



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Doctorado en Biomedicina y Biotecnología

**Regulación del factor transcripcional Whi7 y la
proteínquinasa C en el proceso de *Start* y el
checkpoint de integridad del DNA**

Ester Méndez Belinchón

Directores de la Tesis Doctoral

Juan Carlos Igual García

Inmaculada Quilis Bayarri

Valencia, septiembre de 2019

D. Juan Carlos Igual García, Doctor en Ciencias Químicas, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas e investigador de la Estructura de Recerca Interdisciplinar en Biotecnología y Biomedicina (ERI BIOTECMED), de la Universidad de Valencia, como director, Dña Inmaculada Quilis Bayarri, Doctora en Bioquímica, Profesora Asociada del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas e investigadora de la ERI BIOTECMED, de la Universidad de Valencia, como codirectora, y D. Francisco Estruch Ros, Doctor en Ciencias Biológicas, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia, como tutor académico,

INFORMAN que Dña. Ester Méndez Belinchón, graduada en Bioquímica y Ciencias Biomédicas por la Universidad de Valencia, ha realizado, bajo la dirección de los profesores Juan Carlos Igual e Inmaculada Quilis, la tesis doctoral titulada “Regulación del factor transcripcional Whi7 y la proteínquinasa C en el proceso de *Start* y el *checkpoint* de integridad del DNA”, y que una vez concluida, autorizan su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

Y para que conste, en cumplimiento de la legislación, firman el presente informe en Burjassot, a 27 de septiembre de 2019.

Juan Carlos Igual García

Inmaculada Quilis Bayarri

Francisco Estruch Ros

Dicen que gran parte la educación se recibe en casa y en el colegio, de la mano de tus padres y profesores. En mi caso una parte muy importante no sólo de esa educación, sino también de mi forma de ser y de mi forma de pensar se la debo **A MIS ABUELOS**, por eso esto os lo dedico a vosotros.

**“La inteligencia es la capacidad de adaptarse al cambio”
(Stephen Hawking)**

Gracias a todas aquellas personas que han contribuido de un modo u otro a la realización de este trabajo y a mi formación como investigadora durante todos estos años.

A los doctores Juan Carlos Igual e Inma Quilis, directores de la tesis, por todos sus consejos y por intentar guiarme siempre en la dirección correcta.

A todos los miembros del laboratorio de Ciclo Celular, por su ayuda y su compañerismo.

A todo el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València.

Para la realización de esta Tesis Doctoral, Ester Méndez Belinchón ha disfrutado de un contrato predoctoral VALi+D de la Generalitat Valenciana. Este trabajo ha sido financiado por el Gobierno de España y cofinanciado por el FEDER de la Unión Europea (referencia BFU2013-47503, BFU2014-58429-P y BFU2017-88692-P) y por la Generalitat Valenciana (referencia GVPROMETEO2016-123).



Tras las formalidades... Vienen los agradecimientos reales.

Después de todos estos años, el esfuerzo, el aprendizaje, los buenos y los no tan buenos momentos... Quién me iba a decir a mi que al final del camino parece que todo haya pasado volando, en un abrir y cerrar de ojos. De esta experiencia me llevo muchas cosas, no sólo a nivel académico, sino también a nivel personal. Por ese motivo lo que viene a continuación va para todas esas personas que han estado conmigo durante este proceso:

Gracias, de nuevo, al Gran Nube Negra (conocido también como Juan Carlos), por su enorme positividad ante cualquier situación, por enseñarme a pensar y a aplicar (como él dice) el sentido común, pero sobre todo por transmitirme su pasión por la ciencia y, en concreto, por la buena ciencia.



Aunque a veces pensar como tu no haya sido la mejor opción para mi salud mental... ¡Al final conseguimos llegar a la orilla!



Gracias, gracias y más gracias a Inma. ¡Menudo trayecto desde los inicios! Esos bocadillos de chorizo que hicieron nuestra relación más estrecha 😂😂. Para mi no has sido solo la directora de mi tesis, sino también una persona en quien buscar consejo, apoyo y ayuda en todos los ámbitos. Como ya te dije una vez, mil gracias por haberme acompañado en este largo camino y levantarme el ánimo en estos últimos meses.

Gracias a Mari Carmen, por su alegría, su optimismo y por llevar siempre esa sonrisa que hace más llevaderos los momentos más complicados.

Gracias a todos mis compañeros y excompañeros de laboratorio: María y Carlos, por enseñarme en mis inicios; Salva, Mai, Flora, Antonio, Laura y todos los alumnos internos que han pasado por el laboratorio (que han sido muchos), por haber creado un gran ambiente de trabajo y por el compañerismo; a Cris, por recoger el legado de Whi7 y traer su alegría y ganas de superación al laboratorio; a mi Sara, por

acompañarme (casi) desde el principio en esta andadura, por las risas, los lloros, las cervezas y los viajes, no te acompañaré hasta el final del camino pero sabes que estaré ahí para lo que necesites; y a Mercè, por llegar al laboratorio y revolucionarlo todo, lo que aprendí gracias a ti en tan poco tiempo es una de las cosas que más valoro, junto con tu amistad y las cervezas que nos han unido *around the world*.

Por su puesto, gracias también a mis amig@s, que me han apoyado, me han escuchado (aunque no entendieran ni papa de lo que les hablaba) y a los que, por fin y después de mucho tiempo, les pude sorprender con la noticia de que había depositado la tesis!!

Y por último, los más importantes:

Gracias a mis padres, porque soy lo que soy y he llegado hasta aquí gracias, en gran parte, a vosotros, a vuestra ayuda, a vuestro apoyo incondicional y por creer en mi siempre. Os quiero.

Gracias a Óscar, el diseñador de la portada 🐧, por sorprenderme siempre con el sonido de mi risa, por la energía y la ilusión que le pones a todo lo que haces (menos por las mañanas 😂), por hacerme sentir y creer que soy capaz de todo y que juntos nos comeremos el mundo y, en definitiva, por estar ahí siempre y darle un toque de color a todo. Te quiero.

ÍNDICE

1. Introducción	1
El ciclo celular de <i>S. cerevisiae</i>	2
Reguladores clave del ciclo celular.....	4
CDKs	4
Ciclinas	5
CKIs	6
Dinámica del ciclo celular	7
Transcripción periódica en el ciclo celular	8
Degradación de proteínas en el control del ciclo celular	9
Transcripción en la transición G1/S.....	11
Los factores transcripcionales SBF y MBF	13
Regulación del programa transcripcional de G1/S	14
La proteína Whi7	17
Regulación espacial de la maquinaria de <i>Start</i>	19
El <i>checkpoint</i> de daño en el DNA.....	20
La ruta de la proteína quinasa C o ruta de integridad de la pared celular en <i>S. cerevisiae</i>	22
La proteína quinasa C	24
La cascada MAPK	26
Programa transcripcional de la ruta de integridad de la pared celular	27
El factor de transcripción Rlm1	28
El factor de transcripción SBF.....	28
El complejo Paf1	29
Otras funciones de la ruta de integridad de la pared celular	30
Regulación del ciclo celular	30
Regulación del <i>checkpoint</i> de integridad del DNA.....	32
La superfamilia de la proteína quinasa C de mamíferos	33
Clasificación y estructura.....	33
Regulación	35
La proteína quinasa C δ de mamíferos	37
Regulación	37
Fosforilación en residuos de Ser/Thr necesarios para la estabilización del lazo de activación	38

Fosforilaciones en residuos de Tyr	39
Corte proteolítico mediado por caspasas	39
Localización subcelular	40
Función biológica.....	40
2. Material y Métodos	43
Técnicas en <i>Escherichia coli</i>	43
Cepas de <i>E. coli</i> y condiciones de crecimiento	43
Protocolo de transformación	43
Mutagénesis dirigida	43
Plásmidos	44
Técnicas en <i>S. cerevisiae</i>	47
Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	47
Condiciones de crecimiento	50
Protocolo de transformación	52
Análisis del tamaño celular	52
Determinación del índice de gemación.....	52
Western blot	53
Ensayos de estabilidad de proteínas.....	54
Tratamiento con fosfatasa λ	54
Co-inmunoprecipitación de proteínas	54
Análisis de expresión génica	55
Ensayos de actividad β -galactosidasa.....	55
Co-inmunoprecipitación de cromatina	56
Técnicas de microscopía de fluorescencia	57
Inmunofluorescencia indirecta.....	57
Localización de proteínas in vivo con marcaje GFP.....	58
3. Regulación de la estabilidad de Whi7 a lo largo del ciclo celular	59
El nivel de la proteína Whi7 y su estado de fosforilación están regulados a lo largo del ciclo celular	59
Whi7 es una proteína inestable que es degradada principalmente vía SCF ^{Grr1}	63
La estabilidad de Whi7 está regulada a lo largo del ciclo celular.....	67
La estabilidad de Whi7 está controlada por fosforilación por Cdc28 ..	67
Análisis de la implicación de la fosfatasa Cdc14 en la defosforilación de Whi7	72

4. Whi7 es un represor del programa transcripcional de <i>Start</i>	75
Whi7 tiene una función independiente de Cln3 en la represión de <i>Start</i>	75
Whi7 se asocia a los promotores de genes de <i>Start</i> en G1	76
Whi7 se une al factor transcripcional SBF.....	80
La sobreexpresión de Whi7 bloquea <i>Start</i> en células mutantes <i>cln3</i> ..	81
El papel de Whi7 en <i>Start</i> depende de la presencia de SBF.....	84
La sobreexpresión de Whi7 suprime el fenotipo de un mutante <i>whi5</i>	86
5. Estudio paralelo de los represores transcripcionales Whi7 y Whi5	87
Whi5 tiene un papel predominante en la regulación de <i>Start</i>	88
Comparación de los niveles celulares de Whi7 y Whi5.....	91
Análisis comparativo de la unión de Whi7 y Whi5 a promotores de genes diana	93
Determinantes diferenciales en la unión de Whi7 y Whi5 a promotores	95
Localización diferencial de Whi7 y Whi5.....	100
6. Conexión de Whi7 con la ruta PKC	109
La ruta PKC controla los niveles celulares de Whi7, pero no los de Whi5.....	109
Efecto de elevadas temperaturas en la regulación y función celulares de Whi7 y Whi5.....	115
Efecto del Congo Red en la regulación y función celulares de Whi7 y Whi5.....	117
Conexión de Whi7 con la respuesta estreses genotóxicos	123
La isoforma PKC δ de mamíferos es capaz de controlar los niveles celulares de Whi7.....	127
7. Uso de la levadura <i>S. cerevisiae</i> para el estudio de la función de PKCδ de mamíferos en el <i>checkpoint</i> de integridad del DNA	131
PKC δ suprime parcialmente el defecto de crecimiento de cepas mutantes <i>pkc1</i>	131
Estudio de la localización subcelular de PKC δ	134
Estudio de la activación del <i>checkpoint</i> de integridad del DNA por PKCs noveles	135
Implicación de residuos fosforilados del lazo de activación de PKC δ en la activación del <i>checkpoint</i> de integridad del DNA.....	137

Implicación de la hélice A de PKC δ en la activación del <i>checkpoint</i> de integridad del DNA.....	138
Implicación de residuos de Tyr fosforilados de PKC δ en la activación del <i>checkpoint</i> de integridad del DNA.....	141
8. Discusión	143
Regulación de Whi7 a lo largo del ciclo celular	143
Whi7 es un represor del programa transcripcional de <i>Start</i>	146
Comparación del mecanismo de asociación a promotores de los represores transcripcionales de <i>Start</i> Whi7 y Whi5.....	148
Regulación de la localización de los represores transcripcionales de <i>Start</i> Whi7 y Whi5	153
Regulación del represor transcripcional de <i>Start</i> Whi7 por la ruta PKC	154
Conexión de Whi7 y la respuesta a estrés genotóxico.....	156
Whi7 y Whi5: un juego de dos	157
Función de PKC δ en el <i>checkpoint</i> de integridad del DNA	159
9. Conclusiones	166
10. Bibliografía	167

1. Introducción

La proliferación celular es la base de la propagación de la vida, constituyendo un proceso fundamental para el desarrollo y la función de todos los organismos. Así, en organismos unicelulares la división celular genera un nuevo organismo completo, mientras que en el desarrollo de organismos pluricelulares incontables divisiones celulares transforman una única célula en los diversos tipos celulares que forman tejidos y órganos. En organismos adultos, la división celular proporciona las células que reemplazan a aquellas que mueren por causas naturales o por daños ambientales. La división celular de forma precisa es posible gracias al ciclo celular, un proceso trascendental sujeto a sofisticados sistemas moleculares de control, altamente conservados en todos los organismos eucariotas. Por ello, entender cómo las células se dividen de un modo eficiente y preciso constituye un campo de estudio central en investigación.

Las células completan cuatro procesos básicos al final de cada ciclo celular: crecer, replicar el DNA, segregar los cromosomas en dos conjuntos iguales y dividirse. El ciclo celular estándar se divide en cuatro fases: fase S o de síntesis, durante la cual se replica el DNA y los cromosomas se duplican; fase M, constituida por dos grandes eventos, la mitosis, en la que tiene lugar la división nuclear y la segregación de los cromosomas, y la citocinesis, en la cual las células se dividen; y las fases G1 y G2, conocidas como fases *gap*, entre las fases S y M, respectivamente, las cuales proporcionan el tiempo necesario para el crecimiento celular y funcionan como importantes transiciones reguladoras, en las que la progresión a la siguiente etapa del ciclo celular puede controlarse mediante señales intracelulares y extracelulares.

El sistema de control del ciclo celular está compuesto por diversos puntos de control que garantizan que los diferentes eventos ocurran en el momento y el orden correctos (David O. Morgan, 2007). Para cualquier célula, entrar en un nuevo ciclo de división es una decisión irreversible. La transición entre las fases del ciclo G1 y S es conocida como *Start* en células de levadura o punto de restricción en células de mamífero y es el punto clave de control para entrar en una nueva ronda de división celular. Otros puntos de control fundamentales son la transición G2/M o de entrada en mitosis y la transición metafase-anafase, acoplada a la salida de mitosis. Por otro lado, el principal objetivo del ciclo celular es la transmisión fidedigna del material genético a las células descendientes. Por este motivo las células eucariotas han desarrollado complejos mecanismos de vigilancia que responden a daños en el DNA para salvaguardar la integridad de su genoma. Estos mecanismos incluyen los *checkpoints* de daño en el DNA y de replicación, denominados conjuntamente como *checkpoint* de integridad del DNA (Lanz et al., 2019). Los mecanismos moleculares que integran *Start* y el *checkpoint* de integridad genómica son cruciales en el mantenimiento de la viabilidad celular y en la prevención del desarrollo de importantes enfermedades humanas, como el cáncer.

Diversos organismos modelo se han empleado para profundizar en la comprensión de la proliferación celular. Entre ellos, destaca un organismo unicelular, como es el caso de la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*. Diferentes razones han hecho de ella un organismo modelo clave para la comprensión y la caracterización del funcionamiento del ciclo celular, como la gran disponibilidad de herramientas genéticas y moleculares, su facilidad de cultivo, la existencia de una fase haploide estable que facilita su modificación genética y su corto ciclo de vida debido a su alta velocidad de división celular (Duina et al., 2014).

EL CICLO CELULAR DE *S. CEREVISIAE*

La levadura *S. cerevisiae* prolifera mediante gemación, hecho que resulta de gran utilidad ya que la aparición y el tamaño de la yema sirven como marcadores morfológicos de las diferentes fases del ciclo celular (Figura 1.1). La yema aparece al final de G1 y crece continuamente a lo largo de las fases S y M hasta que alcanza un tamaño ligeramente más pequeño que el de la célula madre. Tras la distribución de los orgánulos y una copia del genoma

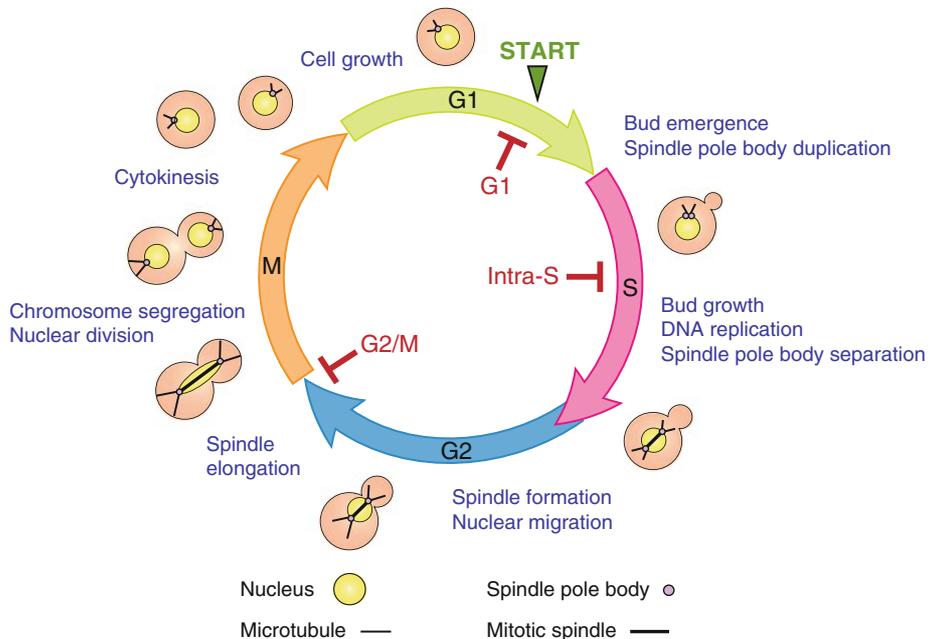


Figura 1.1. Representación del ciclo celular y el *checkpoint* de integridad del DNA de *S. cerevisiae* (Adaptada de Finn et al., 2012). En rojo se indican los tres *checkpoints* de daño en el DNA.

en la yema al finalizar la mitosis, la célula hija se separa de la célula madre mediante citocinesis.

El punto de control más importante del ciclo celular en *S. cerevisiae* es *Start*, puesto que coordina el crecimiento con la división celular. En *Start* las células de levadura integran señales ambientales e internas y si han crecido lo suficiente y las condiciones ambientales son apropiadas deciden entonces iniciar un nuevo ciclo celular. Una vez ejecutado *Start* la célula comienza un nuevo ciclo de división celular poniendo en marcha tres procesos: la gemación, la duplicación del SPB (*Spindle Pole Body*), equivalente al centrosoma en células de mamífero, y el inicio de la replicación del DNA (Fisher, 2016; Johnson and Skotheim, 2013). Por el contrario, si las condiciones ambientales son desfavorables se produce la parada del ciclo celular en fase G1 y si esta situación perdura en el tiempo la célula ingresa en un estado de no división o reposo, denominado fase G0 (Honigberg, 2016). En el caso de células haploides que se encuentran expuestas a feromonas, en *Start* se produce la parada del ciclo celular y se activa el proceso de conjugación o reproducción sexual. Por otra parte, en el caso de células diploides, en

condiciones de crecimiento en las que los nutrientes son limitados, el punto de control *Start* da paso a la esporulación.

Reguladores clave del ciclo celular

En el centro de los mecanismos que regulan el ciclo celular se encuentra una familia de enzimas denominadas CDKs (*Cyclin-dependent kinases*) o quinasas dependientes de ciclina (Malumbres, 2014). La actividad quinasa de estas enzimas oscila a lo largo del ciclo dependiendo de su asociación a proteínas activadoras, las ciclinas, y a proteínas inhibidoras, los CKIs (*Cdk inhibitor proteins*) y de su estado de fosforilación en determinados residuos de Thr y Tyr (David O. Morgan, 2007).

CDKs

En la levadura *S. cerevisiae* existen seis CDKs: Cdc28, Pho85, Kin28, Srb18/Cdk8, Sgv1/Bur1 y Ctk1. De todas ellas, solo Cdc28 es esencial en el control de los eventos del ciclo celular, siendo la máxima responsable de controlar las transiciones G1/S y G2/M (Enserink and Kolodner, 2010; Mendenhall and Hodge, 1998). La activación de la CDK Cdc28 requiere, además de su asociación a ciclinas, de la fosforilación del residuo Thr¹⁶⁹ cercano al sitio activo, lo que permite que la enzima sea completamente activa. Esta fosforilación tiene lugar antes de la asociación de Cdc28 con las ciclinas y es llevada a cabo por una enzima CAK (*Cdk-activating kinase*) que recibe el nombre de Cak1 o Civ1. Por otra parte, la inactivación de Cdc28 está controlada por su asociación con CKIs y también por fosforilación del residuo Tyr¹⁹. La quinasa Swe1 y la fosfatasa Mih1 son las responsables de controlar el estado de fosforilación de este residuo. Cdc28 ejerce su función regulando los distintos eventos del ciclo celular mediante la fosforilación de una gran cantidad de proteínas. Estos sustratos son fosforilados por Cdc28 en residuos de Ser o Thr en un contexto de secuencia específico. La secuencia de fosforilación típica de Cdc28 es [S/T]PX[K/R].

Además de Cdc28, se ha relacionado a otra CDK con el control del ciclo celular, Pho85 (Huang et al., 2007; Moffat et al., 2000). Históricamente Pho85 había sido estudiada en relación a diversos procesos celulares, como la polaridad celular, la expresión génica, el metabolismo de fosfato y glucógeno y la señalización en respuesta a cambios ambientales (Carroll and O'Shea, 2002). Más recientemente se ha identificado que Pho85 también está involucrada en

la regulación de la transición G1/S, aunque, a diferencia de Cdc28, esta CDK no es esencial para la célula y juega un papel más secundario (Jiménez et al., 2013). Como Cdc28, la activación de Pho85 también requiere de su asociación a ciclinas y ejerce sus efectos mediante la fosforilación de una gran cantidad de proteínas. Pho85 fosforila preferentemente la secuencia consenso [S/T]PX[I/L].

Ciclinas

Las ciclinas son una familia de proteínas cuya característica definitoria es la unión y activación de la CDK. Todas ellas tienen en común la existencia de una región de aproximadamente 100 aminoácidos conocida como la caja ciclina, responsable de la unión y activación de dicha quinasa. Además de activar a la CDK, las ciclinas participan en el direccionamiento de la quinasa a sus sustratos específicos, ya sea mediante la unión y el reconocimiento directo de dichos sustratos o mediante la localización de la CDK en compartimentos subcelulares concretos en los que se encuentran dichos sustratos (Bloom and Cross, 2007; Kõivomägi and Loog, 2011; Loog and Morgan, 2005).

En *S. cerevisiae* existen 9 ciclinas que se asocian a Cdc28 y se dividen en cuatro clases según el momento del ciclo celular en el que tiene lugar su expresión y las funciones que desempeñan (Andrews and Measday, 1998; Enserink and Kolodner, 2010; Mendenhall and Hodge, 1998). La primera clase está formada por la ciclina de G1 Cln3, la cual solo experimenta pequeños cambios en su expresión, por lo que los niveles de proteína son prácticamente constantes a lo largo del ciclo celular. Cln3 contribuye al control de la entrada en el ciclo celular y participa en la coordinación del crecimiento celular con la entrada en un nuevo ciclo de división. Por otra parte, se encuentran las ciclinas de G1/S (Cln1 y Cln2), las ciclinas de fase S (Clb5 y Clb6) y las ciclinas de fase M (Clb1, Clb2, Clb3 y Clb4), cuya expresión es periódica a lo largo del ciclo celular, por lo que sus niveles oscilan fuertemente durante el mismo (Breedon, 2000). Todas ellas participan directamente en el control de los distintos eventos que tienen lugar para poder avanzar en el ciclo celular. La función principal de las ciclinas de G1/S es desencadenar la progresión del ciclo ejecutando *Start* y poniendo en marcha los procesos que conducen a la replicación del DNA y la duplicación del SPB. Las ciclinas de fase S estimulan directamente la replicación del DNA. Las ciclinas de fase M son las responsables del ensamblaje del huso mitótico y el alineamiento de las

cromátidas hermanas durante la metafase y su desaparición en anafase contribuye a la salida de mitosis y la citoquinesis.

Por otra parte, existen 10 ciclinas que se asocian a Pho85 y que se agrupan en dos familias según la similitud de secuencia de la caja ciclina (Huang et al., 2007), la familia Pho80 (formada por Pho80, Pcl6, Pcl7, Pcl8 y Pcl10) y la familia Pcl1,2 (formada por Pcl1, Pcl2, Pcl5, Pcl9 y Clg1). Los miembros de la familia Pho80 junto con Pcl5 participan principalmente en la regulación del metabolismo y la detección de cambios ambientales (Smets et al., 2010). Por el contrario, el resto de los miembros de la familia Pcl1,2 muestran, de forma similar a como ocurre con las ciclinas que se asocian a Cdc28, un patrón de expresión altamente controlado a lo largo del ciclo celular (a excepción de Clg1) que se correlaciona con la función de Pho85 en una fase particular del mismo (Jiménez et al., 2013). Así, Pcl9 se expresa al final de mitosis y durante el inicio de G1, la expresión de Pcl2 tiene lugar desde el final de mitosis hasta el final de G1 y Pcl1 se expresa hacia el final de G1.

CKIs

Los CKIs son un grupo de proteínas cuya característica definitoria es la unión e inhibición de complejos CDK-ciclina (De Clercq and Inzé, 2006). También son importantes para promover la parada del ciclo celular en fase G1 en respuesta a condiciones ambientales desfavorables o señales intracelulares como el daño en el DNA.

En *S. cerevisiae* existen tres CKIs de Cdc28: Sic1, Far1 y Cip1. Todas estas proteínas se sintetizan al final de mitosis y Sic1 y Far1 se degradan en G1 tardío debido a su fosforilación por los complejos Cdc28-ciclina de G1/S (Chang et al., 2017; Enserink and Kolodner, 2010). Sic1 inhibe los complejos Cdc28-Clb (Schwob et al., 1994), participa en el control del inicio de la fase S y es crucial para la salida de mitosis. Far1 inhibe los complejos Cdc28-Cln en respuesta a feromonas (Peter and Herskowitz, 1994) y se ha sugerido que también participa coordinando crecimiento y ciclo celular durante el proceso de gemación (Alberghina et al., 2004). Por su parte, Cip1 ha sido identificado en los últimos años como un regulador negativo de complejos Cdc28-Cln, cuya actividad aumenta en respuesta a cambios ambientales como el estrés osmótico (Chang et al., 2017; Ren et al., 2016).

Dinámica del ciclo celular

El control del ciclo celular se basa en la activación de diferentes complejos CDK-ciclina, que aparecen en ondas sucesivas de actividad quinasa a lo largo del ciclo, garantizando el orden y la alternancia de los procesos (Enserink and Kolodner, 2010; Mendenhall and Hodge, 1998; Nasmyth, 1996a). Cada complejo CDK-ciclina promueve la activación del siguiente complejo CDK-ciclina. Los complejos CDK-ciclina junto con el resto de reguladores implicados en la progresión del ciclo hacen del sistema de control del ciclo celular un mecanismo robusto, cuya eficacia se ve reforzada por lazos de retroalimentación que conducen a la activación e inactivación irreversible de la mayoría de los complejos CDK-ciclina, por interacciones reguladoras entre los diferentes complejos CDK-ciclina que aseguran su aparición de forma ordenada, por otros mecanismos que permiten la activación/inactivación de los complejos CDK-ciclina y por la capacidad de adaptación del propio sistema de control del ciclo celular a cambios intracelulares y extracelulares (David O. Morgan, 2007; Li et al., 2004b).

En la [Figura 1.2](#) se muestra una visión general de la dinámica de activación de los diferentes complejos CDK-ciclina a lo largo del ciclo celular en *S. cerevisiae*. Durante G1 la célula se encuentra en un estado de baja actividad quinasa Cdc28, ya que Cln3 es la única ciclina presente en la célula. Al final de

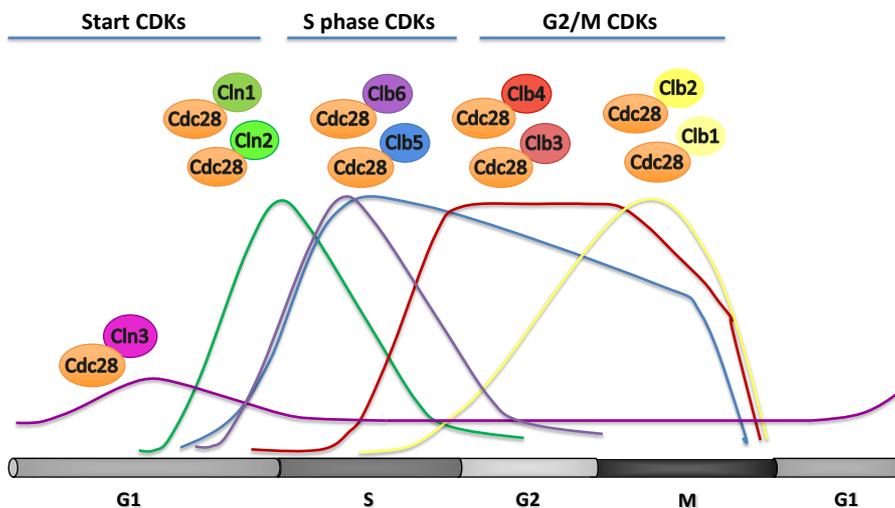


Figura 1.2. Ondas de actividad quinasa CDK-ciclina a lo largo del ciclo celular en *S. cerevisiae*.

G1, Cdc28-Cln3 promueve la ejecución de *Start* y la entrada en una nueva ronda de división celular al activar la transcripción de los genes *CLN1*, *CLN2* y *CLB5*, *CLB6* mediante los factores de transcripción SBF y MBF, respectivamente (Bertoli et al., 2013). La síntesis de Cln1 y Cln2 promueve la aparición de las actividades quinasa de G1/S Cdc28-Cln1, 2 responsables de estimular procesos post-*Start*, inducen la degradación del inhibidor de complejos Cdc28-Clb Sic1 e inactivan la degradación de ciclinas Clb. Como consecuencia, aparecen las actividades quinasa de fase S Cdc28-Clb5, 6, responsables de controlar la síntesis del DNA (Bell and Labib, 2016; Johnson and Skotheim, 2013). Hacia mitad de la fase S, al mismo tiempo que tiene lugar la separación de los SPBs, surgen las actividades quinasa Cdc28-Clb3, 4, responsables del control de la formación del huso mitótico. Poco después, conforme el ensamblaje del huso mitótico avanza, se acumulan las actividades quinasa Cdc28-Clb1, 2. Las actividades quinasa Cdc28-Clb1-4 en su conjunto se encargan de supervisar el progreso de la mitosis, controlando la segregación de las cromátidas hermanas, la elongación del propio huso mitótico y promoviendo el cambio de crecimiento polarizado a isotrópico en la zona de la yema (Howell and Lew, 2012; Marston, 2014). La acumulación del inhibidor Sic1 hacia el final de mitosis, junto con la degradación de las ciclinas Clb, conduce a la inactivación de las actividades quinasa Cdc28-Clb. De esta forma, se completan los procesos de mitosis y citoquinesis, dando por finalizada la división celular y volviendo al punto de partida en el que la actividad quinasa Cdc28 es baja (Queralt and Uhlmann, 2008; Stegmeier and Amon, 2004; Sullivan and Morgan, 2007).

La actividad de los diversos complejos CDK-ciclina a lo largo del ciclo celular está determinada fundamentalmente por los niveles existentes de ciclinas y de inhibidores en cada momento. Dos mecanismos moleculares son los principales responsables del control de los niveles de estos reguladores del ciclo celular: la regulación de la transcripción génica y el control de la estabilidad de proteínas.

Transcripción periódica en el ciclo celular

La expresión coordinada de diferentes grupos de genes cuyos productos están implicados en procesos específicos del ciclo celular es una estrategia muy frecuente en *S. cerevisiae* para asegurar la sucesión ordenada de eventos que permiten la progresión del ciclo (Benanti, 2016; McInerney,

2011). El máximo de expresión de estos genes coincide en la mayoría de los casos con el momento del ciclo celular en el cual se necesitan sus productos. A lo largo del ciclo celular existen varias ondas de expresión periódica que controlan la expresión de reguladores clave necesarios para controlar el progreso del ciclo celular en cada fase. Diversos factores de transcripción contribuyen a organizar estas ondas de expresión (Breedon, 2003; Haase and Wittenberg, 2014). La expresión génica en *Start* depende de los factores transcripcionales SBF y MBF, en fase S del factor de transcripción Hcm1, en la transición G2/M y durante mitosis del complejo Mcm1-Fkh1/2-Ndd1, hacia el final de mitosis Swi5 y Ace2 y al inicio de G1 Mcm1 (Figura 1.3). Las diferentes ondas de expresión génica se suceden de forma encadenada y dependen de las diferentes actividades CDK-ciclina, que regulan la función de los diversos factores transcripcionales a lo largo del ciclo celular.

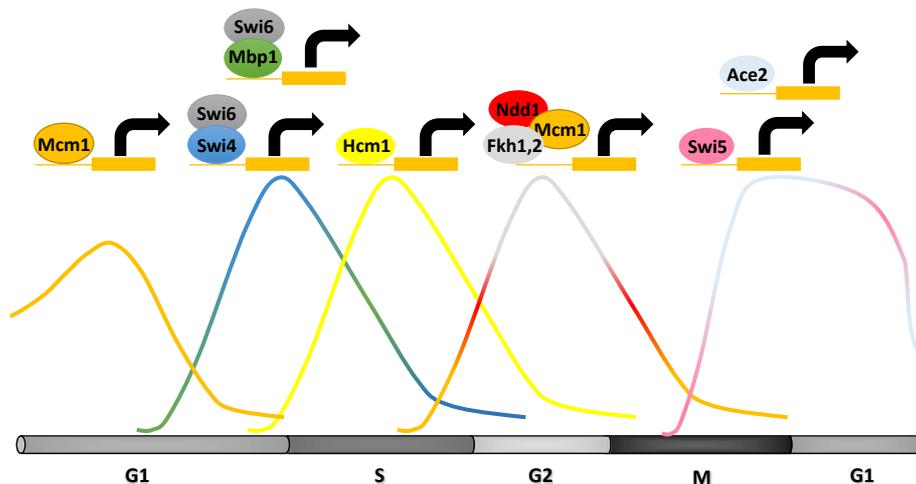


Figura 1.3. Ondas transcripcionales a lo largo del ciclo celular en *S. cerevisiae*.

Degradación de proteínas en el control del ciclo celular

La degradación de muchos de los reguladores del ciclo celular mediante proteólisis es un mecanismo fundamental en el control de las transiciones entre las distintas fases del ciclo celular. De hecho, muchos de los procesos con más relevancia en el control del ciclo celular están gobernados por este mecanismo, como la baja actividad quinasa Cdc28 en G1, la

activación irreversible de las actividades quinasa Cdc28-Clb5, 6 al final de G1 o la transición metafase-anafase.

La proteólisis de ciclinas, CKIs y otros reguladores del ciclo celular se produce por ubiquitinación de estas proteínas, que posteriormente son reconocidas y degradadas por el proteasoma (Finley et al., 2012). En el proceso de ubiquitinación interviene en primer lugar una enzima activadora de la molécula de ubiquitina (E1), la cual se une a dicha molécula. Después, una enzima conjugadora de ubiquitina (E2) se asocia a la molécula de ubiquitina conjugada a E1 y cataliza la transferencia de dicha molécula desde E1 a sí misma. Por último, una enzima ubiquitina-ligasa (E3) cataliza la transferencia de la molécula de ubiquitina desde E2 al grupo amino de un residuo de Lys de una proteína diana. Este proceso se repite tantas veces como sea necesario hasta lograr una cadena de moléculas de ubiquitina en la proteína diana suficientemente larga como para ser reconocida por el proteasoma. Las ubiquitina-ligasas son generalmente las enzimas más importantes en la regulación de la maquinaria de ubiquitinación, ya que son los determinantes primarios de la especificidad para la ubiquitinación de las diferentes proteínas diana y porque catalizan el paso limitante en este proceso. Existen dos ubiquitina-ligasas implicadas en la degradación de sustratos de ciclo celular: SCF y APC (Nakayama and Nakayama, 2006; Skaar and Pagano, 2009).

El complejo SCF (Skp1, Culina/Cul1, proteína *F-box*) está formado por cuatro subunidades: Skp1, Cdc53, Rbx1/Hrt1 y la proteína *F-box* (Willems et al., 2004). La proteína *F-box* recibe su nombre debido a la existencia de una secuencia de aminoácidos denominada caja F en su secuencia y es la subunidad responsable del reconocimiento del sustrato y, por tanto, de la especificidad del complejo SCF. Existen principalmente dos proteínas *F-box* encargadas del reconocimiento de sustratos de ciclo celular: Cdc4 y Grr1. Cdc4 y Grr1 reconocen las proteínas diana a través de sus dominios WD40 y repeticiones ricas en leucina (LRR), respectivamente, implicados en interacciones proteína-proteína. Las proteínas diana del complejo SCF contienen regiones PEST (ricas en Pro, Glu, Ser y Thr) en su secuencia, características de proteínas inestables. Las proteínas *F-box* únicamente reconocen sustratos fosforilados, ya sea en un residuo específico o en un conjunto de residuos (Koivomagi et al., 2011; Willems et al., 2004). El

complejo SCF es activo y participa en la degradación de sustratos durante todo el ciclo celular, pero destaca en el control de la transición G1/S (DeSalle and Pagano, 2001). Así, durante esta transición, SCF^{Grr1} degrada principalmente las ciclinas Cln1 y Cln2, mientras que SCF^{Cdc4} degrada principalmente los CKIs Sic1 y Far1. Sin embargo, pueden existir sustratos cuya degradación se solape y puedan ser reconocidos tanto por SCF^{Grr1} como por SCF^{Cdc4} (Landry et al., 2012).

El complejo APC (*Anaphase-Promoting Complex*) es un complejo de elevada masa molecular formado por trece subunidades (Barford, 2011; Peters, 2006). La ubiquitinación mediada por esta ubiquitina-ligasa está regulada por las subunidades activadoras Cdc20 y Cdh1 que se asocian al complejo APC en diferentes etapas del ciclo celular, promoviendo su actividad al unir los diferentes sustratos. Las proteínas diana del complejo APC contienen uno o dos motivos en su secuencia reconocidos por Cdc20 y Cdh1: *D-box* (caja destructora) y *KEN-box*. El complejo APC solo es activo desde la transición metafase-anafase hasta la transición G1/S, periodo durante el cual promueve la degradación de inhibidores de anafase y de ciclinas mitóticas. La actividad del complejo APC se regula mediante fosforilación y unión de las subunidades activadoras Cdc20 y Cdh1. El *checkpoint* del huso acromático restringe la actividad de APC^{Cdc20} hasta que tiene lugar el alineamiento de los cromosomas en el huso. En ese momento APC^{Cdc20} inicia el proceso de mitosis al degradar la securina Pds1 y permitir la segregación de las cromátidas hermanas (Peters, 2002). Otra diana de APC^{Cdc20} son las ciclinas mitóticas, lo que conduce a una disminución de la fosforilación y actividad de la propia ubiquitina ligasa APC^{Cdc20}. En la transición M/G1 se activa APC^{Cdh1}, responsable de la degradación de Cdc20. APC^{Cdh1} es activo durante G1 hasta que se ejecuta *Start*, momento en el que las actividades quinasa Cdc28-Cln de G1/S fosforilan a Cdh1 disociándolo de APC.

TRANSCRIPCIÓN EN LA TRANSICIÓN G1/S

Como ya se ha indicado, en *S. cerevisiae* *Start* representa el mayor punto de control del ciclo celular, en el que una célula decide si inicia una nueva ronda de división celular en función de estímulos externos e internos. Este punto de control garantiza que la homeostasis del tamaño celular se mantenga generación tras generación (Aldea et al., 2017; Ewald, 2018).

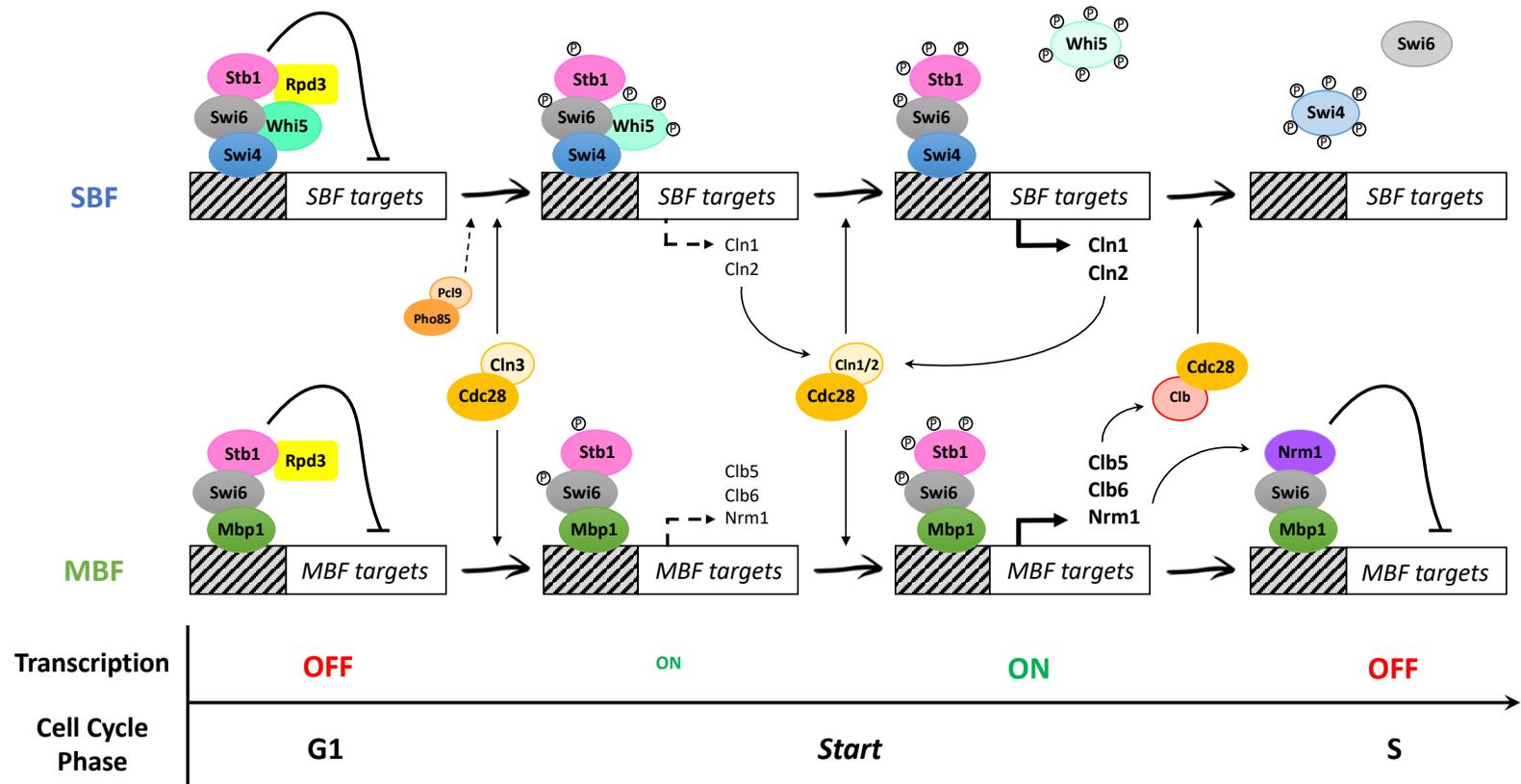


Figura 1.4. Regulación del programa transcripcional de *Start*.

Start implica la activación de un programa transcripcional en G1/S en el cual se ven involucrados más de 200 genes y que depende de dos factores transcripcionales relacionados: SBF y MBF (Bertoli et al., 2013) (Figura 1.4).

Los factores transcripcionales SBF y MBF

SBF y MBF son complejos heterodiméricos, constituidos por una subunidad reguladora común, Swi6, y una subunidad de unión al DNA diferente, Swi4 en SBF y Mbp1 en MBF (Haase and Wittenberg, 2014; Hendler et al., 2018). Swi4 y Mbp1 se asocian, en principio, a distintos elementos en los promotores de los genes a los que regulan, SCBs (Swi4 *Cell-Cycle Box*) y MCBs (*MluI Cell-Cycle Box*), respectivamente. SBF controla la expresión, entre otros, de los genes de las ciclinas de G1/S *CLN1* y *CLN2* y de los genes que codifican proteínas involucradas en morfogénesis, mientras que MBF regula la expresión periódica de los genes de las ciclinas de fase S, *CLB5* y *CLB6* y de genes implicados en el metabolismo del DNA (Bean et al., 2005; Ferrezuelo et al., 2010; Iyer et al., 2001; Simon et al., 2001). SBF es un activador transcripcional que se requiere para activar la transcripción máxima de sus genes diana durante G1/S, mientras que MBF mantiene inhibida la transcripción de sus genes diana fuera de la fase G1 y solo al final de esta fase activa su expresión debido a la unión de cofactores (Hendler et al., 2018). No obstante, aunque cada factor regula preferencialmente un subconjunto de genes específicos, ambos muestran una importante superposición funcional: SBF puede unirse a los sitios de unión de MBF y viceversa (Koch et al., 1993; Partridge et al., 1997), un factor puede sustituir al otro en su ausencia en un número significativo de genes (Bean et al., 2005) y existen genes diana comunes para SBF y MBF (Ferrezuelo et al., 2010; Iyer et al., 2001; Simon et al., 2001). En algunos casos, la inactivación de cualquiera de los dos factores transcripcionales no conlleva una reducción significativa en el nivel de expresión global de los genes a los que regulan, sino más bien a alteraciones en su expresión periódica (Dirick et al., 1992; Igual et al., 1996; Lowndes et al., 1992). La existencia de *crosstalk* entre ambos factores transcripcionales también incluye una regulación directa entre ellos; así el propio *SWI4* es diana de MBF, lo que contribuye a que su expresión sea suficiente durante G1 (Harris et al., 2013a). La redundancia funcional entre SBF y MBF, así como la importancia del programa transcripcional de *Start*, quedan patentes por la letalidad de los dobles mutantes *swi4swi6* y *swi4mbp1* (Koch et al., 1993;

Nasmyth and Dirick, 1991). Esta letalidad se ve suprimida por la expresión ectópica de los genes de las ciclinas *CLN* de G1/S, lo que indica que el objetivo esencial de la activación de este programa transcripcional es proporcionar a las células las ciclinas Cln1 y Cln2. Por otra parte, el hecho de que los mutantes *swi6* y *mbp1swi6* sean viables apoya la idea de que Swi4 monomérico podría actuar como factor transcripcional en ausencia de la subunidad reguladora Swi6.

Regulación del programa transcripcional de G1/S

Desde G1 temprano SBF permanece asociado a sus promotores diana, pero su actividad está bloqueada hasta final de G1 debido a la unión estequiométrica del represor transcripcional Whi5 (de Bruin et al., 2004; Costanzo et al., 2004). Whi5 interacciona a través de su motivo GTB (*G1/S transcription factor binding*) con el extremo C-terminal de Swi6 (Travesa et al., 2013). Para esta interacción es necesaria la integridad del factor transcripcional SBF (de Bruin et al., 2004; Costanzo et al., 2004). En este contexto, se ha descrito que Whi5 actúa reprimiendo la transcripción de los genes diana de SBF mediante el reclutamiento a sus promotores de actividades histona desacetilasa, fundamentalmente Rpd3 (Huang et al., 2009; Kishkevich et al., 2019; Takahata et al., 2009; Wang et al., 2009). El hecho de que Whi5 sea capaz de controlar también la función de MBF es un asunto controvertido, puesto que la interacción física entre ellos y el efecto de Whi5 en la transcripción de los genes regulados por MBF es, en el mejor de los casos, muy débil (Adames et al., 2015; Costanzo et al., 2004; Harris et al., 2013a). Por su parte, la proteína Stb1 se asocia tanto a SBF como a MBF mediante su interacción con Swi6 y contribuye al reclutamiento a los promotores de histona desacetilasas, como Rpd3, siendo necesaria para alcanzar el óptimo de expresión periódica en G1/S de los genes regulados preferentemente por MBF (de Bruin et al., 2008; Costanzo et al., 2003; Takahata et al., 2009; Wang et al., 2009).

La activación del programa transcripcional en G1/S está regulada por las actividades CDK-ciclina de G1 (Cdc28-Cln3) y G1/S (Cdc28-Cln1, 2) en una compleja serie de ordenados eventos. Cuando las células han crecido lo suficiente y las condiciones ambientales son apropiadas, es el complejo Cdc28-Cln3 el responsable de promover inicialmente la activación de la expresión génica en *Start* (Dirick et al., 1995; Stuart and Wittenberg, 1995). Al principio

de G1, Whi3 contribuye a la retención citoplasmática de los componentes del complejo Cdc28-Cln3 (Caudron and Barral, 2013; Garí et al., 2001; Wang et al., 2004). Más tarde en G1, la chaperona Ydj1 libera a este complejo del retículo endoplasmático (RE), lo que permite su acumulación dentro del núcleo (Ferrezuelo et al., 2012; Verges et al., 2007). Una vez dentro del núcleo, Cdc28-Cln3 fosforila extensamente al represor Whi5 y al factor transcripcional SBF, promoviendo la liberación de las histona desacetilasas y activando la transcripción en G1/S (Palumbo et al., 2016; Wagner et al., 2009). Además de Cdc28-Cln3, la quinasa Pho85-Pcl9 se localiza de manera dependiente de SBF en los promotores de genes de G1/S y también fosforila a Whi5, colaborando en la liberación de histona desacetilasas de dichos promotores (Huang et al., 2009). Como resultado de esta activación transcripcional, los complejos Cdc28-Cln1 y Cdc28-Cln2 se acumulan y junto con Cdc28-Cln3 fosforilan a Whi5 y Swi6, disociando completamente a Whi5 de SBF y aumentando aún más la actividad de SBF y MBF (Skotheim et al., 2008). De esta forma se establece un circuito de retroalimentación positiva que fortalece una respuesta transcripcional abrupta y global y hace que el proceso de *Start* sea coherente e irreversible, impulsando el compromiso de una nueva división celular y dando coherencia a la transición G1/S (Charvin et al., 2010; Eser et al., 2011; Skotheim et al., 2008).

Pese a que Cdc28-Cln3 es el principal complejo activador de *Start*, existe una vía alternativa independiente de Cdc28 que actúa en paralelo y que está liderada por la proteína Bck2, cuyo papel en este proceso es más discreto. Bck2 se une a los promotores y permite la expresión de genes de G1/S, y también de genes de G2/M y M/G1, incluso fuera de su ventana temporal, fundamentalmente a través de su interacción con el factor transcripcional Mcm1 (Bastajian et al., 2013; Ferrezuelo et al., 2009).

Una cuestión crítica para todas las células, y en especial los organismos unicelulares como la levadura *S. cerevisiae*, es la coordinación de su crecimiento con la división celular. Por una parte, las células deben adaptar su crecimiento en función de los nutrientes disponibles y, por otra parte, la maquinaria de división celular debe poder detectar cuando es el momento correcto para poner en marcha la proliferación celular. El principal punto del ciclo celular donde confluyen ambos procesos en *S. cerevisiae* es en la ejecución de *Start* (Aldea et al., 2017; Ewald, 2018; Rupes, 2002; Turner et al.,

2012). Muchos factores, tanto externos como internos participan en esta doble regulación a través de diversos mecanismos moleculares. Por lo que respecta a los factores externos, en las pasadas décadas se ha relacionado la señalización metabólica con los niveles de ciclinas y el balance ciclinas/CKIs en el control de *Start* (Alberghina et al., 2004; Rupes, 2002). En los últimos años se ha llegado a identificar mecanismos concretos conectando las principales cascadas de señalización metabólica con reguladores de *Start*: la expresión del CKI Cip1 está controlada por los factores transcripcionales Msn2/4 de la ruta PKA (Chang et al., 2017); PKA fosforila a Swi4 inhibiendo la transcripción de *CLN1* en respuesta a un aumento de nutrientes o cAMP (Amigoni et al., 2015); la quinasa Rim15, encargada de inactivar a la fosfatasa PP2A, integra señales de las rutas PKA y TOR deteniendo o acelerando el paso por *Start* según la severidad de las condiciones, para lo cual controla la fosforilación de Whi5 y Sic1 (Pérez-Hidalgo and Moreno, 2017); por último, PKA también fosforila a Whi3, lo que puede condicionar la disponibilidad de Cln3 (Mizunuma et al., 2013). En cuanto a los factores internos que condicionan que cada célula, de forma individual, ajuste su crecimiento con la división celular, recientemente se han propuesto varios escenarios, no excluyentes entre sí, sobre cómo la activación del programa transcripcional de G1/S podría integrarse con el crecimiento celular para controlar el tamaño celular (Aldea et al., 2017; Dorsey et al., 2018). Un modelo propone la existencia de un *sizer* encargado de determinar el tamaño celular en el que iniciar la división. Entre los mecanismos moleculares capaces de desempeñar este papel se han descrito: la dilución de Whi5 (Schmoller et al., 2015), el balance entre el número creciente de moléculas de Cln3 frente al número constante de sitios de unión de SBF en el DNA (Wang et al., 2009) y, más recientemente, el aumento en la concentración de Swi4 (Dorsey et al., 2018), que ocurrirían debido al crecimiento celular. Un modelo alternativo propone que es la tasa de crecimiento la que es comunicada a la maquinaria del ciclo celular mediante un *speedometer* capaz de medirla: la competencia de otras proteínas capaces de interactuar con Ydj1 y Cln3 por la unión con moléculas libres de la chaperona determinaría el momento en que existe suficiente ciclina Cln3 correctamente plegada y disponible para ejecutar *Start* (Ferrezuelo et al., 2012). Ambos modelos entran en conflicto con un estudio fenomenológico reciente en levadura y bacteria que propone la existencia de un *adder*, un

volumen fijo añadido entre dos eventos de gemación (Soifer et al., 2016). Se ha propuesto que este fenómeno no sea consecuencia de un mecanismo molecular encargado de medir ese incremento fijo sino de una regulación independiente previa a *Start* y en las fases post-*Start* (Chandler-Brown et al., 2017; Heldt et al., 2018).

Más tarde en el ciclo celular, la transcripción dependiente de SBF y MBF se silencia por diferentes mecanismos. SBF es inactivado por fosforilación por Cdc28-Clb, el cual se asocia con Swi4 y lo fosforila, promoviendo así su disociación del DNA y su exportación al citoplasma (Koch et al., 1996). Por otra parte, MBF es inactivado después de la transición G1/S por el correpresor transcripcional Nrm1, cuya expresión depende del propio MBF, estableciéndose así un lazo de retroalimentación negativo (de Bruin et al., 2006). Para ello Nrm1 se asocia a través de su motivo GTB (*G1/S transcription factor binding*) con el extremo C-terminal de Swi6 en los promotores de los genes regulados por MBF (Travesa et al., 2013). Posteriormente, conforme las células salen de mitosis, Nrm1 se convierte en diana de APC^{Cdh1} y es degradado por el proteasoma, preparando así la reactivación de MBF para la siguiente fase G1 (Ostapenko and Solomon, 2011).

Además de Whi5, Stb1 y Nrm1, se ha demostrado que otras proteínas se asocian con SBF y MBF. En condiciones normales la asociación de las proteínas Msa1 y Msa2 con SBF y MBF apenas tiene efecto sobre su actividad (Ashe et al., 2008). Sin embargo, destaca su papel en respuesta a cambios ambientales (Miles and Breeden, 2017). En respuesta a estrés osmótico Msa1 y Whi5 son fosforiladas por la quinasa Hog1, lo que conduce a la inhibición de la transcripción de genes diana de SBF (Gonzalez-Novo et al., 2015). Por su parte, en la transición a quiescencia Msa1/2 actúan como represores de muchos de los genes diana de SBF y como activadores de muchos de los genes diana de MBF (Miles et al., 2016).

La proteína Whi7

Whi7 constituye junto con Whi5 y Nrm1 la familia de proteínas caracterizada por la presencia del motivo GTB en su estructura, que, como ya se ha descrito, en el caso de Whi5 y Nrm1 media su asociación con los factores transcripcionales SBF y MBF, respectivamente (Travesa et al., 2013). En particular, Whi7 presenta un alto grado de homología con el represor

transcripcional de *Start* *Whi5* (Wagner et al., 2009; Yahya et al., 2014) (Figura 1.5). *Whi7* fue identificado originalmente como el gen *SRL3*, un supresor en multicopia de la letalidad del mutante *rad53* (Desany et al., 1998). Más tarde se ha descrito que la expresión de *Whi7* se induce en diferentes situaciones de estrés celular (Berry and Gasch, 2008; García et al., 2004; Gasch et al., 2000). A diferencia de un mutante *whi5*, un mutante *whi7* no presenta un fenotipo de tamaño celular pequeño en cultivos asincrónicos, descartando aparentemente un papel para esta proteína en el inicio del ciclo celular en células proliferativas (Costanzo et al., 2004; Jorgensen et al., 2002). Sin embargo, recientemente se ha descrito un pequeño retraso en ausencia de *Whi7* en la re-entrada al ciclo celular tras un periodo de quiescencia, aunque mucho menor que en ausencia de *Whi5* (Miles et al., 2016). La primera conexión directa de *Whi7* con la regulación del inicio del ciclo celular en células proliferativas fue como un regulador negativo de *Start*, al contribuir en la retención del complejo Cdc28-Cln3 al RE. La fosforilación de *Whi7* por Cdc28 disminuye esta asociación, de manera que una pequeña proporción de complejos Cdc28-Cln3 recién liberados fosforilarían a *Whi7* para inhibir su papel de retención y acelerar la liberación de más complejos Cdc28-Cln3, dando lugar a la ejecución de *Start* (Yahya et al., 2014).

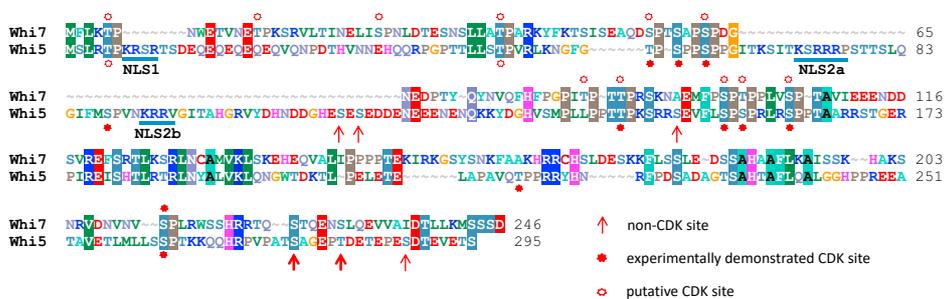


Figura 1.5. Alineamiento de las secuencias de proteína de *Whi7* y *Whi5* (Adaptada de Yahya et al., 2014).

Regulación espacial de la maquinaria de *Start*

Además del caso de Cln3, la actividad de SBF, MBF y otros reguladores clave de *Start* como Whi5 también está regulada mediante el control de su localización subcelular. El transporte activo de proteínas a través del complejo del poro nuclear es asistido por los receptores de transporte solubles de la familia de las β -carioferinas, las cuales reconocen características específicas en sus dianas: señales de localización nuclear (NLS) o señales de exportación nuclear (NES) (Cook et al., 2007; Pemberton and Paschal, 2005). Los receptores se dividen en importinas y exportinas dependiendo de la dirección del transporte. En *S. cerevisiae* existen 14 miembros de los receptores de la familia de las β -carioferinas. Dos de las vías más relevantes son la vía clásica de importación y la exportina Msn5. La vía de importación clásica implica la importación de proteínas que contienen una NLS clásica monopartita (un grupo corto de aminoácidos básicos) o bipartita (dos grupos cortos de aminoácidos básicos separados por 10 - 12 residuos) por el heterodímero formado por Kap95 (importina β 1) y Kap60 (importina α) (Goldfarb et al., 2004; Lange et al., 2007). Por su parte, Msn5 está involucrada en la exportación nuclear de proteínas. La NES mínima identificada en algunas de las dianas de Msn5 involucra a menudo largas regiones de la proteína y requiere la fosforilación de residuos críticos (Boustany and Cyert, 2002; DeVit and Johnston, 1999; Jaquenoud et al., 2002; Kaffman et al., 1998; Kaplun et al., 2003; Quilis and Igual, 2012; Taberner et al., 2009; Ueta et al., 2007). Se ha descrito que Swi6 entra al núcleo de manera dependiente de Kap95 desde el final de mitosis hasta G1 tardío, momento en el que Cdc28-Cln bloquea su importación por fosforilación (Sidorova et al., 1995). Swi6 permanece en el núcleo hasta que en G2/M Cdc28-Clb6 (Geymonat et al., 2004) y la exportina Msn5 median su salida al citoplasma, lo que resulta relevante para la actividad transcripcional dependiente de SBF (Queralt and Igual, 2003). Durante la salida de mitosis la defosforilación de Swi6 por la fosfatasa Cdc14 permite otra vez su acumulación nuclear (Geymonat et al., 2004). Por otra parte, la importación al núcleo de Swi4 y Mbp1 está mediada, del mismo modo que ocurre con Swi6, por Kap95 (Taberner and Igual, 2010). En el caso de Mbp1 vías alternativas adicionales contribuyen también a su importación. Respecto a Whi5, se ha descrito que la proteína es nuclear desde el final de mitosis hasta *Start* y que su localización se encuentra regulada por fosforilación

(Costanzo et al., 2004; Wagner et al., 2009). La importación nuclear de Whi5 depende de la vía clásica de importación que reconoce dos NLSs clásicas en el extremo N-terminal de la proteína, mientras que su exportación depende de la carioferina Msn5, la cual reconoce una NES regulada por fosforilación por Cdc28 (Taberner et al., 2009). Del mismo modo que ocurre con Swi6, la localización nuclear de Whi5 hacia el final de mitosis también depende de su defosforilación por la fosfatasa Cdc14 (Taberner et al., 2009). Por otro lado, la proteína Stb1 también cambia su localización a lo largo del ciclo celular, siendo nuclear durante las fases M y G1 y siendo exportada activamente del núcleo cuando es fosforilada por Cdc28 durante fase S/principio de fase G2 (Youn et al., 2017).

EL CHECKPOINT DE DAÑO EN EL DNA

Todas las células están expuestas constantemente a daños en el DNA, ya sea procedente de fuentes exógenas (radiación ionizante, radiación UV y agentes carcinógenos) o endógenas (errores en la replicación del DNA y productos del metabolismo celular, como las especies reactivas de oxígeno o ROS). La capacidad de lidiar de forma efectiva con el daño en el DNA es crucial para el mantenimiento de la estabilidad genómica y la supervivencia celular. Por este motivo las células eucariotas han desarrollado un mecanismo de vigilancia conocido como *checkpoint* de daño en el DNA, formado por una compleja y altamente ramificada red de señalización conservada en todos los organismos eucariotas, desde levaduras hasta humanos (Ciccia and Elledge, 2010; Finn et al., 2012; Harper and Elledge, 2007; Harrison and Haber, 2006; Lanz et al., 2019). Este *checkpoint* permite coordinar la progresión en el ciclo celular con la reparación del DNA y la apoptosis en respuesta a daños en el DNA o a defectos en la replicación. Su activación conlleva la parada del ciclo celular, la activación de programas transcripcionales concretos y la reparación del DNA. Una vez reparado el daño, la respuesta desencadenada por este *checkpoint* es apagada y las células continúan con el ciclo celular, un proceso conocido con el nombre de recuperación celular (Bartek and Lukas, 2007; Clémenson and Marsolier-Kergoat, 2009; Verma et al., 2019). Alternativamente, si el daño generado es demasiado grave y la lesión no se puede reparar, las células pueden adaptarse y seguir con el ciclo celular en presencia de dicho daño en el DNA o iniciar los mecanismos que conducen a la senescencia o a la muerte celular programada. Fallos en el funcionamiento del

mecanismo de *checkpoint* de daño en el DNA pueden conducir a aberraciones cromosómicas y al desarrollo de enfermedades como el cáncer (Kastan and Bartek, 2004; Roos et al., 2016).

En *S. cerevisiae*, el *checkpoint* de daño en el DNA opera en tres etapas distintas del ciclo celular en respuesta a daños en el DNA (Figura 1.1). En G1 produce una parada celular en la transición G1/S, antes de *Start* (Gerald et al., 2002). Esta parada transitoria retrasa la gemación, la duplicación del SPB y la entrada en fase S, permitiendo a la célula reparar las lesiones existentes en el DNA antes de que tenga lugar su replicación. En fase S ralentiza la tasa de replicación y estabiliza las horquillas replicativas, coordinando los mecanismos de reparación en los que participan las horquillas de replicación con la progresión en el ciclo celular (Pardo et al., 2017). Este mecanismo impide que las células entren en mitosis antes de que se complete adecuadamente la replicación. Por último, en G2/M produce una parada celular en la transición de metafase a anafase, evitando que las células con daños en el DNA progresen en el proceso de mitosis (Palou et al., 2015).

