
**EL MECANISME DE VIGILÀNCIA
DE LA FASE S ESTABILITZA ELS NIVELLS DE
LA CICLINA CLB6
EN RESPOSTA A ESTRÈS GENOTÒXIC**

Glòria Palou i Marín

**Unitat de Biofísica, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Universitat Autònoma de Barcelona**

Abril 2009



Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Unitat de Biofísica-CEB, Facultat de Medicina

**EL MECANISME DE VIGILÀNCIA DE LA FASE S
ESTABILITZA ELS NIVELLS DE LA CICLINA CLB6
EN RESPOSTA A ESTRÈS GENOTÒXIC**

Memòria presentada per optar al grau de Doctora en Bioquímica i Biologia Molecular
per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Abril 2009

Director de la Tesi Doctoral

Doctoranda

Dr. David García Quintana

Glòria Palou i Marín

ÍNDIX

INTRODUCCIÓ	1
1 El cicle de divisió cel·lular eucariota	3
2 Mecanismes de control del cicle cel·lular	4
2.1 Quinases dependents de ciclina (CDK).....	5
2.1.1 Ciclines	6
2.1.2 Ciclines de fase S.....	7
2.1.3 Activitat quinasa dependent de ciclina de la fase S.....	9
2.1.4 Ciclines mitòtiques i activitat CDK-M.....	10
2.2 Factors de transcripció específics de les diferents fase del cicle cel·lular.....	12
2.2.1 El factor de transcripció SBF	12
2.2.2 El factor de transcripció MBF	13
2.3 Degradació pel sistema ubiquitin-proteasoma	14
3 Control de la progressió del cicle cel·lular.....	16
3.1 Control de G1 i Start	16
3.2 Control de la transició G1-S.....	18
3.3 Control de l'inici de la replicació del DNA	20
3.4 Control de la mitosi	22
4 Integritat genòmica i mecanismes de vigilància	23
4.1 Mecanismes de vigilància (<i>checkpoints</i>). El mecanisme de vigilància de la fase S	24
4.2 Activació del checkpoint de la fase S.....	26
4.2.1 Resposta del checkpoint de la fase S.....	29
OBJECTIUS	35
MATERIALS I MÈTODES	39
1 Llevat de gemmació, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
2 Tècniques genètiques	42
2.1 Fons genètic.....	42
2.2 Medis de cultiu	43
2.3 Generació d'estrès genotòxic	44
2.4 Plasmidis usats en aquest treball	44
2.5 Generació de soques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
2.5.1 Transformació del llevat.....	45
2.5.2 Soques de deleció	46
2.5.3 Soques que expressen una proteïna etiquetada.....	48
2.5.4 Soques generades per creuament, esporulació i germinació	49
2.5.4.1 Canvi de tipus heterotàlic	50

2.5.4.2	Creuament i generació del diploide.....	51
2.5.4.3	Esporulació.....	51
2.5.4.4	Germinació.....	52
2.5.5	Generació de soques termodegró.....	52
3	Tècniques de biologia cel·lular en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
3.1	Determinació de la densitat cel·lular d'un cultiu.....	54
3.2	Sectors i dilucions seriades.....	54
3.3	Experiments de cicle cel·lular en una fase S no pertorbada.....	55
3.4	Experiments d'activació del checkpoint de la fase S.....	56
3.5	Experiments de recuperació d'estrès replicatiu.....	57
3.6	Experiments amb sobreexpressió d'una proteïna en una fase S no pertorbada.....	58
3.7	Experiments d'anàlisi de l'estabilitat d'una proteïna.....	59
3.8	Experiments de viabilitat d'una proteïna en soques termosensibles.....	60
3.9	Citometria de flux (FACS, <i>Fluorescent Activated Cell Sorting</i>).....	61
3.10	Recompte d'anafases.....	62
4	Tècniques de Biologia Molecular.....	63
4.1	Amplificació de DNA per PCR.....	63
4.2	Clonació.....	64
4.3	Electroforesi de DNA en gels d'agarosa-bromur d'etidi.....	64
4.4	Lligació del producte de PCR i el vector digerits.....	65
4.5	Transformació d' <i>Escherichia coli</i>	65
4.6	Extracció de DNA plasmídic (miniprep).....	66
4.7	Preparació d' <i>E. coli</i> DH5 α competents amb clorur de rubidi.....	67
4.8	Preparació d' <i>E. coli</i> BL21(DE3)RIL competents amb clorur de calci.....	68
4.9	Construccions usades en aquest treball.....	69
4.10	Extracció de DNA genòmic de llevat.....	70
5	Tècniques Bioquímiques.....	71
5.1	Extracció proteica total de cèl·lules de llevat en àcid tricloroacètic (TCA).....	71
5.2	Electroforesi en gel de poliacrilamida desnaturalitzant (SDS-PAGE).....	72
5.3	Immunoblot (<i>western blot</i>) i anticossos emprats.....	73
5.4	Assaig quinasa <i>in vitro</i> de Rad53.....	75
5.5	Immunoprecipitació de proteïnes.....	76
5.6	Producció de proteïnes recombinants.....	77
5.7	Purificació de proteïnes recombinants.....	78
5.8	Microscòpia d'immunofluorescència.....	79
5.8.1	Fixació.....	79
5.8.2	Permeabilització.....	80
5.8.3	Unió de les cèl·lules al portaobjectes i tinció.....	80
5.8.4	Tinció amb DAPI.....	81
5.8.5	Microscòpia.....	82

6	Taula de Soques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilitzades	82
7	Taula d'oligonucleòtids utilitzats en aquest treball.....	85

RESULTATS

1	La ciclina de fase S Clb6 és una diana del mecanisme de vigilància de la fase S	89
1.1	Clb6 és fosforilada per Rad53 <i>in vitro</i>	89
1.2	Els nivells de Clb6 són estabilitzats en resposta a estrès replicatiu <i>in vivo</i>	91
1.3	L'estabilització dels nivells de Clb6 en resposta a estrès replicatiu és dependent de Rad53 i de Mec1	95
1.3.1	L'estabilització de Clb6 en resposta a estrès replicatiu es correlaciona amb la forma activada de Rad53	95
1.3.2	L'estabilització en resposta a estrès replicatiu és dependent de Rad53	97
1.3.3	L'estabilització en resposta a estrès replicatiu és dependent de Mec1	103
1.4	Els nivells de Clb6 són estabilitzats també en resposta a dany al DNA en forma dependent de Rad53.....	106
2	L'estabilització de Clb6 en resposta a estrès genotòxic requereix síntesi <i>de novo</i> i implica la re-activació d'MBF	109
2.1	L'estabilització de Clb6 en resposta a estrès genotòxic requereix síntesi <i>de novo</i>	109
2.2	L'estabilització dels nivells de Clb6 depèn de transcripció per MBF en una fase S compromesa.....	112
2.2.1	Dun1 és prescindible per l'estabilització dels nivells de Clb6	113
2.2.2	Swi6 és nuclear en una fase S compromesa	116
2.2.3	Clb6 és nuclear en una fase S compromesa per estrès replicatiu	119
2.2.4	Clb6 segueix unit a Cdc28 en presència d'estrès replicatiu	121
2.2.5	La localització nuclear de Swi6 en resposta a estrès replicatiu no depèn ni de Rad53 ni de Mec1	123
2.2.6	L'estabilització dels nivells de Clb6 requereix activitat transcripcional dependent d'MBF	126
3	Paper de l'estabilització de Clb6.....	134
3.1	Genètica reversa: efecte de la deleció de Clb6.....	134
3.1.1	Clb6 és prescindible en el control de la replicació en resposta a estrès genotòxic	135
3.1.1.1	<i>clb6Δ</i> reinicia amb normalitat la replicació després d'estrès replicatiu	135
3.1.1.2	<i>clb6Δ</i> inhibeix els orígens i estabilitza les forquilles de replicació amb normalitat en presència de dany al DNA	137
3.1.2	<i>clb6Δ</i> manté la inhibició de l'activitat CDK-M en presència d'estrès replicatiu	139
3.1.3	Clb6 és prescindible per a la viabilitat front a estrès genotòxic	141
3.1.4	La deleció de Clb6 no dona lloc a un defecte que activi Rad53.....	142
3.2	Aproximació complementària: efecte de la sobreexpressió de Clb6 en una fase S no pertorbada.....	144
3.2.1	La sobreexpressió de CLB6 atura les cèl·lules a mitosi	145

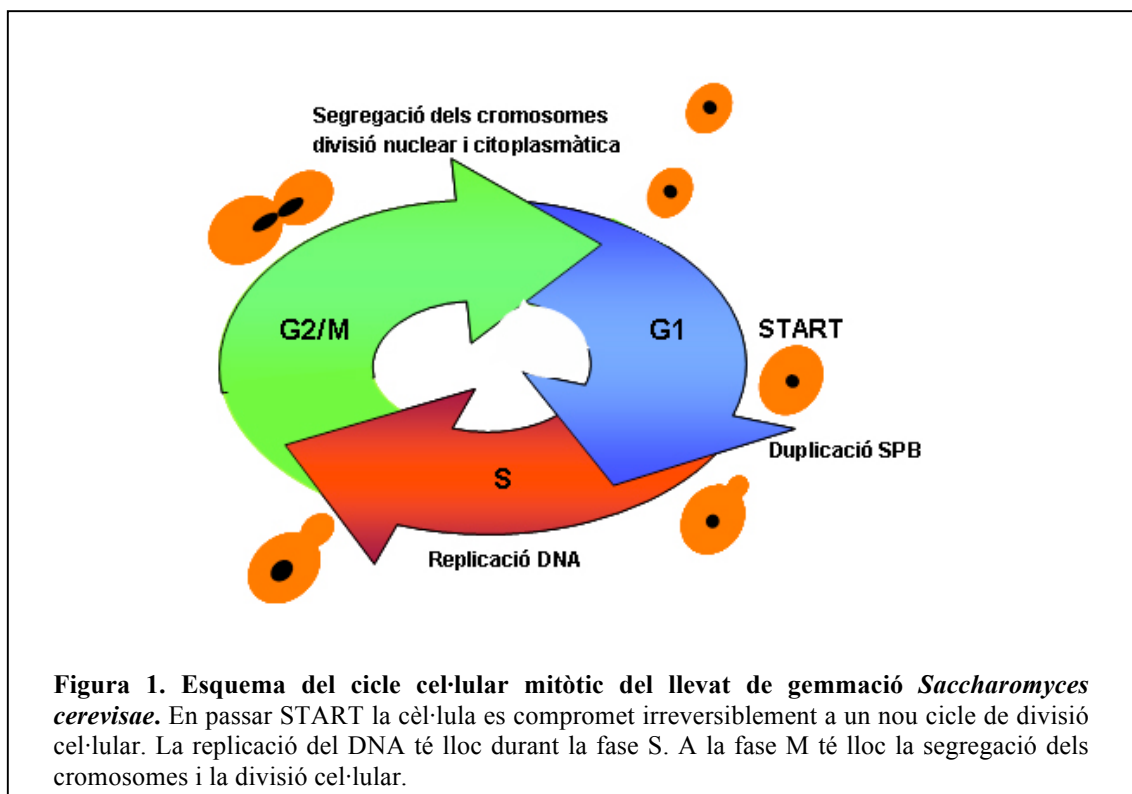
DISCUSSIÓ	149
1 A partir dels resultats originals d'aquest treball de tesi proposem el següent model:	151
2 A partir dels resultats d'aquest treball de tesi, s'obren els següents interrogants:	158
CONCLUSIONS	165
BIBLIOGRAFIA	169
ANNEXOS	185
Definicions	187
Abreviatures	188
Llistat de reactius utilitzats i cases comercials	189

INTRODUCCIÓ

1 El cicle de divisió cel·lular eucariota

El cicle de divisió cel·lular eucariota engloba una seqüència ordenada de processos que porta a la duplicació del seu material genètic i la posterior divisió en dues cèl·lules filles. Al llarg d'un cicle de divisió cel·lular la cèl·lula ha de: (1) créixer, (2) replicar el seu DNA; (3) segregar els cromosomes replicats de manera idèntica entre les dues cèl·lules filles i (4) dividir-se.

El cicle de divisió cel·lular s'ha dividit històricament en quatre fases: dues fases transitòries, que separen el final de la mitosis de l'inici de la replicació (Gap1, G1) i el final de la replicació de l'inici de la mitosi (Gap2, G2); i dues fases crítiques: la fase S (síntesi), on es replica el DNA i la fase M (mitosi) on els cromosomes replicats són segregats (Figura 1).



El cicle de divisió cel·lular eucariota requereix un control molt estricte per tal de preservar la informació genètica i la viabilitat cel·lular. És fonamental que cada procés s'iniciï quan la cèl·lula ha assolit les condicions que n'assegurin la compleció amb èxit (així per exemple, la cèl·lula sols es compromet a replicar i dividir el seu material genètic quan les condicions de creixement són òptimes). Per altra banda és fonamental també, evitar l'inici de processos posteriors fins que s'han completat amb èxit processos previs (així per exemple, cal impedir la segregació del material genètic fins que ha estat completament replicat). Per aconseguir, aquest elevat grau de regulació de la progressió del cicle cel·lular, existeixen dos sistemes oscil·ladors acoblats: (1) les quinases dependents de ciclina (CDK) i (2) els factors de transcripció específics de cada fase del cicle cel·lular.

Per tal d'assegurar la integritat del genoma, així com, la correcta segregació d'aquest, la cèl·lula posseeix mecanismes de vigilància anomenats checkpoints. Un d'aquests mecanismes, el checkpoint de la fase S detecta i respon a la presència de dany al DNA i estrès replicatiu, evitant l'aparició d'instabilitat genòmica .

Aquesta tesi es planteja estudiar el control del cicle de divisió cel·lular pel mecanisme de vigilància de la fase S

2 Mecanismes de control del cicle cel·lular

Per tal de preservar la informació genètica i la viabilitat cel·lular, el cicle de divisió cel·lular requereix un control estricte. És fonamental que cada procés s'iniciï quan la cèl·lula ha assolit les condicions que assegurin la seva culminació amb èxit (així per exemple, la cèl·lula sols es compromet a replicar i dividir el seu material genètic quan les condicions de creixement són òptimes). Per altra banda és fonamental també, evitar l'inici de processos posteriors fins que s'han completat amb èxit processos previs (així per exemple, cal impedir la segregació del material genètic fins que ha estat completament replicat). Per aconseguir, aquest elevat grau de regulació de la progressió del cicle cel·lular, existeixen dos sistemes oscil·ladors acoblats: (1) les quinases dependents de ciclina i (2) els factors de transcripció específics de cada fase del cicle.

En general, els gens la transcripció dels qual està regulada al llarg del cicle cel·lular s'activen just en el moment que els seus productes són necessàries, el que es conegut com a síntesi *just a temps* (de Lichtenberg, Jensen et al. 2005). La síntesi *just a temps* de complexos sencers només es produeix en el cas del nucleosoma, mentre que la ubiquitin-lligasa SCF és l'únic complex totalment estàtic (de Lichtenberg, Jensen et al. 2005). Pel contrari, en la resta de complexos implicats en la regulació del cicle cel·lular, només algunes subunitats són regulades transcripcionalment, per tal de controlar el moment de l'assemblatge final del complex, el que es coneix com assemblatge *just a temps* (de Lichtenberg, Jensen et al. 2005). L'assemblatge *just a temps* representa un obvi avantatge energètic respecte la síntesi *just a temps* de complexos complets. Interessantment, són les subunitats regulades transcripcionalment les que apareixen regulades per fosforilació per CDK, a més de contenir una sobrerrepresentació de seqüències de degradació PEST, la qual cosa confereix robustesa i capacitat de control fi a les activitats regulades al llarg del cicle cel·lular (de Lichtenberg, Jensen et al. 2005).

2.1 Quinases dependents de ciclina (CDK)

La progressió al llarg del cicle cel·lular està regulada per l'activitat quinasa depenent de ciclina (CDK). En el llevat de gemmació *S. cerevisiae* una única proteïna quinasa, codificada per CDC28 (equivalent a Cdk1 en altres organismes) regula l'ordre de les diferents fases i la progressió del cicle cel·lular: (Hartwell 1976; Pringle and Hartwell 1981). A humans actuen múltiples CDKs: Cdk4 i Cdk6 a fase G1; Cdk2 i Cdk1 a fase S, i Cdk1 a les fases G2 i M, cadascuna d'elles regulada per diferents ciclins específiques de cada una de les fases del cicle cel·lular: ciclina D a fase G1, ciclina E a la transició G1-S, ciclina A al llarg de les fase S i G2 i ciclina B a la mitosi (Giordano, Whyte et al. 1989; Fang and Newport 1991; Pines and Hunter 1991).

L'activitat de les quinases dependents de ciclina (CDKs) depèn de l'associació de la subunitat catalítica CDK amb la subunitat activadora, la ciclina (Morgan 1995; Pines 1995).

Les cèl·lules posseeixen múltiples CDKs. El llevat de gemmació *S. cerevisiae* en posseeix com a mínim 5 (Cdc28, Pho85, Kin28, Ssn3 i Ctk1). Cdc28 és la única CDK essencial per la progressió del cicle cel·lular (Hartwell, Mortimer et al. 1973; Jallepalli and Kelly 1997), constituint el motor del cicle cel·lular.

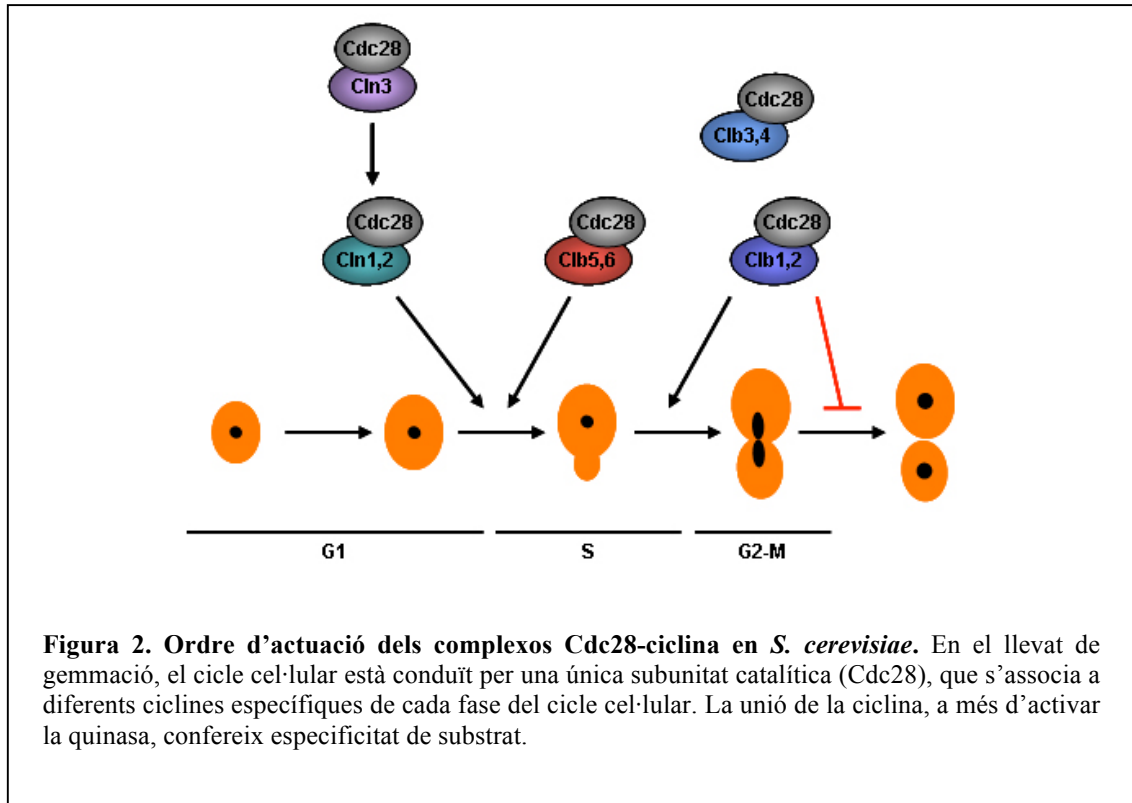
El gen que codifica per CDC28 és essencial. La majoria de mutants termosensibles de *cdc28* bloquegen la progressió del cicle cel·lular en Start (Hartwell 1974; Reed 1980; Reed 1980; Mendenhall, Richardson et al. 1988); encara que també s'han identificat mutants que aturen el cicle en G2-M (Piggott, Rai et al. 1982; Radcliffe, Trevethick et al. 1997).

Encara que l'activitat quinasa està sota el control de múltiples ciclines, el gen CDC28 s'expressa de forma constitutiva i els nivells proteics de Cdc28 són invariables a llarg del cicle cel·lular sense ser un factor limitant per la regulació (Mendenhall, Jones et al. 1987).

La quinasa Cdc28 s'activa per associació a diferents ciclines específiques de cada fase del cicle cel·lular, conferint especificitat per l'activitat CDK: Cln1,2 en G1, Clb5,6 al llarg de la fase S i Clb1-4 en fase G2-M (Hartwell, Mortimer et al. 1973; Evans, Rosenthal et al. 1983; Schwob and Nasmyth 1993; Koch and Nasmyth 1994).

2.1.1 Ciclines

Les ciclines, subunitats activadores de les CDKs, són proteïnes els nivells de les quals estan estretament regulats a nivell de transcripció i destrucció de manera que, la seva presència és específica de cada fase del cicle cel·lular. En el llevat de gemmació s'han identificat nou ciclines diferents que s'associen amb Cdc28, en diferents fases del cicle cel·lular, conferint especificitat a l'activitat CDK (Nash, Tokiwa et al. 1988; Hadwiger, Wittenberg et al. 1989; Richardson, Wittenberg et al. 1989; Ghiara, Richardson et al. 1991; Surana, Robitsch et al. 1991; Fitch, Dahmann et al. 1992; Richardson, Lew et al. 1992; Schwob and Nasmyth 1993; Donaldson, Raghuraman et al. 1998). Les ciclines de fase G1 Cln1, Cln2 i Cln3 promouen i dirigeixen la cèl·lula a través de la fase G1; les ciclines de fase S Clb5 i Clb6, promouen la replicació del DNA i la progressió de la fase S i, les ciclines mitòtiques Clb3, Clb4, Clb1 i Clb2, promouen la segregació dels cromosomes i la divisió cel·lular (Figura 2).



2.1.2 Ciclines de fase S

Al final de la fase G1 es transcriuen les ciclins promotores de l'inici de la replicació, Clb5 i Clb6 de forma dependent del factor de transcripció MBF (Schwob and Nasmyth 1993; Donaldson, Raghuraman et al. 1998) (vegeu punt 2.2.2).

CLB5 s'identificà com un gen transcrit al final de G1, amb un paper important en la replicació del DNA, ja que, els mutant *clb5Δ* tot i que viables, presenten una fase anòmalament llarga (Epstein and Cross 1992).

Posteriorment, s'identificà una segona ciclina promotora de la fase S, CLB6, per homologia amb Clb5 (Kuhne and Linder 1993; Schwob and Nasmyth 1993). En aquests estudis, es confirmà que la deleció de Clb5 allarga la duració de la fase S i a més, es va mostrar que mentre que la deleció de Clb6, no té un defecte aparent, la deleció simultània dels dos gens altera el temps d'inici de la replicació del DNA. Aquests resultats indiquen que, cadascuna de les dues ciclins pot iniciar amb normalitat la replicació del DNA, però que, Clb5 i no Clb6, és necessària després per tal que es porti a terme de forma eficaç.

També, es va determinar que la transcripció de CLB5 i CLB6 al final de la fase G1 és dependent del factor de transcripció específic de fase G1 i promotor de la fase S, MBF (vegeu punt 2.2.2).

En estudis més exhaustius dels mutants de deleció de les ciclines de fase S, es va determinar que la ciclina Clb5 dispara orígens de replicació primerencs i tardans, mentre que Clb6 només pot disparar orígens de replicació primerencs (Donaldson, Raghuraman et al. 1998). Així, els mutants *clb5Δ* (CLB6) inicien la replicació puntualment, com una soca silvestre però, aquesta dura dos cops més. En aquests mutants els orígens de replicació tardans no són disparats i la replicació de la totalitat del DNA depèn dels orígens de replicació establerts a l'inici de la fase S. Per tant, la ciclina Clb6 només activa els orígens de replicació primerencs. En canvi, els mutants *clb6Δ* (CLB5) inicien la replicació puntualment, com una soca silvestre i, la duració del procés de replicació no està alterat. En aquests mutants els orígens de replicació primerencs i tardans s'activen quan pertoca al igual que en una soca silvestre. Per tant, la ciclina de fase S Clb5 activa tant els orígens de replicació primerencs com els tardans. Per últim, els mutant *clb5Δ clb6Δ* inicien la replicació molt més tard que una soca silvestre però, un cop iniciada aquesta tarda el mateix temps a completar la replicació. L'activació de la replicació en aquests mutants, coincideix amb l'activació de l'activitat CDK mitòtica associada a les ciclines Clb1,2 (Donaldson, Raghuraman et al. 1998).

Recentment, en el transcurs d'aquest treball de tesi es va determinar el motiu pel qual la ciclina de fase S Clb6 sols reconeix els orígens de replicació primerencs. Aquesta ciclina, no presenta una afinitat específica per uns o altres orígens de replicació, sinó que és degradada de forma dependent del sistema ubiquitin-lligasa SCF associat a Cdc4 aproximadament a la primera meitat de la fase S (Jackson, Reed et al. 2006). L'altra ciclina de fase S, Clb5 és degradada a la transició G2-M de forma dependent del sistema ubiquitin-lligasa APC associat a Cdc20 (Shirayama, Toth et al. 1999; Wasch and Cross 2002).

La diferent regulació de Clb5 i Clb6 permet explicar el fet que les soques *clb5Δ* activin solament orígens de replicació primerencs.

Posteriorment, s'ha demostrat que un increment de la dosi de Clb6 rescata el defecte en la duració de la fase S en els mutants *clb5Δ* (Gibson, Aparicio et al. 2004). De manera similar, una forma hiperestable de Clb6 (CLB6Δ3P), que no es degradada a mitja fase S, rescata igualment el defecte de la duració de la fase S en els mutants *clb5Δ* (Jackson, Reed et al. 2006).

Substrats específics de CDK associat a Clb6

Si bé és generalment assumit que les dues ciclines de fase S són altament redundants pel que fa als seus substrats diana de l'activitat CDK-S, aquest àmbit està molt poc estudiat. L'únic substrat específic conegut fins al moment per la ciclina Clb6 és la proteïna Swi6. Swi6 junt amb Swi4 i Mbp1 forma els factors de transcripció específic de fase G1, SBF i MBF respectivament (vegeu punt 2.2.2). CDK associada a Clb6 fosforila Swi6 a la fase S i l'exclou del nucli (Geymonat, Spanos et al. 2004). Aquesta funció és específica de Clb6 i no és redundant amb Clb5. Donat que, del factor MBF en depèn la transcripció, entre d'altres, de les dues ciclines de fase S, CLB5 i CLB6, l'exclusió de Swi6 pot constituir un mecanisme de control de la transcripció dependent d'SBF i MBF (vegeu punt 2.2.i i 2.2.2). Un cop finalitzat el cicle cel·lular, per tal d'iniciar un nou cicle és necessari que Swi6 es torni a localitzar al nucli. El responsable que Swi6 es localitzi al nucli en iniciar un nou cicle de divisió cel·lular és la fosfatasa Cdc14 (Geymonat, Spanos et al. 2004).

2.1.3 Activitat quinasa dependent de ciclina de la fase S

Inici de la replicació

Des dels anys 90 es coneix el paper essencial de l'activitat CDK-S en l'inici de la replicació (Hereford and Hartwell 1974; Blow and Nurse 1990; D'Urso, Marraccino et al. 1990; Schwob and Nasmyth 1993). No obstant, no ha estat fins fa poc, que s'han identificat les dianes essencials de CDK-S, per a l'activació de la replicació: les proteïnes Sld2 i Sld3 (Masumoto, Muramatsu et al. 2002; Tanaka, Umemori et al. 2007; Zegerman and Diffley 2007) (vegeu punt 3.3). La fosforilació de Sld2 i Sld3 per CDK-S comporta el reclutament de Dbp11 als orígens de replicació, i el subsegüent desenrotllament de la doble hèlix de DNA, reclutament de les DNA polimerases i activació de l'helicasa replicativa. Una segona activitat específica de la fase S, DDK (vegeu punt 3.3), és també essencial per l'activació dels orígens de replicació.

Inhibició de la re-replicació per part de CDK-S

Per tal d'assegurar que el material genètic és replicat en la seva totalitat només una vegada per cada cicle cel·lular i evitar la re-replicació, CDK-S actua a múltiples nivells (Broek, Bartlett et al. 1991; Hayles, Fisher et al. 1994; Dahmann, Diffley et al. 1995). Per una banda, l'activitat CDK-S fosforila dues de les proteïnes del complex ORC: Orc2 i Orc6. La seva fosforilació impedeix l'una unió eficient d'un nou pre-RC fins al següent cicle cel·lular (Nguyen, Co et al. 2001). A la vegada la interacció directe de Clb5 amb Orc6 impedeix el re-assemblatge i evita la re-replicació (Wilmes, Archambault et al. 2004).

Per altra banda CDK-S fosforila Cdc6 promovent la seva degradació pel proteasoma (Drury, Perkins et al. 1997; Elsasser, Chi et al. 1999; Calzada, Sanchez et al. 2000; Drury, Perkins et al. 2000).

Normalment s'atribueix a l'activitat CDK de fase S associada Clb5 les funcions inhibidores de la re-replicació (Wilmes, Archambault et al. 2004). No obstant, s'ha observat que una forma hiperestable de Clb6, no degradable per SCF^{Cdc4} a mitja fase S (CLB6Δ3P), és capaç de dur a terme els mateixos processos inhibitoris que Cdc28-Clb5 (Ikui, Archambault et al. 2007). L'únic motiu pel qual Cdc28-Clb6 no intervé en la inhibició de la re-replicació és degut a la seva degradació dependent de SCF^{cdc4}, abans que Clb5 (Jackson, Reed et al. 2006; Ikui, Archambault et al. 2007).

2.1.4 Ciclines mitòtiques i activitat CDK-M

Les ciclines mitòtiques Clb1-4, s'expressen en dues onades de transcripció seqüencial. Al final de la fase S s'expressen les ciclines Clb3 i Clb4 (Fitch, Dahmann et al. 1992; Richardson, Lew et al. 1992), i en G2-M s'expressen les ciclines mitòtiques Clb1 i Clb2 (Surana, Roberts et al. 1991; Epstein and Cross 1992; Fitch, Dahmann et al. 1992; Richardson, Lew et al. 1992), en forma dependent del factor de transcripció Fkh1,2/Mcm1/Ndd1 (Maher, Cong et al. 1995; Koranda, Schleiffer et al. 2000).

L'activitat CDK mitòtica (CDK-M) és inhibida per la quinasa Swe1, transcrita en G1 en forma dependent d'MBF i present fins a la seva degradació a G2-M. Swe1 inhibeix als complexos CDK-M per fosforilació de Cdc28 a la tirosina 19, sense afectar l'activitat CDK-S (Amon, Surana et al. 1992; Sorger and Murray 1992; Booher, Deshaies et al. 1993). Aquesta fosforilació és revertida per la tirosina-fosfatasa Mih1 (Russell and Nurse

1986). La tirosina 19 de Cdc28 és fosforilada en resposta a estrès replicatiu generat amb hidroxiuurea (Sorger and Murray 1992), compatible amb un paper de Swe1 en el bloqueig de la mitosi mediat pel mecanisme de vigilància de la fase S. Si bé, s'ha demostrat la implicació de Swe1 en el bloqueig de la mitosi mediat pel mecanisme de vigilància de la morfogènesi (Lew and Reed 1995; Sia, Herald et al. 1996; Lengronne and Schwob 2002), o en resposta a estrès osmòtic (Clotet, Escote et al. 2006), els mutants *swe1* mantenen la capacitat de bloquejar la mitosi en resposta a estrès genotòxic (Amon, Surana et al. 1992; Sorger and Murray 1992), la qual cosa seria compatible amb l'existència de múltiples punts de control en paral·lel.

L'activitat CDK-M i la quinasa mitòtica Cdc5 promouen la fosforilació de Swe1 i la seva degradació pel sistema ubiquitin-proteasoma APC (Thornton and Toczyski 2003; Asano, Park et al. 2005).

Les ciclins mitòtiques són necessàries per la progressió a mitosi (Surana, Robitsch et al. 1991; Fitch, Dahmann et al. 1992; Richardson, Lew et al. 1992; Amon, Tyers et al. 1993). A més promouen el canvi de creixement polar a creixement isotròpic de la gemma (Grandin and Reed 1993; Lew and Reed 1993).

L'activitat CDK associada a Clb2 promou la segregació de les cromàtides germanes i l'elongació del fus mitòtic al final de la mitosi (Surana, Robitsch et al. 1991; Fitch, Dahmann et al. 1992; Richardson, Lew et al. 1992; Amon, Tyers et al. 1993; Grandin and Reed 1993).

Per altra banda, les ciclins mitòtiques poden suplir les funcions de les ciclins de fase S en la replicació del DNA en absència d'aquestes (*clb5Δ clb6Δ*) (Donaldson, Raghuraman et al. 1998).

2.2 Factors de transcripció específics de les diferents fase del cicle cel·lular

Un segon nivell de control del cicle cel·lular està constituït per un sistema de factors de transcripció, activats seqüencialment, que regulen el programa de transcripció periòdica, funcionant com un oscil·lador independent de l'activitat CDK (Orlando, Lin et al. 2008). Aquest oscil·lador transcripcional controla, entre d'altres, l'expressió de les diferents ciclins específiques de cadascuna de les fases del cicle cel·lular. Tot i que aquest oscil·lador transcripcional és essencialment independent de CDK (Orlando, Lin et al. 2008), a la pràctica CDK modula la seva activitat conferint robustesa al control del cicle cel·lular (Orlando, Lin et al. 2008).

Dos factors de transcripció operen el llevat de gemmació en fase G1, promovent l'entrada a fase S: SBF (*Swi4/6 Cell-cycle Box Binding Factor*) i MBF (*Mlu I Cell-cycle Box Binding Factor*). L'activació d'SBF i MBF implica el pas d'Start i compromet la cèl·lula irreversiblement a una ronda de replicació i divisió. SBF i MBF són els anàlegs funcionals en el llevat de gemmació d'E2F en humans (Cooper 2006).

Per immunoprecipitació de cromatina s'han mapejat 200 gens amb MBF o SBF unit al seu promotor (Iyer, Horak et al. 2001; Simon, Barnett et al. 2001). A més SBF activa un mínim de 9 factors de transcripció addicionals, que a l'hora indueixen l'expressió de gens durant la transició G1-S (Horak, Luscombe et al. 2002). Per tant, SBF desencadena una cascada transcripcional que implica l'activació d'una àmplia xarxa de gens involucrats en l'entrada a fase S.

2.2.1 El factor de transcripció SBF

El factor de transcripció SBF està format per dues proteïnes: Swi6 una proteïna que presenta activitat transactivadora i Swi4, que presenta activitat d'unió al DNA (Nasmyth and Dirick 1991). L'expressió de Swi4, però no la de Swi6, varia al llarg del cicle cel·lular, presentant un pic en G1 (MacKay, Mai et al. 2001).

