenthe, S.R., 2003. The Ran GTPase cycle is

- required for yeast nuclear pore complex assembly. *The Journal of Cell Biology*, 160(7), pp.1041-1053.
- Salama, S.R., Hendricks, K.B. & Thorner, J., 1994. G1 cyclin degradation: the PEST motif of yeast Cln2 is necessary, but not sufficient, for rapid protein turnover. *Molecular and Cellular Biology*, 14(12), pp.7953-7966.
- Santamaria, D. et al., 2007. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature*, 448(7155), pp.811-815.
- Sarkar, S. & Hopper, A.K., 1998. tRNA nuclear export in *Saccharomyces cerevisiae*: in situ hybridization analysis. *Molecular Biology of the Cell*, 9(11), pp.3041-3055.
- Sato, M. & Toda, Takashi, 2007. Alp7/TACC is a crucial target in Ran-GTPase-dependent spindle formation in fission yeast. *Nature*, 447(7142), pp.334-337.
- Schneider, B L et al., 1998. Yeast G1 cyclins are unstable in G1 phase. *Nature*, 395(6697), pp.86-89.
- Schneider, B L, Yang, Q.H. & Futcher, A.B., 1996. Linkage of replication to start by the Cdk inhibitor Sic1. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5261), pp.560-562.
- Schneider, Brandt L et al., 2004. Growth rate and cell size modulate the synthesis of, and requirement for, G1-phase cyclins at start. *Molecular and Cellular Biology*, 24(24), pp.10802-10813.
- Schweitzer, K. et al., 2005. The ubiquitin ligase SCFGrr1 is necessary for pheromone sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 22(7), pp.553-564.
- Schwob, E & Nasmyth, K, 1993. CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development*, 7(7A), pp.1160-1175.
- Schwob, E et al., 1994. The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell*, 79(2), pp.233-244.
- Segal, M. & Bloom, K., 2001. Control of spindle polarity and orientation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends in Cell Biology*, 11(4), pp.160-166.
- Sheu, Y.J. et al., 1998. Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 18(7), pp.4053-4069.
- Shibata, S. et al., 2006. Exportin-5 orthologues are functionally divergent among species. *Nucleic Acids Research*, 34(17), pp.4711-4721.
- Shih, J.L. et al., 2005. Cell polarity protein Spa2P associates with proteins involved in actin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 16(10), pp.4595-4608.
- Shimada, Y., Gulli, M.P. & Peter, M, 2000. Nuclear sequestration of the exchange factor Cdc24 by Far1 regulates cell polarity during yeast mating. *Nature Cell*

- Biology*, 2(2), pp.117-124.
- Shulga, N. et al., 1999. A nuclear export signal prevents *Saccharomyces cerevisiae* Hsp70 Ssb1p from stimulating nuclear localization signal-directed nuclear transport. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(23), pp.16501-16507.
- Sidorova, J.M., Mikesell, G.E. & Breeden, L L, 1995. Cell cycle-regulated phosphorylation of Swi6 controls its nuclear localization. *Molecular Biology of the Cell*, 6(12), pp.1641-1658.
- Simon, I. et al., 2001. Serial regulation of transcriptional regulators in the yeast cell cycle. *Cell*, 106(6), pp.697-708.
- Skotheim, J.M. et al., 2008. Positive feedback of G1 cyclins ensures coherent cell cycle entry. *Nature*, 454(7202), pp.291-296.
- Skowyra, D. et al., 1997. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell*, 91(2), pp.209-219.
- Stegmeier, F. & Amon, Angelika, 2004. Closing mitosi: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation. *Annual Review of Genetics*, 38, pp.203-232.
- Stern, B. & Nurse, P., 1996. A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosi in fission yeast. *Trends in Genetics: TIG*, 12(9), pp.345-350.
- Stewart, M., 2007. Ratcheting mRNA out of the nucleus. *Molecular Cell*, 25(3), pp.327-330.
- Strahl, T. et al., 2005. Yeast phosphatidylinositol 4-kinase, Pik1, has essential roles at the Golgi and in the nucleus. *The Journal of Cell Biology*, 171(6), pp.967-979.
- Strohmaier, H. et al., 2001. Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line. *Nature*, 413(6853), pp.316-322.
- Ström, A.C. & Weis, K, 2001. Importin-beta-like nuclear transport receptors. *Genome Biology*, 2(6), p.REVIEWS3008.
- Stuart, D. & Wittenberg, C, 1995. CLN3, not positive feedback, determines the timing of CLN2 transcription in cycling cells. *Genes & Development*, 9(22), pp.2780-2794.
- Sullivan, M. & Morgan, D.O., 2007. Finishing mitosi, one step at a time. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(11), pp.894-903.
- Sun, J. & Kong, D., 2010. DNA replication origins, ORC/DNA interaction, and assembly of pre-replication complex in eukaryotes. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 42(7), pp.433-439.
- Surana, U. et al., 1993. Destruction of the CDC28/CLB mitotic kinase is not required for the metaphase to anaphase transition in budding yeast. *The EMBO Journal*, 12(5), pp.1969-1978.