Los principales componentes del *checkpoint* según el modelo canónico de daño en el DNA son las quinasas sensoras Mec1 y Tel1 en *S. cerevisiae*, ATR y ATM en mamíferos, y las quinasas efectoras Chk1 y Rad53 en *S. cerevisiae*, CHK1 y CHK2 en mamíferos (Blackford and Jackson, 2017; Di Domenico et al., 2014; Lanz et al., 2019; Saldivar et al., 2017). Las quinasas sensoras tienen funciones superpuestas pero distintas en el mantenimiento de la integridad genómica. Mec1/ATR tiene un papel más general y funciona en respuesta a diferentes tipos de daño, como roturas de doble cadena (DSBs) procesadas, alteraciones de base o de nucleótidos, entrecruzamientos y bloqueo de horquillas replicativas. Por su parte, Tel1/ATM es específico en la señalización por DSBs. En cualquier caso, ambas quinasas actúan como iniciadoras de la señalización del *checkpoint* de daño en el DNA y su activación implica que se localicen en la zona de la lesión. A continuación, se describe la visión global de la que se dispone en la actualidad a cerca de las bases moleculares del mecanismo del *checkpoint* (Finn et al., 2012; Lanz et al., 2019). En el caso de Mec1 su asociación con la proteína Ddc2 (ATRIP en mamíferos) permite su unión a estructuras de DNA de simple cadena recubiertas por proteínas RPA generadas en el sitio de la lesión. A este complejo se asocian el complejo cargador de abrazadera Rad24-RFC y el complejo abrazadera 9-1-1, los cuales

a su vez reclutan a Dpb11 (TOPBPI en mamíferos). Ddc1 (componente del complejo abrazadera), Ddc2 y Dpb11 median la activación de Mec1 por distintas vías. Por su parte, Tel1 es reclutada a los DSBs y activada por el complejo MRX. Una vez activadas, Mec1 y Tel1 inician una cascada de eventos de fosforilación que afecta, entre otros, a las propias Ddc1, Ddc2 y Dpb11, y también a la proteína Xrs2 (componente del complejo MRX) y a la histona H2A (variante H2AX en mamíferos). La histona H2A fosforilada sirve como anclaje para la proteína adaptadora Rad9 (Mrc1 en el caso de estrés replicativo). Rad9, a su vez, es la responsable del reclutamiento de las quinasas efectoras del *checkpoint* Chk1 y Rad53, cuya activación dependerá de Mec1 y Tel1. Una vez activadas, Chk1 y Rad53 se liberan de la cromatina y actúan sobre dianas críticas responsables de la detención del ciclo y otras respuestas celulares. En los últimos años estudios ómicos han permitido elaborar una compleja red de señalización en respuesta a daño en el DNA implicando a cientos de sustratos (Bandyopadhyay et al., 2010; Matsuoka et al., 2007; Smolka et al., 2007).

LA RUTA DE LA PROTEÍNA QUINASA C O RUTA DE INTEGRIDAD DE LA PARED CELULAR EN *S. CEREVISIAE*

La pared celular de la levadura es una estructura fuerte, a la vez que elástica, que es esencial para la forma e integridad de la célula y para la progresión en el ciclo celular (Arroyo et al., 2016; Gow et al., 2017; Orlean, 2012). Es una estructura organizada en dos capas, una interna y una externa. La capa interna esta formada en su mayoría por una red de β -1,3-glucano, β -1,6-glucano y quitina. Esta capa es en gran parte responsable de la resistencia mecánica y la elasticidad de la pared celular. La capa externa está formada por un entramado de glicoproteínas incluyendo a aquellas implicadas en adhesión, reorganización de la pared celular, proteínas estructurales y antígenos somáticos (De Groot et al., 2005).

Durante el crecimiento, la morfogénesis y en respuesta a cambios ambientales la pared celular es remodelada de una forma altamente regulada y de una manera polarizada, un proceso que, principalmente, se encuentra bajo el control de la ruta de señalización de integridad de la pared celular (CWI) (Jiménez-Gutiérrez et al., 2019; Levin, 2011; Sanz et al., 2017). La señalización por esta ruta se induce en respuesta a una gran variedad de estreses celulares, entre los que se incluyen: el estrés térmico, el choque hiposmótico, la morfogénesis inducida por feromonas, agentes que generan

estrés de pared celular, la despolarización del citoesqueleto de actina, el estrés del RE, así como la presión turgente y el estiramiento de la membrana plasmática. Diversos compuestos químicos causan estrés en la pared celular, como por ejemplo los agentes químicos Calcofluor White (CFW) y Congo Red, los cuales se asocian con la quitina e interfieren en el ensamblaje de la pared celular (Elorza et al., 1983; Imai et al., 2005), inhibidores de la enzima glucano sintasa, la enzima lítica de la pared celular zimoliasa y la cafeína (Bermejo et al., 2008; García et al., 2004, 2009; Jung et al., 2002; Ketela et al., 1999; Kopecká and Gabriel, 1992; Kuranda et al., 2006; Martín et al., 2000; de Nobel et al., 2000; Reinoso-Martín et al., 2003). Así mismo, se ha descrito que mutaciones que afectan a genes que participan en la biosíntesis de la pared celular (*fks1Δ*, *gas1Δ*, *kre6Δ* o *mnn9Δ*) originan defectos en la misma, lo que activa, de un modo similar a los agentes químicos, la señalización por esta ruta (Bulik et al., 2003; Lagorce et al., 2003; de Nobel et al., 2000; Terashima et al., 2000). Además de condiciones de estrés que afectan a la integridad de la pared celular, la señalización por esta ruta también se ve estimulada en respuesta a estrés oxidativo, a un pH demasiado alto o demasiado bajo y a agentes que dañan el DNA (Charoenbhakdi et al., 2016; Jiménez-Gutiérrez et al., 2019; Schiavone et al., 2014; Soriano-Carot et al., 2012, 2014). Sin embargo, en el caso de estos últimos supuestos todavía se conoce muy poco a cerca de los mecanismos por los que se activa la señalización de la ruta o la naturaleza de las respuestas que se desencadenan.

La ruta CWI responde a los diferentes tipos de estrés de pared celular a través de una familia de sensores de superficie celular (Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2 y Mtl1) responsables de activar la señalización de la ruta de integridad de la pared celular (Jendretzki et al., 2011; Kock et al., 2015; Rodicio and Heinisch, 2010). Para ello detectan y transmiten señales de estrés de pared celular a la pequeña GTPasa Rho1. Rho1, a través de distintos efectores, desencadena una respuesta fisiológica que resulta clave para el control de la integridad celular (Hall, 2012) y que tiene como principal efector a la proteína quinasa C (Pkc1), que controla una cascada MAPK. La activación de la ruta regula la expresión de genes relacionados con la biogénesis de la pared celular, la síntesis de β -glucano en los sitios de remodelación de la pared celular, la organización del citoesqueleto de actina, el direccionamiento de vesículas de secreción a los sitios de crecimiento o la integración con la

división celular. La interrupción de la señalización a través de esta ruta compromete la integridad de la pared celular, lo que resulta en la lisis celular en los sitios de crecimiento polarizado. En la [Figura 1.6](#) se muestra una visión general de los componentes y la señalización de la ruta de integridad de la pared celular.

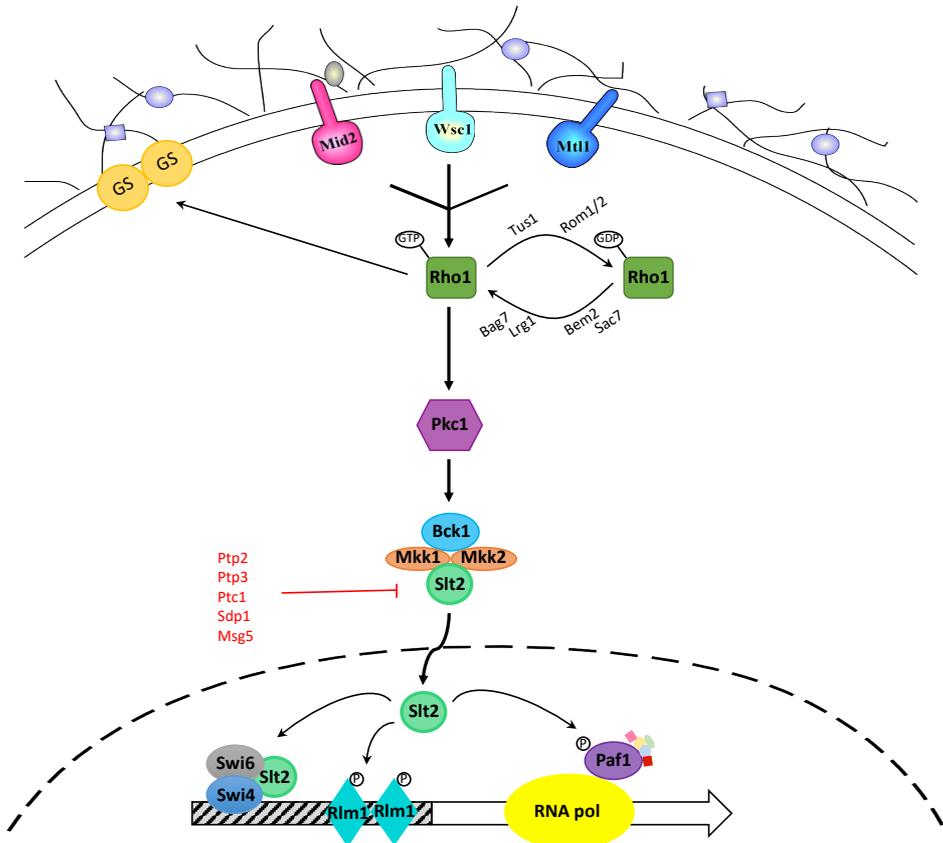


Figura 1.6. Componentes y señalización de la ruta de integridad de la pared celular.

La proteína quinasa C

El término proteína quinasa C (PKC) define a un grupo de Ser/Thr quinasas dependientes de fosfolípidos que regulan una amplia variedad de funciones celulares como la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis (Freeley et al., 2011; Newton, 2018a). La levadura *S. cerevisiae* contiene una única enzima homóloga a la proteína quinasa C (PKC) de

mamíferos, denominada Pkc1 (Levin et al., 1990). La delección del gen *PKC1* es letal en condiciones normales de crecimiento debido a la lisis de las células por defectos en la integridad de la pared celular; así lo refleja el hecho de que la letalidad es suprimida por estabilizadores osmóticos como el sorbitol (Levin and Bartlett-Heubusch, 1992; Paravicini et al., 1992). De hecho, las células en presencia de sorbitol presentan defectos importantes en la pared celular, como capas interna y externa más delgadas y una membrana plasmática separada de la pared celular en algunos puntos (Levin et al., 1994; Roemer et al., 1994).

Pkc1 se asocia con y es activada por la proteína Rho1 activa (Rho1-GTP) (Kamada et al., 1996; Nonaka et al., 1995). Dos dominios en la región N-terminal reguladora de la proteína le confieren capacidad para interactuar con Rho1, el dominio HR1 y el dominio C1, presentes en la superfamilia PKC de mamíferos (Nonaka et al., 1995; Schmitz et al., 2002). Además, el dominio C1 media la activación por fosfatidilserina, pero debido a alteraciones en residuos clave no interactúa con DAG, a diferencia del dominio C1 de PKCs de mamíferos (Nomura et al. 2017). Pkc1 dispone también de otro dominio característico de esta superfamilia, el dominio regulador C2, pero, igual que en el caso del dominio C1, alteraciones en residuos clave hacen que Pkc1 no responda a la señalización por Ca^{2+} (Antonsson et al., 1994; Kamada et al., 1996; Watanabe et al., 1994). Además, Pkc1 dispone, igual que las PKCs de mamíferos, de una secuencia pseudosustrato que inhibe la actividad de esta quinasa mediante su interacción con el dominio catalítico en ausencia de estrés de pared celular (Watanabe et al., 1994). Pkc1 también es diana de las proteínas quinasas Pkh1/2, homólogo de PDK-1 en células de mamíferos (Inagaki et al., 1999). Estas quinasas fosforilan la Thr⁹⁸³ del lazo de activación dentro del dominio catalítico de Pkc1, lo cual es necesario para su completa activación. Por sus características estructurales Pkc1 ha sido considerada una PKC arquetipo, ya que posee todos los dominios reguladores presentes en las PKCs de mamíferos, aunque algunos de estos dominios presentan modificaciones o mutaciones en residuos clave que hacen que dejen de ser funcionales (Mellor and Parker, 1998).

Pkc1 se localiza en los sitios de crecimiento polarizado (Andrews and Stark, 2000). Así, en las fases G1 y S del ciclo celular Pkc1 se localiza en las zonas de pre-gemación y en la punta de la yema. Durante la fase G2 Pkc1 se

deslocaliza de dichas zonas y finalmente durante mitosis se relocaliza en el cuello entre la yema y la célula madre (Denis and Cyert, 2005). Los distintos dominios reguladores son responsables de la localización de Pkc1 en distintos lugares subcelulares específicos (Denis and Cyert, 2005). Así mismo, se han identificado la existencia de tres NLSs clásicas y una NES en la secuencia de Pkc1, lo que sugiere que Pkc1 puede localizarse en el núcleo, aunque sea en bajos niveles o transitoriamente (Denis and Cyert, 2005).

La cascada MAPK

Pkc1 controla la cascada MAPK (*MAP Kinase*) de la ruta de integridad de la pared celular formada por una serie de quinasas que actúan secuencialmente (Levin, 2011). Estudios genéticos y bioquímicos han establecido que Pkc1 activa a la MAPKKK Bck1 mediante su fosforilación en múltiples residuos, la cual a su vez fosforila y activa a las MAPKKs Mkk1 y Mkk2, que finalmente fosforilan a la MAPK Slt2/Mpk1 en los residuos de Thr y Tyr del motivo T-X-Y del lazo de activación, activándola. Adicionalmente, Mkk1/2 también activa por fosforilación a Mlp1 (*Mpk1-like protein*), una pseudoquinasa que carece de actividad enzimática y que comparte con Slt2 una función especializada no catalítica en transcripción (Kim and Levin, 2010, 2011; Kim et al., 2008; Truman et al., 2009). Una vez activadas, Slt2 y Mlp1 se asocian con sus dianas y proteínas reguladoras a través de un motivo D canónico, cuyo reconocimiento tiene lugar a través de un sitio de acoplamiento conservado en todas las MAPK (Zhang et al., 2003). Hay que destacar que las propias Mkk1/2 son inhibidas por fosforilación por Slt2, estableciéndose así un mecanismo de retroalimentación negativo en la cascada (Jiménez-Sánchez et al., 2007).

La pérdida de función de cualquier quinasa *downstream* de Pkc1 (o en el caso de Mkk1/2 de ambas) resulta en lisis celular a 37°C, la cual se ve suprimida por estabilizadores osmóticos como el sorbitol. Otros fenotipos relacionados con la pared celular y asociados a estos mutantes incluyen la sensibilidad a feromonas, a compuestos que interfieren con la pared celular, como el CFW, el Congo Red, la caspofungina, la cafeína y la enzima lítica zimoliasa (Errede et al., 1995; Kirchrath et al., 2000; Martín et al., 2000; Reinoso-Martín et al., 2003), y a defectos en la polarización de la actina (Mazzoni et al., 1993). Es necesario resaltar que el defecto de crecimiento de dichos mutantes es menos severo que el observado en el mutante *pkc1Δ*, lo

que sugiere que Pkc1 también participa en la regulación de otras rutas (Lee and Levin, 1992).

En condiciones normales Slt2 se localiza predominantemente en el núcleo de las células, pero en respuesta a estrés de pared celular una gran parte de esta proteína nuclear se relocaliza rápidamente al citoplasma (Kamada et al., 1995). Además, una pequeña proporción de Slt2 se localiza en los sitios de crecimiento polarizado y es transportada de manera constitutiva durante el crecimiento entre estos sitios y el núcleo (van Drogen and Peter, 2002). Así mismo, durante procesos morfogénicos inducidos por feromonas, Slt2 puede detectarse en la punta de la proyección de apareamiento (Baetz et al., 2001).

En todas las rutas de señalización es de vital importancia la existencia de una regulación negativa para desactivarlas cuando la célula se ha adaptado a las nuevas condiciones. En el caso de la MAPK Slt2 se han descrito cinco proteínas fosfatasa (Ptp2, Ptp3, Ptc1, Sdp1 y Msg5) encargadas de su defosforilación y, por tanto, de la inactivación de la ruta de integridad de la pared celular (Sanz et al., 2017).

Programa transcripcional de la ruta de integridad de la pared celular

Las tecnologías de *microarrays* de DNA y secuenciación de RNA han sido herramientas poderosas para la caracterización de perfiles transcriptómicos globales y para la comprensión de las respuestas transcripcionales al estrés. Así, estudios realizados empleando un alelo hiperactivo de Mkk1 (Jung and Levin, 1999), diferentes mutantes relacionados con la pared celular (Lagorce et al., 2003) o diferentes agentes que interfieren con la biogénesis de la pared celular, como el CFW (Boorsma et al., 2004), el Congo Red (García et al., 2004) y la zimoliasa (García et al., 2009), entre otros, permitieron identificar además de un perfil transcripcional específico de cada condición, otro perfil transcripcional común a todos ellos, que incluye la inducción de 100-200 genes. De hecho, este conjunto de genes inducidos en prácticamente todas las condiciones podría considerarse como la “huella transcripcional” del estrés de pared celular e incluye principalmente genes relacionados con la biogénesis de la pared celular, el metabolismo y la generación de energía, procesos morfogénicos, transducción de señales y genes de respuesta a estrés (Arroyo et al., 2009).

El factor de transcripción Rlm1

El factor de transcripción Rlm1 es el responsable de la mayor parte de la respuesta transcripcional que se desencadena tras la activación de la ruta de integridad de la pared celular (Belén Sanz et al., 2012; García et al., 2004; Jung and Levin, 1999). Rlm1 contiene un dominio de unión al DNA en su región N-terminal relacionado con la familia de reguladores transcripcionales MADS *box*. Reconoce la secuencia CTA(T/A)₄TAG en los promotores de los genes que regula (Dodou and Treisman, 1997). Rlm1 reside de forma constitutiva en el núcleo de la célula, donde Slr2 lo activa mediante fosforilación en dos residuos dentro de su dominio de activación transcripcional, Ser⁴²⁷ y Thr⁴³⁹ (Jung et al., 2002; Watanabe et al., 1997). Además, el motivo D canónico de Rlm1 presente en su dominio de activación es esencial para su activación mediante Slr2 (Jung et al., 2002).

En respuesta a estrés de pared celular Rlm1 regula la expresión de aproximadamente 115 genes, la mayoría de los cuales codifican para proteínas de la pared celular o proteínas implicadas en la biogénesis de la misma (Belén Sanz et al., 2012). Así mismo, Rlm1 también es reclutado a su propio promotor y a los promotores de *SLR2* y *MLP1*, ejerciendo mecanismos de retroalimentación positivos sobre la expresión de ambos genes (Belén Sanz et al., 2012; García et al., 2004; Jung and Levin, 1999).

El factor de transcripción SBF

Otro factor transcripcional implicado en la señalización de la ruta de integridad de la pared celular es SBF. Diversos estudios genéticos y bioquímicos han relacionado desde hace tiempo a SBF con Slr2. En primer lugar, el defecto de lisis celular de un mutante *slr2Δ* se suprime por la sobreexpresión de *SWI4* (Madden et al., 1997). SBF es responsable de la expresión periódica, entre otros, de genes de proteínas de la pared celular en la transición G1/S y los mutantes *swi4Δ* y *swi6Δ* muestran hipersensibilidad a CFW y SDS, apoyando la idea de que SBF desarrolla algún papel en la biogénesis de la pared celular (Iguar et al., 1996). Slr2 se asocia *in vivo* con SBF (Madden et al., 1997) e *in vitro* con Swi4 (Baetz et al., 2001). Swi6 es fosforilado *in vivo* (Madden et al., 1997) e *in vitro* (Baetz et al., 2001) por Slr2 en respuesta a estrés de pared celular. Por último, en condiciones normales y en respuesta a estrés de pared celular, se ha descrito que Slr2 podría

controlar, en ausencia de Swi6, la asociación de Swi4 a los promotores de un subconjunto de genes, entre los que se incluyen *PCL1*, *CCW12*, *GIC1* y *SRL1* (Baetz et al., 2001).

Estudios más recientes demuestran que en respuesta a estrés de pared celular (choque térmico y Congo Red) Slt2 y Mlp1 activan a SBF mediante un mecanismo no catalítico, independiente de su papel específico durante la transcripción en G1 (Kim and Levin, 2010; Kim et al., 2008; Truman et al., 2009). Este mecanismo no es general en todos los genes regulados por SBF, sino que afecta hasta la fecha a un número muy reducido de genes: *FKS2*, *CHA1*, *YLR042c* y *YKR013* (Kim and Levin, 2010; Kim et al., 2008). Para que este mecanismo funcione, Slt2 y Mlp1 deben encontrarse en su conformación activa (fosforilados), pero no se requiere que Slt2 tenga actividad catalítica (Kim and Levin, 2010; Kim et al., 2008). Experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina demuestran que Slt2 y Mlp1 forman un complejo con Swi4 que se asocia a los sitios de unión de SBF en los promotores de los genes diana independientemente de Swi6 (Kim et al., 2008). Para ello, Slt2 se asocia al motivo D canónico de Swi4 eliminando la interacción autoinhibidora del propio Swi4 (Truman et al., 2009). Aunque en este mecanismo Slt2 sustituye a Swi6 para permitir que Swi4 se asocie a los promotores, Swi6 debe ser reclutado al complejo Slt2-Swi4 para permitir el posterior reclutamiento de la RNA pol II y la activación de la transcripción (Kim et al., 2008). Así, el complejo trimérico Slt2-Swi4-Swi6 se asocia al promotor del gen *FKS2* en respuesta a estrés de pared celular para regular su expresión. Además, en este contexto, Slt2 desempeña una función adicional actuando como un regulador bifásico de SBF, ya que fosforila a Swi6 inhibiendo su importación al núcleo (Kim et al., 2010).

El complejo Paf1

El complejo Paf1 (Paf1C) es un complejo conservado en todas las células eucariotas, cuya asociación a la RNAPol II a lo largo de todo el gen permite regular varios procesos transcripcionales, entre los que se encuentran la regulación de activadores transcripcionales, de factores de modificación de histonas y de la elongación y terminación de la transcripción (Jaehning, 2010). Análisis de expresión génica global sugieren que Paf1C se requiere únicamente para la expresión de aproximadamente el 5% de los genes de la levadura (Penheiter et al., 2005), incluidos algunos implicados en la progresión del ciclo

celular (Koch et al., 1999; Porter et al., 2002) y en la biosíntesis de la pared celular (Chang et al., 1999). Así mismo, se ha descrito que mutantes en este complejo muestran sensibilidad a diferentes tipos de estrés de pared celular de un modo similar a lo observado en las cepas mutantes *pkc1* y *slt2*, lo que sugiere una relación entre este complejo y la ruta de integridad de la pared celular (Chang et al., 1999). Así, más recientemente se ha identificado que en respuesta a estrés de pared celular Slt2 se asocia con Paf1C para bloquear la terminación prematura de la transcripción del gen *FKS2* (Kim and Levin, 2011) y que Slt2 es necesario para una asociación estable de Paf1C con la RNAPol II a lo largo del gen (Carot et al., 2016).

Otras funciones de la ruta de integridad de la pared celular

Cada día más datos apoyan la idea de que la ruta de integridad de la pared celular no solo participa en la remodelación de la pared celular durante procesos como el crecimiento, la morfogénesis y en respuesta a cambios ambientales, sino que también está relacionada con otros procesos celulares, como el metabolismo energético y la señalización por nutrientes, la regulación del ciclo celular, conexiones con la membrana plasmática, procesos de citoquinesis, endocitosis y autofagia o el *checkpoint* de integridad del DNA (Heinisch and Rodicio, 2018; Jiménez-Gutiérrez et al., 2019). A continuación, se comentan las funciones más relevantes para este trabajo.

Regulación del ciclo celular

Ya desde los trabajos originales sobre la ruta de integridad de la pared celular se relacionó a esta vía de señalización con la progresión a lo largo del ciclo celular. Así, un mutante *pkc1* presenta un fenotipo de parada del ciclo celular en un punto posterior a la replicación del DNA pero anterior a la mitosis y las células presentan yemas pequeñas (Levin et al., 1990). Además, interacciones genéticas demuestran que Slt2 puede funcionar tanto *downstream* como en paralelo a Cdc28 para promover la aparición de yemas (Mazzoni et al., 1993).

Otros trabajos más recientes han relacionado de forma directa a la ruta de integridad de la pared celular con el control del ciclo celular. En relación con la transición G1/S, como ya se ha comentado, en respuesta a estrés de pared celular, Slt2 y Mlp1 regulan al factor transcripcional SBF mediante un mecanismo no catalítico (Kim and Levin, 2010; Kim et al., 2008;

Truman et al., 2009). Por otra parte, Pkc1 está involucrada en el mantenimiento de los niveles celulares de Cln2, aunque las bases moleculares de este mecanismo todavía se desconocen (Mizunuma et al., 2005). Además, diversas evidencias relacionan a Slt2 y Rlm1 con un papel negativo en la transición G1/S. En respuesta a estrés de pared celular Slt2 fosforila a Swi6 bloqueando su importación al núcleo (Kim et al., 2010). Por otra parte, Slt2 fosforila y estabiliza a Sic1 favoreciendo su acción como CKI de complejos Cdc28-Clb5 e impidiendo a su vez que estos complejos fosforilen a Sic1 para su degradación (Moreno-Torres et al., 2015, 2017). Más recientemente, se ha situado a Rlm1 como un componente clave para retrasar *Start* cuando las células se crecen en presencia de una fuente de carbono no fermentable y baja osmolaridad (Piccirillo et al., 2017).

Adicionalmente, se han descrito conexiones de la ruta de integridad de la pared celular con otras fases del ciclo celular. Así, Slt2 y Pkc1 participan en el *checkpoint* de morfogénesis, un mecanismo que bloquea el ciclo celular en G2/M en respuesta a defectos en el citoesqueleto de actina (Lew, 2003), aunque más recientemente se ha propuesto que la señal que activa el *checkpoint* es un defecto en el tráfico de membranas (Anastasia et al., 2012). Este mecanismo permite la recuperación de estos defectos y con ello la formación y crecimiento de la yema antes de la división celular. El *checkpoint* de morfogénesis está mediado por la fosforilación inhibitoria de Cdc28 en la Tyr¹⁹, regulada por la tirosina quinasa Swe1 y la fosfatasa Mih1. El papel de Slt2 en este proceso es controvertido, puesto que algunos autores sugieren que actuaría activando a la quinasa Swe1 (Mizunuma et al., 1998, 2001), mientras que otros sugieren que actuaría inactivando a la fosfatasa Mih1 (Harrison et al., 2001). Por su parte, se ha descrito que Pkc1 fosforila de forma directa a Mih1, lo que conduce a su exportación al citoplasma impidiendo la activación nuclear de Cdc28 (Yano et al., 2013). Además, la ruta ha sido relacionada con el denominado *Cell Wall Integrity checkpoint*: en respuesta a daño en la pared celular, se induce la degradación del factor de transcripción de fase S Hcm1 mediante su fosforilación presumiblemente por Slt2 (Negishi et al., 2016), lo cual origina a su vez una caída en la expresión del gen *CLB2* que conduce al bloqueo del ciclo celular en G2/M (Negishi and Ohya, 2010). Consistente con esto, se ha descrito que Pkc1 fosforila, inhibiendo, al factor transcripcional Ndd1 (Darieva et al., 2012), responsable de la transcripción de

genes como *CLB2* importantes para la transición G2/M. Junto a este papel negativo de Pkc1 en la transición G2/M, estudios recientes sugieren que Pkc1 también sería capaz de activar la progresión del ciclo celular durante esta transición al participar de forma indirecta en la fosforilación de la subunidad Cdc55 de la fosfatasa PP2A, una fosfatasa con un papel fundamental en el control de mitosis, y de las proteínas Igo, responsables de inhibir a PP2A (Thai et al., 2017). Por otra parte, diversas evidencias relacionan a Pkc1 con el huso mitótico, ya que un mutante *pkc1* sufre un retraso en la elongación del huso mitótico (Hosotani et al., 2001) y una versión truncada de la proteína Pkc1 se localiza en el huso mitótico, apoyando la idea de que esta quinasa sea una diana del reparto mitótico (Denis and Cyert, 2005).

Regulación del checkpoint de integridad del DNA

Diversos trabajos también han relacionado a Pkc1 y Slt2 con el metabolismo del DNA. Se han identificado interacciones genéticas entre *PKC1* y mutaciones en la ciclina Clb5 y la proteína Rad9 (Queralt and Igual, 2005). Un mutante *pkc1* muestra una elevada tasa de recombinación, característica representativa de defectos en la integridad genómica (Huang and Symington, 1994). Además, se ha descrito que un mutante *pkc1* es hipersensible a diferentes agentes genotóxicos, como la HU y el MMS (Leduc et al., 2003; Queralt and Igual, 2005; Soriano-Carot et al., 2014; Zu et al., 2001). Por otra parte, las quinasas del *checkpoint* de daño en el DNA Mec1/Tel1 y Rad53 regulan la actividad transcripcional de Slt2 sobre el gen *FKS2* en respuesta a cafeína (Truman et al., 2009). Así mismo, se ha identificado que Slt2 se activa en respuesta a estrés genotóxico y que su inactivación origina hipersensibilidad a dicho estrés (Soriano-Carot et al., 2012). Recientemente se ha descrito que Slt2 es capaz de retrasar la replicación del DNA a través de la fosforilación de Mrc1 en respuesta a un aumento de la transcripción en situaciones de estrés térmico (Duch et al., 2018). La ruta de integridad de la pared celular también se ha relacionado con la biosíntesis de nucleótidos, ya que Pkc1 fosforila a la CTP sintasa regulando su actividad (Bandyopadhyay et al., 2010; Yang et al., 1996).

Más recientemente, se ha conectado a Pkc1 con la activación del *checkpoint* de integridad del DNA en respuesta a una gran variedad de estreses genotóxicos (Soriano-Carot et al., 2014). En este sentido, se ha descrito que en respuesta a daño en el DNA tanto Pkc1 como su actividad

quinasa son necesarias para la fosforilación de la quinasa efectora del *checkpoint* Rad53, de la histona H2A y de la proteína Xrs2. Esto sugiere que Pkc1 regula a las quinasas sensoras del *checkpoint* de daño en el DNA Tel1 y Mec1. Además, Pkc1 es fosforilada en respuesta al daño en el DNA de una forma dependiente de Tel1, lo que establecería un lazo de retroalimentación entre Pkc1 y esta quinasa. Estas observaciones, junto con el hecho de que mutantes en la cascada MAPK activan de un modo eficiente a la quinasa Rad53, indican que Pkc1 regula el *checkpoint* de integridad del DNA mediante una ruta diferente a la ruta de integridad de la pared celular.

LA SUPERFAMILIA DE LA PROTEÍNA QUINASA C DE MAMÍFEROS

En *S. cerevisiae*, como se ha descrito, existe una única PKC, Pkc1, mientras que en mamíferos la complejidad es mucho mayor, existiendo hasta 12 isoenzimas diferentes que forman parte de la superfamilia PKC. Todas estas isoenzimas presentan diferentes propiedades bioquímicas, distribución específica de tejido y localización subcelular, que les confieren diversidad de funciones y una amplia especificidad (Freeley et al., 2011; Newton, 2018a). Debido a ello la ausencia o activación de diferentes isoformas puede tener efectos pleiotrópicos en la célula. De hecho, alteraciones en la señalización por PKC han sido asociadas con el desarrollo de múltiples enfermedades humanas, de entre las cuales destaca el desarrollo y la progresión del cáncer (Isakov, 2018; Newton, 2018b).

Clasificación y estructura

La superfamilia PKC de mamíferos forma parte del grupo de proteínas quinasas AGC (Figura 1.7A). Las quinasas AGC son un grupo de Ser/Thr quinasas citoplásmicas que presentan en común un mecanismo de activación basado en la modificación de interacciones entre el dominio quinasa C-terminal y el dominio regulador N-terminal, ya sea a través de cambios intra o intermoleculares o de su fosforilación (Arencibia et al., 2013; Reyland and Jones, 2016). La superfamilia PKC de mamíferos está dividida en dos grupos: el grupo de las isoformas pertenecientes a la familia PKC propiamente dicha (9 isoenzimas) y el grupo formado por las quinasas relacionadas con PKC, denominadas PRKs o PKNs (3 isoenzimas). Todas ellas tienen en común la existencia de una región amino-terminal reguladora, cuya composición en dominios varía entre los distintos grupos de isoenzimas, asociada a una región

carboxilo-terminal catalítica conservada en todas ellas. Las diferentes isoformas de la familia PKC se clasifican en tres grupos según sus dominios estructurales y mecanismos de regulación (Figura 1.7B) (Mellor and Parker, 1998; Newton, 2018b, 2018a; Reyland and Jones, 2016; Roffey et al., 2009; Steinberg, 2008). El primer grupo es el formado por las PKCs clásicas o convencionales (cPKCs), compuesto por las isoformas α , β y γ , capaces de unir DAG y ésteres de forbol a través del dominio C1 formado por dos repeticiones del motivo dedo de zinc. La presencia de un motivo C2 con cinco residuos de ácido aspártico permite que las cPKCs sean también sensibles a la regulación por Ca^{2+} . El segundo grupo está formado por las PKCs noveles (nPKCs) e incluye dos subgrupos próximos filogenéticamente compuestos por las isoformas η y ϵ , y δ y θ . Las nPKCs también presentan un dominio C1 al que se unen DAG y ésteres de forbol, pero no pueden unir Ca^{2+} , debido a la existencia de un motivo *C2-like* que carece de uno o más residuos de ácido aspártico necesarios para la coordinación de dicho catión. En tercer lugar, se encuentra el grupo formado por las PKCs atípicas (aPKCs), que consta de las isoformas ζ y λ/ι (ratón/humanos). Estas isoformas carecen de dominio C2, por lo que son insensibles a la regulación por Ca^{2+} , así como de una de las repeticiones del motivo dedo de zinc en su dominio C1, lo que también las hace insensibles a DAG y ésteres de forbol. No obstante, la existencia del dominio PB1 permite a las aPKCs su interacción con proteínas *scaffold*, lo que permite su activación (Graybill et al., 2012; Tobias and Newton, 2016; Tsai et al., 2015). Por su parte, el grupo de las quinasas relacionadas con PKC (PRKs o PKNs) está formado por PRK1, PRK2 y PRK3, las cuales a través de su dominio HR1, interaccionan y son activadas por GTPasas de la familia Rho. Todos los dominios que componen estas isoformas están conectados entre sí a través de regiones de unión altamente flexibles (V1-V5), de entre las que destaca la región V3 o región bisagra que conecta directamente la región reguladora con la catalítica. Así mismo, la región catalítica, conservada en todas las isoformas de la familia, incluye los dominios C3 y C4, responsables de la unión de ATP y del sustrato respectivamente, así como dos sitios de fosforilación relevantes para la estabilidad de la enzima y su interacción con otras quinasas, uno en el motivo de giro y otro en el motivo hidrofóbico, incluidos en la región V5. Todas las isoformas de la familia PKC disponen además de una secuencia pseudosustrato en la región reguladora, cuya interacción con la región catalítica mantiene a la enzima en una conformación inactiva.

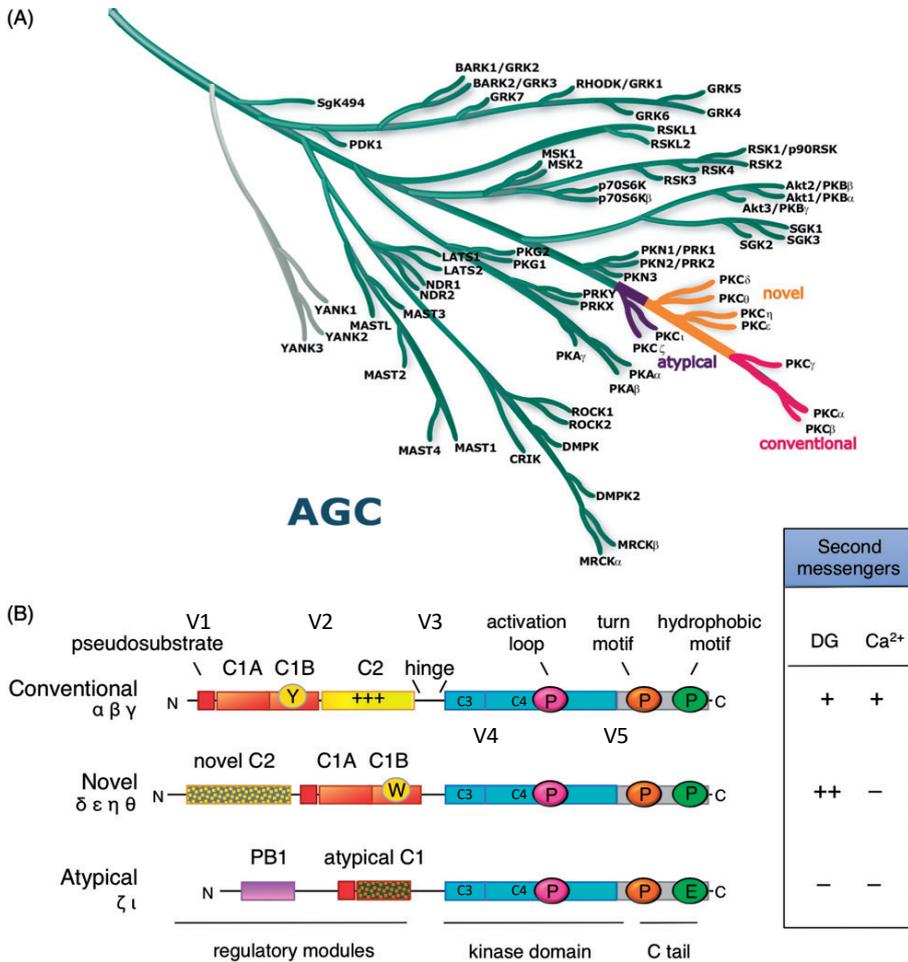


Figura 1.7. Las distintas isoformas de la familia PKC forman parte de la familia de quinasas AGC y se clasifican según los dominios estructurales que controlan su actividad (Adaptada de [Newton, 2018a](#)).

Regulación

La regulación de las isoformas de la familia PKC es compleja. Inicialmente, todas ellas sufren poco después de su síntesis una serie ordenada de eventos de fosforilación en tres posiciones conservadas, lo que les permite adquirir una conformación inactiva pero catalíticamente competente y resistente a la acción de fosfatasa y proteasas. Posteriormente, son capaces de responder a segundos mensajeros y de sufrir fosforilaciones, en otros residuos diferentes de los anteriores, que regulan la función de las diferentes isoformas PKC de forma individual ([Newton, 2018b, 2018a](#)). Así,

tras su síntesis, PKC se encuentra en una conformación abierta, en la que la región pseudosustrato no se encuentra interaccionando con el sitio activo, por lo que el lazo de activación y los módulos de direccionamiento a la membrana de la enzima quedan expuestos. La chaperona Hsp90 se asocia al motivo PXXP conservado en la cola del dominio C-terminal, para permitir que PKC sea fosforilada (Gould et al., 2009). Así, PDK-1 (*Phosphoinositide-Dependent Kinase 1*) se asocia al dominio C-terminal y fosforila una Thr del lazo de activación altamente conservada entre todas las isoformas de la familia PKC (Newton, 2010). Esto permite el posicionamiento de los determinantes claves en el sitio activo encargados de controlar la catálisis (Parker and Parkinson, 2001; Taylor and Kornev, 2011). Esta fosforilación inicial permite que se produzcan dos fosforilaciones adicionales: la fosforilación del motivo de giro por el complejo quinasa mTORC2 (Ikenoue et al., 2008) y la autofosforilación del motivo hidrofóbico mediante una reacción intramolecular (Behn-Krappa and Newton, 1999). Estas fosforilaciones conducen a una serie de cambios conformacionales, quedando PKC en una conformación catalíticamente competente pero inactiva debido a la interacción del dominio regulador con el catalítico a través de la secuencia pseudosustrato. En esta conformación los tres sitios de fosforilación descritos quedan protegidos de la defosforilación y la enzima es relativamente resistente a la degradación. Posteriormente, en presencia de la señal adecuada el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) es hidrolizado, generándose Ca²⁺ y DAG. En el caso de las cPKCs, en primer lugar, la unión de Ca²⁺ al dominio C2 dirige a PKC a la membrana plasmática, dejando expuestos una serie de residuos básicos que interaccionan con el PIP₂. En segundo lugar, el DAG se asocia al dominio C1, promoviendo un segundo cambio conformacional que expulsa a la secuencia pseudosustrato del sitio activo y, por lo tanto, activando a la enzima (Newton and Johnson, 1998; Orr et al., 1992). En el caso de las nPKCs, que únicamente son sensibles a DAG, se activan gracias a la hidrólisis de lípidos, diferentes del PIP₂, por la fosfolipasa C, lo que les permite asociarse no solo a la membrana plasmática, sino también a las membranas de otros compartimentos celulares como Golgi y mitocondria (Gallegos et al., 2006). Por último, las aPKCs son activadas gracias a la interacción de su dominio PB1 con los dominios PB1 de otras proteínas *scaffold*, lo que les permite liberarse de la autoinhibición ejercida por la secuencia pseudosustrato (Drummond and Prehoda, 2016).

LA PROTEÍNA QUINASA C δ DE MAMÍFEROS

PKC δ es una proteína de unos 78 kDa que, a diferencia de los otros miembros del grupo de las nPKCs, se expresa de forma ubicua en los tejidos de mamíferos (Kikkawa et al., 2002; Zhao et al., 2012).

Regulación

PKC δ puede sufrir dos tipos de modificaciones que contribuyen a su regulación: modificaciones reversibles, que incluyen la fosforilación en residuos de Ser/Thr y la fosforilación en residuos de Tyr, y modificaciones irreversibles, como es el corte proteolítico mediado por caspasas (Figura 1.8).

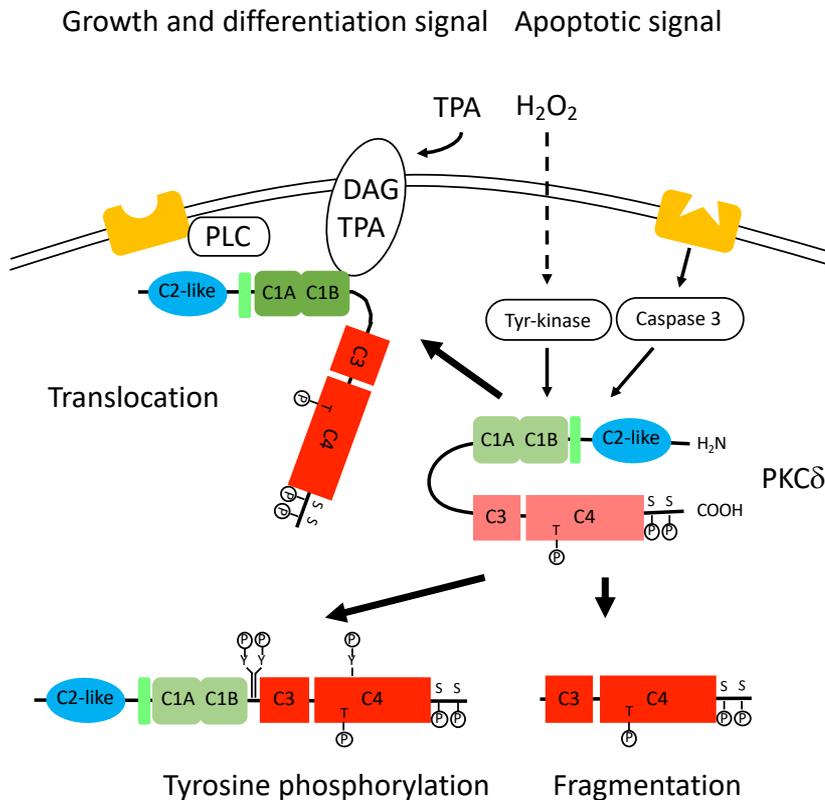


Figura 1.8. Activación diferencial de PKC δ mediante distintos mecanismos (Adaptada de Kikkawa et al., 2002).

Fosforilación en residuos de Ser/Thr necesarios para la estabilización del lazo de activación

Como se ha comentado anteriormente, tres fosforilaciones secuenciales en residuos de Ser y Thr dejan a la quinasa PKC δ en una conformación cerrada, estable, catalíticamente competente y resistente a la acción de proteasas y fosfatasa. La primera de ellas es la fosforilación de la Thr⁵⁰⁵ en el lazo de activación por PDK-1, lo que da lugar a la estabilización del lazo de activación y al correcto posicionamiento de los residuos encargados de llevar a cabo la catálisis. En el caso de PKC δ esta fosforilación da lugar a cierta controversia. Ensayos *in vitro*, en los que PKC δ es purificada a partir de extractos crudos de bacteria indican que esta isoforma es activa en ausencia de fosforilación en la Thr⁵⁰⁵, aunque su actividad se encuentra disminuida (Stempka et al., 1997). En este sentido, se cree que la carga negativa del residuo ácido Glu⁵⁰⁰ en el lazo de activación podría estar desempeñando el papel del grupo fosfato de la Thr⁵⁰⁵ fosforilada, ya que la mutación de dicho Glu a Val reduce de forma importante (un 73%) la actividad quinasa de PKC δ purificada de *E. coli* (Stempka et al., 1999).

Más recientemente, se ha descrito la existencia de un nuevo mecanismo exclusivo de PKC δ implicado en su activación mediante la estabilización de su lazo de activación (Liu et al., 2006). La exclusividad de este mecanismo se debe a que los residuos más relevantes implicados en el mismo (Phe⁴⁹⁸ y Phe⁵²⁵), así como la presencia de una hélice α denominada hélice A, son específicos de la isoforma PKC δ . Interacciones hidrofóbicas entre residuos clave de la hélice A (Tyr³³² y Trp³³⁶) y otros residuos presentes en el lazo de activación (Ile⁴⁹⁷ y Phe⁴⁹⁸), la hélice F (Phe⁵²⁵) y la hélice C (Arg³⁹⁷) son los responsables de este mecanismo. Se ha descrito que la mutación de los dos residuos de Phe⁴⁹⁸ y Phe⁵²⁵, en el contexto de la proteína completa con la Thr⁵⁰⁵ mutada a Ala, reduce drásticamente la actividad catalítica. Del mismo modo, mientras una versión truncada consistente exclusivamente en el dominio catalítico no es funcional en ausencia de fosforilación de la Thr⁵⁰⁵, la adición de la hélice A a este fragmento permite regenerar una enzima catalíticamente activa. Así pues, los datos disponibles parecen indicar que en el caso particular de PKC δ la fosforilación de la Thr⁵⁰⁵ del lazo de activación no es necesaria para obtener una enzima catalíticamente competente, debido a la existencia del residuo Glu⁵⁰⁰ en el lazo de activación y/o del mecanismo de

estabilización del lazo de activación mediante interacciones hidrofóbicas entre diferentes residuos de la proteína y en el que se ve implicada la hélice A.

Fosforilaciones en residuos de Tyr

A diferencia de la fosforilación en residuos de Ser/Thr, la fosforilación en residuos de Tyr parece ser una modificación específica de isoforma más que una modificación común a todos los miembros de la familia PKC. PKC δ es la isoforma cuya fosforilación en residuos de Tyr se produce de una manera más eficiente (Kikkawa et al., 2002). Diferentes residuos son fosforilados dependiendo del estímulo que recibe la célula, lo que determina las propiedades funcionales de la enzima. La fosforilación en residuos de Tyr puede dar lugar tanto a un aumento como a una disminución en la actividad de PKC δ , e incluso puede verse afectada su especificidad por los sustratos, así como su regulación por cofactores (Steinberg, 2004). Parece que son las tirosinas quinasas de la familia SFK (Src, Fyn, Yes y Lyn) las responsables de la fosforilación de estos residuos de Tyr (Reyland and Jones, 2016). Por lo general, en respuesta al éster de forbol TPA, también llamado PMA, y al factor de crecimiento derivado de plaquetas, PDGF, se produce la fosforilación de residuos de Tyr que residen en el dominio regulador de la proteína (Tyr⁵², Tyr¹⁵⁵ y Tyr¹⁸⁷), influyendo en la función celular de PKC δ pero no en su actividad (Steinberg, 2004). Por otra parte, en respuesta a H₂O₂ se produce la fosforilación de residuos de Tyr que residen en la región bisagra (Tyr³¹¹ y Tyr³³², las más relevantes) y en el dominio catalítico de la proteína (Tyr⁵¹², única conservada en todas las isoformas), dando lugar a una enzima constitutivamente activa e independiente de DAG (Konishi et al., 1997, 2001).

Corte proteolítico mediado por caspasas

En respuesta a señales apoptóticas como la radiación ionizante (UV y radiación γ) de alta intensidad y agentes que dañan el DNA, las caspasas llevan a cabo el corte proteolítico de PKC δ (Emoto et al., 1995). Este corte es realizado por la caspasa 3 en el sitio de corte para caspasas que alberga la región bisagra (GED³²⁴MQD³²⁷NS), entre el Asp³²⁷ y la Asn³²⁸, generándose un fragmento catalítico de 41 kDa y otro regulador de 38 kDa (Bharti et al., 1998; Ghayur et al., 1996). Esta modificación permite que el dominio catalítico quede separado de forma permanente del dominio regulador, liberándose de la autoinhibición ejercida por la secuencia pseudosustrato presente en el

dominio regulador, y dando como resultado una enzima constitutivamente activa que contribuye a la inducción de la apoptosis (Basu et al., 2001).

Localización subcelular

La localización subcelular de PKC δ varía según el estímulo que recibe la célula. Así, en respuesta a señales que inducen la producción de segundos mensajeros, PKC δ se asocia a membranas. En respuesta a H₂O₂ o radiaciones ionizantes de baja intensidad permanece soluble en el citoplasma. Por último, en respuesta a señales apoptóticas (agentes que dañan el DNA o radiaciones ionizantes de alta intensidad) PKC δ también es capaz de translocarse al núcleo, puesto que tras el corte proteolítico mediado por la caspasa 3 queda expuesta una señal de localización nuclear (KRKVEPPFKPKVK) que permite su importación al núcleo (Adwan et al., 2011; Humphries et al., 2008).

Función biológica

Históricamente el papel más estudiado de PKC δ ha sido el de inducción de la apoptosis (Basu and Pal, 2010). Puesto que PKC δ se expresa de forma ubicua en todos los tejidos, su capacidad para activar apoptosis tiene que estar fuertemente regulada para prevenir que se produzca muerte celular inapropiada. Los estudios realizados sobre el papel de PKC δ en apoptosis sugieren su participación como un integrador de señales de daño *upstream* de la mitocondria (Reyland and Jones, 2016). De hecho, la pérdida o inhibición de PKC δ suprime eventos apoptóticos tempranos, como la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, y eventos posteriores, como la activación de caspasas y la fragmentación del DNA (Matassa et al., 2001; Reyland et al., 1999). Se han sugerido múltiples mecanismos por los que PKC δ puede controlar la apoptosis incluyendo la fosforilación directa de sustratos, la regulación de la transcripción, el procesamiento del mRNA y la regulación de la estabilidad, la unión y el secuestro de proteínas (Reyland and Jones, 2016).

Un daño excesivo en el DNA causa la inducción de apoptosis con el objeto de eliminar las células dañadas. Es conocido que PKC δ participa en este proceso, en el que sufre el corte proteolítico mediado por caspasas (Yoshida, 2007). En presencia de daño, la quinasa del *checkpoint* ATM controla la translocación al núcleo de PKC δ donde fosforilará a la proteína del complejo abrazadera Rad9 (Ddc1 en *S. cerevisiae*). Esto favorece la interacción de Rad9 con la proteína antiapoptótica Bcl2, lo que origina la inducción de la apoptosis

(Yoshida et al., 2003). Además, PKC δ induce apoptosis en respuesta a daño en el DNA a través de la regulación de p53 y por otros mecanismos independientes de p53 (Basu and Pal, 2010; Zhao et al., 2012). Aunque PKC δ funciona generalmente como una proteína proapoptótica en respuesta a daño en el DNA, también puede tener funciones anti-apoptóticas durante la apoptosis inducida por receptor, lo que apunta a una conexión entre PKC δ y apoptosis más compleja que la imaginada (Basu and Pal, 2010).

En nuestro grupo hemos descrito una conexión novedosa de PKC δ con el daño en el DNA: PKC δ es capaz de suprimir en la levadura el defecto de activación de la quinasa del *checkpoint* de integridad del DNA Rad53 que se produce en ausencia de Pkc1 (Soriano-Carot et al., 2014). Además, se indentificó también que en células humanas la activación de Chk2 (ortólogo de Rad53) por daño en el DNA dependía de PKC δ . Los resultados revelaron que la fosforilación de Chk2 estaba afectada cuando se inhibía específicamente PKC δ , sugiriendo que esta isoforma también desempeña un papel en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA en células de mamíferos.

OBJETIVOS

La proteína Whi7 presenta un alto grado de homología con el represor transcripcional de *Start* Whi5. Además, Whi7 se identificó inicialmente como un supresor en multicopia de mutantes en el *checkpoint* de integridad del DNA. Por otro lado, nuestro grupo ha descrito que la ruta PKC controla este *checkpoint* y diversos resultados relacionan la ruta PKC con la expresión del gen *WHI7*. En base a todos estos antecedentes se han establecido los siguientes objetivos:

1. Estudio de la regulación de Whi7 a lo largo del ciclo celular y su papel como represor transcripcional de *Start*.
2. Análisis comparativo de los represores transcripcionales Whi7 y Whi5: niveles celulares, mecanismo de asociación a promotores y regulación espacial.
3. Estudio de la conexión entre Whi7 y la ruta PKC. Implicación en la respuesta a estrés de pared celular y estrés genotóxico.
4. Estudio de la función de la isoforma de mamíferos PKC δ en el *checkpoint* de integridad del DNA en la levadura *S. cerevisiae*.

2. Material y Métodos

Técnicas en *Escherichia coli*

Cepas de *E. coli* y condiciones de crecimiento

La cepa de *E. coli* utilizada fue DH5 α . Las células se crecieron en medio LB (extracto de levadura 0.5%, triptona 1%, NaCl 1%). Las colonias resistentes a ampicilina se seleccionaron en medio de cultivo suplementado con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nafcilina. Las placas de medio de cultivo sólido se prepararon añadiendo agar bacteriológico al 2%. Todos los medios se esterizaron en el autoclave durante 20 minutos a 1 atm de presión y a 121°C de temperatura. Los cultivos se crecieron a 37°C en agitación.

Protocolo de transformación

Mediante el tratamiento de las células de la cepa DH5 α con glicerol al 10% en frío se obtuvieron células electrocompetentes, que se emplearon para llevar a cabo las transformaciones con plásmidos. Las transformaciones se realizaron siguiendo el método de transformación por electroporación, para el que se utilizó un electroporador *E. coli Pulser (BioRad)* y unas condiciones de pulso de 1.8 kV, 25 μF , 200 Ω . Tras el pulso, se dejaron recuperar las células en medio LB durante 60 min a 37°C antes de sembrarlas en placas de selección y se dejaron crecer toda la noche a 37°C.

Mutagénesis dirigida

Para introducir mutaciones puntuales de sustituciones de nucleótidos sobre una secuencia de DNA presente en un plásmido se utilizó el *QuikChange® Site-directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies)*, que

emplea la polimerasa altamente procesiva *PFU*[®]. Las parejas de oligonucleótidos complementarios utilizados para cada cambio fueron diseñadas empleando el programa *QuikChange*[®] *Prime Design Program* (*Agilent*) y sintetizadas por *Metabion*. Mediante un programa de PCR, consistente en 20 ciclos de 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min 30 s de hibridación a 52°C y 10 min de elongación a 68°C, se consiguieron introducir los cambios deseados en los plásmidos de nueva síntesis. Tras la reacción se incubó la mezcla de PCR con la enzima *DpnI* durante 3 h a 37°C, de modo que se digirieron exclusivamente las cadenas de DNA metiladas procedentes de *E. coli* y que sirvieron de molde para la reacción, dejando intactas aquellas de nueva síntesis (no metiladas), así conseguimos eliminar de la mezcla de PCR el plásmido original empleado como molde para la reacción. El producto obtenido de esta digestión se usó para transformar células DH5α competentes según se ha explicado en el punto anterior. Por último, se obtuvo el DNA plasmídico de algunas de las colonias obtenidas tras la transformación y mediante secuenciación de DNA Sanger (*Servei de Seqüenciació, Universitat de València*) se confirmó la introducción de las mutaciones puntuales deseadas.

Plásmidos

Los plásmidos centroméricos pWHI7, pWHI7-NP, pGAL1:WHI7 y pGAL1:WHI7-NP que expresan la proteína Whi7 silvestre o Whi7 mutada en todos los sitios de fosforilación por Cdc28 etiquetada con HA y bajo el control del promotor *GAL1* respectivamente, fueron amablemente cedidos por el Dr. M. Aldea.

Los plásmidos pADH1:WHI7-GFP y pADH1:WHI7NP-GFP se obtuvieron mediante recombinación ([Oldenburg et al., 1997](#)) en la cepa *whi7* de *S. cerevisiae*, para lo cual se cotransformó con el plásmido pADH1p:GFP-ADH1t linearizado (donde pADH1p es el promotor de *ADH1*, GFP es la secuencia de GFP y ADH1t es el terminador de *ADH1*) y con el fragmento génico que contiene la región codificante del gen *WHI7*, ya sea silvestre o con todos los sitios fosforilables por Cdc28 mutados, obtenido por PCR a partir de los plásmidos pWHI7 y pWHI7NP empleando oligonucleótidos *forward* y *reverse* que contenían una región homóloga a las secuencias C-terminal del promotor *ADH1* y N-terminal de GFP.

Los plásmidos pWHI7^{3A} y pWHI7^{3A, S212A} se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida empleando como molde para la reacción de PCR los plásmidos pWHI7 y pWHI7^{3A}, respectivamente. El plásmido pWHI7^{3A} contiene las mutaciones S98A, T100A y S105A. El plásmido pWHI7^{3A, S212A} contiene, además de las mutaciones anteriores, la mutación S212A.

El plásmido pADH1:NLS-WHI7⁷⁰⁻¹¹⁰-GFP se obtuvo mediante clonación del fragmento génico de *WHI7* comprendido entre los aminoácidos 70 a 110, obtenido por PCR a partir del plásmido pWHI7 empleando oligonucleótidos *forward* y *reverse* que contenían los sitios de restricción de *KpnI* y *BamHI* respectivamente, en el plásmido pADH1:NLS-GFP (donde pADH1p es el promotor de *ADH1*, NLS es la secuencia de localización nuclear del virus SV40 y GFP es la secuencia de GFP) digerido con las enzimas de restricción correspondientes.

El plásmido vector centromérico pADH1:NLS-GFP (descrito anteriormente) y los plásmidos centroméricos pADH1:WHI5-GFP y pADH1:NLS-WHI5⁵¹⁻¹⁶⁷-GFP expresan la proteína Whi5 silvestre o un fragmento de Whi5 comprendido entre los aminoácidos 51 a 167 fusionado a la secuencia de localización nuclear del virus SV40, ambas fusionadas con GFP y bajo el control del promotor *ADH1* (Taberner et al., 2009).

Los plásmidos centroméricos pGAL1:WHI5, pGAL1:WHI5-NP y los plásmidos episomales pYEp-SWI6 y pYEp-SWI6 S4A que expresan la proteína Whi5 silvestre o Whi5 mutada en todos los sitios de fosforilación por Cdc28 etiquetada con myc bajo el control del promotor *GAL1* y la proteína Swi6 silvestre o Swi6 mutada en todos los sitios de fosforilación por Cdc28, fueron amablemente cedidos por el Dr. C. Wittenberg.

El plásmido episomal pYES-Grr1ΔF-FLAG que expresa la proteína Grr1 que carece de su F-box bajo el control del promotor *GAL1*, de modo que Grr1 es capaz de unir sustratos sin promover su degradación, fue amablemente cedido por el Dr. D.P. Toczyski.

El plásmido vector episomal pYES2-GST y los plásmidos episomales pYES2-GST-CDC4 y pYES2-GST-NES-CDC4 que expresan la proteína Cdc4 silvestre o Cdc4 fusionada a la secuencia de exportación nuclear de la proteína PKI humana, fueron amablemente cedidos por la Dr. J. Benanti.

El plásmido centromérico pSpadh1:CLN2 expresa la ciclina Cln2 bajo el control del promotor *adh1* de *Saccharomyces pombe*. El plásmido pSCB:lacZ expresa el gen reportero *lacZ* bajo el control de un fragmento de -507 a -367 del promotor de la endonucleasa HO que contiene 3 elementos SCB.

El plásmido centromérico pSLT2 expresa la proteína Slt2 bajo el control de su propio promotor. El plásmido centromérico pPKC1 expresa la proteína Pkc1 bajo el control de su propio promotor (construido por clonación de la secuencia codificante de *PKC1* en el vector pPKC1p:ADH1t, donde PKC1p es el promotor de *PKC1* y ADH1t es el terminador de *ADH1*).

Los plásmidos centroméricos pPKC δ , pPKC ϵ y pPKC η expresan las proteínas de ratón PKC δ , PKC ϵ y PKC η bajo el control del promotor de *PKC1* (construidos por clonación de la secuencia codificante de PKC δ , PKC ϵ y PKC η , respectivamente, en el vector pPKC1p:ADH1t) (Soriano-Carot et al., 2014).

El plásmido pPKC θ se obtuvo mediante recombinación (Oldenburg et al., 1997) en la cepa silvestre W303 de *S. cerevisiae*, para lo cual se cotransformó con el plásmido pPKC1p:ADH1t linearizado y con el fragmento génico que contiene la región codificante de la isoforma PKC θ , obtenido por PCR a partir de cDNA de cerebro de ratón empleando oligonucleótidos *forward* y *reverse* que contenían una región homóloga a las secuencias C-terminal del promotor *PKC1* y N-terminal del terminador *ADH1*.

El plásmido pPKC δ -GFP se obtuvo mediante clonación del fragmento génico que contiene la región promotora del gen *PKC1* y la región codificante de la isoforma PKC δ de mamíferos, obtenido por PCR a partir del plásmido pPKC δ empleando oligonucleótidos *forward* y *reverse* que contenían los sitios de restricción de *EcoRI* y *BamHI* respectivamente, en el plásmido pGFP-ADH1t (donde GFP es la secuencia de GFP y ADH1t es el terminador de *ADH1*) digerido con las enzimas de restricción correspondientes.

Los plásmidos pPKC δ ^{T505A}, pPKC δ ^{E500G}, pPKC δ ^{F525H}, pPKC δ ^{F498L}, pPKC δ ^{Y332N}, pPKC δ ^{W336R}, pPKC δ ^{F525P}, pPKC δ ^{F498M} y pPKC δ ^{Y311F} se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida empleando como molde para la reacción de PCR el plásmido pPKC δ . Los plásmidos pPKC δ ^{T505A, E500G}, pPKC δ ^{F525H, F498L}, pPKC δ ^{Y332N, W336R} y pPKC δ ^{Y311F, Y332F} se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida empleando como molde para la reacción de PCR los plásmidos pPKC δ ^{T505A}, pPKC δ ^{F525H}, pPKC δ ^{Y332N} y pPKC δ ^{Y311F}, respectivamente. El plásmido pPKC δ ^{Y311F},

Y332F, Y512F se obtuvo mediante mutagénesis dirigida empleando como molde para la reacción de PCR el plásmido pPKC δ ^{Y311F, Y332F}. El nombre del plásmido indica la mutación o mutaciones introducidas en cada caso.

Todos los plásmidos construidos se comprobaron por secuenciación y en los experimentos se analizaron 2 o 3 clones independientes de cada construcción (se muestra un experimento representativo). El cDNA utilizado fue amablemente cedido por la Dra. I. Fariñas.

Técnicas en *S. cerevisiae*

Cepas de *S. cerevisiae*

Las cepas de levadura utilizadas en este trabajo se describen en la [Tabla 1](#). Las deleciones de genes, los marcajes en el extremo C-terminal de los mismos, así como los cambios de promotor endógeno por el promotor *GAL1*, se realizaron mediante amplificación por PCR del *cassette* correspondiente utilizando como molde los plásmidos de la serie pFA6a ([Longtine et al., 1998](#)), el plásmido pYM15 ([Janke et al., 2004](#)), a partir de DNA genómico de otras cepas con dichos cambios disponibles procedentes de nuestro grupo o fueron compradas a Euroscarf. Los cambios de promotor endógeno por el promotor regulable por doxiciclina *tetO₇* se realizaron utilizando el plásmido pCM225 ([Bellí et al., 1998](#)).