Històricament es va descobrir SBF com un factor que controlava la transcripció específica d'HO (endonucleasa que promou el canvi heterotàl·lic) a Start. Delecions en el promotor d'HO van permetre la identificació d'una seqüència consens (CACGAAAA) que

confereix especificitat per ser expressada en Start (Nasmyth 1985). Aquesta seqüència es coneix com a caixa SCB (*Swi4/6 Cell-cycle Box*) i és reconeguda per Swi4 (Ogas, Andrews et al. 1991) (Figura 3).

SBF transcriu gens específics de G1 implicats en gemmació, en biosíntesi de la membrana i la paret cel·lular, a més de les ciclines de fase G1 CLN1, CLN2, (Breedon and Nasmyth 1987; Andrews and Herskowitz 1989; Andrews and Herskowitz 1989; Taba, Muroff et al. 1991; Iyer, Horak et al. 2001; Simon, Barnett et al. 2001).

A l'inici de la fase G1 SBF està reprimat per acció de Whi5, l'anàleg funcional a llevat de gemmació de pRB en humans (de Bruin, McDonald et al. 2004). La fosforilació de Whi5 per Cdc28-Cln3 quan la cèl·lula ha assolit un creixement suficient, dóna lloc a la seva dissociació d'SBF i a la seva activació transcripcional (Costanzo, Nishikawa et al. 2004).

2.2.2 El factor de transcripció MBF

MBF està format per la proteïna transactivadora Swi6, present també en SBF, i un homòleg a Swi4, Mpb1 que actua com a proteïna d'unió al DNA (Wijnen, Landman et al. 2002). Mpb1, reconeix la caixa MCB (*Mlu I Cell-cycle Box*) que presenta una seqüència consens (ACGCGT) que confereix especificitat pels promotors de gens expressants després d'Start (Verma, Patapoutian et al. 1991) (Figura 3).

MBF transcriu gens implicats en la replicació i la reparació del DNA, tals com les ciclines de fase S CLB5 i CLB6; proteïnes essencials per a la replicació del DNA com POL1, POL12, RFA1, CDC45; subunitats ribonuclèotid-reductasa (RNR), l'activitat limitant en la síntesi de dNTPs; i l'inhibidor de l'activitat CDK de fase M, SWE1 (Feldman, Correll et al. 1997; Iyer, Horak et al. 2001; Simon, Barnett et al. 2001)

S'ha suggerit que SBF i MBF són altament redundants, sobre la base que en mutants *mbp1Δ* s'observa expressió en fase G1 de gens regulats per MBF (Bean, Siggia et al. 2005). No obstant, sabem ara que la interdependència és més complexa: mentre que en els mutants *swi4Δ* (que no tenen activitat SBF) l'expressió dels gens regulats per SBF s'anul·la, en els mutants *mbp1Δ* l'expressió dels gens regulats per MBF esdevé basal (de Bruin, Kalashnikova et al. 2006), probablement degut al fet que Mpb1 és necessari per

reclutar el repressor d'MBF Nrm1 (de Bruin, Kalashnikova et al. 2006). Interessantment, no tots els gens regulats per MBF mostren el mateix perfil de desregulació en el mutant *mbp1Δ*: mentre que en alguns casos l'expressió basal no mostra variacions al llarg del cicle cel·lular, en altres s'observa un increment relatiu després d'Start (de Bruin, Kalashnikova et al. 2006), compatible amb una certa intervenció d'SBF (Bean, Siggia et al. 2005).

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	Humans
SBF	Swi6 Swi4	Hp1 Msh3	E2F 1, 2, 3
MBF	Swi6 Mbp1	Cdc10 Res1,2	E2F1, 2, 3

Figura 3. Anàlegs funcionals dels factors de transcripció de fase G1: SBF i MBF en *S. pombe* i humans.

2.3 Degradació pel sistema ubiquitin-proteasoma

Dos complexos E3 ubiquitin-lligasa són essencials en la progressió del cicle cel·lular: SCF (*Skp1, Cullin, F-box*) i APC (*Anaphase Promoting Complex*), essent responsables de la regulació, via proteasoma, de la presència de proteïnes que han de ser eliminades per permetre el pas d'una fase a la següent, o per evitar la repetició de processos.

SCF i la transició G1-S

El complex SCF és essencial per a l'entrada en fase S. A través de la F-box Cdc4 degrada l'inhibidor de CDK associada a ciclins del tipus CLB, Sic1 (Feldman, Correll et al. 1997; Skowyra, Craig et al. 1997; Verma, Annan et al. 1997; Visintin, Craig et al. 1998; Shou, Azzam et al. 2002; Yoshida, Asakawa et al. 2002; D'Amours, Stegmeier et al. 2004; Queralt and Uhlmann 2008).

A més, SCF^{Cdc4} és el responsable de la degradació de Cdc6 (Drury, Perkins et al. 1997), un dels components del pre-RC assemblet en els orígens de replicació (vegeu punt 3.2).

Cdc6 és essencial per a l'activació dels orígens de replicació, i la seva eliminació a la fase S, constitueix un dels nivells de control de la re-replicació (Nguyen, Co et al. 2001).

En fase S, Clb6, una de les dues ciclins promotores de la replicació és degradada de forma dependent del complex SCF^{Cdc4} (Jackson, Reed et al. 2006). Clb6 és l'única ciclina de tipus CLB que no és degradada per APC, i el motiu pel qual té una presència tant limitada en el cicle cel·lular és desconegut.

APC en la mitosi

APC regula la transició metafase-anafase i la sortida de mitosi.

En primer lloc, APC associat al co-activador Cdc20 (APC^{Cdc20}), és responsable de l'eliminació, via proteasoma, de Securina/Pds1 (Cohen-Fix, Peters et al. 1996; Visintin, Prinz et al. 1997), permetent l'anafase i l'activació de FEAR (*cdc-Fourteen Early Anaphase Release*), un dels dos complexos promotors de la sortida de mitosi (vegeu punt 3.4).

FEAR conjuntament amb MEN (*Mitotic Exit Network*), cooperen per promoure la sortida de Cdc14 del nuclèol (Shou, Azzam et al. 2002; Yoshida, Asakawa et al. 2002; Visintin, Stegmeier et al. 2003; D'Amours, Stegmeier et al. 2004; Queralt and Uhlmann 2008), la qual cosa comporta l'activació de APC^{Cdh1} (Schwab, Lutum et al. 1997; Jaspersen, Charles et al. 1998; Visintin, Craig et al. 1998). APC^{Cdh1} promou la degradació de les ciclins mitòtiques (Jaspersen, Charles et al. 1998; Visintin, Craig et al. 1998), inactivant l'activitat CDK de fase M, essencial per permetre la sortida de la mitosi (Wasch and Cross 2002) (vegeu punt 3.4).

3 Control de la progressió del cicle cel·lular

3.1 Control de G1 i Start

En el llevat de gemmació Start és un punt de control crucial. En aquesta transició, les cèl·lules es comprometen a iniciar un nou cicle de divisió cel·lular. Aquest punt, es coneix en humans com el punt de restricció (Pringle and Hartwell 1981). Només es superarà Start si la cèl·lula assoleix una mida determinada i les condicions ambientals són les adequades (Johnston, Pringle et al. 1977).

A la fase G1 la cèl·lula decideix entre: (1) parar el cicle cel·lular en G1, entrant en una fase estacionària (Kupiec, Byers et al. 1997); (2) si es haploide i les condicions són òptimes es poden conjugar en presència de cèl·lules del tipus heterotàlic complementari (Hicks and Herskowitz 1976; Nasmyth 1983); (3) si són diploides i les condicions nutricionals són limitants, esporular (Colomina, Gari et al. 1999); i (4) comprometeres a iniciar una nova ronda de replicació del DNA i divisió cel·lular, creuant Start (Johnston, Pringle et al. 1977). A nivell bioquímic Start implica l'activació dels factors de transcripció específics de G1, promotors de la fase S, SBF i MBF.

Cal coordinar el creixement cel·lular i el cicle cel·lular. L'activador més amunt d'Start és Cln3, l'única ciclina present, a baix nivell, al llarg de la fase G1 (Tyers, Tokiwa et al. 1993; Yaglom, Linskens et al. 1995). L'activitat Cdc28-Cln3 està altament regulada, coordinant el creixement cel·lular amb la progressió del cicle, i és responsable de creuar Start quan les cèl·lules assoleixen una mida crítica (Hartwell and Unger 1977; Johnston, Pringle et al. 1977).

Cln3 és inhibida a dos nivells. La proteïna Whi3, involucrada en el control de la grandària cel·lular, s'uneix al mRNA de CLN3 (Gari, Volpe et al. 2001; Wang, Gari et al. 2004), confinant la traducció de Cln3 al reticle endoplasmàtic, on Cln3, associada a Cdc28, és retinguda per les xaperones Ssa1,2. A mesura que G1 avança l'acumulació de la xaperona Ydj1 desbloqueja el complex Ssa1,2, alliberant Cdc28-Cln3 del reticle endoplasmàtic i permetent la seva acumulació nuclear (Verges, Colomina et al. 2007).

Un cop al nucli Cdc28-Cln3 fosforila Whi5, activant SBF. Whi5 és un inhibidor d'SBF (Costanzo, Nishikawa et al. 2004; de Bruin, McDonald et al. 2004). La fosforilació de Whi5 per Cdc28-Cln3 provoca l'exclusió nuclear de l'inhibidor (Figura 4). El mecanisme d'activació d'MBF a Start és encara desconegut. SBF controla fonamentalment gens implicats en l'aparició de la gemma, la duplicació del SPB (fus mitòtic) i el creixement de la cèl·lula, a més de les ciclins de fase G1 Cln1 i Cln2, mentre que MBF controla gens implicats en la replicació del DNA, a més de les ciclins de fase S Clb5 i Clb6 (Johnston, Morgan et al. 1996; Simon, Barnett et al. 2001) (vegeu punt 2.2) (Figura 4). L'activació d'SBF i MBF implica doncs el pas d'Start. Degut a la dependència seqüencial dels factors de transcripció que operen en fases subsegüents, la cèl·lula queda compromesa a acabar una ronda de divisió cel·lular: ha creuat el punt de no retorn (Figura 4).

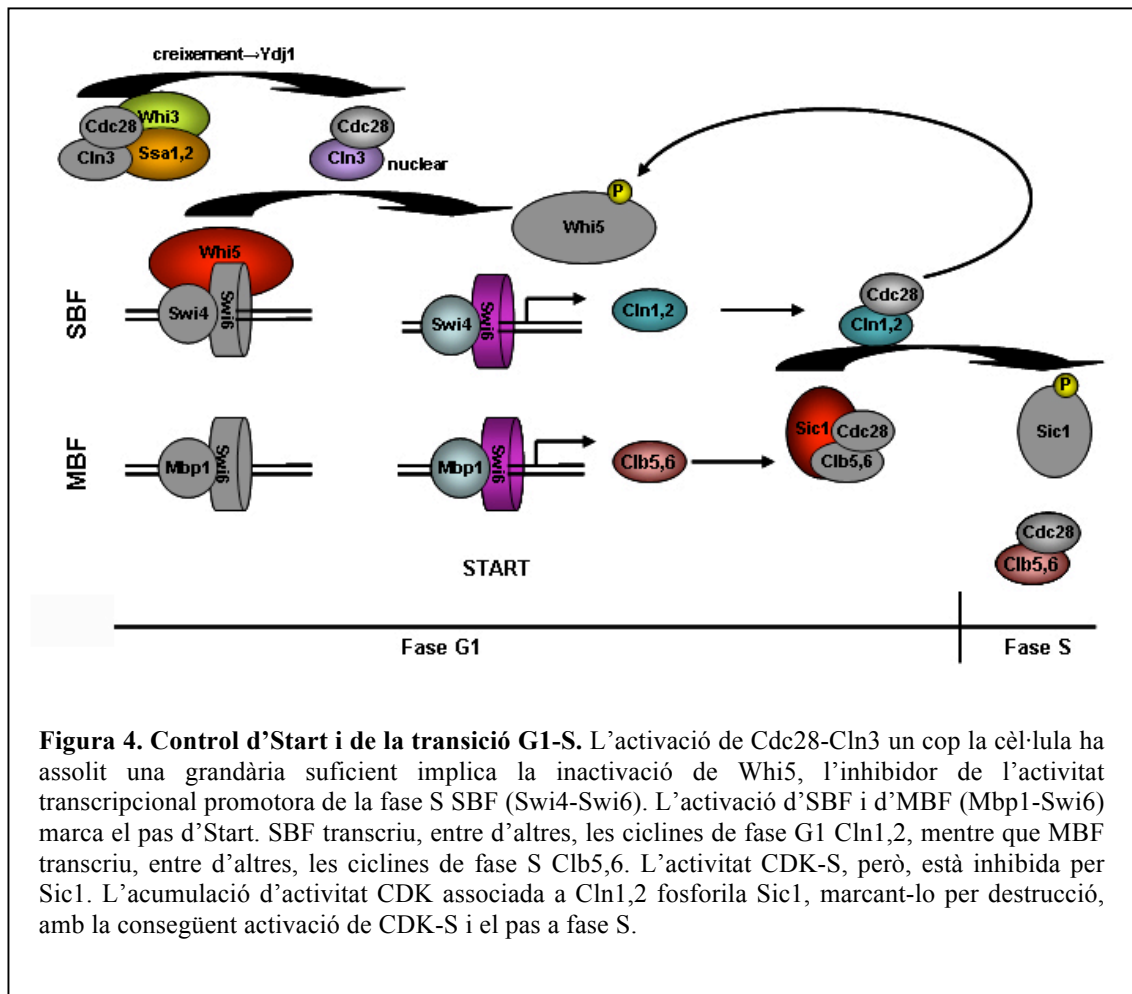


Figura 4. Control d'Start i de la transició G1-S. L'activació de Cdc28-Cln3 un cop la cèl·lula ha assolit una grandària suficient implica la inactivació de Whi5, l'inhibidor de l'activitat transcripcional promotora de la fase S SBF (Swi4-Swi6). L'activació d'SBF i d'MBF (Mbp1-Swi6) marca el pas d'Start. SBF transcriu, entre d'altres, les ciclins de fase G1 Cln1,2, mentre que MBF transcriu, entre d'altres, les ciclins de fase S Clb5,6. L'activitat CDK-S, però, està inhibida per Sic1. L'acumulació d'activitat CDK associada a Cln1,2 fosforila Sic1, marcant-lo per destrucció, amb la consegüent activació de CDK-S i el pas a fase S.

3.2 Control de la transició G1-S

Assemblatge del complexos de pre-replicació (pre-RC)

Previ a l'inici de la replicació durant la fase S, és necessari reclutar una sèrie d'elements essencials que llicencien els orígens de replicació per ser activats.

El Complex de Reconeixement dels Orígens (ORC), reconeix les seqüències de DNA que defineixen els orígens de replicació, les anomenades Seqüències de Replicació Autònoma (ARS) (Stinchcomb, Struhl et al. 1979; Bell and Stillman 1992). A llevat de gemmació, ORC roman unit als orígens al llarg de tot el cicle cel·lular (Diffley and Cocker 1992), actuant de plataforma d'aterratge per a la resta d'elements que constitueixen els pre-RC. El reclutament d'aquests elements és seqüencial: la unió de Cdc6 (Cocker, Piatti et al. 1996; Santocanale and Diffley 1996; Detweiler and Li 1997) és necessària per la unió de Cdt1-MCM (Coleman, Carpenter et al. 1996; Aparicio, Weinstein et al. 1997; Donovan, Harwood et al. 1997; Tanaka, Umemori et al. 2007) i, aquesta, per a la unió de Sld3-Cdc45 (Kamimura, Tak et al. 2001).

Activació de CDK-S

Un cop transcrites les ciclines de fase S, Clb5 i Clb6, s'associen amb la quinasa depenen de ciclina Cdc28. Els complexos Cdc28-Clb5 i Cdc28-Clb6 en ser produïts són inhibits per Sic1, un inhibidor específic de l'activitat CDK associada a ciclines CLB, però no a ciclines del tipus CLN (Mendenhall 1993; Schwob, Bohm et al. 1994). Sic1 es produït en la transició M-G1 en forma dependent del factor de transcripció Swi5 (Knapp, Bhoite et al. 1996; Toyn, Johnson et al. 1997; Aerne, Johnson et al. 1998). Sic1 inhibeix els complexos Cdc28-Clb blocant el centre actiu de Cdc28 (Donovan, Toyn et al. 1994; Schwob, Bohm et al. 1994; Schneider, Yang et al. 1996).

Per permetre l'entrada de les cèl·lules en fase S és necessària, doncs la degradació de Sic1. L'acumulació d'activitat -Cdc28-Cln1,2 promou la fosforilació de Sic1, marcant-lo per degradació pel complex ubiquitin-lligasa SCF^{Cdc4} (Schneider, Yang et al. 1996; Tyers 1996; Skowyra, Craig et al. 1997; Nash, Tang et al. 2001).

La destrucció de Sic1 provoca l'aparició de l'activitat CDK de fase S (Cdc28-Clb5 i Cdc28-Clb6), marcant l'inici de la replicació del DNA (fase S).

Inhibició de la transcripció dependent d'MBF i SBF

La transcripció promotora de la fase S dependent d'SBF i MBF és limitada a la fase G1 a través de diferents mecanismes.

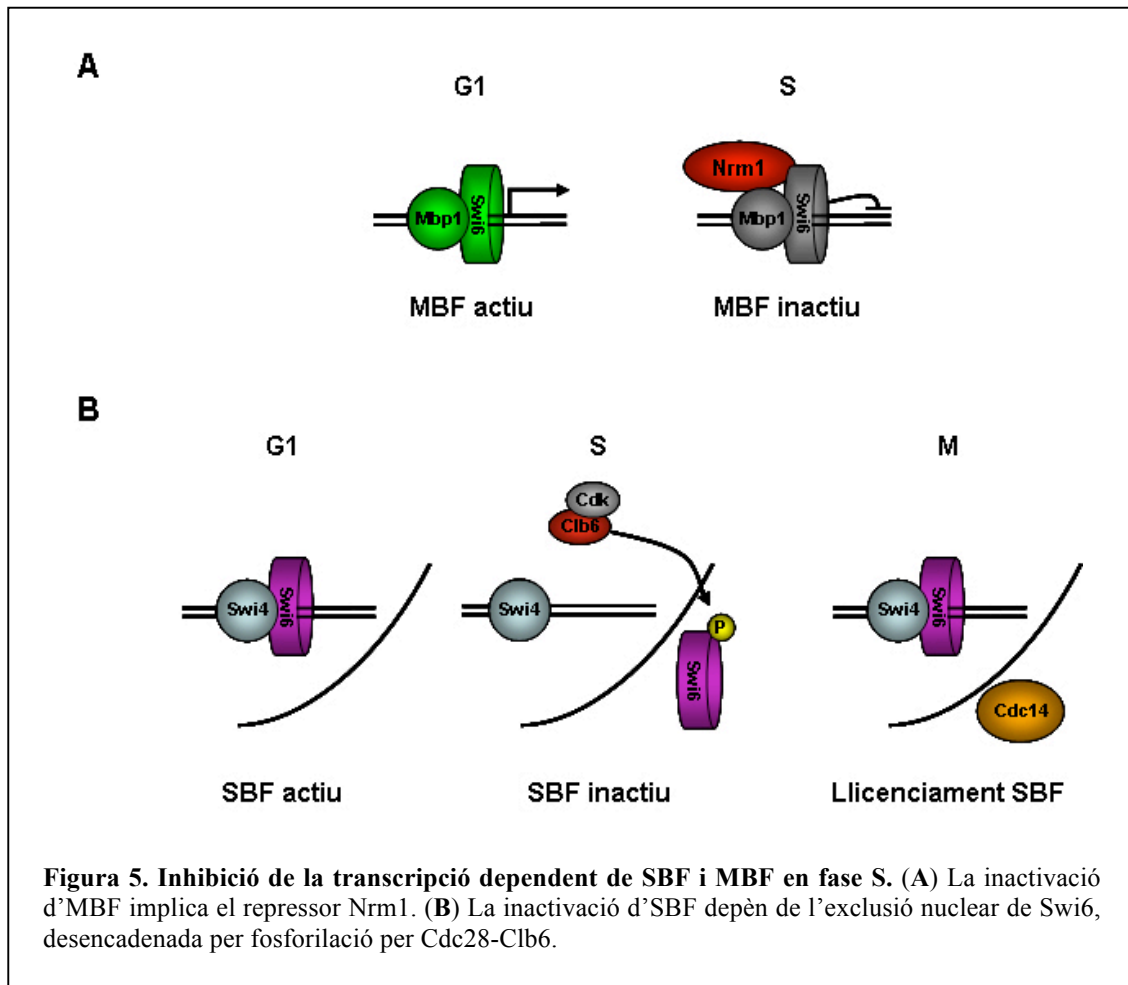
Repressió d'MBF per Nrm1

Nrm1 inhibeix l'expressió de gens dependents d'MBF en fase S (de Bruin, Kalashnikova et al. 2006). Mbp1 segueix unit als promotors regulats per MBF (Koch, Moll et al. 1993) i es necessari per reclutar el repressor Nrm1 (vegeu Figura 5A). En aquesta línia s'observa que en mutants *mbp1Δ*, els gens regulats per MBF mostren una expressió continuada a llarg del cicle cel·lular (Bean, Siggia et al. 2005).

Al final del període de treball d'aquesta tesi s'ha descrit, en el llevat de fissió *Schizosaccharomyces pombe*, que en resposta a estrès replicatiu i de forma dependent del mecanisme de vigilància de la fase S, el repressor Nrm1 és fosforilat, alliberant-se dels promotors regulats per MBF (de Bruin, Kalashnikova et al. 2008).

Exclusió nuclear de Swi6

L'activitat d'SBF i MBF depèn de la proteïna transactivadora Swi6. Swi6 és exclosa del nucli en fase S (Taba, Muroff et al. 1991; Sidorova, Mikesell et al. 1995; Queralt and Igual 2003). L'exclusió és específicament dependent de la fosforilació per l'activitat CDK-S associada a Clb6, però no a Clb5 (Geymonat, Spanos et al. 2004), constituint l'única diana específica diferencial coneguda entre les dues ciclines de fase S. Aquesta exclusió nuclear de Swi6 és, a més essencial per a la reactivació d'SBF, però no d'MBF, a la fase G1 del següent cicle cel·lular, permetent possiblement la càrrega al citosol d'un factor de llicenciament de l'activitat SBF (Queralt and Igual 2003) (vegeu Figura 5B). La desfosforilació de Swi6 és dependent de la fosfatasa mitòtica Cdc14 (Geymonat, Spanos et al. 2004).



3.3 Control de l'inici de la replicació del DNA

Per iniciar la replicació durant la fase S són essencials dues quinases conservades evolutivament: La quinasa dependent de ciclina associada a les ciclins de fase S Clb5 i Clb6 (CDK-S), i la quinasa de fase S Dbf4-Cdc7 (DDK).

En *S. cerevisiae* Sld2 i Sld3 són les dues dianes essencials de la quinasa CDK-S (Tanaka, Umemori et al. 2007; Zegerman and Diffley 2007). Sld2 i Sld3 són dos constituents essencials del complex d'iniciació (pre-RC). La combinació d'un mutant fosfomimètic de Sld2 amb una fusió Sld3-Dpb11 constitueix un bypass de CDK-S, permetent la replicació de DNA en absència d'activitat CDK (Zegerman and Diffley 2007). Aquest bypass de CDK-S encara requereix l'activitat DDK per iniciar la replicació (Zegerman and Diffley 2007). De forma similar a l'activitat CDK, DDK està constituït per una subunitat

catalítica, Cdc7, i una subunitat activadora, Dbf4. La presència de Cdc7 és constant al llarg del cicle cel·lular (Jackson, Pahl et al. 1993; Yoon, Loo et al. 1993), mentre que Dbf4 és una proteïna inestable, degrada pel sistema ubiquitin-lligasa APC, que s'acumula només a la fase S (Cheng, Collyer et al. 1999; Weinreich and Stillman 1999; Ferreira, Santocanale et al. 2000).

DDK és essencial per l'inici de la replicació i l'activació de cadascun dels orígens de replicació (Bousset and Diffley 1998; Donaldson, Fangman et al. 1998). DDK fosforila la subunitat Mcm4 de l'helicasa replicativa MCM, promovent la formació d'un complex estable entre MCM i el seu factor de processivitat Cdc45 (Sheu and Stillman 2006).

La càrrega de Dpb11 en forma dependent de CDK-S i la formació del complex Cdc45-MCM, permet la càrrega del complex GINS (Takayama, Kamimura et al. 2003) als complexos d'iniciació, amb la consegüent activació de l'helicasa (Aparicio, Weinstein et al. 1997; Aparicio, Stout et al. 1999; Labib, Tercero et al. 2000; Moyer, Lewis et al. 2006), el desenrotllament de la doble cadena de DNA i el reclutament de les DNA polimerases (Gambus, Jones et al. 2006; Kanemaki and Labib 2006).

Els orígens de replicació no s'activen tots a l'hora sinó que presenten un programa temporal d'activació, de manera que segueixen la mateixa seqüència d'activació a cada fase S (Ferguson and Fangman 1992; Friedman, Diller et al. 1996). D'aquesta forma es defineixen com orígens primerencs aquells que s'activen a l'inici de la fase S i tardans els activats al final de la fase S (Ferguson, Brewer et al. 1991; Brewer, Diller et al. 1993; Friedman, Diller et al. 1996).

3.4 Control de la mitosi

La mitosi està regulada per APC a dos nivells: transició metafase-anafase i la sortida de mitosi.

En primer lloc, APC associat al co-activador Cdc20 (APC^{Cdc20}), és responsable de l'eliminació, via proteasoma de Securina/Pds1 (Cohen-Fix, Peters et al. 1996; Visintin, Prinz et al. 1997). La Securina inhibeix la separació de les cromàtides germanes impedit l'acció de la Separasa/Esp1. L'activació de la Separasa talla una de les subunitats, Scc1/Cohesina, permetent la segregació dels cromosomes (Shirayama, Toth et al. 1999; Salah and Nasmyth 2000; Wang, Liu et al. 2001; Agarwal, Tang et al. 2003; Rahal and Amon 2008). Una segona forma d'APC, APC^{Cdh1} , intervé en la sortida de mitosi, eliminant completament les ciclines de tipus CLB. A diferència d' APC^{Cdc20} , APC^{Cdh1} és inactiva al principi de la mitosi (Harper, Burton et al. 2002), degut a la fosforilació de Cdh1 per CDK-CLB (Schwab, Lutum et al. 1997; Visintin, Prinz et al. 1997; Zachariae, Schwab et al. 1998; Kramer, Scheuringer et al. 2000). A més de tallar la cohesina, la Separasa/Esp1 forma part del complex FEAR (*cdc-Fourteen Early Anaphase Release*), responsable de la sortida de Cdc14 del nuclèol a l'inici de l'anafase. La Separasa talla Cdc55, la subunitat reguladora de la fosfatasa tipus PPP2 (PP2A). L'activitat PPP2 manté Net1 hipofosforilada. La forma hipofosforilada de Net1 reté la fosfatasa Cdc14 segregada al nuclèol (Shou, Seol et al. 1999; Visintin, Hwang et al. 1999). La inactivació de Cdc55 permet la fosforilació de Net1 per CDK-CLB i Cdc5, alliberant Cdc14 del nuclèol (Shou, Azzam et al. 2002; Visintin, Stegmeier et al. 2003; Queralt and Uhlmann 2008).

MEN (*Mitotic Exit Network*) (Jaspersen, Charles et al. 1998) promou la sortida de Cdc14 i el seu estat alliberat durant els estadis finals de l'anafase (Yoshida, Asakawa et al. 2002; D'Amours, Stegmeier et al. 2004). L'alliberament de la fosfatasa Cdc14 té com a resultat la desfosforilació, directa o indirecta de Cdh1, amb la subsegüent activació de APC^{Cdh1} (Schwab, Lutum et al. 1997; Jaspersen, Charles et al. 1998; Visintin, Craig et al. 1998). APC^{Cdh1} promou la degradació de les ciclines mitòtiques (Jaspersen, Charles et al. 1998; Visintin, Craig et al. 1998), inactivant l'activitat CDK de fase M, essencial per permetre la sortida de la mitosi (Wasch and Cross 2002).

4 Integritat genòmica i mecanismes de vigilància

Per tal de mantenir la viabilitat cel·lular és imprescindible preservar la integritat del genoma. Per això és essencial que la cèl·lula: (1) repliqui la totalitat del seu material genètic amb fidelitat, i sols una vegada per cada cicle cel·lular, (2) detecti i reperi les lesions en el DNA, per tal d'evitar que aquestes es fixin com a mutacions permanents, i (3) segregui els cromosomes de forma equitativa a cadascuna de les cèl·lules filles.

Les agressions que rep constantment el DNA, majoritàriament degudes a causes endògenes (com per exemple oxidació o hidròlisi espontània de bases nitrogenades) (De Bont and van Larebeke 2004), i també a causes exògenes (radiació ionitzant, llum ultraviolada o agents mutagènics) (Gale, Nissen et al. 1987) són les principals fonts d'instabilitat genòmica de no ser degudament reparades. A més, pèrdues transitòries d'homeòstasi (hipòxia, reducció de la disponibilitat de nutrients,...) poden afectar la síntesi de dNTPs donant lloc a l'aturada de la replicació per manca de precursors, fenomen conegut com a estrès replicatiu. Les forquilles de replicació aturades són altament recombinogèniques (Admire, Shanks et al. 2006) i, per tant, font d'instabilitat genòmica si no són degudament estabilitzades.

La instabilitat genòmica és una de les forces motores del càncer en humans (Cahill, Kinzler et al. 1999; Hanahan and Weinberg 2000; Luo, Solimini et al. 2009). Per tal de preservar l'estabilitat del genoma les cèl·lules s'han dotat evolutivament de mecanismes de vigilància que detecten i responen a la presència d'estrès genotòxic.

4.1 Mecanismes de vigilància (*checkpoints*). El mecanisme de vigilància de la fase S

Operant sobre el cicle cel·lular, les cèl·lules posseeixen mecanismes de vigilància (*checkpoints*) que actuen per assegurar que no es progressa a una fase següent fins que no s'ha completat correctament la fase anterior, actuant com a sistema *feed-forward* (Weinert and Hartwell 1988). Els checkpoints segueixen l'estructura de les cascades de transducció de senyals, formades per elements sensors, quinases transductores centrals i quinases efectores. Aquestes quinases transmeten i amplifiquen el senyal, actuant sobre diferents proteïnes diana, limitants en la progressió del cicle (Weinert and Hartwell 1988).

El mecanisme de vigilància de la fase S s'encarrega de detectar tant el dany al DNA com l'estrès replicatiu durant la replicació del DNA. Encara que el dany al DNA es pot produir en qualsevol fase del cicle cel·lular, la fase S és el període més vulnerable a l'estrès genotòxic, ja que els cromosomes es troben descromatinitzats i la doble cadena oberta de DNA és més accessible a l'acció d'agents genotòxic (Zhou and Bartek 2004). A més, durant el procés de síntesi del DNA una lesió reparable pot ser convertida en una mutació permanent.

En resposta a estrès genotòxic, el checkpoint de la fase S activa les vies necessàries per a superar el problema, actuant a diferents nivells: (1) aturant el cicle cel·lular, bloquejant l'entrada en mitosi i impeding la segregació de les cromàtides germanes fins que el problema hagi estat superat (Cohen-Fix, Peters et al. 1996), (2) protegint el procés de replicació (Santocanale and Diffley 1998; Tercero and Diffley 2001) i, (3) activant una resposta transcripcional caracteritzada per la inducció dels gens de la ribonucleòtid reductasa (Zhou and Elledge 1993).

En *S. cerevisiae* la quinasa transductora central del checkpoint de la fase S és Mec1, homòleg d'ATR i ATM en humans (Kato and Ogawa 1994; Weinert, Kiser et al. 1994; Sun, Fay et al. 1996) (Figura 6). Una segona quinasa homòloga a ATM, Tel1, és present en llevat de gemmació, però no sembla jugar un paper en el checkpoint de la fase S (Mantiero, Clerici et al. 2007).

Mec1 activa la quinasa efectora Rad53 (Chk2 en humans) (Sun, Fay et al. 1996; Lee, Schwartz et al. 2003), encarregada de difondre el senyal actuant sobre les diferents proteïnes diana. Fora de la fase S, Mec1 actua també a través de la quinasa efectora Chk1 (Sanchez, Bachant et al. 1999). A més, en absència de Rad53, Chk1 pot executar algunes de les funcions de Rad53, tal com la inactivació de la flap-endonucleasa Exo1 com a part de l'estabilització de forquilles de replicació aturades per estrès genotòxic (Segurado and Diffley 2008). No obstant, Chk1 juga un paper secundari, ja que mentre que els mutants de *rad53* mostren pèrdua de viabilitat en presència de dany al DNA, els mutants de *chk1* no (Sanchez, Bachant et al. 1999) (Figura 6).

En humans, mutacions en les vies controlades pel checkpoint de la fase S donen lloc a síndromes familiars de predisposició a càncer, com Li-Fraumeni (Bell, Varley et al. 1999). A més, s'ha mostrat que el checkpoint de la fase S constitueix un barrera anti-càncer en l'inici del procés de tumorigenesis (Bartkova, Horejsi et al. 2005; Bartkova, Rezaei et al. 2006). En *S. cerevisiae* els mutants *mec1* o *rad53* presenten una forta sensibilitat a tots els tipus de dany al DNA i estrès replicatiu (Allen, Zhou et al. 1994).

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	Humans
Quinases transductores	Mec1 Tel1	Rad3 Tel1	ATR ATM
Adaptadors	Rad9 Mrc1	Rhp1/Crb2 Mrc1	BRCA1; 53BP1 Claspin
Quinases efectores	Chk1 Rad53	Chk1 Cds1	Chk1 Chk2

Figura 6. Elements del mecanisme de vigilància de la fase S (Checkpoint de la fase S). En la taula es mostren les principals proteïnes implicades en el checkpoint de la fase S en *Saccharomyces cerevisiae* i els seus homòlegs en *Schizosaccharomyces pombe* i humans.

4.2 Activació del checkpoint de la fase S

El senyal activador del checkpoint de la fase S és el DNA de cadena senzilla (ssDNA) recobert per la proteïna de replicació A (RPA) (Zou and Elledge 2003). El ssDNA és altament recombinogènic, i no existeix nu a la cèl·lula ja que, s'hi uneix amb alta afinitat el complex RPA (Wold 1997). Si bé es produeix ssDNA durant una fase S normal, només quan la cèl·lula està sotmesa a estrès genotòxic se'n generen extensions suficients per activar el checkpoint (Shimada, Pasero et al. 2002; Vaze, Pellicioli et al. 2002; Byun, Pacek et al. 2005; Lopes, Foiani et al. 2006), resultat del desacoblament entre l'helicasa (MCM) i les polimerases de la maquinària de replicació (Byun, Pacek et al. 2005) (Figura 7). A més, s'ha observat que les lesions que no provoquen un desacoblament entre l'helicasa i l'activitat polimerasa no generen una resposta del checkpoint degut a que els nivells de ssDNA són baixos (Lambert and Carr 2005).

L'ssDNA-RPA recluta el complex sensor (Yang and Zou 2006) (vegeu a continuació) i el complex Mec1-Ddc2 (Zou and Elledge 2003).