- Surana, U. et al., 1991. The role of CDC28 and cyclins during mitosi in the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell*, 65(1), pp.145-161.
- Taberner, Francisco J, Quilis, Inmaculada & Igual, J Carlos, 2009. Spatial regulation of the start repressor Whi5. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(18), pp.3010-3018.
- Taberner, Francisco José & Igual, Juan Carlos, 2010. Yeast karyopherin Kap95 is required for cell cycle progression at Start. *BMC Cell Biology*, 11, p.47.
- Takahata, S., Yu, Y. & Stillman, D.J., 2009. The E2F functional analogue SBF recruits the Rpd3(L) HDAC, via Whi5 and Stb1, and the FACT chromatin reorganizer, to yeast G1 cyclin promoters. *The EMBO Journal*, 28(21), pp.3378-3389.
- Takano, A., Endo, T. & Yoshihisa, T., 2005. tRNA actively shuttles between the nucleus and cytosol in yeast. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5731), pp.140-142.
- Tanaka, S. & Diffley, J.F.X., 2002. Deregulated G1-cyclin expression induces genomic instability by preventing efficient pre-RC formation. *Genes & Development*, 16(20), pp.2639-2649.
- Tanaka, T.U., Stark, M.J.R. & Tanaka, Kozo, 2005. Kinetochores capture and bi-orientation on the mitotic spindle. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(12), pp.929-942.
- Tcheperegine, S.E., Gao, X.-D. & Bi, Erfei, 2005. Regulation of cell polarity by interactions of Msb3 and Msb4 with Cdc42 and polarisome components. *Molecular and Cellular Biology*, 25(19), pp.8567-8580.
- Tjandra, H., Compton, J. & Kellogg, D., 1998. Control of mitotic events by the Cdc42 GTPase, the Clb2 cyclin and a member of the PAK kinase family. *Current Biology: CB*, 8(18), pp.991-1000.
- Toenjes, K.A., Sawyer, M.M. & Johnson, D I, 1999. The guanine-nucleotide-exchange factor Cdc24p is targeted to the nucleus and polarized growth sites. *Current Biology: CB*, 9(20), pp.1183-1186.
- Towpik, J. et al., 2008. Derepression of RNA polymerase III transcription by phosphorylation and nuclear export of its negative regulator, Maf1. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(25), pp.17168-17174.
- Tran, E.J. & Wentz, S.R., 2006. Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell*, 125(6), pp.1041-1053.
- Tyers, M, 1996. The cyclin-dependent kinase inhibitor p40SIC1 imposes the requirement for Cln G1 cyclin function at Start. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(15), pp.7772-7776.
- Tyers, M & Futcher, B, 1993. Far1 and Fus3 link the mating pheromone signal transduction pathway to three G1-phase Cdc28 kinase complexes. *Molecular and Cellular Biology*, 13(9), pp.5659-5669.