Tabla 1. Cepas de levadura

W303-1a ^b	<i>MATa ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-52 can1</i>
W303-1b ^b	<i>MATα ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-52 can1</i>
WCG4 α ^b	<i>MATα his3-11 leu2-3,112 ura3Δ</i>
A364A ^a	<i>MATa ade1 ade2 ura1 his7 lys2 tyr1 gal1</i>
<i>pre1pre2</i> ^a	<i>pre1-1 pre2-2</i> en WCG4 α
<i>cdc4</i> ^{ts g}	<i>cdc4-1</i> en W303-1a
<i>cdc15</i> ^{ts g}	<i>cdc15-2</i> en W303-1a
<i>cdc16</i> ^{ts g}	<i>cdc16-1</i> en A364
<i>cdc28</i> ^{ts g}	<i>MATa bar1 ade1 his2 leu2-3,111 trp1 ura3Δ cdc28-13</i>
<i>cdc53</i> ^{ts g}	<i>cdc53-1</i> en W303-1a
CML128 ^e	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1 his4 can1</i>

2. Material y Métodos

CML128 <i>whi7</i> ^e	<i>whi7::kanMX6</i> en CML128
BF305 ^c	<i>GAL1p:CLN3 cln1::HIS3 cln2::TRP1 leu2 ura3 ade1 arg5 arg6 met14</i>
K3080 ^d	<i>clb1 clb2^{ts} clb3::TRP1 clb4::HIS3</i> en W303-1a
MCY123 ^g	<i>CLB2-3HA-HIS3 SIC1-13myc-TRP1</i> en <i>cdc15^{ts}</i>
MT244 ^b	<i>MATa ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-52 can1 cln3::URA3</i>
JC6-3A ^g	<i>MATa rsf8/pkc1-8 SWI4 ade2 ura3 his3 leu2 trp1 can1 met</i>
JKM139 ^f	<i>MATa ade1-100 leu2-3,112 lys5 ura3-52 trp1::hisG hoD hml1::ADE1 hmr::ADE1 ade3::GAL1-HO</i>
GPY1115 ^g	<i>MATa pkc1Δ1::HIS3 leu2-3,112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 ade2-101 suc2-Δ9</i>
JCY0167 ^g	<i>swi4::LEU2</i> en W303-1a
JCY0221 ^g	<i>swi6::TRP1</i> en W303-1a
JCY0325 ^g	<i>swi6::kanMX6</i> en W303-1a
JCY0622 ^g	<i>SWI6-13myc- kanMX6</i> en W303-1a
JCY0624 ^g	<i>mbp1::URA3</i> en W303-1a
JCY0740 ^g	<i>WHI5-3HA-TRP1</i> en JCY0167
JCY1018 ^g	<i>msn5::HIS3</i> en W303-1a
JCY1148 ^g	<i>kanMX6-tetO₇;RAD53</i> en W303-1a
JCY1205 ^g	<i>GAL1:CDC14::URA3</i> en W303-1a
JCY1281 ^g	<i>kanMX6-tetO₇;PKC1</i> en W303-1a
JCY1346 ^g	<i>WHI5-3HA-TRP1</i> en W303-1a
JCY1440 ^g	<i>cln3::TRP1</i> en W303-1b
JCY1539 ^g	<i>grr1::LEU2</i> en W303-1a
JCY1698 ^g	<i>kanMX6-tetO₇;PKC1</i> en JKM139
JCY1707	<i>WHI7-GFP-kanMX6</i> en JC6-3A
JCY1728	<i>WHI7-3HA-TRP1</i> en W303-1a
JCY1730	<i>WHI7-3HA-TRP1</i> en JC6-3A
JCY1732	<i>WHI7-3HA-TRP1</i> en <i>cdc53^{ts}</i>
JCY1735	<i>WHI7-3HA-TRP1</i> en A364A
JCY1737	<i>WHI7-3HA-TRP1</i> en <i>cdc16^{ts}</i>
JCY1739	<i>WHI7-3HA-HIS3</i> en WCG4α

JCY1740	<i>WHI7-3HA-HIS3</i> en <i>pre1pre2</i>
JCY1746	<i>WHI7-GFP-kanMX6</i> en W303-1a
JCY1757	<i>WHI7-3HA-TRP1</i> en <i>cdc4^{ts}</i>
JCY1760	<i>WHI7-3HA-TRP1</i> en JCY1539
JCY1789	<i>WHI7-GFP-kanMX6</i> en <i>cdc28^{ts}</i>
JCY1802	<i>WHI7-GFP-kanMX6</i> en MCY123
JCY1804	<i>kanMX6-GAL1:WHI7</i> en JCY1728
JCY1805	<i>kanMX6-GAL1:WHI7</i> en JCY1730
JCY1815	<i>WHI7-GFP-kanMX6</i> en JCY1440
JCY1819	<i>whi7::kanMX6</i> en W303-1a
JCY1823	<i>whi7::kanMX6</i> en JC6-3A
JCY1836	<i>SIC1-13myc-HIS3</i> en <i>cdc15^{ts}</i>
JCY1837	<i>cln3::TRP1</i> en JCY1836
JCY1843	<i>whi7::kanMX6</i> en JCY1836
JCY1868	<i>whi7::kanMX6</i> en MT244
JCY1872	<i>whi7::kanMX6</i> en JCY0167
JCY1874	<i>whi5::LEU2</i> en W303-1a
JCY1875	<i>whi5::LEU2</i> en MT244
JCY1879	<i>SWI4-13myc-HIS3</i> en <i>cdc15^{ts}</i>
JCY1880	<i>whi7::kanMX6</i> en JCY0221
JCY1884	<i>swi6::kanMX6</i> en JCY1879
JCY1885	<i>kanMX6-GAL1:WHI7</i> en JCY1874
JCY1896	<i>whi7::KanMX6</i> en JCY1837
JCY1899	<i>nrm1::TRP1</i> en JCY1885
JCY1923	<i>nrm1::TRP1</i> en W303-1a
JCY1934	<i>WHI5-3HA-kanMX6</i> en JCY0221
JCY1952	<i>WHI7-GFP-TRP1</i> en W303-1a
JCY1956	<i>SWI4-6HA-HIS3</i> en JCY1952
JCY1958	<i>swi6::kanMX6</i> en JCY1956
JCY1976	<i>SWI4-13myc-HIS3</i> en W303-1a
JCY1982	<i>SWI6-13myc-HIS3</i> en JCY1346
JCY1984	<i>SWI4-13myc-HIS3</i> en JCY1346

2. Material y Métodos

JCY1991	<i>WHI7-GFP-kanMX6</i> en K3080
JCY2008	<i>WHI7-GFP-kanMX6</i> en BF305
JCY2013	<i>cln1::kanMX6 cln2::LEU2</i> en JCY1757
JCY2015	<i>WHI7-6HA-HIS3</i> en W303-1a
JCY2036	<i>WHI5-6HA-HIS3</i> en W303-1a
JCY2039	<i>slt2::HIS3</i> en JCY1746
JCY2041	<i>slt2::HIS3</i> en W303-1a
JCY2042	<i>slt2::HIS3</i> en JCY1728
JCY2084	<i>MBP1-6HA-HIS3</i> en W303-1a
JCY2095	<i>whi5::kanMX6</i> en JCY0221
JCY2100	<i>swi4::LEU2</i> en JCY2084
JCY2112	<i>WHI5-6HA-HIS3</i> en MT244
JCY2114	<i>WHI7-6HA-HIS3</i> en MT244
JCY2116	<i>WHI5-GFP-kanMX6</i> en W303-1a
JCY2134	<i>WHI5-3HA-TRP1</i> en JCY1879
JCY2135	<i>swi6::kanMX6</i> en JCY2134
JCY2138	<i>slt2::kanMX6</i> en JCY1976
JCY2140	<i>slt2::HIS3</i> en JCY1346
JCY2164	<i>WHI5-6HA-HIS3</i> en JC6-3A
JCY2166	<i>rlm1::LEU2</i> en JCY1728
JCY2181	<i>MBP1-13myc-HIS3</i> en JCY0167
JCY2187	<i>WHI7-3HA-TRP1</i> en JCY2181
JCY2194	<i>mbp1::HIS3</i> en W303-1a
JCY2237	<i>whi5::kanMX6</i> en JCY0167

^a del Dr. H. Wolf; ^b del Dr. M. Tyers; ^c del Dr. B. Futcher; ^d del Dr. K. Nasmyth; ^e del Dr. M. Aldea; ^f del Dr. D. A. Haber; ^g de nuestro laboratorio (Ciclo Celular)

Condiciones de crecimiento

Las células de levadura se crecieron en medio YPD (extracto de levadura 1%, peptona bacteriológica 2%, glucosa 2%), en medio YPGal (galactosa 2% en lugar de glucosa 2%), en medio mínimo sintético SD (*yeast*

nitrogen base 0,67%, glucosa 2%) suplementado con los aminoácidos adecuados a 40 µg/mL para el mantenimiento de plásmidos, SGal (galactosa 2% en lugar de glucosa 2%) o SRaf (rafinosa 2% en lugar de glucosa 2%). Para la preparación de placas de medio sólido se añadió agar al 2%. Las cepas resistentes a geneticina se crecieron en las placas correspondientes suplementadas con G418 (geneticina) 200 µg/mL. Para reprimir la expresión de aquellos genes bajo el control del promotor *tetO₇* se añadió doxiciclina al medio a una concentración de 5-10 µg/mL. Las células se crecieron a 25°C en agitación. En el caso de mutantes termosensibles el fenotipo mutante se alcanzó por incubación a 37°C durante 3 horas.

La parada del ciclo celular en fase G1 se realizó añadiendo al medio factor α 5 µg/mL durante 2-3 horas. Posteriormente se comprobó la parada del ciclo celular en fase G1 mediante microscopía óptica. Por otro lado, la parada del ciclo celular en fase G2/M se llevó a cabo añadiendo al medio de cultivo nocodazol 15 µg/mL durante 1-2 horas. En este caso la microscopía óptica también se empleó para comprobar la parada del ciclo celular en fase G2/M.

Para la inducción de estrés consecuencia de elevadas temperaturas se crecieron los cultivos a 25°C hasta fase exponencial, tras lo cual se transfirieron a 37°C durante 3 horas. Para la inducción de estrés de pared celular por el compuesto orgánico Congo Red (CR) se crecieron los cultivos a 25°C hasta fase exponencial, tras lo cual se adicionó al medio CR 40 µg/mL durante 4 horas.

Para la inducción de estrés genotóxico se añadió hidroxiiurea (HU) 150-200mM o metilmetanosulfonato (MMS) 0,03%-0,04% a cultivos en fase de crecimiento exponencial. Para la inducción de un único DSB en aquellas cepas con la expresión de la endonucleasa HO bajo el control del promotor *GAL1*, los cultivos se crecieron en medio SD. Cuando los cultivos llegaron a fase de crecimiento exponencial, las células se lavaron y se resuspendieron en medio SGal (o SD como control negativo) y se incubaron durante 8h en agitación a 25°C.

Para el ensayo de pérdida de plásmido, la cepa *pkc1Δ* se transformó con el plásmido pPKC δ . Los transformantes se crecieron en el medio de selección correspondiente y se sembraron en placas suplementadas con

FOA (5- Fluoroorotic Acid, Sigma) 1 mg/mL, en las que las células perdieron el plásmido con marcador de selección URA.

Para los ensayos de crecimiento en sectores se sembró una cantidad equivalente de cada cepa en las placas adecuadas y se dejaron crecer durante 2 o 3 días a 25°C.

Para los ensayos de crecimiento por goteo se prepararon diluciones 1:10 seriadas de cultivos en fase de crecimiento exponencial de las diferentes cepas tras haber igualado las concentraciones de los mismos a $1-3 \times 10^6$ células/mL. Se depositaron 3-5 μ L de cada dilución sobre las placas adecuadas y las células se incubaron a 25°C durante 2 o 3 días. En el caso de mutantes termosensibles o para inducir estrés consecuencia de elevadas temperaturas las células se incubaron a 37°C.

Protocolo de transformación

La transformación de levadura, ya sea con plásmidos o con productos de PCR, se realizó siguiendo el método de transformación con acetato de litio (Gietz et al., 1995). Los transformantes se seleccionaron por auxotrofia, empleando placas de medio mínimo que carecían del aminoácido correspondiente, o por resistencia al antibiótico geneticina, para lo cual tras el choque térmico las células se incubaron en 4 mL de medio YPD durante 12-18 horas antes de sembrarlas en placas suplementadas con geneticina 200 μ g/mL. En ambos casos las placas se incubaron a 25°C durante 2-3 días.

Análisis del tamaño celular

El tamaño celular se determinó a partir de cultivos en fase de crecimiento exponencial ($2-4 \times 10^6$ células/mL), tras haber sonicado brevemente las células para dispersarlas, con un *Particle count and Size Analyzer Z2* (Coulter Inc.). Los resultados son la media móvil de los histogramas derivados a partir de, como mínimo, seis cultivos independientes de cada cepa.

Determinación del índice de gemación

El índice de gemación (*budding index*) se determinó, tras la sonicación de cultivos en fase de crecimiento exponencial ($2-8 \times 10^6$ células/mL), por recuento de células con y sin yema en el microscopio óptico. Los resultados

son la media de, como mínimo, tres recuentos diferentes (aproximadamente 100 células/recuento) de cada cepa.

Western blot

Los extractos totales de proteína para el análisis por Western blot se prepararon a partir de aproximadamente 10^8 células de cultivos en fase de crecimiento exponencial. Las células se resuspendieron en 100 μ L de agua y, después de añadir 100 μ L de NaOH 0,2M, se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se recogieron por centrifugación (12.000 rpm - 1 min), se resuspendieron en 50 μ L del tampón de carga/disolvente de muestras SDS-PAGE (0.2M Tris-HCl pH 7.5, 8% SDS, 40% glicerol, 0.2M DTT, 0.04% azul de bromo-fenol) y se incubaron durante 5 minutos a 95°C. Los extractos se clarificaron por centrifugación (3.000 rpm - 10 min) y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. La cantidad de proteína total extraída se estimó mediante el método de Bradford empleando el reactivo *Dye Reagent (Bio-Rad)*. Cantidades equivalentes de proteína se resolvieron en un gel SDS-PAGE, tras lo cual se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante electrotransferencia. Las membranas se bloquearon con TBS-T (Tris-HCl 0.1M pH 7.5, NaCl 0,125M, Tween-20 0,1%) durante 1 hora y se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C. Después de lavar las membranas con TBS-T, se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora a 4°C y se volvieron a lavar con TBS-T. Los anticuerpos primarios utilizados fueron el anticuerpo monoclonal anti-HA peroxidasa 3F10 (*Roche Diagnostics*) diluido 1:5.000, el anticuerpo monoclonal anti-c-myc 9E10 (*Roche Diagnostics*) diluido 1:5.000, anti-GFP monoclonal (*Roche Diagnostics*) diluido 1:5.000, anti-FLAG M2 monoclonal (*Sigma-Aldrich*) diluido 1:10.000, anti-Cdc2 p34 (PSTAIRE) sc-53 monoclonal (*Santa Cruz Biotechnology Inc.*) diluido 1:2.000, anti-Rad53-YC19 (*Santa Cruz Biotechnology*) diluido 1:10.000, anti-Mpk1 (SlT2)-yC20 (*Santa Cruz Biotechnology Inc.*) diluido 1:10.000 y anti-Cdc14 (y-300) (*Santa Cruz Biotechnology Inc.*) diluido 1:1.000. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron IgG anti-ratón (*Thermo Fisher Scientific*), IgG anti-conejo (*Thermo Fisher Scientific*) e IgG anti-cabra (*Santa Cruz Biotechnology Inc.*) conjugados con peroxidasa de rábano picante diluidos 1:20.000. La detección se realizó usando los reactivos *Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific)*. Las bandas se cuantificaron con el programa *ImageQuant™ LAS 4000mini biomolecular imager (GE Healthcare)*.

Ensayos de estabilidad de proteínas

Para evaluar la estabilidad de las proteínas Whi7 y Whi5, se agregó cicloheximida 100 µg/mL a cultivos en fase de crecimiento exponencial. Las muestras se recogieron a los tiempos indicados en cada experimento y la degradación de las proteínas se analizó mediante Western blot. Las bandas se cuantificaron con el programa *ImageQuant LAS 4000mini biomolecular imager* (GE Healthcare). Para cada experimento se llevaron a cabo dos o tres ensayos con transformantes independientes de cada cepa (se muestra un experimento representativo).

Tratamiento con fosfatasa λ

Inmunoprecipitados de Whi7 procedentes de extractos celulares de cultivos en fase de crecimiento exponencial se dividieron en 3 alícuotas de 10 µL cada una. Se añadió tampón fosfatasa λ y MnCl₂ 2M a todas las alícuotas. A continuación, se añadieron 2 µL de H₂O a la alícuota 1, 2 µL de fosfatasa λ (800 U) a la alícuota 2 y una mezcla con 2 µL de fosfatasa λ incubada previamente durante 20 min junto con inhibidores de fosfatasa (4 µL β-glicerol fosfato 1M, 0.8 µL Na-ortovandato 0.5M y 0.8 µL NaF 1.25M) a la alícuota 3. Los tubos se incubaron a 30°C durante 30 min, tras lo cual se añadieron 20 µL de tampón de carga SDS-PAGE y se incubaron las muestras 5 min a 95°C. El estado de fosforilación de Whi7 tras el tratamiento con fosfatasa λ se analizó mediante Western blot.

Co-inmunoprecipitación de proteínas

Aproximadamente 5×10^8 células que expresan Grr1ΔF-flag, Swi4-myc, Swi6-myc o Mbp1-myc y versiones de Whi7 o Whi5 sin etiquetar o etiquetadas con el epítipo HA, se resuspendieron en 100 µL de Tris-HCl 50mM pH 8, NaCl 250mM, EDTA 5mM, Triton X-100 0.1%, PMSF 1mM y 5 µg/mL de *Complete mixture* (Roche Applied Science) y se rompieron con agitación vigorosa en presencia de perlas de vidrio. Los restos celulares se eliminaron y el sobrenadante se clarificó por centrifugación (12.000 rpm - 5 min). Se incubaron 50 µL de las perlas magnéticas *Dynabeads Protein G* (Invitrogen) con el anticuerpo HA-probe (F-7) (Santa Cruz Bio-technology Inc.) durante 20 minutos a temperatura ambiente y, tras un lavado exhaustivo con una solución salina tamponada con fosfato que contiene Tween 0,02%, las perlas magnéticas con el anticuerpo ya conjugado se incubaron con el extracto

celular durante 20 min a temperatura ambiente. Después de lavar las perlas, las proteínas inmunoprecipitadas se eluyeron hirviendo las perlas durante 5 minutos en tampón de carga SDS-PAGE y posteriormente se analizaron mediante Western blot.

Análisis de expresión génica

Aproximadamente 2×10^8 células se recogieron y se rompieron en un *FastPrep Precellys24* (Bertin technologies) con perlas de vidrio en tampón LETS (LiCl 0.1M, EDTA 0.01M, Tris-HCl 0.01M pH 7.4, SDS 0.2%) con un volumen de fenol saturado (pH 4.5). Las células se centrifugaron (12.000 rpm - 5 min) y la fase acuosa se recogió en dos veces junto con un volumen de fenol:cloroformo (5:1) y un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El RNA se precipitó durante toda la noche con un volumen de LiCl 5M a -80°C . El precipitado se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 30 μL de agua libre de RNasa. Alternativamente, también se extrajo RNA de las células con el kit *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. El RNA obtenido mediante cualquiera de los procedimientos anteriores se cuantificó con el espectrofotómetro *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific). Se incubaron 5 μg de RNA con Turbo DNasa (Ambion) y, después de la inactivación de la DNasa e incubación con oligo dT, se obtuvo cDNA con la transcriptasa inversa Improm-II y el RNasin recombinante (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Por último, el cDNA se analizó por PCR de transcripción inversa semicuantitativa (RT-PCR) o por RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR). En el caso del análisis por qRT-PCR, el cDNA obtenido se analizó por triplicado mediante un *DNA Engine Peltier Thermal Cycler* (Bio Rad) usando el *SYBR Premix Ex Taq Tli RNase H Plus Green* con ROX (Takara). Con el cDNA obtenido se analizó la expresión de los genes *CLN2*, *WHI7*, *WHI5* y el gen de la actina como control. Los valores de expresión de *CLN2*, *WHI7* o *WHI5* indican el grado de transcripción de cada uno de ellos en comparación con el grado de transcripción del gen de la actina (gen de expresión constitutiva), calculado como ΔCt . Los valores para cada cepa o condición son relativos a la expresión del gen de la actina.

Ensayos de actividad β -galactosidasa

Se recogieron aproximadamente 10^8 células, se lavaron con agua y se resuspendieron en 200 μL de tampón Z (Na_2HPO_4 60mM, NaH_2PO_4 40mM,

H₂O, KCl 10mM, MgSO₄ 1mM, β-mercaptoetanol 0,1% pH 7.0) con zimoliasa-20T 1 mg/mL. Después de 20 min de incubación a 30°C, se centrifugaron los extractos y se conservaron únicamente los sobrenadantes. Se tomaron diferentes cantidades de sobrenadante (20 - 180 μL) y se agregó tampón Z hasta alcanzar un volumen final de 900 μL. La reacción se inició mediante la adición a la mezcla de 180 μL de ONPG (o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido) 4 mg/mL. Las muestras se incubaron a 30°C hasta la aparición de color amarillo. La reacción se detuvo entonces con 450 μL de Na₂CO₃ 1M y se determinó la A₄₂₀. La actividad se expresa en U/μg de proteína, donde 1U se define como A₄₂₀ × 10³ min⁻¹ de incubación. La concentración de proteína se determinó mediante el ensayo de Bradford.

Co-inmunoprecipitación de cromatina

Se llevó a cabo el entrecruzamiento de aproximadamente 5 × 10⁸ células mediante la adición al medio de cultivo e incubación durante 15 min de formaldehído 1% (v/v), seguido de una incubación de 5 min con glicina 125mM para detener el entrecruzamiento. Las células se lavaron y se resuspendieron en 300 μL de tampón de lisis (HEPES-KOH 50mM pH 7.9, NaCl 40mM, 1mM EDTA 1mM, Triton X-100 1% (v/v), deoxicolato de sodio 0,1% (p/v), PMSF 1mM, benzamidina 1mM e inhibidores de proteasas *Complete Mini (Roche Diagnostics)*) y, posteriormente, se lisaron mediante agitación en vórtex con perlas de vidrio durante 30 min a 4°C. Tras romper las células, se añadió tampón de lisis hasta alcanzar un volumen final de 600 μL. A continuación, se fragmentó la cromatina mediante sonicación, se centrifugó la muestra a 4°C (12.000 rpm - 15 min) y, por una parte, se recogieron 20 μL del sobrenadante como control del extracto celular completo (input) y, por otra parte, se incubó el resto del volumen, mediante rotación orbital durante 2 h a 4°C, con las perlas magnéticas *Dynabeads Protein G (Invitrogen)* previamente incubadas con el anticuerpo HA-probe (F-7) (*Santa Cruz Biotechnology Inc.*) o con el anticuerpo monoclonal anti-GFP (*Roche Diagnostics*). Las perlas se lavaron 4 veces con tampón PBS (NaCl 150mM, Na₂HPO₄ 40mM, NaH₂PO₄ 10mM) con Tween® 20 0,02% (v/v). La elución de la proteína unida se realizó en dos pasos, en cada uno se añadieron 40 μL de tampón de elución (Tris-HCl 50mM pH 8.0, EDTA 10mM, SDS 1% (p/v) y se incubó la mezcla a 65°C durante 8 min. El entrecruzamiento entre DNA y proteínas se revirtió mediante incubación con tampón de elución a 65°C con agitación durante toda la noche.

La muestra eluida se digirió con proteinasa K 0,33 mg/mL durante 90 min a 37°C y el DNA obtenido se purificó con el kit *High Pure PCR product purification* (Roche Diagnostics). El DNA co-inmunoprecipitado (IP) se analizó por triplicado mediante PCR cuantitativa (qPCR) en un *DNA Engine Peltier Thermal Cycler* (Bio Rad) usando el *SYBR Premix Ex Taq Tli RNase H Plus Green* con ROX (Takara). El DNA analizado incluía fragmentos de los promotores de *CLN2*, *CLN1*, *RNR1*, *FKS1*, *MNN1*, *CDC21* y una región intergénica como control. Los valores de unión de Whi7, Whi5, Swi4 o Mbp1 indican el enriquecimiento específico de los fragmentos de promotor analizados en la muestra inmunoprecipitada (IP) en comparación con el extracto celular completo (input) usando la región intergénica como control, calculado con el método $\Delta\Delta Ct$. Los valores son relativos a la cepa control sin etiquetar (el valor de 1 es equivalente a enriquecimiento no específico).

Técnicas de microscopía de fluorescencia

Todas las muestras analizadas por microscopía de fluorescencia se visualizaron con un microscopio de fluorescencia *Axioskop 2* (Zeiss Inc.). Las imágenes se tomaron con una cámara *AxioCam MRm* (Zeiss Inc.) y se analizaron con el software *AxioVision v4.7* (Zeiss Inc.).

Inmunofluorescencia indirecta

Se recogieron 1×10^7 - 1×10^8 células procedentes de cultivos en fase de crecimiento exponencial. Las células se fijaron con tampón A (K_2HPO_4 100mM pH 6.4, $MgCl_2$ 0.5mM, formaldehído 3,7%) durante 2h a 30°C (o toda la noche a 4°C). Después, se lavaron las células con tampón B (misma composición que tampón A, pero con sorbitol 1.2M en lugar de formaldehído). Para la obtención de esferoplastos se incubaron las células con tampón B con β -mercaptoetanol 0.1% y zimoliasa 20-T 200 μ g/mL durante 20 min. A continuación, se lavaron los esferoplastos con tampón B. Se distribuyeron 5-10 μ L de los esferoplastos en portas multipocillo, donde se incubaron con los anticuerpos correspondientes. El bloqueo se hizo con PBS con BSA 1% y los lavados entre anticuerpos con PBS. El anticuerpo primario que se usó fue anti-HA High Affinity 3F10 (Roche) diluido 1:50 y la incubación fue de 3 h a 4°C. El anticuerpo secundario que se usó fue IgG anti-rata conjugado con Alexa546 (Molecular Probes) diluido 1:500 y la incubación fue de 1 h a 4°C. Para teñir los núcleos se empleó, al terminar los lavados de los anticuerpos, DAPI (Sigma)

0,1 mg/mL durante 2 min. Por último, los pocillos se cubrieron con glicerol 50% y se selló el cubre.

Localización de proteínas in vivo con marcaje GFP

Las proteínas fusionadas con GFP se visualizaron en células vivas sonicadas crecidas en el medio sintético correspondiente hasta fase exponencial.

3. Regulación de la estabilidad de Whi7 a lo largo del ciclo celular

El nivel de la proteína Whi7 y su estado de fosforilación están regulados a lo largo del ciclo celular.

Muchos reguladores de ciclo celular se caracterizan por ser proteínas periódicas, es decir, proteínas cuyos niveles proteicos fluctúan a lo largo del ciclo celular. Por este motivo, se estudiaron los niveles celulares de la proteína Whi7 en cultivos sincronizados. Es necesario señalar en primer lugar que la migración de Whi7 que se observa mediante Western blot en un gel SDS-PAGE presenta unas características particulares, ya que se aprecian múltiples bandas de la proteína (Figura 3.1). El tratamiento con fosfatasa lambda tiene como resultado la desaparición de este bandeo y la migración de una única banda de mayor movilidad electroforética, revelando que las múltiples bandas que se aprecian se corresponden con los distintos estados de fosforilación de la proteína.

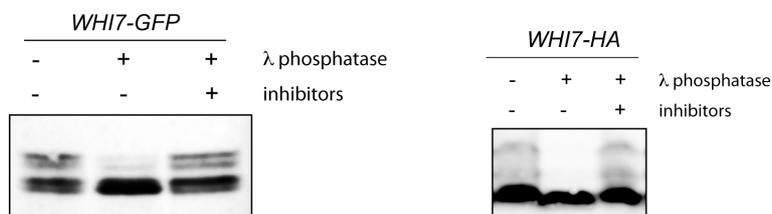


Figura 3.1. Análisis de la fosforilación de Whi7 mediante ensayo con fosfatasa λ. Extractos celulares de las cepas *WHI7-GFP* (JCY1802) y *WHI7-HA* (JCY1728) se incubaron con la proteína fosfatasa λ en ausencia o en presencia de inhibidores de fosfatasas. La migración electroforética de Whi7 se analizó mediante Western blot.

La sincronización del cultivo para el estudio de los niveles de proteína Whi7 a lo largo del ciclo celular se realizó empleando un mutante *cdc15* termosensible, el cual experimenta un bloqueo en telofase a temperatura restrictiva. Tras la liberación del bloqueo en telofase al pasar las células a temperatura permisiva, se analizó la progresión en el ciclo celular por la presencia de yema y el número de núcleos (Figura 3.2A), y además por el seguimiento de los niveles de proteína de la ciclina mitótica Clb2 (síntesis en G2 y degradación en transición M/G1) y el inhibidor de CDK Sic1 (síntesis en M/G1 y degradación en G1/S) (Figura 3.2B). La caída en los niveles de Clb2 y la acumulación de Sic1, junto con la disminución del número de células con yema y dos núcleos, reflejan la salida de mitosis a los 40 minutos aproximadamente; más tarde, el comienzo de la degradación de Sic1 y el inicio en la gemación indican la transición de *Start* hacia los 60 minutos; la aparición de Clb2 marca la fase G2 a los 90 minutos, mientras que el aumento en el número de células con núcleos segregados hacia los 130 minutos muestra la progresión a través de la anafase. El análisis de Whi7 revela que los niveles de esta proteína oscilan a lo largo del ciclo celular, aumentando desde G1 temprano antes de *Start*, alcanzando su máximo en G2 y cayendo a partir de mitosis (Figura 3.2B). Además, también se observaron cambios en el estado de fosforilación de Whi7 durante el ciclo celular, característica compartida por muchas proteínas de ciclo celular e implicada en la regulación y funcionalidad de las mismas. Whi7 es hiperfosforilada conforme las células progresan desde G1 hasta mitosis. Mientras que el máximo grado de fosforilación de Whi7 se alcanza durante mitosis, hacia la salida de esta fase la fosforilación de la proteína comienza a disminuir. Estos resultados reflejan que Whi7 es una proteína regulada a lo largo del ciclo celular y que fluctúa entre dos estados: uno asociado a hiperfosforilación y altas concentraciones de la proteína que va desde G1 hasta G2/M, y otro asociado a hipofosforilación y bajos niveles de la proteína desde el final de mitosis hasta G1 temprano.

El sistema de control del ciclo celular está gobernado por dos procesos moleculares fundamentales: la expresión génica y la degradación de proteínas. Estos sucesos guían la sucesión temporal y ordenada de la acumulación de reguladores clave en el ciclo celular y de otras proteínas necesarias en las distintas fases del ciclo. Por ello, la expresión periódica es una de las características que comparten muchos de los reguladores de ciclo

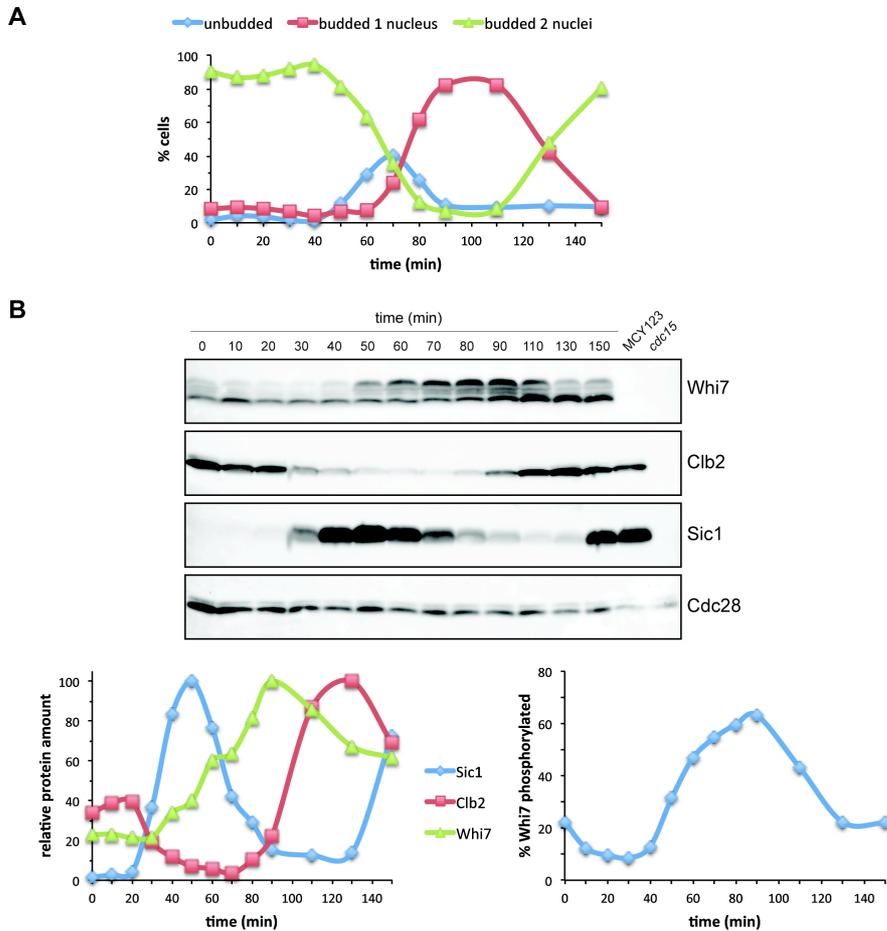


Figura 3.2. Regulación de *Whi7* en ciclo celular. Células *cdc15* que expresan *Whi7* etiquetada con GFP, *Clb2* etiquetada con HA y *Sic1* etiquetada con myc (JCY1802) se pararon en telofase mediante su incubación a 37°C. Después de 3 horas las células se transfirieron a 25°C y la progresión en el ciclo celular se analizó a los tiempos indicados. (A) La gráfica muestra la distribución de la células en las diferentes etapas del ciclo celular. (B) Las proteínas *Whi7*, *Clb2* y *Sic1*, así como el control de carga *Cdc28*, se analizaron mediante Western blot; la gráfica de la izquierda muestra la cantidad relativa de cada proteína en referencia a la muestra más abundante; la gráfica de la derecha representa el porcentaje total de la proteína *Whi7* presente como bandas de migración más lenta. Las cepas MCY123 y *cdc15* sin etiquetar se incluyeron en el análisis del Western blot como controles.

celular, como es el caso de la ciclina *Cln2*. Con el objetivo de analizar si la transcripción del gen *WHI7* está regulada a lo largo del ciclo celular se emplearon, del mismo modo que en el caso anterior, cultivos sincronizados

del mutante *cdc15* y se monitorizaron los niveles de la proteína Sic1 como indicador de la progresión en el ciclo celular. Se siguió también la expresión del gen *CLN2* como ejemplo de gen cuya expresión es periódica en la transición G1/S. Los resultados muestran que *CLN2* presenta un máximo de expresión a los 40 minutos que coincide con la disminución en los niveles de Sic1, marcando la transición de *Start*. Por el contrario, la expresión de *WHI7* permanece constante a lo largo del ciclo celular, indicando que el gen *WHI7* se expresa de forma constitutiva en la célula (Figura 3.3). Esto sugiere que las oscilaciones observadas a nivel proteico se deben probablemente a mecanismos postranscripcionales, ya sea a nivel de traducción del mRNA o de una alteración en la estabilidad de la proteína durante las distintas fases del ciclo celular, y no a cambios en su expresión génica.

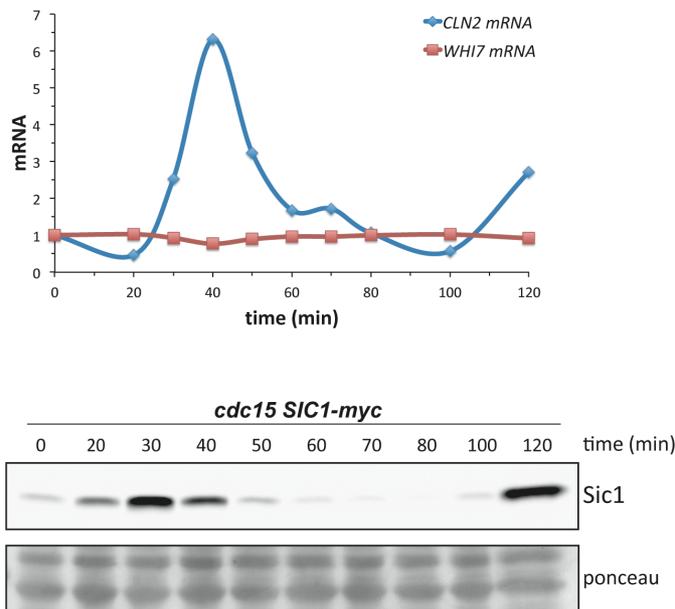


Figura 3.3. Análisis de la transcripción del gen *WHI7* a lo largo del ciclo celular. Células *cdc15* que expresan Sic1 etiquetada con myc (JCY1836) se pararon en telofase mediante su incubación a 37°C. Después de 3 horas las células se transfirieron a 25°C y mediante RT-qPCR se analizaron a los tiempos indicados los niveles de mRNA de *WHI7* y *CLN2* relativos a los niveles de mRNA de *ACT1* (como control). La proteína Sic1 se analizó mediante Western blot. La tinción con Ponceau se muestra como control de carga.

Whi7 es una proteína inestable que es degradada principalmente vía SCF^{Grr1}

Muchos reguladores de ciclo celular son proteínas inestables con una elevada tasa de degradación, lo que favorece su acumulación en determinados momentos del ciclo celular. Por ello, se estudió la estabilidad de la proteína Whi7 mediante experimentos de apagado traduccional, en los que la traducción global de la célula se bloquea mediante cicloheximida y a continuación se analiza la desaparición de la proteína mediante Western blot. El resultado indica que Whi7 es, en efecto, una proteína inestable con una vida media de aproximadamente 20 minutos a 25°C y de menos de 10 minutos a 37°C (Figura 3.4).

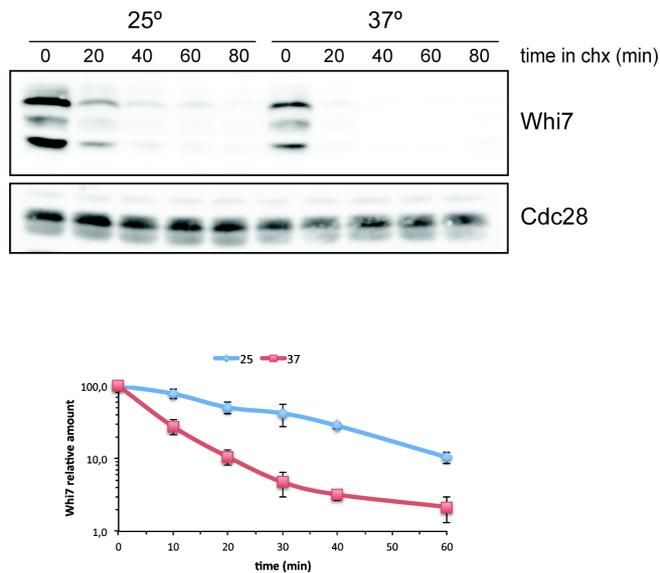


Figura 3.4. Análisis de la estabilidad de Whi7 a diferentes temperaturas. Cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa *WHI7-HA* (JCY1728) se dividieron y fueron incubados durante 3 horas a 25°C o a 37°C y después se añadió cicloheximida 100 µg/mL. Mediante Western blot se analizaron los niveles de proteína Whi7 a los tiempos indicados tras la adición de cicloheximida. La gráfica representa la cantidad relativa de la proteína Whi7 en relación con Cdc28.

Uno de los principales mecanismos por los que los reguladores de ciclo son degradados implica su ubiquitinación y posterior reconocimiento y degradación por el proteasoma. Por este motivo, se estudió la estabilidad de Whi7 mediante experimentos de apagado traduccional en el mutante del

proteasoma *pre1 pre2* (Figura 3.5A). Whi7 se estabiliza en dicho mutante, indicando que su degradación tiene lugar a través de la vía ubiquitin-proteasoma. Existen dos ubiquitina ligasas implicadas en la degradación de sustratos de ciclo celular: SCF, crítica para la transición G1/S, y APC, esencial en mitosis (Nakayama and Nakayama, 2006; Willems et al., 2004). La estabilidad de Whi7 se analizó en cepas mutantes tanto para la subunidad Cdc53 de SCF como para la subunidad Cdc16 de APC. Mientras que Whi7 permanece altamente inestable en el mutante *cdc16* (Figura 3.5C), su estabilidad aumenta cuando Cdc53 se inactiva (Figura 3.5B). Estos resultados indican que la ubiquitina ligasa SCF es la encargada de la degradación de Whi7.

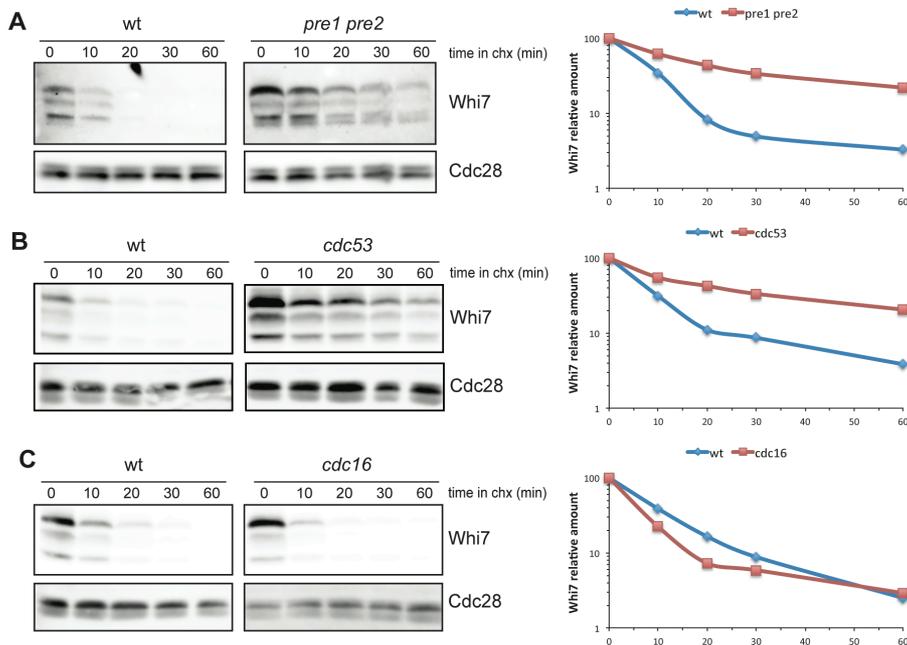


Figura 3.5. Análisis de la degradación de Whi7 en cepas mutantes en las ubiquitina ligasas SCF y APC. (A) Células de la cepa mutante *pre1 pre2* (JCY1740) y de su parental WCG4 α (JCY1739), (B) del mutante *cdc53* (JCY1732) y su parental W303 (JCY1728), y (C) del mutante *cdc16* (JCY1737) y su parental A364 (JCY1735) que expresan de manera endógena la proteína Whi7 etiquetada con el epítipo HA se transfirieron a 37°C durante 3 horas y después se incubaron en presencia de cicloheximida 100 μ g/mL. Los niveles de proteína Whi7 se analizaron mediante Western blot a los tiempos indicados tras la adición de cicloheximida. Cdc28 se muestra como control de carga. Las gráficas representan la cantidad relativa de la proteína Whi7 en relación con Cdc28.

SCF reconoce sustratos específicos de ciclo celular principalmente por medio de dos subunidades o proteínas F: Cdc4 y Grr1 (Nakayama and Nakayama, 2006; Willems et al., 2004). El análisis de la estabilidad de Whi7 en ausencia de Cdc4 muestra que Whi7 continúa siendo altamente inestable, aunque algo menos de lo que se observa en una cepa silvestre (Figura 3.6A). Por el contrario, la estabilidad de Whi7 aumenta de forma considerable en el mutante *grr1* (Figura 3.6B). Estos resultados indican que Grr1 es la principal proteína F encargada del reconocimiento de Whi7 para su degradación vía SCF.

En el caso de la ciclina Cln2, cuya degradación también es dependiente de Grr1, se ha demostrado que su insensibilidad a ser reconocida por Cdc4 se debe, no a que Cdc4 sea incapaz de reconocer a Cln2 para su degradación, sino a que Cdc4 es una proteína de localización nuclear, mientras que Cln2 es principalmente citoplasmática, lo que impide que ambas proteínas colocalicen en el mismo compartimento celular (Landry et al., 2012). De hecho, la expresión de una versión de Cdc4 fusionada con una señal de exportación nuclear (Cdc4-NES) en un mutante *grr1* da como resultado la degradación de Cln2 por Cdc4. Sin embargo, en el caso de Whi7 el análisis de su estabilidad en un mutante *grr1* que expresa Cdc4-NES no muestra cambio alguno en la estabilidad de la proteína, lo cual confirma que Cdc4 tiene únicamente un papel residual en la degradación de Whi7 (Figura 3.6C).

Por último, para identificar una interacción física entre Whi7 y Grr1 se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación en células mutantes *grr1* que expresaban una versión de Grr1 privada de su F-box (Grr1 Δ F), así como una versión silvestre de Whi7. La ausencia de la F-box en Grr1 permite que Grr1 reconozca y una sus sustratos sin que estos sean degradados, estabilizando la interacción entre Grr1 y su posible sustrato. Esta aproximación permitió identificar la existencia de una interacción física *in vivo* entre Whi7 y Grr1 (Figura 3.6D). En conclusión, todos estos resultados revelan que Whi7 es una proteína inestable que es degradada principalmente por la vía de la ubiquitina ligasa SCF^{Grr1}.

3. Estabilidad de Whi7

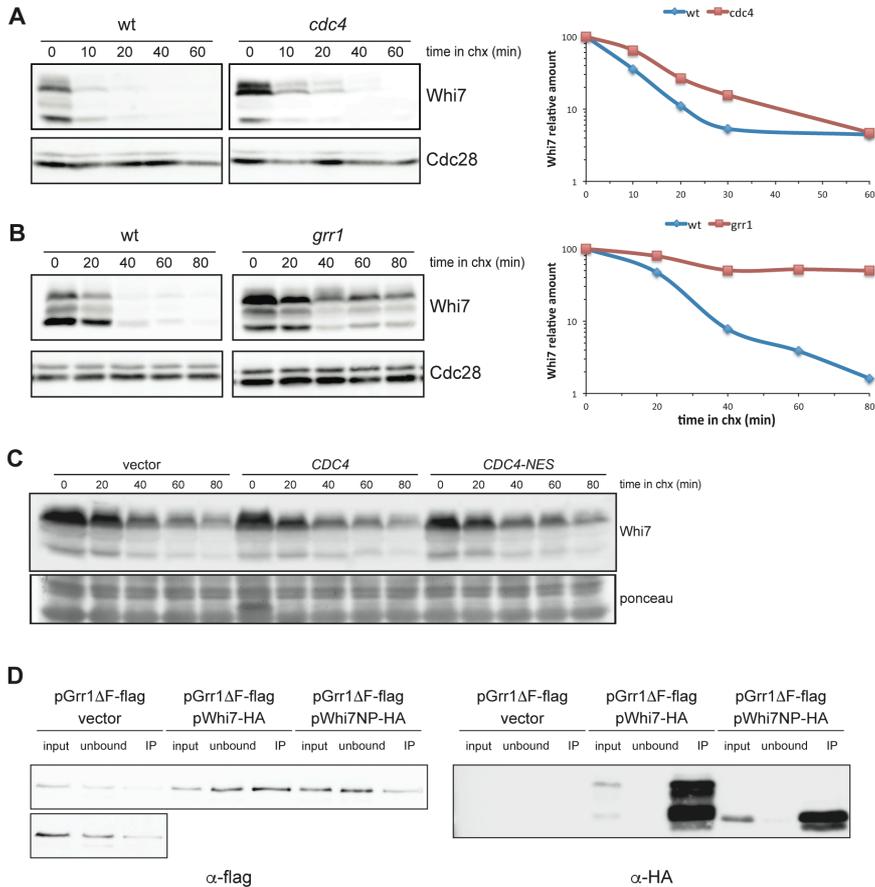


Figura 3.6. Análisis de las diferentes subunidades F-box de SCF en la degradación de Whi7. (A) Células de las cepas mutantes *cdc4* (JCY1757) y (B) *grr1* (JCY1760) y de su parental W303 (JCY1728) que expresan de manera endógena la proteína Whi7 etiquetada con el epítipo HA se transfirieron a 37°C durante 3 horas (excepto el mutante *grr1* y su cepa parental) y después se incubaron en presencia de cicloheximida 100 µg/mL. La estabilidad de la proteína Whi7 se analizó como se describe en la Figura 3.5. (C) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa *grr1 WHI7-HA* (JCY1760) transformadas con un vector vacío y un plásmido centromérico que expresa Cdc4 silvestre o Cdc4 fusionada a una señal de exportación nuclear (NES), se incubaron en presencia de cicloheximida 100 µg/mL y se analizó la estabilidad de la proteína Whi7. La tinción con Ponceau se muestra como control de carga. (D) La cepa mutante *grr1* (JCY1760) se co-transformó con un plásmido que expresa, bajo el control del promotor *GAL1*, Grr1 privada de su F-box (Grr1ΔF) etiquetada con flag y con el plásmido pWHI7, pWHI7-NP (expresan etiquetada con HA una versión silvestre de Whi7 o una versión no fosforilable de Whi7 respectivamente) o un vector control. Las células se crecieron en un medio con rafinosa y se transfirieron a un medio con galactosa durante 4 horas. Whi7 se inmunoprecipitó a partir de extractos crudos y la presencia de Grr1ΔF-flag y Whi7-HA en los extractos totales (input) y en las fracciones no retenidas (unbound) e inmunoprecipitadas (IP) se determinó mediante análisis por Western blot. Se muestra una exposición más larga de las muestras del vector para evaluar mejor la señal de fondo.

La estabilidad de Whi7 está regulada a lo largo del ciclo celular

La estabilidad de los reguladores de ciclo celular suele fluctuar a lo largo del mismo. Para probar si la degradación de Whi7 podría estar regulada a lo largo del ciclo celular, se estudió la estabilidad de la proteína en diferentes etapas del ciclo celular. Al incubar las células con nocodazol se induce un bloqueo en metafase, momento del ciclo celular en el que Whi7 muestra una vida media corta, similar a la observada en cultivos asincrónicos (Figura 3.7A). Whi7 también es altamente inestable en células paradas en telofase en un mutante *cdc15* (Figura 3.7B). Para estudiar la estabilidad de Whi7 en células en fase G1, se añadió cicloheximida 50 minutos después de la liberación del bloqueo en telofase inducido en un cultivo de la cepa mutante *cdc15*; la ausencia de yema y la presencia de Sic1 confirman que las células permanecían en G1 a lo largo de todo el experimento. Contrariamente a lo observado en G2/M y telofase, Whi7 permanece estable en células en G1, acumulándose en su estado no fosforilado (Figura 3.7C). El mismo resultado se obtuvo con células paradas en G1 debido a la depleción de las ciclinas Cln de G1 (Figura 3.7D). Estos resultados en conjunto indican que la estabilidad de Whi7 está regulada a lo largo del ciclo celular, permaneciendo estable durante G1 en su forma no fosforilada y degradándose rápidamente en su estado hiperfosforilado durante el resto de las fases del ciclo.

La estabilidad de Whi7 está controlada por fosforilación por Cdc28

En Western blot se observa a Whi7 estable como una banda no fosforilada (Figura 3.7C), lo que sugiere que la estabilidad de la proteína está controlada por fosforilación. Esto es consistente con el hecho de que la degradación de Whi7 tenga lugar a través de la vía SCF, ya que el reconocimiento de sustratos por esta vía requiere de su fosforilación en residuos específicos (Koivomagi et al., 2011; Willems et al., 2004). La CDK Cdc28 resulta una buena candidata para fosforilar a Whi7 y así mediar la degradación de la proteína. El análisis de la estabilidad de Whi7 en una cepa mutante *cdc28* revela que en ausencia de la CDK la estabilidad de Whi7 aumenta y que se acumula principalmente en su forma no fosforilada (Figura 3.8A). De hecho, una versión de Whi7 con todos los sitios consenso de fosforilación por Cdc28 mutados (Whi7-NP) permanece totalmente estable (Figura 3.8B). Además, ensayos de co-inmunoprecipitación revelan que la interacción física entre Grr1 y Whi7 se pierde con la versión de Whi7-NP, es

3. Estabilidad de Whi7

decir, en ausencia de fosforilación por Cdc28 (Figura 3.6D). Todos estos resultados indican que la fosforilación de Whi7 por Cdc28 es necesaria para la degradación de la proteína.

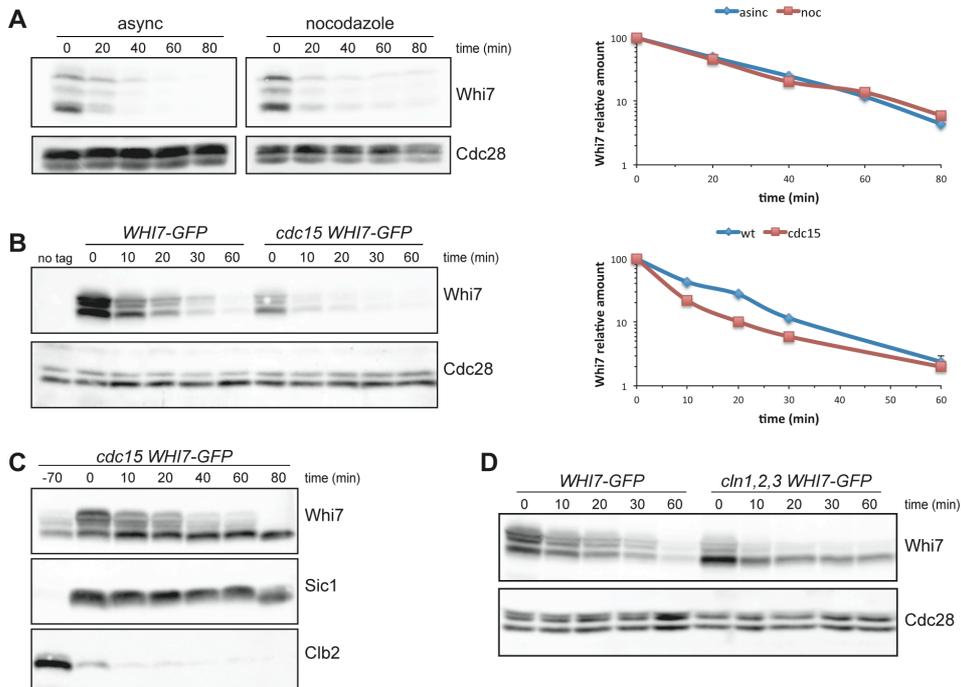


Figura 3.7. Análisis de la estabilidad de Whi7 en distintas fases del ciclo celular. (A) Células de la cepa *WHI7-HA* (JCY1728) se incubaron durante 2 horas en presencia de nocodazol 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (>90% de las células se encontraban paradas en fase G2/M) tras lo cual se incubaron con cicloheximida 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La estabilidad de la proteína Whi7 se analizó como se describe en la Figura 3.5. (B) Células silvestres (JCY1746) y del mutante *cdc15* (JCY1802) que expresan Whi7 etiquetada con GFP se incubaron a 37°C durante 3 horas (>95% de las células mutantes *cdc15* se encontraban paradas en telofase) y después se analizó la estabilidad de la proteína Whi7. (C) Células de la cepa mutante *cdc15* que expresan Whi7 etiquetada con GFP (JCY1802) se pararon en telofase mediante su incubación a 37°C. Tras 3 horas, las células se liberaron del bloqueo y después de 50 minutos se añadió cicloheximida 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. No se observó la aparición de nuevas yemas durante el experimento, confirmándose que las células permanecen en fase G1 durante el mismo. Los niveles de proteína de Whi7, así como los de Clb2 y Sic1 como controles de la progresión del ciclo celular, se analizaron mediante Western blot a los tiempos indicados tras la adición de cicloheximida. (D) Células silvestres (JCY1746) y de la cepa mutante *GAL1:CLN3 cln1 cln2* (JCY2008) que expresan Whi7 etiquetada con GFP se crecieron en un medio con galactosa, se transfirieron a medio completo (YPD) y después de 3 horas (en la cepa mutante el 100% de las células se encontraban en G1) se analizó la estabilidad de la proteína Whi7.

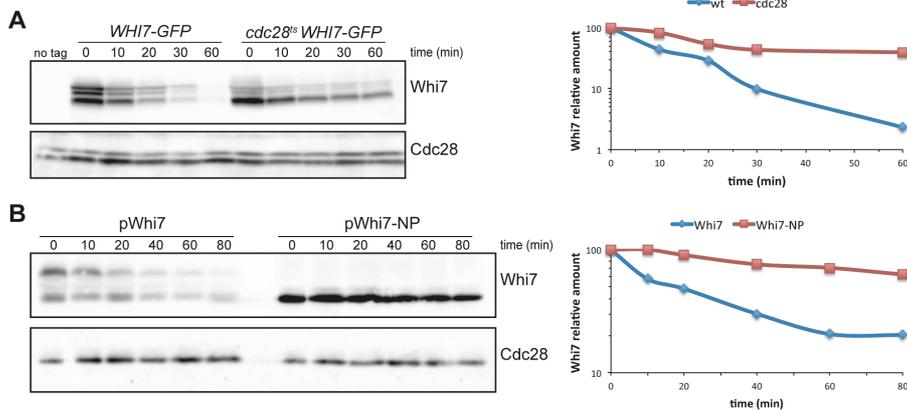


Figura 3.8. Papel de la fosforilación por *Cdc28* en la estabilidad de *Whi7*. (A) Células silvestres (JCY1746) y del mutante *cdc28* (JCY1789) que expresan *Whi7* etiquetada con GFP se incubaron a 37°C durante 3 horas, tras lo cual se analizó la estabilidad de la proteína *Whi7* como se describe en la Figura 3.5. (B) Se analizó la estabilidad de la proteína *Whi7* en células mutantes *whi7* (JCY1819) transformadas con un plásmido centromérico que expresa una versión de *Whi7* silvestre etiquetada con HA (pWHI7) o una versión de *Whi7* con todos los sitios consenso de fosforilación por CDK mutados (pWHI7-NP).

Hasta el momento, *Cln3* era la única ciclina conocida que fosforila a *Whi7* (Yahya et al., 2014). El hecho de que *Whi7* sea fosforilada e inestable en G2/M y células paradas en telofase, sugiere que otras ciclinas también son capaces de fosforilar a esta proteína. De hecho, ensayos de estabilidad realizados en un mutante *cln3* no muestran diferencias en comparación con lo observado en células silvestres, ni en el patrón de movilidad de *Whi7* ni en su estabilidad (Figura 3.9A). Esto demuestra que efectivamente otras ciclinas, a parte de *Cln3*, son también responsables de la fosforilación y degradación de *Whi7*. Para analizar la contribución de las ciclinas *Clb* en la degradación de *Whi7*, se analizó la estabilidad de la proteína en una cepa mutante en las ciclinas mitóticas *Clb1-4*, observándose una estabilización parcial de la misma (Figura 3.9B). A continuación, para analizar la contribución de las ciclinas *Cln1* y *Cln2* se estudió la estabilidad de *Whi7* en células mutantes *cln1 cln2* en un fondo genético *cdc4* (en el que no hay actividad de ciclinas *Clb*). En este caso, de nuevo se observa que *Whi7* se estabiliza parcialmente (Figura 3.9C). Ambos resultados permiten concluir que cualquier actividad CDK-ciclina participa en el control de la estabilidad de *Whi7*. En resumen, todos estos resultados

3. Estabilidad de Whi7

indican que la degradación de Whi7 regulada a lo largo del ciclo celular tiene lugar por fosforilación por Cdc28, siendo estable únicamente en G1, momento en el que no hay actividad CDK.

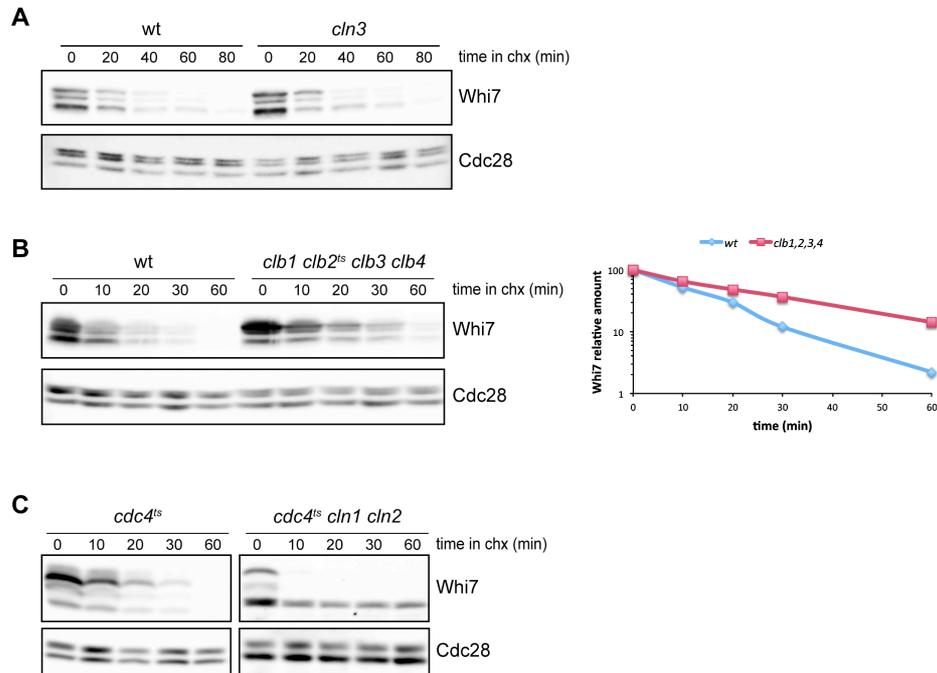


Figura 3.9. Análisis de la degradación de Whi7 en cepas mutantes en distintas ciclinas. (A) Células en fase de crecimiento exponencial de las cepas mutantes *cln3* (JCY1815), (B) *clb1 clb2^Δ clb3 clb4* (JCY1991) y de su parental W303 (JCY1746), que expresan Whi7 etiquetada con GFP, (C) así como del mutante *cdc4 cln1 cln2* (JCY2013) y de su parental *cdc4* (JCY1757) que expresan Whi7 etiquetada con HA, se incubaron a 37°C durante 3 horas (excepto el mutante *cln3* y su cepa parental), tras lo cual se analizó la estabilidad de la proteína Whi7 como se describe en la Figura 3.5. La gráfica representa la cantidad relativa de la proteína Whi7 en relación con Cdc28.

A la vista de los resultados obtenidos nos centramos en identificar residuos fosforilados por Cdc28 implicados en la degradación de Whi7. En una primera aproximación se sustituyeron por Ala aquellos residuos de Whi7 susceptibles de ser fosforilados por Cdc28 y que, además, resultan clave para la funcionalidad de Whi5 (parálogo de Whi7) (Taberner et al., 2009; Wagner et al., 2009). Así, mediante mutagénesis dirigida se mutaron en conjunto los residuos Ser⁹⁸, Thr¹⁰⁰ y Ser¹⁰⁵ (Whi7^{3A}), y sobre este tripe mutante se realizó

una mutación adicional en la Ser²¹² (*Whi7*^{3A, S212A}). El análisis de ambos mutantes por Western blot revela una disminución tanto en los niveles como en la fosforilación de la proteína en comparación con la versión de *Whi7* silvestre, siendo este hecho más destacable en el caso del cuádruple mutante, en el que prácticamente la única banda observable es la correspondiente a *Whi7* no fosforilado (Figura 3.10A). Esto sugiere que las bandas correspondientes a *Whi7* que se observan en Western blot reflejan principalmente la fosforilación de estos cuatro residuos. Por otra parte, el análisis de la estabilidad del triple y el cuádruple mutante muestra una clara inestabilización de la proteína en comparación con la versión silvestre de *Whi7*, más evidente en el caso del cuádruple mutante (Figura 3.10B). Este hecho resulta bastante llamativo si se tiene en cuenta que el aspecto por Western blot del cuádruple mutante se asemeja considerablemente al de la versión *Whi7*-NP y que en ausencia de fosforilación por Cdc28 la proteína *Whi7* se estabiliza. Los cuatro residuos mutados están implicados en el control de la localización subcelular de *Whi5*, lo que sugiere que la localización del cuádruple mutante *Whi7* podría estar controlando su estabilidad, condición que se estudiará en el futuro.