Complexos sensors

Perquè es produeixi la resposta del checkpoint de la fase S és necessari que es localitzin a les forquilles de replicació afectades per estrès genotòxic els complexos Rfc2-5/Rad24 i Rad17/Mec3/Ddc1. Rfc2-5/Rad24 està format per 4 subunitats del complex Factor de Replicació C (RFC), amb Rad24 en lloc de la subunitat Rfc1 (Griffiths, Barbet et al. 1995). Mentre que RFC en una fase S normal actua com a carregador del complex grapa (*clamp*) PCNA, factor de processivitat del replisoma, en una fase S compromesa per estrès genotòxic, Rfc2-5/Rad24 carreguen el complex grapa Rad17/Mec3/Ddc1 (Kondo, Wakayama et al. 2001; Melo, Cohen et al. 2001), estructuralment relacionat a PCNA (Venclovas and Thelen 2000) (Figura 7).

Tot i que perquè Mec1 es localitzi a la zona de la lesió no són necessaris els complexos Rad17/Mec3/Ddc1 i Rfc2-5/Rad24, aquests són necessaris per a la seva activació, a més d'actuar com a plataforma per reclutar proteïnes adaptadores (vegeu més a baix) (Parrilla-Castellar, Arlander et al. 2004; Majka, Niedziela-Majka et al. 2006).

Un segon complex sensor, el format per Mre11/Rad50/Xrs2 actua en resposta als trencaments de doble cadena del DNA (Lisby, Barlow et al. 2004).

Quinases transductores centrals

Les quinases transductores centrals del checkpoint de la fase S formen part de la família de les quinases relacionades amb la fosfoinositol-3 quinasa (PIKK) (Keith and Schreiber 1995; Carr 1997; Mallory and Petes 2000). Les proteïna quinases transductores centrals del checkpoint de la fase S estan conservades evolutivament. L'ortòleg en llevat de gemmació és Mec1 (Kato and Ogawa 1994; Weinert, Kiser et al. 1994; Sun, Fay et al. 1996). Els mutants *mec1* presenten una elevada sensibilitat als diferents tipus d'estrès genotòxic (Allen, Zhou et al. 1994). El seu homòleg Tel1, en canvi, és prescindible (Morrow, Tagle et al. 1995), i el seu paper en la resposta a estrès genotòxic està poc clar (Mantiero, Clerici et al. 2007).

Mec1 es recluta a la zona de la lesió a través de Ddc2, que s'uneix a ssDNA-RPA (Zou, Cortez et al. 2002). En presència del complex sensor Rad17/Mec3/Ddc1, Mec1 s'activa i fosforila la quinasa efectora Rad53 (Pelliccioli, Lucca et al. 1999) (Figura 7).

Proteïnes adaptadores de les quinases efectores

L'activació de les proteïnes quinases efectores per part de les quinases transductores centrals es realitza a través de les proteïnes adaptadores. El llevat de gemmació presenta una proteïna adaptadora en resposta a dany en el DNA, Rad9, i una en resposta a estrès replicatiu, Mrc1. Les proteïnes adaptadores presenten la quinasa efectora Rad53 a Mec1, probablement determinant diferents patrons d'hiperfosforilació activadora de Rad53 d'acord a la resposta requerida (Smolka, Albuquerque et al. 2005; Sweeney, Yang et al. 2005).

L'adaptador en resposta a dany al DNA és Rad9 (Sweeney, Yang et al. 2005). Una vegada Mec1 ha estat activada, aquesta fosforila Rad9 (Koonin, Altschul et al. 1996; Schwartz, Duong et al. 2002), permetent la unió de la proteïna Rad9 amb Rad53. La unió de Rad9 amb Rad53 permet la fosforilació de Rad53 per Mec1. Rad53 fosforilat per Mec1, és capaç d'autohiperfosforilar-se en *trans* (Sun, Fay et al. 1996; Sun, Hsiao et al. 1998). La forma hiperfosforilada de Rad53 es correlaciona amb la forma activa durant la resposta del

checkpoint de la fase S (Pellicioli, Lucca et al. 1999). Rad53 hiperfosforilat trenca l'associació amb Rad9 i difon a la zona de la lesió, a fi de fosforilar les dianes del checkpoint que durant a terme la resposta (Gilbert, Green et al. 2001).

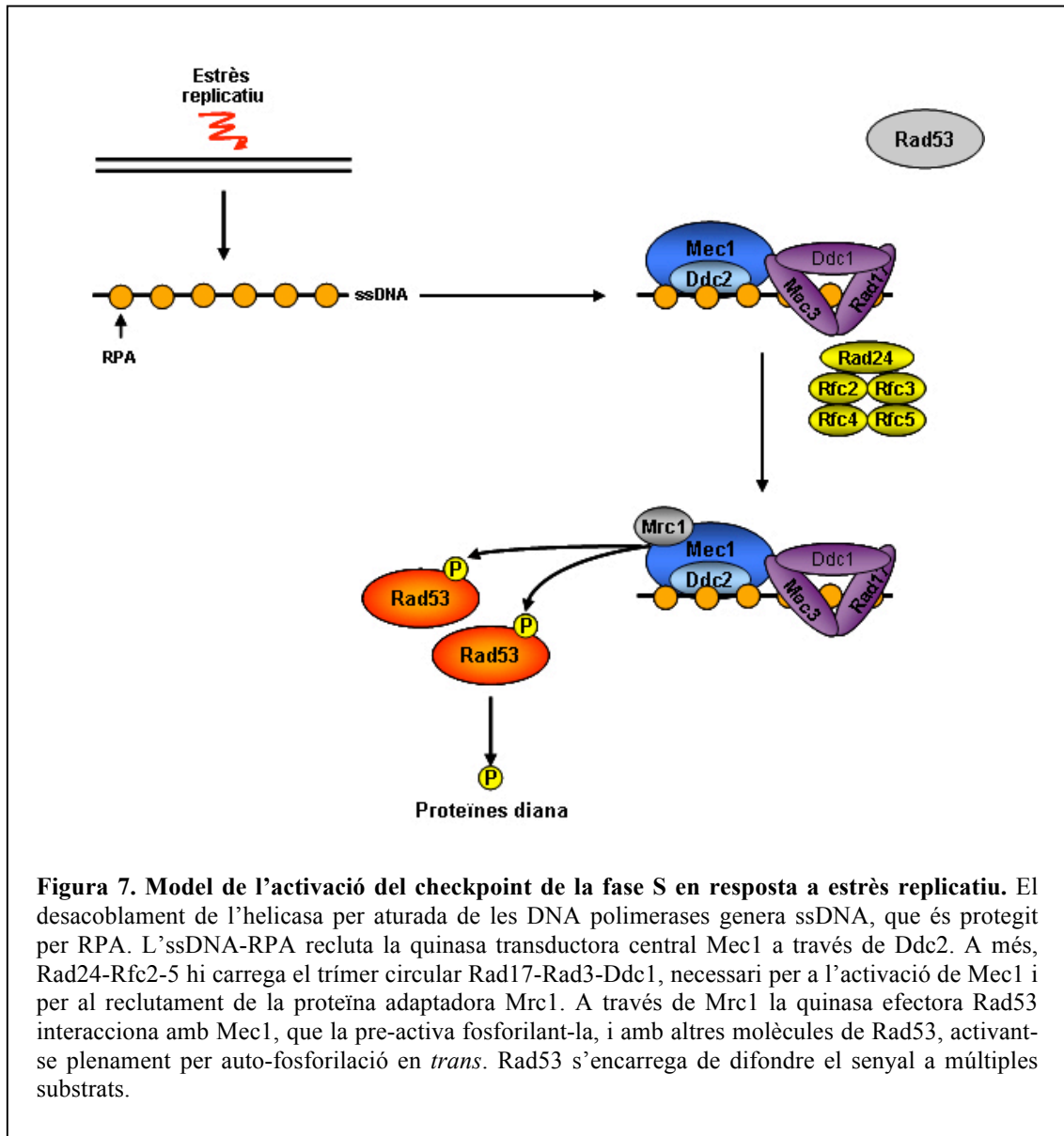
L'adaptador en resposta a estrès replicatiu és Mrc1 (Alcasabas, Osborn et al. 2001). En un cicle no pertorbat la proteïna Mrc1 viatja amb les forquilles de replicació (Katou, Kanoh et al. 2003). Mec1 fosforila Mrc1, que esdevé plataforma d'activació de Rad53 en forma específica a estrès replicatiu (Alcasabas, Osborn et al. 2001; Osborn and Elledge 2003) (Figura 7).

Quinases efectores

Les quinases efectores del checkpoint de la fase S formen part de la família de serina-treonina quinases CHK, conservades evolutivament (Melo and Toczyski 2002).

En *S. cerevisiae*, la proteïna quinasa efectora del checkpoint de la fase S és Rad53. En resposta a estrès genotòxic Rad53 és reclutat al lloc de la lesió, on a través de la interacció amb el corresponent adaptador, Rad9 o Mrc1, és pre-activada per fosforilació per Mec1 (Pellicioli, Lucca et al. 1999; Sanchez, Bachant et al. 1999).

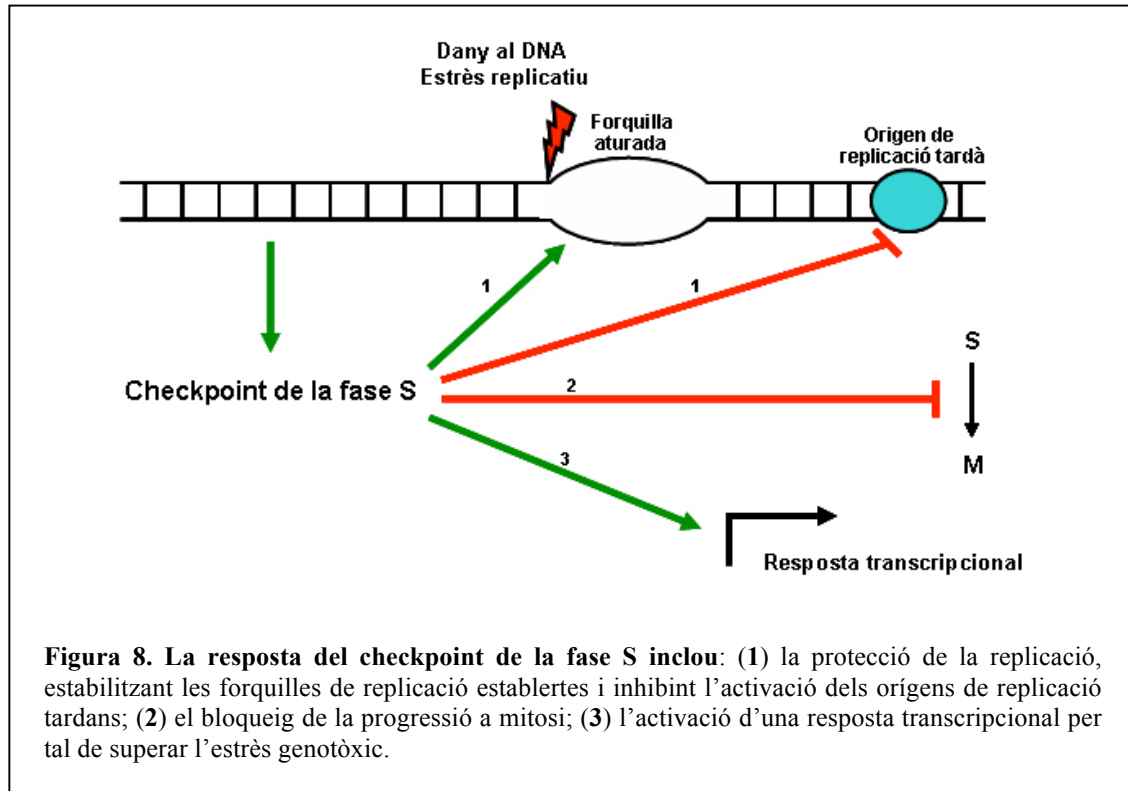
La fosforilació de Rad53 per Mec1 promou l'homodimerització de Rad53 (Lee, Schwartz et al. 2003), permetent la seva autohiperfosforilació en *trans*, que correlaciona amb la forma plenament activa de la quinasa efectora (Pellicioli, Lucca et al. 1999). Rad53 activat difon per fosforilar les proteïnes substrat a través de les quals el checkpoint exerceix la seva resposta (Gilbert, Green et al. 2001).



4.2.1 Resposta del checkpoint de la fase S

L'activació del mecanisme de vigilància de fase S en resposta a estrès genotòxic dona lloc a: (1) Una aturada del cicle bloquejant l'entrada en mitosi i impedit la segregació de les cromàtides germanes fins que el problema hagi estat superat (Cohen-Fix, Peters et al. 1996); (2) l'estabilització de les forquilles de replicació que s'han establert i que s'han aturat a causa del dany al DNA o estrès replicatiu (Tercero and Diffley 2001), i la inhibició dels orígens de replicació que encara no han estat activats, minimitzant l'exposició del DNA a l'agent genotòxic (Santocanale and Diffley 1998); (3) l'activació d'una resposta

transcripcional *ad hoc* mediada entre d'altres per Dun1 i que característicament indueix el gens de la ribonucleòtid reductasa (Zhou and Elledge 1993).(Figura 8).



Bloqueig de la mitosi

El mecanisme de vigilància de la fase S impedeix que les cèl·lules entrin en mitosi fins que la lesió o l'estrès replicatiu hagin estat corregits, per evitar que les cèl·lules es divideixin amb un DNA lesionat o incompletament replicat (Hartwell and Kastan 1994).

En resposta estrès genotòxic, el checkpoint de la fase S impedeix que les cèl·lules progressin a anafase estabilitzant la Securina/Pds1 (Sanchez, Bachant et al. 1999; Clarke, Segal et al. 2001; Wang, Liu et al. 2001), un inhibidor de l'activitat Separasa/Esp1 requerida per la separació de les cromàtides germanes (vegeu punt 3.4).

Per altra banda, el checkpoint de la fase S evita l'entrada en anafase bloquejant l'activitat ubiquitin-lligasa APC associada a Cdc20, el complex MEN i, l'aparició de proteïnes associades a microtúbuls Cin8 i Stu2 (vegeu punt 3.4) (Clarke, Segal et al. 2001; Krishnan, Nirantar et al. 2004; Searle, Schollaert et al. 2004).

Protecció de la replicació

El mecanisme de vigilància de fase S inhibeix la replicació en resposta a estrès genotòxic (Paulovich and Hartwell 1995), presumiblement per minimitzar el risc de l'aparició d'instabilitat genòmica. Encara que el dany al DNA es pot produir en qualsevol fase del cicle cel·lular, la fase S és el període més vulnerable a l'estrès genotòxic, ja que els cromosomes es troben descromatinitzats i la doble cadena oberta de DNA és més accessible a l'acció d'agents genotòxics (Zhou and Bartek 2004). A més, durant el procés de síntesi del DNA una lesió reparable pot ser convertida en una mutació permanent. Finalment, les forquilles de replicació aturades són altament recombinogèniques (Admirer, Shanks et al. 2006) i, per tant, font d'instabilitat genòmica si no són degudament estabilitzades.

La inhibició de la replicació pel checkpoint de la fase S es dona per bloqueig dels orígens de replicació (Santocanale and Diffley 1998; Shirahige, Hori et al. 1998), i no per alentiment de les forquilles de replicació (Tercero and Diffley 2001). Si bé és sabut que Rad53 fosforila Dbf4, la subunitat activadora de la quinasa de fase S DDK, essencial per a l'activació dels orígens de replicació (Weinreich and Stillman 1999), soques mutants que bypassen el requeriment de DDK mantenen la capacitat de bloquejar els orígens de replicació en resposta a estrès genotòxic (resultats del nostre grup, no publicats), compatible amb l'existència d'un nivell paral·lel de control (comunicació personal, Philip Zegerman i John Diffley).

El checkpoint de la fase S actua també protegint la replicació a un segon nivell, estabilitzant les forquilles de replicació que es troben aturades a causa d'una lesió o per estrès replicatiu, impedit el seu col·lapse irreversible (Lopes, Cotta-Ramusino et al. 2001; Tercero and Diffley 2001; Sogo, Lopes et al. 2002). Amb les forquilles de replicació viatja el replisoma. Aquest, està format per la helicasa MCM associada a Cdc45 i GINS, i les DNA polimerases α , DNA primases δ i ϵ , juntament amb els factors necessaris per l'estabilització de la forquilla de replicació, Tof1 i Mrc1 (Aparicio, Weinstein et al. 1997; Katou, Kanoh et al. 2003; Calzada, Hodgson et al. 2005; Szyjka, Viggiani et al. 2005; Tourriere, Versini et al. 2005; Gambus, Jones et al. 2006; Hodgson, Calzada et al. 2007). A més, Mrc1 és l'adaptador del checkpoint de la fase S en resposta a estrès replicatiu (Alcasabas, Osborn et al. 2001) (vegeu més a munt). Per una banda, el mecanisme de vigilància de la fase S estabilitza els elements constituents del replisoma. Si bé no es

coneix la totalitat de dianes del mecanisme de vigilància de la fase S en l'estabilització de les forquilles aturades per estrès genotòxic, se sap que Mec1 és necessari per estabilitzar la unió de les DNA polimerases (Cobb, Bjergbaek et al. 2003; Cobb, Schleker et al. 2005). Mec1 fosforila a més la proteïna que estabilitza el ssDNA, RPA, la histona H2A i l'helicasa de tipus RecQ1, Sgs1 (Cobb, Schleker et al. 2005). A més, Rad53 actua sobre l'helicasa replicativa MCM i sobre la flap-endonucleasa Exo1 (Cobb, Schleker et al. 2005; Segurado and Diffley 2008). Per altra banda, el checkpoint de la fase S suprimeix la recombinació a les forquilles aturades per estrès genotòxic, evitant la generació de molècules de DNA hemireplicades i amb acumulació de gaps, així com la reversió de les forquilles (Sogo, Lopes et al. 2002).

Resposta transcripcional

Històricament, la resposta transcripcional mediada pel mecanisme de vigilància de la fase S s'ha limitat a la inducció dels gens que codifiquen les diferents subunitats del enzim ribonucleòtid reductasa (RNR1-4) (Zhou and Elledge 1993). Aquesta resposta és mediada per l'activació per Rad53 de la quinasa paràloga Dun1 (Zhou and Elledge 1993). En un cicle de divisió no pertorbat, la transcripció dels gens RNR es dona al final de la fase G1 i depèn del factor de transcripció MBF. En un cicle cel·lular pertorbat l'activació de Dun1 per part de Rad53 regula els nivells de dNTPs de la cèl·lula a través de les RNR. La regulació de les RNRs a través de Dun1 es dona a dos nivells: (1) Augmenta la transcripció de les RNR mitjançant la fosforilació de Crt1. En un cicle no pertorbat Crt1 està unit al promotor de RNR bloquejant-ne la transcripció. En activar-se Dun1 a través del checkpoint de la fase S, aquesta quinasa fosforila a Crt1 impedit la seva unió i per tant, permet la transcripció dels gens RNR (Huang, Zhou et al. 1998). (2) Dun1 incrementa l'activitat de les RNRs fosforilant Sml1. Sml1 inhibeix les RNRs per unió directa a la subunitat més gran, RNR1. Dun1 fosforila a Sml1 i la marca per la seva destrucció pel sistema ubiquitin-lligasa-proteasoma (Zhao and Rothstein 2002).

Més recentment, s'ha comprovat que la resposta transcripcional és més àmplia i inclou, entre altres: la repressió dels diferents gens de les histones; la inducció de gens que codifiquen proteïnes implicades en la reparació per recombinació homòloga, tals com Rad51 i Rad54; així com els gens de resposta a estrès ambiental (ESR) (Gasch, Huang et al. 2001).

A mitjans de 2008, quan el treball experimental d'aquesta tesi ja ens indicava la inesperada re-activació del factor de transcripció de fase G1 MBF en resposta a estrès genotòxic en fase S, el grup de Curt Wittenberg a l'*Scripps Research Institute*, van reportar la re-activació d'MBF dependent del checkpoint de la fase S a *S. pombe* (de Bruin, Kalashnikova et al. 2008). A finals del 2008, els mateixos resultats en el llevat de fissió, han estat confirmats pel laboratori Nicholas Rhind (Dutta, Patel et al. 2008).

OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest treball és identificar nous elements implicats en el control del cicle cel·lular regulats pel mecanisme de vigilància de la fase S en resposta a estrès genotòxic.

Els objectius concrets han estat:

1. Estudiar la ciclina de fase S Clb6 com a diana del mecanisme de vigilància de la fase S.
2. Estudiar el possible paper de Clb6 en el control del cicle cel·lular en resposta a estrès genotòxic.

MATERIALS I MÈTODES

1 Llevat de gemmació, *Saccharomyces cerevisiae*

Aquest treball s'ha realitzat en el llevat de gemmació, *Saccharomyces cerevisiae*. Aquest organisme eucariota és una eina ideal per dur a terme els experiments realitzats, per diferents raons: (1) el seu temps de doblatge és relativament curt (120 minuts en medi ric a 24°C), la qual cosa permet realitzar experiments de cicle cel·lular acurats en un temps raonable; (2) de forma visual i fàcil es pot determinar la fase del cicle cel·lular i la sincronia de la població, d'acord a la presència i grandària de la gemma (vegeu Figura 1, Introducció); (3) existeixen mètodes per sincronitzar de forma eficient i reversible una població cel·lular en les diferents fases del cicle; (4) es tracta d'un dels organismes model per a l'estudi de la biologia molecular cel·lular eucariota; els descobriments fets en aquest organisme en l'àmbit del control del cicle cel·lular i la resposta a estrès genotòxic poden extrapolar-se a eucariotes superiors, com els humans, ja que els elements i les vies implicades estan altament conservats evolutivament.

Per altra banda, *S. cerevisiae* és un organisme que es pot modificar genèticament amb relativa facilitat, degut a que prioritza reparar els trencaments de doble cadena de DNA mitjançant recombinació homòloga. Així, si s'introdueix en una cèl·lula de llevat un DNA linial amb extrems no protegits i amb homologia a una seqüència del genoma, s'integrarà amb una freqüència elevada, substituint el material genòmic corresponent. Usant aquest sistema es poden delecionar gens, o integrar-ne en la zona del genoma que ens interressi, mitjançant una simple transformació. A tot això, se li afegeix l'avantatge de poder treballar amb soques haploides modificades, de forma que només ens cal delecionar una còpia del gen per eliminar la seva funció.

2 Tècniques genètiques

2.1 Fons genètic

S'ha treballat amb soques del llevat de gemmació *Saccharomyces cerevisiae* del fons genètic W303 (Thomas and Rothstein 1989). W303 ha estat modificada respecte les soques presents a la naturalesa per mantenir-se de forma haploide, delectant la endonucleasa HO, que promou el canvi tipus heterotà·lic. A més, W303 és mutant per un gen de cadascuna de les vies de síntesi de 5 nutrients essencials: TRP1 (síntesi de l'aminoàcid, marcador auxòtrofic *trp1-1*), HIS3 (histidina, *his3-11,15*), LEU2 (leucina, *leu2-3,112*), URA3 (síntesi de la base nitrogenada uracil, *ura3-1*) i ADE2 (adenina, *ade2-1*) (vegeu Taula 2). Aquests marcadors auxotròfics permeten la selecció de transformants, ja que la introducció del gen salvatge restaura la capacitat per viure en un medi selectiu en absència de l'aminoàcid o la base nitrogenada corresponent.

S'ha treballat amb soques haploides, W303-1a, que permeten la seva sincronització en fase G1 amb la feromona α -factor (vegeu punts 3.3-3.8 i Taula 2). L' α -factor és una feromona natural peptídica alliberada per les soques de tipus heterotà·lic Mat α . Aquesta feromona atura (reversiblement) les cè·l·lules haploides del tipus Mat a en fase G1, en expectativa d'acoblar-se. Aquest pèptid, de seqüència Trp-His-Trp-Leu-Gln-Leu-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Met-Tyr es pot sintetitzar per usar per sincronitzar cultius Mat a en fase G1, en absència de cè·l·lules Mat α . Donat que l'aturada és reversible, és possible alliberar sincrònicament la població a Start i fase S.

Les soques usades en el present treball han estat *bar1* Δ . El gen BAR1 codifica per una proteasa que elimina l' α -factor. Per tant, en delectar-lo la cè·l·lula esdevé sensible a baixes concentracions del pèptid, essent suficient per sincronitzar la cè·l·lula una concentracions 100 vegades menor que en les cè·l·lules BAR1 (en lloc de 5 mg/ml s'usen 50 μ g/ml). Alhora, facilita l'obtenció de cultius sincrònics en fase G1 de poblacions de mutants difícils de sincronitzar, com és el cas de les soques *rad53*.

2.2 Medis de cultiu

El medi ric líquid utilitzat és el YPD (1% (p/v) extracte de llevat, 2% (p/v) peptona, 2% (p/v) glucosa); segons les necessitats de l'experiment s'ha substituït la font de carboni per sucrosa, rafinosa o galactosa.

El medi mínim (SD: *Synthetic minimal medium Dextrose*) conté 0,67% (p/v) base nitrogenada de llevat (YNB), 2% (p/v) glucosa i, segons la selecció que es desitgi, els següents components: 40 µg/ml adenina, uracil, leucina, triptòfan, histidina.

El medi d'esperulació, RSM (*Rich Sporulation Medium*), consta de 0,5% (p/v) extracte de llevat, 3% (p/v) acetat de potassi, 0,001% glucosa (p/v), complementat amb 0,16 mg/ml d'adenina i uracil, 0,08 mg/ml d'histidina, leucina, lisina, triptòfan, metionina i arginina, 32 µg/ml tirosina i 0,4 mg/ml fenilalanina.

Els estocs concentrats dels sucres, YNB, aminoàcid i bases nitrogenades s'han esterilitzat per microfiltració (porus de 0,20 µm) i s'han afegit a la resta del medi autoclavat, un cop atemperat a 55°C.

El medi de contra-selecció d'URA3 consta d'1 mg/ml 5-fluorooròtic (5-FOA) en medi SC (Synthetic Complete): 2 mg/ml Drop-out mix without Ura (Sigma), 0,67% (p/v) base nitrogenada de llevat (YNB), 2% (p/v) glucosa, 50 µg/ml uracil.

El medi LB (*Luria Broth*) consta de 1 % (p/v) bacto-triptona, 0,5 % (p/v) extracte de llevat i 0,5 % (p/v) NaCl.

El medi per preparar cèl·lules *E. coli* DH5α competents el Psi-broth, consta de 2% (p/v) triptona; 0,5% (p/v) extracte de llevat; 0,5% (p/v), MgSO₄·7H₂O, pH 7,6.

Els medis sòlids tenen la mateixa composició que la descrita per als medis líquids, més 2% (p/v) agar.

2.3 Generació d'estrès genotòxic

Per activar el mecanisme de vigilància de la fase S s'han utilitzat els reactius estàndard en el camp: hidroxidurea (HU) i metilmetanosulfonat (MMS).

L'HU genera estrès replicatiu per inhibició (reversible) de la síntesi de dNTPs, actuant sobre el centre catalític de les ribonucleòtid reductases (RNRs). Quan la cèl·lula comença la replicació en presència d'HU al medi, ràpidament esgota els nivells de dNTPs, generant-se estrès replicatiu que comporta l'aturada de les forquilles de replicació i l'activació del checkpoint.

L'HU s'ha usat a 0,2 M, tant en medi líquid com en medi sòlid.

L'MMS és un agent metilant, que genera lesions en el DNA per metilació de les cisteïnes provocant un desaparellament entre bases a nivell local. Aquests adductes impedeixen la progressió de la replicació, condició que activa el mecanisme de vigilància de la fase S.

L'MMS s'ha usat a 0,033% (v/v) en medi líquid, i a 0,022% (v/v) en medi sòlid.

2.4 Plasmidis usats en aquest treball

pFa6a

Els plasmidis de la família pFA6-KanMX6 (Bahler, Wu et al. 1998) s'han utilitzat per generar soques que expressin proteïnes fusionades a una etiqueta C-terminal.

Els pFA6a serveixen de motlle de PCR per a l'amplificació d'un cassette integrable al genoma del llevat, amb la seqüència de l'etiqueta d'interès i 6 còpies del gen KanMX de resistència a l'antibiòtic geneticina (G418). Les etiquetes utilitzades en el nostre cas han estat 13myc (pFA6a-KanMX6-13myc) i 3HA (pFA6a-KanMX6-3HA).

pGEX

Per produir proteïnes recombinants en *E. coli* s'han usat els plasmidis de la família pGEX-6P (Amersham). Aquests vectors permeten expressar la proteïna d'interès fusionada a la Glutatió-S-Transferasa (GST) a l'extrem N-terminal i són induïdes per IPTG, ja que el gen està sota el control del promotor Tac. El gen de resistència a ampil·lina permet seleccionar els transformants.

Els pGEX-6P inclouen una seqüència PreScission entre la seqüència del GST i la regió de clonatge. Això permet tallar el domini GST després de purificar la proteïna (vegeu punts 5.6 i 5.7).

pRS

S'han utilitzat els plasmidis de la família pRS (Sikorski and Hieter 1989) com a motlle de PCR per amplificar els gens salvatges corresponents als marcadors auxotròfics de W303, en el procés de generació de soques de *S. cerevisiae* mutants de deleció (vegeu punt 2.5.2).

2.5 Generació de soques de *Saccharomyces cerevisiae*

2.5.1 Transformació del llevat

El mètode usat per transformar el llevat es basa en l'afebliment de la paret cel·lular i la transformació per xoc tèrmic. Per dur a terme la transformació, es parteix de 10 ml de cultiu de la soca progenitora, en creixement exponencial (10^7 cèl·lules/ml). Les cèl·lules es renten dues vegades amb aigua estèril, i a continuació es resuspenen en 0,1 M acetat de liti (pH 7,5), 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, a una concentració de $2 \cdot 10^9$ cèl·lules/ml.

A 50 µl d'aquesta suspensió de cèl·lules, s'afegeix 1-2 µg del DNA que es vol transformar, 5 µl ssDNA (10 mg/ml) (DNA de cadena simple d'esperma de salmó, que fa la funció de transportador augmentant la probabilitat que el DNA entri a la cèl·lula).

A aquesta barreja s'afegeixen 300 µl de 50% (v/v) polietilenglicol 3350, 0,1 M acetat de liti (pH 7,5), 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA. El paper del polietilenglicol d'alt pes molecular és ocupar l'espai, facilitant l'encontre del DNA i les cèl·lules.

La barreja s'incuba durant 30 minuts a 30°C. Posteriorment, s'afegeix DMSO a una concentració final del 10 % (v/v) i es sotmeten les cèl·lules a un xoc tèrmic de 15 minuts a 42°C, seguit de 60 segons en glaç.

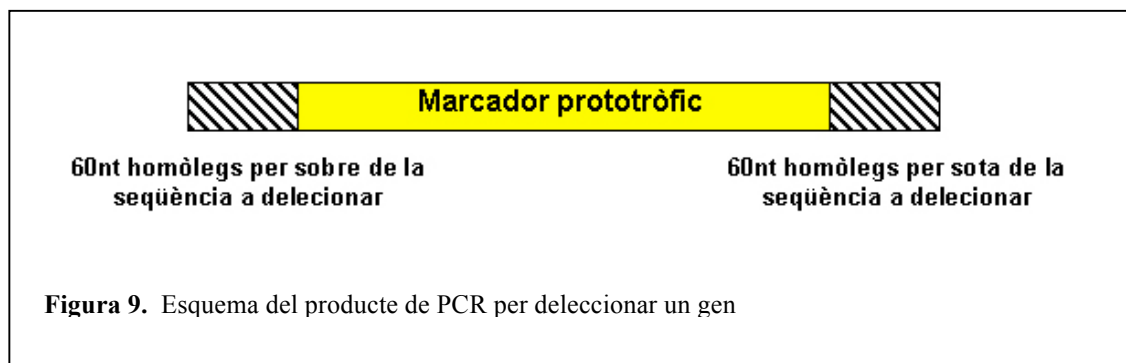
Finalment les cèl·lules es van resuspenen en 200 µl de TE pH 7,5 (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA) i es sembren en plaques de medi selectiu adequat (Schiestl and Gietz 1989; Gietz, St Jean et al. 1992; Bartel, Chien et al. 1993).

Les colònies transformants es sotmeten a una segona selecció per assegurar la puresa dels clons.

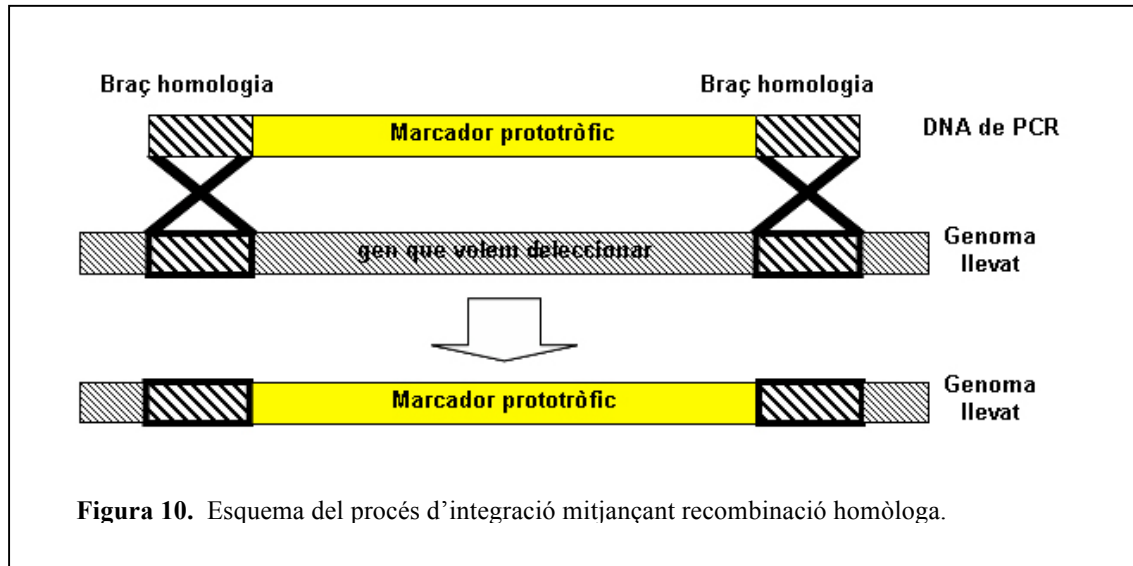
Per últim es comprova la modificació, mitjançant PCR genòmica (vegeu punt 4.1 i 4.10) o mitjançant immunoblot sobre extractes cel·lulars totals (vegeu punts 5.1, 5.2 i 5.3).

2.5.2 Soques de deleció

El DNA per deleccionar un gen s'obté de l'amplificació per PCR del gen salvatge (prototròfic) corresponent a un dels marcadors auxotròfics disponibles (vegeu punt 2.1), emprant els vectors pRS com a motlle (vegeu punt 2.4). En l'amplificació s'usen oligonucleòtids encebadors dissenyats de forma que en 5' presenten cues de 60 nucleòtids amb les seqüències que flanquegen el gen a deleccionar (Figura 9).



A les cèl·lules de llevat transformades amb el producte de PCR la deleció del gen té lloc gràcies a recombinació homòloga, activada per *reparar* el fragment de DNA de doble cadena d'extrem no protegits amb una regió homòloga del genoma, com s'esquematitza a la Figura 10.



Les cèl·lules transformants es sembren en plaques del medi selectiu adequat. Les colònies transformants es sotmeten a una segona selecció per assegurar la puresa dels clons.

Per confirmar que el marcador auxotrófic s'ha integrat en el locus del gen d'interès i no en un lloc inespecífic del genoma, es fa una PCR (vegeu 4.1) usant com a motlle el DNA genòmic dels transformants (vegeu 4.10), usant oligonucleòtids encebadors externs a la regió substituïda. La diferència de longitud entre el gen d'interès i el marcador permet distingir en quins clons el DNA transformat s'ha integrat de forma específica, delectonant el gen d'interès.