- Tyers, M & Jorgensen, P., 2000. Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10(1), pp.54-64.
- Tyers, M et al., 1992. The Cln3-Cdc28 kinase complex of *S. cerevisiae* is regulated by proteolysis and phosphorylation. *The EMBO Journal*, 11(5), pp.1773-1784.
- Uetz, P. et al., 2000. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 403(6770), pp.623-627.
- Ugolini, S. & Bruschi, C.V., 1996. The red/white colony color assay in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: epistatic growth advantage of white *ade8-18, ade2* cells over red *ade2* cells. *Current Genetics*, 30(6), pp.485-492.
- Vergés, E. et al., 2007. Cyclin Cln3 is retained at the ER and released by the J chaperone Ydj1 in late G1 to trigger cell cycle entry. *Molecular Cell*, 26(5), pp.649-662.
- Verma, R., Feldman, R.M. & Deshaies, R J, 1997. SIC1 is ubiquitinated in vitro by a pathway that requires CDC4, CDC34, and cyclin/CDK activities. *Molecular Biology of the Cell*, 8(8), pp.1427-1437.
- Visintin, R. et al., 1998. The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Molecular Cell*, 2(6), pp.709-718.
- Wagner, M.V. et al., 2009. Whi5 regulation by site specific CDK-phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS One*, 4(1), p.e4300.
- Wai, S.C., Gerber, S.A. & Li, R., 2009. Multisite phosphorylation of the guanine nucleotide exchange factor Cdc24 during yeast cell polarization. *PloS One*, 4(8), p.e6563.
- Walther, T.C. et al., 2003. RanGTP mediates nuclear pore complex assembly. *Nature*, 424(6949), pp.689-694.
- Wang, Hongyin et al., 2009. Recruitment of Cln3 cyclin to promoters controls cell cycle entry via histone deacetylase and other targets. *PLoS Biology*, 7(9), p.e1000189.
- Wang, Hongyin et al., 2004. Recruitment of Cdc28 by Whi3 restricts nuclear accumulation of the G1 cyclin-Cdk complex to late G1. *The EMBO Journal*, 23(1), pp.180-190.
- Wang, Yunmei et al., 2005. Cdc24 regulates nuclear shuttling and recruitment of the Ste5 scaffold to a heterotrimeric G protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(13), pp.13084-13096.
- Wäsch, R. & Cross, Frederick R, 2002. APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit. *Nature*, 418(6897), pp.556-562.
- Weinreich, M. et al., 2001. Binding of cyclin-dependent kinases to ORC and Cdc6p regulates the chromosome replication cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), pp.11211-11217.
- Weis, Karsten, 2003. Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport

- throughout the cell cycle. *Cell*, 112(4), pp.441-451.
- Willems, A R et al., 1996. Cdc53 targets phosphorylated G1 cyclins for degradation by the ubiquitin proteolytic pathway. *Cell*, 86(3), pp.453-463.
- Willems, Andrew R, Schwab, M. & Tyers, Mike, 2004. A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1695(1-3), pp.133-170.
- Wittenberg, C, Sugimoto, K. & Reed, S I, 1990. G1-specific cyclins of *S. cerevisiae*: cell cycle periodicity, regulation by mating pheromone, and association with the p34CDC28 protein kinase. *Cell*, 62(2), pp.225-237.
- Yaglom, J. et al., 1995. p34Cdc28-mediated control of Cln3 cyclin degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 15(2), pp.731-741.
- Yamaguchi, R. & Newport, J., 2003. A role for Ran-GTP and Crm1 in blocking re-replication. *Cell*, 113(1), pp.115-125.
- Yan, C., Lee, L.H. & Davis, L.I., 1998. Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *The EMBO Journal*, 17(24), pp.7416-7429.
- Yang, J & Kornbluth, S., 1999. All aboard the cyclin train: subcellular trafficking of cyclins and their CDK partners. *Trends in Cell Biology*, 9(6), pp.207-210.
- Yeong, F.M. et al., 2001. Early expressed Clb proteins allow accumulation of mitotic cyclin by inactivating proteolytic machinery during S phase. *Molecular and Cellular Biology*, 21(15), pp.5071-5081.
- Yoshida, K. & Blobel, G., 2001. The karyopherin Kap142p/Msn5p mediates nuclear import and nuclear export of different cargo proteins. *The Journal of Cell Biology*, 152(4), pp.729-740.
- Zachariae, W. & Nasmyth, K, 1999. Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes & Development*, 13(16), pp.2039-2058.