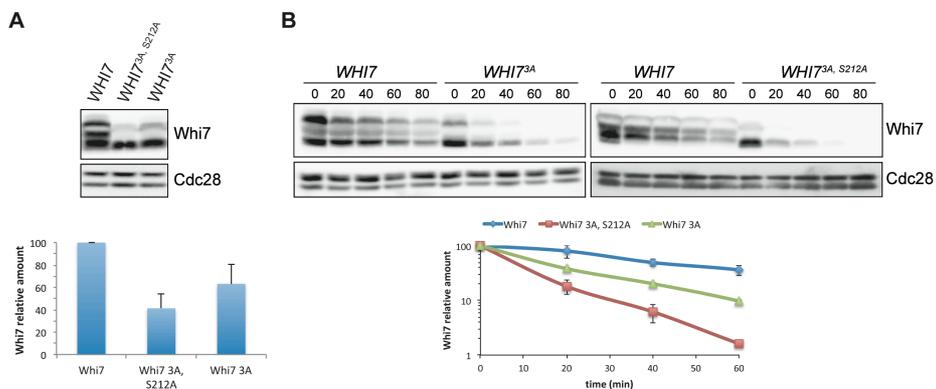


Figura 3.10. Análisis de los niveles de proteína y estabilidad de mutantes *Whi7* en sitios de fosforilación por Cdc28. Mediante Western blot se analizaron (A) los niveles y (B) la estabilidad de la proteína *Whi7*, como se describe en la Figura 3.5, en células de la cepa silvestre W303 transformadas con un plásmido que expresa una versión silvestre de *Whi7* etiquetada con HA (p*WHI7*), una versión de *Whi7* con las mutaciones S98A, T100A, S105A etiquetada con HA (p*WHI7*^{3A}) o una versión de *Whi7* con las mutaciones anteriores y la mutación S212A etiquetada con HA (p*WHI7*^{3A, S212A}). Cdc28 se muestra como control de carga. Las gráficas representan la cantidad relativa de la proteína *Whi7* en relación con Cdc28. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas de dos experimentos.

Análisis de la implicación de la fosfatasa *Cdc14* en la defosforilación de *Whi7*

Puesto que *Whi7* es una proteína con un alto grado de fosforilación y que las fosforilaciones la hacen considerablemente inestable, la existencia de una actividad fosfatasa encargada de compensar dichas fosforilaciones para impedir su inmediata degradación parece evidente. Dado el parecido a nivel de secuencia entre *Whi7* y el represor transcripcional de *Start* *Whi5*, nos planteamos si *Cdc14*, la fosfatasa encargada de la defosforilación de *Whi5* (Taberner et al., 2009), sería capaz de llevar a cabo la misma función con *Whi7*. Para ello, se sobreexpresó de forma ectópica la fosfatasa *Cdc14*, tanto en cultivos asincrónicos (Figura 3.11A) como en cultivos sincronizados con hidroxiurea (HU) (Figura 3.11B), compuesto que origina una parada de las células en fase S, momento del ciclo celular en el que *Whi7* se encuentra hiperfosforilado. El análisis del estado de fosforilación de *Whi7* mediante Western blot no muestra una disminución en la fosforilación de esta proteína en ninguna de las dos aproximaciones estudiadas, sugiriendo que *Cdc14* no es la principal fosfatasa encargada de su defosforilación.

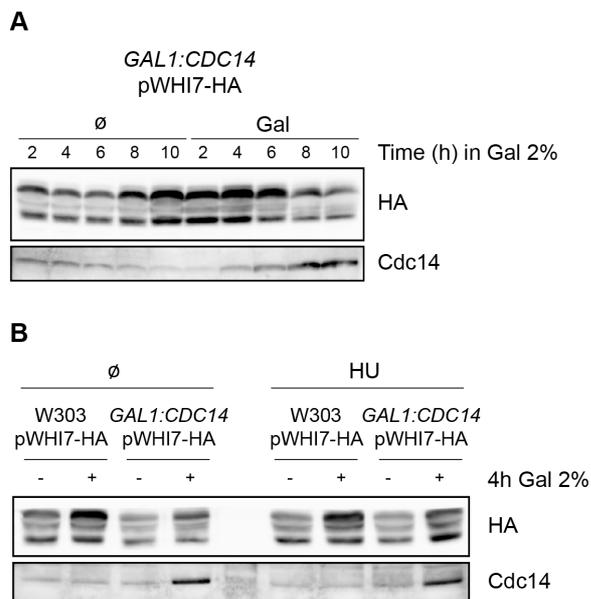


Figura 3.11. Análisis del papel de la fosfatasa *Cdc14* en el estado de fosforilación de la proteína *Whi7*. (A) Células de la cepa *GAL1:CDC14* (JCY1205) transformadas con un plásmido que expresa una versión silvestre de *Whi7* etiquetada con HA (pWHI7) se crecieron hasta fase exponencial temprana en medio completo (YPD), después se dividió el cultivo, la mitad se mantuvo en YPD y la otra mitad se transfirió a un medio

con galactosa (YPGal) y se tomaron muestras a los tiempos indicados para analizar el nivel de fosforilación de la proteína *Whi7* mediante Western blot. Se muestran los niveles de *Cdc14*. (B) Células de la cepa silvestre W303 y de la cepa *GAL1:CDC14* (JCY1205) transformadas con un plásmido que expresa la versión silvestre de *Whi7* etiquetada con HA (pWHI7) se crecieron en medio de selección con rafinosa hasta fase exponencial, después se transfirieron a glucosa o galactosa en presencia o ausencia de HU 200 mM y se incubaron durante 4 horas. Se tomaron muestras de todos los cultivos para analizar el nivel de fosforilación de la proteína *Whi7* mediante Western blot. Se muestran los niveles de *Cdc14*.

4. Whi7 es un represor del programa transcripcional de *Start*

Whi7 forma junto con Whi5 y Nrm1 una familia de proteínas caracterizada por la presencia del motivo GTB (*G1/S transcription factor binding*) en su secuencia. En el caso de Whi5 y Nrm1, este motivo media la represión transcripcional a través de la unión a SBF y MBF, respectivamente (Travesa et al., 2013).

Recientemente se ha identificado a Whi7 (parálogo del represor transcripcional Whi5) como un regulador negativo de *Start*. Whi7 participa en el control del inicio del ciclo celular mediante la retención de Cln3 en el RE de forma dependiente de fosforilación por Cdc28 (Yahya et al., 2014). Además del papel que desempeña en la regulación de *Start*, se ha descrito que tras la liberación de un cultivo celular sincronizado en fase G1 con factor α y en presencia de HU, Whi7 se asocia rápidamente y de forma transitoria al promotor del gen *CLN2* (Travesa et al., 2013), lo que sugiere que Whi7 podría desarrollar alguna función en transcripción.

Whi7 tiene una función independiente de Cln3 en la represión de *Start*

En primer lugar, dada la similitud de secuencia entre el represor transcripcional de G1/S Whi5 y la proteína Whi7, nos planteamos si la regulación de *Start* por parte de Whi7 podría involucrar otros mecanismos distintos del ya descrito en la retención citosólica de Cln3 (Yahya et al., 2014).

(Nota: los resultados del anterior y este capítulo se recogen en la publicación Gomar-Alba M, Méndez E, Quilis I, Bañó MC, Igual JC, 2017, Nat Commun 8:329. Los resultados mostrados en este capítulo han sido realizados principalmente por la Dra. Mercè Gomar-Alba y en ellos la doctoranda ha tenido una participación más secundaria. Consideramos conveniente incluirlos para facilitar la narración y seguimiento de la historia y por el hecho de que algunos paneles de las figuras han sido realizados por la doctoranda)

En un fondo silvestre la inactivación de *Whi7* da lugar a una disminución en el porcentaje de células sin yema en cultivos asincrónicos: $18'9 \pm 2'7$ en células *whi7* comparado con $24'3 \pm 2'4$ en células silvestres (de aquí en adelante los valores de índice de gemación indicados corresponden a la media y desviación típica de al menos cinco cultivos independientes). Este resultado concuerda con la disminución del tamaño celular durante la gemación ya descrita en un mutante *whi7* (Yahya et al., 2014) y apunta a la existencia de una fase G1 más corta. Hay que señalar, sin embargo, que la ausencia de *Whi7* en la célula no altera la distribución del tamaño celular en cultivos asincrónicos, probablemente debido a una compensación en otras etapas del ciclo (Figura 4.1A). Por su parte, en el caso de células mutantes *cln3*, que muestran un aumento del tamaño celular debido a la activación deficiente de *Start*, también se detecta una reducción en el porcentaje de células sin yema al inactivar a *Whi7* ($31'1 \pm 2'4$ comparado con $40'5 \pm 3'1$ de un *cln3*). Además, la delección de *WHI7* en un mutante *cln3* sí que muestra una leve, aunque significativa, reducción del tamaño celular en cultivos asincrónicos (Figura 4.1B). Este resultado sugiere que *Whi7* media alguna función en *Start* independientemente de *Cln3*.

A continuación, se estudió el efecto de *Whi7* en la cinética de la transición G1/S. En concreto, se analizó la duración de la fase G1 en cultivos sincronizados del mutante *cln3*. Tras la liberación del bloqueo en telofase inducido por la mutación *cdc15*, se observa que tanto las células *WHI7* como *whi7* salen de mitosis (señalado por la acumulación de Sic1) con cinéticas similares. Sin embargo, el inicio de *Start* (marcado por la desaparición de Sic1 y la aparición de la yema) se encuentra adelantado aproximadamente 10 minutos en ausencia de *Whi7* (Figura 4.1C–E). Estas observaciones demuestran claramente que *Whi7* reprime la progresión de *Start* mediante un mecanismo que es independiente de la regulación por *Cln3*.

Whi7 se asocia a los promotores de genes de *Start* en G1

Whi7 está relacionado con *Whi5* a nivel de secuencia. Por lo tanto, resulta tentador pensar en la posibilidad de que *Whi7* pueda jugar un nuevo papel en el control del ciclo celular relacionado con la regulación del programa transcripcional de *Start*. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) se estudió la unión de *Whi7* a los genes del programa transcripcional de G1/S. Células con la mutación *cdc15* se sincronizaron en

4. *Whi7* es un represor del programa transcripcional de *Start*

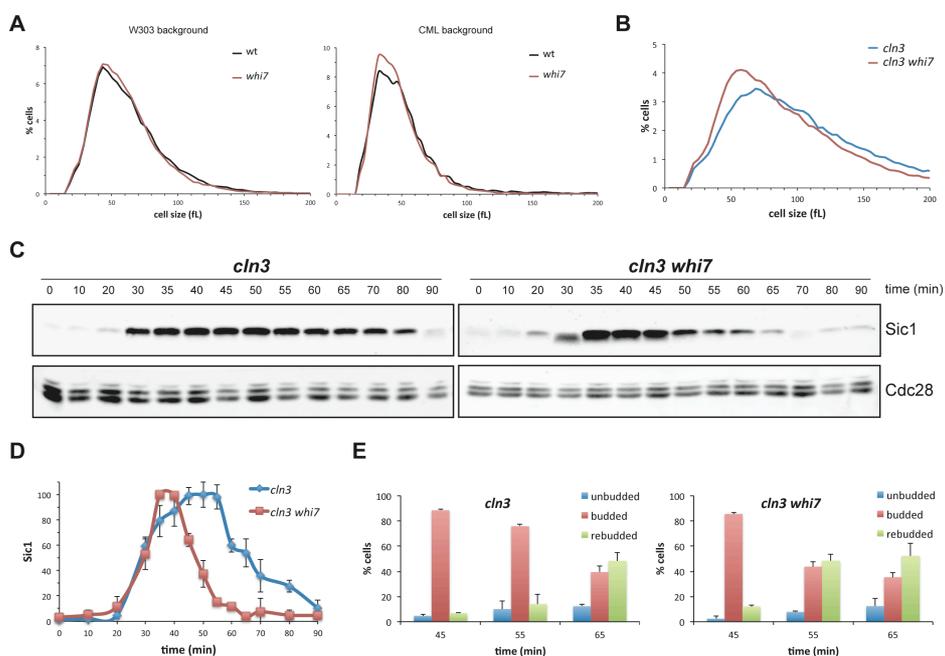


Figura 4.1. Efecto de la delección de *WHI7* sobre el tamaño celular de cepas silvestres y sobre la cinética de *Start* en una cepa mutante *cln3*. (A) Distribución del tamaño celular en cultivos en fase de crecimiento exponencial de las cepas silvestres W303 y CML128 y sus derivadas *whi7* (JCY1819 y CML128 *whi7*). (B) Distribución del tamaño celular de cultivos en fase de crecimiento exponencial de las cepas mutantes *cln3* (MT244) y *cln3 whi7* (JCY1868). (C) Cultivos de las cepas mutantes *cdc15 cln3 SIC1-myc* (JCY1837) y su derivada *whi7* (JCY1896) se pararon en telofase mediante su incubación a 37°C. Después de 3 horas, las células se transfirieron a 25°C y la progresión en el ciclo celular se analizó a los tiempos indicados. El Western blot muestra los niveles de Sic1 como control de la progresión en el ciclo celular y los de Cdc28 como control de carga. (D) El gráfico representa la cantidad relativa de la proteína Sic1 en relación con Cdc28. (E) Se monitorizó la gemación como indicador del inicio del ciclo celular a los tiempos indicados. Hay que señalar que el mutante *cdc15* a menudo muestra un retraso en la separación de las células tras la liberación del bloqueo en telofase, dando lugar a la aparición de células regemadas. Los valores en D y en E representan la media y la desviación estándar derivadas de tres experimentos.

telofase, tras su liberación se tomaron muestras en las que se inmunoprecipitó *Whi7* y se analizó la purificación específica de fragmentos de DNA de los promotores de *CLN2* y *RNR1*. Tal y como se observa en la [Figura 4.2A](#), tras la liberación del bloqueo en telofase se detecta la unión transitoria

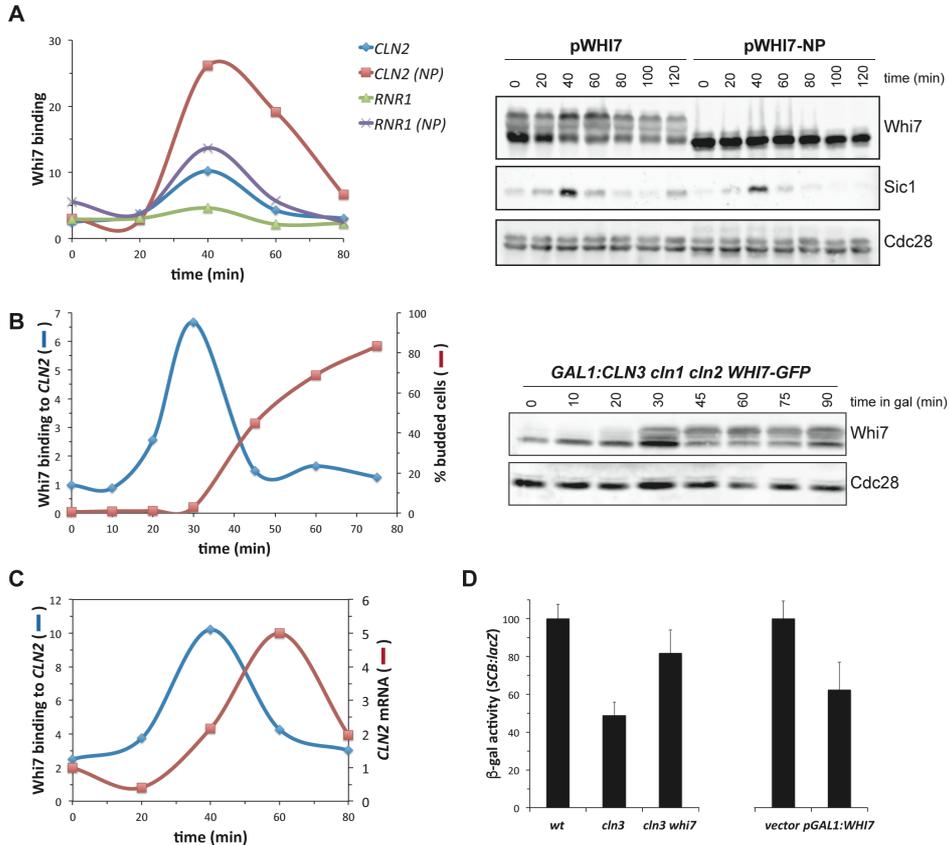
de *Whi7* al promotor de *CLN2* y en menor medida al promotor de *RNR1*, llegando a alcanzar su máximo de unión durante la fase G1, como se deduce por la ausencia de yema y la presencia de *Sic1*. Al mismo tiempo que se ejecuta *Start* (comienza la gemación y la degradación de *Sic1*) la unión de *Whi7* disminuye. También se identificó la asociación de *Whi7* a genes de *Start* en células que expresaban *Whi7-NP* (variante de *Whi7* con todos los sitios consenso de fosforilación por *Cdc28* mutados), indicando que las fosforilaciones por *Cdc28* no son necesarias ni para la unión ni para la disociación de *Whi7* de los promotores.

Para profundizar en la caracterización de la unión de *Whi7* durante G1, se estudió la asociación de esta proteína al promotor de *CLN2* empleando otro método de sincronización. En concreto, se indujo un bloqueo en fase G1 mediante la depleción de las tres ciclinas *Cln*. Estudios de inmunoprecipitación de la cromatina revelaron que no se produce asociación de *Whi7* al promotor de *CLN2* en células paradas en G1. Sin embargo, tras la liberación del bloqueo en G1 y antes de que tenga lugar *Start* (reflejado por la ausencia de yema en las células), sí que se observa la unión transitoria de *Whi7* al promotor de *CLN2* (Figura 4.2B). Ambas observaciones permiten concluir que *Whi7* se une a los promotores de genes de G1/S en G1 tardío y que se disocia de los mismos en *Start*. Esta función se asemeja bastante a la de *Whi5* y señala la existencia de un nuevo papel para *Whi7* en la regulación de *Start* a través del control del programa transcripcional de *Start*.

Finalmente, para analizar si la unión de *Whi7* al promotor de *CLN2* está relacionada con la regulación de la transcripción del gen, tras la liberación del bloqueo inducido en telofase en un mutante *cdc15* se analizó simultáneamente la cinética de unión de *Whi7* al promotor de *CLN2* y la expresión de dicho gen. Los resultados obtenidos mediante ChIP y RT-qPCR muestran que la disociación de *Whi7* del promotor de *CLN2* coincide con la

Figura 4.2. Análisis de la función de *Whi7* en la transcripción en *Start*. (A) Cultivos de la cepa *cdc15 SIC1-myc whi7* (JCY1843) transformada con los plásmidos centroméricos *pWHI7* o *pWHI7-NP*, en los que *Whi7* está etiquetada con HA, se incubaron a 37°C durante 3 horas para bloquear las células en telofase (>95% de las células paradas). Tras liberarlos del bloqueo, la unión de *Whi7* a los promotores de *CLN2* y *RNR1* se estudió mediante ensayos de ChIP. El Western blot muestra los niveles de *Whi7*, *Sic1* y

4. *Whi7* es un represor del programa transcripcional de *Start*



Cdc28 (como control de carga). La progresión en el ciclo celular se monitorizó siguiendo las oscilaciones de la proteína Sic1 y la aparición de la yema, lo que indicó que la transición de *Start* tenía lugar a los 60 min. (B) Cultivos de la cepa *GAL1:CLN3 cln1 cln2 WHI7-GFP* (JCY2008) se pararon en G1 tras crecerlos en medio YPD durante 3 horas. Después, las células se transfirieron a medio YPGal y mediante ensayos de ChIP se analizó la unión de Whi7 al promotor de *CLN2* a los tiempos indicados. El Western blot muestra los niveles de Whi7 y Cdc28 (como control de carga). La progresión en el ciclo celular se monitorizó mediante la aparición de la yema, lo que indicó que la transición de *Start* tenía lugar a los 45 min. (C) Cultivos de la cepa *cdc15 SIC1-myc* (JCY1836) transformada con el plásmido pWHI7 se incubaron a 37°C durante 3 horas para bloquear las células en telofase (>95% de las células paradas). Tras transferirlos a 25°C y liberarlos del bloqueo, se analizó la unión de Whi7 al promotor de *CLN2* y los niveles de mRNA de *CLN2* en referencia a los niveles de mRNA de *ACT1* (como control), mediante ChIP y RT-qPCR, respectivamente. (D) Se determinó la actividad β -galactosidasa en extractos celulares de la cepa silvestre W303 y las cepas mutantes *cln3* (MT244) y *cln3 whi7* (JCY1868) (gráfica izquierda), así como de la cepa silvestre que contenía un vector vacío o el plásmido pGAL1:WHI7 (gráfica derecha), todas ellas transformadas con el plásmido que expresa el gen reportero *SCB:lacZ*. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas al menos de tres experimentos.

activación transcripcional del gen (Figura 4.2C). Además, se realizaron ensayos de expresión empleando el gen reportero *SCB:lacZ*, en el que la expresión de la enzima β -galactosidasa se encuentra bajo el control de un promotor regulado por SBF. El análisis de la expresión de este gen reportero tanto en el mutante simple *cln3* como en el doble mutante *cln3 whi7*, reveló que la delección de *WHI7* suprime, aunque de forma parcial, el defecto de expresión observado en la cepa mutante *cln3* (Figura 4.2D). Por otra parte, este mismo ensayo realizado en una cepa silvestre en la que *WHI7* se encuentra sobreexpresado, da como resultado una reducción en la expresión del gen reportero *SCB:lacZ* (Figura 4.2D). Todos estos resultados indican que *Whi7* es capaz de reprimir la expresión de genes regulados por SBF, como es el caso del gen *CLN2*. De este modo queda confirmado el nuevo papel de *Whi7* como represor transcripcional de genes específicos de G1/S.

Whi7 se une al factor transcripcional SBF

El programa transcripcional de *Start* está mediado por los factores transcripcionales SBF y MBF. Para probar si *Whi7* actúa a través de alguno de ellos, se estudió la unión de *Whi7* a los promotores de *CLN2* (regulado principalmente por SBF) y *RNR1* (regulado principalmente por MBF) en cepas mutantes en *Swi4* y *Mbp1*, componentes específicos de unión al DNA de SBF y MBF, respectivamente. Los resultados revelan que en ausencia de *Swi4* la asociación de *Whi7* tanto al promotor de *CLN2* como al de *RNR1* queda drásticamente reducida, mientras que en ausencia de *Mbp1* no se detecta un defecto significativo en la unión (Figura 4.3A). Por otra parte, se analizó la unión de *Whi7* al promotor de *CLN2* en cultivos bloqueados en fase G1 con factor α (para optimizar la unión de *Whi7* al promotor) de los mutantes *swi4* y *swi6*. Tanto en ausencia de *Swi6* como de *Swi4*, la unión de *Whi7* al promotor de *CLN2* queda severamente afectada (Figura 4.3A). Este resultado demuestra que *Whi7* se une a los promotores de genes de *Start* principalmente a través de SBF.

Para caracterizar mejor la conexión entre SBF y *Whi7*, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación para analizar la existencia de una posible interacción física entre *Whi7* y los componentes de SBF *in vivo*. Como se aprecia en la Figura 4.3B, tanto *Swi6* como *Swi4* co-purifican selectivamente con la fracción de *Whi7* inmunoprecipitada, de forma similar a lo que se observa cuando la proteína inmunoprecipitada es *Whi5*. Estos resultados

demuestran la existencia de una interacción física *in vivo* entre *Whi7* y *Swi4* y entre *Whi7* y *Swi6* y refuerzan la conclusión de que *Whi7* actúa como represor transcripcional de *SBF*.

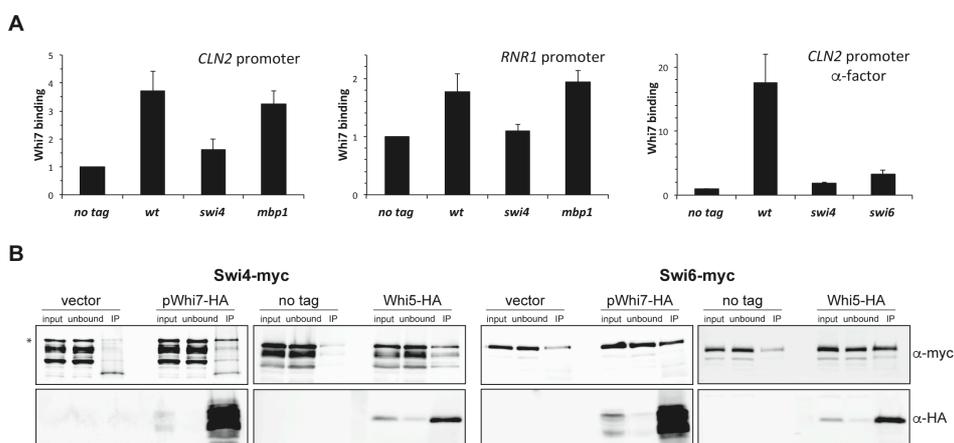


Figura 4.3. Análisis de la unión de *Whi7* a promotores de genes de *Start* en mutantes de *SBF* y *MBF* y estudio de la interacción entre *Whi7* y los componentes de *SBF*. (A) Se estudió mediante ensayos de ChIP la unión de *Whi7* a los promotores de *CLN2* y *RNR1* en cultivos asincrónicos de la cepa silvestre W303 y de las cepas mutantes *swi4* (JCY0167) y *mbp1* (JCY0624) y en cultivos tratados con factor α de la cepa silvestre W303 y de las cepas mutantes *swi4* (JCY0167) y *swi6* (JCY0325), todas ellas transformadas con el plásmido pWHI7, en el que *Whi7* está etiquetada con HA, o con el vector control (no tag). Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas al menos de tres experimentos. (B) Células que expresan de forma endógena la proteína *Swi4* etiquetada con *myc* (JCY1879) o la proteína *Swi6* etiquetada con *myc* (JCY0622) se transformaron con el plásmido pWHI7, en el que *Whi7* está etiquetada con HA, o con un vector control. *Whi7* se inmunoprecipitó a partir de extractos crudos y la presencia de *Whi7*-HA, *Swi4*-*myc* y *Swi6*-*myc* en los extractos totales (input) y en las fracciones no retenida (unbound) e inmunoprecipitadas (IP) se determinó mediante Western blot. El mismo experimento se realizó con células que expresaban *Whi5* etiquetada con HA de las cepas *SWI4-MYC* (JCY1984) o *SWI6-MYC* (JCY1982).

La sobreexpresión de *Whi7* bloquea *Start* en células mutantes *cln3*

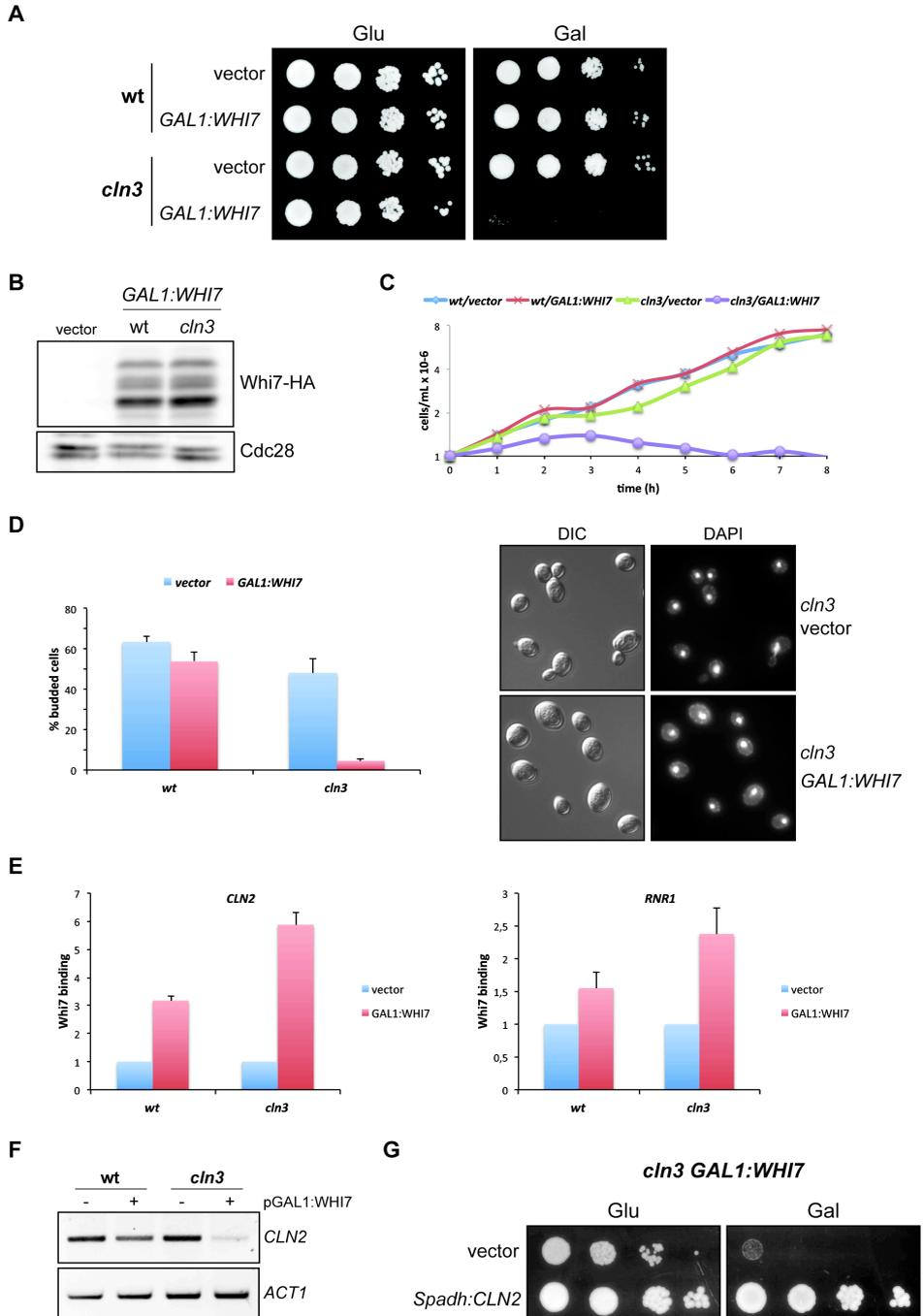
Para avanzar en la caracterización de *Whi7* como represor transcripcional, se determinó el efecto de la sobreexpresión de *WHI7* bajo el control del promotor inducible por galactosa *GAL1*. En células silvestres no se observa un efecto significativo en cuanto al crecimiento celular, pero sí que se

detecta un aumento importante en el porcentaje de células sin yema en cultivos en fase de crecimiento exponencial, de $32'2 \pm 2'1$ (plásmido vector) a $49'4 \pm 2'7$ (plásmido *GAL1:WHI7*). Esto concuerda con el aumento ya descrito del tamaño celular durante la gemación (Yahya et al., 2014) e indica una fase G1 más prolongada. Para estudiar este efecto de manera independiente de la regulación que *Whi7* ejerce sobre *Cln3* (Yahya et al., 2014), se analizó el efecto de la sobreexpresión de *WHI7* en un mutante *cln3*. Ensayos de crecimiento en placa muestran que en ausencia de *Cln3* en la célula elevados niveles de *Whi7* resultan letales (Figura 4.4A). Cabe resaltar que este hecho no se debe a diferencias en la expresión de *Whi7* entre células de la cepa silvestre y el mutante *cln3* (Figura 4.4B). El análisis de las células tras la inducción de *WHI7* revela que se produce un bloqueo de primer ciclo en *Start*, acumulándose más del 97% de las células sin yema y con un solo núcleo (Figura 4.4C, D).

Una posible explicación a este bloqueo observado en *Start* como consecuencia de la sobreexpresión de *WHI7* en un mutante *cln3*, podría deberse a que en estas condiciones *Whi7* esté reprimiendo el programa transcripcional de G1/S. Para probar esta hipótesis, se realizaron en primer lugar ensayos de ChIP en células mutantes *cln3* en las que se indujo el bloqueo en *Start* mediante la sobreexpresión de *WHI7*. Los resultados muestran un

Figura 4.4. Efecto de la sobreexpresión de *WHI7* en la progresión del ciclo celular en una cepa mutante *cln3*. (A) Diluciones 1/10 seriadas de cultivos de la cepa silvestre W303 y de la cepa mutante *cln3* (MT244) transformados con un vector vacío o el plásmido pGAL1:WHI7, se sembraron en placas con medio de selección con glucosa o galactosa y se incubaron a 25°C durante 3 días. (B) Análisis mediante Western blot de los niveles de proteína *Whi7* en células crecidas en medio de selección con galactosa. (C) Las mismas cepas se crecieron en medio de selección con rafinosa hasta fase exponencial, se añadió galactosa al medio para inducir la sobreexpresión de *WHI7* y se analizó el aumento en el número de células a los tiempos indicados. (D) La gráfica muestra la distribución en el ciclo celular, representada como porcentaje de células con yema, tras 3 horas de la adición de la galactosa. Las imágenes de microscopía muestran la imagen en DIC y la tinción del DNA con DAPI. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas de tres experimentos. (E) Se estudió mediante ensayos de ChIP la asociación de *Whi7* a los promotores de *CLN2* y *RNR1* tras 3 horas desde la adición de la galactosa. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas de tres experimentos. (F) Los niveles de mRNA de *CLN2* y *ACT1* se analizaron por RT-PCR semicuantitativa 3 horas después de la adición de la galactosa. (G) Diluciones 1/10 seriadas de cultivos de la cepa mutante *cln3* (MT244)

4. *Whi7* es un represor del programa transcripcional de *Start*



transformada con el plásmido pGAL1:WHI7 y también con un vector vacío o un plásmido que expresa *CLN2* bajo el control del promotor *adh* de *S. pombe*, se sembraron en placas con medio de selección con glucosa o con galactosa y se incubaron a 25°C durante 3 días.

aumento en la asociación de Whi7 a los promotores de *CLN2* y *RNR1* (Figura 4.4E). Además, el análisis del mRNA de *CLN2* en células que sobreexpresan *WHI7* confirma que la expresión del gen *CLN2* se encuentra reprimida en estas células (Figura 4.4F). Por otra parte, la expresión ectópica de *CLN2* suprime la letalidad del mutante *cln3* ocasionada por la sobreexpresión de *WHI7* (Figura 4.4G). De esta forma se confirma que, en ausencia de Cln3, el bloqueo en G1 debido a la sobreexpresión de *WHI7* se produce por encontrarse Whi7 reprimiendo la expresión de los genes del programa transcripcional de *Start*.

En conclusión, niveles elevados de Whi7 tienen como consecuencia la represión del programa transcripcional de *Start*, lo que conduce a un bloqueo en G1 en células mutantes *cln3*. Esto confirma en primer lugar, que Whi7 desarrolla un papel en la regulación de *Start* mediando la represión del programa transcripcional de *Start*, y en segundo lugar, que este nuevo papel es totalmente independiente de su función, ya conocida, en la regulación de Cln3 (Yahya et al., 2014).

El papel de Whi7 en *Start* depende de la presencia de SBF

Tal y como se ha descrito al inicio de este capítulo, la delección de *WHI7* causa la reducción del tamaño celular en una cepa en la que *Start* se encuentra comprometido, como es el caso del mutante *cln3*. Curiosamente, la delección de *WHI7* en los mutantes *swi4* y *swi6*, en los que *Start* también está comprometido, no tiene ningún efecto en el tamaño celular de los mismos (Figura 4.5A). Esto indica que el efecto de Whi7 sobre el tamaño celular depende de la presencia de SBF en la célula, pero no requiere de Cln3.

Se analizó también el efecto de la sobreexpresión de *WHI7* tanto en células mutantes *swi4* como *swi6*. Contrariamente a lo observado en el caso del mutante *cln3*, niveles elevados de Whi7 en la célula no resultan letales ni en ausencia de Swi4 ni de Swi6 (Figura 4.5B). Sin embargo, sí que se observa una disminución en la tasa de crecimiento, así como un ligero incremento en el porcentaje de células sin yema, hecho que resulta más evidente en el caso del mutante *swi4* (Figura 4.5C-F). Este hecho es consistente con la ya conocida regulación de Cln3 por parte de Whi7. Estos resultados sugieren que el bloqueo inducido en G1 por Whi7 está mediado por la regulación de SBF.

4. *Whi7* es un represor del programa transcripcional de *Start*

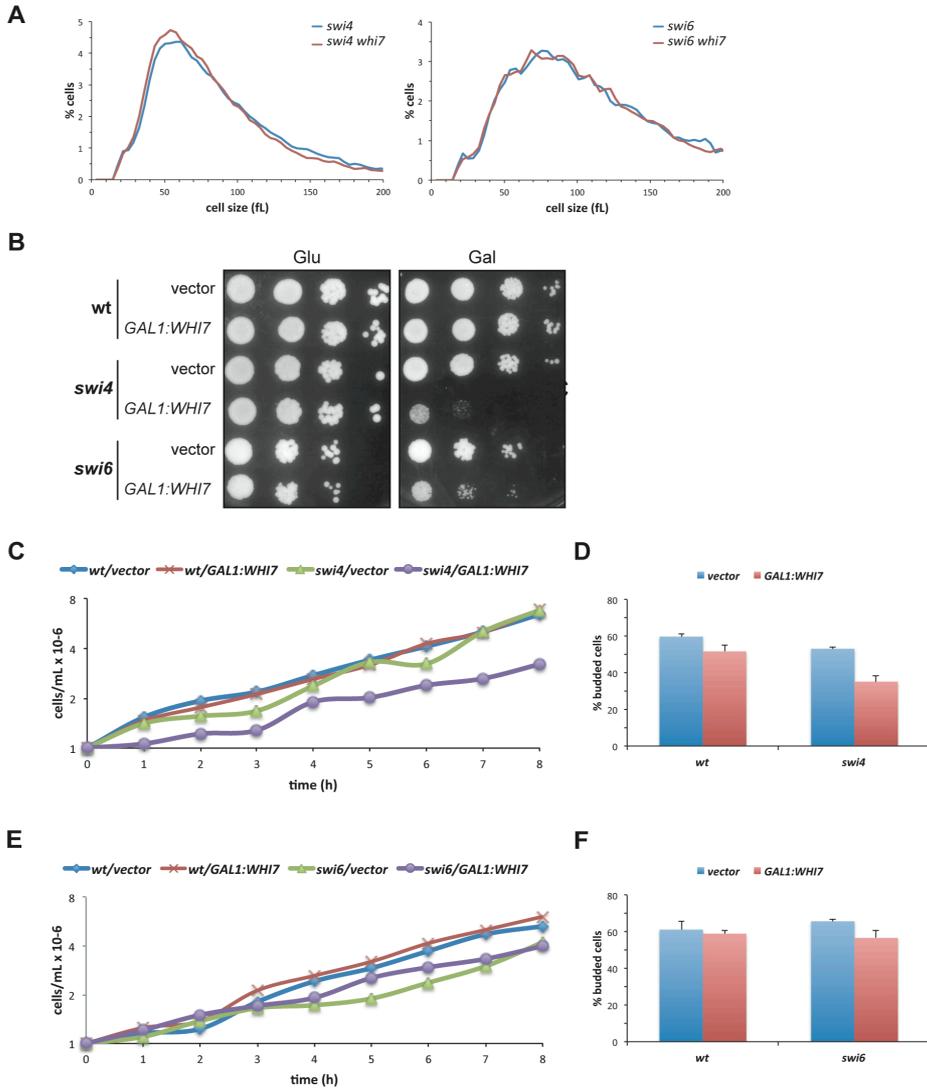


Figura 4.5. Efecto de la delección y la sobreexpresión de *WHI7* sobre el tamaño celular y la progresión en el ciclo celular en cepas mutantes *swi4* y *swi6*. (A) Distribución del tamaño celular en cultivos en fase de crecimiento exponencial de las cepas mutantes *swi4* (JCY0167), *swi4 whi7* (JCY1872), *swi6* (JCY0221) y *swi6 whi7* (JCY1880). (B) Diluciones 1/10 seriadas de cultivos de la cepa silvestre W303 y de las cepas mutantes *swi4* (JCY0167) y *swi6* (JCY0325) transformadas con un vector vacío o con el plásmido centromérico pGAL1:WHI7, que expresa *WHI7* bajo el control del promotor *GAL1*, se sembraron en placas con medio de selección con glucosa o con galactosa y se incubaron a 25°C durante 3 días. (C, E) Las mismas cepas se crecieron en medio de selección con rafinosa hasta fase exponencial, se añadió galactosa al medio para inducir la sobreexpresión de *WHI7* y se analizó el aumento en el número de células a los tiempos indicados. (D, F) Las gráficas muestran la distribución en el ciclo celular, representada como porcentaje de células con yema, tras 3 horas de la adición de la galactosa. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas de tres experimentos.

La sobreexpresión de *Whi7* suprime el fenotipo de un mutante *whi5*

Los resultados obtenidos nos han permitido confirmar que *Whi7*, además de estar relacionado con *Whi5* a nivel de secuencia, también actúa como represor transcripcional del programa de *Start*, del mismo modo que *Whi5*. Para investigar un poco más a cerca de la relación entre *Whi7* y *Whi5*, se analizó el efecto de la sobreexpresión de *WHI7* bajo el control del promotor *GAL1*. La sobreexpresión de *WHI7* en una cepa silvestre no tiene ningún efecto sobre el tamaño celular, mientras que, por el contrario, la sobreexpresión de *WHI5* conduce a un aumento del tamaño celular. Sin embargo, cuando se sobreexpresan conjuntamente *WHI7* y *WHI5* en la célula se observa un efecto aditivo en el control del tamaño celular produciéndose un aumento del mismo, lo que refuerza la idea de que ambas proteínas actúan en paralelo (Figura 4.6A). Por otra parte, en células mutantes *whi5*, cuyo tamaño celular es ya de por sí menor debido a la ausencia de dicho represor transcripcional, la sobreexpresión de *WHI7* es capaz de recuperar el tamaño normal de las células (Figura 4.6B). Estos resultados son importantes porque demuestran que *Whi7*, no solo desarrolla la misma función que *Whi5* como represor del programa transcripcional de *Start*, sino que además es capaz de sustituir a *Whi5* en la regulación de *Start* cuando sus niveles celulares son elevados.

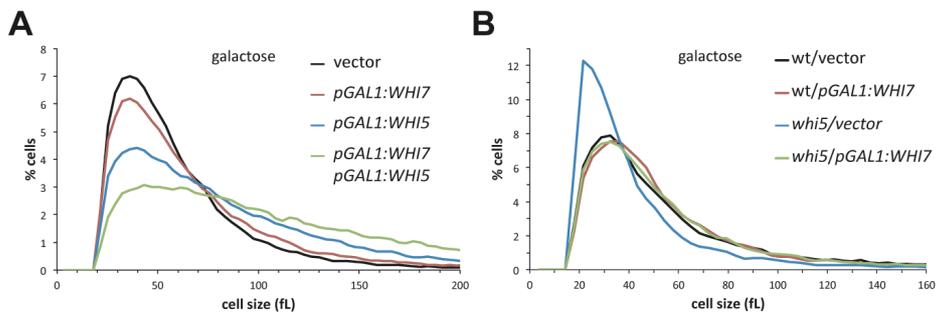


Figura 4.6. Efecto de la sobreexpresión de *WHI7* sobre el tamaño celular en presencia o ausencia de *WHI5* en la célula. (A) Distribución del tamaño celular en cultivos en fase de crecimiento exponencial en medio de selección con galactosa de la cepa silvestre W303 transformada con el plásmido pGAL1:WHI5, pGAL1:WHI7, ambos plásmidos o con los vectores control correspondientes. (B) Distribución del tamaño celular en cultivos en fase de crecimiento exponencial en medio de selección con galactosa de la cepa silvestre W303 y de la cepa mutante *whi5* (JCY1874) transformados con el plásmido pGAL1:WHI7 o con el vector control.

5. Estudio paralelo de los represores transcripcionales Whi7 y Whi5

Whi7 está relacionado a nivel de secuencia con el represor transcripcional Whi5, el parálogo funcional en levaduras de la proteína Rb de células de mamífero. Esto indica que ambas proteínas tienen un origen evolutivo común y sugiere que podrían desarrollar funciones similares en la célula. Ya se había descrito que Whi7 participa en la represión de *Start* reteniendo a Cln3 en la membrana del RE de forma dependiente de fosforilación por Cdc28 (Yahya et al., 2014). Los resultados recogidos en el capítulo anterior demuestran que Whi7 actúa como represor de *Start* reprimiendo la transcripción de genes de G1/S de forma dependiente de SBF, función en la que colabora con Whi5. Estos datos indican que Whi7 no solo presenta homología de secuencia con Whi5, sino que además es un parálogo funcional del mismo, puesto que ambas proteínas actúan como represores del programa transcripcional de *Start*. De este modo, tal y como ocurre en mamíferos con las proteínas Rb, en la levadura *S. cerevisiae* la represión del programa transcripcional de *Start* también depende de varias proteínas.

Muchas proteínas que participan en la regulación del ciclo celular presentan redundancia funcional. Esta característica asegura la progresión del ciclo y la supervivencia celular en condiciones desfavorables, pero no implica que dichos reguladores muestren exactamente la misma especificidad funcional. Por ello, nos planteamos identificar los posibles determinantes diferenciales en la regulación y función de los represores transcripcionales Whi7 y Whi5.

Whi5 tiene un papel predominante en la regulación de *Start*

Hemos observado que la sobreexpresión de *WHI7* es capaz de suprimir el fenotipo celular de un mutante *whi5* (Figura 4.6B), indicando que *Whi7* es capaz de sustituir funcionalmente a *Whi5* como represor del programa transcripcional de *Start* cuando sus niveles celulares son elevados. Como ya ha sido descrito por otros autores, la ausencia de *Whi5* en la célula da como resultado una clara disminución del tamaño celular y del porcentaje de células sin yema en cultivos asincrónicos (Figura 5.1A, B). Sin embargo, la inactivación de *Whi7* no modifica la distribución del tamaño celular en cultivos asincrónicos, pero sí que tiene como consecuencia una disminución en el porcentaje de células sin yema (Figura 5.1A, B). El análisis del tamaño celular de un doble mutante *whi5 whi7* no muestra una reducción adicional a la ya observada en el mutante simple *whi5* (Figura 5.1C). Estos resultados estarían indicando que el represor transcripcional *Whi5* tiene una mayor relevancia que su parálogo *Whi7* durante la fase G1 del ciclo celular.

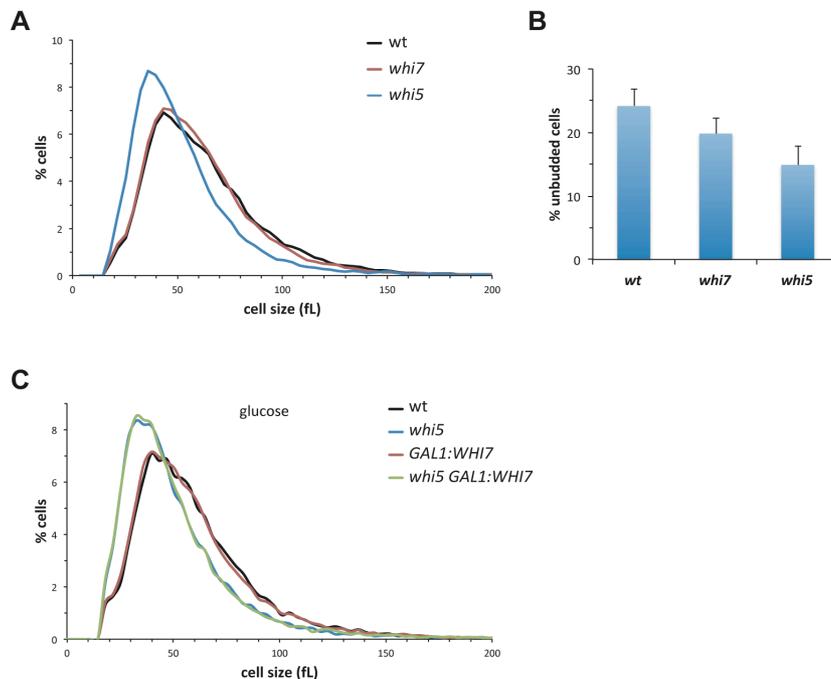


Figura 5.1. Efecto de la delección de *WHI7* y *WHI5* sobre el tamaño celular. (A) Distribución del tamaño celular en cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa silvestre W303 y de las cepas mutantes *whi7* (JCY1819) y *whi5* (JCY1874). (B) La gráfica representa el porcentaje de células sin yema de cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa silvestre W303 y de las cepas mutantes *whi7* (JCY1819) y *whi5*

(JCY1874). (C) Distribución del tamaño celular en cultivos en fase de crecimiento exponencial en medio YPD (el promotor *GAL1* permanece reprimido para mimetizar la mutación *whi7*) de la cepa silvestre W303 y de las cepas mutantes *whi5* (JCY1874), *GAL1:WHI7* (JCY1804) y *whi5 GAL1:WHI7* (JCY1885).

Whi5 y *Whi7* forman, junto con *Nrm1*, una familia de proteínas caracterizada por la presencia en su estructura del motivo GTB, implicado en la represión transcripcional de *G1/S* (Travesa et al., 2013). *Whi5* y *Whi7* actúan en *G1* temprano reprimiendo la transcripción de forma dependiente de SBF. En el caso de la transcripción dependiente de MBF, la proteína *Nrm1* funciona como co-represor una vez *Start* ya ha sido ejecutado (de Bruin et al., 2006). Por este motivo nos planteamos estudiar el fenotipo celular de un triple mutante para los tres principales represores de la transición *G1/S*: *Whi5*, *Whi7* y *Nrm1*. Se realizaron ensayos de crecimiento en placa y se analizó el tamaño celular del mutante *whi5 whi7 nrm1*. Los resultados revelan la ausencia de un fenotipo característico asociado a este triple mutante, ya que no muestra ningún defecto en el crecimiento (Figura 5.2A), ni tampoco una reducción del tamaño celular adicional a la ya observada para el mutante simple *whi5* (Figura 5.2B).

Whi5 es una proteína fosforilada por *Cdc28* en múltiples sitios. La sobreexpresión de una versión de *Whi5* con todos estos sitios mutados a Ala (*Whi5*^{12A}) no tiene ningún fenotipo a nivel celular. Sin embargo, cuando la sobreexpresión de esta versión se combina con la expresión de una versión de *Swi6* con cuatro sitios fosforilables por *Cdc28* mutados a Ala (*Swi6*^{S4A}) resulta letal para las células, indicando que para activar *Start* es suficiente la fosforilación de alguno de estos dos factores (Costanzo et al., 2004; Wagner et al., 2009). Con la finalidad de investigar si las fosforilaciones por *Cdc28* de *Whi7* tienen un papel similar a las de *Whi5*, se realizaron experimentos de crecimiento en células que sobreexpresan la versión de *Whi7* con todos los posibles sitios fosforilables por *Cdc28* mutados a Ala (*Whi7*-NP) junto con la versión *Swi6*^{S4A}. Los ensayos realizados no revelan defecto alguno en el crecimiento indicativo de un posible bloqueo en *Start* (Figura 5.3A). No obstante, la presencia de *Whi5* en la célula podría estar enmascarando el resultado. Por ello, este mismo experimento se realizó también en un mutante *whi5*, con el objetivo de que *Whi7* fuese el único represor transcripcional de *Start* presente en la célula. En este caso, la co-expresión de *Whi7*-NP y *Swi6*^{S4A}

tampoco da lugar a un defecto de crecimiento (Figura 5.3B). Así, a diferencia de lo que ocurre con *Whi5*^{12A}, no se observa ningún defecto en el crecimiento asociado a la co-expresión de *Whi7*-NP y *Swi6*^{S4S}, lo que estaría sugiriendo alguna diferencia en el papel de la fosforilación por *Cdc28* de *Whi7* en comparación con el de *Whi5*.

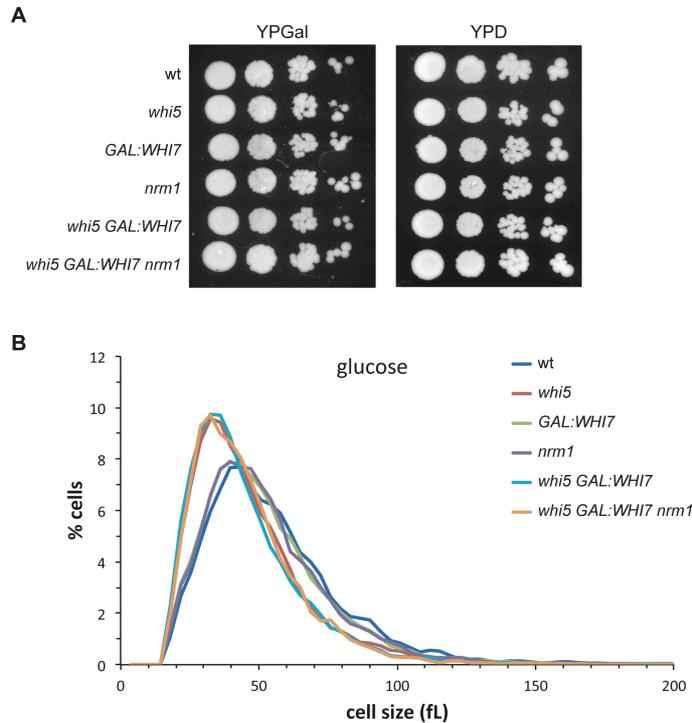


Figura 5.2. Efecto de la delección de *WHI7*, *WHI5* y *NRM1* sobre el crecimiento y el tamaño celular. (A) Diluciones 1/10 seriadas de cultivos de la cepa silvestre W303 y de las cepas mutantes *whi5* (JCY1874), *GAL1:WHI7* (JCY1804), *nrm1* (JCY1923), *whi5 GAL1:WHI7* (JCY1885) y *whi5 GAL1:WHI7 nrm1* (JCY1899) se sembraron en placas con medio completo YP con galactosa o con glucosa (el promotor *GAL1* permanece reprimido) y se incubaron a 25°C durante 3 días. (B) Distribución del tamaño celular en cultivos en fase de crecimiento exponencial en medio YPD (el promotor *GAL1* permanece reprimido) de la cepa silvestre W303 y de las cepas mutantes *whi5* (JCY1874), *GAL1:WHI7* (JCY1804), *nrm1* (JCY1923), *whi5 GAL1:WHI7* (JCY1885) y *whi5 GAL1:WHI7 nrm1* (JCY1899).

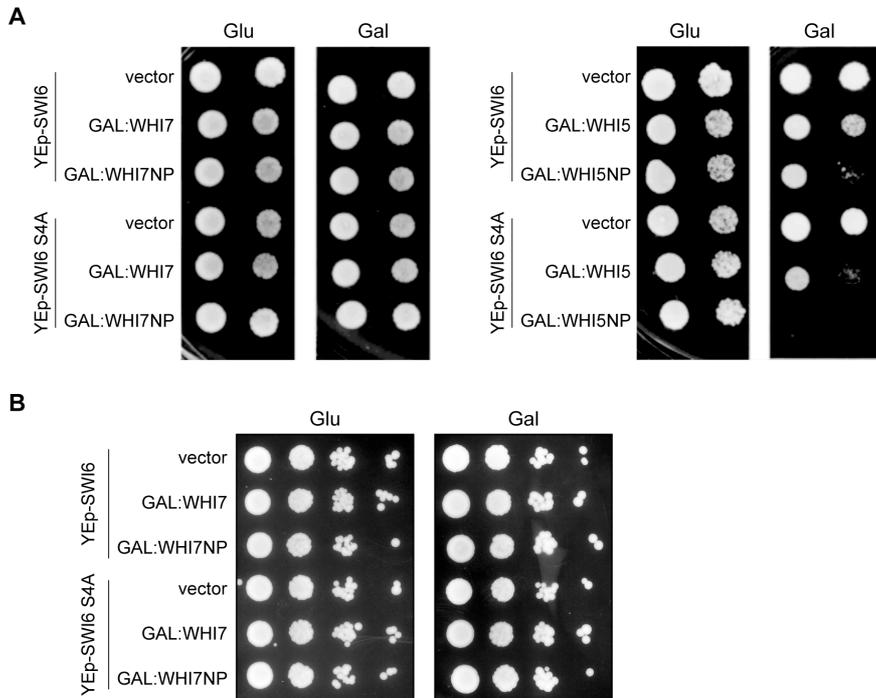


Figura 5.3. Efecto sobre el crecimiento celular de la eliminación de los sitios consenso de fosforilación por Cdc28 en *Whi7*. (A) Diluciones 1/10 seriadas de cultivos de la cepa silvestre W303 co-transformada con el plásmido pYEpSWI6 o pYEpSWI6 S4A (versión de Swi6 con 4 sitios de fosforilación por CDK mutados) y el vector vacío o los plásmidos centroméricos pGAL1:WHI7, pGAL1:WHI7NP (versión de *Whi7* con todos los posibles sitios de fosforilación por CDK mutados), pGAL1:WHI5 o pGAL1:WHI5 NP (versión de *Whi5* con 12 sitios de fosforilación por CDK mutados), en los que la expresión de *WHI7* y *WHI5* se encuentra bajo el control del promotor *GAL1*, se sembraron en placas con medio de selección con glucosa o galactosa y se incubaron a 25°C durante 3 días. (B) Diluciones 1/10 seriadas de cultivos de la cepa mutante *whi5* (JCY1874) co-transformada con el plásmido pYEpSWI6 o pYEpSWI6 S4A y el vector vacío o los plásmidos centroméricos pGAL1:WHI7 o pGAL1:WHI7NP, se sembraron en placas con medio de selección con glucosa o galactosa y se incubaron a 25°C durante 3 días.

Comparación de los niveles celulares de *Whi7* y *Whi5*

Los resultados anteriores reflejan que, pese a que *Whi7* y *Whi5* presentan homología en su secuencia y son parálogos funcionales, existen diferencias funcionales entre ellos. Una posible explicación a las diferencias que muestran estos dos represores de *Start* podría tener su origen en diferencias en sus niveles celulares.

5. Comparación entre *Whi7* y *Whi5*

Para realizar un análisis cuantitativo entre proteínas es necesario emplear el mismo sistema de etiquetaje; además, es importante que el sistema seleccionado no altere los niveles celulares de las proteínas a estudiar. Por este motivo, para comparar los niveles de *Whi7* y *Whi5* mediante Western blot se usó la etiqueta 6xHA (Saiz-Baggetto et al., 2017). Tal y como se aprecia en la Figura 5.4A, la abundancia de *Whi7* en la célula es considerablemente menor que la de su parólogo *Whi5*, detectándose aproximadamente 12 veces más proteína de *Whi5* que de *Whi7*. El hecho de que haya más proteína *Whi5* en la célula podría dar explicación a algunos de los fenotipos más severos que observamos para *whi5*, como el asociado al tamaño celular.

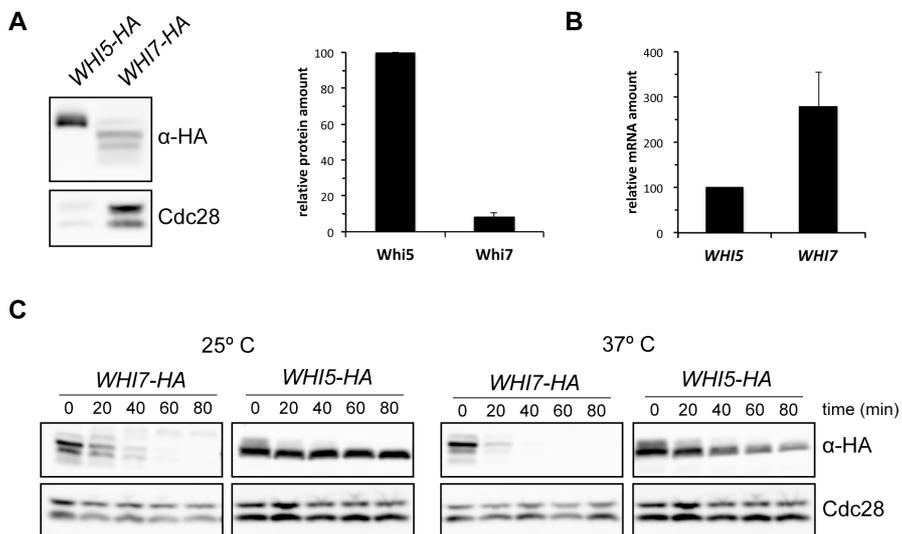


Figura 5.4. Análisis de los niveles celulares de *Whi7* y *Whi5*. (A) Se analizaron mediante Western blot los niveles de proteína en células silvestres que expresan *Whi7* (JCY2015) o *Whi5* (JCY2036) etiquetadas con 6xHA. La gráfica representa la cantidad relativa de ambas proteínas en relación con *Cdc28*. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas al menos de tres experimentos. (B) Se analizaron mediante RT-qPCR los niveles de mRNA de *WHI7* y *WHI5* relativos a los niveles de mRNA de *ACT1* (como control) en células silvestres que expresan las proteínas *Whi7* (JCY2015) o *Whi5* (JCY2036) etiquetadas con 6xHA o en células de la cepa silvestre W303 sin etiquetar. Hay que indicar que la relación entre los niveles de mRNA de *WHI7* y *WHI5* no se ve afectada por la presencia de etiqueta. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas al menos de tres experimentos. (C) Células silvestres que expresan la proteína *Whi7* (JCY2015) o *Whi5* (JCY2036) etiquetadas con 6xHA se mantuvieron a 25°C o se transfirieron a 37°C durante 3 horas, tras lo cual se incubaron en presencia de cicloheximida 100 µg/mL. Los niveles de proteína de *Whi7* y *Whi5* se analizaron mediante Western blot a los tiempos indicados tras la adición de cicloheximida. *Cdc28* se muestra como control de carga.

Para analizar si las diferencias observadas entre *Whi7* y *Whi5* a nivel de proteína se deben a diferencias en la transcripción de los genes, se analizaron los niveles de mRNA de *WHI7* y *WHI5* mediante RT-qPCR. El análisis de los datos revela que *WHI7* se expresa aproximadamente 3 veces más que *WHI5* en células silvestres (Figura 5.4B). Este resultado estaría reflejando que las diferencias encontradas a nivel de proteína se deben a una regulación diferencial de ambos represores a nivel postranscripcional. En este sentido es necesario recordar que *Whi7* es una proteína muy inestable (Figura 3.4). Para comparar directamente la estabilidad de *Whi7* y *Whi5* se realizaron en paralelo ensayos de apagado traduccional. Los resultados muestran que a 25°C los niveles de *Whi5* permanecen estables, mientras que la vida media de *Whi7* es de aproximadamente 20 minutos (Figura 5.4C). Además, a 37°C *Whi5* continúa siendo una proteína bastante estable en comparación con *Whi7*, la cual ya experimenta una fuerte caída en sus niveles a los 10 minutos (Figura 5.4C). Estos datos indican que mientras que *Whi5* es una proteína estable *Whi7* es una proteína inestable. Esta diferencia de estabilidad entre ambas proteínas podría explicar cómo a pesar de que el gen *WHI7* se expresa más en la célula, los niveles de proteína *Whi5* son mayores.

Análisis comparativo de la unión de *Whi7* y *Whi5* a promotores de genes diana

Los represores *Whi7* y *Whi5* se asocian al factor transcripcional SBF para poder unirse a los promotores de genes de *Start*. Estudios previos sugieren que ambos represores difieren en la especificidad con la que se asocian a los promotores de estos genes (Gomar-Alba et al., 2017). Puesto que la unión de *Whi7* y *Whi5* es fuertemente periódica y solo se produce en un momento muy concreto del ciclo celular, es conveniente realizar el ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) para ambas proteínas en las mismas células con el objetivo de identificar diferencias de especificidad en su asociación a promotores. En el ensayo se analizó la unión de *Whi7* y *Whi5* a los promotores de *CLN2* y *CLN1*, los genes de las ciclinas de *Start*, *FKS1*, *MNN1* y *GAS1*, genes que codifican proteínas implicadas en la biosíntesis de la pared celular, y *RNR1*, subunidad mayor de la ribonucleótido reductasa encargada de la síntesis de dNTPs. Los genes *CLN2*, *CLN1*, *FKS1*, *MNN1* y *GAS1* se encuentran regulados principalmente por SBF, mientras que la regulación del gen *RNR1* depende mayoritariamente de MBF. Los resultados muestran que

tanto *Whi7* como *Whi5* son capaces de unirse a los promotores de todos los genes estudiados. Sin embargo, existen diferencias en su especificidad por asociarse a los distintos genes. *Whi5* tiene más especificidad por los genes de las ciclinas de *Start* (principalmente por *CLN2*) que *Whi7*, mientras que *Whi7* presenta mayor especificidad por los genes *FKS1*, *MNN1* y *RNR1* que *Whi5*. Por otra parte, la especificidad por la asociación al promotor del gen *GAS1* es similar para ambas proteínas (Figura 5.5). Este resultado confirma que los represores de *Start* *Whi7* y *Whi5* tienen diferente especificidad en su asociación a promotores y sugiere que dicha unión tiene lugar a través de distintos determinantes.