Soques *bar1Δ*

El cas de la deleció *bar1Δ* és especial, donat que el gen està flanquejat per seqüències altament repetides a altres regions del genoma. Per aquest motiu, l'estratègia general descrita adalt, amb cues d'homologia de 60 nucleòtids, no presenta una freqüència d'integració específica al locus *BAR1* suficient. Per aquest motiu es va utilitzar una estratègia específica.

Es va usar el vector pJGsst1 (Reneke, Blumer et al. 1988) que conté la regió genòmica de BAR1, amb el gen deletat per integració d'URA3. La digestió del vector amb els enzims de restricció EcoR I i Sal I permet recuperar un fragment *bar1Δ::URA3* de 5,1 kb, amb homologia flanquejant al gen BAR1 per assegurar una freqüència acceptable d'integracions al locus del gen, deletant-lo.

Les cèl·lules transformants es seleccionen en plaques de medi mínim sense uracil (SD Ura⁻). Les colònies transformants es sotmeten a una segona selecció per assegurar la puresa dels clons.

2.5.3 Soques que expressen una proteïna etiquetada

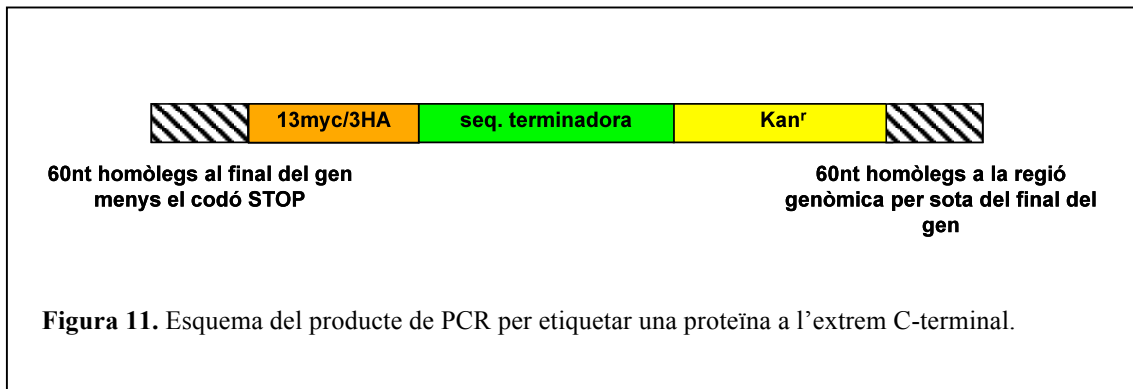
El llevat de gemmació permet integrar una etiqueta al marc de lectura del gen que es desitgi, de manera que la proteïna corresponent s'expressi, des del seu locus, sota el seu promotor, com a fusió a una etiqueta d'interès.

El DNA per transformar i etiquetar la proteïna d'interès prové de l'amplificació per PCR de l'etiqueta (vegeu punt 4.1) dels plàsmids de la família pFA6-KanMX6. Les etiquetes utilitzades en el nostre cas han estat 13myc (pFA6a-KanMX6-13myc) i 3HA (pFA6a-KanMX6-3HA).

Per fusionar l'etiqueta a l'extrem C terminal de la proteïna, es dissenyen dos d'oligonucleòtids encebadors específic:

- Forward: en 5' presenta 60 nucleòtids corresponents a la seqüència final del gen, sense incloure el codó STOP.
- Reverse: en 5' presenta 60 nucleòtids corresponents a la seqüència d'una regió del genoma per sota del gen.

D'aquesta manera es genera un fragment que conté l'etiqueta i 6 còpies del gen de resistència a l'antibiòtic genèticina/G418 KanMX, flanquejat per seqüències homòlogues a la regió cromosòmica on es vol integrar (vegeu Figura 11).



Es transformen les cèl·lules de llevat amb el producte resultant de la PCR per a la seva integració. La selecció dels transformants es du a terme per resistència a G418. Donat que les cèl·lules necessiten un temps per expressar la resistència, en primer instància els transformants es plaquegen en medi ric sense selecció (YPD). Transcorregudes 24 h es seleccionen els clons resistents fent rèpliques en plaques de medi ric amb 200 µg/ml G418.

La comprovació dels clons es porta a terme per immunoblot sobre extractes cel·lulars totals (vegeu punts 5.1, 5.2 i 5.3) amb anticossos monoclonals contra l'etiqueta (9E10 anti-myc o 12CA5 anti-HA), confirmant-se una banda específica i de la mida correcta. S'utilitza la soca progenitora corresponent com a control negatiu.

2.5.4 Soques generades per creuament, esporulació i germinació

La generació de soques per creuament, s'usa per obtenir soques de genotip complex resultat de la combinació de dues soques amb diferents al·lels. Per fer-ho és necessari que cadascuna de les soques haploides implicades en el creuament tingui un tipus heterotàl·lic diferent. D'aquesta forma, es genera una cèl·lula diploide que conté la informació genètica d'ambdues soques alhora. A continuació, s'esporula el diploide i es germinen les espores, donant lloc a la soques haploides amb els diversos genotips possibles resultat de la distribució meiótica, un dels quals el que ens interessa.

2.5.4.1 Canvi de tipus heterotàl·lic

Per obtenir el diploide generalment primer és necessari canviar el tipus heterotàl·lic en una de les dues soques a creuar, ja que en el laboratori sempre treballem amb soques haploides del tipus Mat a.

Per realitzar el canvi de tipus heterotàl·lic, es transforma (vegeu punt 2.5.1) la soca d'interès amb el plasmidi centromèric pGAL1,10-HO (URA3). Aquest permet induir amb galactosa la sobreexpressió de la endonucleasa HO, implicada en el canvi de tipus heterotàl·lic (i que en les soques emprades al laboratori està delecionada per assegurar l'estabilitat del tipus haploide Mat a). Els transformants es seleccionen en plaques de medi mínim sense uracil.

La soca transformada amb pGAL1,10-HO es va fer créixer O/N en medi mínim amb sucrosa com a font de carboni i sense uracil (SSucr Ura⁻). Al matí següent el cultiu es dilueix (vegeu 3.1) en SSucr Ura⁻ a una concentració de $5 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml. El cultiu es va deixar créixer a 30°C durant un temps de generació. A continuació s'addiciona galactosa al medi a una concentració final 2% (p/v), i s'incuben les cèl·lules durant 2 hores i 20 minuts, per permetre l'expressió de l'endonucleasa HO induïda per la galactosa, donant lloc al canvi de tipus heterotàl·lic (Connolly, White et al. 1988) Seguidament es reprimeix l'expressió de l'endonucleasa (per evitar l'aparició de cèl·lules poliploides) sembrant en plaques de YPD.

Les plaques s'incuben a 30°C fins obtenir clons independents. Es comprova el tipus heterotàl·lic (Mat a o Mat α) de diferents clons creuant-los amb dues soques *tester*: DC14 (Mat a *his1*) i DC17 (Mat α *his1*) en plaques de medi mínim sense histidina. Donat que el fons W303 és HIS1 *his3*, només els diploides resultants dels creuaments podran sobreviure en un medi sense histidina: si la soca interrogada és Mat a, generarà diploides només amb DC17, però no amb DC14, mentre que si la soca interrogada és Mat α , generarà diploides només amb DC14, però no amb DC17.

Finalment la soca d'interès es cura del pGAL1,10-HO per contra-selecció en plaques 5-FOA (vegeu 2.1). L'àcid 5-fluorooròtic és un substrat sintètic per a l'enzim URA3, que el

processa a 5-fluouracil, tòxic. En conseqüència, totes les cèl·lules que porten un gen URA3 funcional moren, mentre que aquelles que l'han perdut o inactivat espontàniament sobreviuen i generen colònies.

2.5.4.2 Creuament i generació del diploide

Per obtenir la cèl·lula diploide les soques amb els genotips d'interès, una Mat a i l'altra Mat α es creuen en una placa de medi ric (YPD).

Després de 24 hores a 30°C la placa presenta un sector de creixement continu, que conté cèl·lules de les dues soques progenitores i cèl·lules diploides (Mat a/Mat α que contenen el genotip suma de les dues soques que hem creuat). Sempre que és possible, les colònies diploides es seleccionen respecte una o les dues progenitores haploides, fent una estria en una placa de medi mínim selectiu. Les plaques s'incuben fins a obtenir colònies independents.

2.5.4.3 Esporulació

El següent pas es esporular la cèl·lula diploide per produir cèl·lules haploides amb el genotip resultat de la recombinació meiòtica. Un d'aquests genotips contindrà la combinació al·lèlica del nostre interès.

Per això, es fan estries de la soca diploide en placa d'esporulació (RSM, vegeu punt 2.1) i s'incuba a 24°C durant 2 dies i mig.

Transcorregut aquest temps es confirma la correcta esporulació per observació d'ascs al microscopi òptic.

2.5.4.4 Germinació

Per obtenir la soca haploide que ens interessa és necessari alliberar les espores dels asc. Per això, es digereixen els asc i seguidament s'alliberen i s'individualitzen les espores per acció mecànica.

Cèl·lules provinents de la placa de RSM es resuspenen en 200 µl d'aigua estèril que conté 2.000 unitats de β-glucoronidasa (SIGMA). La mescla s'incuba (*Termomix*, Eppendorf) a 30°C amb agitació suau (300 rpm) durant 2 hores. Transcorregut aquest temps s'addicionen 100 µl de sorra de vidre estèril i s'agita la mescla (*Termomix*, Eppendorf) a 30°C amb una agitació de 900 rpm durant 1 hora. Seguidament s'incrementa el volum afegint 1 ml d'aigua estèril i es vortexa a màxima velocitat durant 2 minuts. Finalment es sonica a 50W (sonicador *Sonic Dismembrator* (Dynatech), mantenint les espores en gel en tot moment, per preservar la seva viabilitat. Es sonica en cicles de 30 segons, fins observar al microscopi que el número d'espores individualitzades és superior al 90%.

Les espores es sembren en plaques de medi mínim selectiu per al genotip d'interès. Diferents clons individuals es sotmeten a una segona selecció per assegurar la seva puresa.

Finalment, per identificar l'haploide del tipus heterotà·lic Mat a, i per descartar possibles diploides supervivents (que també creixerien en el medi selectiu), els clons s'interroguen contra les soques tester DC14 i DC17, en plaques de medi mínim sense histidina (vegeu punt 2.5.4.1).

2.5.5 Generació de soques termodegró

Per tal de generar mutants condicionals es va recórrer a generar mutants termodegró (td) (Kanemaki, Sanchez-Diaz et al. 2003). Aquest sistema permet mantenir una proteïna d'interès present a la cèl·lula fins al moment que ens interessa eliminar-la.

El mètode consisteix en fusionar una seqüència termodegró N-terminal a la proteïna que ens interessa. El termodegró està constituït per un motiu de reconeixement per la

ubiquitin-lligasa Ubr1, que es troba protegit a temperatura permissiva (24°C) per un pèptid termosensible annex. A temperatura restrictiva (37°C), el pèptid ts pateix un canvi conformacional desprotegint el degró, la qual cosa dona lloc a la destrucció ràpida i completa de la proteïna fusionada pel sistema ubiquitin-lligasa-proteasoma.

Donat que el degró no es troba en un context conformacional afí per la Ubr1, normalment cal forçar la interacció sobreexpressant la ubiquitin-lligasa, sense que això tingui cap efecte negatiu sobre el creixement cel·lular (Kanemaki, Sanchez-Diaz et al. 2003).

Per generar una proteïna de fusió amb el termodegró, aquest s'amplifica per PCR (vegeu punt 4.1) fent servir el plasmidi pKL187 com a motlle i oligonucleòtids encebadors específics. Donat que la fusió és N-terminal i que cal incloure en el cassette un gen per seleccionar els transformants integrants (resistència a G418), l'expressió del termodegró està sota el promotor CUP1 (induïble per 0,1 mM CuSO₄).

La PCR es porta a terme amb oligonucleòtids encebadors que permeten integrar, per recombinació homòloga, el cassette a 5', en el marc de lectura del gen d'interès. La selecció dels transformants es du a terme per resistència a G418. Donat que les cèl·lules necessiten un temps per expressar la resistència, en primer instància els transformants es plaquegen en medi ric sense selecció (YPD). Transcorregudes 24 h es seleccionen els clons resistents fent rèpliques en plaques de medi ric amb 200 µg/ml G418.

L'extrem N-terminal del termodegró conté una etiqueta 1myc que permet comprovar l'obtenció de la proteïna d'interès fusionada (i la seva eliminació) mitjançant immunoblot (vegeu punts 5.1, 5.2 i 5.3).

Per tal de donar a les soques amb un mutant termodegró la possibilitat de sobreexpressar la ubiquitin-lligasa Ubr1, s'usa el vector pKL142, que conté clonat l'extrem 5' d'UBR1, fusionat a una etiqueta 3HA N-terminal, i sota el promotor GAL1,10. La transformació amb el plasmidi linearitzat amb Mss I, que talla pel mig del fragment UBR1, permet regenerar una copia completa d'UBR1, induïble amb galactosa. L'etiqueta 3HA permet comprovar la sobreexpressió d'Ubr1 mitjançant immunoblot (vegeu punts 5.1, 5.2 i 5.3).

3 Tècniques de biologia cel·lular en *Saccharomyces cerevisiae*

3.1 Determinació de la densitat cel·lular d'un cultiu.

La densitat cel·lular dels cultius es determina comptant en una cambra de Neubauer (microscopi òptic) una mostra de cultiu diluïda 1:10 o el que sigui necessari en aigua.

Les mostres es sonioquen 8 segons a 50W (sonicador *Sonic Dismembrator* (Dynatech) per individualitzar les cèl·lules, i a continuació es compten amb la cambra de Neubauer.

3.2 Sectors i dilucions seriades

Són dos mètodes que permeten l'observació en placa del nivell de sensibilitat d'una soca a un determinat agent genotòxic.

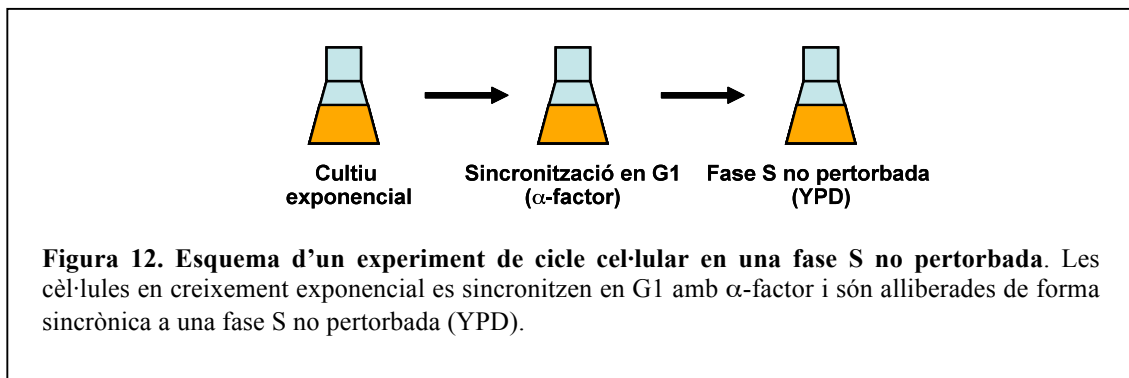
Per realitzar sectors, s'escampa en ziga-zaga, una petita quantitat de cèl·lules, de forma que al final del traç hi hagi cèl·lules individuals que permeten estudiar el creixement de colònies individuals.

En casos, en que es requereix una major resolució, es realitzen dilucions seriades. En aquest cas partim de cultius saturats de les soques que volem estudiar, que es dilueixen a $2 \cdot 10^7$ cèl·lules/ml. A partir d'aquí, es fan 6 dilucions seriades 1:10 de cada cultiu, i es plaquegen 12 μ l de cadascuna de les dilucions en: plaques control de medi ric sense agent genotòxic i plaques de medi ric amb l'agent genotòxic d'interès (0,2 M HU o concentracions menors; 0,022% (v/v) MMS).

3.3 Experiments de cicle cel·lular en una fase S no pertorbada

Per estudiar el comportament d'una determinada proteïna al llarg del cicle cel·lular, o la progressió del cicle cel·lular en un determinat mutant.

Es duen a terme els experiments en medi ric (YPD) a 24°C tal com s'esquematitza (vegeu Figura 12).



S'inocula un cultiu a partir d'una colònia fresca i s'incuba en una incubadora amb agitació orbital a 220 rpm tota la nit. L'endemà al matí es determina la densitat del cultiu (vegeu 3.1) i es dilueix en medi ric (YPD) a $5 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml, en un volum adequat al nombre i mida de les alíquotes necessàries al llarg de l'experiment.

Els cultius es deixen créixer fins que la densitat cel·lular es dobla (un temps de generació), a aproximadament $1 \cdot 10^7$ cèl·lules/ml. En aquest punt es pren una alíquota de cultiu asincrònic i la resta del cultiu cel·lular es sincronitza en fase G1 afegint al medi 50 ng/ml α -factor (soques *bar1Δ*) (vegeu fons genètic).

Després de 120 minuts, per confirmar que les cèl·lules estan correctament sincronitzades en fase G1, es compta una dilució 1:15 del cultiu, a la cambra de Neubauer, determinant l'índex de gemmació (BI). L'índex de gemmació, [(núm. cèl·lules gemmades / núm. cèl·lules totals) \cdot 100] indica el nivell de sincronització del cultiu en fase G1. En un cultiu perfectament sincronitzat en fase G1, l'índex de gemmació hauria de ser del 0 %, ja que les cèl·lules en fase G1 no presenten gemma. No obstant, a la pràctica, es considera que un cultiu està ben sincronitzat quant l'índex de gemmació és inferior al 5%. Si l'índex de gemmació es superior al 5%, degut a la presència de moltes cèl·lules en gemma de fase

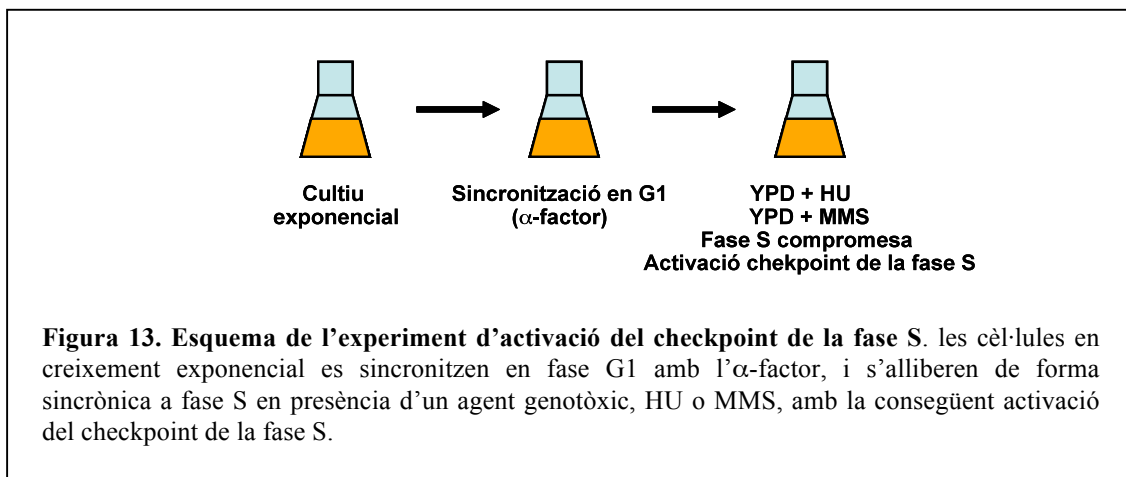
G2-M (forma de vuit, on la gemma presenta la mateixa mida que el cos de la cèl·lula mare (*dumbbell*)), el cultiu es deixa més temps en α -factor per acabar de sincronitzar-lo.

Un cop es comprova la correcta sincronització del cultiu, es renten les cèl·lules tres vegades amb medi ric sense α -factor, per alliberar-les de l'aturada en fase G1, i es resuspenen en medi ric sense α -factor, permetent l'entrada sincrònica de les cèl·lules a una fase S no pertorbada.

3.4 Experiments d'activació del checkpoint de la fase S

Per estudiar el comportament d'una proteïna en resposta a estrès genotòxic o la progressió del cicle cel·lular en presència d'estrès genotòxic en un determinat mutant.

Es duen a terme els experiments en medi ric (YPD) a 24°C tal com s'esquematitza (vegeu Figura 13).



Es procedeix de forma idèntica que el descrit al punt 3.3 fins la sincronització en fase G1 amb la feromona α -factor.

Un cop es comprova la correcta sincronització del cultiu, es renten les cèl·lules tres vegades amb medi ric sense α -factor, per alliberar-les de l'aturada en fase G1, i es resuspenen en medi ric sense α -factor però amb un agent genotòxic, permetent l'entrada sincrònica de les cèl·lules a una fase S compromesa per estrès replicatiu o per dany al

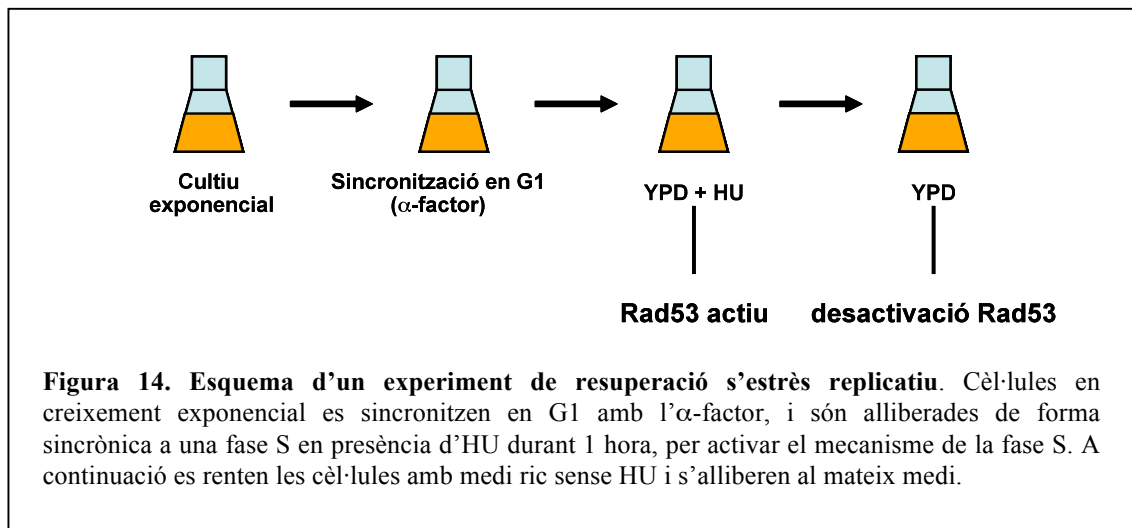
DNA. L'estrès replicatiu va ser generat per la presència de 200 mM d'hidroxiurea (HU); el dany per metilació del DNA va ser generat per la presència de 0,033% (v/v) metilmetanosulfonat (MMS) (vegeu punt 2.2).

3.5 Experiments de recuperació d'estrès replicatiu

Per estudiar el comportament d'una proteïna després d'estrès replicatiu o la progressió de la replicació i del cycle cel·lular després d'estrès replicatiu en un determinat mutant.

Es procedeix de forma idèntica que el descrit al punt 3.4 fins l'alliberament a una fase S compromesa per estrès replicatiu, per la presència de 0,2 M HU. La cèl·lules es mantenen en HU durant 1 hora.

A continuació, per eliminar l'HU de medi es realitzen tres rentats amb medi ric sense HU, i les cèl·lules es resuspenen en medi ric sense HU, la qual cosa permet la recuperació de l'estrès replicatiu i la inactivació del mecanisme de vigilància de la fase S (vegeu Figura 14).



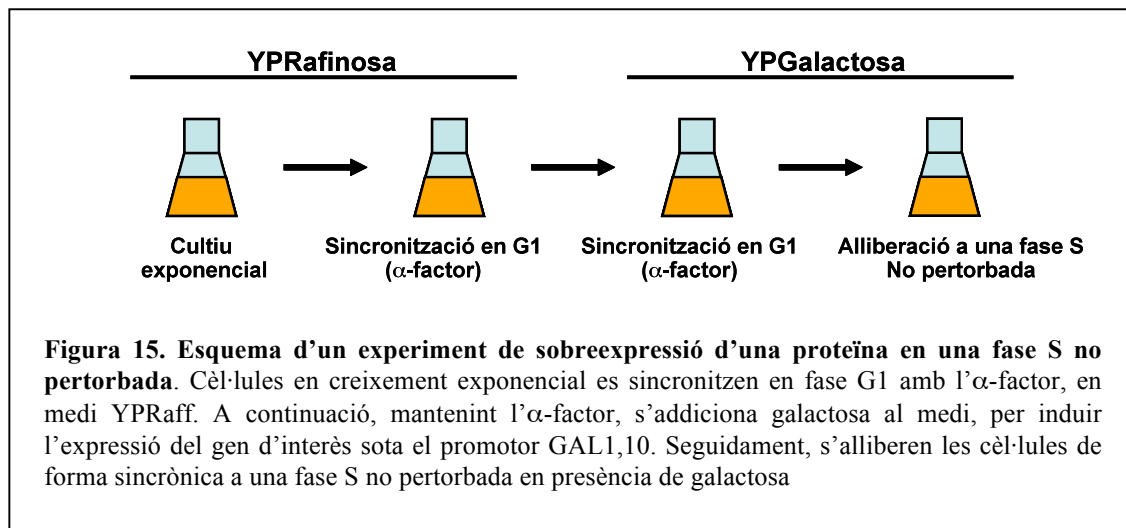
3.6 Experiments amb sobreexpressió d'una proteïna en una fase S no pertorbada

Per estudiar l'efecte de la sobreexpressió d'una proteïna d'interès (Clb6) en la progressió de la replicació i del cicle cel·lular.

Per dur a terme es va partir d'una soca que conté el gen d'interès clonat sota el promotor induïble per galactosa, GAL1,10.

Es procedeix de forma idèntica que el descrit al punt 3.3 fins la sincronització en fase G1 amb la feromona α -factor, excepte que el medi és YPRaff en comptes de YPD, per tal de facilitar la posterior inducció del promotor GAL1,10.

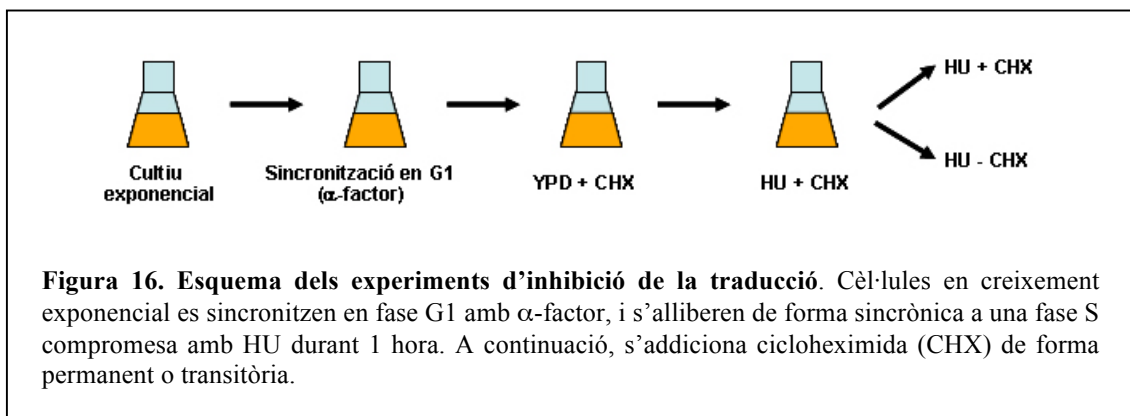
Quan el cultiu presenta un índex de gemmació 5% o inferior (vegeu punt 3.2), s'addiciona galactosa sòlida al medi fins a una concentració final d'un 2%, per induir la proteïna d'interès, mantenint l' α -factor. Transcorreguts 30 minuts les cèl·lules es renten tres cops en medi YPGal, i es resuspenen en el mateix medi, per alliberar-les a fase S mantenint la producció de la proteïna (vegeu Figura 15).



3.7 Experiments d'anàlisi de l'estabilitat d'una proteïna

Per comprovar si la presència d'una proteïna d'interès requereix síntesi *de novo* es va optar per inhibir la traducció de proteïna amb cicloheximida (CHX). La CHX actua interferint l'activitat peptidil transferasa del ribosoma, bloquejant l'elongació de la traducció

Es procedeix de forma idèntica que el descrit al punt 3.4 fins l'alliberament a fase S en presència de 0,2 M HU. S'incuben les cèl·lules 1 hora en aquestes condicions, per tal de generar estrès replicatiu i activar el mecanisme de vigilància de la fase S. Transcorregut aquest temps, es determina l'índex de gemmació del cultiu (BI) (vegeu punt 3.2) (en aquest cas, el BI es troba al voltant del 50%, indicant que les cèl·lules han estat correctament alliberades a fase S). A continuació mantenint l'HU al medi s'addiciona 100 µg/ml CHX. Arribats a aquest punt, en funció de l'objectiu de l'experiment, pot mantenir-se la CHX al llarg del temps, o bé enretirar-la (mantenint però la HU) després d'un temps per permetre el reinici de la síntesi proteica (vegeu Figura 16).



3.8 Experiments de viabilitat d'una proteïna en soques termosensibles

Els experiments amb els mutants condicionals termodegró (vegeu 2.5.5) permeten mantenir la proteïna d'interès, i eliminar-la en el moment del cicle cel·lular en que es vol estudiar l'efecte de la seva eliminació.

Els cultius s'inicien a condicions permisives: 24°C (termodegró no exposat) en YPRaff (no sobreexpressió d'Ubr1), El medi es suplementa amb 0,1 mM CuSO₄ per assegurar l'expressió del mutant condicional des del promotor CUP1. Altrament es procedeix com es descriu al punt 3.3 fins a la sincronització amb α -factor.

Una vegada comprovada la bona sincronització del cultiu, les cèl·lules es renten tres vegades amb YRaff a 24°C, i es van alliberar a fase S, mantenint les condicions permisives (YRaff, 24°C) en presència de 0,2 M HU. Les cèl·lules s'incuben 1 hora en aquestes condicions, per tal de generar estrès replicatiu i activar el mecanisme de vigilància de la fase S. Transcorregut aquest temps es determina l'índex de gemmació del cultiu (BI) (vegeu punt 3.2) (en aquest cas, el BI es troba al voltant del 50%, indicant que les cèl·lules han estat correctament alliberades a fase S).

Seguidament, mantenint els cultius a temperatura permissiva (24°C) i la presència d'HU s'addiciona galactosa sòlida al medi fins a una concentració final d'un 2%, per induir la sobreexpressió de la ubiquitin lligasa UBR1. Transcorreguts 30 minuts, es canvia el medi a YPGal pre-escalfat a 37°C (condicions restrictives), amb l'objectiu d'exposar el degró i eliminar la proteïna, mantenint l'estrès replicatiu amb HU i la incubació a 37°C durant la resta d el' experiment (vegeu esquema experiment Figura 17).

Un cop fixades, per permetre la hidròlisi de l'RNA, es rehidraten amb dos rentats en 1 ml de 50 mM Tris-HCl pH 7,8. S'incuben en el mateix tampó, en presència de 200 µg/ml de RNasa A, bé durant 2 hores a 37°C o bé durant una nit a 24°C.

Per tal de permeabilitzar les cèl·lules al iodur de propidi es du a terme una digestió parcial amb pepsina, incubant les cèl·lules en 5 mg/ml pepsina en 50 mN HCl, durant 30 minuts a 37°C. Passat aquest temps la pepsina s'inactiva per evitar una major degradació, tornant a pH 7,8, amb un rentat en 1 ml en el tampó de FACS (200 mM Tris-HCl pH 7,8; 211 mM NaCl; 78 mM MgCl₂).

Per tenyir el DNA es resuspenen les cèl·lules en 0,5 ml de tampó de FACS suplementat amb iodur de propidi a 20 µg/ml. En aquest estat es mantenen estables a 4°C, protegides de la llum, durant anys.

Just abans de l'anàlisi en el citòmetre de flux es transfereixen 50 µl de la suspensió de cèl·lules en tampó FACS amb iodur de propidi a 1 ml de 50 mM Tris-HCl pH 7,8. La suspensió es sonica durant 8 segons a 50W (sonicador *Sonic Dismembrator*, Dynatech). La sonicació és de vital importància en aquesta tècnica, per tal d'assegurar que cada lectura correspon a una sola cèl·lula i evitar així que per exemple dues cèl·lules amb contingut 1C de DNA siguin comptades com una sola partícula amb un contingut de DNA 2C.

Les mostres han estat analitzades en un aparell FACScan (Becton-Dickinson), llegint l'emissió de fluorescència del iodur de propidi (FL2-H). Les dades es van representar gràficament com els histogrames del nombre d'esdeveniments (Y) front fluorescència FL2-H (X), per a 20.000 esdeveniments.

3.10 Recompte d'anafases

Es va determinar el nombre de cèl·lules post-anafase mitjançant microscòpia de fluorescència de les cèl·lules tenyides amb iodur de propidi preprades per a la citometria de flux (FACS) (vegeu punt 3.9). Les cèl·lules amb una sola massa nuclear es van comptar com a pre-anafase, i les cèl·lules amb dues masses nuclears es van comptar com a post-anafase.

4 Tècniques de Biologia Molecular

4.1 Amplificació de DNA per PCR

S'ha usat PCR (*Polymerase Chain Reaction*) per amplificar seqüències d'interès per: clonar gens, generar cassettes de deleció, per integrar seqüències que donin lloc a proteïnes fusionades a etiquetes, que substitueixin un promotor, o que substitueixin una seqüència salvatge per una de mutant.

Per dur a terme les amplificacions s'han dissenyat oligonucleòtids específics per als extrems de la seqüència d'interès (vegeu Taula 3). En el cas de les clonacions, els oligonucleòtids incorporen en l'extrem 5' seqüències diana per als enzims de restricció que s'usaran posteriorment per clonar el producte de PCR en el vector adequat. En el cas de les integracions, els oligonucleòtids incorporen en l'extrem 5' 60 nucleòtids amb la seqüència flanquejant a la regió que es vol substituir (vegeu per exemple 2.5.2 i 2.5.3).

Les reaccions de PCR en el termociclador *GeneAmp PCR System 2400* (Applied Biosystems) consten de:

- Desnaturalització inicial: 2 minuts a 98°C.
- 28 cicles:
 - desnaturalització (5 seg DNA plasmídic o 10 seg genòmic, a 98°C),
 - anellament (10 seg a 55°C),
 - extensió (15 seg/Kb DNA plasmídic o 30 seg/Kb DNA genòmic, a 72°C).
- Extensió final (4 minuts a 72°C).

En iniciar la reacció i per evitar amplificar productes espuris resultat d'anellament inespecífic a baixa temperatura, que es pot produir durant la pujada inicial de temperatura ambient a 98°C, les mostres s'introdueixen al termociclador un cop la temperatura ha superat els 90°C (“*hot start*”).

4.2 Clonació

El marc de lectura que es vol clonar s'amplifica per PCR amb DNA genòmic com a motlle (vegeu 4.1). El producte es purifica (QIAquick PCR purification kit, Qiagen) . La seva qualitat i concentració s'analitzen mitjançant electroforesi de DNA en gels d'agarosa-bromur d'etidi (vegeu 4.3).

100 ng dels producte de PCR purificat es digereixen amb l'enzim o enzims de restricció (New England Biolabs) triats per dur a terme el clonatge, usant els tampons i seguint les condicions de treball indicades pel fabricant. Independentment, el vector on es clonarà el DNA és digerit amb els mateixos enzims i condicions. En cas que la clonació impliqui l'ús d'un únic enzim de restricció, es desfosforila el vector per evitar la seva recirculació, afavorida respecte la lligació del vector amb l'insert. Per a la desfosforilació s'afegeixen 5 unitats de fosfatasa antàrtica (New England Biolabs) i s'incuba a 37°C durant 15 minuts. Seguidament, s'inactiva la fosfatasa a 65°C durant 5 minuts.

El producte de PCR i el vector digerits es purifiquen (QIAquick PCR purification kit, Qiagen) i es lliquen (vegeu 4.4).

4.3 Electroforesi de DNA en gels d'agarosa-bromur d'etidi

L'electroforesi en gels d'agarosa és una tècnica que permet separar molècules de DNA lineal per mida. Aquest fet permet que sigui usada per verificar tots els passos del clonatge, des de la PCR fins a la confirmació del producte final.

S'utilitzen gels d'1% (p/v) agarosa (*Agarose D-1 Low EEO-GQT*, Pronadisa) en tampó TAE (50 mM Tris-acètic pH 8,5, 2 mM EDTA) amb 0,5 µg/ml de bromur d'etidi. El bromur d'etidi és un agent intercalant fluorescent que en ser retingut pel DNA durant l'electroforesi, permet la seva visualització en ser il·luminat amb llum UV (365 nm).

S'han utilitzat com a marcadors de mida els 1 kb ladder i 100 bp ladder (New England Biolabs). La quantitat coneguda de DNA a cada banda dels marcadors ens ha permès fer una estimació de la quantitat de DNA present, a partir de la comparació d'intensitats de bandes de longitud similar.

4.4 Lligació del producte de PCR i el vector digerits

Per a la lligació del vector i l'insert s'usa 1 unitat de T4 DNA lligasa (Roche), en un volum final de 10 µl, en el tampó subministrat pel fabricant.

Les lligacions es fan típicament en una relació molar aproximada 7:1 insert/vector, per tal de facilitar l'encontre de l'insert amb el vector.

Les reaccions s'incuben durant la nit, a 16°C. El producte de lligació s'amplifica a través de transformació en *E. coli* (vegeu 4.5).

4.5 Transformació d'*Escherichia coli*

Per transformar *E. coli* DH5α s'usen cèl·lules competents preparades segons es descriu al punt 4.7.

60 µl de cèl·lules competents i els 10 µl de reacció de lligació, incubats en glaç 30 minuts, es sotmeten a un xoc tèrmic de 90 segons a 42°C. Immediatament després les cèl·lules es refreden en aigua-glaç per reduir la mortalitat.

Després d'afegir 1 ml d'LB (vegeu medis) les cèl·lules s'incuben 1 hora a 37°C, per tal que expressin el gen de resistència a l'ampicil·lina abans de plaquejar en medi selectiu.

Finalment, les cèl·lules es sembren en plaques LB suplementades amb 75 µg/ml ampil·lina (LBA) com a selecció. Només les cèl·lules transformades amb una molècula

de vector recircularitzat (en principi només possible per lligació de l'insert) haurien de tenir i mantenir el plàsmid que conté el gen de resistència a ampicil·lina, donant lloc a colònies.

Donat que les clonacions incloses en aquesta tesi no permetien destriar positius de falsos positius per selecció blanc-blau (Liu, Cashion et al. 1997), s'ha inclòs com a control de l'eficiència de la lligació la reacció amb vector però sense insert. El nombre de colònies obtingudes en el control ens indicarà la taxa de falsos positius, i suggereix la grandària de la mostra que cal explorar per assegurar-se la identificació d'un positiu.

Un nombre adequat de colònies individuals s'inoculen en 5 ml de LBA, a 37°C, durant una nit, i es procedeix a l'extracció de DNA plasmídic (vegeu punt 4.6), la comprovació de la presència d'insert per digestió amb endonucleases de restricció (vegeu punt 4.2) i la visualització d'aquests digerits mitjançant electroforesi de DNA en gel d'agarosa-bromur d'etidi (vegeu punt 4.3).

4.6 Extracció de DNA plasmídic (miniprep)

Per preparar DNA plasmídic es parteix d'1,5 ml de cultiu saturat de la soca d'*E. coli* portadora. Les cèl·lules es centrifuguen en una centrífuga Eppendorf 5418, a 14.000 rpm, durant 1 minut, a temperatura ambient.

Les cèl·lules es resuspenen en 0,5 ml de solució STET (8% (p/v) sucrosa, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA, 0,1% (v/v) TritóX100). Per tal de desestructurar la paret cel·lular s'afegeix a la solució lisozim fresc a 100 µg/ml i s'incuba la barreja a temperatura ambient durant 10 minuts.

A continuació, es bull la solució 45 segons, fet que genera porus que permeten la sortida del DNA plasmídic però no el cromosòmic. Seguidament, s'elimina el material no soluble per centrifugació, a iguals condicions que anteriorment, durant 10 minuts.

El DNA plasmídic del sobrenedant es concentra mitjançant precipitació alcohòlica: s'afegeix NaCl fins a 0,2 M final, i un volum d'isopropanol. Es barreja i s'incuba en glaç durant 15 minuts per afavorir la precipitació del DNA.

El DNA precipitat es recupera per centrifugació, a iguals condicions que anteriorment, durant 10 minuts. Per eliminar l'excés de sal i les restes d'isopropanol el pèl·let es renta una vegada amb 1 ml d'etanol 70% (v/v), i s'incuba 5 minuts en un nou volum d'etanol 70% (v/v), a temperatura ambient.

Un cop eliminat l'etanol, el DNA es dissol en 80 µl de 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA + 10 µg/ml d'RNasa A. Les mostres s'incuben a 37°C durant 2 hores, per tal de solubilitzar el DNA i d'eliminar l'RNA arrossegat al llarg del procés.

4.7 Preparació d'*E. coli* DH5α competents amb clorur de rubidi

Per preparar cèl·lules competents s'ha usat el mètode químic basat en el clorur de rubidi per debilitar la paret cel·lular i d'aquesta manera fer les cèl·lules aptes per a la transformació per xoc tèrmic.

S'inocula un cultiu a partir d'una única colònia fresca d'*E. coli* DH5α, en 20 ml d'LB (vegeu 2.2) i s'incuba durant una nit a 37°C, en una incubadora amb agitació orbital a 220 rpm. L'endemà, s'inocula 1 ml d'aquest cultiu saturat a 100 ml de medi Psi-broth (vegeu 2.2). El cultiu es creix a 37°C fins que assoleix una densitat òptica a 550 nm d'absorbància compresa entre 0,48 i 0,6, i mai superior a 0,7.

A partir d'aquest punt, tots els passos es realitzen a 4°C, en cambra freda o dins glaç.

Es refreda el cultiu durant 15 minuts en una barreja d'aigua-gel. A continuació, es recuperen les cèl·lules centrifugant el cultiu 5 minuts a 3.000g a 4°C.

Després d'eliminar el sobrenedant es resuspenen les cèl·lules suaument i a la cambra freda, en 40 ml de tampó TfbI fred (30 mM acetat de potassi; 100 mM clorur de rubidi; 10 mM clorur de calci; 50 mM clorur de manganès; 15% (v/v) glicerol).

Es tornen a centrifugar les cèl·lules en les mateixes condicions que les anteriors però aquest cop es resuspenen en 4 ml de TbfII fred (10 mM MOPS; 75 mM clorur de calci; 10 mM clorur de rubidi; 15% (v/v) glicerol). Es deixen en gel 15 minuts i es poden transformar directament o aliquotar en tubs eppendorf de 1,5 ml freds, en volums de 60 a 100 µl de cèl·lules.

Les cèl·lules sobrants es sotmeten a congelació ràpida en nitrogen líquid i s'emmagatzamen en un congelador -80°C.

4.8 Preparació d'*E. coli* BL21(DE3)RIL competents amb clorur de calci

BL21(DE3)RIL és una soca d'*E. coli* dissenyada especialment per la sobreexpressió de proteïnes recombinants de *S. cerevisiae*. La soca presenta diferents modificacions en aquest sentit: (1) Com la resta de soques BL21, té delecionades les proteases Lon i Omp-t, per evitar la degradació de la proteïna sobreexpressada. (2) Com la resta de soques BL21(DE3) permet l'expressió regulada de gens clonats sota el control del promotor víric T7, ja que les soques BL21(DE3) contenen el factor de transcripció T7 induïble per isopropil β-D-1-tiogalactopiranosid (IPTG), un anàleg sintètic de la galactosa no metabolitzable. (3) A més, la soca BL21(DE3)RIL conté còpies extres dels tRNA d'Arginina, Isoleucina i Leucina, en un plasmidi no integratiu que permet selecció amb cloramfenicol (50 µg/ml). Aquests tRNAs corregeixen la major representació d'aquests aminoàcids a les proteïnes de *S. cerevisiae* respecte les d'*E. coli*, la qual cosa evita truncaments de la proteïna sobreexpressada.

Donat que les soques BL21 assoleixen rendiments de competència de transformació baixos, i que la congelació els redueix fins a nivells inacceptables, les cèl·lules competents

s'utilitzen sempre en fresc. A canvi, el mètode de preparació és simplificat respecte el descrit al punt 4.7.

S'inocula un cultiu a partir d'una colònia fresca d'*E. coli* BL21(DE3)RIL, en 20 ml d'LB (vegeu 2.2) i s'incuba durant una nit a 37°C, en una incubadora amb agitació orbital a 220 rpm. L'endemà, s'inocula 1 ml d'aquest cultiu saturat a 5 ml de medi LB + 50 µg/ml cloramfenicol. Es cultiu s'incubar a les mateixes condicions durant 1 hora i 30 minuts.

A partir d'aquest punt, tot el procés es realitza a 4°C, en cambra freda o dins glaç.

Es refreda el cultiu durant 15 minuts en una barreja d'aigua-gel. A continuació, es recuperen les cèl·lules centrifugant el cultiu a 1.900g, durant 5 minuts, a 4°C.

Després d'eliminar el sobrenedant es resuspenen les cèl·lules suaument i a la cambra freda, en 500 µl de CaCl₂ 50 mM i es mantenen en gel fins al moment de la transformació, en fresc. Per cada constructe a transformar s'usen 50 µl de la suspensió de cèl·lules.

4.9 Construccions usades en aquest treball

Construcció	Vector-Insert	Utilitzada en
pGP4	pGEX-6P-3-Clb6 clonat amb BamHI i Sall	BL21(DE3)RIL
pJGsst1	per delecionar BAR1*	YGP17, 18, 19, 20, ...
pGAL-HO	pGAL1,10-HO**	YGP58
pRS305	pRS305 (LEU2)	YGP54
pFa6aKanMX6	pFa6aKanMX6	YGP4, 6, 7, 8, ...

Taula 1. Construccions usades en aquest treball. Es mostren el nom, el vector i l'insert corresponent, amb els enzims de lligació utilitzats per a la clonació, i el nom de la soca en què han estat utilitzades. * Construcció publicada a (Reneke, Blumer et al. 1988); ** Construcció publicada a (Jensen and Herskowitz 1984).

4.10 Extracció de DNA genòmic de llevat

Es parteix de 5 ml de cultiu saturat. Les cèl·lules es centrifuguen i el pèl·let es resuspèn amb tampó de lisi (100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,1% (v/v) SDS)

S'afegeix un volum de sorra de vidre i un volum de fenol/cloroform/isoamil alcohol (25:24:1). Les cèl·lules es vortexen a màxima potència durant 90 segons, per lisar-les mecànicament. Es separen la fase orgànica i la fase aquosa per centrifugació, 5 minuts, a 16.000g, temperatura ambient. Es recupera la fase aquosa que conté els àcids nucleics desproteïnitats.

Es precipita el DNA present a la fase aquosa mitjançant precipitació alcohòlica, afegint un volum d'isopropanol. Després de barrejar la mescla s'incuba en gel breument, per permetre la precipitació del DNA, molt favorable en el cas de cromosomes.

El DNA és recuperat per centrifugació, en una centrifuga eppendorf 5418, a 16.000 g, durant 10 minuts, a temperatura ambient. El DNA precipitat es renta dos cops, cadascun amb 1 ml d'etanol 70% (v/v). Finalment es dissol en 50 µl de 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA + 0,01 µg/ml RNasa A. Les mostres s'incuben a 37°C durant 2 hores o bé tota la nit a temperatura ambient, per tal de solubilitzar el DNA i d'eliminar l'RNA arrossegat al llarg del procés, abans d'utilitzar-lo com a DNA motlle per PCR (vegeu punt 4.1).

5 Tècniques Bioquímiques

5.1 Extracció proteica total de cèl·lules de llevat en àcid tricloroacètic (TCA)

Aquest mètode permet l'extracció de proteïnes totals de llevat de forma efectiva, alhora que inactiva de forma immediata les proteases, quinases i fosfatases. El trencament mecànic s'aconsegueix per agitació de sorra de vidre.

Es resuspenen 10^8 cèl·lules de llevat en 200 μ l de 20% (p/v) TCA. S'afegeixen 200 μ l de sorra de vidre i es vortexa la barreja durant 1 minut a velocitat màxima.

Es recupera el lisat i es renta la sorra de vidre dos cops amb 200 μ l de 5% (p/v) àcid tricloroacètic. Cada volum de rentat s'afegeix al lisat, per tal de recuperar la màxima quantitat de proteïna possible de l'espai mort de la sorra de vidre.

Les proteïnes desnaturalitzades, insolubles en TCA, es recuperen fàcilment per centrifugació del lisat a baixa velocitat: 3.000 rpm en una centrífuga Eppendorf 5418, 10 minuts, a temperatura ambient.

Es descarta el sobrenedant i es dissol el pèl·let en un volum adequat de tampó d'aplicació electroforètica de mostres (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 8% (v/v) glicerol, 4% (v/v) 2-mercaptoetanol, 1,6% (p/v) SDS, 0.008% (p/v) blau de bromofenol). Les restes de TCA superen la capacitat tamponadora dels volums de tampó emprats habitualment, de manera que es neutralitza el pH de les mostres afegint 0,2 volums de 1 M Tris-base (altrament es donaria proteòlisi àcida al proper pas).

Per últim les mostres es bullen 3 minuts, es centrifuguen a 3.000 rpm en una centrífuga Eppendorf 5418, durant 10 minuts, a temperatura ambient, per eliminar el material insoluble. Els sobrenedants es poden carregar immediatament en un gel d'electroforesi

(vegeu punt 5.2). Alternativament es poden congelar (en aquest cas es bullen de nou abans d'aplicar).

5.2 Electroforesi en gel de poliacrilamida desnaturalitzant (SDS-PAGE)

L'SDS-PAGE permet separar les proteïnes en funció de la seva massa molecular (Laemmli 1970) i després visualitzar-les mitjançant immunoblot o per tinció directa en el gel.

El detergent aniònic dodecilsulfat de sodi (SDS) s'uneix a les proteïnes amb una relació constant a la seva massa, de manera que, en general, totes les proteïnes presenten la mateixa densitat de càrrega. Per tant, en un camp elèctric es mouen en forma inversament proporcional (logarítmica) a la seva mida, impulsades per la diferència de potencial existent entre els dos pols de l'electroforesi.

S'han utilitzat gels de 1,5 mm de gruix i diferents concentracions d'acrilamida total: 7,5%, el 10% i el 12% en funció de la massa molecular de la proteïna d'interès. La relació acrilamida-bisacrilamida ha estat sempre 37,5:1 (Biorad).

Les mostres s'apliquen en tampó d'aplicació de mostra (vegeu punt 5.1).

El marcador utilitzat varia en funció del mètode d'anàlisi posterior: *Broad Range Prestained Starndar* (Fermentas) en el cas d'immunoblot, i *Broad Range Standard* (BioRad) quan es fa una tinció amb blau de Coomassie.

Els gels es corren en tampó d'electroforesi (25 mM Tris-glicina pH 8,3, 0,1 % (p/v) SDS), utilitzant un generador *Power-Pac Basic* (BioRad), a les següents condicions de voltatge i de temps:

- En l'anàlisi de Clb6-13myc (64 KDa), 10% acrilamida, 15 minuts d'apilació a 90 V i 80 minuts a 200 V.
- En l'anàlisi de Clb6-3HA (46 KDa) 12 % acrilamida, 15 minuts d'apilació a 90 V i 110 minuts a 200 V.
- En l'anàlisi de les formes hiperfosforilades de Rad53 (a l'entorn dels 100 KDa), 7,5 % acrilamida, 220 V durant 85 minuts.
- En l'anàlisi de les dues formes fosforilades de Pol12 (86 i 91 KDa), 7,5 % acrilamida, 50 minuts d'apilació a 120 V i 62 minuts a 190 V.
- En l'anàlisi de Cdc28 (34 KDa) respecte Pho85 (35 KDa), 10 %, acrilamida, 15 minuts d'apilació a 90 V i 50 minuts a 200V.

5.3 Immunoblot (*western blot*) i anticossos emprats

Les proteïnes separades mitjançant SDS-PAGE (vegeu punt 5.2) s'electrotransfereixen a una membrana de PVDF (*difluorur de polivinil*, Immobilon-P) o de nitrocel·lulosa (Protran BA85) per transferència semiseca (*Panther Semidry Electrobotter*, Owl Scientific).

La transferència es fa a amperatge constant, adequant el valor al percentatge del gel i a la massa molecular de les proteïnes a transferir (de 2 a 3,2 mA/cm²), durant 60 minuts.

El tampó de transferència és una modificació del tampó Towbin, que conté SDS per incrementar l'eficiència de la transferència, i pH alcalí, que minimitza el nombre de proteïnes que presenten càrrega nul·la per coincidència amb el seu punt isoelèctric: 50 mM Tris-glicina pH 9,1; 0,0373 % (p/v) SDS; 20 % (v/v) metanol.

Un cop transferides les proteïnes a la membrana, es tenyeixen amb Ponceau S (0,2% (p/v) Ponceau S; 3 % (p/v) TCA). Aquesta tinció permet visualitzar les proteïnes més abundants que s'han transferit a la membrana, i permet controlar la correcta transferència de les proteïnes. A més, un escanejat d'aquestes imatges s'ha usat com a control de càrrega.

Abans de continuar l'immunoblot, la tinció s'elimina rentant la membrana amb TBST (100 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween-20).

Les membranes es bloquegen incubant-les en TBST + 5% (p/v) de llet descremada en pols, durant 20 minuts en agitació suau. Així s'impedeix la unió de l'anticòs de manera inespecífica a la membrana.

Seguidament, les membranes són transferides a la dilució d'anticòs primari contra la proteïna o contra l'etiqueta fusionada a la proteïna que es vol detectar, i incubades durant una 1 hora i 30 minuts amb agitació suau.

Els anticossos primaris i les dilucions emprades són:

- 9E10 α -myc (monoclonal de ratolí, Roche), dilució 1:2.000 en TBST + 1 % llet.
- 9E10 α -myc (monoclonal de ratolí, sobrenedant d'hibridoma), dilució 1:500 en TBST.
- 12CA5 α -HA (monoclonal de ratolí, Roche), dilució 1:1000 en TBST + 1 % llet.
- 12CA5 α -HA (monoclonal de ratolí, sobrenedant d'hibridoma), dilució 1:100 en TBST.
- 6D2 α -Pol12 (monoclonal de ratolí, ascites, cedit pel Dr. Marco Foiani), dilució 1:2000 en TBST + 1 % llet.
- α -PSTAIR, a *S. cerevisiae* reconeix Cdc28 i Pho85 (monoclonal de ratolí, ascites, cedit pel Dr. Tim Hunt), dilució 1:25 en TBST + 5 % llet.
- γ C-19 α -Rad53 (policlonal de cabra, sc-6749, Santa Cruz Biotechnology), dilució 1:500 en TBST + 5 % llet.

A continuació, s'elimina l'excés d'anticòs fent tres rentats de 5 minuts amb TBST. Seguidament, les membranes són incubades 30 minuts amb l'anticòs secundari corresponent. Per als anticossos primaris de ratolí, anti-IgG de ratolí conjugat a peroxidasa de rave rusticà (HRP) (Dako P0161), dilució 1:3.000 en TBST. Per a l'anticòs primari de

cabra, anti-IgG de cabra conjugat a HRP (Santa Cruz Biotechnology sc-2020), dilució 1:2500 en TBST + 5 % llet.

Per últim, s'elimina l'excés d'anticòs fent tres rentats de 5 minuts amb TBST, i s'incuba la membrana amb el reactiu luminiscent *ECL Plus Western Blotting Detection System* (Amersham), durant 2 minuts, amb agitació suau, a temperatura ambient. S'elimina l'excés de reactiu i s'exposa a pel·lícules fotogràfiques Curix RP2 Plus Medical X-ray (Agfa).

5.4 Assaig quinasa *in vitro* de Rad53

El sistema ha estat posat a punt prèviament al laboratori, optimitzant les condicions de concentració de Rad53, de substrat, i de temps d'incubació, monitoritzant la saturació de la fosforilació de substrats coneguts, i la no-fosforilació de proteïnes improbablement substrat.

Per dur a terme la reacció quinasa, usem 1 µg de Rad53 recombinant (vegeu 5.6 i 5.7), i 500 ng de la proteïna candidata a ser substrat, recombinant (vegeu 5.6 i 5.7), en 30 µl de tampó de reacció quinasa (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂, 1mM DTT, 1mM AEBSF, 2 mM NaF).

La reacció s'inicia afegint 100 µM ATP i 5 µCi de γ -[³²P]- ATP (Amersham, GE Healthcare), i es deixa procedir durant 1 hora, a 30°C, amb agitació suau (Thermomix Eppendorf).

Les reaccions s'aturen afegint tampó d' electroforètica de mostres i bullint-les (vegeu punt 5.2).

Les mostres es resolen en electroforesi SDS-PAGE i els gels es tenyeixen amb Coomassie blue (vegeu punt 5.2) per localitzar la posició de les proteïnes que hem emprat en l'assaig quinasa.

Finalment s'obté una autoradiografia exposant el gel a pel·lícules fotogràfiques Curix RP2 Plus Medical X-ray (Agfa), sensibles a la radiació β emesa pel ^{32}P incorporat a les proteïnes per fosforilació.

5.5 Immunoprecipitació de proteïnes

La immunoprecipitació s'ha emprat per estudiar interaccions proteïna–proteïna. Per aquest motiu, s'han emprat extractes proteics totals en condicions natives.

Les mostres corresponents a $2 \cdot 10^9$ cèl·lules de cultius de *S. cerevisiae* en les condicions d'interès, es centrifuguen a 2800g, 5 min i es renten en tampó d'immunoprecipitació fred (50 mM Tris-HCl pH 7,7, 75 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% (v/v) glicerol). Seguidament, es congela el pèl·let en N_2 líquid i es guarda a -80°C .

Per obtenir els extractes proteics totals el pèl·let es descongela sobre glaç, i es transfereix a un tub Duran de vidre de 40 ml de capacitat, fred, amb 2 ml de tampó d'immunoprecipitació fred, suplementat amb inhibidors de proteases (Tampó immunoprecipitació complet: 1 mM AEBSF; 0,15 μM aprotinina; 1 μM leupeptina, 1 μM pepstatina), inhibidors de fosfatases (0,5 mM pirofosfat de sodi, 2 mM NaF; 2mM β -glicerofosfat), 1 mM DTT i 0,1% (v/v) nonidet-P40.

S'afegeixen 2 ml de sorra de vidre i es vortexa 6 cops a la cambra freda, a màxima potència, alternant 30 segons de vòrtex i 1 minut en gel, per tal de minimitzar la desnaturalització tèrmica de les proteïnes. Els lisats es deixen en glaç, a la cambra freda, durant 1 hora, per tal de maximitzar el procés d'extracció.

Seguidament, es procedeix al clarificat de l'extracte. Es transfereix l'extracte a dos tubs eppendorf freds, i es centrifuguen 30 minuts, a 14.000 g, a 4°C per eliminar el material insoluble. El sobrenedant -extracte proteic total natiu- es transfereix a tubs nous.

Les immunoprecipitacions s'han fet contra proteïnes fusionades a una etiqueta 3HA, emprant 3F10 Anti-3HA Affinity Matrix (Roche). 3F10 és un anticòs monoclonal de rata, d'alta afinitat contra l'epítot HA, que dona major rendiment en les immunoprecipitacions que el 12CA5 que hem utilitzat en immunoblot i en microscòpia d'immunofluorescència. S'han emprat 3 μl de matriu 3F10 per immunoprecipitació (diluïts en 27 μl de reïna

Sepharose 4B (Sigma) per assolir un volum manejable sense incrementar la quantitat d'anticòs), pre-equilibrats en tampó d'immunoprecipitació complet.

La matriu 3F10 s'ha incubat amb els extractes proteics totals durant 1 hora, a 4°C, en rotació suau. Transcorregut aquest temps, es recupera la matriu 3F10, centrifugant 90 segons a 500 g.

Un cop eliminat l'extracte, l'immunoprecipitat es renta 5 cops, cadascun amb 1 ml de tampó d'immunoprecipitació complet, fred, per tal d'eliminar l'excés de proteïnes no unides a l'anticòs.

Finalment, les proteïnes immunoprecipitades s'alliberen bullint la matriu 3F10 en tampó d'aplicació electroforètica de mostres (vegeu punt 5.2).

La detecció es fa mitjançant immunoblots contra la proteïna immunoprecipitada i contra les proteïnes candidates a interaccionar amb aquesta (vegeu punts 5.1, 5.2 i 5.3).

5.6 Producció de proteïnes recombinants

S'inocula un cultiu a partir d'una sola colònia fresca de BL21(DE3)RIL portadora del constructe d'interès (pGP4 o control pGEX-6P-3 buit). en medi LBA (vegeu medis) + 50 µg/ml cloramfenicol (vegeu apartat 4.8). S'incuba durant una nit a 37°C, en una incubadora amb agitació orbital a 220 rpm.

L'endemà, 500 ml de medi LBA + cloramfenicol s'inoculen amb 20 ml del cultiu saturat i s'incuben a les mateixes condicions. Un cop s'assoleix una $OD_{600} \approx 0,6$ (creixement exponencial) es reserva una alíquota (control no-induït) i s'afegeix IPTG a 1 mg/ml final, per tal d'induir la proteïna heteròloga (vegeu punt 4.8)

El cultiu s'incuba, a les mateixes condicions, durant 2 hores i es recullen les cèl·lules, reservant una alíquota (cultiu induït, un volum que contingui el mateix nombre de cèl·lules que l'alíquota de cultiu no-induït, que es trobava a densitat menor) per comprovar la inducció de la proteïna abans de procedir a l'extracció i purificació.

A partir d'aquí tots els passos es realitzen a 4°C, a la cambra freda o en glaç.

El cultiu es centrifuga 10 minuts a 8000 g. Es descarta el sobrenedant i les cèl·lules es resuspenen en 25 ml de tampó de lisi fred (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM NaCl; 2 mM DTT; 1,5 mM EDTA; 1 mM AEBSF). La suspensió es congela en nitrogen líquid, per afavorir la lisi cel·lular i es conserva a -80°C fins quan convingui prosseguir amb la purificació de la proteïna recombinant.

Abans de prosseguir amb la purificació de la proteïna recombinant, es comprova l'èxit de la inducció a partir de les alíquotes de cultiu no-induït i induït. Les cèl·lules es centrifuguen 30 segons a 16.000 g, i es bullen 3 minuts en tampó d'aplicació electroforètica de mostres (vegeu punt 5.2). Les mostres es centrifuguen a 3.000 rpm en una centrífuga Eppendorf 5418, durant 10 minuts, a temperatura ambient, per eliminar el material insoluble. Els sobrenedants es carreguen en un gel SDS-PAGE (vegeu punt 5.2). Les proteïnes es tenyeixen en el gel per tinció de Coomassie (vegeu punt 5.2), per comprovar si la proteïna s'ha induït i, per referència a les proteïnes del marcador de pesos moleculars (*Broad Range Standard*, BioRad), estimar la quantitat de proteïna produïda.

5.7 Purificació de proteïnes recombinants

Tot el procés es du a terme a 4°C.

Un cop descongelades les cèl·lules (vegeu punt 5.6), es procedeix a la seva lisi: s'afegeix lisozim a una concentració final de 0,1 mg/ml i s'incuba durant 15 min en gel. A continuació es duen a terme 5 polsos de sonicació a 50 W (Sonicador *Sonic Dismembrator* (Dynatech)), de 30 segons cada un, amb un minut d'espera en aigua-gel entre polsos. A continuació, s'afegeix Tritó-X100 a 1 % (v/v) final, per ajudar a solubilitzar la proteïna, i s'incuba 1 hora a la cambra freda, per afavorir l'extracció, en rotació suau. El lisat es clarifica a 12.000 g, durant 10 min, a 4°C.

L'extracte clarificat es transfereix a un tub Falcon de 50 ml que conté 200 µl de matriu escorreguda de glutatió-sefarosa (GE Healthcare), prèviament equilibrada en tampó de lisi. L'extracte es deixa rotant durant 1 hora a la cambra freda, per permetre la unió de la

proteïna fusionada a GST amb la matriu. Usant 200 µl de matriu es poden purificar uns 5 mg de proteïna aproximadament.

Es recupera la matriu amb la proteïna d'interès unida centrifugant durant 1 min a 500 g. Es descarta el sobrenedant i la reïna es renta 5 cops amb tampó de lisi fred.

Seguidament, la proteïna recombinant induïda és alliberada de la seva etiqueta GST per proteòlisi amb la proteasa PreScission, que reconeix una seqüència aminoacídica específica, present al C-terminal del domini GST en els vectors pGEX-6P. Per fer-ho, la reïna és incubada durant 16 hores a 4°C amb 2 unitats de PreScission en el seu tampó (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT).

S'estima la concentració i quantitat total de proteïna recombinat purificada mitjançant una electroforesi SDS-PAGE, seguit d'una tinció amb solució de Coomassie (0,1 % (p/v) Coomassie Brilliant Blue, Sigma) (vegeu punt 5.2), per comparació a les quantitats conegudes de les proteïnes del marcador de pesos molecular (*Broad Range Standard*, BioRad).

5.8 Microscòpia d'immunofluorescència

S'ha emprat per determinar la localització subcel·lular de proteïnes d'interès, a diferents condicions.

5.8.1 Fixació

Per tal de mantenir inalterades les estructures cel·lulars 1 ml de cultiu a una concentració de $1 \cdot 10^7$ cèl·lules/ml es transfereix a un tub falcon amb 4 ml de solució fixadora (0,1 M KPO_4 pH 6,5; 4% (p/v) formaldehid fresc). La barreja s'incuba amb rotació, durant 2 hores, a temperatura ambient. Seguidament s'elimina l'excés de formaldehid rentant les cèl·lules dues vegades amb 5 ml de 0,1 M KPO_4 pH 6,5.

5.8.2 Permeabilització

Les cèl·lules fixades es resuspenen en 5 ml de solució isotònica (0,1 M KPO_4 pH 6,5; 1,2 M sorbitol, 0,1% (v/v) 2-mercaptoetanol) i es sotmeten a digestió controlada amb 120 unitats de liticasa, un enzim amb activitat endoglucanasa i proteasa que digereix la paret del llevat. El temps de incubació a 30°C varia entre 20 i 30 minuts, fins el moment que s'estima que les cèl·lules estan suficientment permeabilitzades (esferoplasts) però no lisades. Els esferoplasts són les cèl·lules de llevat desproveïdes de la protecció de la paret cel·lular. Al microscopi òptic es distingeixen perquè presenten un contorn menys contrastat que les cèl·lules amb la paret intacta. A més la membrana plasmàtica exposada dels esferoplasts es dissol, i la cèl·lula desapareixen, en introduir 1% (p/v) SDS.

L'excés de liticasa s'elimina rentant els esferoplasts en la mateixa solució isotònica (sense 2-mercaptoetanol). Aleshores es resuspenen en aquesta mateixa solució, a una concentració de $1,5 \cdot 10^7$ cèl·lules/ μ l.

5.8.3 Unió de les cèl·lules al portaobjectes i tinció

Es preparen els portaobjectes de vidre per tal que s'hi adhereixin establement les cèl·lules. Per això es col·loca una gota de poli-lisina en cadascun dels pous del portaobjectes. La poli-lisina genera una matriu de càrrega positiva sobre el portaobjectes que uneix les cèl·lules establement. 15 minuts després s'elimina la gota de poli-lisina, els pous es netegen amb aigua destil·lada i es deixen assecar.

Es dipositen 15 μ l de la suspensió de cèl·lules (vegeu punt 5.8.2) i es deixen 15 minuts sobre la poli-lisina, per permetre la seva unió, a temperatura ambient.

Acte seguit s'aspira el líquid des del centre del pou i es prossegueix amb una sèrie d'immersions amb l'objectiu d'exposar epítops altrament ocults, sense alterar la localització de les proteïnes. Es submergeix el portaobjecte primer en metanol a -20°C, durant 6 minuts, i després en acetona a -20°C, durant 30 segons. Finalment s'asseca el portaobjectes durant 3 minuts, a temperatura ambient.

Tot seguit, es bloquen amb albúmina sèrica bovina (BSA) els llocs enganxosos exposats, per tal de minimitzar la unió inespecífica dels anticossos i reduir el soroll de fons. Amb aquest objectiu les cèl·lules es cobreixen amb una gota de PBS (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,3) + 10 mg/ml de BSA. S'ha emprat BSA certificada lliure d'immunoglobulines (Sigma A7030) per minimitzar el soroll de fons per reaccions creuades dels anticossos. Les mostres s'incuben 15 minuts, a temperatura ambient.

S'aspira el tampó de bloqueig i s'afegeixen 15 µl d'anticòs primari (9E10 α-myc o 12CA5 α-HA, ambdós de Roche), a un concentració de 5 µg/ml en PBS + 10 mg/ml de BSA certificada lliure d'immunoglobulines. Les mostres s'incuben a temperatura ambient durant 1 hora, en una cambra saturada d'humitat per evitar que es concentri (senyals inespecífics) o s'evapori (mostra inservible) l'anticòs.

Passat el temps d'incubació s'aspira l'anticòs primari i es fan 3 rentats de 5 minuts amb PBS + 10 mg/ml BSA certificada lliure d'immunoglobulines.

Per últim, s'incuba la mostra amb 15 µl d'anticòs secundari (anti-IgG de ratolí acoblat al fluoròfor Alexa 488 (Invitogen)), diluït a 1:200 en PBS + 10 mg/ml BSA certificada lliure d'immunoglobulines. Les mostres s'incuben durant 1 hora, en la cambra saturada d'humitat, a 37°C, protegides de la llum.

Passat el temps d'incubació s'aspira l'anticòs secundari i es fan 3 rentats de 5 minuts amb PBS + 10 mg/ml BSA certificada lliure d'immunoglobulines, seguits d'un quart rentat amb PBS sense BSA.

5.8.4 Tinció amb DAPI

Per determinar la localització nuclear d'una proteïna els nuclis han estat tenyits amb la sonda intercalant fluorescent **4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)**, que presenta longituds d'ona d'excitació i d'emissió que no interfereixen significativament amb el senyal de l'Alexa 488 (anticòs secundari).

El DAPI s'ha inclòs a 0,5-0,7µg/ml en la solució de muntatge: 24 µg/ml DABCO (un agent que minimitza la destrucció del fluoròfor per la llum ultraviolada del microscopi), 50% glicerol en PBS.