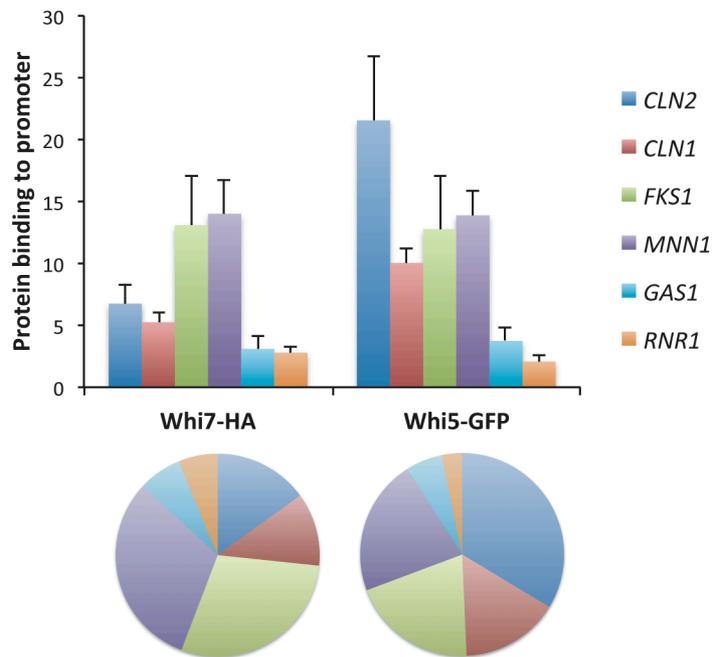


Figura 5.5. Análisis comparativo de la unión de *Whi7* y *Whi5* a promotores de genes de *Start*. Se analizó mediante ensayos de ChIP la unión de *Whi7* y *Whi5* a los promotores de los genes indicados en células silvestres que expresan la proteína *Whi5* etiquetada con GFP (JCY2116) transformadas con el plásmido pWHI7, en el que *Whi7* está etiquetada con HA. Como control se usó la cepa silvestre W303 (no tag). Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas al menos de tres experimentos. Los gráficos circulares seccionados reflejan la distribución relativa de unión de *Whi7* y *Whi5* a los promotores de los genes analizados.

Determinantes diferenciales en la unión de Whi7 y Whi5 a promotores

La transcripción génica en *Start* depende principalmente de dos factores: SBF (Swi4/Swi6) y MBF (Mbp1/Swi6). Ya se ha descrito que Whi5 interacciona con el factor transcripcional SBF íntegro para su asociación a promotores de genes de *Start*, puesto que la ausencia de alguno de sus componentes da como resultado la pérdida de la unión de Whi5 a dichos promotores (de Bruin et al., 2004; Costanzo et al., 2004). Del mismo modo, nosotros hemos identificado que Whi7 se une a los promotores de los genes de G1/S principalmente a través de SBF (Gomar-Alba et al., 2017).

Para profundizar en el mecanismo por el que Whi7 se asocia al factor transcripcional SBF, se investigó mediante experimentos de ChIP la unión de Whi7 a los promotores de genes de *Start* *CLN2*, *FKS1*, *MNN1* y *RNR1* en las cepas mutantes *swi4* y *swi6*. Coincidiendo con que la interacción de Whi5 con SBF necesita de este factor transcripcional íntegro, se observa que Whi5 es incapaz de asociarse a los promotores de todos los genes analizados tanto en ausencia de Swi4 como de Swi6 (Figura 5.6B). A diferencia de lo que ocurre con Whi5, Whi7 presenta unión a todos los genes en ausencia de Swi6, aunque dicha unión se encuentra afectada (Figura 5.6A). Por lo tanto, mientras que Whi5 precisa de la integridad del factor transcripcional SBF para asociarse a promotores, los resultados obtenidos sugieren que Whi7 también es capaz de asociarse a Swi4 en ausencia de Swi6.

La unión de Whi7 a promotores en ausencia de Swi6 sugiere que Swi4 debe mediar dicha asociación. Esto implica que cuando Swi6 no se encuentra presente en la célula Swi4 debe permanecer unido a promotores. Por ello, se analizó la unión de Swi4 a los promotores de *CLN2*, *FKS1*, *MNN1* y *RNR1* en un mutante *swi6*. El estudio realizado mediante ChIP demuestra que Swi4 es capaz de asociarse a todos los promotores en ausencia de Swi6 (Figura 5.7). Resulta especialmente llamativo el caso del gen *FKS1*, al que la unión de Swi4 se ve menos afectada en ausencia de Swi6. Este resultado apoya la hipótesis de que en ausencia de Swi6 la unión de Whi7 a promotores tenga lugar a través de Swi4.

Whi7 y Whi5 son capaces de interaccionar tanto con Swi4 como con Swi6 en células silvestres (Figura 4.3B). En el caso de Whi5, ya está descrito que en ausencia de Swi6 desaparece la interacción física entre Whi5 y Swi4 (de Bruin et al., 2004; Costanzo et al., 2004). Puesto que Whi7 es capaz de

asociarse a promotores en ausencia de *Swi6* y para caracterizar mejor qué subunidades son necesarias en la interacción física *in vivo* entre SBF y *Whi7*, se llevaron a cabo experimentos de co-inmunoprecipitación (co-IP) en un mutante *swi6*. Tal y como se observa en la [Figura 5.8](#), a diferencia de *Whi5*, en ausencia de la proteína *Swi6*, *Swi4* co-purifica selectivamente con la fracción de *Whi7* inmunoprecipitada. Este resultado confirma que, mientras que *Whi5* necesita el factor transcripcional SBF íntegro para interaccionar con el mismo, *Whi7* es capaz de interaccionar físicamente *in vivo* con *Swi4* en ausencia de *Swi6*.

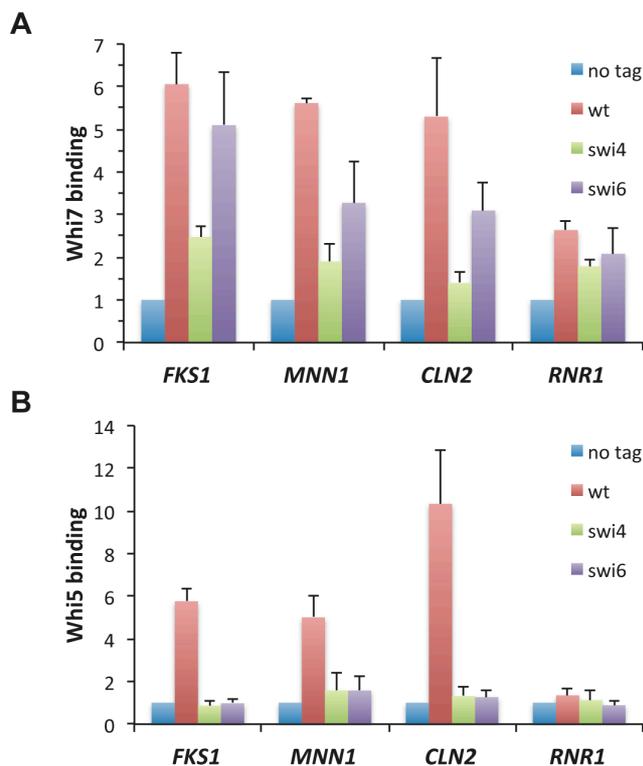


Figura 5.6. Análisis de la unión de *Whi7* y *Whi5* a promotores de genes de *Start* en mutantes de SBF. (A) Se estudió mediante ensayos de ChIP la unión de *Whi7* a los promotores de los genes indicados en la cepa silvestre W303 y en las cepas mutantes *swi4* (JCY0167) y *swi6* (JCY0325), transformadas con el plásmido pWHI7, en el que *Whi7* está etiquetada con HA, o con el vector control (no tag). (B) Se estudió mediante ensayos de ChIP la unión de *Whi5* a los promotores de los genes indicados en la cepa silvestre W303 y en las cepas mutantes *swi4* (JCY0740) y *swi6* (JCY1934) en las que *Whi5* está etiquetada con HA. Los valores en A y en B representan la media y la desviación estándar derivadas al menos de tres experimentos.

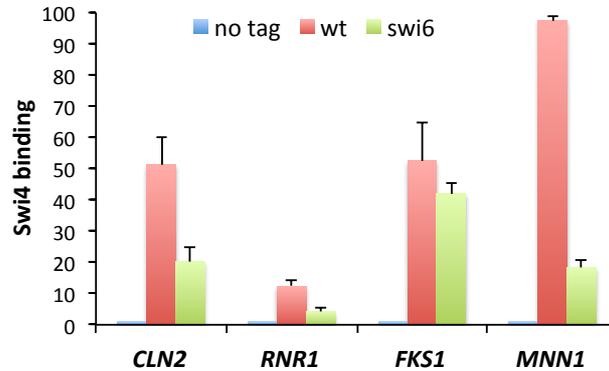


Figura 5.7. Análisis de la unión de Swi4 a promotores de genes de *Start* en una cepa mutante *swi6*. Se estudió mediante ensayos de ChIP la unión de Swi4-HA a los promotores de los genes indicados en la cepa silvestre (JCY1956) y mutante *swi6* (JCY1958). Como control se usó la cepa silvestre JCY1952 (no tag). Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas al menos de tres experimentos.

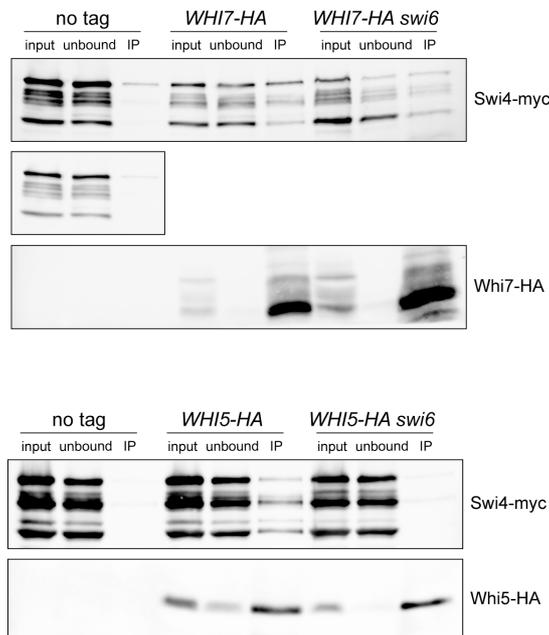


Figura 5.8. Estudio de la interacción de *Whi7* y *Whi5* con la proteína *Swi4* en un mutante *swi6*. Se analizó mediante ensayos de co-IP la interacción física *in vivo* entre *Whi7* y *Swi4* en células que expresan de forma endógena la proteína *Swi4* etiquetada con myc en presencia (JCY1879) o ausencia de *Swi6* (JCY1884), transformadas con el plásmido pWHI7, en el que *Whi7* está etiquetada con HA, o con un vector control (no tag). *Whi7* se inmunoprecipitó a partir de extractos crudos y la presencia de *Whi7*-HA y *Swi4*-myc en los extractos totales (input) y en las fracciones no retenida (unbound) e inmunoprecipitadas (IP) se determinó mediante Western blot. El mismo experimento se realizó en paralelo con células que expresaban *Whi5* etiquetada con HA de las

cepas *SWI4-MYC* (JCY2134) y *SWI4-MYC swi6* (JCY2135) y con células de la cepa *SWI4-MYC* (JCY1879) como control (no tag).

Por otro lado, el estudio de la unión de Whi7 a los promotores de los genes *CLN2*, *FKS1*, *MNN1* y *RNR1* en un mutante *swi4* muestra que dicha asociación queda drásticamente reducida, especialmente en el caso del promotor del gen *CLN2* (Figura 5.6A). Este resultado refleja que la unión de Whi7 a promotores es fuertemente dependiente de Swi4, ya sea cuando se encuentra formando parte del complejo SBF junto con Swi6 o bien en su forma monomérica. No obstante, es importante resaltar que todavía se observa unión residual de Whi7 en ausencia de Swi4, principalmente a los promotores de los genes *FKS1* y *MNN1*. Esta observación podría deberse a que Whi7 también sea capaz de asociarse a promotores a través del factor transcripcional MBF, lo que implica que Mbp1 debe ser capaz de unirse a los promotores de los genes analizados en ausencia de Swi4 en la célula. Por ello, se analizó la capacidad de asociación de Mbp1 a promotores en un mutante *swi4*. El ensayo realizado mediante CHIP muestra que Mbp1 se asocia a los promotores de todos los genes analizados tanto en una cepa silvestre como en el mutante *swi4* (Figura 5.9A). También se observa una unión muy potente de Mbp1 al promotor del gen *RNR1*, lo cual no resulta extraño puesto que es un gen cuya regulación depende principalmente de MBF. El hecho de que Mbp1 sea capaz de asociarse a los promotores de genes de G1/S en un mutante *swi4*, podría indicar que la unión de Whi7 a promotores en ausencia de Swi4 tenga lugar a través de su interacción con MBF. En este sentido, resulta llamativo que la asociación más importante de Mbp1 tenga lugar al promotor del gen *FKS1*, gen al que la unión de Whi7 es más fuerte en ausencia de Swi4 (Figura 5.6A).

A continuación, se investigó si Whi7 es capaz de interactuar físicamente *in vivo* con Mbp1 en ausencia de Swi4. Para ello, se realizaron experimentos de co-IP en células mutantes *swi4*, en los que no se detectó que Mbp1 co-purificara con la fracción de Whi7 inmunoprecipitada (Figura 5.9B). A la vista de este resultado, no es posible afirmar que exista una interacción física entre Whi7 y Mbp1 *in vivo*. Además, para comprobar si Whi7 es capaz de

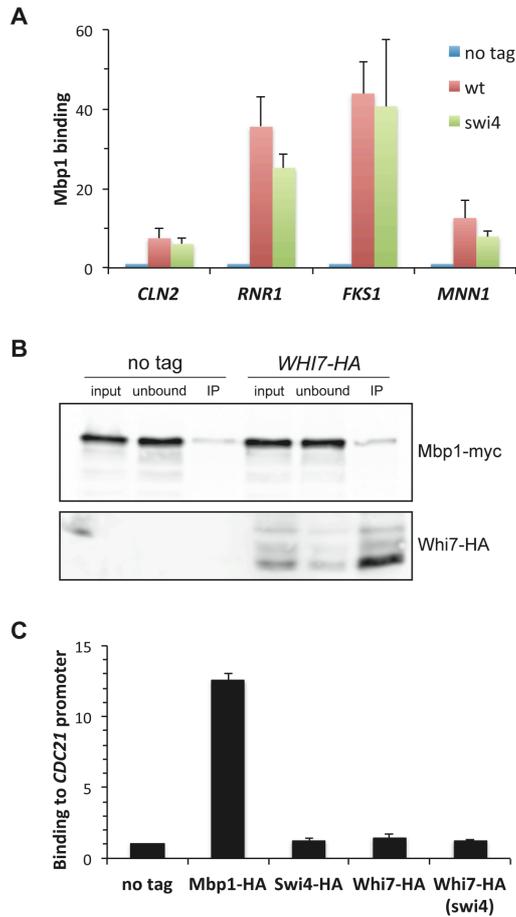


Figura 5.9. Análisis de la interacción entre *Whi7* y MBF. (A) Se estudió mediante ensayos de CHIP la unión de Mbp1-HA a los promotores de los genes indicados en presencia (JCY2084) o ausencia de Swi4 (JCY2100). Como control se usó la cepa silvestre W303 (no tag). (B) Se analizó mediante ensayos de co-IP la interacción física entre *Whi7* y Mbp1 en células mutantes *swi4* (JCY2187) que expresan de forma endógena las proteínas Mbp1 etiquetada con myc y *Whi7* etiquetada con HA. La cepa *swi4 MBP1-myc* (JCY2181) se usó como control (no tag). *Whi7* se inmunoprecipitó a partir de extractos crudos y la presencia de *Whi7*-HA y Mbp1-myc en los extractos totales (input) y en las fracciones no retenida (unbound) e inmunoprecipitadas (IP) se determinó mediante Western blot. (C) Se estudió mediante ensayos de CHIP la unión al promotor del gen *CDC21* de Mbp1-HA en la cepa silvestre JCY2084, Swi4-HA en la cepa silvestre JCY1956 y *Whi7*-HA en la cepa silvestre W303 y en la cepa mutante *swi4* (JCY0167) transformadas con el plásmido pWHI7, que expresa *Whi7* etiquetada con HA. Como control se usó la cepa silvestre W303 (no tag). Los valores en A y en C representan la media y la desviación estándar derivadas al menos de tres experimentos.

asociarse a promotores a través de MBF, se analizó mediante experimentos de ChIP la unión de *Whi7* al promotor del gen *CDC21*, que codifica para una timidilato sintasa necesaria para la biosíntesis *de novo* de desoxirribonucleótidos de pirimidina y cuya regulación depende exclusivamente del factor transcripcional MBF (Takahata et al., 2009). Paralelamente a la asociación de *Whi7* al promotor de *CDC21*, se analizó también la unión de *Mbp1* y *Swi4*. Como cabe esperar, *Mbp1* se une al promotor del gen *CDC21*, mientras que *Swi4* no. En el caso de *Whi7* tampoco se observa unión al promotor de este gen (Figura 5.9C). Para comprobar que la incapacidad de *Whi7* para asociarse el promotor de *CDC21* no se deba a que se encuentre interaccionando con SBF, se realizó este mismo ensayo en un mutante *swi4*. El análisis de los datos muestra que *Whi7* tampoco se asocia al promotor de *CDC21* en ausencia de *Swi4* (Figura 5.9C). Estos resultados en conjunto sugieren que *Whi7* no sería capaz de asociarse a promotores a través de MBF. Sin embargo, no es posible descartar que la interacción entre *Whi7* y MBF sea tan débil que impida su detección mediante ensayos de co-inmunoprecipitación o detectar la unión de *Whi7* al promotor de *CDC21* (la unión de *Mbp1* al promotor de este gen es aproximadamente 1/3 de la observada al promotor de *FKS1*).

En resumen, la unión de *Whi5* a promotores de genes de *Start* se produce a través del factor transcripcional SBF íntegro, mientras que *Whi7* se asocia a estos promotores principalmente a través de SBF, aunque en ausencia de *Swi6* también es capaz de unirse a promotores a través de *Swi4*.

Localización diferencial de *Whi7* y *Whi5*

La regulación espacial es un mecanismo que permite regular la función de muchas proteínas, puesto que se restringe su actuación a un compartimento celular concreto. De hecho, el control de la localización subcelular de muchos reguladores de ciclo comprende su transporte entre el núcleo y el citoplasma en momentos específicos del ciclo celular.

La localización del represor transcripcional *Whi5* está regulada a lo largo del ciclo celular, encontrándose en el núcleo de las células desde la salida de mitosis y durante la fase G1, hasta la activación de *Start* (Costanzo et al., 2004). Nuestros resultados demuestran que *Whi7* actúa como represor del programa transcripcional de *Start*, por lo que se hace necesario investigar su

localización subcelular. Mediante microscopía de fluorescencia *in vivo*, se analizó la localización de *Whi7* en paralelo a la de *Whi5* en células silvestres. Para el estudio se emplearon las construcciones pADH1:WHI7-GFP y pADH1:WHI5-GFP, en las que ambos represores transcripcionales se encuentran fusionados con la proteína GFP y se expresan de forma constitutiva debido al promotor *ADH1*. El análisis de cultivos asincrónicos por microscopía revela que, al igual que *Whi5*, la localización de *Whi7* está regulada a lo largo del ciclo celular: *Whi7*, como *Whi5*, se localiza en el núcleo de células en fase G1 (sin yema) y telofase (yema grande y dos núcleos) (Figura 5.10A). Para analizar con más detalle la regulación subcelular de *Whi7* a lo largo del ciclo celular, se realizó este mismo ensayo tras la liberación de cultivos sincronizados con factor α . El análisis microscópico muestra que *Whi7* se encuentra en el núcleo de células en fase G1 (0-30 minutos), desaparece del mismo tras la activación de *Start*, coincidiendo con la gemación, hasta el final del ciclo y solo vuelve a localizarse en el núcleo de células en telofase (150 minutos) (Figura 5.10B). Estos resultados demuestran que la localización de *Whi7* está regulada a lo largo del ciclo celular y que presenta la misma cinética de localización que su parálogo funcional *Whi5*. No obstante, es importante resaltar que mientras que *Whi5* es totalmente nuclear en G1 y telofase, *Whi7* nunca llega a ser completamente nuclear en estas fases del ciclo, sino que se distribuye entre el núcleo y el citosol de la célula.

Como se ha descrito, *Whi7* es una proteína muy inestable cuya degradación depende principalmente de la ubiquitina ligasa SCF^{Grr1} (Figura 3.6). Por esto, nos preguntamos si la desaparición de *Whi7* de los núcleos de células en determinadas fases del ciclo podría deberse a una degradación selectiva de la proteína. Con la intención de esclarecer este hecho, se estudió mediante microscopía de fluorescencia *in vivo* la localización subcelular de *Whi7* en células mutantes *grr1*. Como cabía esperar, el análisis de las imágenes por microscopía muestra que el aumento en la estabilidad de *Whi7* que se produce en un mutante *grr1*, da lugar a un aumento en la señal de GFP (Figura 5.11) con respecto a la señal que se detecta en células procedentes del cultivo de una cepa silvestre (Figura 5.10A). No obstante, la ausencia de *Grr1* en la célula no altera la localización subcelular de *Whi7*, ya que ésta se detecta únicamente en el núcleo de células en fase G1 y en telofase (Figura 5.11). Este resultado indica que la ausencia de *Whi7* en los núcleos de células en

5. Comparación entre *Whi7* y *Whi5*

determinadas fases del ciclo celular se debe a un mecanismo activo de exportación de la proteína.

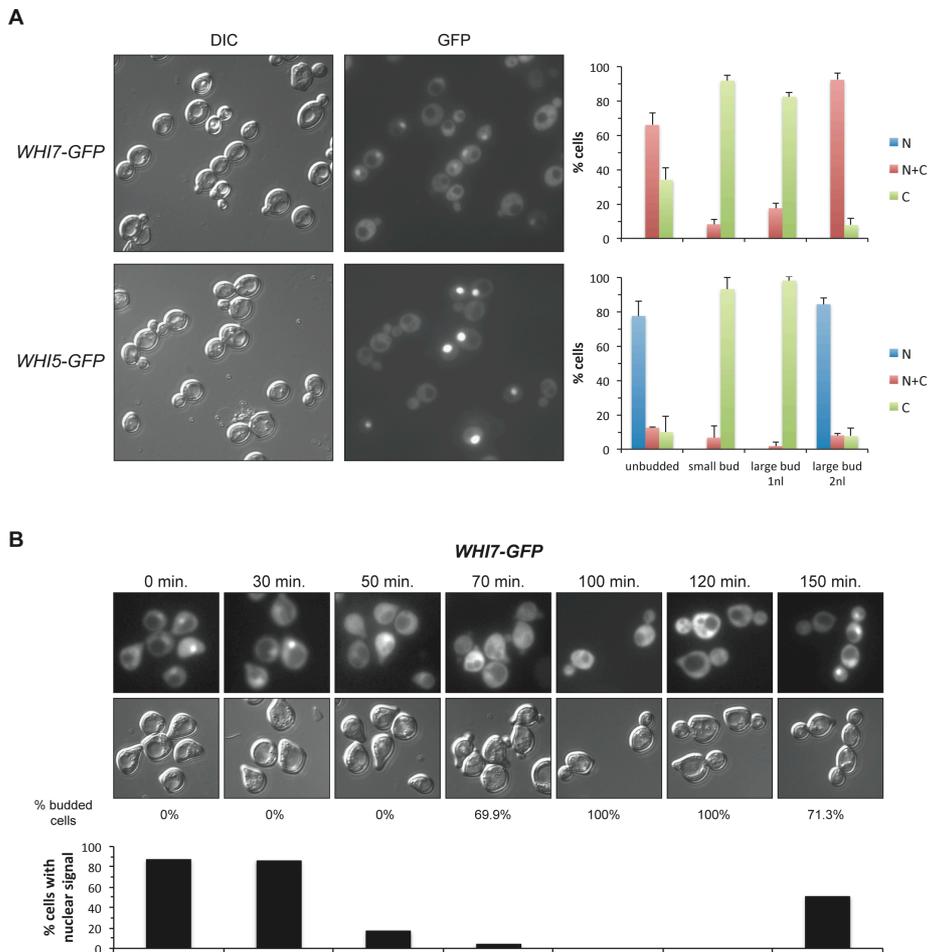


Figura 5.10. Análisis de la localización subcelular de *Whi7* y *Whi5* a lo largo del ciclo celular. (A) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa silvestre W303 transformadas con el plásmido pADH1:WHI7-GFP o pADH1:WHI5-GFP se observaron en el microscopio de fluorescencia. Se muestran las imágenes de DIC y la señal de GFP. Las gráficas representan la localización de las proteínas *Whi7* y *Whi5* en las diferentes fases del ciclo celular (N: señal fluorescente nuclear; N + C: señal fluorescente en núcleo y citoplasma; C: señal fluorescente citoplasmática). Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas al menos de tres experimentos. (B) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa silvestre W303 transformadas con el plásmido pADH1:WHI7-GFP se incubaron con factor α 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Después de 3 horas, las células se lavaron, se transfirieron a medio de selección fresco y se observaron en el microscopio de fluorescencia a los tiempos indicados. Se muestran las imágenes de DIC y la señal de GFP. La gráfica indica el porcentaje de células con señal nuclear de *Whi7*.

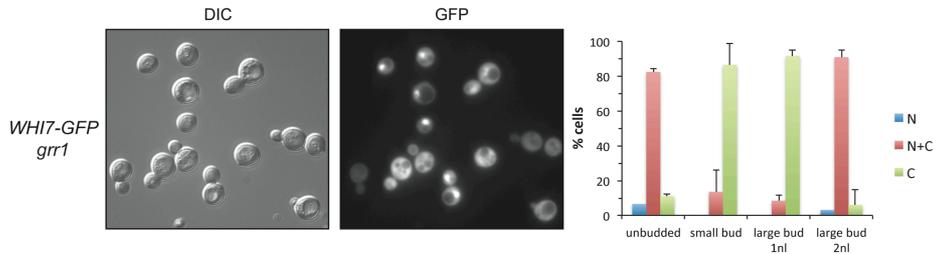


Figura 5.11. Análisis de la localización subcelular de *Whi7* en un mutante *grr1*. Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *grr1* (JCY1539) transformadas con el plásmido pADH1:WHI7-GFP se observaron en el microscopio de fluorescencia. Se muestran las imágenes de DIC y la señal de GFP. Las gráficas representan la localización de la proteína *Whi7* en las diferentes fases del ciclo celular como se describe en la Figura 5.10A.

Whi7 es una proteína con un alto grado de fosforilación y su fosforilación por la CDK *Cdc28* es importante para el control de su estabilidad (Figura 3.8). En el caso de *Whi5*, la fosforilación de residuos específicos por *Cdc28* regula su localización, ya que mutantes no fosforilables en dichos residuos son nucleares en todas las fases del ciclo celular (Costanzo et al., 2004; Taberner et al., 2009; Wagner et al., 2009). Por este motivo, se investigó el papel de las fosforilaciones por *Cdc28* en la localización subcelular de *Whi7*. Mediante microscopía de fluorescencia *in vivo* se analizó la localización de las versiones de *Whi7* silvestre y de *Whi7* con todos los sitios consenso de fosforilación por *Cdc28* mutados a Ala (*Whi7*-NP). El estudio realizado muestra que la versión no fosforilable por *Cdc28* de *Whi7* es nuclear en todas las fases del ciclo celular, mientras que *Whi7* silvestre solo presenta señal nuclear en células en fase G1 y en telofase (Figura 5.12). Esto indica que las fosforilaciones por *Cdc28* de *Whi7* controlan, no solo su estabilidad, sino también su localización subcelular, puesto que la fosforilación de la proteína por *Cdc28* es necesaria para su exportación, tal y como ocurre con *Whi5*.

La exportación nuclear de *Whi5* depende de la carioferina *Msn5*. Además, se identificó un fragmento de *Whi5*, comprendido entre los aminoácidos 51 y 167, que actúa como NES mediando su exportación de manera dependiente de fosforilación en residuos específicos de Ser (Taberner et al., 2009). Por ello, se estudió mediante microscopía de fluorescencia *in vivo* la localización subcelular de *Whi7* en el mutante *msn5*. Contrariamente

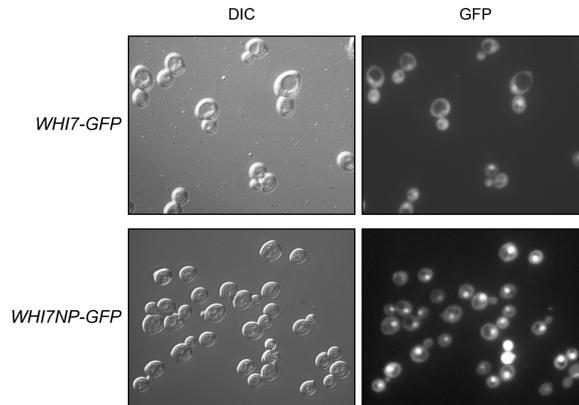


Figura 5.12. Papel de la fosforilación por Cdc28 en la localización subcelular de *Whi7*. Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa silvestre W303 transformadas con los plásmidos pADH1:WHI7-GFP y pADH1:WHI7NP-GFP se observaron en el microscopio de fluorescencia. Se muestran las imágenes de DIC y la señal de GFP.

a lo que ocurre con *Whi5*, el análisis de la localización de *Whi7* en cultivos asincrónicos del mutante *msn5* no revela cambios significativos en su localización (Figura 5.13A). Un análisis más completo de la localización de *Whi7* tras la liberación de cultivos del mutante *msn5* sincronizados con factor α , muestra que *Whi7* presenta la misma localización en ausencia de *Msn5* que en células silvestres, se encuentra en el núcleo de células en fase G1 (0-30 minutos), desaparece del mismo en *Start* hasta el final del ciclo y vuelve a localizarse en el núcleo de células en telofase (150 minutos) (Figura 5.13B). Estos resultados indican que *Whi7* no es exportada por *Msn5*, como sí que ocurre en el caso de *Whi5*. Además, para averiguar si el fragmento de *Whi7* homólogo a la región NES de *Whi5* (51-167) puede ser reconocido como una NES (Figura 1.5), se investigó la localización subcelular de *Whi7*⁷⁰⁻¹¹⁰ mediante microscopía de fluorescencia *in vivo*. Para ello se fusionó *Whi7*⁷⁰⁻¹¹⁰ a una proteína de localización nuclear constitutiva, NLSSV40-GFP. El análisis de las imágenes obtenidas por microscopía muestra que, a diferencia de lo que ocurre con *Whi5*⁵¹⁻¹⁶⁷, *Whi7*⁷⁰⁻¹¹⁰ no es capaz de salir del núcleo (Figura 5.13C). Este dato indica que el fragmento de *Whi7* comprendido entre los aminoácidos 70 a 110 no tiene capacidad para ser reconocido como una NES, como sí que ocurre con la región homóloga a ésta en *Whi5*. Todos

estos resultados en conjunto sugieren que en la exportación de *Whi7* no parece intervenir la carioferina *Msn5*.

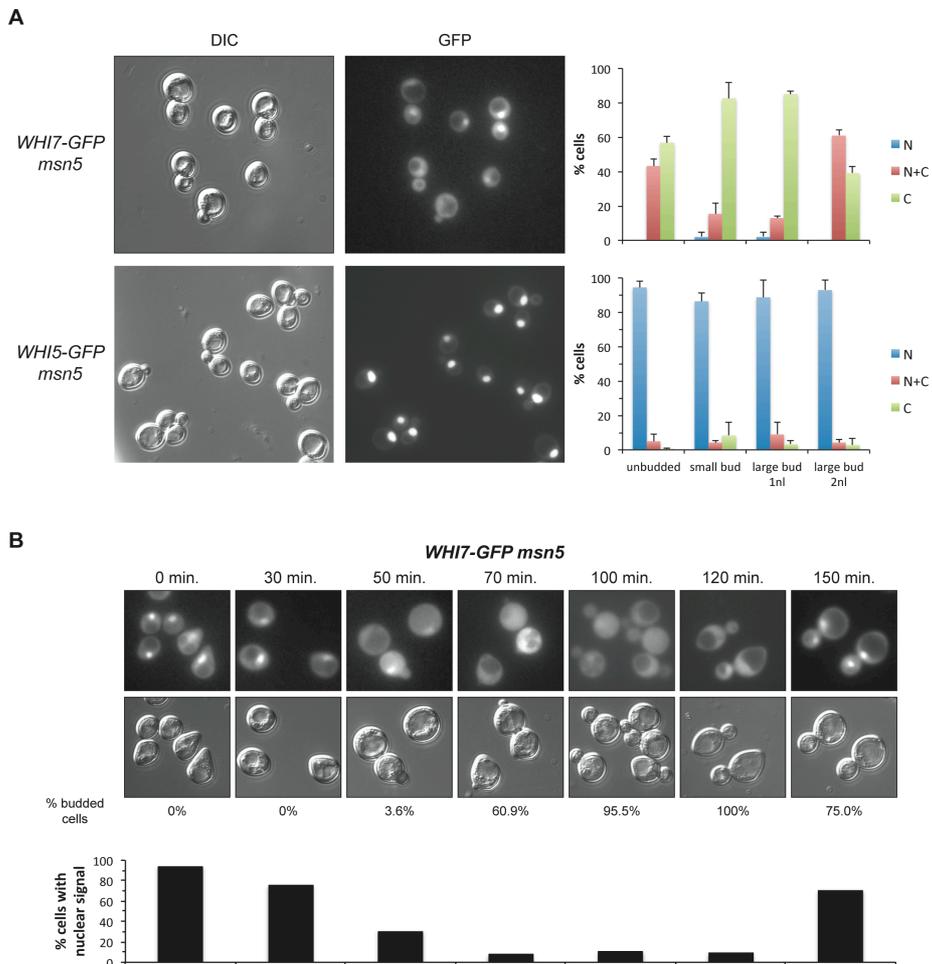


Figura 5.13. Análisis de la exportación de *Whi7*. (A) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *msn5* (JCY1018) transformadas con el plásmido pADH1:WHI7-GFP o pADH1:WHI5-GFP se observaron en el microscopio de fluorescencia. Se muestran las imágenes de DIC y la señal de GFP. Las gráficas representan la localización de las proteínas *Whi7* y *Whi5* en las diferentes fases del ciclo celular como se describe en la Figura 5.10A. (B) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *msn5* (JCY1018) transformadas con el plásmido pADH1:WHI7-GFP se incubaron con factor α 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Después de 3 horas, las células se lavaron, se transfirieron a medio de selección fresco y se observaron en el microscopio de fluorescencia a los tiempos indicados. Se muestran las imágenes de DIC y la señal de GFP. La gráfica indica el porcentaje de células con señal nuclear de *Whi7*.

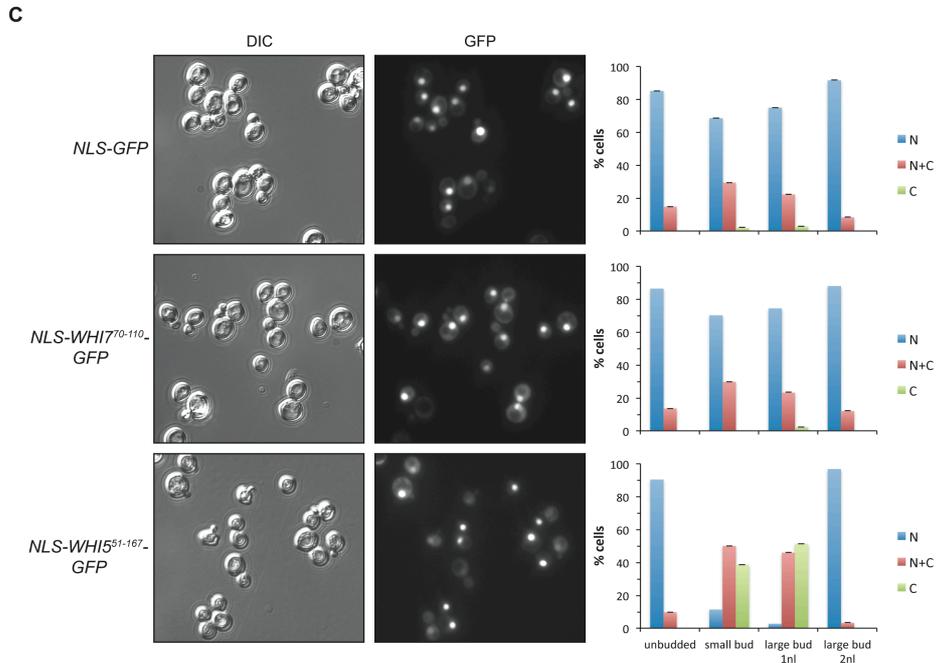


Figura 5.13 (continuación). (C) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa silvestre W303 transformadas con el plásmido pADH1:NLS-WHI7⁷⁰⁻¹¹⁰-GFP, pADH1:NLS-WHI5⁵¹⁻¹⁶⁷-GFP o pADH1:NLS-GFP (como control) se observaron en el microscopio de fluorescencia. Se muestran las imágenes de DIC y la señal de GFP. Las gráficas representan la localización de las proteínas truncadas *Whi7* y *Whi5* en las diferentes fases del ciclo celular como se describe en la Figura 5.10A.

Como *Whi5*, *Whi7* es capaz de entrar al núcleo de células en fase G1 y en telofase. En lo que se refiere a *Whi5*, se ha descrito que posee dos NLS clásicas y redundantes entre sí, responsables de su importación a través de la carioferina β Kap95 mediante la vía clásica de importación (Taberner et al., 2009). Sin embargo, el análisis de la secuencia de *Whi7* indica que no existen NLS clásicas y que la región de *Whi5* en la que se encuentran sus dos NLS clásicas está ausente en *Whi7* (Figura 1.5). Por ello, nos preguntamos si la importación de *Whi7* podría producirse en compañía de otra proteína, como aquellas que forman parte de la maquinaria transcripcional de *Start*. *Swi6* resulta una buena proteína candidata, puesto que su cinética de localización es similar a la de *Whi7*. *Swi6* se detecta en el núcleo de las células desde el final de mitosis hasta las fases S-G2 (Geymonat et al., 2004; Sidorova et al., 1995). Mediante microscopía de fluorescencia *in vivo* se estudió la localización

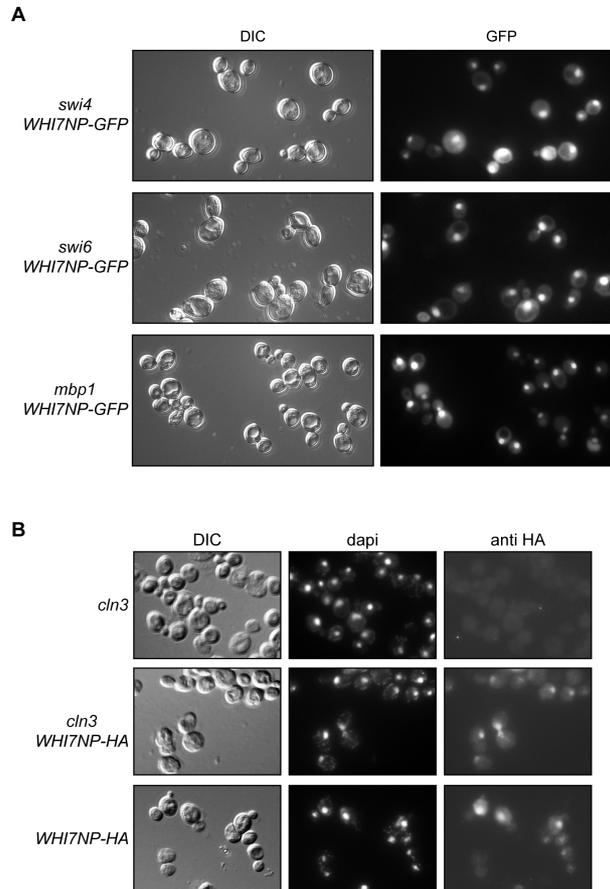


Figura 5.14. Análisis de la importación de *Whi7*. (A) Células en fase de crecimiento exponencial de las cepas mutantes *swi6* (JCY0221), *swi4* (JCY0167) y *mbp1* (JCY2194) transformadas con el plásmido pADH1:WHI7NP-GFP se observaron en el microscopio de fluorescencia. Se muestran las imágenes de DIC y la señal de GFP. (B) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *cln3* (MT244) y de la cepa silvestre W303 transformadas con el plásmido centromérico pWHI7NP, en el que *Whi7* está etiquetada con HA, o con un vector control, se fijaron y se analizaron por inmunofluorescencia indirecta. Se muestran las imágenes de DIC, la tinción del DNA con DAPI y la señal correspondiente a *Whi7NP-HA* (anti HA).

subcelular de *Whi7* en la cepa mutante *swi6*. El análisis microscópico muestra que la localización de *Whi7-NP* no se ve alterada con respecto a la de una cepa silvestre en ausencia de *Swi6* (Figura 5.14A). Esto indica que la entrada de *Whi7* al núcleo no se produce en compañía de la proteína *Swi6*. Además, nos preguntamos si *Whi7* podría entrar al núcleo acompañado de *Swi4*, *Mbp1* o *Cln3*, otras de las proteínas más relevantes implicadas en la transición de *Start*. Por ello, se analizó la localización subcelular de *Whi7* en células

5. Comparación entre *Whi7* y *Whi5*

mutantes *swi4*, *mbp1* y *cln3*. Los resultados obtenidos no revelan cambio alguno en la localización de *Whi7*-NP en ausencia de cualquiera de estas proteínas (Figura 5.14A, B). Este resultado señala que la importación de *Whi7* tampoco se produce en compañía de las proteínas *Swi4*, *Mbp1* o *Cln3*.

6. Conexión de Whi7 con la ruta PKC

La ruta de la proteína quinasa C (PKC) o la ruta de integridad de la pared celular es la ruta principal encargada de responder a los cambios que se producen en la pared celular, así como de coordinar dichos cambios con el ciclo celular. Esta ruta se induce en respuesta a una gran variedad de estreses que afectan a la superficie celular, como por ejemplo el estrés térmico, el estrés osmótico o agentes químicos, como el Congo Red, que afectan a distintos componentes de la pared celular (Levin, 2005, 2011). Además, se ha establecido una nueva relación entre Pkc1 y el mantenimiento de la integridad genómica en respuesta a estreses genotóxicos, ya que Pkc1 es necesaria para la correcta activación del *checkpoint* de daño en el DNA. Así mismo, la expresión de la isoforma PKC δ de mamíferos es capaz de activar el *checkpoint* de integridad del DNA en células de levadura (Soriano-Carot et al., 2014).

La ruta PKC controla los niveles celulares de Whi7, pero no los de Whi5

El análisis global de la expresión diferencial de todos los genes de la levadura *S. cerevisiae* en una cepa mutante *pkc1* muestra una disminución en los niveles de expresión del gen *WHI7* (Martínez-Bono, B., 2005). Con la intención de identificar una posible correlación entre la disminución en los niveles de expresión génica de *WHI7* en un mutante *pkc1* y los niveles de proteína Whi7, se analizó mediante Western blot la proteína Whi7 en el mutante termosensible *pkc1* (Figura 6.1A). En primer lugar, es necesario señalar que en la cepa silvestre a 37°C se produce una inducción en los niveles de Whi7. Esa inducción es dependiente de Pkc1, puesto que al inactivar Pkc1 a temperatura restrictiva no se observa ese aumento en los niveles de proteína Whi7, la cual, además, se acumula en su estado hipofosforilado. En paralelo, se analizaron también los niveles de mRNA de *WHI7* (Figura 6.1B). Del mismo modo que ocurre con los niveles de proteína, a 37°C se aprecia un aumento en

los niveles de mRNA del gen *WHI7* en la cepa silvestre. Sin embargo, este incremento no se observa cuando *Pkc1* es inactiva.

Como se ha descrito, *Whi7* es una proteína muy inestable. Con el fin de estudiar si la estabilidad de la proteína *Whi7* podría verse alterada en ausencia de *Pkc1* en la célula, se investigó la estabilidad de la proteína en el mutante termosensible *pkc1*. Para ello se realizaron ensayos de apagado traduccional y se analizó la proteína *Whi7* mediante Western blot. Los resultados muestran que cuando *Pkc1* es inactiva la proteína *Whi7* es estable (Figura 6.1C). Todos estos datos indican que la proteína quinasa *Pkc1* controla los niveles celulares del represor transcripcional *Whi7* mediante dos mecanismos con resultados opuestos: por una parte, induce su expresión y por otra, favorece su degradación.

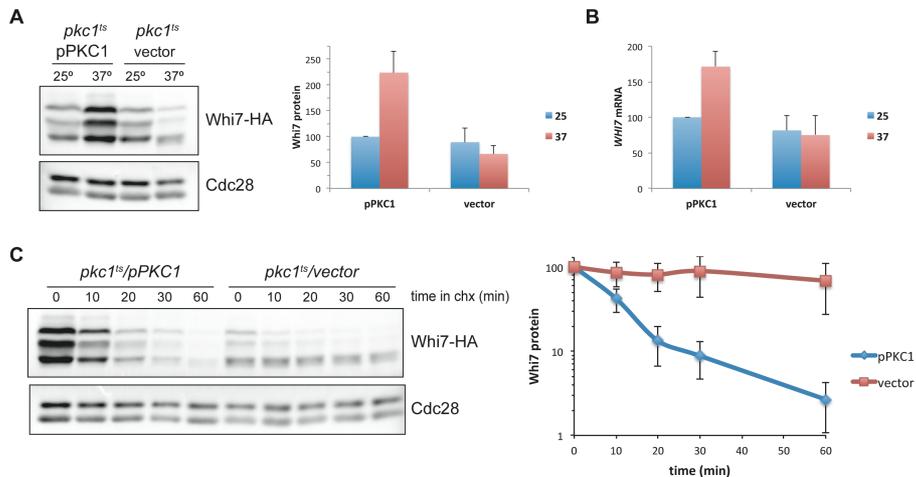


Figura 6.1. Análisis de los niveles celulares de *Whi7* en una cepa mutante *pkc1*. Células de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3A) que expresan la proteína *Whi7* etiquetada con HA (JCY1730), transformadas con el plásmido pPKC1 o un vector control, se transfirieron a 37°C durante 3 horas. (A) Los niveles de proteína *Whi7* se analizaron mediante Western blot. *Cdc28* se muestra como control de carga. La gráfica representa la cantidad relativa de la proteína *Whi7* en relación con *Cdc28*. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas de seis experimentos. (B) Los niveles de mRNA de *WHI7* relativos a los niveles de mRNA de *ACT1* (como control) se analizaron mediante RT-qPCR. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas de tres experimentos. (C) Tras incubación 3 horas a 37°C se añadió cicloheximida 100 µg/mL. Los niveles de proteína *Whi7* se analizaron mediante Western blot a los tiempos indicados tras la adición de cicloheximida. *Cdc28* se muestra como control de carga. La gráfica representa la cantidad relativa de la proteína *Whi7* en relación con *Cdc28*. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas de tres experimentos.

Para analizar si el control de los niveles celulares por Pkc1 también se extiende a Whi5, se estudiaron, en primer lugar, los niveles de proteína Whi5 en el mutante *pkc1* termosensible (Figura 6.2A). A diferencia de lo que ocurre con Whi7, a 37°C en células silvestres los niveles de Whi5 disminuyen a la mitad de su valor. Esto podría deberse a la ligera disminución en la estabilidad de la proteína observada en estas mismas condiciones (Figura 5.4C). Este mismo resultado en los niveles de Whi5 se observa tras la inactivación de Pkc1 a temperatura restrictiva, no encontrándose diferencias con respecto a una cepa silvestre. Así mismo, se analizaron también los niveles de mRNA de *WHI5* cuando Pkc1 es inactiva (Figura 6.2B). Contrariamente a lo que ocurre con los niveles de proteína, a 37°C los niveles de mRNA del gen *WHI5* en la cepa silvestre no se muestran afectados. Por otra parte, los niveles de mRNA de *WHI5* en el mutante *pkc1* aumentan aproximadamente 2 veces. Este incremento podría deberse a un efecto indirecto, ya que en un mutante *pkc1* termosensible las células tienden a acumularse en fase S, momento del ciclo celular en el que el gen *WHI5* presenta su máximo de expresión (Pramila et al., 2006). En conjunto, estos resultados sugieren, que a diferencia de lo observado para el represor transcripcional Whi7, Pkc1 no regula los niveles celulares de su parálogo funcional Whi5.

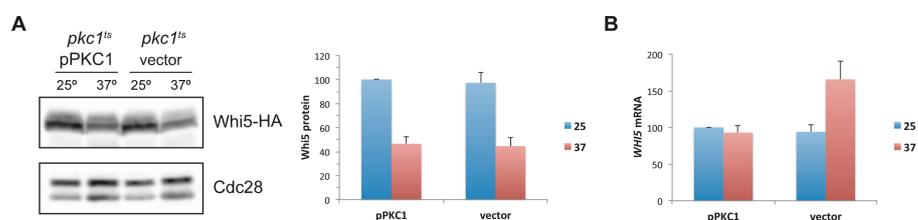
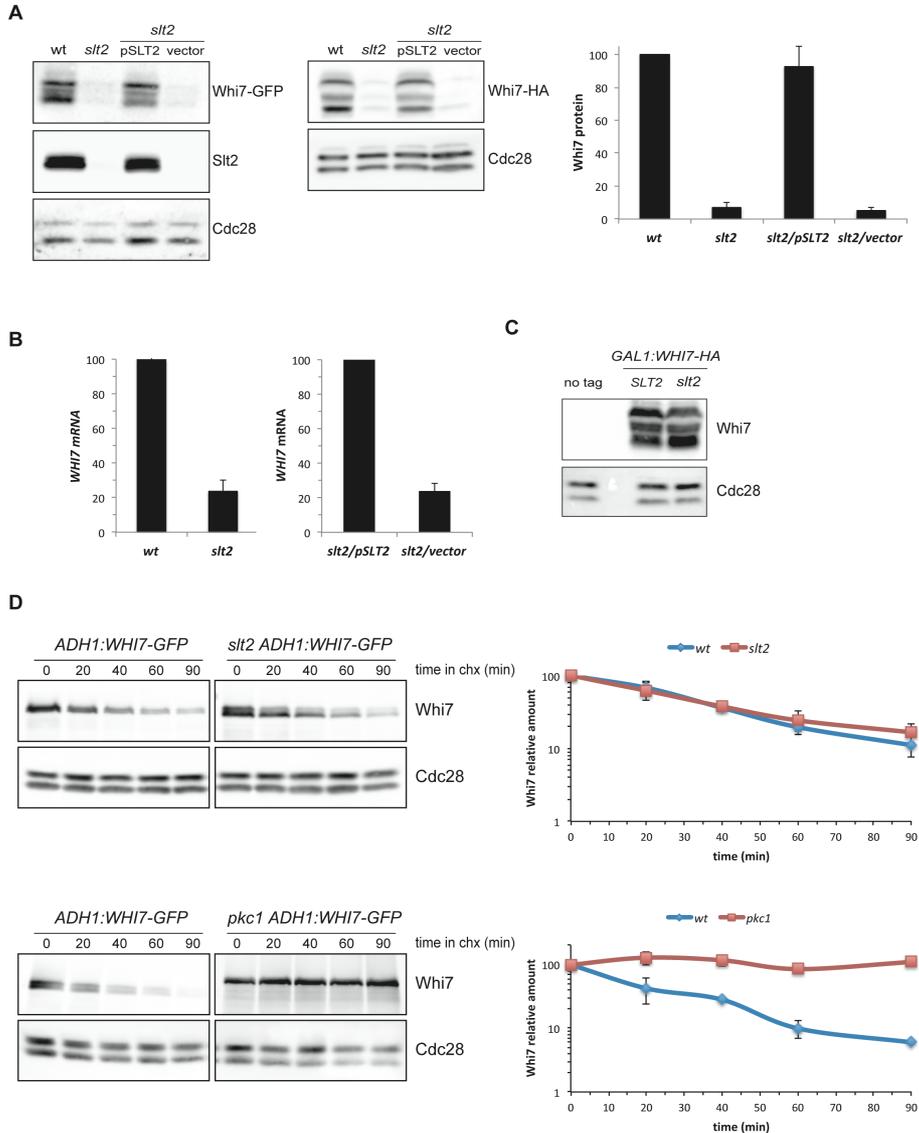


Figura 6.2. Análisis de los niveles celulares de Whi5 en una cepa mutante *pkc1*. Células de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3A) que expresan la proteína Whi5 etiquetada con HA (JCY2164), transformadas con el plásmido pPKC1 o un vector control, se transfirieron a 37°C durante 3 horas. (A) Los niveles de proteína Whi5 se analizaron mediante Western blot. Cdc28 se muestra como control de carga. La gráfica representa la cantidad relativa de la proteína Whi5 en relación con Cdc28. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas de cuatro experimentos. (B) Los niveles de mRNA de *WHI5* relativos a los niveles de mRNA de *ACT1* (como control) se analizaron mediante RT-qPCR. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas de cuatro experimentos.

Pkc1 es la quinasa encargada de activar la cascada MAP quinasa de la ruta PKC y en última instancia a la MAP quinasa Slt2. Se ha descrito previamente que la expresión del gen *WHI7* se induce por estrés de pared celular y que dicha inducción está mediada por Slt2 (Belén Sanz et al., 2012). Con el objetivo de investigar si el papel de Slt2 en la regulación de la expresión de *Whi7* puede ser más general se investigaron los niveles de expresión de *Whi7* y la estabilidad de la proteína en un mutante *slt2* en condiciones basales, sin inducción de estrés de pared celular. El análisis de la proteína mediante Western blot revela que los niveles de *Whi7* en la célula están severamente reducidos en ausencia de la MAPK de la ruta PKC (Figura 6.3A). Además, los niveles de mRNA de *WHI7* también disminuyen drásticamente en ausencia de Slt2 (Figura 6.3B). Este resultado sugiere que Slt2 regula los niveles de *Whi7* en la célula controlando la transcripción del gen. De hecho, la expresión ectópica de *WHI7* en el mutante *slt2* permite recuperar los niveles de *Whi7* de una cepa silvestre (Figura 6.3C), confirmando que la MAPK Slt2 controla la expresión de este represor a nivel transcripcional.

Puesto que la cantidad de *Whi7* presente en la célula en ausencia de Slt2 es muy reducida, la estabilidad de la proteína en el mutante *slt2* se estudió mediante su expresión de forma ectópica. En paralelo también se realizó este mismo ensayo en un mutante *pkc1* termosensible. El análisis de la proteína muestra que, como cabía esperar, *Whi7* es estable en un mutante *pkc1*. Por el contrario, la degradación de *Whi7* en un mutante *slt2* no se ve alterada con respecto a la de una cepa silvestre (Figura 6.3D). Este resultado indica que Slt2, a diferencia de Pkc1, no controla la degradación de *Whi7*.

Figura 6.3. Análisis de los niveles celulares de Whi7 en una cepa mutante *slt2*. Células de las cepas silvestres (JCY1746 y JCY1728) y de las cepas mutantes *slt2* (JCY2039 y JCY2042) que expresan la proteína *Whi7* etiquetada con GFP o HA respectivamente, transformadas con el plásmido pSLT2 o un vector control cuando se indica, se crecieron hasta fase exponencial. (A) Los niveles de proteína *Whi7* se analizaron mediante Western blot. Se muestran las proteínas Slt2, como control de la mutación, y Cdc28, como control de carga. La gráfica representa la cantidad relativa de la proteína *Whi7* en relación con Cdc28. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas de tres experimentos. (B) Los niveles de mRNA de *WHI7* relativos a los niveles de mRNA de *ACT1* (como control) se analizaron mediante RT-qPCR. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas al menos de tres experimentos. (C) Células de la cepa silvestre (JCY1976) y de la cepa mutante



slt2 (JCY2138) transformadas con el plásmido pGAL1:WHI7-HA, se crecieron en medio de selección con rafinosa hasta fase exponencial. Después se añadió galactosa al medio para inducir la sobreexpresión de *WHI7* y los niveles de proteína Whi7 se analizaron mediante Western blot. Cdc28 se muestra como control de carga. Como control se usó la cepa W303 (no tag). (D) Células de la cepa silvestre W303, de la cepa mutante *slt2* (JCY2041) y de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3A) transformadas con el plásmido pADH1:WHI7-GFP se transfirieron a 37°C durante 3 horas y después se incubaron en presencia de cicloheximida 100 µg/mL. Los niveles de proteína Whi7 se analizaron mediante Western blot a los tiempos indicados tras la adición de cicloheximida. Cdc28 se muestra como control de carga. La gráfica representa la cantidad relativa de la proteína Whi7 en relación con Cdc28. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas de dos experimentos.

Del mismo modo que en el caso de la regulación por Pkc1, se extendió el estudio del control de los niveles celulares por Slt2 a la proteína *Whi5*. Para ello se analizaron tanto los niveles de proteína *Whi5* como los niveles de mRNA de *WHI5* en el mutante *slt2*. Contrariamente a lo que ocurre con *Whi7*, ni los niveles de proteína ni los niveles de mRNA de *Whi5* se ven alterados en ausencia de Slt2 (Figura 6.4A, B). Estas observaciones indican que, a diferencia de lo observado para *Whi7*, el control de los niveles celulares de *Whi5* es totalmente independiente de la MAP quinasa Slt2.

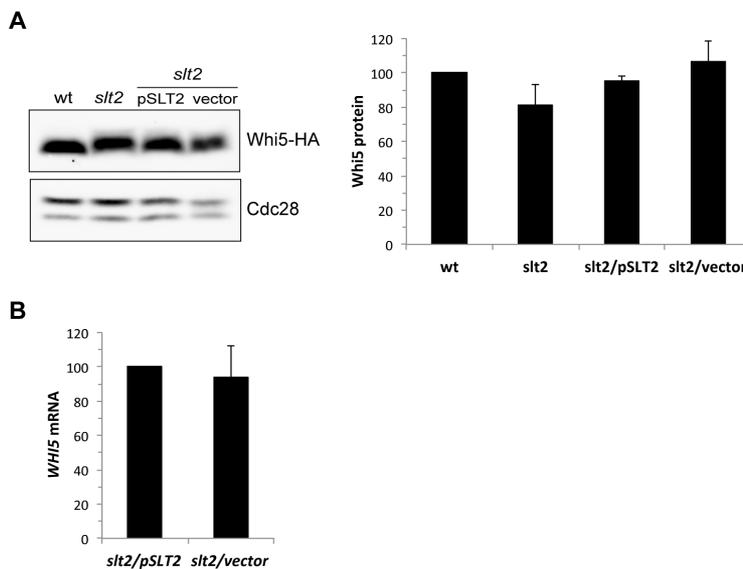


Figura 6.4. Análisis de los niveles celulares de *Whi5* en una cepa mutante *slt2*. Células de la cepa silvestre (JCY1346) y de la cepa mutante *slt2* (JCY2140) que expresan la proteína *Whi5* etiquetada con HA, transformadas con el plásmido pSLT2 o un vector control cuando se indica, se crecieron hasta fase exponencial. (A) Los niveles de proteína *Whi5* se analizaron mediante Western blot. *Cdc28* se muestra como control de carga. La gráfica representa la cantidad relativa de la proteína *Whi5* en relación con *Cdc28*. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas de cuatro experimentos. (B) Los niveles de mRNA de *WHI5* relativos a los niveles de mRNA de *ACT1* (como control) se analizaron mediante RT-qPCR. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas de tres experimentos.

Rlm1 es el principal factor transcripcional de la ruta PKC (Jung and Levin, 1999; Terashima et al., 2000), encargado de regular la expresión de muchos genes de biosíntesis de pared celular (García et al., 2004). Para

completar el análisis sobre la regulación de los niveles celulares de *Whi7* por la ruta PKC, se investigó el efecto sobre los mismos en un mutante *rlm1*. Los resultados son muy similares a los obtenidos en el caso del mutante *slt2*: tanto los niveles de proteína (Figura 6.5A) como los niveles de mRNA (Figura 6.5B) de *Whi7* quedan drásticamente reducidos en ausencia de *Rlm1*. Por el contrario, tal y como cabía esperar, la expresión de *WHI5* no se muestra afectada. Estos resultados indican que la MAP quinasa *Slr2* controla los niveles celulares de *Whi7* a través del factor transcripcional *Rlm1*.

En resumen, la ruta PKC es la encargada de controlar los niveles celulares del represor transcripcional de *Start* *Whi7*, pero no los de su parálogo funcional *Whi5*. Concretamente, la ruta regula positivamente la expresión de *Whi7* a través de la MAP quinasa *Slr2* y el factor transcripcional *Rlm1*, mientras que su degradación es dependiente de la quinasa *Pkc1*.

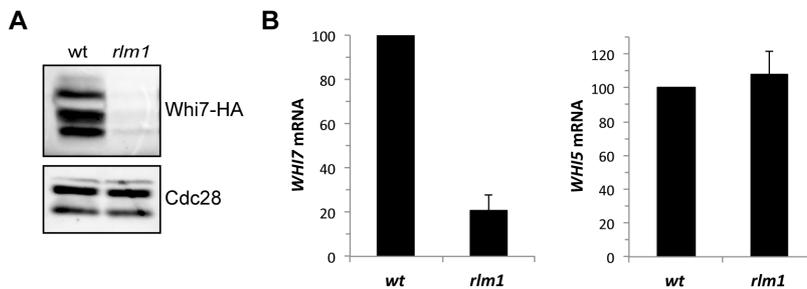


Figura 6.5. Análisis de los niveles celulares de *Whi7* y *Whi5* en una cepa mutante *rlm1*. Células de la cepa silvestre (JCY1728) y de la cepa mutante *rlm1* (JCY2166) que expresan la proteína *Whi7* etiquetada con HA se crecieron hasta fase exponencial. (A) Los niveles de proteína *Whi7* se analizaron mediante Western blot. *Cdc28* se muestra como control de carga. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas de dos experimentos. (B) Los niveles de mRNA de *WHI7* y *WHI5* relativos a los niveles de mRNA de *ACT1* (como control) se analizaron mediante RT-qPCR. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas de dos experimentos.

Efecto de elevadas temperaturas en la regulación y función celulares de *Whi7* y *Whi5*

En presencia de cualquier tipo de estrés de pared celular la ruta PKC se encuentra hiperactiva. Puesto que esta ruta regula los niveles celulares de *Whi7*, pero no los de *Whi5*, distintos tipos de estrés que afecten a la pared

celular de la levadura podrían revelar alguna diferenciación funcional entre ambos represores transcripcionales de *Start*.