5.8.5 Microscòpia

Les mostres es cobreixen amb un cobreobjectes i es segellen amb vernís d'ungles incolor de secat instantani per evitar que l'evaporació. A més, es protegeixen de la llum i, en el cas que no siguin analitzades immediatament, es conserven a la cambra freda.

Per a la visualització de les mostres s'ha utilitzat el microscopi òptic d'epifluorescència Leica DMRB, amb objectiu PI fluotar 100x/1.13 d'immersió.

El microscopi està acoblat a una càmera digital que permet l'adquisició d'imatges a diferents temps d'exposició,

6 Taula de Soques de *Saccharomyces cerevisiae* utilitzades

Nom	Genotip	Origen
W303-1a	MATa <i>ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	1
YGP4	W303-1a CLB6-13myc (KanMX6)	2
YGP6	W303-1a CLB5-13myc (KanMX6)	2
YGP7	W303-1a <i>rad53-21</i> CLB6-13myc (KanMX6)	2
YGP8	W303-1a <i>sml1Δ::URA3 rad53Δ::LEU2</i> CLB6-13myc	2
YGP10	W303-1a <i>sml1Δ::URA3</i> CLB6-13myc (KanMX6)	2
YGP11	W303-1a <i>clb6Δ::KanMX4</i>	2
YGP14	W303-1a <i>sml1Δ rad53Δ::LEU2</i>	2
YGP15	W303-1a <i>sml1Δ rad53Δ::LEU2</i> CLB6-13myc	2

Nom	Genotip	Origen
YGP17	W303-1a CLB6-13myc (KanMX6) <i>bar1Δ::URA3</i>	2
YGP18	W303-1a <i>sml1Δ rad53Δ::LEU2</i> CLB6-13myc <i>bar1Δ::URA3</i>	2
YGP19	W303-1a <i>sml1Δ bar1Δ::URA3</i>	2
YGP20	W303-1a <i>bar1Δ::URA3</i>	2
YGP23	W303-1a CLB5-13myc(KanMX6) <i>bar1Δ::URA3</i>	2
YGP24	W303-1a <i>sml1Δ rad53Δ::LEU2 bar1Δ::URA3</i>	2
YGP25	W303-1a <i>sml1Δ clb6Δ::KanMX4 bar1Δ::URA3</i>	2
YGP26	W303-1a <i>sml1Δ</i> CLB6-13myc (KanMX6) <i>bar1Δ::URA3</i>	2
YGP27	W303-1a CLB6-13myc (KanMX6) <i>bar1Δ</i>	2
YGP37	W303-1a <i>rad53-21</i> CLB6-13myc (KanMX6) <i>bar1Δ::URA3</i>	2
YGP38	W303-1a <i>rad53-21 bar1Δ::URA3</i>	2
YGP39	W303-1a SWI6-13myc (HIS3) <i>bar1Δ::URA3</i>	2
YGP40	W303-1a CLB6-3HA (KanMX6) <i>bar1Δ::URA3</i>	2
YGP41	W303-1a CLB6-3HA (KanMX6)	2
YGP42	W303-1a CLB6-3HA (KanMX6) SWI6-13myc (HIS3) <i>bar1Δ::URA3</i>	2
YGP44	W303-1a <i>rad53-21</i> SWI6-13myc (HIS3) <i>bar1Δ::URA3</i>	2
YGP45	W303-1a SWI6-13myc (HIS3) <i>sml1Δ bar1Δ::URA3</i>	2
YGP46	W303-1a SWI6-13myc (HIS3) <i>sml1Δ rad53Δ::LEU2 bar1Δ::URA3</i>	2
YGP54	W303-1a <i>dun1Δ::LEU2</i> CLB6-13myc (KanMX6) <i>bar1Δ::URA3</i>	2
YGP56	W303-1a <i>dun1Δ::LEU2 bar1Δ::URA3</i>	2
YGP58	W303-1α CLB6-13myc (KanMX6) <i>bar1Δ::URA3</i>	2
YGP61	W303-1a SWI6-13myc (HIS3) <i>sml1Δ::URA3 mec1Δ::LEU2</i>	2
YGP64	W303-1a <i>mec1Δ::LEU2</i> CLB6-13myc (KanMX6) <i>sml1Δ::URA3 bar1Δ</i>	2

Nom	Genotip	Origen
YGP65	W303-1a CLB6-13myc <i>bar1Δ</i> ::URA3	2
YGP67	W303-1a CLB6-13myc <i>bar1Δ</i> ::URA3 GAL1,10-HA-UBR1 (HIS3)	2
YGP68	W303-1a CLB6-13myc <i>bar1Δ</i> ::URA3 GAL1,10-HA-UBR1 (HIS3) 1myc- <i>mbp1-td</i> (KanMX6)	2
YGP69	W303-1a CLB6-13myc <i>bar1Δ</i> ::URA3 <i>mbp1Δ</i> :: KanMX4	2
YGP70	W303-1a CLB6-13myc (KanMX6) TRP1::GAL1,10-NRM1ΔN- 13myc::URA3 <i>bar1Δ</i>	2
YJT72	W303-1a <i>sml1Δ</i> ::URA3	5
YJT74	W303-1a <i>mec1Δ</i> ::LEU2 <i>sml1Δ</i> ::URA3	5
YJT75	W303-1a <i>rad53Δ</i> ::LEU2 <i>sml1Δ</i> ::URA3	5
<i>rad53-21</i>	W303-1a <i>rad53-21</i>	6
SBY510	W303-1a GAL-CLB6-3HA (LEU2) <i>bar1Δ</i>	7
SBY573	W303-1a GAL-CLB6Δ3P-3HA (LEU2) <i>bar1Δ</i>	7
YAT208	W303-1a SWI6-13myc(HIS3)	8
DC14	Tester strain Mat-1a <i>his1</i>	9
DC17	Tester strain Mat-1a <i>his1</i>	9
BY4741	Mat a <i>his3del1 leu2del0 met15del0 ura3del0</i>	3
<i>clb6Δ</i>	BY4741 <i>clb6Δ</i> ::KanMX4	4
<i>clb5Δ</i>	BY4741 <i>clb5Δ</i> ::KanMX4	4
<i>mbp1Δ</i>	BY4741 <i>mbp1Δ</i> ::KanMX4	4
CWY231	15Daub Mat a <i>ade1 leu2-3 112his2 trp1-1 ura3Δns bar1Δ</i>	10
CWY1821	CWY231 TRP1::GAL1,10-NRM1ΔN-13myc::URA3	10

Taula 2. Soques de *S. cerevisiae* utilitzades en aquest treball. L'origen de les soques és (1) Thomas and Rothstein (1989), (2) aquest treball, (3) Brachmann et al (1998); (4) Joaquin Ariño, (5) José Antonio Tercero, (6) Stephen Elledge (1997), (7) Steven Haase, (8) Steven Sedgwick, (9) J Hicks Cold Spring Harbor Laboratory; (10) Curt Wittenberg.

7 Taula d'oligonucleòtids utilitzats en aquest treball

Nom	Seqüència	Construcció / Soca
GST-Clb6 F	CGGATCCATGAATTGTATCCCTAGTCC	pGP3
GST-Clb6 R	CCGGTCGACTCAACGTTTTTGTTTACACC	pGP3
Clb6-myc/HA F	AAAAAGCCTAAACATGGCATGGTTTATTCAAGTTTTTGACT GGTGTAACAACAAAACGTCGGATCCCCGGGTAAATTA	YGP4,7,8,10, 15, 41
Clb6-myc/HA R	AATAATGCATTTTCTTTCTTTTTTTGAATACATAAAAAGAAATA AAGAAGTATGTCTATCGGAATTCGAGCTCGTTAAAC	YGP4,7,8,10, 15,41
Clb6delF	GCTTCACTAATCTAGCGTTC	YGP11
Clb6delR	AAGATGCAGGGGTTAGCTGG	YGP11
KanMX6del F	CGGCAGATCCGCTAGGGATAACAGGGTAATATAGATCTGTTT AGCTTGCCTCGTCCCCGCGCGGTATTTTCTCCTTACGC	YGP65
KanMX6del R	AATAATGCATTTTCTTTCTTTTTTTGAATACATAAAAAGAAATA AAGAAGTATGTCTATCGAGATTGTACTGAGAGTGCAC	YGP65
Clb5-myc/HA F	ACTTTCAAGTGGTGACATCCGAAATGCATAGCAACTTTCAAA ATCTATTTAATCTTAAGCGGATCCCCGGGTAAATTA	YGP6
Clb5-myc/HA R	ACATATATATAGATAGATAGATAGATGCAAAAAATTTTTTCTT TTAGTTCAGCAAAAAGGAATTCGAGCTCGTTAAAC	YGP6
dun1del F	TAGTCGAGAGTAACAAGTAAAGGGGCTTAACATACAGTAAAA AAGGCAATTATAGTGAAG	YGP54, 56
dun1del R	AAATAGATACTTGGAAAAATCCAGATTCAAACAATGTTTTTGA AATAATGCTTCTCATGTGATTGTACTGAGAGTGCA	YGP54, 56
dun1del Chk F	TACGTGACGCGACGCGTTTGTTTAC	YGP54, 56
dun1del Chk R	AGAGCTGCAGGAGAAAGTAG	YGP54, 56
Swi6-myc F	CGCCAATCTCCTTCTTAAACG	YGP42,44,45, 46 i 61
Swi6-myc R	CGTTCGATTTTGAGCGACGCG	YGP42,44,45, 46i 61
mbp1-td F	AAAATAAAGCCCATTGTAATTCATATAACTAAACATCATATCA AGTGCGATTGGTCTGCAATTAAGGCGCGCCAGATCTG	YGP68

Nom	Seqüència	Construcció / Soca
mbp1-td R	ATGAATGAATTCATAAACATCAACCCCGAATATCTCGCTGAG TATATTTGGTTAGACATGGCACCCGCTCCSGCGCCTG	YGP68
mbp1-td Chk F	AACTACTCACCAGTAGTAGTTG	YGP68
mbp1-td Chk R	TTTGAAATTGATTTTCCTCGG	YGP68
mbp1del F	TGCACAAGATTGAGCCATCG	YGP69
mp1del R	CGGTGGTAAAGTCTTACCTC	YGP69
mbp1del Chk F	CTGGTATTCCACATGTTTCAGC	YGP69
mbp1del Chk R	TGACGACGTTGAAGTTAAGG	YGP69
NRM1ΔN F	GAATTCGAGCTCGTTTAAAC	YGP70
NRM1ΔN R	GAATTCGAGCTCGTTTAAAC	YGP70

Taula 3. Oligonucleòtids utilitzats en aquest treball. Les seqüències en minúscula mostren les bases que s'anellen al DNA motlle. Les seqüències en majúscules corresponen a les cues necessàries per integrar el producte de PCR en el genoma o per subclonar-lo.

RESULTATS

1 La ciclina de fase S Clb6 és una diana del mecanisme de vigilància de la fase S

El mecanisme de vigilància de la fase S respon a estrès genotòxic durant la fase S (vegeu Introducció punt 4.2.1). Dues activitats quinasa són essencials en aquesta fase, DDK i CDK-S (vegeu Introducció punt 3.3), i per tant constitueixen dianes raonables de la resposta checkpoint. Si bé la regulació de DDK ha estat estudiada a aquest nivell (Weinreich and Stillman 1999), no existeixen estudis sobre el possible control de CDK-S en resposta a estrès genotòxic. No és possible inhibir completament l'activitat CDK-S durant la fase S, ja que això comporta el re-assemblatge dels orígens de replicació i la posterior generació d'instabilitat genòmica per re-replicació (Broek, Bartlett et al. 1991; Hayles, Fisher et al. 1994; Dahmann, Diffley et al. 1995). Això però, no exclou la possibilitat que el checkpoint actuï modificant l'especificitat de l'activitat CDK-S pels seus substrats. Partint d'aquesta idea vam decidir explorar si les ciclines promotores de la fase S són dianes del mecanisme de vigilància de la fase S.

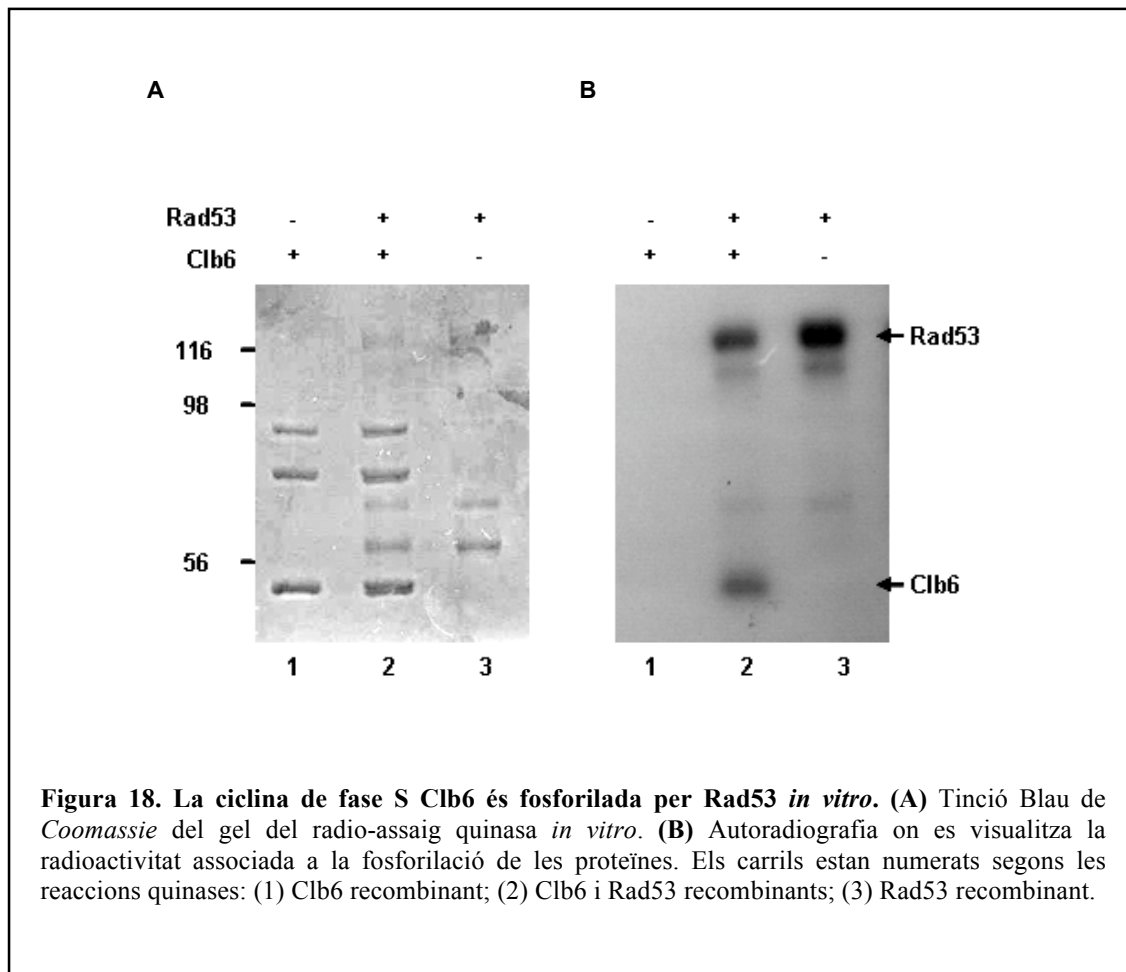
1.1 Clb6 és fosforilada per Rad53 *in vitro*

Per determinar si Clb6 és substrat de Rad53, vam estudiar si aquesta ciclina és fosforilada per Rad53 en un radio-assaig quinasa *in vitro*. Amb anterioritat havíem comprovat l'especificitat d'aquest sistema per identificar substrats de Rad53, havent donat fins al moment com a positius només veritables substrats *in vivo*.

Per dur a terme el radio-assaig quinasa *in vitro* prèviament vam obtenir les proteïnes Rad53 i Clb6 recombinants (vegeu Materials i Mètodes punts 5.6 i 5.7). La sobreexpressió de Rad53 en *E. coli* dona lloc a la seva forma hiperfosforilada activa (vegeu Introducció punt 4.2) (Pelliccioli, Lucca et al. 1999; Travesa, Duch et al. 2008).

Vam dur a terme el radio-assaig quinasa *in vitro* amb 1 µg de cadascuna de les proteïnes recombinants (vegeu Materials i Mètodes punt 5.4). Com a controls de l'especificitat de la reacció quinasa *in vitro*, vam incloure una reacció amb substrat sol sense quinasa, i una altra reacció amb quinasa sola sense substrat.

Com es pot veure a la Figura 18B, carril 2, en presència de Rad53 i Clb6 apareixen dues bandes de fosforilació a l'autoradiografia: una banda superior d'uns 115 kDa corresponent a l'autofosforilació de Rad53 i, una banda d'uns 45 kDa, corresponent a Clb6 fosforilat. El carril 1, amb Clb6 i sense Rad53, no mostra cap banda a l'alçada de la ciclina; per tant, la fosforilació de Clb6 no és deguda a cap quinasa inespecíficament co-purificada amb Clb6. Per altra banda, el carril 3, en presència de Rad53 i sense Clb6, sols s'observa la banda de autofosforilació corresponent a Rad53; per tant, la fosforilació de la Clb6 per Rad53 (vegeu carril 2) no es deguda a una proteïna inespecíficament co-purificada amb Rad53.



Aquest resultat mostra que Clb6 és substrat de Rda53 *in vitro*.

1.2 Els nivells de Clb6 són estabilitzats en resposta a estrès replicatiu *in vivo*

A la vista del resultat obtingut amb el radio-assaig quinasa *in vitro*, vam voler estudiar si Clb6 és diana de Rad53 *in vivo*. Per això, vam decidir comparar el comportament d'aquesta ciclina en una fase S no pertorbada respecte una fase S compromesa per estrès genotòxic.

Cultius en creixement exponencial van ser sincronitzats en fase G1 amb la feromona α -factor, i després alliberats de forma sincrònica a una fase S en absència o en presència de 200 mM d'hidroxiurea (HU). L'HU genera estrès replicatiu, amb la consegüent activació del mecanisme de vigilància de la fase S (vegeu Materials i Mètodes punts 2.3, 3.3 i 3.4). A partir d'aquí es van obtenir alíquotes durant aproximadament un temps de generació, en intervals de 10 minuts. Aquestes alíquotes, es van usar per dur a terme l'anàlisi electroforètica de Clb6 i Rad53 (immunoblots) (vegeu Materials i Mètodes punts 5.1, 5.2 i 5.3), així com per l'anàlisi de la progressió del cicle cel·lular mitjançant l'índex de gemmació i la progressió del contingut de DNA per citometria de flux (FACS) (vegeu Materials i Mètodes punt 3.9).

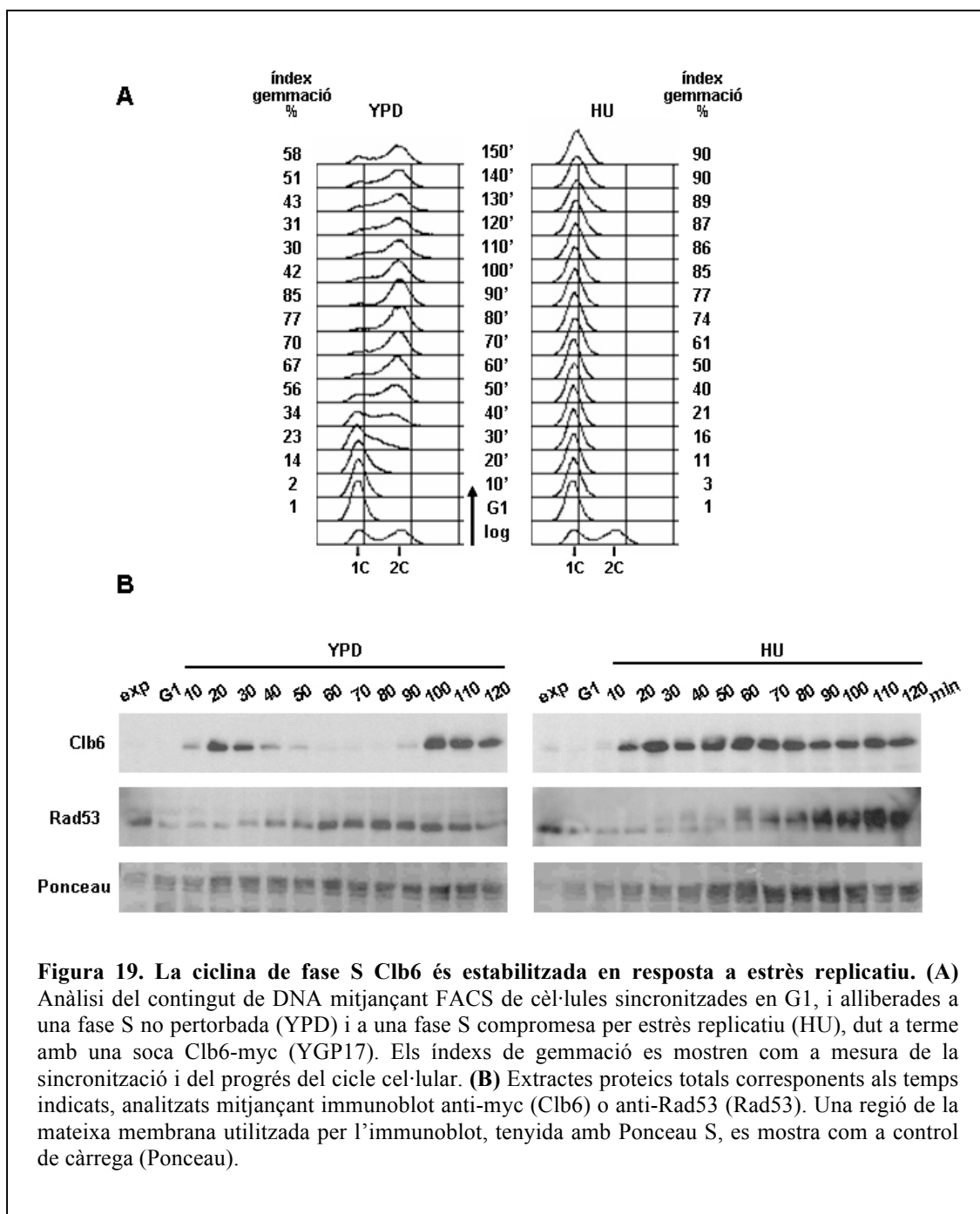
Com s'observa a la Figura 19A, les cèl·lules van ser correctament sincronitzades a fase G1, d'acord al contingut 1C de DNA que s'observa en la citometria de flux i a l'índex de gemmació. Per altra banda, les cèl·lules van ser després correctament alliberades, i de forma sincrònica, a fase S, tal com indiquen la progressió de l'índex de gemmació i, en el cas de les cèl·lules alliberades a una fase S no pertorbada, la progressió del contingut de DNA des de 1C a 2C.

L'aparició d'estrès replicatiu generat amb HU és controlada tant per la no progressió del contingut de DNA (Figura 19A, HU), com per l'aparició de la forma hiperfosforilada activa de Rad53 (Figura 19B, HU) (vegeu Introducció punt 4.2).

Pel que fa a la ciclina Clb6, mentre que en una fase S no pertorbada Clb6 desapareix aproximadament a mitja fase S (Figura 19, YPD), en una fase S compromesa per estrès replicatiu la presència de Clb6 es manté al llarg de tota la durada de l'experiment. De

produir-se fosforilació de Clb6 per Rad53, com l'observada *in vitro*, o algun altre tipus de modificació post-traduccional en resposta a estrès replicatiu, no es reflexa en un canvi en la mobilitat electroforètica detectable a les condicions emprades.

La desaparició de Clb6 en fase S, en comptes de fase M com la resta de ciclines tipus CLB (vegeu Introducció punts 2.3 i 3.4), confirma el comportament específic de Clb6 descrit pel laboratori d'Steven Haase durant la realització del treball d'aquesta tesi doctoral (Jackson, Reed et al. 2006). Clb6 reapareix aproximadament als 100 minuts de l'experiment, quan les cèl·lules ja s'han dividit i es troben a la següent transició G1-S.



Aquest resultat mostra que la ciclina de fase S Clb6 és estabilitzada *in vivo* en resposta a estrès replicatiu.

Comparació amb Clb5

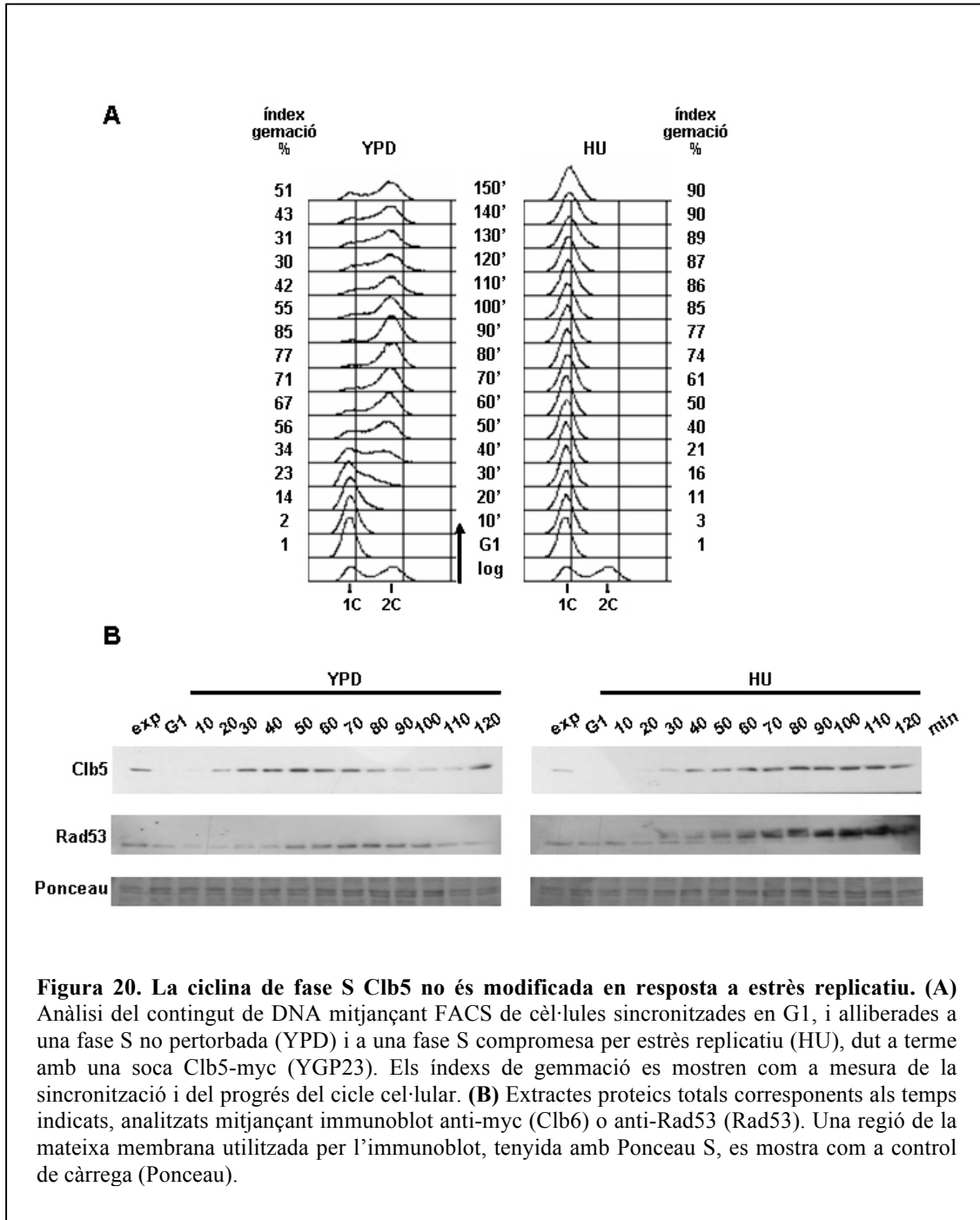
A la vista del comportament de Clb6 en una fase S compromesa per estrès replicatiu, vam decidir estudiar si l'altra ciclina de fase S, Clb5, presenta el mateix comportament.

Cultius en creixement exponencial van ser sincronitzats en fase G1 amb la feromona α -factor, i després alliberats de forma sincrònica a una fase S en absència o en presència de 200 mM d'hidroxiurea (HU). L'HU genera estrès replicatiu, amb la consegüent activació del mecanisme de vigilància de la fase S (vegeu Materials i Mètodes punt 2.3, 3.3 i 3.4). A partir d'aquí es van obtenir alíquotes durant aproximadament un temps de generació, en intervals de 10 minuts. Aquestes alíquotes es van usar per dur a terme l'anàlisi electroforètica de Clb5 i Rad53 (immunoblots) (vegeu Materials i Mètodes punts 5.1, 5.2 i 5.3), així com per l'anàlisi de la progressió del cicle cel·lular mitjançant l'índex de gemmació i la progressió del contingut de DNA per citometria de flux (FACS) (vegeu Materials i Mètodes punt 3.9).

Com s'observa a la Figura 20A, les cèl·lules van ser correctament sincronitzades a fase G1, d'acord al contingut 1C de DNA que s'observa en la citometria de flux i a l'índex de gemmació. Per altra banda, les cèl·lules van ser després correctament alliberades, i de forma sincrònica, a fase S, tal com indiquen la progressió de l'índex de gemmació i, en el cas de les cèl·lules alliberades a una fase S no pertorbada, la progressió del contingut de DNA des de 1C a 2C.

L'aparició d'estrès replicatiu generat amb HU és controlada tant per la no progressió del contingut de DNA (Figura 20A, HU), com per l'aparició de la forma hiperfosforilada activa de Rad53 (Figura 20B, HU) (vegeu Introducció punt 4.2).

Pel que fa a la ciclina Clb5 no s'observen diferències en una fase S compromesa per estrès replicatiu respecte una fase S no pertorbada: ni en els nivells de proteïna, ni pel que fa a alteracions en la mobilitat electroforètica detectable a les condicions emprades (Figura 20B). El manteniment dels nivells de Clb5 observats en HU és en aquest cas degut a la inhibició de la progressió de la mitosi, i a la inhibició d'APC pel mecanisme de vigilància de la fase S (vegeu Introducció punt 4.2.1).



1.3 L'estabilització dels nivells de Clb6 en resposta a estrès replicatiu és dependent de Rad53 i de Mec1

L'estabilització de Clb6 es produeix en condicions d'estrès replicatiu, que activen el mecanisme de vigilància de la fase S. Per tal de determinar si aquesta estabilització és mediada pel checkpoint, es va estudiar la seva dependència respecte les quinases centrals Mec1 i Rad53.

1.3.1 L'estabilització de Clb6 en resposta a estrès replicatiu es correlaciona amb la forma activada de Rad53

Per tal d'explorar si l'estabilització de Clb6 en resposta a estrès replicatiu depèn de l'activació del mecanisme de vigilància de la fase S, vam estudiar en primer lloc la correlació entre l'estabilització de Clb6 i l'activació de Rad53 en un experiment de recuperació d'estrès replicatiu.

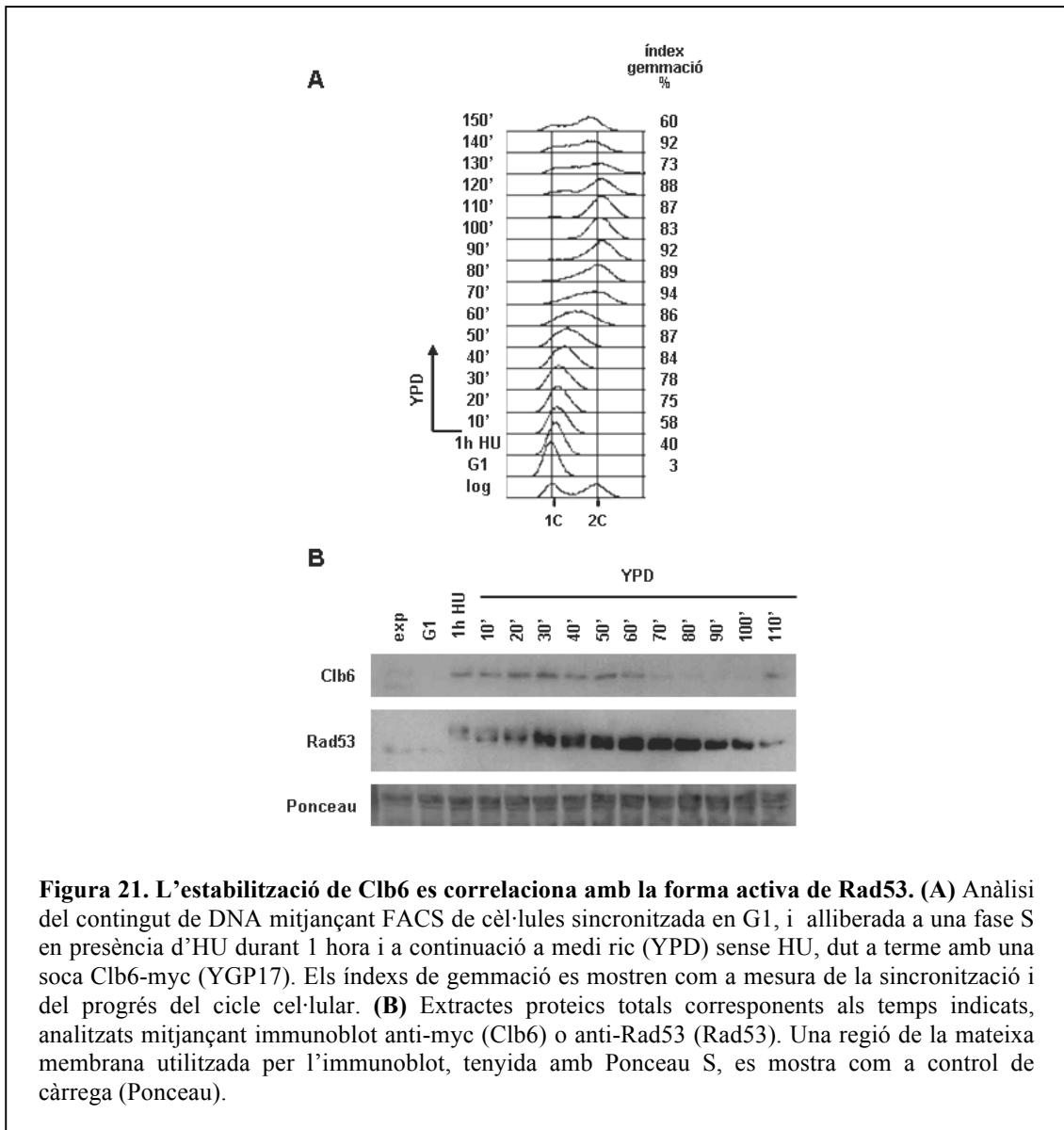
Cultius en creixement exponencial van ser sincronitzats en fase G1 amb la feromona α -factor, i després alliberats de forma sincrònica a una fase S en presència de 200 mM d'hidroxiurea (HU) durant 1 hora, a fi d'activar el mecanisme de vigilància de la fase S i d'estabilitzar Clb6. A continuació es va eliminar l'HU, permetent la recuperació de l'estrès replicatiu i la inactivació de Rad53 (vegeu Materials i Mètodes punt 3.5). A partir d'aquí es van obtenir alíquotes durant aproximadament un temps de generació, en intervals de 10 minuts. Aquestes alíquotes es van usar per dur a terme l'anàlisi electroforètica de Clb6 i Rad53 (immunoblots) (vegeu Materials i Mètodes punts 5.1, 5.2 i 5.3), així com per l'anàlisi de la progressió del cicle cel·lular mitjançant l'índex de gemmació i la progressió del contingut de DNA per citometria de flux (FACS) (vegeu Materials i Mètodes punt 3.9).

Com s'observa a la Figura 21, les cèl·lules van ser correctament sincronitzades a fase G1, d'acord al contingut 1C de DNA que s'observa en la citometria de flux i a l'índex de gemmació. Per altra banda, les cèl·lules van ser després correctament alliberades, i de forma sincrònica, a fase S, tal com indica la progressió de l'índex de gemmació. La generació d'estrès replicatiu en presència d'HU impedeix la progressió de la replicació

(Figura 21A) i dóna lloc a l'aparició de la forma hiperfosforilada activa de Rad53 (Figura 21B). Un cop transferides les cèl·lules a medi ric sense HU, per tal de permetre la recuperació de l'estrès replicatiu, s'observa la progressió del contingut de DNA des de 1C a 2C, i la posterior divisió cel·lular.

Pel que fa a la ciclina Clb6, és estabilitzada en presència d'HU, tal i com ja s'havia observat (vegeu punt 1.2). En aquestes condicions Rad53 mostra el desplaçament característic del seu estat hiperfosforilat actiu. En retirar l'HU, Rad53 torna de forma progressiva al seu estat hipofosforilat, inactiu (vegeu Introducció punt 4.2).

La desaparició de Clb6 en retirar l'HU (Figura 21B) es produeix quan les cèl·lules han superat l'estrès replicatiu i assoleixen un contingut de DNA similar al del punt en que Clb6 desapareix en una fase S no pertorbada. La desaparició de Clb6 es correlaciona amb la desfosforilació de Rad53, la qual cosa és compatible amb la implicació de Rad53 en l'estabilització de Clb6 en resposta a estrès genotòxic.



1.3.2 L'estabilització en resposta a estrès replicatiu és dependent de Rad53

La correlació entre la desaparició de Clb6 i la inactivació de Rad53 suggereix, però no demostra, que l'estabilització de Clb6 en resposta estrès genotòxic sigui mediada per Rad53. Per tal de comprovar si l'estabilització de Clb6 en resposta a estrès replicatiu és dependent de Rad53, vam estudiar el comportament de Clb6 en soques mutants *rad53*.

Al marge de la seva funció en el mecanisme de vigilància de la fase S, Rad53 juga un paper essencial com a regulador de Sml1, un inhibidor de l'activitat ribonucleòtid reductasa (Zhao, Muller et al. 1998), essencial en la síntesi de dNTPs. Per aquest motiu la deleció *rad53Δ* és letal, i és necessari combinar-la amb *sml1Δ* (Zhao, Georgieva et al. 2000).

Cultius en creixement exponencial de la soca *rad53Δ sml1Δ* i de la corresponent soca control (*sml1Δ*) van ser sincronitzats en fase G1 amb la feromona α -factor, i després alliberats de forma sincrònica a una fase S en absència o en presència de 200 mM d'hidroxiurea (HU). L'HU genera estrès replicatiu, amb la consegüent activació del mecanisme de vigilància de la fase S (vegeu Materials i Mètodes punts 2.3, 3.3 i 3.4). A partir d'aquí es van obtenir alíquotes durant aproximadament un temps de generació, en intervals de 10 minuts. Aquestes alíquotes es van usar per dur a terme l'anàlisi electroforètica de Clb6 i Rad53 (immunoblots) (vegeu Materials i Mètodes punts 5.1, 5.2 i 5.3), així com per l'anàlisi de la progressió del cicle cel·lular mitjançant l'índex de gemmació i la progressió del contingut de DNA per citometria de flux (FACS) (vegeu Materials i Mètodes punt 3.9).

Com s'observa a la Figura 22A, les cèl·lules van ser correctament sincronitzades a fase G1, d'acord al contingut 1C de DNA que s'observa en la citometria de flux i a l'índex de gemmació. Per altra banda, les cèl·lules van ser després correctament alliberades, i de forma sincrònica, a fase S, tal com indiquen la progressió de l'índex de gemmació i, en el cas de les cèl·lules alliberades a una fase S no pertorbada, la progressió del contingut de DNA des de 1C a 2C.

L'aparició d'estrès replicatiu generat amb HU és controlada tant per la no progressió del contingut de DNA (Figura 22A, HU), com per l'aparició de la forma hiperfosforilada activa de Rad53 (Figura 22B, HU) (vegeu Introducció punt 4.2).

Pel que fa a Clb6, en un cicle no pertorbat (Figura 22, YPD) no s'observen diferències en la cinètica d'aparició-desaparició de la ciclina entre la soca mutant *rad53Δ sml1Δ* i la soca control *sml1Δ* (Figura 22B).

Per altra banda, en una fase S compromesa per estrès replicatiu, mentre que en la soca control *sml1Δ* la presència de Clb6 es manté al llarg de tot l'experiment (Figura 22B, *sml1Δ*, HU), la soca mutant *rad53Δ sml1Δ* és incapaç d'estabilitzar Clb6, que desapareix seguint una cinètica comparable a la d'un cicle no pertorbat (Figura 22B, *rad53Δ sml1Δ*, HU).

Aquest resultat suggereix que l'estabilització de Clb6 en resposta a estrès replicatiu depèn, directa o indirectament, de Rad53.

Malgrat tot, aquest experiment no permet descartar que la no estabilització de Clb6 en resposta a estrès replicatiu sigui fruit de la combinació de les delecions *rad53Δ* i *sml1Δ*. Per aquest motiu vam portar a terme el mateix estudi amb el mutant hipomòrfic *rad53-21*. El mutant *rad53-21*, malgrat presentar un defecte en la resposta a estrès genotòxic comparable a les soques nul·les per RAD53 (Allen, Zhou et al. 1994), manté la capacitat de control sobre Sml1, la qual cosa permet treballar en un fons SML1.

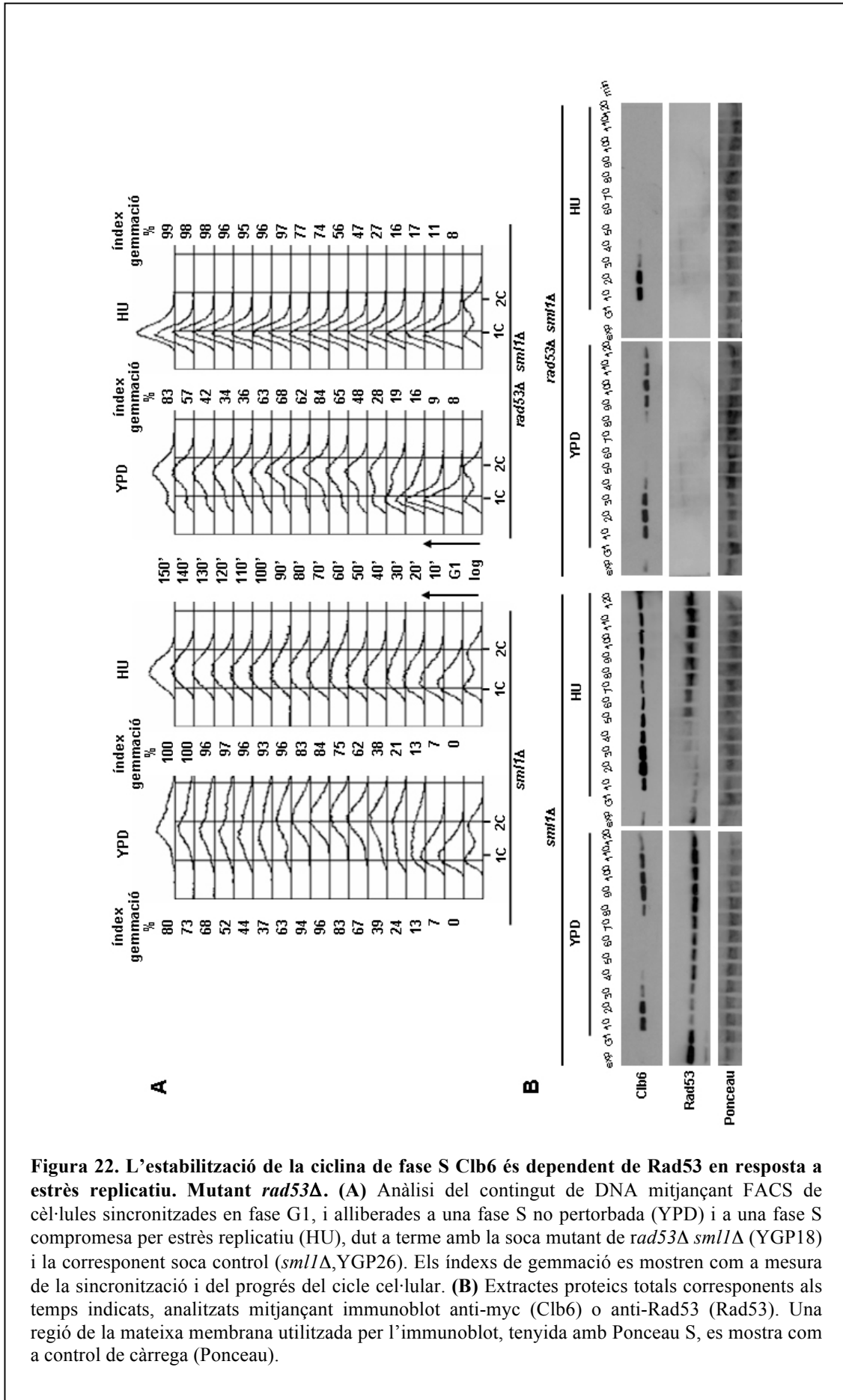


Figura 22. L'estabilització de la ciclina de fase S Clb6 és dependent de Rad53 en resposta a estrès replicatiu. Mutant *rad53Δ*. (A) Anàlisi del contingut de DNA mitjançant FACS de cèl·lules sincronitzades en fase G1, i alliberades a una fase S no pertorbada (YPD) i a una fase S compromesa per estrès replicatiu (HU), dut a terme amb la soca mutant de *rad53Δ smt1Δ* (YGP18) i la corresponent soca control (*smt1Δ*, YGP26). Els índexs de gemmació es mostren com a mesura de la sincronització i del progrés del cycle cel·lular. **(B)** Extractes proteics totals corresponents als temps indicats, analitzats mitjançant immunoblot anti-myc (Clb6) o anti-Rad53 (Rad53). Una regió de la mateixa membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Ponceau).

Cultius en creixement exponencial de la soca *rad53-21* i de la corresponent soca control salvatge van ser sincronitzats en fase G1 amb la feromona α -factor, i després alliberats de forma sincrònica a una fase S en absència o en presència de 200 mM d'hidroxiurea (HU). L'HU genera estrès replicatiu, amb la consegüent activació del mecanisme de vigilància de la fase S (vegeu Materials i Mètodes punts 2.3, 3.3 i 3.4). A partir d'aquí es van obtenir alíquotes durant aproximadament un temps de generació, en intervals de 10 minuts. Aquestes alíquotes es van usar per dur a terme l'anàlisi electroforètica de Clb6 i Rad53 (immunoblots) (vegeu Materials i Mètodes punts 5.1, 5.2 i 5.3), així com per l'anàlisi de la progressió del cicle cel·lular mitjançant l'índex de gemmació i la progressió del contingut de DNA per citometria de flux (FACS) (vegeu Materials i Mètodes punt 3.9).

Com s'observa a la Figura 23A, les cèl·lules van ser correctament sincronitzades a fase G1, d'acord al contingut 1C de DNA que s'observa en la citometria de flux i a l'índex de gemmació. Per altra banda, les cèl·lules van ser després correctament alliberades, i de forma sincrònica, a fase S, tal com indiquen la progressió de l'índex de gemmació i, en el cas de les cèl·lules alliberades a una fase S no pertorbada, la progressió del contingut de DNA des de 1C a 2C.

L'aparició d'estrès replicatiu generat amb HU és controlada tant per la no progressió del contingut de DNA (Figura 23A, HU), com per l'aparició de la forma hiperfosforilada activa de Rad53 (Figura 23B, HU) (vegeu Introducció punt 4.2).

Pel que fa a la ciclina Clb6, en un cicle no pertorbat (Figura 23, YPD) no s'observen diferències entre les dues soques, salvatge i *rad53-21*, ni en la cinètica d'aparició-desaparició (Figura 23B, YPD) de Clb6, ni en la progressió de la replicació (Figura 23A, YPD).

Per altra banda, en una fase S compromesa per estrès replicatiu, mentre que en la soca salvatge la presència de Clb6 es manté al llarg de tot l'experiment (Figura 23B, WT, HU), en la soca mutant *rad53-21* Clb6 desapareix (Figura 23B, *rad53-21*, HU) seguint una cinètica similar a l'observada en una soca salvatge en una fase S no pertorbada.

Aquest resultat descarta, per tant, que la pèrdua de capacitat d'estabilització de Clb6 en resposta a estrès replicatiu observada en el mutant *rad53Δ sml1Δ* sigui fruit de la combinació de les dues delecions, i indica que l'estabilització de Clb6 en resposta a estrès replicatiu depèn, directa o indirectament, de Rad53.

1.3.3 L'estabilització en resposta a estrès replicatiu és dependent de Mec1

L'estabilització de Clb6 en resposta a estrès replicatiu és dependent de Rad53, la quinasa efectora del mecanisme de vigilància de la fase S. Donat que Rad53 és activat per Mec1, la quinasa transductora central del checkpoint, vam voler confirmar la dependència de Mec1 en l'estabilització de Clb6 en resposta a estrès genotòxic. Per això, vam estudiar el comportament de Clb6 en el mutant *mec1Δ* en una fase S compromesa per estrès replicatiu respecte una fase S no pertorbada.

Cultius en creixement exponencial de la soca *mec1Δ sml1Δ* i de la corresponent soca control (*sml1Δ*) (igual que en el cas de Rad53 (vegeu punt 1.3.2), la deleció *sml1Δ* és necessària per mantenir la viabilitat dels mutants *mec1Δ* (Zhao, Muller et al. 1998; Zhao, Chabes et al. 2001), van ser sincronitzats en fase G1 amb la feromona α -factor, i després alliberats de forma sincrònica a una fase S en absència o en presència de 200 mM d'hidroxiurea (HU). L'HU genera estrès replicatiu, amb la consegüent activació del mecanisme de vigilància de la fase S (vegeu Materials i Mètodes punts 2.3, 3.3 i 3.4). A partir d'aquí es van obtenir alíquotes durant aproximadament un temps de generació, en intervals de 10 minuts. Aquestes alíquotes es van usar per dur a terme l'anàlisi electroforètica de Clb6 i Rad53 (immunoblots) (vegeu Materials i Mètodes punts 5.1, 5.2 i 5.3), així com per l'anàlisi de la progressió del cicle cel·lular mitjançant l'índex de gemmació i la progressió del contingut de DNA per citometria de flux (FACS) (vegeu Materials i Mètodes punt 3.9).

Com s'observa a la Figura 24A, les cèl·lules van ser correctament sincronitzades a fase G1, d'acord al contingut 1C de DNA que s'observa en la citometria de flux i a l'índex de gemmació. Per altra banda, les cèl·lules van ser després correctament alliberades, i de forma sincrònica, a fase S, tal com indiquen la progressió de l'índex de gemmació i, en el cas de les cèl·lules alliberades a una fase S no pertorbada, la progressió del contingut de DNA des de 1C a 2C.

L'aparició d'estrès replicatiu generat amb HU és controlada tant per la no progressió del contingut de DNA (Figura 24A, HU), com per l'aparició de la forma hiperfosforilada activa de Rad53 (Figura 24B, HU) (vegeu Introducció punt 4.2).

Pel que fa a la ciclina Clb6, mentre que en una fase S compromesa per estrès replicatiu en la soca control *sml1Δ* la presència de Clb6 es manté estable al llarg de tot l'experiment (Figura 24B, *sml1Δ*, HU), en la soca mutant *mec1Δ sml1Δ* no, essent el mutant *mec1Δ sml1Δ* incapaç d'estabilitzar els nivells de Clb6 (Figura 24B, *rad53Δ sml1Δ*, HU).

La desaparició de Clb6 en el mutant *mec1Δ sml1Δ* no és tan dràstica com en els mutants *rad53* (vegeu Figures 23 i 24). Mentre que en els mutants *rad53* la desaparició de Clb6 es produeix als 30-40 minuts després d'alliberar d' α -factor, igual que en una fase S no pertorbada, en el mutant *mec1Δ* la ciclina és detectable fins als 90 minuts (Figura 24A, *mec1Δ sml1Δ*, HU). No obstant, el comportament de Clb6 ja apareix alterat en el mutant *mec1Δ* en una fase S no pertorbada, mostrant una major estabilitat de Clb6 (Figura 24A, *mec1Δ sml1Δ*, YPD).

Aquest resultat mostra que l'estabilització de Clb6 en resposta a estrès replicatiu és també dependent de Mec1.

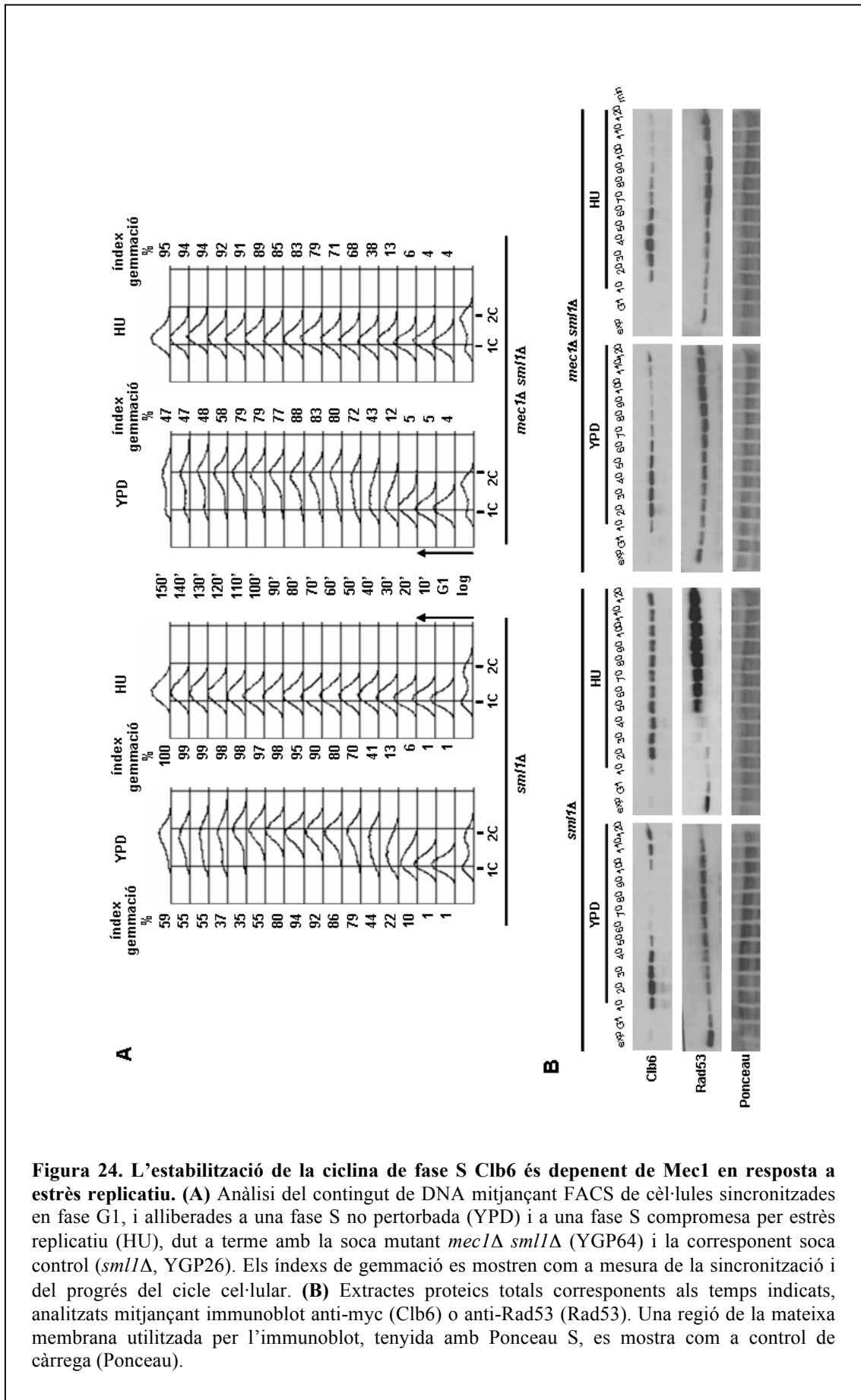


Figura 24. L'estabilització de la ciclina de fase S Clb6 és dependent de Mec1 en resposta a estrès replicatiu. (A) Anàlisi del contingut de DNA mitjançant FACS de cèl·lules sincronitzades en fase G1, i alliberades a una fase S no perturbada (YPD) i a una fase S compromesa per estrès replicatiu (HU), dut a terme amb la soca mutant *mec1Δ smIIΔ* (YGP64) i la corresponent soca control (*smIIΔ*, YGP26). Els índexs de gemmació es mostren com a mesura de la sincronització i del progrés del cycle cel·lular. **(B)** Extractes proteics totals corresponents als temps indicats, analitzats mitjançant immunoblot anti-myc (Clb6) o anti-Rad53 (Rad53). Una regió de la mateixa membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Ponceau).

1.4 Els nivells de Clb6 són estabilitzats també en resposta a dany al DNA en forma dependent de Rad53

Per determinar si l'estabilització de Clb6 de forma dependent de Rad53 és exclusiva de la resposta a estrès replicatiu, o si pel contrari, és una resposta generalitzable a altres tipus d'estrès genotòxic, vam estudiar el comportament de Clb6 en resposta a dany per metilació del DNA en el mutant *rad53-21*.

Cultius en creixement exponencial de la soca *rad53-21* i de la corresponent soca control salvatge van ser sincronitzats en fase G1 amb la feromona α -factor, i després alliberats de forma sincrònica a una fase S en absència o en presència de 0,033% (v/v) metilmetanosulfonat (MMS). L'MMS genera dany per metilació al DNA, amb la consegüent activació del mecanisme de vigilància de la fase S (vegeu Materials i Mètodes punt 2.3, 3.3 i 3.4). A partir d'aquí es van obtenir alíquotes durant aproximadament un temps de generació, en intervals de 10 minuts. Aquestes alíquotes es van usar per dur a terme l'anàlisi electroforètica de Rad53 i Clb6 (immunoblots) (vegeu Materials i Mètodes punts 5.1, 5.2 i 5.3), així com per l'anàlisi de la progressió del cicle cel·lular mitjançant l'índex de gemmació i la progressió del contingut de DNA per citometria de flux (FACS) (vegeu Materials i Mètodes punt 3.9).

Com s'observa a la Figura 25A, les cèl·lules van ser correctament sincronitzades a fase G1, d'acord al contingut 1C de DNA que s'observa en la citometria de flux i a l'índex de gemmació. Per altra banda, les cèl·lules van ser després correctament alliberades, i de forma sincrònica, a fase S, tal com indiquen la progressió de l'índex de gemmació i, en el cas de les cèl·lules alliberades a una fase S no pertorbada, la progressió del contingut de DNA des de 1C a 2C.

En la soca control salvatge la presència de dany al DNA dóna lloc a l'alentiment de la progressió de la replicació del DNA degut al bloqueig dels orígens de replicació pel mecanisme de vigilància de la fase S (Figura 25A, MMS) (vegeu Introducció punt 4.2.1), així com per l'aparició de la forma hiperfosforilada, activa de Rad53 (Figura 25B, MMS) confirma la generació de dany al DNA (vegeu Introducció punt 4.2). En el cas de la soca mutant *rad53-21* no és possible visualitzar l'efecte de la presència de dany al DNA: aquest

mutant és incapaç d'activar-se per hiperfosforilació (Alcasabas, Osborn et al. 2001), i el defecte en la resposta checkpoint fa que la replicació progressi sense control, al mateix ritme que en absència de dany al DNA (Paulovich and Hartwell 1995; Tercero and Diffley 2001). A aquest respecte cal dir que el cultiu *rad53-21* ha estat alliberat en la mateixa preparació de medi + MMS que el cultiu control salvatge.

Pel que fa a la ciclina Clb6 en la soca control salvatge, mentre que en una fase S no pertorbada Clb6 desapareix aproximadament a mitja fase S (Figura 25, WT, YPD), en una fase S compromesa per dany al DNA la presència de Clb6 es manté al llarg de tota la durada de l'experiment (Figura 25, WT, HU). De produir-se fosforilació de Clb6 per Rad53, com l'observada *in vitro*, o algun altre tipus de modificació post-traducciona en resposta a dany al DNA, no es reflexa en un canvi en la mobilitat electroforètica detectable a les condicions emprades.

Aquest resultat (Figura 25), unit als anteriors (vegeu punt 1.2, Figura 19), indica que l'estabilització de Clb6 és una resposta general a estrès genotòxic.

En el cas del mutant *rad53-21*, en un cicle no pertorbat (Figura 25, YPD) no s'observen diferències ni en la cinètica d'aparició-desaparició de la ciclina entre aquesta soca mutant i la soca control salvatge (Figura 25B, YPD), ni en la progressió de la replicació (Figura 25A, YPD). Per altra banda, en una fase S compromesa per dany al DNA, mentre que en la soca control salvatge la presència de Clb6 es manté al llarg de tot l'experiment (Figura 25B, WT, MMS), la soca mutant *rad53-21* és incapaç d'estabilitzar Clb6. Si bé, la cinètica de desaparició de Clb6 en el mutant *rad53-21* no és idèntica a la observada en aquesta mateixa soca amb un cicle no pertorbat, acaba desapareixent (Figura 25B, *rad53-21* YPD vs MMS). Una possibilitat és que el mutant *rad53-21*, que és hipomòrfic, mantingui una certa capacitat d'estabilització de Clb6 en resposta a dany al DNA, però no en resposta a estrès replicatiu.

En qualsevol cas, aquest resultat suggereix que, a l'igual que en resposta a estrès replicatiu, l'estabilització de Clb6 en resposta a dany al DNA per metilació també depèn, directa o indirectament, de Rad53.

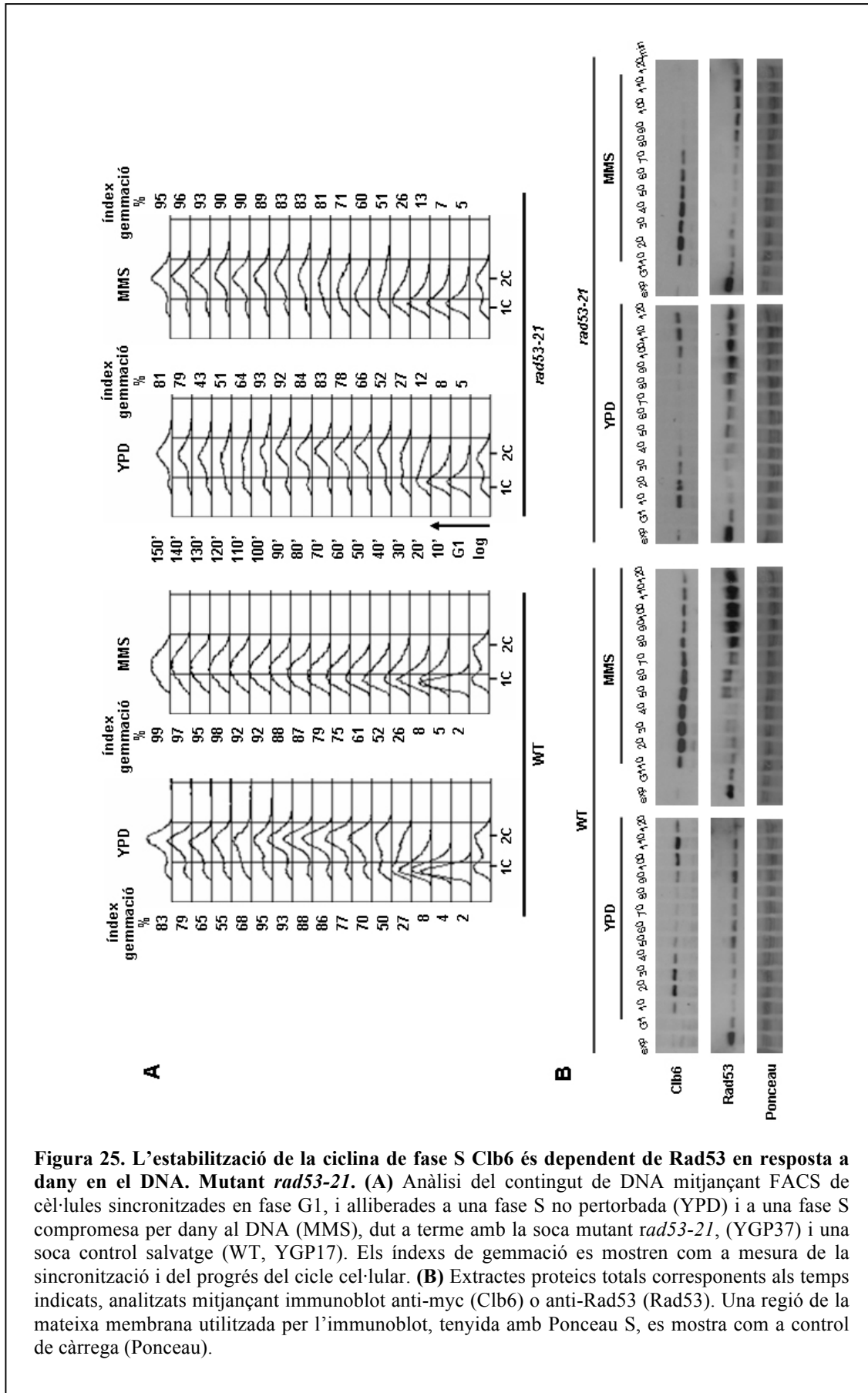


Figura 25. L'estabilització de la ciclina de fase S Clb6 és dependent de Rad53 en resposta a dany en el DNA. Mutant *rad53-21*. (A) Anàlisi del contingut de DNA mitjançant FACS de cèl·lules sincronitzades en fase G1, i alliberades a una fase S no pertorbada (YPD) i a una fase S compromesa per dany al DNA (MMS), dut a terme amb la soca mutant *rad53-21*, (YGP37) i una soca control salvatge (WT, YGP17). Els índexs de gemmació es mostren com a mesura de la sincronització i del progrés del cicle cel·lular. (B) Extractes proteics totals corresponents als temps indicats, analitzats mitjançant immunoblot anti-myc (Clb6) o anti-Rad53 (Rad53). Una regió de la mateixa membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Ponceau).

2 L'estabilització de Clb6 en resposta a estrès genotòxic requereix síntesi *de novo* i implica la re-activació d'MBF

Els nivells de la ciclina de fase S Clb6 s'estabilitzen en resposta estrès genotòxic en forma dependent del mecanisme de vigilància de la fase S. Aquesta estabilització es pot donar a diferents nivells. Per una banda, és possible que Rad53 fosforili Clb6 estabilitzant-la. En aquest sentit, hem mostrat que Clb6 és substrat de Rad53 *in vitro*. De tota manera no es pot descartar que l'estabilització dels nivells de Clb6 sigui resultat, parcialment o totalment, d'una acció a un nivell diferent. Per exemple l'activació del mecanisme de vigilància de la fase S podria estabilitzar els nivells de Clb6 induint la seva expressió, estabilitzant el seu mRNA o potenciant la seva traducció. Per aquest motiu, vam decidir explorar el nivell sobre el que actua Rad53 sobre l'estabilització dels nivells de Clb6.

2.1 L'estabilització de Clb6 en resposta a estrès genotòxic requereix síntesi *de novo*

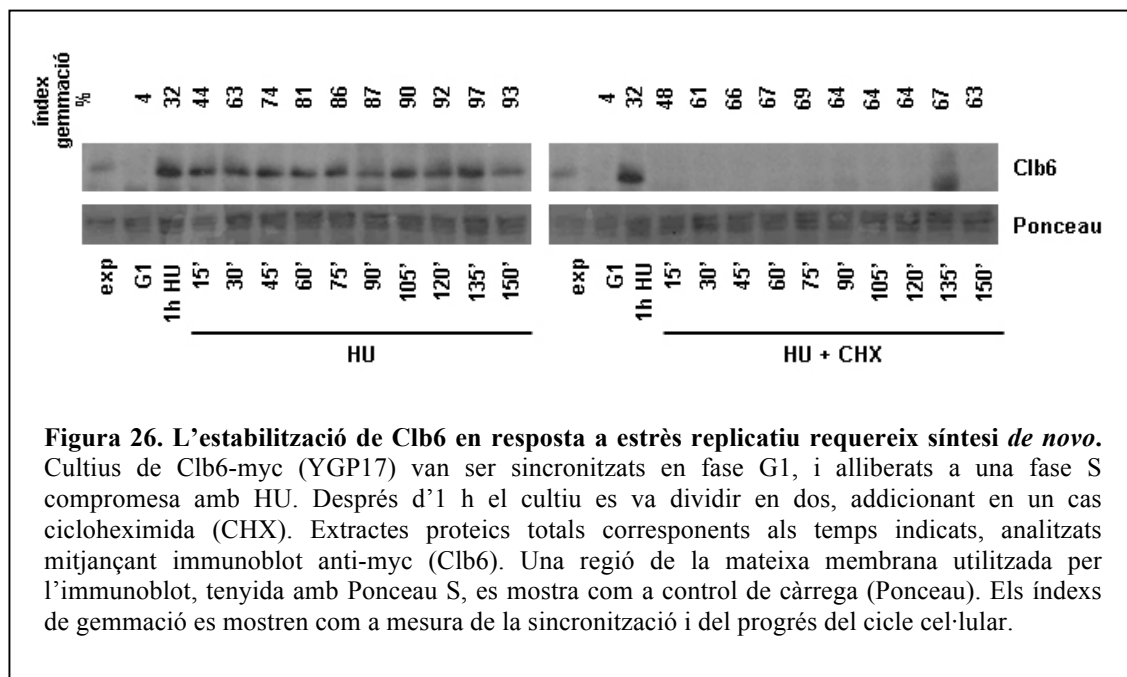
Per tal d'explorar si l'estabilització dels nivells de Clb6 en resposta a estrès genotòxic és deguda a estabilització directa de la ciclina, vam estudiar l'efecte de la inhibició de la traducció amb cicloheximida. En cas que Clb6 sigui directament estabilitzada, la inhibició de la traducció no hauria d'afectar el manteniment dels nivells d'aquesta ciclina en resposta a estrès genotòxic. En canvi, si l'estabilització requereix transcripció o traducció, la inhibició de la síntesi *de novo* hauria de comportar la desaparició de Clb6 malgrat la presència d'estrès genotòxic.

Cultius en creixement exponencial, van ser sincronitzats en fase G1 amb la feromona α -factor, i després alliberats de forma sincrònica a una fase S en presència de 200 mM d'hidroxiurea (HU) durant 1 hora, a fi d'activar el mecanisme de vigilància de la fase S i d'estabilitzar Clb6. A continuació, el cultiu es va dividir en dos, i en un cas es va afegir cicloheximida (CHX) al medi (vegeu Materials i Mètodes, punt 3.7) i en l'altre no, mantenint sempre l'HU. A partir d'aquí es van obtenir alíquotes durant aproximadament un temps de generació, en intervals de 10 minuts. Aquestes alíquotes es van usar per dur a terme l'anàlisi electroforètica de Clb6 (immunoblot) (vegeu Materials i Mètodes punts 5.1,

5.2 i 5.3), així com per l'anàlisi de la progressió del cicle cel·lular mitjançant l'índex de gemmació.