El estrés producido como consecuencia de elevadas temperaturas induce la activación de la ruta PKC (Kamada et al., 1995; Zarzov et al., 1996). En concreto, se produce una acumulación de trehalosa en el citoplasma (De Virgilio et al., 1994; Hottiger et al., 1994; Neves and François, 1992) que da lugar a un aumento en la osmolaridad intracelular y en la presión turgente, señal que es reconocida por los sensores de superficie y que conduce a la activación de la ruta (Mensonides et al., 2005). Tal y como ya se ha descrito al trabajar con el mutante *pkc1* termosensible, en presencia de estrés térmico en una cepa silvestre los niveles de la proteína *Whi7* aumentan como consecuencia de un aumento en su transcripción, mientras que en el caso de *Whi5* los niveles de proteína caen a la mitad sin que se muestre afectada su transcripción (Figura 6.1, 6.2, 6.6A). Estos resultados reflejan una inducción en los niveles celulares de *Whi7*, pero no de *Whi5*, en respuesta a estrés térmico. Como se ha descrito en el apartado 4, en condiciones basales *Whi5* juega un papel fundamental como represor de *Start*, mientras que *Whi7* desarrolla un papel más secundario. Llegados a este punto nos preguntamos si en condiciones de estrés térmico *Whi7* podría tener un papel más preponderante. Para analizar esta posibilidad, nos planteamos si la delección de *WHI7* o *WHI5* podría tener algún efecto sobre el fenotipo de un mutante

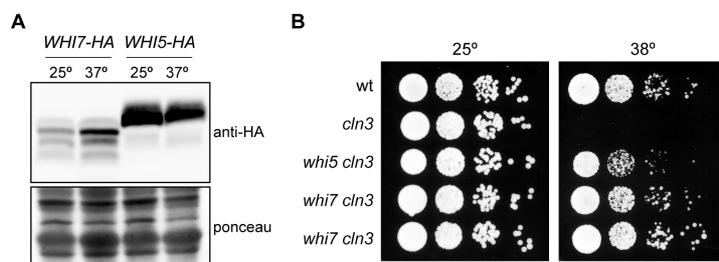


Figura 6.6. Efecto de elevadas temperaturas sobre la funcionalidad de *Whi7* y *Whi5*. (A) Cultivos de células silvestres que expresan la proteína *Whi7* (JCY2015) o *Whi5* (JCY2036) etiquetadas con 6xHA se mantuvieron a 25°C o se transfirieron a 37°C durante 3 horas. Los niveles de las proteínas *Whi7* y *Whi5* se analizaron mediante Western blot. La tinción con Ponceau se muestra como control de carga. (B) Diluciones 1/10 seriadas de cultivos de la cepa silvestre W303 y de las cepas mutantes *cln3* (MT244), *cln3 whi5* (JCY1875) y *cln3 whi7* (JCY1868) se sembraron en placas de YPD y se incubaron a 25°C o 38°C durante 3 días.

cln3, en el que el proceso de *Start* se encuentra de por sí comprometido, en condiciones de temperatura elevada. Los ensayos de crecimiento revelan que en ausencia de *Cln3* las células presentan una elevada sensibilidad al estrés térmico que resulta letal (Figura 6.6B). Se observa que tanto la delección de *WHI7* como la de *WHI5* suprimen la termosensibilidad del mutante *cln3*, aunque el efecto de *whi5* parece algo más suave que el de *whi7*. Este resultado en condiciones de estrés térmico refleja por primera vez un papel fundamental de *Whi7*, equiparable al menos al desarrollado por *Whi5*, en el control de *Start*.

Efecto del Congo Red en la regulación y función celulares de *Whi7* y *Whi5*

A continuación, se estudió el efecto de un agente capaz de generar estrés de pared celular. En concreto, se analizó el efecto del Congo Red (CR), un colorante que se une a la quitina de la pared celular de la levadura, originando alteraciones en diferentes componentes de la misma, como la red de β -1,3 glucano, e induciendo así la activación de la ruta PKC (Ketela et al., 1999; de Nobel et al., 2000).

En relación con *Whi7*, se ha descrito que en presencia de este compuesto la expresión del gen *WHI7* se induce aproximadamente 4 veces (García et al., 2004) y que, como ya se ha indicado, esta inducción es dependiente de la MAP quinasa *Slit2* (Belén Sanz et al., 2012). Dados estos antecedentes, nos propusimos estudiar el efecto del CR sobre los niveles de proteína de *Whi7* y *Whi5*, así como el efecto de este compuesto sobre la estabilidad de la proteína *Whi7*. En consonancia con estudios previos de expresión génica (García et al., 2004), se observa que en presencia de CR los niveles de la proteína *Whi7* aumentan aproximadamente 4 veces con respecto a las células no tratadas (Figura 6.7A). Por el contrario, los niveles de la proteína *Whi5* no se ven afectados en presencia de este compuesto (Figura 6.7B). Por otra parte, el ensayo de apagado traduccional revela que la estabilidad de la proteína *Whi7* no se ve alterada en respuesta al CR, ya que la vida media de la proteína es la misma que en condiciones normales (Figura 6.7C). Estos resultados indican que los niveles celulares de *Whi7*, pero no los de *Whi5*, aumentan en presencia de CR, sin que la estabilidad de la proteína se muestre afectada.

6. Conexión de *Whi7* con la ruta PKC

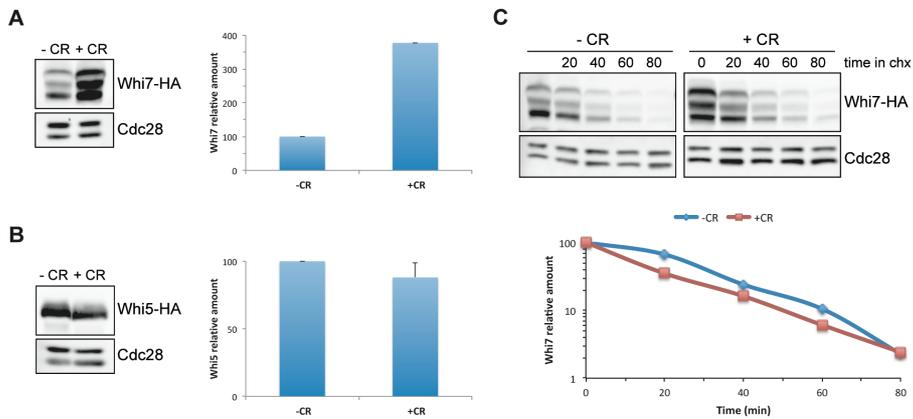


Figura 6.7. Análisis de los niveles celulares de *Whi7* y *Whi5* en respuesta a Congo Red. Cultivos de células silvestres que expresan (A) la proteína *Whi7* (JCY2015) o (B) la proteína *Whi5* (JCY2036) etiquetada con 6xHA se crecieron en ausencia o en presencia de Congo Red (CR) 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 4 horas. Los niveles de las proteínas *Whi7* y *Whi5* se analizaron mediante Western blot. Las gráficas representan la cantidad relativa de la proteína *Whi7* y de la proteína *Whi5* en relación con *Cdc28*. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas de tres experimentos. (C) Células de la cepa silvestre que expresan la proteína *Whi7* etiquetada con 6xHA (JCY2015), se crecieron en ausencia o en presencia de CR 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 4 horas y después se añadió cicloheximida 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los niveles de proteína *Whi7* se analizaron mediante Western blot a los tiempos indicados tras la adición de cicloheximida. *Cdc28* se muestra como control de carga. La gráfica representa la cantidad relativa de la proteína *Whi7* en relación con *Cdc28*.

A continuación, se estudió el efecto a nivel de crecimiento del compuesto CR en una cepa silvestre y en las cepas mutantes *whi7* y *whi5*. Tal como se observa en la [Figura 6.8A](#) la cepa silvestre muestra un defecto en el crecimiento en presencia de CR. El análisis microscópico de estas células muestra un aumento significativo en el porcentaje de células con morfología *dummbbell* (células con yema grande y núcleos segregados) con respecto a las no tratadas ([Figura 6.8B](#)). La aparición de células con esta morfología podría deberse a que el compuesto CR al afectar a la pared celular origine algún defecto en la separación de las células. De hecho, ese es el caso, ya que tras el tratamiento con zimoliasa (enzima lítico que degrada la pared celular de las levaduras) se observa un incremento considerable en el porcentaje de células sin yema, reflejando que estas células son capaces de completar la mitosis, pero se acumulan en fase G1 sin ejecutar *Start*. Por otra parte, los ensayos de crecimiento realizados con los mutantes *whi7* y *whi5* muestran que tanto la delección de *WHI7*, como la de *WHI5*, es capaz de aliviar la sensibilidad de una

cepa silvestre al CR (Figura 6.8A). No obstante, el análisis microscópico de estos mutantes revela que la ausencia del represor transcripcional *Whi7* suprime en mayor medida el bloqueo en fase G1 que se observa en una cepa silvestre en presencia del compuesto CR (Figura 6.8B). Esto sugiere que el defecto en la activación de *Start* que se observa en una cepa silvestre como consecuencia del estrés de pared generado por el CR depende, principalmente, de la acción del represor transcripcional *Whi7*.

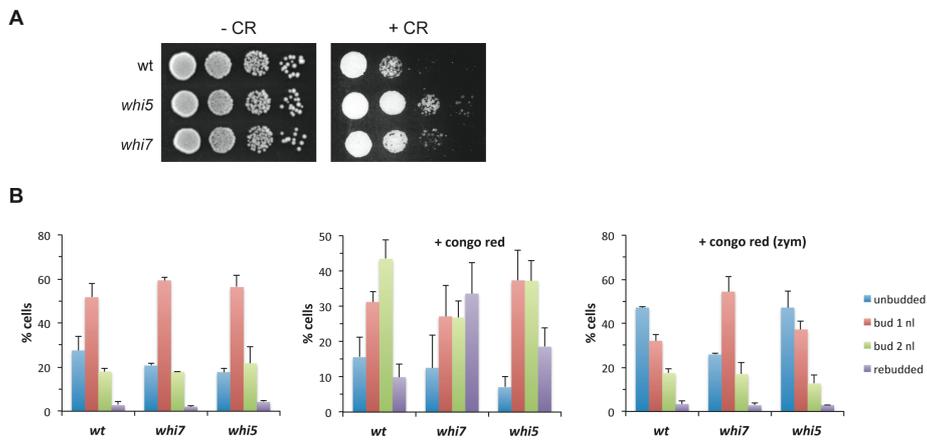


Figura 6.8. Implicación de *Whi7* y *Whi5* en la progresión del ciclo celular en respuesta a Congo Red. (A) Diluciones 1/10 seriadas de cultivos de la cepa silvestre W303 y de las cepas mutantes *whi5* (JCY1874) y *whi7* (JCY1819) se sembraron en placas de YPD suplementadas con Congo Red (CR) 40 µg/mL y se incubaron a 25°C durante 3 días. (B) Células en fase de crecimiento exponencial de las mismas cepas se incubaron en ausencia o en presencia de CR 40 µg/mL durante 4 horas y se observaron en el microscopio óptico. Las gráficas representan la distribución en el ciclo celular, representada como porcentaje de células sin yema (*unbudded*), con yema y un núcleo (*bud 1 nl*), con yema y dos núcleos (*bud 2 nl*) y regemadas (*rebudded*). La gráfica de la derecha representa la distribución en el ciclo celular tras el tratamiento con zimoliasa 20-T 200 µg/mL durante 20 minutos de las células previamente incubadas con CR 40 µg/mL. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas de tres experimentos.

Whi7 reprime la transcripción de los genes de G1/S principalmente de forma dependiente de SBF. Por este motivo, se quiso investigar si la función de *Whi7* en respuesta al compuesto CR también requiere de este factor transcripcional. Ya se ha descrito que los mutantes *swi4* y *swi6* presentan una elevada sensibilidad al CR (García et al., 2004). Por ello, nos planteamos si de forma similar a como ocurre en una cepa silvestre, la delección de *WHI7* o

WHI5 es capaz de aliviar o suprimir el fenotipo de crecimiento de estos mutantes en respuesta al CR. Ensayos de crecimiento por goteo muestran que ni la ausencia de *Whi7* en la célula, ni tampoco la de *Whi5*, suprimen la letalidad de los mutantes *swi4* y *swi6* en presencia de CR (Figura 6.9). Este resultado estaría indicando que la función de *Whi7* en respuesta a este compuesto es dependiente de la función de SBF.

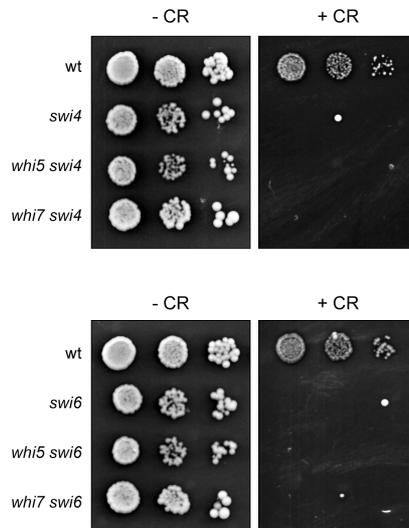


Figura 6.9. Efecto del Congo Red sobre el crecimiento de cepas mutantes SBF. Diluciones 1/10 seriadas de cultivos de la cepa silvestre W303 y de las cepas mutantes *swi4* (JCY0167), *swi4 whi5* (JCY2237), *swi4 whi7* (JCY1872), *swi6 whi5* (JCY2095) y *swi6 whi7* (JCY1880) se sembraron en placas de YPD suplementadas con Congo Red (CR) 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubaron a 25°C durante 3 días.

Finalmente, se estudió el efecto de la delección de estos represores transcripcionales sobre el fenotipo de una cepa mutante *cln3*, en la que el proceso de *Start* se encuentra comprometido. En primer lugar, resulta llamativa la elevada sensibilidad que presenta el mutante *cln3* en respuesta al CR en los ensayos de crecimiento en placa, que, de hecho, resulta letal para las células (Figura 6.10A). Es más, el seguimiento en medio líquido de este mutante revela que tras la adición del CR al medio se produce un bloqueo de primer ciclo, puesto que las células tan siquiera llegan a experimentar una duplicación (Figura 6.10B). El análisis mediante microscopía óptica permitió identificar que en presencia de CR prácticamente la totalidad de las células

mutantes *cln3* se encuentran con una morfología de célula *dummbbell* (Figura 6.10C). Así mismo, el tratamiento con zimoliasa demuestra que en realidad estas células se encuentran en fase G1. Todos estos datos reflejan que la letalidad de una cepa mutante *cln3* en presencia del compuesto CR es consecuencia de un bloqueo en G1, antes de que se ejecute *Start*.

Por otro lado, los ensayos de crecimiento en placa realizados en presencia de CR en el mutante *cln3* muestran que la delección de *WHI7* suprime completamente la letalidad de este mutante al CR. Por el contrario, la delección de *WHI5* en células mutantes *cln3* únicamente tiene un efecto muy ligero en la mejora de su crecimiento (Figura 6.10A). Además, el análisis microscópico de los dobles mutantes *cln3 whi7* y *cln3 whi5* en presencia de CR confirma que la ausencia de *Whi7* en el mutante *cln3* permite que las células avancen en el ciclo, observándose un aumento importante en el porcentaje de células que vuelven a gemar. Sin embargo, y consistente con lo observado a nivel de crecimiento, cuando *Whi5* no se encuentra presente solo un pequeño porcentaje de células es capaz de volver a gemar (Figura 6.10D). En conclusión, el mutante *cln3* sufre un bloqueo del ciclo celular en fase G1, mediado fundamentalmente por el represor transcripcional de *Start* *Whi7* y no por *Whi5*. Así, al contrario de lo que ocurre en condiciones normales, en estas condiciones particulares de estrés de pared celular es *Whi7* y no *Whi5* el represor que juega un papel predominante en la represión de *Start*.

Una posible explicación al papel fundamental en *Start* de *Whi7* en condiciones de estrés de pared celular, podría deberse a que en dichas condiciones tenga lugar una sustitución física de *Whi5* por *Whi7* en los promotores de los genes que regulan *Start* y que la represión ejercida por *Whi7* en estas condiciones sea más relevante que la ejercida por *Whi5*. Por este motivo, se realizó un experimento de ChIP en presencia de CR en el mutante *cln3*, en el que *Whi7* y *Whi5* se inmunoprecipitaron utilizando el mismo sistema de etiquetaje y se analizó su unión a promotores de genes de ciclinas de *Start* (*CLN2*, *CLN1*) y genes que codifican proteínas implicadas en la biosíntesis de la pared celular (*FKS1* y *MNN1*). Los resultados obtenidos muestran que tanto la unión de *Whi7* como de *Whi5* a los promotores aumenta en todos los genes analizados (Figura 6.10E), en mayor medida en el caso de los genes *CLN2* y *CLN1* que de *FKS1* y *MNN1*, lo cual es consistente con la acumulación de células en fase G1 observada en el mutante *cln3* en

6. Conexión de *Whi7* con la ruta PKC

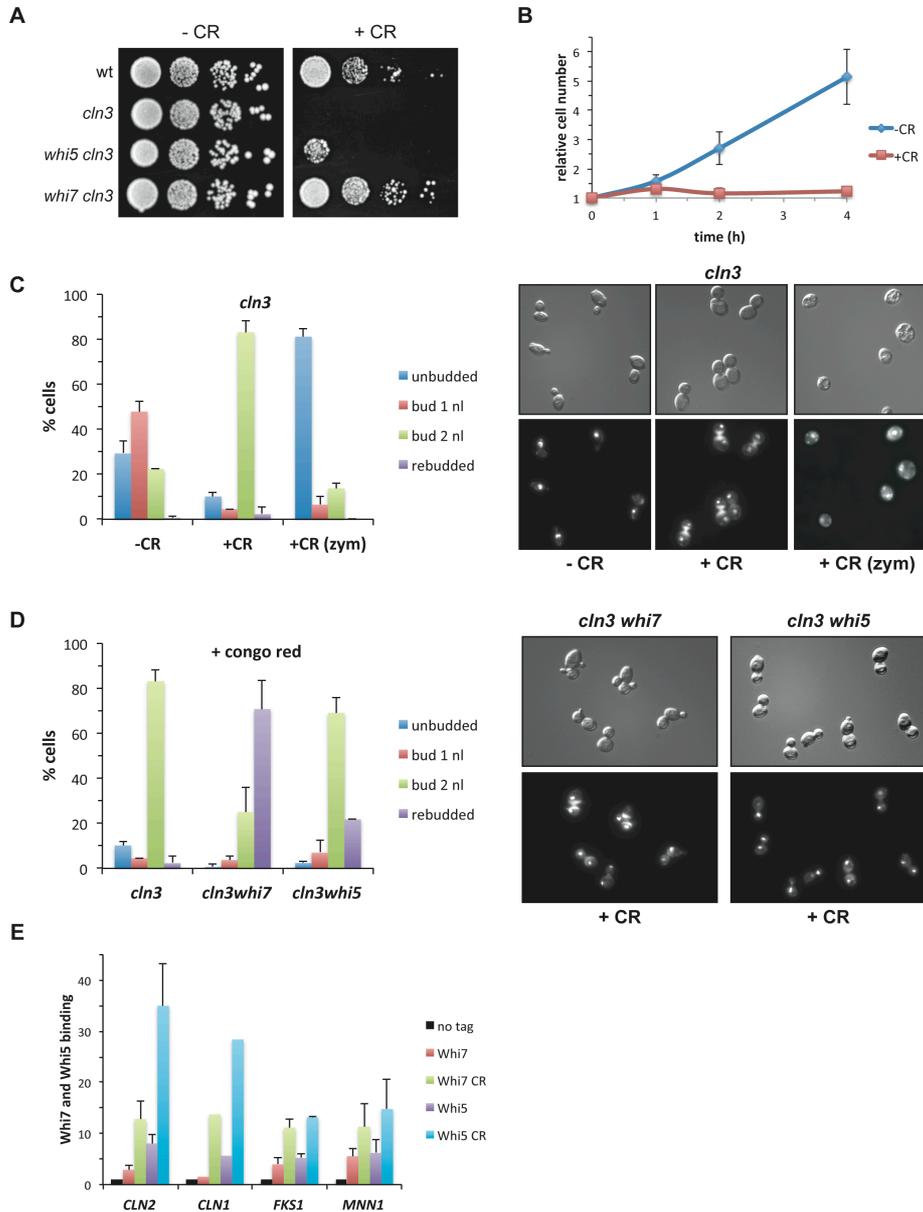


Figura 6.10. Implicación de *Whi7* y *Whi5* en la progresión del ciclo celular en una cepa mutante *cln3* en respuesta a Congo Red. (A) Diluciones 1/10 seriadas de cultivos de la cepa silvestre W303 y de las cepas mutantes *cln3* (MT244), *cln3 whi5* (JCY1875) y *cln3 whi7* (JCY1868) se sembraron en placas de YPD suplementadas con Congo Red (CR) 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubaron a 25°C durante 3 días. (B) Células de la cepa mutante *cln3* (MT244) se crecieron hasta fase exponencial, se incubaron en ausencia o en presencia de CR 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se analizó el aumento en el número de células a los tiempos indicados. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas de dos experimentos. (C) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *cln3* (MT244) se incubaron en ausencia o en presencia de CR 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 4 horas y se observaron en el microscopio óptico. La gráfica representa la

distribución en el ciclo celular, como se describe en la Figura 6.8B. La parte derecha de la gráfica y de las imágenes de microscopía representa la distribución en el ciclo celular tras el tratamiento con zimoliasa 20-T 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 20 minutos de las células previamente incubadas con CR 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se muestran las imágenes de DIC y la tinción del DNA con DAPI. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas de tres experimentos. (D) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *cln3* (MT244), *cln3 whi7* (JCY1868) y *cln3 whi5* (JCY1875) se incubaron en presencia de CR 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 4 horas y se observaron en el microscopio óptico. La gráfica representa la distribución en el ciclo celular, como se describe en la Figura 6.8B. Se muestran las imágenes de DIC y la tinción del DNA con DAPI. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas de tres experimentos. (E) Se analizó mediante ensayos de ChIP la unión de *Whi7* y *Whi5* a los promotores de los genes indicados en células mutantes *cln3* que expresan la proteína *Whi7* (JCY2114) o *Whi5* (JCY2112) etiquetada con 6xHA. Como control se usó la cepa mutante *cln3* (MT244) (no tag). Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas de tres experimentos, excepto en el caso del gen *CLN1*.

presencia del compuesto CR. No obstante, la relación en los valores de unión de ambas proteínas no muestra cambios significativos. Por tanto, no se produce cambio alguno en la unión relativa de *Whi7* y *Whi5* a promotores en un mutante *cln3* en respuesta a CR que permita explicar el efecto principal de *Whi7* en el bloqueo de *Start* en estas condiciones. Este resultado sugiere que en presencia de CR se podría producir un cambio en la funcionalidad de ambos represores, independiente de la capacidad de unión a promotores, que pueda justificar que *Whi7* tenga una función como represor transcripcional más relevante que la de *Whi5*.

Conexión de *Whi7* con la respuesta a estreses genotóxicos

El gen *WHI7* fue identificado inicialmente como un supresor en multicopia de la letalidad de un mutante *rad53*, quinasa efectora del *checkpoint* de daño en el DNA (Desany et al., 1998). Este hecho indica la existencia de una posible conexión entre el represor transcripcional *Whi7* y el *checkpoint*. Por ello, y para analizar también si esta conexión se extiende a *Whi5*, se estudió el efecto de la sobreexpresión de *WHI7* y *WHI5* en mutante condicional *rad53*, en el que la expresión de *RAD53* se encuentra bajo el control del promotor regulable por doxiciclina *tetO₇*. Los ensayos de crecimiento realizados confirman que la sobreexpresión de *WHI7* suprime parcialmente la letalidad de un mutante *rad53*. Además, se observa que la sobreexpresión de *WHI5* también es capaz de suprimir la letalidad de este

mismo mutante, aunque de manera más suave que en el caso de *Whi7* (Figura 6.11). Este resultado refleja una condición adicional en la que el papel de *Whi7* es más relevante que el de *Whi5* y abre la puerta a una relación entre la proteína *Whi7* y el *checkpoint* de integridad del DNA.

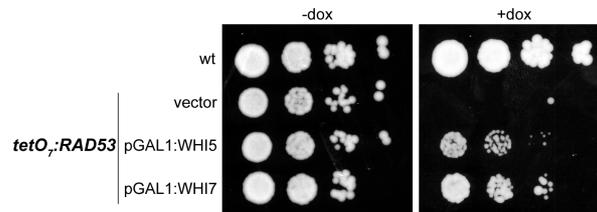


Figura 6.11. Efecto de la sobreexpresión de *WHI7* y *WHI5* en una cepa mutante *rad53*. Diluciones 1/10 seriadas de cultivos de la cepa silvestre W303 y de la cepa mutante *tetO₇::RAD53* (JCY1148) transformada con un vector vacío, y los plásmidos pGAL1:WHI5 o pGAL1:WHI7, se sembraron en placas de YPGal suplementadas con doxiciclina 10 µg/mL y se incubaron a 25°C durante 3 días.

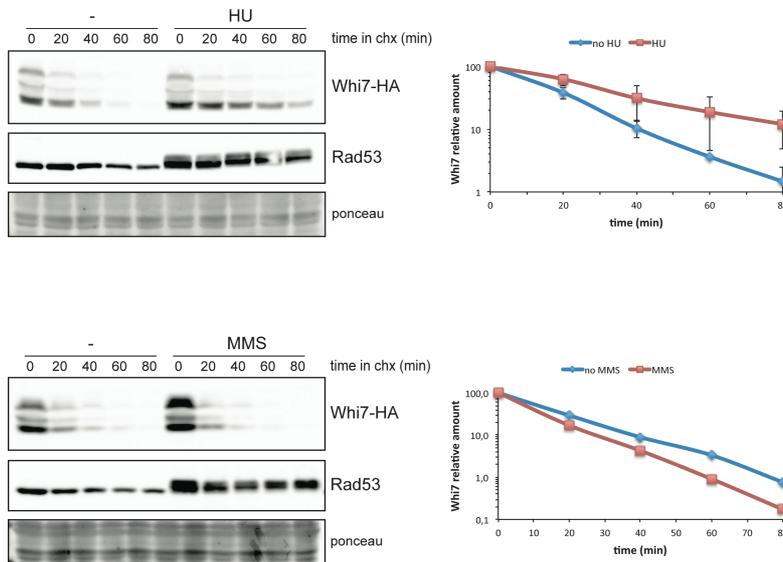


Figura 6.12. Análisis de la estabilidad de *Whi7* en respuesta a HU y MMS. Células de la cepa silvestre que expresan la proteína *Whi7* etiquetada con HA (JCY1728), se crecieron hasta fase exponencial y se incubaron en ausencia o en presencia de HU 200 mM o MMS 0,04% durante 2 o 1 hora respectivamente y después se añadió cicloheximida 100 µg/mL. Los niveles de proteína *Whi7* se analizaron mediante Western blot a los tiempos indicados tras la adición de cicloheximida. Rad53 se muestra como control del experimento y la tinción con Ponceau como control de carga. La gráfica representa la cantidad relativa de la proteína *Whi7* en relación con la tinción Ponceau.

Puesto que la ruta PKC se activa en respuesta a agentes que dañan el DNA y regula la degradación de *Whi7*, se estudió como aproximación inicial la estabilidad de esta proteína en presencia de los agentes genotóxicos MMS e HU. Tras los ensayos de apagado traduccional, el análisis por Western blot muestra que la estabilidad de *Whi7* no se ve afectada en presencia de MMS, mientras que en presencia de HU se aprecia una ligera estabilización de la proteína (Figura 6.12).

Para avanzar en la conexión de *Whi7* con la respuesta a daño en el DNA, se estudió la sensibilidad y la capacidad para activar el *checkpoint* de integridad del DNA en presencia de los agentes MMS e HU, bien en un mutante *whi7* o al sobreexpresar *WHI7*. Los ensayos realizados no revelan ningún defecto de crecimiento asociado a la delección de *WHI7* en presencia de estos compuestos (Figura 6.13A). Sin embargo, la sobreexpresión de *WHI7* es capaz de suprimir la sensibilidad de una cepa silvestre al compuesto MMS (Figura 6.13B). Por otra parte, se analizó la activación de la quinasa efectora

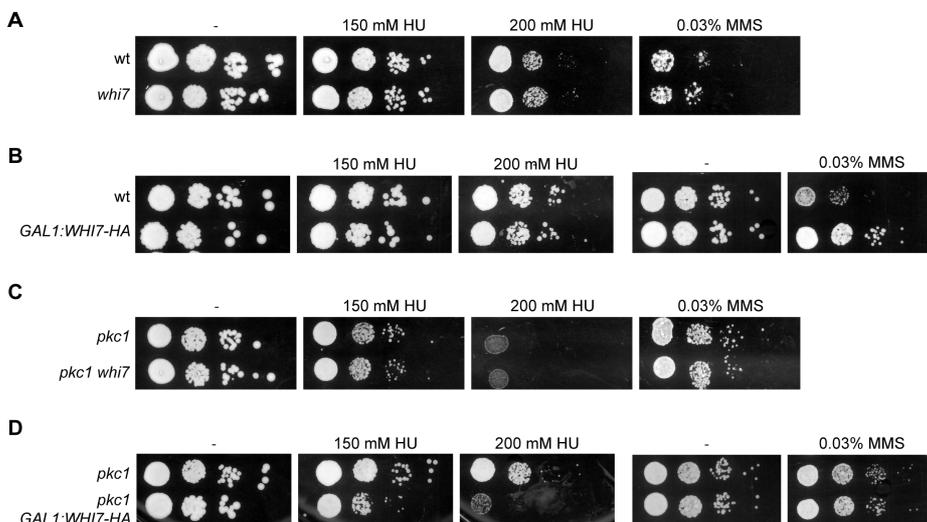


Figura 6.13. Efecto de la delección o la sobreexpresión de *WHI7* en células silvestres o células mutantes *pkc1* en respuesta a HU y MMS. (A) Diluciones 1/10 seriadas de cultivos de la cepa silvestre W303 y de las cepas mutantes *whi7* (JCY1819), (B) *GAL1:WHI7-HA* (JCY1804), (C) *pkc1-8* (JC6-3A), *pkc1-8 whi7* (JCY1823) y (D) *pkc1-8 GAL1:WHI7-HA* (JCY1805) se sembraron en placas de YPD suplementadas con HU 150-200 mM o MMS 0,03% y se incubaron a 25°C, o 37°C en el caso del mutante termosensible *pkc1-8*, durante 3 días.

del *checkpoint* de integridad del DNA, Rad53, mediante Western blot (aparición de bandas de menor movilidad electroforética indicativas de su fosforilación). En este caso, ni la ausencia de *Whi7* ni su sobreexpresión en la célula conllevan algún defecto en la activación de Rad53 en respuesta a MMS o HU (Figura 6.14A, B).

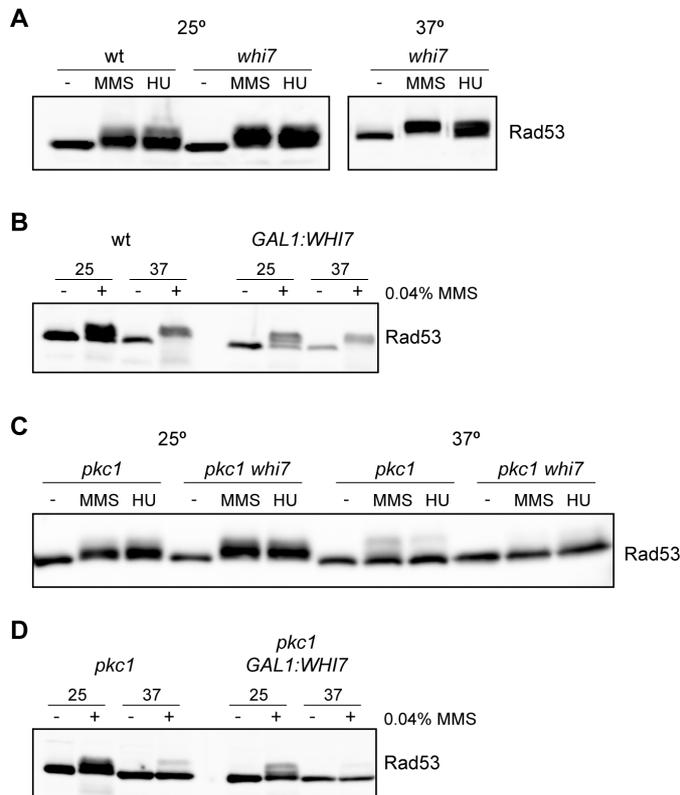


Figura 6.14. Análisis de la activación de Rad53 en células silvestres o en células mutantes *pkc1* con la delección *whi7* o que sobreexpresan *WHI7* en respuesta a HU y MMS. Cultivos en fase de crecimiento exponencial de la cepa silvestre W303 y de las cepas mutantes *whi7* (JCY1819), (B) *GAL1:WHI7-HA* (JCY1804), (C) *pkc1-8* (JC6-3A), *pkc1-8 whi7* (JCY1823) y (D) *pkc1-8 GAL1:WHI7-HA* (JCY1805) se mantuvieron a 25°C o se transfirieron a 37°C durante 3 horas y después se incubaron en ausencia o en presencia de HU 200 mM o MMS 0,04% durante 2 o 1 hora respectivamente. La activación de la proteína Rad53 se analizó mediante Western blot.

A continuación, puesto que *Pkc1* resulta necesaria para la correcta activación del *checkpoint* de integridad del DNA, se estudió la existencia de un

posible fenotipo asociado a Whi7 y relacionado con el *checkpoint* en un mutante *pkc1*. Del mismo modo que en el caso anterior, los experimentos se realizaron en presencia de MMS e HU, tanto en mutante *whi7* como al sobreexpresar *WHI7*. Los ensayos de crecimiento muestran que la sensibilidad del mutante *pkc1* en respuesta a los agentes MMS e HU no se ve alterada cuando Whi7 no se encuentra presente en la célula (Figura 6.13C). Por el contrario, la sobreexpresión de *WHI7* en este mismo mutante aumenta considerablemente su sensibilidad a HU, resultando letal a elevadas concentraciones de este compuesto (Figura 6.13D). Por otro lado, y de la misma manera que ocurre en células silvestres, ni la delección ni la sobreexpresión de *WHI7* en un mutante *pkc1* alteran la capacidad de dicho mutante para activar el *checkpoint* de daño en el DNA, ya que en ninguno de los dos casos se observa activación de la quinasa Rad53 (Figura 6.14C, D).

En resumen, la sobreexpresión de *WHI7* suprime parcialmente la letalidad de un mutante *rad53*, lo que pone en evidencia la existencia de una relación entre este represor transcripcional de G1/S y el *checkpoint* de integridad del DNA. Además, hemos observado que Whi7 sufre cierta estabilización en respuesta al agente genotóxico HU. En cuanto a su efecto a nivel de crecimiento, la sobreexpresión de *WHI7* es capaz de suprimir la sensibilidad de células silvestres al compuesto MMS y de aumentar la sensibilidad de un mutante *pkc1* en respuesta a HU. Todos estos resultados reflejan un papel de Whi7 en relación con la respuesta a daño en el DNA.

La isoforma PKC δ de mamíferos es capaz de controlar los niveles celulares de Whi7

En *S. cerevisiae* existe una única enzima PKC, Pkc1. A diferencia de lo que ocurre en la levadura, en células de mamíferos existen 12 PKCs. En nuestro laboratorio se ha descrito que la isoforma PKC δ es capaz de suprimir el defecto en la activación del *checkpoint* que presenta un mutante *pkc1* (Soriano-Carot et al., 2014). En este capítulo se ha descrito que la ruta PKC regula los niveles celulares de Whi7, controlando su expresión y su degradación. Por ello, en primer lugar, se estudió si PKC δ también sería capaz de controlar los niveles celulares de Whi7. Se analizaron para ello los niveles de proteína Whi7 en un mutante *pkc1* termosensible que expresa PKC δ . Los resultados obtenidos mediante Western blot muestran que en presencia de

6. Conexión de *Whi7* con la ruta PKC

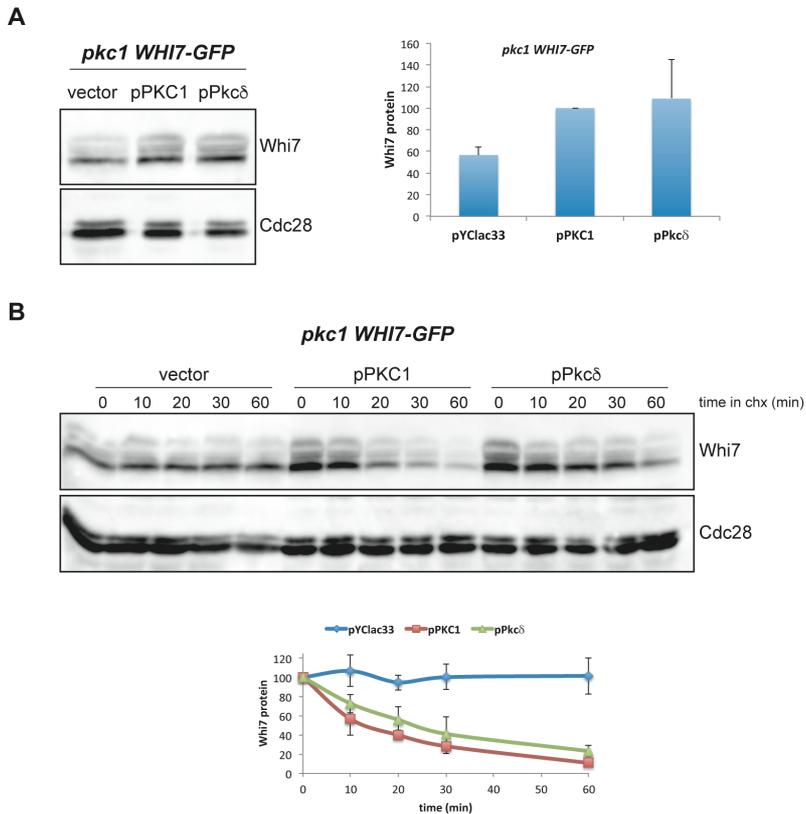


Figura 6.15. Análisis de los niveles celulares y la estabilidad de la proteína *Whi7* en células que expresan la isoforma PKC δ de mamíferos. Células de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3A) que expresan la proteína *Whi7* etiquetada con GFP (JCY1707), transformadas con un vector control, el plásmido pPKC1 o el plásmido pPkc δ se transfirieron a 37°C durante 3 horas. (A) Los niveles de proteína *Whi7* se analizaron mediante Western blot. *Cdc28* se muestra como control de carga. La gráfica representa la cantidad relativa de la proteína *Whi7* en relación con *Cdc28*. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas de tres experimentos. (B) Tras incubar las células 3 horas a 37°C se añadió cicloheximida 100 μ g/mL. Los niveles de proteína *Whi7* se analizaron mediante Western blot a los tiempos indicados tras la adición de cicloheximida. *Cdc28* se muestra como control de carga. La gráfica representa la cantidad relativa de la proteína *Whi7* en relación con *Cdc28*. Los valores representan la media y la desviación estándar derivadas al menos de tres experimentos.

PKC δ se recuperan el estado de fosforilación y los niveles de *Whi7*, aunque sin llegar a alcanzar los niveles de una cepa silvestre (Figura 6.15A). Por tanto, PKC δ es capaz de controlar los niveles celulares de *Whi7* en células de levadura induciendo su expresión de un modo similar a como lo hace *Pkc1*.

A continuación, se estudió mediante ensayos de apagado traduccional la estabilidad de Whi7 en un mutante *pkc1* termosensible que expresa PKC δ . El análisis de la proteína Whi7 revela que en presencia de PKC δ se observa una inestabilización de Whi7 parecida a la observada con Pkc1 (Figura 6.15B). Esto indica que PKC δ está implicada en el control de la estabilidad de Whi7 de un modo similar a como lo hace Pkc1, favoreciendo su degradación.

En conclusión, los resultados obtenidos indican la existencia de similitudes adicionales entre la isoforma PKC δ de mamíferos y la quinasa Pkc1 de *S. cerevisiae*, ya que PKC δ no solo es capaz de activar el *checkpoint* de daño en el DNA de la levadura, sino que además es capaz de controlar los niveles celulares del represor transcripcional de *Start Whi7*.

7. Uso de la levadura *S. cerevisiae* para el estudio de la función de PKC δ de mamíferos en el *checkpoint* de integridad del DNA

La familia PKC está implicada en la regulación de diversos procesos celulares. En *S. cerevisiae* existe una única PKC, que recibe el nombre de Pkc1. En mamíferos la familia PKC está formada por 9 isoenzimas que se clasifican en tres grupos según sus dominios estructurales y mecanismos de regulación (Mellor and Parker, 1998; Newton, 2018a). Hasta el momento, en nuestro grupo se ha identificado que únicamente la isoforma PKC δ de mamíferos, del grupo de las PKCs noveles, del que también forman parte PKC θ , PKC ϵ y PKC η , es capaz de activar el *checkpoint* de integridad del DNA en cepas mutantes *pkc1* de *S. cerevisiae*. Además, la inactivación de PKC δ en células *HeLa* tiene como consecuencia una activación deficiente de la quinasa efectora del *checkpoint* CHK2 en presencia de daño en el DNA (Soriano-Carot et al., 2014). Estos y otros resultados parecen indicar que el control del *checkpoint* de integridad genómica mediado por PKC es un mecanismo conservado evolutivamente.

PKC δ suprime parcialmente el defecto de crecimiento de cepas mutantes *pkc1*

La función más conocida de Pkc1 es el mantenimiento de la integridad celular (Levin, 2011). Además, también está implicada en la regulación de las etapas iniciales del *checkpoint* de integridad del DNA (Soriano-Carot et al., 2014). De hecho, un mutante *pkc1* termosensible sufre lisis celular a temperatura restrictiva y es deficiente en la activación de la quinasa efectora del *checkpoint* de daño en el DNA, Rad53. La proteína de mamíferos PKC δ

suprime el defecto en la activación del *checkpoint* de un mutante *pkc1* termosensible, pero es incapaz de recuperar el defecto de crecimiento que presenta la cepa a elevadas temperaturas (Soriano-Carot et al., 2014).

Con el fin de analizar si la incapacidad de PKC δ para suprimir el defecto de crecimiento en el mutante *pkc1* termosensible es extensible a otros mutantes *pkc1*, se llevaron a cabo ensayos de crecimiento en las cepas mutantes *tetO₇:PKC1* y *pkc1 Δ* . A diferencia de lo que ocurre en un mutante *pkc1* termosensible, en las cepas mutantes *tetO₇:PKC1*, en las que PKC1 se expresa bajo el control del promotor *tetO₇*, reprimible por doxiciclina, PKC δ sí que es capaz de suprimir parcialmente el defecto de crecimiento consecuencia de la ausencia de Pkc1 en la célula (Figura 7.1A, B). Curiosamente, a 37°C PKC δ pierde la capacidad de suprimir el defecto de crecimiento de estos mutantes, señalando que PKC δ no permite suprimir el fenotipo de lisis celular de mutantes *pkc1* a elevadas temperaturas (Figura 7.1C).

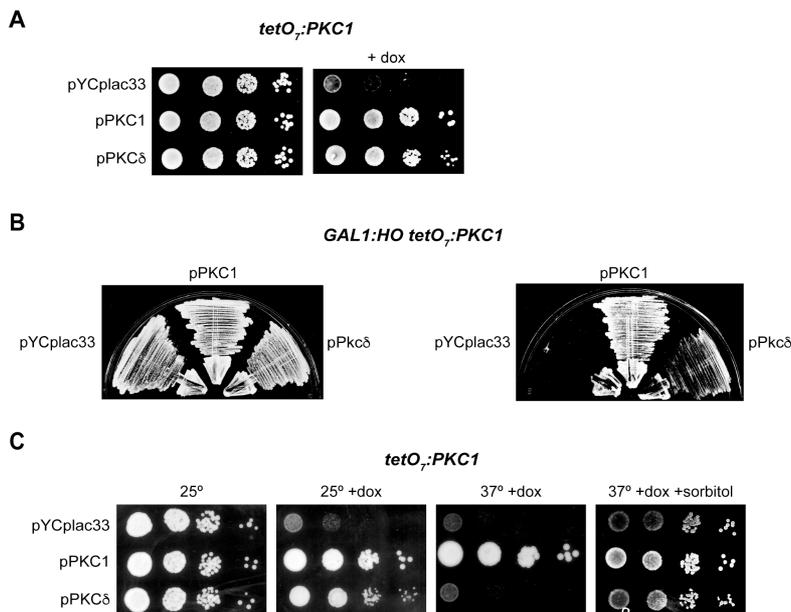


Figura 7.1. Supresión del defecto de crecimiento de cepas mutantes *pkc1* condicionales por PKC δ . (A) Diluciones 1/10 seriadas de cultivos de la cepa mutante *tetO₇:PKC1* (JCY1281) transformada con los plásmidos pPKC1, pPKC δ o con un vector vacío se sembraron en placas de YPD suplementadas con doxiciclina 5 μ g/mL y se incubaron a 25°C durante 3 días. (B) Células de la cepa mutante *GAL1:HO tetO₇:PKC1* (JCY1698) transformada con los plásmidos pPKC1, pPkc δ o con un vector vacío se sembraron en placas de YPD suplementadas con doxiciclina 5 μ g/mL y se incubaron a 25°C durante 3 días. (C) Diluciones 1/10 seriadas de cultivos de la cepa mutante

tetO₇:PKC1 (JCY1281) transformada con los plásmidos pPKC1, pPkc δ o con un vector vacío se sembraron en placas de YPD suplementadas con doxiciclina 5 μ g/mL y donde se indica con sorbitol 1M y se incubaron a 25°C y 37°C durante 3 días.

Así mismo, se ha identificado que PKC δ también es capaz de suprimir el defecto de crecimiento de un mutante *pkc1 Δ* . En ausencia de Pkc1 las células son incapaces de crecer sin sorbitol en el medio, pero la expresión de PKC δ suple parcialmente esa deficiencia (Figura 7.2A). Además, el crecimiento del mutante *pkc1 Δ* en placas suplementadas con FOA, en las que se produce la pérdida del plásmido que codifica el gen *Pkc δ* , conlleva la pérdida de la capacidad de estas células de crecer en ausencia de sorbitol (Figura 7.2B), demostrando que el efecto de supresión observado en el mutante *pkc1 Δ* se debe específicamente a la presencia de PKC δ en la célula.

Estos resultados indican que PKC δ es capaz de suprimir, no solo el defecto en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA, sino también el defecto de crecimiento de mutantes *pkc1*. Sin embargo, a elevadas temperaturas esta segunda capacidad se pierde, probablemente porque el defecto de lisis celular sea más severo a temperaturas altas.

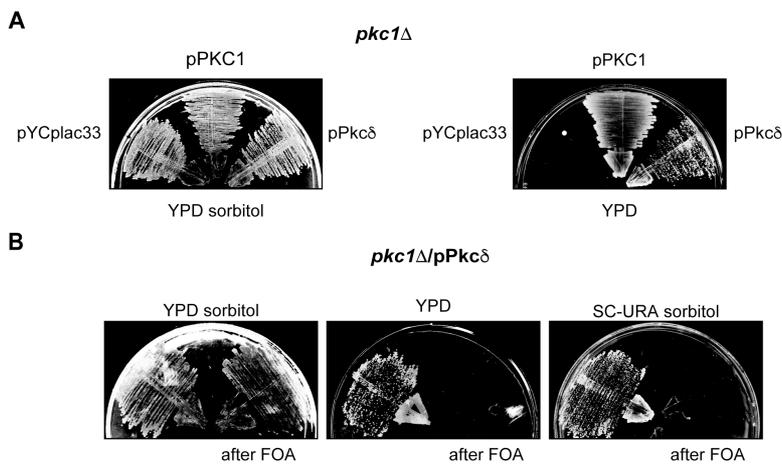


Figura 7.2. Supresión del defecto de crecimiento de la cepa mutante *pkc1 Δ* por PKC δ . (A) Células de la cepa mutante *pkc1 Δ* (GPY1115) transformada con los plásmidos pPKC1, pPkc δ o con un vector vacío se sembraron en placas de YPD, suplementadas con sorbitol 1M donde se indica, y se incubaron a 25°C durante 3 días. (B) Células de la cepa mutante *pkc1 Δ* (GPY1115) transformada con el plásmido pPkc δ , procedentes de placas de medio de selección suplementadas con FOA, se sembraron en placas de YPD o de medio mínimo de selección suplementadas con sorbitol 1M y se incubaron a 25°C durante 3 días.

Estudio de la localización subcelular de PKC δ

En células de mamíferos se ha identificado que PKC δ entra al núcleo principalmente en respuesta a señales apoptóticas. Además, PKC δ posee en su extremo C-terminal una NLS bipartita, que junto con las fosforilaciones en determinados residuos de Tyr del dominio regulador parecen ser las responsables de su importación al núcleo (Humphries et al., 2008). Resultados anteriores del grupo revelaban que Pkc1 sufre un cambio de localización en presencia de estrés replicativo en *S. cerevisiae*, desapareciendo de los sitios de polarización, como son el cuello y la punta de la yema de la levadura. Sin embargo, no se pudo identificar una localización clara de Pkc1 en el núcleo de las células en presencia de dicho estrés (Soriano-Carot et al., 2014). Dado que PKC δ es capaz de activar el *checkpoint* de integridad genómica en la levadura (Soriano-Carot et al., 2014) y que, en un última instancia, las proteínas efectoras de dicho *checkpoint* son reclutadas a la zona de la lesión en respuesta a daño en el DNA (Melo and Toczyski, 2002), sería probable que PKC δ mediara la activación del *checkpoint* de daño en el DNA en *S. cerevisiae* mediante su entrada al núcleo.

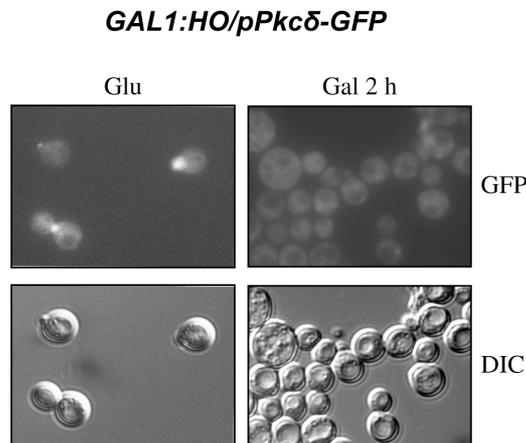


Figura 7.3. Análisis de la localización subcelular de PKC δ en presencia de daño en el DNA. Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa *GAL1:HO* (JKM139) transformada con el plásmido pPkc δ -GFP se crecieron en medio de selección con glucosa (ausencia de daño en el DNA) o galactosa (presencia de daño en el DNA) y se observaron en el microscopio de fluorescencia. Se muestran las imágenes de DIC y la señal de GFP. Los cultivos en presencia de galactosa se observaron a diferentes tiempos (0.5 h, 1 h, 1.5 h y 2 h). Se muestra un resultado representativo.

Mediante microscopía de fluorescencia se analizó la localización subcelular de la construcción PKC δ -GFP en células en las que la endonucleasa HO se encuentra bajo el control del promotor inducible por galactosa *GAL1*. Así, en presencia de galactosa en el medio la endonucleasa HO se expresa generando un único DSB (*double strand break*) y con ello daño en el DNA. En la [Figura 7.3](#) se observa que PKC δ -GFP se localiza en el cuello y la yema de las células en ausencia de daño en el DNA. Esta localización en sitios de polarización de crecimiento es similar a la que muestra Pkc1 ([Soriano-Carot et al., 2014](#)) y es consistente con que PKC δ suprima el defecto de crecimiento en un mutante *pkc1*. Por su parte, en presencia de daño en el DNA, PKC δ se deslocaliza de dichas zonas, de manera similar a lo que ocurre con Pkc1 ([Soriano-Carot et al., 2014](#)).

Estudio de la activación del *checkpoint* de integridad del DNA por PKCs noveles

De las 12 isoformas PKC presentes en mamíferos PKC θ es la isoforma filogenéticamente más próxima a PKC δ ([Kikkawa et al., 2002](#)). Por ello, nos planteamos estudiar la capacidad de PKC θ y el resto de las isoformas PKCs noveles (PKC ϵ y PKC η) para suprimir el defecto en el crecimiento y el defecto en la activación de la quinasa efectora del *checkpoint* Rad53 de cepas mutantes *pkc1* de *S. cerevisiae*.

El análisis del crecimiento de células mutantes *tetO₇:PKC1* transformadas con plásmidos que expresan las distintas PKCs noveles de mamífero, revela que PKC δ , y en menor medida PKC θ , son capaces de suprimir, aunque parcialmente, el defecto de crecimiento que presenta una cepa mutante *pkc1* de levadura ([Figura 7.4A](#)).

Para el estudio de la supresión del defecto en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA por PKCs noveles se empleó la cepa mutante *pkc1* termosensible y se analizó mediante Western blot la activación de la proteína Rad53. El análisis de la proteína Rad53 indica que solo PKC δ permite suprimir el defecto en la activación del *checkpoint* de daño en el DNA que presenta una cepa mutante *pkc1* de levadura ([Figura 7.4B](#)), observándose un efecto mucho menor en la capacidad para suprimir este fenotipo en el caso de PKC θ .

En resumen, únicamente la isoforma PKC δ de mamíferos es capaz de recuperar de un modo eficiente tanto el defecto de crecimiento como el defecto en la activación del *checkpoint* de daño en el DNA de cepas mutantes *pkc1* de la levadura *S. cerevisiae*, aunque sin llegar a desarrollar estas funciones al mismo nivel que Pkc1. Por su parte, PKC θ también es capaz de desarrollar estas mismas funciones, pero de un modo mucho menos eficiente que PKC δ , mientras que no se observa ningún efecto en el caso de PKC ϵ y PKC η .

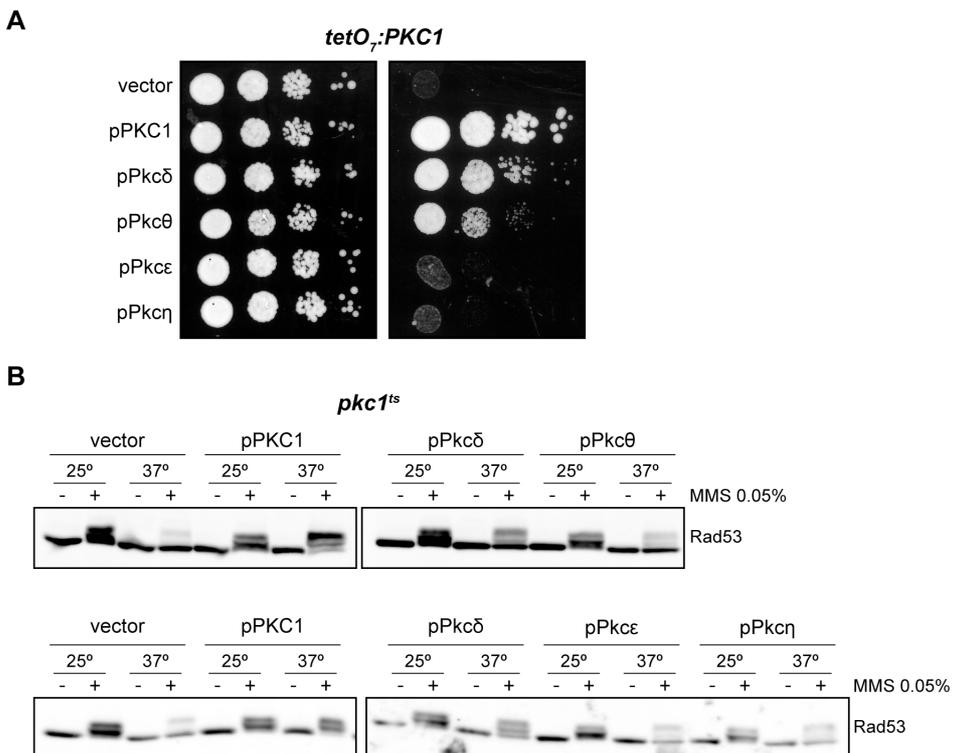


Figura 7.4. Supresión del defecto en el crecimiento y la activación del *checkpoint* de integridad del DNA de cepas mutantes *pkc1* por PKCs noveles. (A) Diluciones 1/10 seriadas de cultivos de la cepa mutante *tetO₇::PKC1* (JCY1281) transformada con los plásmidos pPKC1, pPkc δ , pPkc θ , pPkc ϵ , pPkc η o con un vector vacío se sembraron en placas de YPD suplementadas con doxiciclina 5 μ g/mL y se incubaron a 25°C durante 3 días. (B) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3A) transformada con los plásmidos pPKC1, pPkc δ , pPkc θ , pPkc ϵ , pPkc η o con un vector vacío se mantuvieron a 25°C o se transfirieron a 37°C durante 3 horas y después se incubaron en ausencia o en presencia de MMS 0,04% durante 1 hora. La activación de la proteína Rad53 se analizó mediante Western blot.

Implicación de residuos fosforilados del lazo de activación de PKC δ en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA

Por lo general, todas las isoformas PKC de mamíferos requieren de la fosforilación en un residuo de Thr del lazo de activación para ser activas. El caso de PKC δ es un tanto particular, puesto que, aunque *in vivo* se ha identificado la fosforilación en la Thr⁵⁰⁵ del lazo de activación, estudios *in vitro* indican que esta fosforilación no sería necesaria para su actividad (Stempka et al., 1997). También se ha descrito que la existencia de un residuo ácido distal, Glu⁵⁰⁰, en el lazo de activación podría simular la fosforilación de la Thr⁵⁰⁵, motivo por el que no resultaría necesaria su fosforilación (Stempka et al., 1999).

Mediante mutagénesis dirigida se sustituyó la Thr⁵⁰⁵ por Ala (mimetiza un estado no fosforilable) y el Glu⁵⁰⁰ por Gly (aminoácido presente en esta misma posición en la isoforma PKC ϵ). Con estas versiones mutantes de PKC δ se analizó *in vivo* la capacidad para activar el *checkpoint* de integridad del DNA de un mutante *pkc1* termosensible (Figura 7.5). Los resultados obtenidos revelan que en ausencia de fosforilación en la Thr⁵⁰⁵ todavía se produce fosforilación de la quinasa Rad53, aunque ésta se muestra afectada. Por tanto, la fosforilación de este residuo en PKC δ no es esencial para la activación del

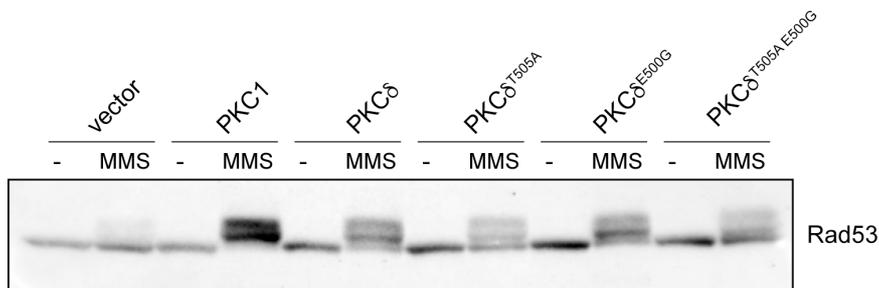


Figura 7.5. Análisis de la activación del *checkpoint* de integridad del DNA en mutantes en residuos clave del lazo de activación de PKC δ . Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3A) transformada con los plásmidos pPKC1, pPkc δ , pPkc δ ^{T505A}, pPkc δ ^{E500G}, pPkc δ ^{T505A, E500G} o con un vector vacío se transfirieron a 37°C durante 3 horas y después se incubaron en ausencia o en presencia de MMS 0,04% durante 1 hora. La activación de la proteína Rad53 se analizó mediante Western blot.

checkpoint de integridad del DNA, pero sí que es necesaria para que esta activación sea eficiente. Por otra parte, la sustitución del residuo ácido distal Glu⁵⁰⁰ por Gly no tiene efecto en la capacidad de PKC δ para activar a Rad53 en respuesta a daño en el DNA, tanto en la proteína silvestre como en la proteína mutada en Thr⁵⁰⁵.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que ni la fosforilación de la Thr⁵⁰⁵ ni la presencia del residuo ácido distal Glu⁵⁰⁰ en el lazo de activación son necesarios *in vivo* para que PKC δ active el *checkpoint* de integridad del DNA en *S. cerevisiae* en respuesta a agentes genotóxicos.

Implicación de la hélice A de PKC δ en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA

PKC δ es la única isoforma de la familia PKC que contiene la denominada hélice A. Se ha descrito que la interacción de determinados residuos presentes en esta hélice con otros presentes en otras partes de la proteína sustituye a la fosforilación del lazo de activación como mecanismo para generar una enzima catalíticamente competente (Liu et al., 2006). Residuos claves en esta interacción son: Tyr³³², Trp³³⁶, Arg³⁹⁷, Ile⁴⁹⁷, Phe⁴⁹⁸ y Phe⁵²⁵. Las interacciones que se establecen entre estos residuos incluyen los siguientes contactos: (1) Tyr³³²-Phe⁴⁹⁸, (2) Trp³³⁶-Arg³⁹⁷ y (3) Ile⁴⁹⁷-Phe⁵²⁵. Únicamente Tyr³³² y Trp³³⁶ residen en la hélice A, el resto de los residuos citados e implicados en este mecanismo se hayan en otras partes de la proteína. No obstante, parece que son los dos residuos de Phe (Phe⁴⁹⁸ y Phe⁵²⁵) situados en el lazo de activación y la hélice F, respectivamente, los más relevantes en este mecanismo, puesto que son aminoácidos muy hidrofóbicos que proporcionan interacciones estables y capaces de formar *hydrophobic stacks*. Además de la hélice A, PKC δ es la única de las isoformas PKC de mamíferos que tiene dos Phe en estas posiciones. Por todos estos motivos resulta fácil pensar que una posible explicación a que PKC δ sea la única isoforma capaz de activar el *checkpoint* de daño en el DNA en la levadura *S. cerevisiae*, se podría deber a la existencia de este mecanismo de estabilización del lazo de activación en el que participan tanto residuos que se encuentran en la hélice A como residuos de Phe específicamente posicionados en el dominio catalítico de la proteína.

PKC isoform	Contact 1		Contact 2		Contact 3	
δ	Tyr ³³²	Phe ⁴⁹⁸	Trp ³³⁶	Arg ³⁹⁷	Ile ⁴⁹⁷	Phe ⁵²⁵
θ	Glu	Leu	Trp	Arg	Met	His
ϵ	Asn	Met	Arg	Arg	Ile	Pro

Tabla 2. Comparación de aminoácidos en PKCs noveles. Residuos de las isoformas PKC θ y PKC ϵ que se encuentran en la misma posición que aquellos residuos de PKC δ implicados en el mecanismo de estabilización del lazo de activación.

El alineamiento de las proteínas PKC δ y PKC θ , isoforma más próxima filogenéticamente a PKC δ y con cierta capacidad residual para activar el *checkpoint* de integridad del DNA en la levadura *S. cerevisiae*, revela que los residuos implicados en el contacto 2 (implicado en la estabilización del lazo de activación en PKC δ citado anteriormente) se encuentran conservados en la isoforma PKC θ (Tabla 2). Por ello, dada la importancia que tienen los dos residuos de Phe en el mecanismo en el que se encuentra implicada la hélice A, se sustituyeron mediante mutagénesis dirigida la Phe⁵²⁵ (contacto 3) y Phe⁴⁹⁸ (contacto 1) de PKC δ por aquellos residuos presentes en PKC θ , con el objetivo de analizar la capacidad para activar el *checkpoint* de integridad del DNA en dichos mutantes. En la Figura 7.6 se observa que PKC δ es completamente funcional para activar a la quinasa efectora del *checkpoint* Rad53 en respuesta a daño en el DNA en cualquiera de los mutantes generados (simples o doble). Estos resultados indican que los residuos de Phe de PKC δ implicados en el mecanismo en el que interviene la hélice A para estabilizar el lazo de activación no son necesarios para la activación del *checkpoint* de integridad del DNA de la levadura *S. cerevisiae* por PKC δ , puesto que su sustitución por aquellos aminoácidos presentes en esas mismas posiciones en PKC θ permite seguir activando eficientemente a Rad53.

Por otra parte, el alineamiento de las proteínas PKC δ y PKC ϵ , isoforma más próxima filogenéticamente a PKC δ sin capacidad para activar el *checkpoint* de daño en el DNA, no revela la existencia de ningún contacto conservado e implicado en la estabilización del lazo de activación en PKC δ en la isoforma PKC ϵ (Tabla 2). En primer lugar, se sustituyeron mediante mutagénesis dirigida, de forma individual y en combinación, la Tyr³³² (contacto 1) y el Trp³³⁶ (contacto 2), ambos presentes en la hélice-A, por los residuos

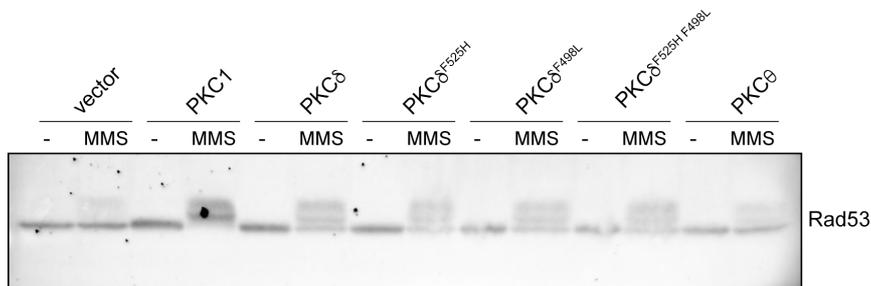


Figura 7.6. Análisis de la activación del *checkpoint* de integridad del DNA en mutantes de PKC δ donde se sustituyen residuos clave por los presentes en PKC θ . Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3A) transformada con los plásmidos pPKC1, pPkc δ , pPkc δ ^{F525H}, pPkc δ ^{F498L}, pPkc δ ^{F525H, F498L}, pPkc θ o con un vector vacío se transfirieron a 37°C durante 3 horas y después se incubaron en ausencia o en presencia de MMS 0,04% durante 1 hora. La activación de la proteína Rad53 se analizó mediante Western blot.

correspondientes en PKC ϵ . Tanto los mutantes simples como el mutante doble son funcionales y capaces de activar eficientemente a Rad53 en presencia del agente genotóxico MMS (Figura 7.7A, B, C), señalando que estos residuos no resultan necesarios para la activación del *checkpoint* de integridad del DNA por PKC δ . Dada la importancia que tienen los dos residuos de Phe en el mecanismo en el que se encuentra implicada la hélice-A, decidimos realizar la sustitución de la Phe⁴⁹⁸ y Phe⁵²⁵ siguiendo la misma estrategia que en el caso anterior. Los resultados obtenidos en este caso revelan que PKC δ únicamente pierde la capacidad para activar a la quinasa Rad53 en respuesta a daño en el DNA cuando el residuo mutado es Phe⁵²⁵ (Figura 7.7D). Este resultado podría señalar que el papel de la Phe⁵²⁵ sería importante para la función de PKC δ , un resultado aparentemente contradictorio con lo comentado anteriormente para el caso de PKC θ . Sin embargo, hay que resaltar que el residuo presente en esta posición en PKC ϵ , y por el que se sustituyó la Phe⁵²⁵ de PKC δ , es una Pro, un aminoácido que por sus características como disruptor de hélices podría afectar a la estructura de PKC δ . De hecho, el análisis de la proteína PKC δ mediante Western blot muestra la aparición de una banda adicional de menor tamaño a la correspondiente a PKC δ , que debe corresponder a una versión truncada de la proteína (resultados no mostrados). Esto podría indicar

alguna alteración estructural en PKC δ^{F525P} que podría ser la causa de la pérdida de funcionalidad para activar el *checkpoint* de integridad del DNA.

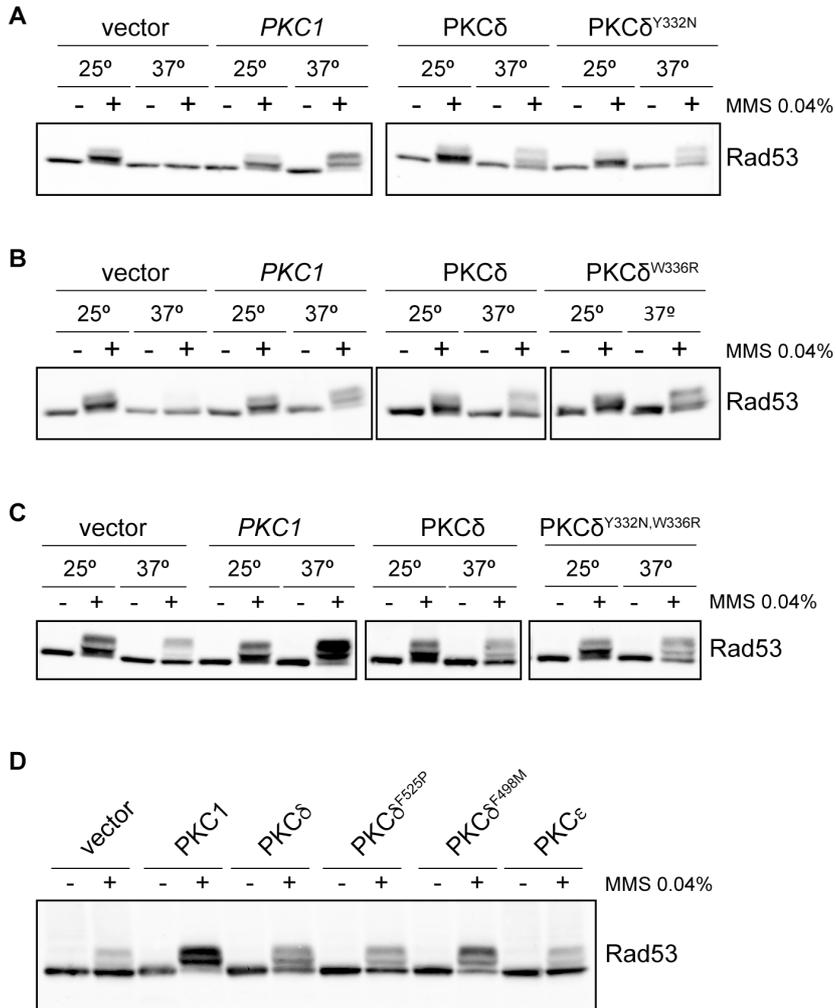


Figura 7.7. Análisis de la activación del *checkpoint* de integridad del DNA en mutantes de PKC δ donde se sustituyen residuos clave por los presentes en PKC ϵ . (A) Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3A) transformada con un vector vacío y con los plásmidos pPKC1, pPKC δ , pPKC δ^{Y332N} , (B) pPKC δ^{W336R} , (C) pPKC $\delta^{Y332N, W336R}$ o (D) pPKC δ^{F525P} , pPKC δ^{F498M} y pPKC ϵ se transfirieron a 37°C durante 3 horas y después se incubaron en ausencia o en presencia de MMS 0,04% durante 1 hora. La activación de la proteína Rad53 se analizó mediante Western blot.

Implicación de residuos de Tyr fosforilados de PKC δ en la activación del checkpoint de integridad del DNA

PKC δ es, de todas las PKCs de mamíferos, la isoforma más fosforilada en residuos de Tyr. En ensayos *in vitro* e *in vivo* se ha descrito que en respuesta a H₂O₂ PKC δ es fosforilada en Tyr³¹¹, Tyr³³² y Tyr⁵¹², aumentando la actividad de la proteína (Konishi et al., 1997, 2001). El tratamiento con H₂O₂ genera estrés oxidativo lo cual origina daño en el DNA, de manera que estas fosforilaciones podrían estar asociadas con el estrés genotóxico.

Con el objetivo de identificar si estos tres residuos de Tyr son relevantes en PKC δ para activar el *checkpoint* de integridad del DNA, se sustituyeron mediante mutagénesis dirigida a Phe (mimetiza un estado no fosforilable) y se analizó su capacidad para activar a la quinasa efectora del *checkpoint* Rad53 en respuesta al agente genotóxico MMS. En la [Figura 7.8](#) se observa que PKC δ mutada en los residuos de Tyr no ve afectada su capacidad para activar a la quinasa efectora del *checkpoint* Rad53 en comparación con la proteína silvestre. Este resultado indica que la fosforilación en cualquiera de estos tres residuos de Tyr no resulta necesaria para que PKC δ active el *checkpoint* de integridad del DNA en respuesta a agentes genotóxicos, no siendo por tanto relevante para la funcionalidad de la proteína en la levadura *S. cerevisiae*.

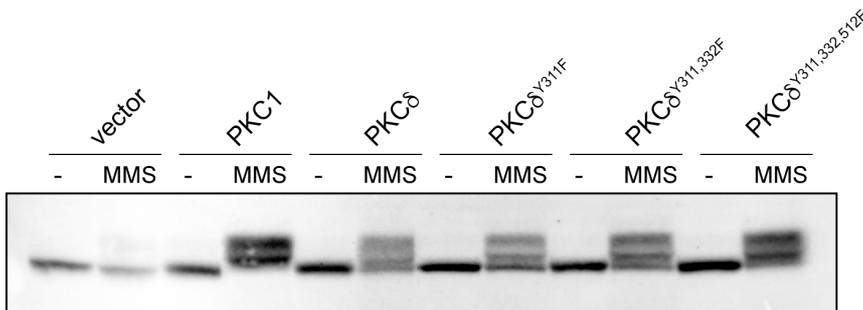


Figura 7.8. Análisis de la activación del *checkpoint* de integridad del DNA en mutantes en Tyr claves en la respuesta a estrés oxidativo de PKC δ . Células en fase de crecimiento exponencial de la cepa mutante *pkc1-8* (JC6-3A) transformada con los plásmidos pPKC1, pPkc δ , pPkc δ ^{Y311F}, pPkc δ ^{Y311F, Y332F}, pPkc δ ^{Y311F, Y332F, Y512F} o con un vector vacío se transfirieron a 37°C durante 3 horas y después se incubaron en ausencia o en presencia de MMS 0,04% durante 1 hora. La activación de la proteína Rad53 se analizó mediante Western blot.

8. Discusión

La proteína Whi7 está relacionada a nivel de secuencia con el represor transcripcional Whi5, el parálogo funcional de las proteínas Rb en células de mamífero (Figura 1.5). Esto indica la existencia de un origen evolutivo común y sugiere que ambas proteínas podrían desarrollar funciones similares. A lo largo de esta tesis se han proporcionado nuevas claves sobre la función de Whi7 en la regulación del ciclo celular, se ha caracterizado a Whi7 como una proteína inestable regulada a lo largo del ciclo celular y se ha descrito una nueva función como represor transcripcional de *Start*, demostrando la existencia de redundancia funcional entre Whi7 y Whi5. Así mismo se han analizado las diferencias entre Whi7 y Whi5 tratando de establecer determinantes de su especificidad funcional.

Regulación de Whi7 a lo largo del ciclo celular

Un primer aspecto que resaltar es que Whi7 se encuentra presente en múltiples estados de fosforilación a lo largo del ciclo celular. Ya se había descrito con anterioridad que Whi7 es fosforilado por el complejo Cdc28-Cln3 y, en consonancia con esto, que su patrón de fosforilación cambia durante G1/S (Yahya et al., 2014). En este trabajo, se ha descrito que Whi7 se encuentra en un estado fosforilado básicamente a lo largo de todo el ciclo celular. Es más, se ha observado que su grado de fosforilación cambia drásticamente a lo largo del mismo: aumenta desde mitad de G1, antes de *Start*, hasta mitosis y disminuye hacia la salida de mitosis. Esta ventana temporal coincide con el periodo del ciclo celular en el que hay actividad Cdc28. La migración electroforética de Whi7 en un mutante *cdc28*, así como la de una versión de Whi7 con todos los posibles sitios de fosforilación por CDK mutados, es similar a la observada en los ensayos con fosfatasa lambda, sugiriendo que la CDK Cdc28 es la única quinasa implicada en la fosforilación

de Whi7. Sin embargo, no puede excluirse por completo que otras quinasas sean capaces de fosforilar a Whi7. De hecho, en el caso de Whi5, además de diez sitios de fosforilación por Cdc28, se han identificado seis sitios cuya fosforilación es independiente de Cdc28 (Wagner et al., 2009). Cinco de estos sitios son secuencias consenso de fosforilación por caseína quinasa I o II (CKA1/2) (Ptacek et al., 2005), la cual es conocida por su papel en la regulación de factores de transcripción y RNA polimerasas (Glover, 1998). Dos de estos sitios en la secuencia de Whi5 (Ser²⁷⁶ y Thr²⁸¹) se encuentran conservados en Whi7 (Ser²²⁴ y Ser²²⁹), señalando a CKA1/2 como posible quinasa capaz de fosforilar a Whi7.

Al final de mitosis tiene lugar la activación de la fosfatasa Cdc14 (Simanis, 2003), la cual se encarga de la defosforilación de muchos sustratos de ciclo celular, como Swi6 (Geymonat et al., 2004; Sidorova et al., 1995) y Whi5 (Taberner et al., 2009). Puesto que la fosforilación de Whi7 disminuye hacia el final de mitosis, también podría ser Cdc14 la fosfatasa responsable de la defosforilación de Whi7. Sin embargo, los experimentos realizados indican que Cdc14 no es la fosfatasa encargada de la defosforilación de Whi7 o al menos no la principal. Esto sugiere que otra fosfatasa con mayor actividad durante mitosis podría ser la encargada de la mayor parte de la defosforilación de la proteína. En este sentido, la defosforilación de sustratos por la fosfatasa PP2A^{Cdc55} resulta esencial para la salida de mitosis en la levadura (Baro et al., 2013; Queralt et al., 2006). Además, recientemente diversos estudios han relacionado a Cdc55 y Whi5 (Baro et al., 2018; Talarek et al., 2017). Cdc55 se encarga de defosforilar a Whi5 favoreciendo su asociación a SBF y reprimiendo así el programa transcripcional de *Start*. Por estos motivos la fosfatasa PP2A^{Cdc55} resulta una buena candidata como responsable de la defosforilación de Whi7.

También hemos identificado que Whi7 es una proteína muy inestable y que su estabilidad esta regulada a lo largo del ciclo celular. De las ubiquitina-ligasas que participan en la degradación de sustratos de ciclo celular hemos identificado que la proteína Whi7 es degradada principalmente a través de la ubiquitina-ligasa SCF^{Grr1}. No obstante, el hecho de que Whi7 no sea completamente estable en un mutante de delección *grr1* podría sugerir que otras vías contribuyesen a su degradación o que Whi7 sea una proteína con una elevada inestabilidad intrínseca en comparación con otras proteínas. Así

mismo, demostramos que la degradación de Whi7 es, tal y como suele ocurrir con las dianas de SCF, dependiente de la fosforilación por CDK. Evidencia de ello es que Whi7 se mantiene estable en células mutantes *cdc28* o al mutar todos los posibles sitios de fosforilación por Cdc28. Esto es consistente con el hecho de que Whi7 únicamente sea estable en la fase G1, el período del ciclo celular con menor actividad CDK. La primera actividad CDK que aparece en el ciclo es Cln3-Cdc28, por lo que parece razonable pensar que dicha actividad sea la responsable de iniciar la degradación de Whi7. Sin embargo, Whi7 también es inestable en G2/M, en telofase y en células mutantes *cln3* y se estabiliza al inactivar Clb1-4 o Cln1-2. Por ello, proponemos que cualquier actividad CDK es capaz de fosforilar a Whi7 marcándola para su degradación vía SCF^{Grr1}, como ocurre con otros reguladores clave del ciclo celular, tales como el CKI Sic1 (Koivomagi et al., 2011) o el co-activador de la ubiquitina-ligasa APC, Cdh1 (Peters, 2006).

Además de los cambios en el estado de fosforilación y en la estabilidad de la proteína, se ha observado que Whi7 es una proteína periódica, ya que sus niveles oscilan a lo largo del ciclo celular: aumentan desde G1, antes de *Start*, hasta G2 y disminuyen a partir de mitosis. La periodicidad es una de las características cruciales que comparten muchos de los reguladores clave del ciclo celular. Las oscilaciones de la mayoría de estos reguladores a lo largo del ciclo se deben bien a cambios en su expresión génica o a su degradación. En cuanto a la expresión génica de *WHI7* a lo largo del ciclo celular existe cierta controversia. Por una parte, en la base de datos "*Cell cycle transcript profile*" no se considera que *WHI7* sea un gen de expresión periódica, mientras que por el contrario en la base de datos "*Cyclebase*" se indica la existencia de un máximo en la fase G1, aunque la oscilación es de hecho muy pequeña (el gen *WHI7* se encuentra situado en la clasificación de genes periódicos en la posición 916). En este trabajo, se analizó la expresión del gen *WHI7* a lo largo del ciclo celular haciendo uso del mismo sistema experimental empleado para el estudio de la proteína Whi7 (sincronización de células mutantes *cdc15*). Los resultados obtenidos no muestran oscilación alguna en los niveles de mRNA de *WHI7* a lo largo del ciclo celular en estas condiciones, señalando que la periodicidad observada a nivel de la proteína no se debe a cambios en la expresión del gen, sino más bien a mecanismos postranscripcionales. Estos mecanismos pueden afectar bien a la traducción del mRNA o a la estabilidad

de la proteína en las diferentes fases del ciclo. No obstante, dado que la cantidad de Whi7 es más reducida en fase G1, justo la única fase del ciclo celular en la que la proteína es estable, queda descartada la opción de que sea la regulación de la estabilidad de la proteína la responsable de la oscilación en sus niveles y apunta a un posible mecanismo durante el proceso de traducción como responsable de dicha oscilación.

Whi7 es un represor del programa transcripcional de *Start*

Recientemente, Whi7 ha sido relacionada con la regulación del ciclo celular, participando en el control de la retención citosólica de Cln3 (Yahya et al., 2014). En nuestro trabajo se describe que la inactivación de Whi7 da lugar a una reducción de forma significativa en el tamaño celular y a una anticipación de *Start* en células mutantes *cln3*. Este hecho resulta relevante, en primer lugar, porque indica que Whi7 desarrolla un papel clave como regulador negativo de *Start* y, en segundo lugar, porque pone de manifiesto una nueva función de Whi7 diferente de la ya conocida como regulador de Cln3. Whi7 muestra similitudes en su secuencia con el regulador de *Start* Whi5, pero hasta ahora no se había descrito ninguna función transcripcional para Whi7. Los resultados recogidos a lo largo de este trabajo proporcionan al fin evidencia de que Whi7 puede realizar la misma función que Whi5, puesto que es capaz de unirse y reprimir los promotores de los genes regulados en la transición G1/S. Diversos resultados apoyan esta idea: (1) Whi7 se asocia a los promotores de los genes *CLN2* y *RNR1* en G1 y su disociación coincide con la expresión de los genes de G1/S, del mismo modo que ocurre con Whi5; (2) la inactivación de Whi7 permite superar el defecto de células mutantes *cln3* en la expresión del gen reportero *SCB:lacZ* y su sobreexpresión en células silvestres reprime parcialmente la expresión de dicho gen; (3) la sobreexpresión de *WHI7* es letal en un mutante *cln3* debido a que permanece asociado a promotores reprimiendo su transcripción y originando así un bloqueo en *Start*; (4) finalmente, la sobreexpresión de *WHI7* y *WHI5* en la célula da como resultado un aumento aditivo del tamaño celular y la sobreexpresión de *WHI7* en células mutantes *whi5* permite recuperar el tamaño celular de células silvestres, demostrando que Whi7 es capaz de desempeñar la misma función que Whi5 y que ambas proteínas funcionan en paralelo.

En conjunto, los resultados recogidos proporcionan nuevos conocimientos en la caracterización del control de *Start*, demostrando que *Whi7* es, como *Whi5*, un represor del programa transcripcional de *Start*. Por este motivo, proponemos a *Whi7* como un parólogo funcional de *Whi5*. Esto proporciona un conocimiento más extenso de cómo *Whi7* controla el ciclo celular. Así, *Whi7* desarrolla un doble papel como represor de *Start*, mediando: (1) la retención de *Cln3* en el RE de forma dependiente de fosforilación por *Cdc28* (Yahya et al., 2014), y (2) la represión transcripcional de los promotores diana activados inicialmente por *Cln3* y más tarde por *Cln1,2* mediante un lazo de retroalimentación y de manera dependiente de *SBF*, función en la que colabora con *Whi5* (Figura 8.1). Este mecanismo de bloqueo de *Start* mediante dos vías distintas resalta la existencia y necesidad de controles robustos en la regulación del ciclo celular.

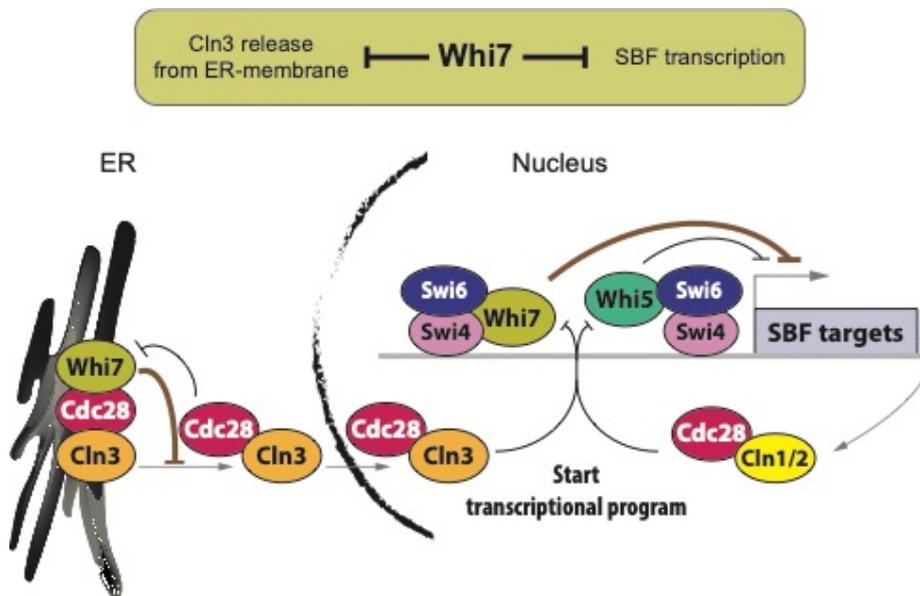


Figura 8.1. Modelo de la función de *Whi7* en el control de *Start*. *Whi7* desempeña una doble función represora antes de que tenga lugar la transición de *Start*: media la retención de *Cln3* en el RE y colabora con *Whi5* en la represión de la transcripción mediada por *SBF*.

Comparación del mecanismo de asociación a promotores de los represores transcripcionales de *Start* Whi7 y Whi5

Todos los resultados obtenidos demuestran la existencia de redundancia funcional entre las proteínas Whi7 y Whi5, ya que las dos participan en la represión del programa transcripcional de *Start*. La redundancia funcional es una de las características que comparten muchos de los reguladores del ciclo celular, lo que permite asegurar la progresión del ciclo y la supervivencia celular, de ahí su importancia. Sin embargo, la redundancia funcional entre proteínas no supone necesariamente que las proteínas realicen exactamente la misma función. De hecho, el papel de Whi5 en la regulación de *Start* resulta más relevante que el de su parólogo funcional Whi7. Evidencia de ello es que la inactivación de Whi5 da lugar a una disminución del tamaño celular y del porcentaje de células sin yema en cultivos asincrónicos, mientras que la inactivación de Whi7 solo muestra una ligera disminución en el porcentaje de células sin yema, sin afectar a la distribución del tamaño celular. Únicamente cuando se inactiva Whi7 en un fondo mutante *cln3*, que presenta la transición de *Start* comprometida, se detecta una disminución del tamaño celular. En cualquier caso, este efecto es menor que el observado al inactivar Whi5 en este mismo fondo genético. Además, la sobreexpresión de *WHI5*, pero no de *WHI7*, da lugar a un aumento severo del tamaño celular. Por tanto, el efecto observado sobre el tamaño celular, así como sobre el porcentaje de células que se encuentran en fase G1, indica que el papel de Whi5 es más crítico que el de Whi7 para una correcta cinética de *Start*. Apoyando este hecho se encuentran los resultados obtenidos mediante ChIP al inmunoprecipitar Whi7 y Whi5 con el mismo sistema de etiquetaje, en los que se refleja un enriquecimiento de 3 a 4 veces mayor del fragmento del promotor del gen *CLN2* al inmunoprecipitar Whi5 que Whi7 (Gomar-Alba et al., 2017).

En el caso de proteínas redundantes que colaboran en la misma función celular, históricamente se han planteado dos modelos que permitiesen explicar las diferencias respecto a su especificidad funcional (Nasmyth, 1996b; Stern and Nurse, 1996). El modelo cuantitativo basa la especificidad de distintas proteínas en las diferencias en sus niveles a lo largo del ciclo celular, mientras que el modelo cualitativo propone que la especificidad de una proteína está determinada por alguna característica

intrínseca diferencial de la misma. En un principio se podría pensar que las diferencias en la especificidad de función entre Whi7 y Whi5, en concreto el papel más relevante de Whi5 en el control de *Start* comentado anteriormente, se podrían deber a diferencias en sus niveles, ya que la abundancia (aproximadamente 12 veces más) y la estabilidad de la proteína Whi5 en la célula es mucho mayor que la de Whi7. Así surge la siguiente pregunta: ¿si la cantidad de Whi7 en la célula fuera equivalente a la de Whi5 las diferencias de especificidad entre ambas proteínas desaparecerían? A favor de esta hipótesis se encuentra el hecho de que el tamaño celular de un mutante *whi5* vuelve a ser el de una cepa silvestre al sobreexpresar *WHI7*. Sin embargo, hay que resaltar que en este experimento se utilizó un promotor *GAL1* muy potente que da lugar a la acumulación de una gran cantidad de proteína Whi7 en las células, lo que impide ser concluyente. Por el contrario, la sobreexpresión de *WHI7* no ocasiona un aumento significativo en su unión a promotores cercano a los valores que se observan para Whi5. Además, en presencia de Congo Red Whi7 es el represor que juega el papel principal, aunque la inducción de 4 veces en sus niveles no es suficiente para alcanzar los niveles de Whi5 en su unión a promotores. Estas observaciones estarían reflejando que las diferencias en la función de estas proteínas no se deben solo a diferencias en sus niveles sino también a la existencia de alguna/s característica/s intrínseca/s distintas en las mismas.

Un análisis más exhaustivo de la asociación a promotores de Whi7 y Whi5 demuestra que Whi7 comparte con Whi5 la asociación a los promotores de todos los genes analizados: genes de ciclinas de *Start* (*CLN2* y *CLN1*), genes de pared celular (*FKS1*, *MNN1* y *GAS1*) y genes de metabolismo del DNA (*RNR1*). Los experimentos de CHIP realizados, en los que se inmunoprecipitó tanto Whi7 como Whi5 a partir de extractos totales procedentes de las mismas células, muestran que cada proteína presenta diferente afinidad por los distintos promotores. Mientras que Whi5 presenta mayor especificidad por los genes de las ciclinas de *Start*, la especificidad de Whi7 es mayor por genes de pared celular. Este resultado concuerda con lo observado al inmunoprecipitar Whi7 y Whi5 empleando el mismo epítipo (Gomar-Alba et al., 2017). Como se ha comentado, se observa una asociación de 3 a 4 veces más fuerte de Whi5 que de Whi7 en el promotor del gen *CLN2*. En cuanto a los promotores de genes de pared celular, se observa el mismo valor de

asociación al inmunoprecipitar tanto Whi7 como Whi5; no obstante, teniendo en cuenta que hay mucha menos proteína Whi7 que Whi5 en la célula, este resultado refleja una mayor afinidad de Whi7 por los promotores de genes de pared celular. En conclusión, el hecho de que Whi7 y Whi5 se distribuyan de manera diferente entre los distintos promotores de los genes a los que se asocian es un resultado importante que revela la existencia de determinantes diferenciales en su asociación a promotores.

La expresión periódica en G1/S está mediada por los factores transcripcionales SBF y MBF. Es conocido que el represor transcripcional Whi5 se une a promotores de genes de *Start* a través del factor SBF (de Bruin et al., 2004; Costanzo et al., 2004). En cuanto a Whi7, su asociación a los promotores *CLN2* y *RNR1* no se ve afectada por la ausencia de Mbp1, pero sí que se ve alterada en ausencia de Swi4 o Swi6, confirmando que la unión de Whi7 a promotores está mediada principalmente por SBF. Sin embargo, un análisis más detallado refleja una diferencia fundamental en la asociación de Whi7 y Whi5 a promotores. Whi5 se asocia a través del factor transcripcional SBF íntegro, puesto que no se detecta su unión a promotores ni en un mutante *swi6* ni en un mutante *swi4*. En el caso de Whi7, se observa unión a promotores en ausencia de Swi6 en la célula, lo cual indica que Whi7 también es capaz de asociarse a promotores a través de Swi4 monomérico. De hecho, se ha descrito que Swi4 monomérico es el único factor transcripcional de *Start* activo en células mutantes *swi6* (Nasmyth and Dirick, 1991; Wijnen et al., 2002). Apoyando esta idea se encuentra el hecho de que Swi4 se asocia a los mismos promotores que Whi7 en un mutante *swi6*, destacando el caso del gen *FKS1*, al que Swi4 apenas ve afectada su unión y que coincide con ser el gen a cuyo promotor Whi7 presenta mayor asociación en ausencia de Swi6. Además, Whi7, pero no Whi5, es capaz de interactuar físicamente *in vivo* con Swi4 en ausencia de Swi6 en la célula. Estos resultados revelan una diferencia clave entre Whi7 y Whi5 como represores transcripcionales de *Start*, puesto que, a diferencia de Whi5, Whi7 reprime la expresión de genes de G1/S, no solo a través de SBF, sino también a través de Swi4 monomérico (Figura 8.2). Teniendo en cuenta que Swi4 monomérico tiene la capacidad de actuar como factor transcripcional en *Start*, esta función de Whi7 puede resultar relevante para la fisiología celular.

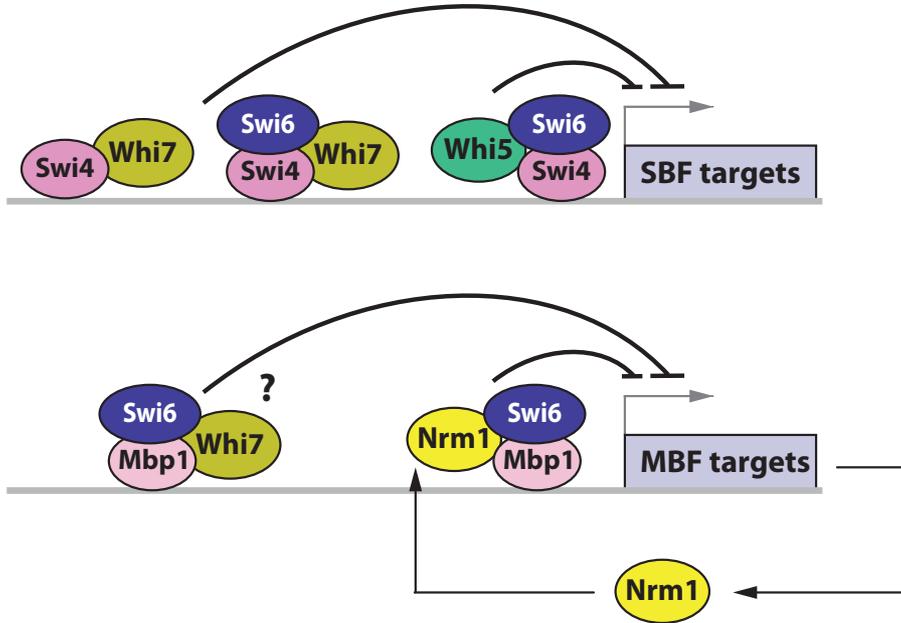


Figura 8.2. Mecanismo de asociación a promotores de los represores del programa transcripcional de *Start* Whi7, Whi5 y Nrm1.

Hay que resaltar que en un mutante *swi4* todavía se observa algo de unión de Whi7 a promotores, sugiriendo que, pese a que la unión de Whi7 a los mismos no se ve afectada en mutante *mbp1*, Whi7 también podría asociarse a promotores a través del factor transcripcional MBF. En este sentido, hemos observado que Mbp1 es capaz de unirse a los mismos promotores a los que se une Whi7 en ausencia de Swi4. Hay que destacar una vez más el caso del gen *FKS1*, gen en el que Mbp1 presenta más unión en un mutante *swi4* y que coincide con ser el gen a cuyo promotor Whi7 presenta mayor asociación en ausencia de Swi4. Sin embargo, diversas aproximaciones enfocadas al estudio de la interacción física entre Whi7 y Mbp1 o al estudio de la capacidad de Whi7 para asociarse al promotor del gen *CDC21* (regulado exclusivamente por MBF), no nos permiten afirmar con rotundidad que Whi7 también sea capaz de unirse a promotores a través de MBF. Cabe la posibilidad de que la interacción entre Whi7 y MBF sea débil y secundaria, motivo por el no seríamos capaces de detectar la interacción física entre ambas proteínas, ni la asociación de Whi7 al promotor de *CDC21*. Por ello, podría analizarse la asociación de Whi7 a promotores de otros genes

regulados exclusivamente por MBF por los que Whi7 presente una unión más fuerte que la observada para el caso del gen *CDC21*, y, en última instancia, analizar la asociación de Whi7 a promotores en un doble mutante *swi4 mbp1*. El único represor conocido de MBF es Nrm1, el tercer miembro de la familia de proteínas con el motivo GTB (*G1/S transcription factor binding*) en su estructura e implicado en la represión transcripcional de G1/S (Travesa et al., 2013). Sin embargo, su papel represor, a diferencia del de Whi7 y Whi5, no tiene lugar hasta que no se ha ejecutado *Start*, una vez ha sido transcrito por el propio MBF (de Bruin et al., 2006). La posibilidad de que Whi7 pueda reprimir a MBF antes de *Start* aporta un nuevo mecanismo a la regulación de dicho programa transcripcional (Figura 8.2). Al igual que la actuación de Whi7 sobre Swi4 monomérico, este nuevo mecanismo podría tener relevancia biológica en ciertas condiciones en las que sea necesario bloquear al factor MBF antes de *Start*.

Una cuestión que queda abierta es el papel de la fosforilación de Whi7 en esta nueva función como represor transcripcional. Una versión no fosforilable de Whi7 por Cdc28 es capaz de asociarse y disociarse de manera normal de los promotores. En el caso de Whi5, la mutación de todos los sitios de fosforilación por Cdc28 no tiene ningún efecto en *Start*, únicamente resulta letal cuando se combina con una versión no fosforilable de Swi6 por Cdc28 (Costanzo et al., 2004; Wagner et al., 2009). Este hecho sugiere que la fosforilación de Whi5 y Swi6 son necesarias para la disociación de Whi5 de los promotores. Cabe la posibilidad de que la disociación de Whi7 de SBF se produzca también como consecuencia de múltiples y redundantes eventos de fosforilación en Whi7 y Swi6. Apoyando la idea de que la fosforilación de Whi7 podría ayudar en su liberación de los promotores, se encuentra el hecho de que se observa una mayor asociación a los promotores con la versión no fosforilable de Whi7 que con la versión silvestre. No obstante, la co-expresión de una versión de Whi7 con todos los posibles sitios de fosforilación por Cdc28 mutados junto con la versión de Swi6 no fosforilable por Cdc28 no resulta letal. Esto podría sugerir o bien que la fosforilación de Whi7 no es necesaria para su disociación de promotores o que, siendo necesaria, además de su fosforilación y la de Swi6 se requiera la fosforilación de Swi4. Esta última posibilidad cobra más relevancia teniendo en cuenta que Whi7 es capaz de asociarse a Swi4 monomérico.

Regulación de la localización de los represores transcripcionales de *Start* Whi7 y Whi5

Muchas proteínas controlan su función, entre otros mecanismos, mediante la regulación de su localización subcelular. Respecto a los factores transcripcionales esta regulación espacial implica necesariamente un mecanismo de importación al núcleo y en algunos casos también de exportación. Ya se ha descrito que la localización de Whi5 a lo largo del ciclo celular es dinámica, localizándose en el núcleo desde la salida de mitosis hasta la transición G1/S y acumulándose en el citoplasma durante el resto de las fases del ciclo celular (Costanzo et al., 2004). En este estudio hemos identificado que la localización subcelular de Whi7 también se encuentra regulada a lo largo del ciclo celular, siguiendo la misma cinética de localización que Whi5: únicamente es nuclear en la fase G1. Sin embargo, existe una diferencia importante, mientras que Whi5 es completamente nuclear, Whi7 se distribuye entre el núcleo y el citosol de la célula, sin llegar a ser totalmente nuclear en ninguna de las fases del ciclo celular. Como ya se ha indicado, Whi7 es una proteína inestable, cuya degradación depende de la ubiquitina-ligasa SCF^{Grr1}. Hemos observado que la localización subcelular de Whi7 no se ve alterada en un mutante *grr1*, en el que tiene lugar la estabilización de la proteína. Esto indica que la desaparición de la señal nuclear de Whi7 no se debe a la degradación de la proteína sino a la existencia de un mecanismo activo de exportación.

En el caso de Whi5, los determinantes responsables de su regulación espacial son conocidos. Se ha descrito que la exportación de Whi5 del núcleo es dependiente de la carioferina Msn5 y de la fosforilación por Cdc28 de residuos específicos en la señal NES comprendida entre los aminoácidos 51 a 167 (Taberner et al., 2009). Nosotros hemos identificado que la exportación de Whi7 también está controlada por fosforilación por Cdc28, ya que una versión de Whi7 con todos los posibles sitios de fosforilación por Cdc28 mutados es nuclear en todas las fases del ciclo. Sin embargo, no se observa acumulación nuclear de Whi7 en un mutante *msn5*. Además, la secuencia de Whi7 homóloga a la NES de Whi5 no es reconocida como señal de exportación nuclear. Aunque no se puede descartar totalmente una contribución de Msn5 (se observa de manera consistente un pequeño porcentaje de células fuera de la fase G1 con acumulación nuclear), ambos resultados indican que la

exportación de Whi7 no requiere de la carioferina Msn5, señalando una diferencia en el modo en el que Whi7 y Whi5 ven regulada su localización subcelular.

Por otra parte, la importación de Whi5 al núcleo es dependiente de la vía clásica de importación, en la que la importina β/α (Kap95/Kap60 en *S. cerevisiae*) reconoce dos señales NLS clásicas y redundantes entre sí en el extremo N-terminal de la proteína (Taberner et al., 2009). En el caso de Whi7, no existen señales NLS clásicas en su secuencia, por lo que su importación al núcleo podría tener lugar en compañía de otras proteínas que forman parte de la maquinaria de *Start*, como pueden ser las subunidades que forman los factores transcripcionales SBF y MBF o la ciclina Cln3. Sin embargo, la localización de Whi7 no se muestra afectada, detectándose señal nuclear, en los mutantes *swi6*, *swi4*, *mbp1* y *cln3*, lo que concuerda con que Whi7 sea capaz de asociarse a promotores en ausencia de estas proteínas. En resumen, estos resultados en conjunto ponen de manifiesto que Whi7 y Whi5, pese a seguir la misma cinética de localización subcelular, difieren en sus mecanismos de exportación e importación. Queda abierta la puerta al estudio detallado de los mecanismos responsables de la localización subcelular de Whi7, pudiendo estar implicadas otras vías de exportación y de importación, que reconozcan otro tipo de NLS no clásicas.

Regulación del represor transcripcional de *Start* Whi7 por la ruta PKC

Trabajos anteriores habían conectado la ruta de integridad de la pared celular (CWI) o ruta de la proteína quinasa C y la expresión del gen *WHI7*. En nuestro grupo se identificó que la expresión de *WHI7* se encuentra reducida en un mutante *pkc1*, quinasa de la ruta PKC (Martínez-Bono, B., 2005). Otros estudios globales reflejaron una inducción del gen *WHI7* en diferentes condiciones que afectan a la integridad de la pared celular de la levadura (Boorsma et al., 2004; García et al., 2004; Lagorce et al., 2003). También se ha descrito que la expresión de *WHI7* se induce por estrés de pared celular en presencia del compuesto Congo Red de manera dependiente de Slt2 (Belén Sanz et al., 2012). En este trabajo, se ha dado un paso más en la caracterización de la regulación de la expresión del gen *WHI7* por la ruta PKC. En concreto, hemos descrito que la MAP quinasa de la ruta, Slt2, a través del factor transcripcional Rlm1, es responsable de la expresión de *WHI7* en condiciones basales. También hemos descrito que la inducción de la expresión

de *WHI7* por choque térmico requiere de la actividad de Pkc1. Hay que indicar que el mutante *pkc1* no presenta un defecto en la expresión del gen *WHI7* tan severo como el observado en el caso del mutante *slt2*. Esto puede deberse a la presencia de cierta actividad Pkc1 en el mutante termosensible o a que la expresión del gen en condiciones basales no requiera actividad Pkc1. Por otra parte, el papel de Pkc1 es importante en el control de la estabilidad de Whi7, probablemente mediante su fosforilación, ya que según nuestros análisis promueve la degradación de la proteína, la cual se acumula en su estado hipofosforilado en un mutante *pkc1*.

Hay que destacar que el nivel de expresión de Whi7 en los mutantes *slt2* y *rlm1* es prácticamente nulo, lo que apunta a una conexión funcional muy estrecha entre la MAPK Slt2 y el represor transcripcional Whi7. Slt2, a través de Rlm1, regula principalmente la expresión de genes de pared celular (Jung and Levin, 1999). Por otro lado, también se ha descrito una conexión de Slt2 con los componentes de SBF, Swi4 y Swi6 (Baetz et al., 2001; Kim et al., 2008, 2010; Truman et al., 2009) y que SBF a su vez participa en la expresión de genes de pared (Iguar et al., 1996). Todas estas conexiones sugieren que la función de Whi7 como represor de *Start* podría resultar más relevante bajo determinadas condiciones, como por ejemplo condiciones de estrés de pared celular, en las que hay una mayor actividad de la ruta PKC. De hecho, diversos resultados en condiciones de estrés de pared celular (altas temperaturas o presencia del compuesto Congo Red) proporcionan evidencia de ello: la delección de *WHI7* suprime la sensibilidad y el bloqueo en fase G1 de un mutante *cln3* en respuesta a elevadas temperaturas y al compuesto Congo Red. El hecho de que la inactivación de Whi7 en células mutantes *swi4* y *swi6* no permita suprimir la letalidad de estos mutantes en presencia de Congo Red, indica que la función de Whi7 en condiciones de estrés de pared celular tiene lugar a través de SBF. Es importante destacar que contrariamente a todo lo observado con Whi7, la ruta PKC no afecta a los niveles celulares de Whi5, estableciéndose así una diferencia clave entre ambos represores transcripcionales. Consistente con esto, la delección de *WHI7* tiene mayor efecto que la de *WHI5* en el crecimiento celular a altas temperaturas o en presencia de Congo Red. En conclusión, todos estos resultados indican que en situaciones de estrés de pared celular es Whi7 y no Whi5 el represor transcripcional que juega un papel principal en el control de *Start*.

En presencia del compuesto Congo Red se produce un aumento en los niveles de Whi7, pero no de Whi5, lo que además concuerda con que sea la ruta PKC la encargada de regular sus niveles celulares. Una posible explicación al papel fundamental que desarrolla Whi7 como represor de *Start* en condiciones de estrés de pared celular podría radicar en que el aumento en los niveles de Whi7 origine una sustitución funcional de Whi5 por Whi7 como principal represor transcripcional de *Start*. En este sentido, los experimentos de ChIP realizados en el mutante *cln3* en presencia del compuesto Congo Red mostraban un aumento en la unión de ambos represores a los promotores de todos los genes analizados. No obstante, en ningún caso revelaban una sustitución en la unión de estos represores ni a promotores de genes de *Start* (ej. *CLN2* o *CLN1*) ni a promotores de genes de pared (ej. *FKS1* o *MNN1*). Este hecho sugiere que otros mecanismos independientes de la asociación a promotores actúan de manera diferencial sobre la funcionalidad de Whi7 y Whi5 para convertir a Whi7 en el represor transcripcional de *Start* de referencia en estas condiciones de estrés de pared celular.

Conexión de Whi7 y la respuesta a estrés genotóxico

Whi7 fue aislado inicialmente como un supresor en multicopia del mutante en el *checkpoint* de daño en el DNA *rad53* (Desany et al., 1998), sugiriendo por primera vez la existencia de una posible relación entre Whi7 y el *checkpoint* de integridad del DNA. Los resultados recogidos en este trabajo revelan que efectivamente la sobreexpresión del gen *WHI7* suprime la letalidad de un mutante *rad53*. Además, se ha descrito que Whi7 se asocia al promotor del gen *CLN2* en presencia de HU (Travesa et al., 2013). Estudios transcriptómicos globales más recientes también sugieren que el gen *WHI7* se encuentra sobreexpresado en presencia del agente genotóxico MMS o de HU (Waern and Snyder, 2013). En conjunto, todos estos resultados preliminares sugieren una relación entre Whi7, el *checkpoint* de integridad del DNA y la respuesta a estreses genotóxicos, un tipo adicional de estrés celular. Es necesario comentar que el papel de Whi5 en la supresión del mutante *rad53* es más suave que el de Whi7, ya que su sobreexpresión únicamente tiene un ligero efecto sobre el crecimiento de células mutantes *rad53*. Esto supone la existencia de una condición de estrés celular adicional en la que el papel de Whi7 parece más relevante que el de Whi5. En una aproximación inicial hemos observado: (1) un ligero aumento en la estabilidad de la proteína Whi7

en respuesta a HU; (2) la supresión de la sensibilidad a MMS por la sobreexpresión de *WHI7*; y (3) un aumento en la sensibilidad a HU de células mutantes *pkc1* al sobreexpresar *WHI7*. Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de una relación entre el represor transcripcional de *Start* *Whi7* y la respuesta a daño en el DNA. Estudios más completos se llevarán a cabo en un futuro para descifrar la relevancia de *Whi7* en esta condición en particular.

Whi7 y Whi5: un juego de dos

En conjunto, todos los resultados recogidos en esta tesis demuestran que *Whi7*, no solo presenta homología de secuencia con el represor transcripcional de *Start* *Whi5*, sino que además es un parólogo funcional del mismo. La redundancia funcional entre proteínas es una de las características principales que comparten muchos de los reguladores clave del ciclo celular. La existencia de dos proteínas represoras de *Start* representa una ventaja evolutiva para la célula. Sin embargo, pese a la redundancia funcional que existe entre los represores transcripcionales de *Start* *Whi7* y *Whi5*, hemos descrito que ambas proteínas difieren tanto en su regulación como en su funcionalidad (Tabla 3). Todas estas diferencias en características y regulación de *Whi7* en comparación con *Whi5* podrían contribuir a un control más robusto de *Start* en circunstancias específicas. Por un lado, los diferentes requisitos intrínsecos para la unión de *Whi7* a promotores confieren una nueva capacidad de represión de los genes de *Start* más allá de la represión mediada por *Whi5*, en particular en lo que se refiere a la regulación del factor de transcripción *Swi4*, del que se sabe que es capaz de activar la transcripción de los genes de *G1/S* por sí solo. Por otro lado, las diferencias en la regulación de la expresión de *Whi7* y *Whi5* proporcionan un mecanismo alternativo por el que la represión de *Start* puede verse afectada en respuesta a señales internas o externas. *Whi5* destaca como represor transcripcional de *Start* en condiciones normales, mientras que la función de *Whi7* como represor de *Start* toma relevancia en condiciones particulares de estrés celular. En concreto, en este trabajo se ha identificado que *Whi7* tiene una función más importante que su parólogo *Whi5* bajo condiciones de estrés de pared celular o en respuesta a estrés genotóxico. De hecho, apoyando la idea de que la función de *Whi7* sería más importante en determinadas circunstancias, se ha descrito que los niveles de mRNA de *WHI7*, pero no los de *WHI5*, también se encuentran incrementados en presencia de Calcofluor White, Congo Red,

MMS, HU, sal o factor α (Waern and Snyder, 2013), así como en las células madre tras 12 generaciones (Yiu et al., 2008), lo que apunta a un papel específico de Whi7 restringiendo la entrada al ciclo celular durante el envejecimiento replicativo. La existencia de dos proteínas represoras de *Start* ciertamente debe representar una ventaja evolutiva para la célula.

Las similitudes en el control del sistema de regulación de la transición G1/S entre levaduras y mamíferos son llamativas. En células de mamífero, superar el punto de restricción implica la activación de la expresión génica de una gran cantidad de genes por la familia de factores de transcripción E2F-DP (Bertoli et al., 2013). Antes de G1 tardío, la transcripción es reprimida debido a la asociación de proteínas pertenecientes a la familia Retinoblastoma (Rb, p107, p130) a los factores transcripcionales E2F. La activación inicial es desencadenada por la fosforilación del represor transcripcional Rb por el complejo CDK4,6-ciclina D originando la disociación de dicho represor de E2F. Como consecuencia, se expresa el gen de la ciclina E, dando lugar a un lazo de retroalimentación positivo en el que el complejo CDK2-ciclina E fosforila al represor Rb para mantener activa la transcripción. En células de levadura, es fácil reconocer la misma estrategia reguladora en el control de *Start*, en el que los papeles de la ciclina D, los factores transcripcionales E2F-DP, el represor transcripcional Rb y la ciclina E son desarrollados por la ciclina Cln3, los factores transcripcionales SBF/MBF, el represor transcripcional Whi5 y las ciclinas Cln1,2, respectivamente. Whi5 era el único factor en levadura conocido encargado de mantener reprimido el programa transcripcional de *Start* antes de la ejecución de *Start*. En este trabajo, hemos demostrado que, tal y como ocurre en células de mamífero, la levadura también hace uso de múltiples represores transcripcionales antes de que se ejecute *Start*, extendiendo más si cabe el paralelismo entre levaduras y células de mamíferos. Debido a la conservación de las vías reguladoras, entender la interacción entre los represores Whi5 y Whi7 en levaduras podría proporcionar nuevos conocimientos sobre cómo distintas proteínas de la familia Rb se entrelazan para controlar el ciclo celular en células de mamífero. Además, el hecho de que un miembro de la familia Rb se encuentre mutado en casi todos los tipos de tumores subraya la importancia de estudiar el papel de estos represores de G1, y dada la relevancia de la levadura como

organismo modelo para el estudio del ciclo celular, una investigación más en profundidad sobre Whi7 y Whi5 es relevante.

	Whi5	Whi7
Need of Swi4 for association to promoters	✓	✓
Need of Swi6 for association to promoters	✓	✗
Interaction with Swi4 in the absence of Swi6	✗	✓
Protein levels	↑↑	↓↓
mRNA levels	↓	↑
Protein stability	↑↑↑↑	↓↓↓↓
Nuclear accumulation in G1	✓	✓
Nuclear localization regulated by Cdc28 phosphorylation	✓	✓
Msn5-mediated nuclear export	✓	✗
Kap95-dependent classical NLS	✓	✗
Regulation of gene expression by Slt2/Rlm1	✗	✓
Regulation of protein stability by Pkc1	✗	✓
Main Start transcriptional repressor	Normal conditions	Stress conditions

Tabla 3. Análisis comparativo de Whi7 y Whi5.

Función de PKC δ en el *checkpoint* de integridad del DNA

Las proteínas que desarrollan funciones celulares importantes se encuentran conservadas evolutivamente desde levaduras hasta humanos. En *S. cerevisiae* existe una única proteína quinasa C, Pkc1, mientras que en células de mamífero existen múltiples isoformas PKC con diferentes especificidades de sustrato, lo que dificulta la comprensión de los sistemas de

señalización en los que se encuentran implicadas. Diferentes isoformas favorecen determinadas funciones según el tipo celular, como resultado, en parte, de los diferentes patrones de compartimentación subcelular específicos de cada una de ellas, interacciones proteína-proteína y modificaciones postraduccionales que influyen en su función catalítica. Por ello, estudios en organismos más sencillos, como la levadura, pueden contribuir al entendimiento de las funciones que llevan a cabo las distintas isoformas PKC en las células de mamíferos al poder estudiar una de ellas en ausencia de las otras. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que PKC δ , y en menor grado la isoforma novel más cercana filogenéticamente a ella, PKC θ , desarrollan funciones celulares que están conservadas desde levaduras hasta humanos, como el control de procesos morfogénéticos y el mantenimiento de la integridad genómica.

En la levadura *S. cerevisiae* la inactivación de Pkc1 conduce a la muerte por lisis celular en ausencia de un protector osmótico como el sorbitol (Levin and Bartlett-Heubusch, 1992; Paravicini et al., 1992). Este fenotipo está relacionado con el papel de Pkc1 en el mantenimiento de la integridad celular. PKC δ es capaz de suprimir este defecto de crecimiento asociado a mutantes *pkc1*. No obstante, esta capacidad queda anulada a elevadas temperaturas, presumiblemente porque el fenotipo de lisis celular sea más severo en dicha condición. El hecho de que la presencia de sorbitol alivie este defecto de crecimiento a altas temperaturas apoya esta hipótesis. PKC δ puede, por tanto, desempeñar un papel similar al de Pkc1 en el mantenimiento de la integridad de la pared celular, lo que es consistente con que PKC δ se localice, del mismo modo que Pkc1, en zonas de polarización en la levadura. La capacidad de PKC δ para desarrollar funciones morfogénéticas puede resultar aparentemente sorprendente, puesto que el control de estas funciones por parte de Pkc1 de la levadura depende de su interacción con la proteína Rho1 (Schmitz et al., 2002). De todas las PKCs de mamíferos, solo las PRKs contienen el dominio HR1 que permite interactuar con GTPasas de la familia Rho (Mellor and Parker, 1998), situándolas inicialmente como proteínas candidatas para desarrollar funciones de tipo morfogénico en la levadura. Sin embargo, además del dominio HR1, se ha descrito que Pkc1 de la levadura es capaz de interactuar con la proteína Rho1 a través de su dominio C1 (Nonaka et al., 1995). Este dato sugiere que, de forma similar a como ocurre con Pkc1, el

dominio C1 presente en PKC δ podría ser el responsable de la regulación de los procesos morfogénicos en la levadura *S. cerevisiae* e incluso de desarrollar funciones relacionadas con Rho-GTPasas en células de mamíferos.

Por otro lado, la ausencia de actividad Pkc1 en la levadura conlleva el fallo de la activación del *checkpoint* de integridad del DNA en respuesta a agentes genotóxicos (Soriano-Carot et al., 2014). Este fenotipo está asociado al papel de Pkc1 en el mantenimiento de la integridad genómica. El hecho de que PKC δ pueda suprimir el defecto en la activación del *checkpoint* de un mutante *pkc1* termosensible, sugiere que esta isoforma puede desempeñar un papel similar al de Pkc1 en el mantenimiento de la integridad genómica. Además, del mismo modo que ocurre con Pkc1, en presencia de daño en el DNA, PKC δ se deslocaliza de las zonas de polarización en la levadura. Se ha descrito que en células de mamífero una de las dianas de PKC δ en la respuesta apoptótica de daño en el DNA es la proteína Rad9 del complejo 9-1-1 (Yoshida et al., 2003). Por ello, un posible mecanismo a través del cual PKC δ podría desempeñar su papel en la activación del *checkpoint* en la levadura *S. cerevisiae* en respuesta a daño en el DNA sería aquel que implicase a la proteína homóloga de Rad9 en levadura, Ddc1, como diana de PKC δ . Nuestro grupo identificó que Pkc1 podría participar en la vía de las dos quinasas sensoras del *checkpoint* de daño en el DNA, Mec1 y Tel1 (Soriano-Carot et al., 2014). Este dato junto con el hecho de que PKC δ es fosforilada por ATM (Li et al., 2004a), el ortólogo en mamíferos de Tel1, sugieren que Mec1 y Tel1 también podrían estar implicadas en el papel de PKC δ en el control del *checkpoint* de daño en el DNA en la levadura *S. cerevisiae*. En este sentido, se han intentado identificar aquellas proteínas de la levadura con las que PKC δ interacciona en respuesta a daño en el DNA mediante dos aproximaciones diferentes: GFP-Trap y purificación por afinidad en tándem (TAP) (resultados no mostrados). Aunque en un primer momento se identificaron posibles candidatos de interés (Cdc28, H2A, Net1, Bmh1 y Bmh2), no se pudo validar mediante ensayos de Co-IP su interacción con PKC δ en respuesta a daño en el DNA.

Adicionalmente, en este trabajo hemos descrito una nueva función para Pkc1 como regulador de los niveles celulares y de la fosforilación del represor transcripcional de *Start* Whi7. Este descubrimiento sugiere una nueva conexión entre Pkc1 y el proceso de *Start*, el punto de control del ciclo

celular más relevante para las células de levadura y que determina si una célula entrará en una nueva ronda de división celular. De forma similar a como ocurre con Pkc1 de la levadura, hemos identificado que PKC δ también es capaz de regular tanto los niveles del represor de la transición G1/S Whi7 como su fosforilación. De esta forma, aumentan, aún más si cabe, los paralelismos entre Pkc1 de la levadura y la isoforma PKC δ de mamíferos. Este resultado sugiere que PKC δ podría desarrollar algún papel en la regulación de las proteínas de la familia Rb y señala una posible conexión entre PKC δ y el control del punto de restricción en células de mamíferos. En este sentido, diversos estudios realizados en distintos tipos celulares señalan a diferentes isoformas PKC como coordinadoras de la transición G1/S (Livneh and Fishman, 1997). Un ejemplo de ellas es PKC η , una de las isoformas del grupo de las nPKCs al que también pertenece PKC δ , la cual ha sido relacionada con la inhibición de la transición G1/S debido a una disminución en la fosforilación de la proteína Rb (Livneh et al., 1996).

Llegados a este punto, nos planteamos por qué PKC δ es la única de las isoformas PKC de mamíferos capaz de desarrollar eficientemente determinadas funciones de Pkc1 en la levadura. Existen distintas posibilidades que podrían explicar esta cuestión. La primera de ellas es que la expresión de PKC δ en la levadura sea más elevada que la del resto de isoformas. Aunque no se pueda descartar totalmente, el hecho de que la expresión de todas las isoformas se realiza bajo el control del promotor de *PKC1*, apunta a que este no es el caso. En segundo lugar, también podría ocurrir que la actividad específica intrínseca de PKC δ sea más elevada que la de las otras isoformas. Sin embargo, no hay datos en la bibliografía que apoyen esta hipótesis. Una hipótesis alternativa interesante es que PKC δ sea la única isoforma que puede ser activada en la levadura debido a que presenta particularidades específicas en su regulación que la diferencian del resto de isoformas. Estas particularidades incluyen mecanismos alternativos a la fosforilación de residuos de Ser/Thr en el lazo de activación, su mayor grado de fosforilación en residuos de Tyr o su corte proteolítico mediado por caspasas. En el intento de validación de esta hipótesis se ha centrado el trabajo realizado hasta la actualidad en esta tesis.

PKC δ ha sido relacionada con la apoptosis inducida por daño en el DNA. Cuando el daño en el DNA es persistente, PKC δ es procesada por la

caspasa 3 generándose un fragmento catalítico constitutivamente activo de aproximadamente 40kDa (Emoto et al., 1995; Ghayur et al., 1996). El descubrimiento de actividades tipo caspasa en la levadura *S. cerevisiae*, como la metacaspasa Mca1/Yca1 (Madeo et al., 2002), abren la puerta a la pregunta de si PKC δ también sería capaz de ser procesada proteolíticamente en respuesta a daño en el DNA por Mca1/Yca1 en este organismo y, si es así, si el fragmento catalítico generado podría ser el responsable de que PKC δ sea capaz de activar el *checkpoint* de integridad del DNA en células de levadura. Sin embargo, los experimentos realizados hasta el momento no nos han permitido identificar que la metacaspasa Mca1/Yca1 sea capaz de procesar a la isoforma PKC δ (resultados no mostrados). Por otra parte, el hecho de que PKC θ , PKC ϵ y PKC ζ también sean procesadas por caspasas en células de mamífero (Steinberg, 2008) y, sin embargo, en respuesta a daño en el DNA ninguna de ellas tenga la capacidad de PKC δ para activar el *checkpoint* de integridad del DNA en *S. cerevisiae*, hace pensar que el procesamiento de PKC δ puede no ser el responsable de la funcionalidad de PKC δ en la levadura.

PKC δ es la isoforma PKC de mamíferos más fosforilada en residuos de Tyr. Se ha descrito que en respuesta a H₂O₂ la activación de PKC δ depende de su fosforilación en Tyr³¹¹, Tyr³³² y Tyr⁵¹² y es independiente de DAG (Konishi et al., 1997, 2001). Puesto que el tratamiento con H₂O₂ genera estrés oxidativo y que éste a su vez ocasiona daño en el DNA, estas fosforilaciones también podrían estar asociadas con el mecanismo que permita a PKC δ , y no al resto de isoformas PKC, activar el *checkpoint* de integridad del DNA en respuesta a agentes genotóxicos. Sin embargo, los ensayos realizados empleando una versión de PKC δ en la que estos tres residuos de Tyr están mutados a Phe no revelan fallo alguno en la activación de la quinasa efectora del *checkpoint* Rad53, señalando que ninguno de ellos resulta necesario *in vivo* para que PKC δ active el *checkpoint* de daño en el DNA de la levadura *S. cerevisiae*.

Para la activación de todas las isoformas PKC de mamíferos es necesaria la fosforilación de una Thr en el lazo de activación, lo que permite el correcto posicionamiento de los residuos en el centro activo y la estabilización del lazo de activación (Steinberg, 2008). El caso de PKC δ es un tanto particular, puesto que se ha descrito que *in vitro* la fosforilación de la Thr⁵⁰⁵ del lazo de activación no resulta esencial para generar una enzima catalíticamente competente, aunque sí que afecta a la funcionalidad de la enzima (Stempka et

al., 1997). Diversos estudios señalan a dos mecanismos alternativos como responsables de la estabilización del lazo de activación en ausencia de fosforilación de la Thr⁵⁰⁵: (1) la carga negativa del residuo ácido distal a la Thr⁵⁰⁵, Glu⁵⁰⁰, podría jugar el mismo papel que la carga negativa del fosfato de la Thr⁵⁰⁵ en el posicionamiento de los residuos del centro activo para generar una enzima catalíticamente competente (Stempka et al., 1999); (2) las interacciones hidrofóbicas entre diferentes residuos de la proteína, incluidos determinados residuos presentes en la hélice A (Liu et al., 2006). De todas las isoformas del grupo de las nPKCs de mamíferos, solo PKC θ dispone también de un residuo ácido distal a la Thr del lazo de activación, Asp⁵³³, mientras que el mecanismo de interacciones hidrofóbicas en el que se ve involucrado la hélice A es específico de PKC δ , ya que es la única de las isoformas PKC de mamíferos con la denominada hélice A y con determinados residuos clave necesarios para que se den dichas interacciones hidrofóbicas.

Por todo esto nos planteamos estudiar en primer lugar el papel de la fosforilación del lazo de activación. Los resultados obtenidos demuestran que la fosforilación de la Thr⁵⁰⁵ del lazo de activación no resulta necesaria *in vivo* para que PKC δ active el *checkpoint* de daño en el DNA en respuesta a agentes genotóxicos. No obstante, la ausencia de fosforilación en este residuo da lugar a una activación menos eficiente de la quinasa efectora del *checkpoint* Rad53, sugiriendo que la fosforilación de la Thr⁵⁰⁵ del lazo de activación es importante para la funcionalidad de PKC δ . Este resultado se encuentra en consonancia con lo descrito en experimentos *in vitro* por Stempka y colaboradores que describen que PKC δ es funcional en ausencia de esta fosforilación (Stempka et al., 1997). Además, sugiere que las quinasas Pkh1 y Pkh2 de *S. cerevisiae*, homólogos de la quinasa PDK-1 en células de mamífero y responsable de fosforilar el lazo de activación de las quinasas PKC (Newton, 2010), son capaces de fosforilar y activar a PKC δ .

Por otra parte, hemos identificado que el Glu⁵⁰⁰ no resulta relevante para la funcionalidad de PKC δ , puesto que la mutación de este residuo en la proteína silvestre o en la proteína con la Thr⁵⁰⁵ mutada no afecta a la capacidad de ninguna de ellas para activar a la quinasa Rad53. Es interesante recordar que PKC θ , la única isoforma, además de PKC δ , que muestra cierta capacidad para activar el *checkpoint* de integridad del DNA en la levadura *S. cerevisiae*, es también la única que contiene un residuo ácido distal a la Thr⁵³⁸

del lazo de activación, el Asp⁵³³. Aunque en el caso de PKC δ la eliminación del Glu⁵⁰⁰ no parece tener ningún efecto sobre la capacidad de la proteína para activar el *checkpoint* de integridad del DNA, no se puede descartar que este residuo ácido esté implicado en el desarrollo de esta misma función en el caso de PKC θ . En el caso de PKC δ el papel del Glu⁵⁰⁰ podría estar enmascarado por la existencia del mecanismo adicional en el que se ve involucrada la hélice A.

Por último, se analizó la implicación de los residuos Tyr³³² y Trp³³⁶ de la hélice A, así como de la Phe⁴⁹⁸ y Phe⁵²⁵, residentes en el lazo de activación y en la hélice F, respectivamente, cuya implicación resulta clave en el mecanismo de interacciones hidrofóbicas para estabilizar el lazo de activación en ausencia de fosforilación en la Thr⁵⁰⁵ (Liu et al., 2006). En una primera aproximación nos centramos en romper las diferentes interacciones implicadas en dicho mecanismo mediante la sustitución de los residuos implicados por aquellos presentes en las isoformas PKC θ y/o PKC ϵ . En ningún caso encontramos que alguno de estos residuos fuese necesario *in vivo* para la activación del *checkpoint* de daño en el DNA por PKC δ . En el caso de la Phe⁵²⁵, su sustitución por el aminoácido presente en esa misma posición en la isoforma PKC ϵ (Pro) origina que PKC δ pierda su capacidad para activar el *checkpoint* de integridad del DNA, ya que no se observa fosforilación de la quinasa Rad53. Sin embargo, la sustitución de esta misma Phe⁵²⁵ por el aminoácido presente en esa misma posición en PKC θ (His) no tiene ningún efecto sobre la capacidad de PKC δ para activar el *checkpoint* de daño en el DNA. Este resultado nos llevó a pensar que la pérdida de la capacidad de PKC δ para activar el *checkpoint* en respuesta a daño en el DNA al sustituir la Phe⁵²⁵ por Pro se debía más bien a la introducción del aminoácido Pro y no en sí a la eliminación de la Phe. La Pro es un aminoácido caracterizado por su capacidad como disruptor de hélices, lo que podría provocar un cambio en la conformación de la proteína que diera lugar a la pérdida de dicha capacidad. De hecho, la aparición de bandas truncadas en el Western blot de la proteína con la Phe⁵²⁵ mutada a Pro (resultados no mostrados) apunta a esa dirección.

En resumen, la disrupción por separado de los diversos mecanismos descritos en la regulación de PKC δ en células de mamíferos no ha revelado el papel esencial de ninguno de ellos en la activación del *checkpoint* de integridad del DNA en levadura. Es probable que en el contexto de la proteína completa puedan contribuir más de un mecanismo. Por ello, para completar el

análisis realizado sería necesario analizar la funcionalidad de los mutantes obtenidos en residuos de Tyr o residuos implicados en la estabilización del lazo de activación en ausencia de la fosforilación de la Thr⁵⁰⁵ del lazo de activación, puesto que la fosforilación de este residuo podría estar enmascarando el efecto de estos mecanismos adicionales. Otra aproximación que podría ofrecer resultados concluyentes sería la construcción de versiones truncadas. En ausencia de la región reguladora N-terminal, se ha descrito que la presencia de la hélice A es necesaria para la actividad del fragmento catalítico de PKC δ en ausencia de fosforilación de la Thr⁵⁰⁵ del lazo de activación (Liu et al., 2006). La obtención de diferentes versiones truncadas de la proteína, que incluyan o no la extensión en la que se encuentra la hélice A, tanto en presencia como en ausencia de fosforilación del lazo de activación, podría resultar de gran interés para resolver preguntas que quedan abiertas y abrir otras nuevas, como si eliminar la región reguladora del resto de isoformas nPKCs o, en su caso, añadir a estas versiones truncadas la extensión con la hélice A de PKC δ , les permitiría ser activas en la levadura y, por tanto, capaces de desarrollar las funciones de Pkc1. Futuros experimentos se realizarán para tratar de dar respuesta a estas preguntas.

9. Conclusiones

1. Whi7 es una proteína regulada a lo largo del ciclo celular. Sus niveles y su patrón de fosforilación cambian a lo largo de las distintas fases del ciclo aumentando desde final de G1 hasta alcanzar su máximo en mitosis.
2. Whi7 es una proteína inestable que se degrada principalmente vía SCF^{Grr1}. Su estabilidad está regulada por fosforilación por Cdc28, siendo estable únicamente en la fase G1 en su forma no fosforilada.
3. Whi7 se asocia a los promotores de los genes regulados en la transición G1/S reprimiendo su expresión durante la fase G1 hasta su liberación de los promotores en *Start*. Esto demuestra que Whi7 es un parálogo genuino de Whi5 como represor del programa transcripcional de *Start*.
4. La proteína Whi7 es mucho menos abundante en la célula que la proteína Whi5 debido a la diferencia de estabilidad entre ambas. Esto podría explicar el papel preponderante en el control de *Start* en condiciones normales.
5. Whi7 y Whi5 muestran una especificidad distinta por genes diana: la especificidad de Whi5 es mayor por los genes de las ciclinas de *Start*, mientras que la de Whi7 es mayor por los genes de pared celular.
6. Whi7 y Whi5 muestran diferencias en su mecanismo de asociación a promotores: además de con SBF, Whi7, pero no Whi5, es capaz de interactuar con Swi4 monomérico y, probablemente, con MBF.
7. La localización subcelular de Whi7 se encuentra regulada a lo largo del ciclo celular de manera similar a Whi5 acumulándose en el núcleo solamente en fase G1. Sin embargo, existen diferencias importantes entre la localización de ambos represores. La acumulación nuclear de Whi7 en G1 es solamente

parcial y los mecanismos de importación/exportación de Whi7 difieren de los de Whi5. Así, Whi7 carece de NLSs clásicas en su secuencia capaces de ser reconocidas por la vía clásica de importación y no requiere de Msn5 para su exportación.

8. La ruta PKC afecta a los niveles celulares de Whi7, pero no de Whi5. La MAPK de la ruta, Slt2, a través del factor transcripcional Rlm1, es responsable de la expresión del gen *WHI7*. Además, Pkc1 es necesaria para la degradación de Whi7.

9. Whi7, pero no Whi5, se induce en condiciones de estrés de pared celular. En estas condiciones es Whi7 y no Whi5 quien juega el papel fundamental como represor transcripcional de *Start*, bloqueando la transición G1/S.

10. La isoforma PKC δ de mamíferos es capaz de desempeñar en *S. cerevisiae* las mismas funciones que Pkc1, tales como la activación del *checkpoint* de integridad del DNA y la regulación de la proteína Whi7. Esta capacidad no se ve alterada cuando se inactivan por separado diferentes mecanismos implicados en la regulación específica de PKC δ en células de mamíferos como la fosforilación en Thr⁵⁰⁵ o la presencia del Glu⁵⁰⁰ en el lazo de activación, interacciones del mecanismo asociado a la hélice A o la fosforilación en residuos específicos de Tyr.

10. Bibliografía

- Adames, N.R., Schuck, P.L., Chen, K.C., Murali, T.M., Tyson, J.J., and Peccoud, J. (2015). Experimental testing of a new integrated model of the budding yeast Start transition. *Mol Biol Cell* 26, 3966–3984.
- Adwan, T.S., Ohm, A.M., Jones, D.N.M., Humphries, M.J., and Reyland, M.E. (2011). Regulated binding of importin- α to protein kinase C δ in response to apoptotic signals facilitates nuclear import. *J. Biol. Chem.* 286, 35716–35724.
- Alberghina, L., Rossi, R.L., Querin, L., Wanke, V., and Vanoni, M. (2004). A cell size network involving Cln3 and Far1 controls entrance into S phase in the mitotic cycle of budding yeast. *J. Cell Biol.* 167, 433–443.
- Aldea, M., Jenkins, K., and Csikász-Nagy, A. (2017). Growth Rate as a Direct Regulator of the Start Network to Set Cell Size. *Front. Cell Dev. Biol.* 5.
- Amigoni, L., Colombo, S., Belotti, F., Alberghina, L., and Martegani, E. (2015). The transcription factor Swi4 is target for PKA regulation of cell size at the G1 to S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Cycle Georget. Tex* 14, 2429–2438.
- Anastasia, S.D., Nguyen, D.L., Thai, V., Meloy, M., MacDonough, T., and Kellogg, D.R. (2012). A link between mitotic entry and membrane growth suggests a novel model for cell size control. *J. Cell Biol.* 197, 89–104.
- Andrews, B., and Measday, V. (1998). The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea. *Trends Genet. TIG* 14, 66–72.
- Andrews, P.D., and Stark, M.J. (2000). Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 15), 2685–2693.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Friedli, L., Payton, M.A., and Paravicini, G. (1994). Protein kinase C in yeast. Characteristics of the *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 gene product. *J. Biol. Chem.* 269, 16821–16828.
- Arencibia, J.M., Pastor-Flores, D., Bauer, A.F., Schulze, J.O., and Biondi, R.M. (2013). AGC protein kinases: from structural mechanism of regulation to allosteric drug development for the treatment of human diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1834, 1302–1321.
- Arroyo, J., Bermejo, C., García, R., and Rodríguez-Peña, J.M. (2009). Genomics in the detection of damage in microbial systems: cell wall stress in yeast. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15 Suppl 1, 44–46.

- Arroyo, J., Farkaš, V., Sanz, A.B., and Cabib, E. (2016). "Strengthening the fungal cell wall through chitin-glucan cross-links: effects on morphogenesis and cell integrity". *Cell. Microbiol.* *18*, 1239–1250.
- Ashe, M., de Bruin, R.A., Kalashnikova, T., McDonald, W.H., Yates, J.R., and Wittenberg, C. (2008). The SBF- and MBF-associated protein Msa1 is required for proper timing of G1-specific transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *283*, 6040–6049.
- Baetz, K., Moffat, J., Haynes, J., Chang, M., and Andrews, B. (2001). Transcriptional coregulation by the cell integrity mitogen-activated protein kinase Slr2 and the cell cycle regulator Swi4. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 6515–6528.
- Bállega, E., Carballar, R., Samper, B., Ricco, N., Ribeiro, M.P., Bru, S., Jiménez, J., and Clotet, J. (2019). Comprehensive and quantitative analysis of G1 cyclins. A tool for studying the cell cycle. *PLoS ONE* *14*.
- Bandyopadhyay, S., Mehta, M., Kuo, D., Sung, M.-K., Chuang, R., Jaehnig, E.J., Bodenmiller, B., Licon, K., Copeland, W., Shales, M., et al. (2010). Rewiring of genetic networks in response to DNA damage. *Science* *330*, 1385–1389.
- Barford, D. (2011). Structure, function and mechanism of the anaphase promoting complex (APC/C). *Q. Rev. Biophys.* *44*, 153–190.
- Baro, B., Rodríguez-Rodríguez, J.-A., Calabria, I., Hernández, M.L., Gil, C., and Queralt, E. (2013). Dual Regulation of the mitotic exit network (MEN) by PP2A-Cdc55 phosphatase. *PLoS Genet.* *9*, e1003966.
- Baro, B., Játiva, S., Calabria, I., Vinaixa, J., Bech-Serra, J.-J., de LaTorre, C., Rodrigues, J., Hernández, M.L., Gil, C., Barceló-Batllo, S., et al. (2018). SILAC-based phosphoproteomics reveals new PP2A-Cdc55-regulated processes in budding yeast. *GigaScience* *7*.
- Bartek, J., and Lukas, J. (2007). DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *19*, 238–245.
- Bastajian, N., Friesen, H., and Andrews, B.J. (2013). Bck2 acts through the MADS box protein Mcm1 to activate cell-cycle-regulated genes in budding yeast. *PLoS Genet.* *9*, e1003507.
- Basu, A., and Pal, D. (2010). Two faces of protein kinase C δ : the contrasting roles of PKC δ in cell survival and cell death. *ScientificWorldJournal* *10*, 2272–2284.
- Basu, A., Woolard, M.D., and Johnson, C.L. (2001). Involvement of protein kinase C-delta in DNA damage-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* *8*, 899–908.
- Bean, J.M., Siggia, E.D., and Cross, F.R. (2005). High functional overlap between Mlul cell-cycle box binding factor and Swi4/6 cell-cycle box binding factor in the G1/S transcriptional program in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *171*, 49–61.
- Behn-Krappa, A., and Newton, A.C. (1999). The hydrophobic phosphorylation motif of conventional protein kinase C is regulated by autophosphorylation. *Curr. Biol. CB* *9*, 728–737.
- Belén Sanz, A., García, R., Rodríguez-Peña, J.M., Díez-Muñiz, S., Nombela, C., Peterson, C.L., and Arroyo, J. (2012). Chromatin remodeling by the SWI/SNF complex is essential for transcription mediated by the yeast cell wall integrity MAPK pathway.

- Mol. Biol. Cell 23, 2805–2817.
- Bell, S.P., and Labib, K. (2016). Chromosome Duplication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 203, 1027–1067.
- Bellí, G., Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1998). An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 26, 942–947.
- Benanti, J.A. (2016). Create, activate, destroy, repeat: Cdk1 controls proliferation by limiting transcription factor activity. *Curr. Genet.* 62, 271–276.
- Bermejo, C., Rodríguez, E., García, R., Rodríguez-Peña, J.M., Rodríguez de la Concepción, M.L., Rivas, C., Arias, P., Nombela, C., Posas, F., and Arroyo, J. (2008). The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Mol. Biol. Cell* 19, 1113–1124.
- Berry, D.B., and Gasch, A.P. (2008). Stress-activated genomic expression changes serve a preparative role for impending stress in yeast. *Mol. Biol. Cell* 19, 4580–4587.
- Bertoli, C., Skotheim, J.M., and de Bruin, R.A. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 518–528.
- Bharti, A., Kraeft, S.K., Gounder, M., Pandey, P., Jin, S., Yuan, Z.M., Lees-Miller, S.P., Weichselbaum, R., Weaver, D., Chen, L.B., et al. (1998). Inactivation of DNA-dependent protein kinase by protein kinase Cdelta: implications for apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6719–6728.
- Blackford, A.N., and Jackson, S.P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol. Cell* 66, 801–817.
- Bloom, J., and Cross, F.R. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 149–160.
- Boorsma, A., de Nobel, H., ter Riet, B., Bargmann, B., Brul, S., Hellingwerf, K.J., and Klis, F.M. (2004). Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21, 413–427.
- Boustany, L.M., and Cyert, M.S. (2002). Calcineurin-dependent regulation of Crz1p nuclear export requires Msn5p and a conserved calcineurin docking site. *Genes Dev.* 16, 608–619.
- Breeden, L.L. (2000). Cyclin transcription: Timing is everything. *Curr. Biol. CB* 10, R586–588.
- Breeden, L.L. (2003). Periodic transcription: a cycle within a cycle. *Curr. Biol. CB* 13, R31–38–R31–38.
- de Bruin, R.A., McDonald, W.H., Kalashnikova, T.I., Yates, J., and Wittenberg, C. (2004). Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5. *Cell* 117, 887–898.
- de Bruin, R.A., Kalashnikova, T.I., Chahwan, C., McDonald, W.H., Wohlschlegel, J., Yates, J., Russell, P., and Wittenberg, C. (2006). Constraining G1-specific transcription to late G1 phase: the MBF-associated corepressor Nrm1 acts via negative feedback. *Mol Cell* 23, 483–496.
- de Bruin, R.A., Kalashnikova, T.I., and Wittenberg, C. (2008). Stb1 collaborates with

- other regulators to modulate the G1-specific transcriptional circuit. *Mol Cell Biol* 28, 6919–6928.
- Bulik, D.A., Olczak, M., Lucero, H.A., Osmond, B.C., Robbins, P.W., and Specht, C.A. (2003). Chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* in response to supplementation of growth medium with glucosamine and cell wall stress. *Eukaryot. Cell* 2, 886–900.
- Carot, M.S., Bono, B.M., Quilis, I., and Igual, J.C. (2016). Paf1C mediates regulation of gene expression by the MAP Kinase Slt2. p.
- Carroll, A.S., and O’Shea, E.K. (2002). Pho85 and signaling environmental conditions. *Trends Biochem. Sci.* 27, 87–93.
- Caudron, F., and Barral, Y. (2013). A super-assembly of Whi3 encodes memory of deceptive encounters by single cells during yeast courtship. *Cell* 155, 1244–1257.
- Chandler-Brown, D., Schmoller, K.M., Winetraub, Y., and Skotheim, J.M. (2017). The Adder Phenomenon Emerges from Independent Control of Pre- and Post-Start Phases of the Budding Yeast Cell Cycle. *Curr. Biol.* 27, 2774–2783.e3.
- Chang, M., French-Cornay, D., Fan, H.Y., Klein, H., Denis, C.L., and Jaehning, J.A. (1999). A complex containing RNA polymerase II, Paf1p, Cdc73p, Hpr1p, and Ccr4p plays a role in protein kinase C signaling. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1056–1067.
- Chang, Y.-L., Tseng, S.-F., Huang, Y.-C., Shen, Z.-J., Hsu, P.-H., Hsieh, M.-H., Yang, C.-W., Tognetti, S., Canal, B., Subirana, L., et al. (2017). Yeast Cip1 is activated by environmental stress to inhibit Cdk1–G1 cyclins via Mcm1 and Msn2/4. *Nat. Commun.* 8, 56.
- Charoenbhakdi, S., Dokpikul, T., Burphan, T., Techo, T., and Auesukaree, C. (2016). Vacuolar H⁺-ATPase Protects *Saccharomyces cerevisiae* Cells against Ethanol-Induced Oxidative and Cell Wall Stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 3121–3130.
- Charvin, G., Oikonomou, C., Siggia, E.D., and Cross, F.R. (2010). Origin of irreversibility of cell cycle start in budding yeast. *PLoS Biol* 8, e1000284.
- Ciccia, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell* 40, 179–204.
- Clémenson, C., and Marsolier-Kergoat, M.-C. (2009). DNA damage checkpoint inactivation: adaptation and recovery. *DNA Repair* 8, 1101–1109.
- Cook, A., Bono, F., Jinek, M., and Conti, E. (2007). Structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 647–671.
- Costanzo, M., Schub, O., and Andrews, B. (2003). G1 transcription factors are differentially regulated in *Saccharomyces cerevisiae* by the Swi6-binding protein Stb1. *Mol Cell Biol* 23, 5064–5077.
- Costanzo, M., Nishikawa, J.L., Tang, X., Millman, J.S., Schub, O., Breikreuz, K., Dewar, D., Rupes, I., Andrews, B., and Tyers, M. (2004). CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast. *Cell* 117, 899–913.
- Darieva, Z., Han, N., Warwood, S., Doris, K.S., Morgan, B.A., and Sharrocks, A.D. (2012). Protein kinase C regulates late cell cycle-dependent gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 32, 4651–4661.

- David O. Morgan (2007). The cell-cycle control system. In *The Cell Cycle: Principles of Control*, (New Science Press), pp. 28–54.
- De Clercq, A., and Inzé, D. (2006). Cyclin-dependent kinase inhibitors in yeast, animals, and plants: a functional comparison. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *41*, 293–313.
- De Groot, P.W.J., Ram, A.F., and Klis, F.M. (2005). Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genet. Biol.* *FG B 42*, 657–675.
- De Virgilio, C., Hottiger, T., Dominguez, J., Boller, T., and Wiemken, A. (1994). The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *Eur. J. Biochem.* *219*, 179–186.
- Denis, V., and Cyert, M.S. (2005). Molecular analysis reveals localization of *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C to sites of polarized growth and Pkc1p targeting to the nucleus and mitotic spindle. *Eukaryot. Cell* *4*, 36–45.
- DeSalle, L.M., and Pagano, M. (2001). Regulation of the G1 to S transition by the ubiquitin pathway. *FEBS Lett.* *490*, 179–189.
- Desany, B.A., Alcasabas, A.A., Bachant, J.B., and Elledge, S.J. (1998). Recovery from DNA replicational stress is the essential function of the S-phase checkpoint pathway. *Genes Dev* *12*, 2956–2970.
- DeVit, M.J., and Johnston, M. (1999). The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glucose repressor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Biol.* *CB 9*, 1231–1241.
- Di Domenico, E.G., Romano, E., Del Porto, P., and Ascenzioni, F. (2014). Multifunctional role of ATM/Tel1 kinase in genome stability: from the DNA damage response to telomere maintenance. *BioMed Res. Int.* *2014*, 787404.
- Dirick, L., Moll, T., Auer, H., and Nasmyth, K. (1992). A central role for SWI6 in modulating cell cycle Start-specific transcription in yeast. *Nature* *357*, 508–513.
- Dirick, L., Bohm, T., and Nasmyth, K. (1995). Roles and regulation of Cln-Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* *14*, 4803–4813.
- Dodou, E., and Treisman, R. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 1848–1859.
- Dorsey, S., Tollis, S., Cheng, J., Black, L., Notley, S., Tyers, M., and Royer, C.A. (2018). G1/S Transcription Factor Copy Number Is a Growth-Dependent Determinant of Cell Cycle Commitment in Yeast. *Cell Syst.* *6*, 539-554.e11.
- van Drogen, F., and Peter, M. (2002). Spa2p functions as a scaffold-like protein to recruit the Mpk1p MAP kinase module to sites of polarized growth. *Curr. Biol.* *CB 12*, 1698–1703.
- Drummond, M.L., and Prehoda, K.E. (2016). Molecular Control of Atypical Protein Kinase C: Tipping the Balance between Self-Renewal and Differentiation. *J. Mol. Biol.* *428*, 1455–1464.
- Duch, A., Canal, B., Barroso, S.I., García-Rubio, M., Seisenbacher, G., Aguilera, A., de Nadal, E., and Posas, F. (2018). Multiple signaling kinases target Mrc1 to prevent genomic instability triggered by transcription-replication conflicts. *Nat. Commun.*

9, 379.

- Duina, A.A., Miller, M.E., and Keeney, J.B. (2014). Budding Yeast for Budding Geneticists: A Primer on the *Saccharomyces cerevisiae* Model System. *Genetics* 197, 33–48.
- Elorza, M.V., Rico, H., and Sentandreu, R. (1983). Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *J. Gen. Microbiol.* 129, 1577–1582.
- Emoto, Y., Manome, Y., Meinhardt, G., Kisaki, H., Kharbanda, S., Robertson, M., Ghayur, T., Wong, W.W., Kamen, R., and Weichselbaum, R. (1995). Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *EMBO J.* 14, 6148–6156.
- Enserink, J.M., and Kolodner, R.D. (2010). An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Div.* 5, 11.
- Errede, B., Cade, R.M., Yashar, B.M., Kamada, Y., Levin, D.E., Irie, K., and Matsumoto, K. (1995). Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Mol. Reprod. Dev.* 42, 477–485.
- Eser, U., Falleur-Fettig, M., Johnson, A., and Skotheim, J.M. (2011). Commitment to a cellular transition precedes genome-wide transcriptional change. *Mol Cell* 43, 515–527.
- Ewald, J.C. (2018). How yeast coordinates metabolism, growth and division. *Curr. Opin. Microbiol.* 45, 1–7.
- Ferrezuelo, F., Aldea, M., and Futcher, B. (2009). Bck2 is a phase-independent activator of cell cycle-regulated genes in yeast. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 239–252.
- Ferrezuelo, F., Colomina, N., Futcher, B., and Aldea, M. (2010). The transcriptional network activated by Cln3 cyclin at the G1-to-S transition of the yeast cell cycle. *Genome Biol.* 11, R67.
- Ferrezuelo, F., Colomina, N., Palmisano, A., Gari, E., Gallego, C., Csikasz-Nagy, A., and Aldea, M. (2012). The critical size is set at a single-cell level by growth rate to attain homeostasis and adaptation. *Nat Commun* 3, 1012.
- Finley, D., Ulrich, H.D., Sommer, T., and Kaiser, P. (2012). The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 192, 319–360.
- Finn, K., Lowndes, N.F., and Grenon, M. (2012). Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 69, 1447–1473.
- Fisher, R.P. (2016). Getting to S: CDK functions and targets on the path to cell-cycle commitment. *F1000Research* 5, 2374.
- Freeley, M., Kelleher, D., and Long, A. (2011). Regulation of Protein Kinase C function by phosphorylation on conserved and non-conserved sites. *Cell. Signal.* 23, 753–762.
- Frutos, S., Moscat, J., and Diaz-Meco, M.T. (1999). Cleavage of zetaPKC but not lambda/iotaPKC by caspase-3 during UV-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274, 10765–10770.

- Gallegos, L.L., Kunkel, M.T., and Newton, A.C. (2006). Targeting protein kinase C activity reporter to discrete intracellular regions reveals spatiotemporal differences in agonist-dependent signaling. *J. Biol. Chem.* *281*, 30947–30956.
- García, R., Bermejo, C., Grau, C., Pérez, R., Rodríguez-Peña, J.M., Francois, J., Nombela, C., and Arroyo, J. (2004). The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J. Biol. Chem.* *279*, 15183–15195.
- García, R., Rodríguez-Peña, J.M., Bermejo, C., Nombela, C., and Arroyo, J. (2009). The high osmotic response and cell wall integrity pathways cooperate to regulate transcriptional responses to zymolyase-induced cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *284*, 10901–10911.
- Garí, E., Volpe, T., Wang, H., Gallego, C., Fitcher, B., and Aldea, M. (2001). Whi3 binds the mRNA of the G1 cyclin CLN3 to modulate cell fate in budding yeast. *Genes Dev.* *15*, 2803–2808.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P.O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* *11*, 4241–4257.
- Gerald, J.N.F., Benjamin, J.M., and Kron, S.J. (2002). Robust G1 checkpoint arrest in budding yeast: dependence on DNA damage signaling and repair. *J. Cell Sci.* *115*, 1749–1757.
- Geymonat, M., Spanos, A., Wells, G.P., Smerdon, S.J., and Sedgwick, S.G. (2004). Clb6/Cdc28 and Cdc14 regulate phosphorylation status and cellular localization of Swi6. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 2277–2285.
- Ghayur, T., Hugunin, M., Talanian, R.V., Ratnofsky, S., Quinlan, C., Emoto, Y., Pandey, P., Datta, R., Huang, Y., Kharbanda, S., et al. (1996). Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J. Exp. Med.* *184*, 2399–2404.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R., and Woods, R.A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* *Chichester Engl.* *11*, 355–360.
- Glover, C.V. (1998). On the physiological role of casein kinase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* *59*, 95–133.
- Goldfarb, D.S., Corbett, A.H., Mason, D.A., Harreman, M.T., and Adam, S.A. (2004). Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol.* *14*, 505–514.
- Gomar-Alba, M., Méndez, E., Quilis, I., Bañó, M.C., and Igual, J.C. (2017). Whi7 is an unstable cell-cycle repressor of the Start transcriptional program. *Nat. Commun.* *8*, 329.
- Gonzalez-Novo, A., Jimenez, J., Clotet, J., Nadal-Ribelles, M., Cavero, S., de Nadal, E., and Posas, F. (2015). Hog1 targets Whi5 and Msa1 transcription factors to downregulate cyclin expression upon stress. *Mol Cell Biol* *35*, 1606–1618.
- Gould, C.M., Kannan, N., Taylor, S.S., and Newton, A.C. (2009). The chaperones Hsp90 and Cdc37 mediate the maturation and stabilization of protein kinase C through a

- conserved PXXP motif in the C-terminal tail. *J. Biol. Chem.* *284*, 4921–4935.
- Gow, N.A.R., Latge, J.-P., and Munro, C.A. (2017). The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol. Spectr.* *5*.
- Graybill, C., Wee, B., Atwood, S.X., and Prehoda, K.E. (2012). Partitioning-defective protein 6 (Par-6) activates atypical protein kinase C (aPKC) by pseudosubstrate displacement. *J. Biol. Chem.* *287*, 21003–21011.
- Haase, S.B., and Wittenberg, C. (2014). Topology and control of the cell-cycle-regulated transcriptional circuitry. *Genetics* *196*, 65–90.
- Hall, A. (2012). Rho family GTPases. *Biochem. Soc. Trans.* *40*, 1378–1382.
- Harper, J.W., and Elledge, S.J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Mol. Cell* *28*, 739–745.
- Harris, M.R., Lee, D., Farmer, S., Lowndes, N.F., and de Bruin, R.A.M. (2013a). Binding specificity of the G1/S transcriptional regulators in budding yeast. *PLoS One* *8*, e61059.
- Harris, M.R., Lee, D., Farmer, S., Lowndes, N.F., and de Bruin, R.A.M. (2013b). Binding specificity of the G1/S transcriptional regulators in budding yeast. *PLoS One* *8*, e61059.
- Harrison, J.C., and Haber, J.E. (2006). Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu. Rev. Genet.* *40*, 209–235.
- Harrison, J.C., Bardes, E.S., Ohya, Y., and Lew, D.J. (2001). A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint. *Nat. Cell Biol.* *3*, 417–420.
- Heinisch, J.J., and Rodicio, R. (2018). Protein kinase C in fungi—more than just cell wall integrity. *FEMS Microbiol. Rev.* *42*.
- Heldt, F.S., Lunstone, R., Tyson, J.J., and Novák, B. (2018). Dilution and titration of cell-cycle regulators may control cell size in budding yeast. *PLOS Comput. Biol.* *14*, e1006548.
- Hendler, A., Medina, E.M., Buchler, N.E., de Bruin, R.A.M., and Aharoni, A. (2018). The evolution of a G1/S transcriptional network in yeasts. *Curr. Genet.* *64*, 81–86.
- Honigberg, S.M. (2016). Similar environments but diverse fates: Responses of budding yeast to nutrient deprivation. *Microb. Cell Graz Austria* *3*, 302–328.
- Hosotani, T., Koyama, H., Uchino, M., Miyakawa, T., and Tsuchiya, E. (2001). PKC1, a protein kinase C homologue of *Saccharomyces cerevisiae*, participates in microtubule function through the yeast EB1 homologue, BIM1. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *6*, 775–788.
- Hottiger, T., De Virgilio, C., Hall, M.N., Boller, T., and Wiemken, A. (1994). The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins in vitro. *Eur. J. Biochem.* *219*, 187–193.
- Howell, A.S., and Lew, D.J. (2012). Morphogenesis and the cell cycle. *Genetics* *190*, 51–77.
- Huang, K.N., and Symington, L.S. (1994). Mutation of the gene encoding protein kinase

- C 1 stimulates mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 6039–6045.
- Huang, D., Friesen, H., and Andrews, B. (2007). Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast. *Mol. Microbiol.* *66*, 303–314.
- Huang, D., Kaluarachchi, S., van Dyk, D., Friesen, H., Sopko, R., Ye, W., Bastajian, N., Moffat, J., Sassi, H., Costanzo, M., et al. (2009). Dual regulation by pairs of cyclin-dependent protein kinases and histone deacetylases controls G1 transcription in budding yeast. *PLoS Biol* *7*, e1000188.
- Humphries, M.J., Ohm, A.M., Schaack, J., Adwan, T.S., and Reyland, M.E. (2008). TYROSINE PHOSPHORYLATION REGULATES NUCLEAR TRANSLOCATION OF PKC δ . *Oncogene* *27*, 3045–3053.
- Igual, J.C., Johnson, A.L., and Johnston, L.H. (1996). Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *EMBO J* *15*, 5001–5013.
- Ikenoue, T., Inoki, K., Yang, Q., Zhou, X., and Guan, K.-L. (2008). Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J.* *27*, 1919–1931.
- Imai, K., Noda, Y., Adachi, H., and Yoda, K. (2005). A novel endoplasmic reticulum membrane protein Rcr1 regulates chitin deposition in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *280*, 8275–8284.
- Inagaki, M., Schmelzle, T., Yamaguchi, K., Irie, K., Hall, M.N., and Matsumoto, K. (1999). PDK1 homologs activate the Pkc1-mitogen-activated protein kinase pathway in yeast. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 8344–8352.
- Isakov, N. (2018). Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. *Semin. Cancer Biol.* *48*, 36–52.
- Iyer, V.R., Horak, C.E., Scafe, C.S., Botstein, D., Snyder, M., and Brown, P.O. (2001). Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. *Nature* *409*, 533–538.
- Jaehning, J.A. (2010). The Paf1 complex: platform or player in RNA polymerase II transcription? *Biochim. Biophys. Acta* *1799*, 379–388.
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., et al. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast Chichester Engl.* *21*, 947–962.
- Jaquenoud, M., van Drogen, F., and Peter, M. (2002). Cell cycle-dependent nuclear export of Cdh1p may contribute to the inactivation of APC/C(Cdh1). *EMBO J.* *21*, 6515–6526.
- Jendretzki, A., Wittland, J., Wilk, S., Straede, A., and Heinisch, J.J. (2011). How do I begin? Sensing extracellular stress to maintain yeast cell wall integrity. *Eur. J. Cell Biol.* *90*, 740–744.
- Jiménez, J., Ricco, N., Grijota-Martínez, C., Fadó, R., and Clotet, J. (2013). Redundancy or specificity? The role of the CDK Pho85 in cell cycle control. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* *4*, 140–149.

- Jiménez-Gutiérrez, E., Alegría-Carrasco, E., Sellers-Moya, Á., Molina, M., and Martín, H. (2019). Not just the wall: the other ways to turn the yeast CWI pathway on. *Int. Microbiol.*
- Jiménez-Sánchez, M., Cid, V.J., and Molina, M. (2007). Retrophosphorylation of Mkk1 and Mkk2 MAPKs by the Sit2 MAPK in the yeast cell integrity pathway. *J. Biol. Chem.* *282*, 31174–31185.
- Johnson, A., and Skotheim, J.M. (2013). Start and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol* *25*, 717–723.
- Jorgensen, P., Nishikawa, J.L., Breikreutz, B.J., and Tyers, M. (2002). Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* *297*, 395–400.
- Jung, U.S., and Levin, D.E. (1999). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol. Microbiol.* *34*, 1049–1057.
- Jung, U.S., Sobering, A.K., Romeo, M.J., and Levin, D.E. (2002). Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Mol. Microbiol.* *46*, 781–789.
- Kaffman, A., Rank, N.M., O’Neill, E.M., Huang, L.S., and O’Shea, E.K. (1998). The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. *Nature* *396*, 482–486.
- Kamada, Y., Jung, U.S., Piotrowski, J., and Levin, D.E. (1995). The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev.* *9*, 1559–1571.
- Kamada, Y., Qadota, H., Python, C.P., Anraku, Y., Ohya, Y., and Levin, D.E. (1996). Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. *J. Biol. Chem.* *271*, 9193–9196.
- Kaplun, L., Ivantsiv, Y., Bakhrat, A., and Raveh, D. (2003). DNA damage response-mediated degradation of Ho endonuclease via the ubiquitin system involves its nuclear export. *J. Biol. Chem.* *278*, 48727–48734.
- Kastan, M.B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* *432*, 316–323.
- Ketela, T., Green, R., and Bussey, H. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J. Bacteriol.* *181*, 3330–3340.
- Kikkawa, U., Matsuzaki, H., and Yamamoto, T. (2002). Protein kinase C delta (PKC delta): activation mechanisms and functions. *J. Biochem. (Tokyo)* *132*, 831–839.
- Kim, K.-Y., and Levin, D.E. (2010). Transcriptional reporters for genes activated by cell wall stress through a non-catalytic mechanism involving Mpk1 and SBF. *Yeast Chichester Engl.* *27*, 541–548.
- Kim, K.-Y., and Levin, D.E. (2011). Mpk1 MAPK association with the Paf1 complex blocks Sen1-mediated premature transcription termination. *Cell* *144*, 745–756.
- Kim, K.Y., Truman, A.W., and Levin, D.E. (2008). Yeast Mpk1 mitogen-activated protein kinase activates transcription through Swi4/Swi6 by a noncatalytic mechanism that

- requires upstream signal. *Mol Cell Biol* 28, 2579–2589.
- Kim, K.Y., Truman, A.W., Caesar, S., Schlenstedt, G., and Levin, D.E. (2010). Yeast Mpk1 cell wall integrity mitogen-activated protein kinase regulates nucleocytoplasmic shuttling of the Swi6 transcriptional regulator. *Mol Biol Cell* 21, 1609–1619.
- Kirchrath, L., Lorberg, A., Schmitz, H.P., Gengenbacher, U., and Heinisch, J.J. (2000). Comparative genetic and physiological studies of the MAP kinase Mpk1p from *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 300, 743–758.
- Kishkevich, A., Cooke, S.L., Harris, M.R.A., and de Bruin, R. a. M. (2019). Gcn5 and Rpd3 have a limited role in the regulation of cell cycle transcripts during the G1 and S phases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.* 9, 10686.
- Koch, C., Moll, T., Neuberger, M., Ahorn, H., and Nasmyth, K. (1993). A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G1 to S phase. *Science* 261, 1551–1557.
- Koch, C., Schleiffer, A., Ammerer, G., and Nasmyth, K. (1996). Switching transcription on and off during the yeast cell cycle: Cln/Cdc28 kinases activate bound transcription factor SBF (Swi4/Swi6) at start, whereas Clb/Cdc28 kinases displace it from the promoter in G2. *Genes Dev* 10, 129–141.
- Koch, C., Wollmann, P., Dahl, M., and Lottspeich, F. (1999). A role for Ctr9p and Paf1p in the regulation G1 cyclin expression in yeast. *Nucleic Acids Res.* 27, 2126–2134.
- Kock, C., Dufrêne, Y.F., and Heinisch, J.J. (2015). Up against the wall: is yeast cell wall integrity ensured by mechanosensing in plasma membrane microdomains? *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 806–811.
- Kõivomägi, M., and Loog, M. (2011). Cdk1: a kinase with changing substrate specificity. *Cell Cycle Georget. Tex* 10, 3625–3626.
- Koivomagi, M., Valk, E., Venta, R., Iofik, A., Lepiku, M., Balog, E.R., Rubin, S.M., Morgan, D.O., and Loog, M. (2011). Cascades of multisite phosphorylation control Sic1 destruction at the onset of S phase. *Nature* 480, 128–131.
- Konishi, H., Tanaka, M., Takemura, Y., Matsuzaki, H., Ono, Y., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1997). Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11233–11237.
- Konishi, H., Yamauchi, E., Taniguchi, H., Yamamoto, T., Matsuzaki, H., Takemura, Y., Ohmae, K., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (2001). Phosphorylation sites of protein kinase C delta in H₂O₂-treated cells and its activation by tyrosine kinase in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6587–6592.
- Kopecká, M., and Gabriel, M. (1992). The influence of congo red on the cell wall and (1----3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 158, 115–126.
- Kuranda, K., Leberre, V., Sokol, S., Palamarczyk, G., and François, J. (2006). Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol. Microbiol.* 61, 1147–1166.
- Lagorce, A., Hauser, N.C., Labourdette, D., Rodriguez, C., Martin-Yken, H., Arroyo, J., Hoheisel, J.D., and Francois, J. (2003). Genome-wide analysis of the response to

- cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278, 20345–20357.
- Landry, B.D., Doyle, J.P., Toczyski, D.P., and Benanti, J.A. (2012). F-box protein specificity for g1 cyclins is dictated by subcellular localization. *PLoS Genet* 8, e1002851.
- Lange, A., Mills, R.E., Lange, C.J., Stewart, M., Devine, S.E., and Corbett, A.H. (2007). Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J. Biol. Chem.* 282, 5101–5105.
- Lanz, M.C., Dibitetto, D., and Smolka, M.B. (2019). DNA damage kinase signaling: checkpoint and repair at 30 years. *EMBO J.* e101801.
- Leduc, A., He, C.H., and Ramotar, D. (2003). Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* cell-wall pathway gene *SLG1* causes hypersensitivity to the antitumor drug bleomycin. *Mol. Genet. Genomics* 269, 78–89.
- Lee, K.S., and Levin, D.E. (1992). Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (*BCK1*) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol. Cell. Biol.* 12, 172–182.
- Levin, D.E. (2005). Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 69, 262–291.
- Levin, D.E. (2011). Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* 189, 1145–1175.
- Levin, D.E., and Bartlett-Heubusch, E. (1992). Mutants in the *S. cerevisiae* *PKC1* gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J. Cell Biol.* 116, 1221–1229.
- Levin, D.E., Fields, F.O., Kunisawa, R., Bishop, J.M., and Thorner, J. (1990). A candidate protein kinase C gene, *PKC1*, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell* 62, 213–224.
- Levin, D.E., Bowers, B., Chen, C.Y., Kamada, Y., and Watanabe, M. (1994). Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Mol. Biol. Res.* 40, 229–239.
- Lew, D.J. (2003). The morphogenesis checkpoint: how yeast cells watch their figures. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 648–653.
- Li, B., Wang, X., Rasheed, N., Hu, Y., Boast, S., Ishii, T., Nakayama, K., Nakayama, K.I., and Goff, S.P. (2004a). Distinct roles of *c-Abl* and *Atm* in oxidative stress response are mediated by protein kinase C delta. *Genes Dev.* 18, 1824–1837.
- Li, F., Long, T., Lu, Y., Ouyang, Q., and Tang, C. (2004b). The yeast cell-cycle network is robustly designed. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4781–4786.
- Liu, Y., Belkina, N.V., Graham, C., and Shaw, S. (2006). Independence of protein kinase C-delta activity from activation loop phosphorylation: structural basis and altered functions in cells. *J. Biol. Chem.* 281, 12102–12111.
- Livneh, E., and Fishman, D.D. (1997). Linking protein kinase C to cell-cycle control. *Eur. J. Biochem.* 248, 1–9.
- Livneh, E., Shimon, T., Bechor, E., Doki, Y., Schieren, I., and Weinstein, I.B. (1996). Linking protein kinase C to the cell cycle: ectopic expression of *PKC eta* in NIH3T3

- cells alters the expression of cyclins and Cdk inhibitors and induces adipogenesis. *Oncogene* *12*, 1545–1555.
- Longtine, M.S., McKenzie, A., Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *Chichester Engl.* *14*, 953–961.
- Loog, M., and Morgan, D.O. (2005). Cyclin specificity in the phosphorylation of cyclin-dependent kinase substrates. *Nature* *434*, 104–108.
- Lowndes, N.F., Johnson, A.L., Breeden, L., and Johnston, L.H. (1992). SWI6 protein is required for transcription of the periodically expressed DNA synthesis genes in budding yeast. *Nature* *357*, 505–508.
- Madden, K., Sheu, Y.J., Baetz, K., Andrews, B., and Snyder, M. (1997). SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science* *275*, 1781–1784.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lächelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S.J., Wesselborg, S., et al. (2002). A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol. Cell* *9*, 911–917.
- Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* *15*, 122.
- Marston, A.L. (2014). Chromosome segregation in budding yeast: sister chromatid cohesion and related mechanisms. *Genetics* *196*, 31–63.
- Martín, H., Rodríguez-Pachón, J.M., Ruiz, C., Nombela, C., and Molina, M. (2000). Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slr2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *275*, 1511–1519.
- Martínez-Bono, B. (2005). Tesis doctoral: La ruta de la proteína quinasa C en *Saccharomyces cerevisiae*. Conexiones con el control del ciclo celular.
- Matassa, A.A., Carpenter, L., Biden, T.J., Humphries, M.J., and Reyland, M.E. (2001). PKCdelta is required for mitochondrial-dependent apoptosis in salivary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* *276*, 29719–29728.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., et al. (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* *316*, 1160–1166.
- Mazzoni, C., Zarov, P., Rambourg, A., and Mann, C. (1993). The SLT2 (MPK1) MAP kinase homolog is involved in polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* *123*, 1821–1833.
- McInerney, C.J. (2011). Cell cycle regulated gene expression in yeasts. *Adv. Genet.* *73*, 51–85.
- Mellor, H., and Parker, P.J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* *332 (Pt 2)*, 281–292.
- Melo, J., and Toczyski, D. (2002). A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 237–245.
- Mendenhall, M.D., and Hodge, A.E. (1998). Regulation of Cdc28 cyclin-dependent

- protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **MMBR 62**, 1191–1243.
- Mensonides, F.I.C., Brul, S., Klis, F.M., Hellingwerf, K.J., and Teixeira de Mattos, M.J. (2005). Activation of the protein kinase C1 pathway upon continuous heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* is triggered by an intracellular increase in osmolarity due to trehalose accumulation. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4531–4538.
- Miles, S., and Breeden, L. (2017). A common strategy for initiating the transition from proliferation to quiescence. *Curr. Genet.* **63**, 179–186.
- Miles, S., Croxford, M.W., Abeysinghe, A.P., and Breeden, L.L. (2016). Msa1 and Msa2 Modulate G1-Specific Transcription to Promote G1 Arrest and the Transition to Quiescence in Budding Yeast. *PLoS Genet* **12**, e1006088.
- Mizunuma, M., Hirata, D., Miyahara, K., Tsuchiya, E., and Miyakawa, T. (1998). Role of calcineurin and Mpk1 in regulating the onset of mitosis in budding yeast. *Nature* **392**, 303–306.
- Mizunuma, M., Hirata, D., Miyaoka, R., and Miyakawa, T. (2001). GSK-3 kinase Mck1 and calcineurin coordinately mediate Hsl1 down-regulation by Ca²⁺ in budding yeast. *EMBO J.* **20**, 1074–1085.
- Mizunuma, M., Hirata, D., and Miyakawa, T. (2005). Implication of Pkc1p protein kinase C in sustaining Cln2p level and polarized bud growth in response to calcium signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **118**, 4219–4229.
- Mizunuma, M., Tsubakiyama, R., Ogawa, T., Shitamukai, A., Kobayashi, Y., Inai, T., Kume, K., and Hirata, D. (2013). Ras/cAMP-dependent protein kinase (PKA) regulates multiple aspects of cellular events by phosphorylating the Whi3 cell cycle regulator in budding yeast. *J. Biol. Chem.* **288**, 10558–10566.
- Moffat, J., Huang, D., and Andrews, B. (2000). Functions of Pho85 cyclin-dependent kinases in budding yeast. *Prog. Cell Cycle Res.* **4**, 97–106.
- Moreno-Torres, M., Jaquenoud, M., and De Virgilio, C. (2015). TORC1 controls G1-S cell cycle transition in yeast via Mpk1 and the greatwall kinase pathway. *Nat. Commun.* **6**, 8256.
- Moreno-Torres, M., Jaquenoud, M., Péli-Gulli, M.-P., Nicastro, R., and De Virgilio, C. (2017). TORC1 coordinates the conversion of Sic1 from a target to an inhibitor of cyclin-CDK-Cks1. *Cell Discov.* **3**, 17012.
- Nakayama, K.I., and Nakayama, K. (2006). Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 369–381.
- Nasmyth, K. (1996a). At the heart of the budding yeast cell cycle. *Trends Genet.* **TIG 12**, 405–412.
- Nasmyth, K. (1996b). Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science* **274**, 1643–1645.
- Nasmyth, K., and Dirick, L. (1991). The role of SWI4 and SWI6 in the activity of G1 cyclins in yeast. *Cell* **66**, 995–1013.
- Negishi, T., and Ohya, Y. (2010). The cell wall integrity checkpoint: coordination between cell wall synthesis and the cell cycle. *Yeast Chichester Engl.* **27**, 513–519.

- Negishi, T., Veis, J., Hollenstein, D., Sekiya, M., Ammerer, G., and Ohya, Y. (2016). The Late S-Phase Transcription Factor Hcm1 Is Regulated through Phosphorylation by the Cell Wall Integrity Checkpoint. *Mol. Cell. Biol.* *36*, 941–953.
- Neves, M.J., and François, J. (1992). On the mechanism by which a heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* *288 (Pt 3)*, 859–864.
- Newton, A.C. (2010). Protein kinase C: poised to signal. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *298*, E395–402.
- Newton, A.C. (2018a). Protein kinase C: perfectly balanced. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *53*, 208–230.
- Newton, A.C. (2018b). Protein kinase C as a tumor suppressor. *Semin. Cancer Biol.* *48*, 18–26.
- Newton, A.C., and Johnson, J.E. (1998). Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. *Biochim. Biophys. Acta* *1376*, 155–172.
- de Nobel, H., Ruiz, C., Martin, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M., and Klis, F.M. (2000). Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiol. Read. Engl.* *146 (Pt 9)*, 2121–2132.
- Nonaka, H., Tanaka, K., Hirano, H., Fujiwara, T., Kohno, H., Umikawa, M., Mino, A., and Takai, Y. (1995). A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* *14*, 5931–5938.
- Oldenburg, K.R., Vo, K.T., Michaelis, S., and Paddon, C. (1997). Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Res.* *25*, 451–452.
- Orlean, P. (2012). Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Genetics* *192*, 775–818.
- Orr, J.W., Keranen, L.M., and Newton, A.C. (1992). Reversible exposure of the pseudosubstrate domain of protein kinase C by phosphatidylserine and diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* *267*, 15263–15266.
- Ostapenko, D., and Solomon, M.J. (2011). Anaphase promoting complex-dependent degradation of transcriptional repressors Nrm1 and Yhp1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* *22*, 2175–2184.
- Palou, G., Palou, R., Zeng, F., Vashisht, A.A., Wohlschlegel, J.A., and Quintana, D.G. (2015). Three Different Pathways Prevent Chromosome Segregation in the Presence of DNA Damage or Replication Stress in Budding Yeast. *PLoS Genet.* *11*, e1005468.
- Palumbo, P., Vanoni, M., Cusimano, V., Busti, S., Marano, F., Manes, C., and Alberghina, L. (2016). Whi5 phosphorylation embedded in the G1/S network dynamically controls critical cell size and cell fate. *Nat Commun* *7*, 11372.
- Paravicini, G., Cooper, M., Friedli, L., Smith, D.J., Carpentier, J.L., Klig, L.S., and Payton, M.A. (1992). The osmotic integrity of the yeast cell requires a functional PKC1 gene

- product. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 4896–4905.
- Pardo, B., Crabbé, L., and Pasero, P. (2017). Signaling pathways of replication stress in yeast. *FEMS Yeast Res.* *17*.
- Parker, P.J., and Parkinson, S.J. (2001). AGC protein kinase phosphorylation and protein kinase C. *Biochem. Soc. Trans.* *29*, 860–863.
- Partridge, J.F., Mikesell, G.E., and Breeden, L.L. (1997). Cell Cycle-dependent Transcription of CLN1 Involves Swi4 Binding to MCB-like Elements. *J Biol Chem* *272*, 9071–9077.
- Pemberton, L.F., and Paschal, B.M. (2005). Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic Cph. Den.* *6*, 187–198.
- Penheiter, K.L., Washburn, T.M., Porter, S.E., Hoffman, M.G., and Jaehning, J.A. (2005). A posttranscriptional role for the yeast Paf1-RNA polymerase II complex is revealed by identification of primary targets. *Mol. Cell* *20*, 213–223.
- Pérez-Hidalgo, L., and Moreno, S. (2017). Coupling TOR to the Cell Cycle by the Greatwall–Endosulfine–PP2A-B55 Pathway. *Biomolecules* *7*, 59.
- Peter, M., and Herskowitz, I. (1994). Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. *Science* *265*, 1228–1231.
- Peters, J.-M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell* *9*, 931–943.
- Peters, J.M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* *7*, 644–656.
- Piccirillo, S., Neog, D., Spade, D., Van Horn, J.D., Tiede-Lewis, L.M., Dallas, S.L., Kapros, T., and Honigberg, S.M. (2017). Shrinking Daughters: Rlm1-Dependent G1/S Checkpoint Maintains *Saccharomyces cerevisiae* Daughter Cell Size and Viability. *Genetics* *206*, 1923–1938.
- Porter, S.E., Washburn, T.M., Chang, M., and Jaehning, J.A. (2002). The yeast paf1-rNA polymerase II complex is required for full expression of a subset of cell cycle-regulated genes. *Eukaryot. Cell* *1*, 830–842.
- Pramila, T., Wu, W., Miles, S., Noble, W.S., and Breeden, L.L. (2006). The Forkhead transcription factor Hcm1 regulates chromosome segregation genes and fills the S-phase gap in the transcriptional circuitry of the cell cycle. *Genes Dev.* *20*, 2266–2278.
- Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., Guo, H., Jona, G., Breitkreutz, A., Sopko, R., et al. (2005). Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* *438*, 679–684.
- Queralt, E., and Igual, J.C. (2003). Cell cycle activation of the Swi6p transcription factor is linked to nucleocytoplasmic shuttling. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 3126–3140.
- Queralt, E., and Igual, J.C. (2005). Functional connection between the Clb5 cyclin, the protein kinase C pathway and the Swi4 transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *171*, 1485–1498.
- Queralt, E., and Uhlmann, F. (2008). Cdk-counteracting phosphatases unlock mitotic exit. *Curr. Opin. Cell Biol.* *20*, 661–668.

- Queralt, E., Lehane, C., Novak, B., and Uhlmann, F. (2006). Downregulation of PP2A(Cdc55) phosphatase by separase initiates mitotic exit in budding yeast. *Cell* 125, 719–732.
- Quilis, I., and Igual, J.C. (2012). Molecular basis of the functional distinction between Cln1 and Cln2 cyclins. *Cell Cycle Georget. Tex* 11, 3117–3131.
- Reinoso-Martín, C., Schüller, C., Schuetzer-Muehlbauer, M., and Kuchler, K. (2003). The yeast protein kinase C cell integrity pathway mediates tolerance to the antifungal drug caspofungin through activation of Slp2p mitogen-activated protein kinase signaling. *Eukaryot. Cell* 2, 1200–1210.
- Ren, P., Malik, A., and Zeng, F. (2016). Identification of YPL014W (Cip1) as a novel negative regulator of cyclin-dependent kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* 21, 543–552.
- Reyland, M.E., and Jones, D.N.M. (2016). Multifunctional roles of PKC δ : Opportunities for targeted therapy in human disease. *Pharmacol. Ther.* 165, 1–13.
- Reyland, M.E., Anderson, S.M., Matassa, A.A., Barzen, K.A., and Quissell, D.O. (1999). Protein kinase C delta is essential for etoposide-induced apoptosis in salivary gland acinar cells. *J. Biol. Chem.* 274, 19115–19123.
- Rodicio, R., and Heinisch, J.J. (2010). Together we are strong--cell wall integrity sensors in yeasts. *Yeast Chichester Engl.* 27, 531–540.
- Roemer, T., Paravicini, G., Payton, M.A., and Bussey, H. (1994). Characterization of the yeast (1 \rightarrow 6)-beta-glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the PKC1 pathway and extracellular matrix assembly. *J. Cell Biol.* 127, 567–579.
- Roffey, J., Rosse, C., Linch, M., Hibbert, A., McDonald, N.Q., and Parker, P.J. (2009). Protein kinase C intervention: the state of play. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 268–279.
- Roos, W.P., Thomas, A.D., and Kaina, B. (2016). DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat. Rev. Cancer* 16, 20–33.
- Rupes, I. (2002). Checking cell size in yeast. *Trends Genet. TIG* 18, 479–485.
- Saiz-Baggetto, S., Méndez, E., Quilis, I., Igual, J.C., and Bañó, M.C. (2017). Chimeric proteins tagged with specific 3xHA cassettes may present instability and functional problems. *PLOS ONE* 12, e0183067.
- Saldivar, J.C., Cortez, D., and Cimprich, K.A. (2017). The essential kinase ATR: ensuring faithful duplication of a challenging genome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 622–636.
- Sanz, A.B., García, R., Rodríguez-Peña, J.M., and Arroyo, J. (2017). The CWI Pathway: Regulation of the Transcriptional Adaptive Response to Cell Wall Stress in Yeast. *J. Fungi Basel Switz.* 4.
- Schiavone, M., Vax, A., Formosa, C., Martin-Yken, H., Dague, E., and François, J.M. (2014). A combined chemical and enzymatic method to determine quantitatively the polysaccharide components in the cell wall of yeasts. *FEMS Yeast Res.* 14, 933–947.
- Schmitz, H.-P., Lorberg, A., and Heinisch, J.J. (2002). Regulation of yeast protein kinase C activity by interaction with the small GTPase Rho1p through its amino-terminal

- HR1 domain. *Mol. Microbiol.* *44*, 829–840.
- Schmoller, K.M., Turner, J.J., Koivomagi, M., and Skotheim, J.M. (2015). Dilution of the cell cycle inhibitor Whi5 controls budding-yeast cell size. *Nature* *526*, 268–272.
- Schwob, E., Böhm, T., Mendenhall, M.D., and Nasmyth, K. (1994). The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* *79*, 233–244.
- Sidorova, J.M., Mikesell, G.E., and Breeden, L.L. (1995). Cell cycle-regulated phosphorylation of Swi6 controls its nuclear localization. *Mol. Biol. Cell* *6*, 1641–1658.
- Simanis, V. (2003). Events at the end of mitosis in the budding and fission yeasts. *J. Cell Sci.* *116*, 4263–4275.
- Simon, I., Barnett, J., Hannett, N., Harbison, C.T., Rinaldi, N.J., Volkert, T.L., Wyrick, J.J., Zeitlinger, J., Gifford, D.K., Jaakkola, T.S., et al. (2001). Serial regulation of transcriptional regulators in the yeast cell cycle. *Cell* *106*, 697–708.
- Skaar, J.R., and Pagano, M. (2009). Control of cell growth by the SCF and APC/C ubiquitin ligases. *Curr Opin Cell Biol* *21*, 816–824.
- Skotheim, J.M., Di Talia, S., Siggia, E.D., and Cross, F.R. (2008). Positive feedback of G1 cyclins ensures coherent cell cycle entry. *Nature* *454*, 291–296.
- Smets, B., Ghillebert, R., De Sniyder, P., Binda, M., Swinnen, E., De Virgilio, C., and Winderickx, J. (2010). Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* *56*, 1–32.
- Smolka, M.B., Albuquerque, C.P., Chen, S., and Zhou, H. (2007). Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage checkpoint kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 10364–10369.
- Soifer, I., Robert, L., and Amir, A. (2016). Single-Cell Analysis of Growth in Budding Yeast and Bacteria Reveals a Common Size Regulation Strategy. *Curr. Biol.* *26*, 356–361.
- Soriano-Carot, M., Bano, M.C., and Igual, J.C. (2012). The yeast mitogen-activated protein kinase Slt2 is involved in the cellular response to genotoxic stress. *Cell Div* *7*, 1.
- Soriano-Carot, M., Quilis, I., Bano, M.C., and Igual, J.C. (2014). Protein kinase C controls activation of the DNA integrity checkpoint. *Nucleic Acids Res* *42*, 7084–7095.
- Stegmeier, F., and Amon, A. (2004). Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation. *Annu. Rev. Genet.* *38*, 203–232.
- Steinberg, S.F. (2004). Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cdelta. *Biochem. J.* *384*, 449–459.
- Steinberg, S.F. (2008). Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol. Rev.* *88*, 1341–1378.
- Stempka, L., Girod, A., Müller, H.J., Rincke, G., Marks, F., Gschwendt, M., and Bossemeyer, D. (1997). Phosphorylation of protein kinase Cdelta (PKCdelta) at threonine 505 is not a prerequisite for enzymatic activity. Expression of rat

- PKCdelta and an alanine 505 mutant in bacteria in a functional form. *J. Biol. Chem.* 272, 6805–6811.
- Stempka, L., Schnölzer, M., Radke, S., Rincke, G., Marks, F., and Gschwendt, M. (1999). Requirements of protein kinase cdelta for catalytic function. Role of glutamic acid 500 and autophosphorylation on serine 643. *J. Biol. Chem.* 274, 8886–8892.
- Stern, B., and Nurse, P. (1996). A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genet.* TIG 12, 345–350.
- Stuart, D., and Wittenberg, C. (1995). CLN3, not positive feedback, determines the timing of CLN2 transcription in cycling cells. *Genes Dev* 9, 2780–2794.
- Sullivan, M., and Morgan, D.O. (2007). Finishing mitosis, one step at a time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 894–903.
- Taberner, F.J., and Igual, J.C. (2010). Yeast karyopherin Kap95 is required for cell cycle progression at Start. *BMC Cell Biol.* 11, 47.
- Taberner, F.J., Quilis, I., and Igual, J.C. (2009). Spatial regulation of the start repressor Whi5. *Cell Cycle* 8, 3010–3018.
- Takahata, S., Yu, Y., and 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. *EMBO J* 28, 3378–3389.
- Talarek, N., Gueydon, E., and Schwob, E. (2017). Homeostatic control of START through negative feedback between Cln3-Cdk1 and Rim15/Greatwall kinase in budding yeast. *ELife* 6.
- Taylor, S.S., and Kornev, A.P. (2011). Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* 36, 65–77.
- Terashima, H., Yabuki, N., Arisawa, M., Hamada, K., and Kitada, K. (2000). Up-regulation of genes encoding glycosylphosphatidylinositol (GPI)-attached proteins in response to cell wall damage caused by disruption of FKS1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* MGG 264, 64–74.
- Thai, V., Dephoure, N., Weiss, A., Ferguson, J., Leitao, R., Gygi, S.P., and Kellogg, D.R. (2017). Protein Kinase C Controls Binding of Igo/ENSA Proteins to Protein Phosphatase 2A in Budding Yeast. *J. Biol. Chem.* 292, 4925–4941.
- Tobias, I.S., and Newton, A.C. (2016). Protein Scaffolds Control Localized Protein Kinase C ζ Activity. *J. Biol. Chem.* 291, 13809–13822.
- Travesa, A., Kalashnikova, T.I., de Bruin, R.A., Cass, S.R., Chahwan, C., Lee, D.E., Lowndes, N.F., and Wittenberg, C. (2013). Repression of G1/S transcription is mediated via interaction of the GTB motifs of Nrm1 and Whi5 with Swi6. *Mol Cell Biol* 33, 1476–1486.
- Truman, A.W., Kim, K.-Y., and Levin, D.E. (2009). Mechanism of Mpk1 mitogen-activated protein kinase binding to the Swi4 transcription factor and its regulation by a novel caffeine-induced phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 29, 6449–6461.
- Tsai, L.-C.L., Xie, L., Dore, K., Xie, L., Del Rio, J.C., King, C.C., Martinez-Ariza, G., Hulme, C., Malinow, R., Bourne, P.E., et al. (2015). Zeta Inhibitory Peptide Disrupts Electrostatic Interactions That Maintain Atypical Protein Kinase C in Its Active

- Conformation on the Scaffold p62. *J. Biol. Chem.* 290, 21845–21856.
- Turner, J.J., Ewald, J.C., and Skotheim, J.M. (2012). Cell size control in yeast. *Curr. Biol.* CB 22, R350–359.
- Ueta, R., Fujiwara, N., Iwai, K., and Yamaguchi-Iwai, Y. (2007). Mechanism underlying the iron-dependent nuclear export of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 18, 2980–2990.
- Verges, E., Colomina, N., Gari, E., Gallego, C., and Aldea, M. (2007). Cyclin Cln3 is retained at the ER and released by the J chaperone Ydj1 in late G1 to trigger cell cycle entry. *Mol Cell* 26, 649–662.
- Verma, N., Franchitto, M., Zonfrilli, A., Cialfi, S., Palermo, R., and Talora, C. (2019). DNA Damage Stress: Cui Prodest? *Int. J. Mol. Sci.* 20.
- Waern, K., and Snyder, M. (2013). Extensive transcript diversity and novel upstream open reading frame regulation in yeast. *G3 Bethesda Md* 3, 343–352.
- Wagner, M.V., Smolka, M.B., de Bruin, R.A., Zhou, H., Wittenberg, C., and Dowdy, S.F. (2009). Whi5 regulation by site specific CDK-phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 4, e4300.
- Wang, H., Gari, E., Verges, E., Gallego, C., and Aldea, M. (2004). Recruitment of Cdc28 by Whi3 restricts nuclear accumulation of the G1 cyclin-Cdk complex to late G1. *EMBO J* 23, 180–190.
- Wang, H., Carey, L.B., Cai, Y., Wijnen, H., and Futcher, B. (2009). Recruitment of Cln3 cyclin to promoters controls cell cycle entry via histone deacetylase and other targets. *PLoS Biol* 7, e1000189.
- Watanabe, M., Chen, C.Y., and Levin, D.E. (1994). *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 encodes a protein kinase C (PKC) homolog with a substrate specificity similar to that of mammalian PKC. *J. Biol. Chem.* 269, 16829–16836.
- Watanabe, Y., Takaesu, G., Hagiwara, M., Irie, K., and Matsumoto, K. (1997). Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Slt2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2615–2623.
- Wijnen, H., Landman, A., and Futcher, B. (2002). The G(1) cyclin Cln3 promotes cell cycle entry via the transcription factor Swi6. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4402–4418.
- Willems, A.R., Schwab, M., and Tyers, M. (2004). A hitchhiker’s guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochim. Biophys. Acta* 1695, 133–170.
- Yahya, G., Parisi, E., Flores, A., Gallego, C., and Aldea, M. (2014). A Whi7-anchored loop controls the G1 Cdk-cyclin complex at start. *Mol Cell* 53, 115–126.
- Yang, W.L., Bruno, M.E., and Carman, G.M. (1996). Regulation of yeast CTP synthetase activity by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 271, 11113–11119.
- Yano, K., Uesono, Y., Yoshida, S., Kikuchi, A., Kashiwazaki, J., Mabuchi, I., and Kikuchi, Y. (2013). Mih1/Cdc25 is negatively regulated by Pkc1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 18, 425–441.
- Yiu, G., McCord, A., Wise, A., Jindal, R., Hardee, J., Kuo, A., Shimogawa, M.Y., Cahoon, L., Wu, M., Kloke, J., et al. (2008). Pathways change in expression during replicative

- aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gerontol Biol Sci Med Sci* 63, 21–34.
- Yoshida, K. (2007). PKCdelta signaling: mechanisms of DNA damage response and apoptosis. *Cell. Signal.* 19, 892–901.
- Yoshida, K., Wang, H.-G., Miki, Y., and Kufe, D. (2003). Protein kinase Cdelta is responsible for constitutive and DNA damage-induced phosphorylation of Rad9. *EMBO J.* 22, 1431–1441.
- Youn, J.-Y., Friesen, H., Nguyen Ba, A.N., Liang, W., Messier, V., Cox, M.J., Moses, A.M., and Andrews, B. (2017). Functional Analysis of Kinases and Transcription Factors in *Saccharomyces cerevisiae* Using an Integrated Overexpression Library. *G3 GenesGenomesGenetics* 7, 911–921.
- Zarzov, P., Mazzoni, C., and Mann, C. (1996). The SLT2(MPK1) MAP kinase is activated during periods of polarized cell growth in yeast. *EMBO J.* 15, 83–91.
- Zhang, J., Zhou, B., Zheng, C., and Zhang, Z. (2003). A bipartite mechanism for ERK2 recognition by its cognate regulators and substrates. *J. Biol. Chem.* 278, 29901–29912.
- Zhao, M., Xia, L., and Chen, G.-Q. (2012). Protein kinase cδ in apoptosis: a brief overview. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 60, 361–372.
- Zu, T., Verna, J., and Ballester, R. (2001). Mutations in WSC genes for putative stress receptors result in sensitivity to multiple stress conditions and impairment of Rim1-dependent gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics* 266, 142–155.