Com indiquen els índexs de gemmació (Figura 26), les cèl·lules van ser correctament sincronitzades a fase G1. Per altra banda, les cèl·lules van ser després correctament alliberades, i de forma sincrònica, a fase S, tal com s'observa per la progressió de l'índex de gemmació.

Com es mostra a la Figura 26, l'addició de cicloheximida comporta la ràpida desaparició de Clb6, malgrat la presència continuada d'HU.



El manteniment de Clb6 requereix síntesi *de novo*, si bé no podem distingir entre la possibilitat que depengui de la síntesi de Clb6, o bé de la síntesi d'un factor inestable necessari per estabilitzar Clb6 en resposta a estrès genotòxic. CLB6 s'expressa en fase G1, després d'Start, en forma dependent d'MBF (vegeu Introducció punt 2.1.2). El factor de transcripció MBF és específic de la fase G1 i és reprimat quan les cèl·lules entren en fase S (vegeu Introducció punts 2.2.2 i 3.2). Per altra banda, en una fase S no pertorbada, l'mRNA de CLB6 és inestable i desapareix en fase S (Schwob and Nasmyth 1993). Per tant, a priori, la desaparició de Clb6 per inhibició de la síntesi proteica *de novo*, hauria de ser irreversible a no ser que l'activació del mecanisme de vigilància de la fase S comporti,

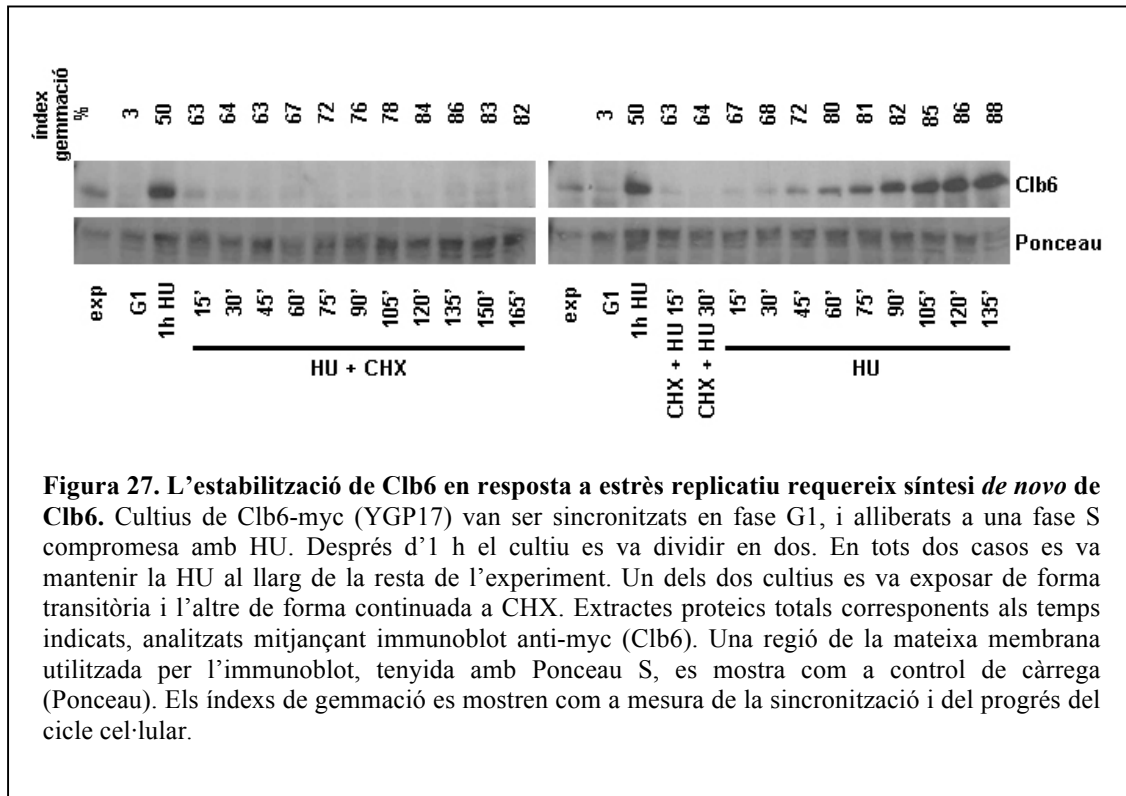
sorprenentment, la reinducció de la transcripció de CLB6, o l'estabilització del seu mRNA en resposta a estrès genotòxic.

Per tal d'estudiar si la desaparició de Clb6 per inhibició de la síntesi proteica *de novo*, en presència d'estrès replicatiu, és reversible, vam portar a terme un experiment en que vam inhibir de forma transitòria la traducció amb cicloheximida.

Cultius en creixement exponencial, van ser sincronitzats en fase G1 amb la feromona α -factor, i després alliberats de forma sincrònica a una fase S en presència de 200 mM d'hidroxiurea (HU) durant 1 hora, a fi d'activar el mecanisme de vigilància de la fase S i d'estabilitzar Clb6. A continuació, el cultiu es va dividir en dos. En tots dos casos es va mantenir la HU al llarg de la resta de l'experiment. Un dels dos cultius es va exposar de forma transitòria i l'altre de forma continuada a CHX (vegeu Materials i Mètodes, punt 3.7). A partir d'aquí es van obtenir alíquotes durant aproximadament un temps de generació, en intervals de 10 minuts. Aquestes alíquotes es van usar per dur a terme l'anàlisi electroforètica de Clb6 (immunoblot) (vegeu Materials i Mètodes punts 5.1, 5.2 i 5.3), així com per l'anàlisi de la progressió del cicle cel·lular mitjançant l'índex de gemmació.

Com indiquen els índexs de gemmació (Figura 27), les cèl·lules van ser correctament sincronitzades a fase G1. Per altra banda, les cèl·lules van ser després correctament alliberades, i de forma sincrònica, a fase S, tal com s'observa per la progressió de l'índex de gemmació.

Com es mostra a la Figura 27, l'eliminació de la cicloheximida permet la reaparició de Clb6 en condicions d'estrès replicatiu. Aquesta observació és compatible amb que l'estabilització dels nivells de Clb6 impliqui síntesi *de novo* de Clb6, ja sigui, reactivant la seva transcripció, o bé estabilitzant el seu mRNA.



Els resultats obtinguts usant cicloheximida (Figures 26 i 27) mostren que l'estabilització de Clb6 en resposta a estrès replicatiu no és deguda a l'acció directa de Rad53 sobre la proteïna, sinó que requereix síntesi *de novo* d'aquesta.

2.2 L'estabilització dels nivells de Clb6 depèn de transcripció per MBF en una fase S compromesa

Donat que l'estabilització dels nivells de Clb6 requereix síntesi *de novo*, vam decidir estudiar si es produeix reinducció de la transcripció de CLB6 en resposta a estrès genotòxic.

La resposta transcripcional coneguda, desencadenada per activació del mecanisme de vigilància de la fase S, és mediada per l'activació per Rad53 de la quinasa paràloga Dun1 (Zhou and Elledge 1993). Explorem si l'estabilització dels nivells de Clb6 en resposta a estrès genotòxic és dependent de Dun1.

Per altra banda, en un cicle cel·lular no pertorbat, Clb6 és transcrita en fase G1 de forma dependent del factor de transcripció MBF (vegeu Introducció punts 2.1.2 i 2.2.2). MBF actua específicament en fase G1 i és inactivat quan les cèl·lules entren en fase S per unió de l'inhibidor Nrm1 i per l'exclusió del nucli de Swi6 fosforilada per l'activitat CDK associada a Clb6 (vegeu Introducció 3.2). Explorem si, més enllà del coneixement disponible en l'actualitat, es dona reactivació de la transcripció mediada per MBF en una fase S compromesa.

2.2.1 Dun1 és prescindible per l'estabilització dels nivells de Clb6

En resposta a estrès genotòxic el mecanisme de vigilància de la fase S activa un extens programa transcripcional (vegeu Introducció punt 4.2.1). L'activació d'aquest programa està majoritàriament mediat per la quinasa Dun1, activada per Rad53 (Gasch, Huang et al. 2001). A la vista d'aquest fet vam decidir estudiar si l'estabilització dels nivells de Clb6 depèn de Dun1.

Cultius en creixement exponencial de la soca *dun1Δ* i de la corresponent soca control salvatge van ser sincronitzats en fase G1 amb la feromona α -factor, i després alliberats de forma sincrònica a una fase S en absència o en presència de 200 mM d'hidroxiurea (HU). L'HU genera estrès replicatiu, amb la consegüent activació del mecanisme de vigilància de la fase S (vegeu Materials i Mètodes punts 2.3, 3.3 i 3.4). A partir d'aquí es van obtenir alíquotes durant aproximadament un temps de generació, en intervals de 10 minuts. Aquestes alíquotes es van usar per dur a terme l'anàlisi electroforètica de Clb6 i Rad53 (immunoblots) (vegeu Materials i Mètodes punts 5.1, 5.2 i 5.3), així com per l'anàlisi de la progressió del cicle cel·lular mitjançant l'índex de gemmació i la progressió del contingut de DNA per citometria de flux (FACS) (vegeu Materials i Mètodes punt 3.9).

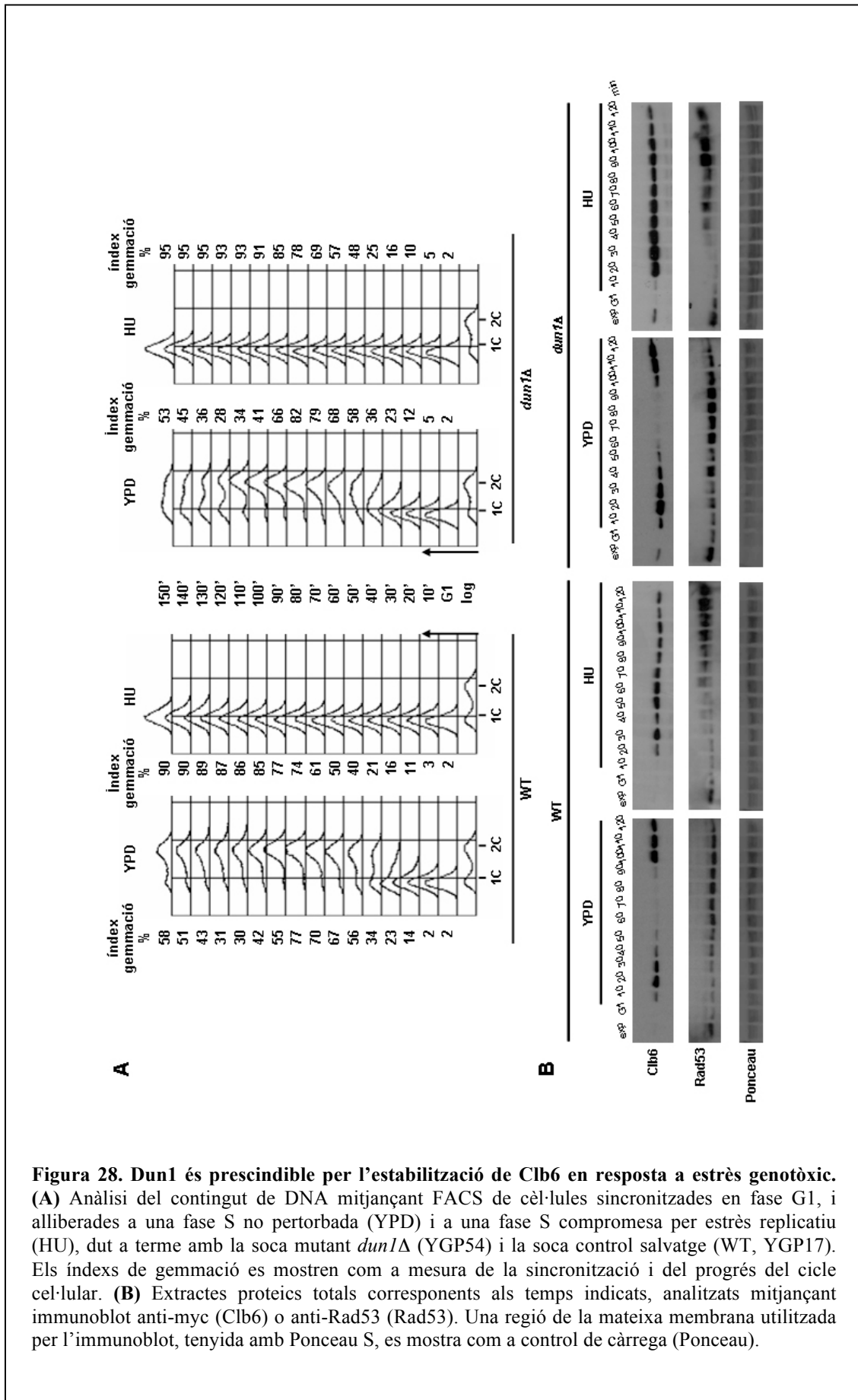
Com s'observa a la Figura 28A, les cèl·lules van ser correctament sincronitzades a fase G1, d'acord al contingut 1C de DNA que s'observa en la citometria de flux i a l'índex de gemmació. Per altra banda, les cèl·lules van ser després correctament alliberades, i de forma sincrònica, a fase S, tal com indiquen la progressió de l'índex de gemmació i, en el cas de les cèl·lules alliberades a una fase S no pertorbada, la progressió del contingut de DNA des de 1C a 2C.

L'aparició d'estrès replicatiu generat amb HU és controlada tant per la no progressió del contingut de DNA (Figura 28A, HU), com per l'aparició de la forma hiperfosforilada activa de Rad53 (Figura 28B, HU) (vegeu Introducció punt 4.2).

Pel que fa a la Clb6, en un cicle no pertorbat (Figura 28, YPD), no s'observen diferències entre les dues soques, salvatge i *dun1Δ*, ni en la cinètica d'aparició-desaparició de Clb6 (Figura 28B, YPD), ni en la progressió de la replicació (Figura 28A, YPD).

Per altra banda, en una fase S compromesa per estrès replicatiu, no hi ha diferències en el comportament de Clb6 entre la soca salvatge i la soca *dun1Δ*. En ambdós casos, la presència de Clb6 es manté al llarg de tot l'experiment (Figura 28B, HU).

Aquest resultat (Figura 28) indica que l'estabilització de Clb6 en resposta a estrès replicatiu no és dependent de Dun1. Per tant, de ser deguda a reinducció de la transcripció, aquesta no és mediat per Dun1.



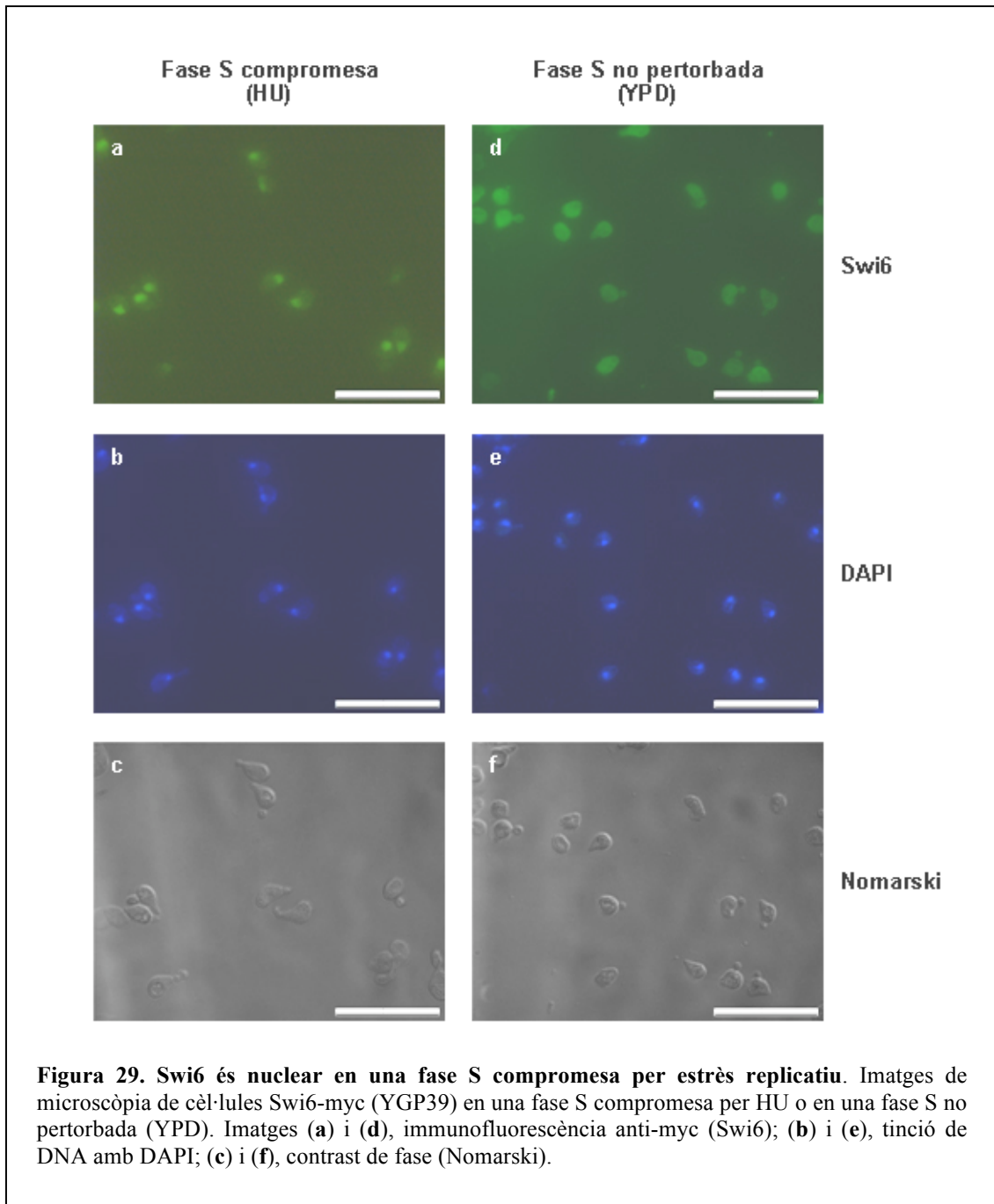
2.2.2 Swi6 és nuclear en una fase S compromesa

En un cicle cel·lular no pertorbat CLB6 és expressada a Start de forma dependent d'MBF. MBF és un factor de transcripció específic de la fase G1, i és inactiu en fase S. Un dels nivells d'inactivació (vegeu Introducció punt 3.2) és l'exclusió del nucli de la subunitat Swi6 després de ser fosforilada per Cdc28-Clb6 (específicament i no per Cdc28-Clb5) en fase S (Geymonat, Spanos et al. 2004). Donat que l'estabilització dels nivells de Clb6 en una fase S compromesa requereix síntesi *de novo*, vam voler explorar la possibilitat que MBF es reactivés en resposta a estrès genotòxic.

Si MBF es reactiva en fase S en resposta a estrès genotòxic, una condició necessària és la no exclusió nuclear de Swi6. Per això vam estudiar la localització sub-cel·lular de Swi6 en una fase S compromesa per estrès replicatiu.

Cultius en creixement exponencial van ser sincronitzats en fase G1 amb la feromona α -factor, i després alliberats de forma sincrònica a una fase S en presència o en absència de 200 mM d'hidroxiurea (HU). L'HU genera estrès replicatiu, amb la consegüent activació del mecanisme de vigilància de la fase S (vegeu Materials i Mètodes punts 2.3 i 3.4). La mostra corresponent a una fase S no pertorbada es va recollir 30 minuts després d'alliberar d' α -factor, temps que correspon a l'inici de la fase S. La mostra corresponent a una fase S compromesa per estrès replicatiu es va recollir 1 hora després d'alliberar d' α -factor, temps suficient per activar plenament el mecanisme de vigilància de la fase S. Les mostres es van processar per detectar Swi6-myc mitjançant microscòpia d'immunofluorescència (vegeu Materials i Mètodes punt 5.8).

Tal com mostra la Figura 29, Swi6 és nuclear, coincident amb la tinció DAPI, en les cèl·lules que estan en una fase S compromesa per estrès replicatiu (Figura 29, HU), en clar contrast amb el patró de localització difús que s'observa en les cèl·lules que estan en una fase S no pertorbada (Figura 29, YPD), coincident amb el reportat amb anterioritat (Geymonat, Spanos et al. 2004).

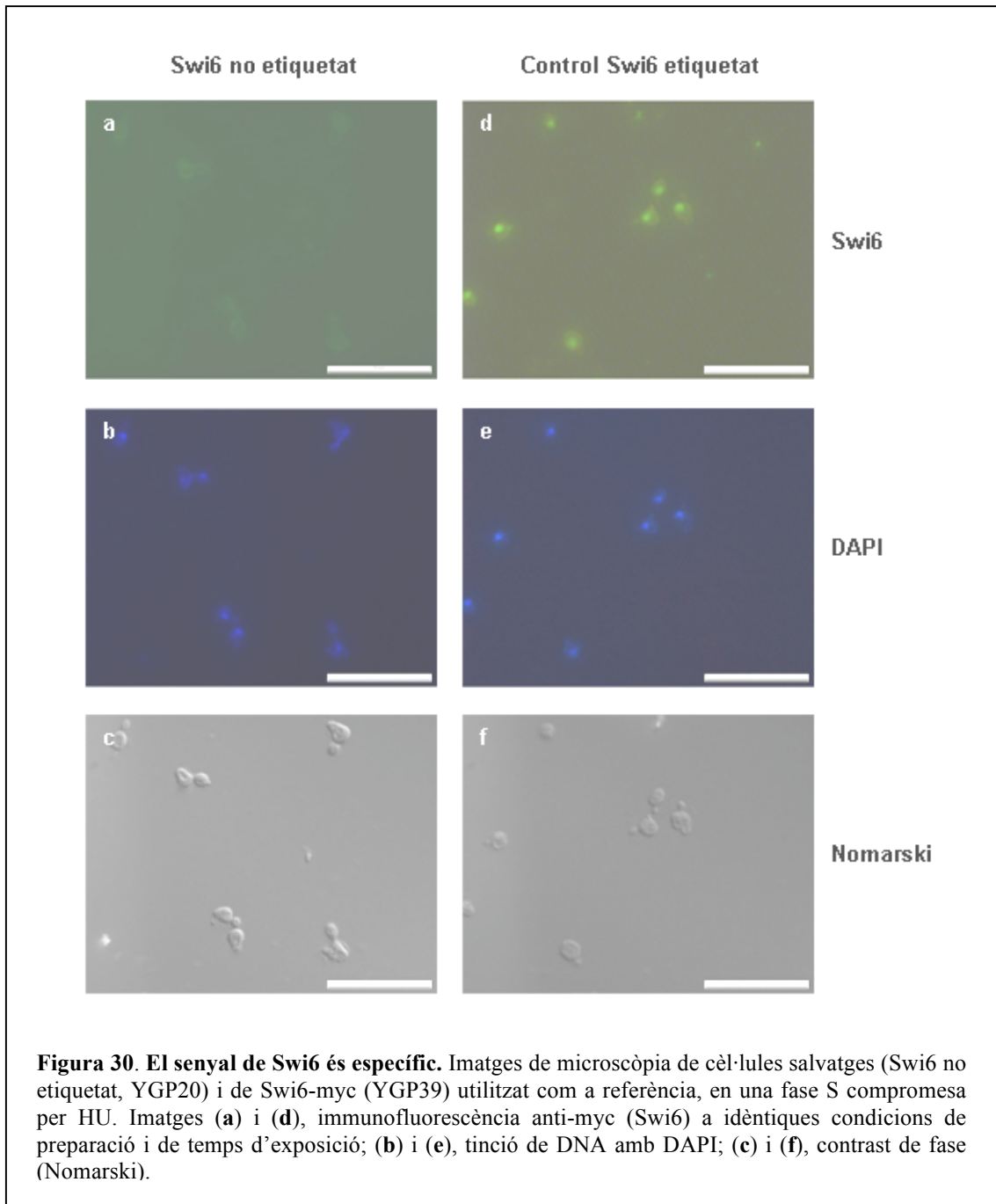


La localització nuclear de Swi6 en una fase S compromesa encoratja la hipòtesi de la transcripció de CLB6 per reactivació d'MBF en resposta a estrès replicatiu.

Com a control de l'especificitat del senyal detectat, vam reproduir el mateix experiment, usant una soca no etiquetada.

Cultius en creixement exponencial van ser sincronitzats en fase G1 amb la feromona α -factor, i després alliberats de forma sincrònica a una fase S i incubats en presència de 200 mM d'hidroxiurea (HU) durant 1 hora. Les mostres es van processar amb les mateixes condicions d'anticòs primari anti-myc i d'anticòs secundari que a la Figura 29.

Tal com mostra la Figura 30, les cèl·lules amb Swi6 no etiquetat no mostren senyal d'immunofluorescència, a idèntic temps d'exposició que la soca Swi6-myc, usada en aquest cas com a referència. Per tant, el senyal observat en una fase S compromesa en les cèl·lules Swi6-myc és específic.



2.2.3 Clb6 és nuclear en una fase S compromesa per estrès replicatiu

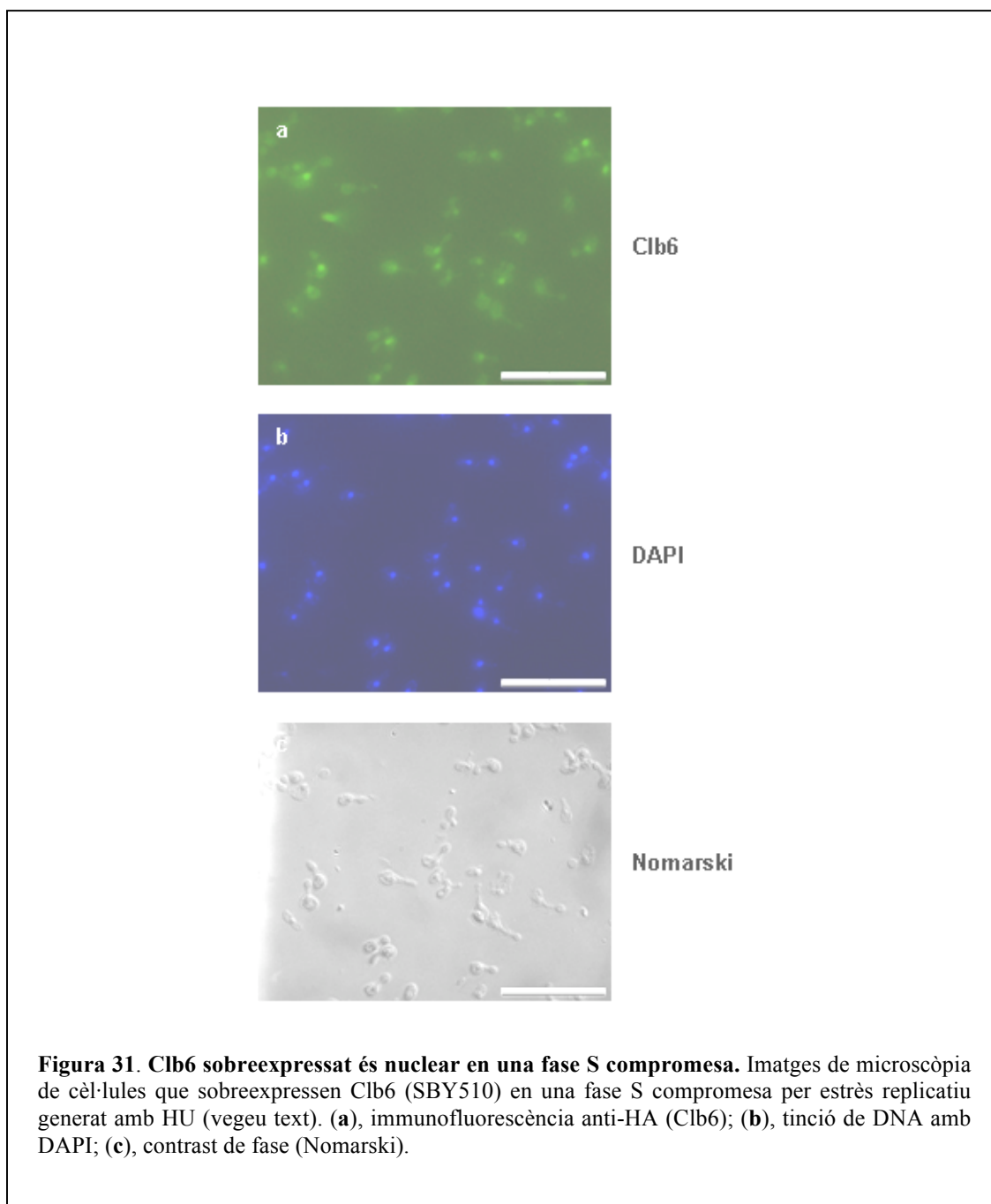
Swi6 és exclòs del nucli per fosforilació per Cdc28-Clb6 (específicament i no per Cdc28-Clb5) (Geymonat, Spanos et al. 2004). Donat que Swi6 roman al nucli en una fase S compromesa per estrès replicatiu, vam voler explorar si la ciclina Clb6 estabilitzada pel mecanisme de vigilància de la fase S és nuclear. En cas que Clb6 sigui exclosa del nucli

(per exemple per fosforilació directa per Rad53), constituiria un mecanisme que possibilitaria la localització nuclear de Swi6 en aquestes condicions.

No ha estat possible detectar Clb6 mitjançant microscòpia d'immunofluorescència, possiblement degut als seus baixos nivells (mitjançant immunoblot quantitatiu, en el nostre grup hem quantificat que la concentració de Clb6 en la cèl·lula és unes 100 vegades menor a la de Clb5). Per aquest motiu vam decidir utilitzar una soca amb una còpia extra de CLB6 sota el promotor induïble per galactosa GAL1,10.

Un cultiu de la soca GAL-CLB6-3HA en creixement exponencial en medi YPSucr, va ser sincronitzat en fase G1 amb la feromona α -factor. Un cop sincronitzat es va canviar el medi a YPGal durant 30 minuts, mantenint l' α -factor. Les cèl·lules van ser aleshores alliberades de forma sincrònica a una fase S en YPGal en presència de 200 mM d'hidroxiurea (HU) durant 1 hora, moment en el que es va prendre una alíquota per processar per a la detecció de Clb6-3HA mitjançant microscòpia d'immunofluorescència (vegeu Materials i Mètodes punt 5.8).

Tal com s'observa a la Figura 31, Clb6 és nuclear en una fase S compromesa per estrès replicatiu generat amb HU. Per tant, aquest resultat no exclou la possibilitat que Swi6 i Clb6 coexisteixin al nucli en una fase S compromesa per estrès replicatiu.



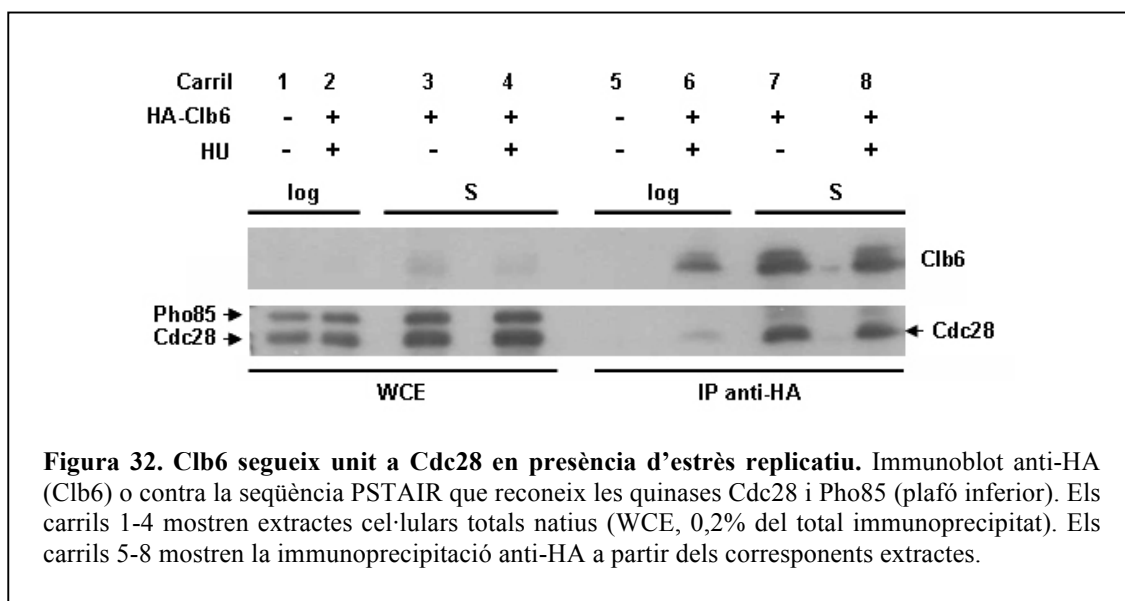
2.2.4 Clb6 segueix unit a Cdc28 en presència d'estrès replicatiu

Swi6 és exclòs del nucli per fosforilació per Cdc28-Clb6 (específicament i no per Cdc28-Clb5) (Geymonat, Spanos et al. 2004). Donat que Swi6 roman al nucli en una fase S compromesa per estrès replicatiu, i que Clb6 és estabilitzat en resposta a estrès genotòxic, vam voler explorar la possibilitat que Clb6 estigui dissociat de Cdc28 en aquestes condicions.

Cultius en creixement exponencial (log a la Figura 32) d'una soca Clb6-HA (Clb6-HA + a la Figura 32) i la corresponent soca control no etiquetada (Clb6-HA – a la Figura 32) van ser sincronitzats en fase G1 amb la feromona α -factor, i després alliberats de forma sincrònica a una fase S en presència (HU + a la Figura 32) o en absència (HU – a la Figura 32) de 200 mM d'hidroxiurea. L'HU genera estrès replicatiu, amb la consegüent activació del mecanisme de vigilància de la fase S (vegeu Materials i Mètodes punts 2.3 i 3.4). La mostra corresponent a una fase S no pertorbada es va recollir 30 minuts després d'alliberar d' α -factor, temps que correspon a l'inici de la fase S. La mostra corresponent a una fase S compromesa per estrès replicatiu es va recollir 1 hora després d'alliberar d' α -factor, temps suficient per activar plenament el mecanisme de vigilància de la fase S. Clb6-HA es va immunoprecipitar d'extractes cel·lulars totals en condicions natives, utilitzant anticossos monoclonals anti-HA (vegeu Materials i Mètodes punt 5.5). Els immunoprecipitats es van analitzar mitjançant electroforesis i immunoblots contra Cdc28 (anticòs anti-PSTAIR) i Clb6 (anticòs anti-HA) (vegeu Materials i Mètodes punts 5.1, 5.2 i 5.3).

Com s'observa a la Figura 32 la immunoprecipitació de Clb6 en una fase S compromesa per estrès replicatiu (carril 8) co-immunoprecipita una quantitat de Cdc28 (plafó inferior) equivalent al co-immunoprecipitat amb Clb6 en una fase S no pertorbada (carril 7). La presència de Cdc28 és específica per associació a Clb6, ja que als immunoprecipitats anti-HA d'una soca control no etiquetada no es detecta (carril 5).

Aquest resultat indica que la quinasa dependent de ciclina de fase S Cdc28-Clb6 roman associada durant estrès replicatiu.



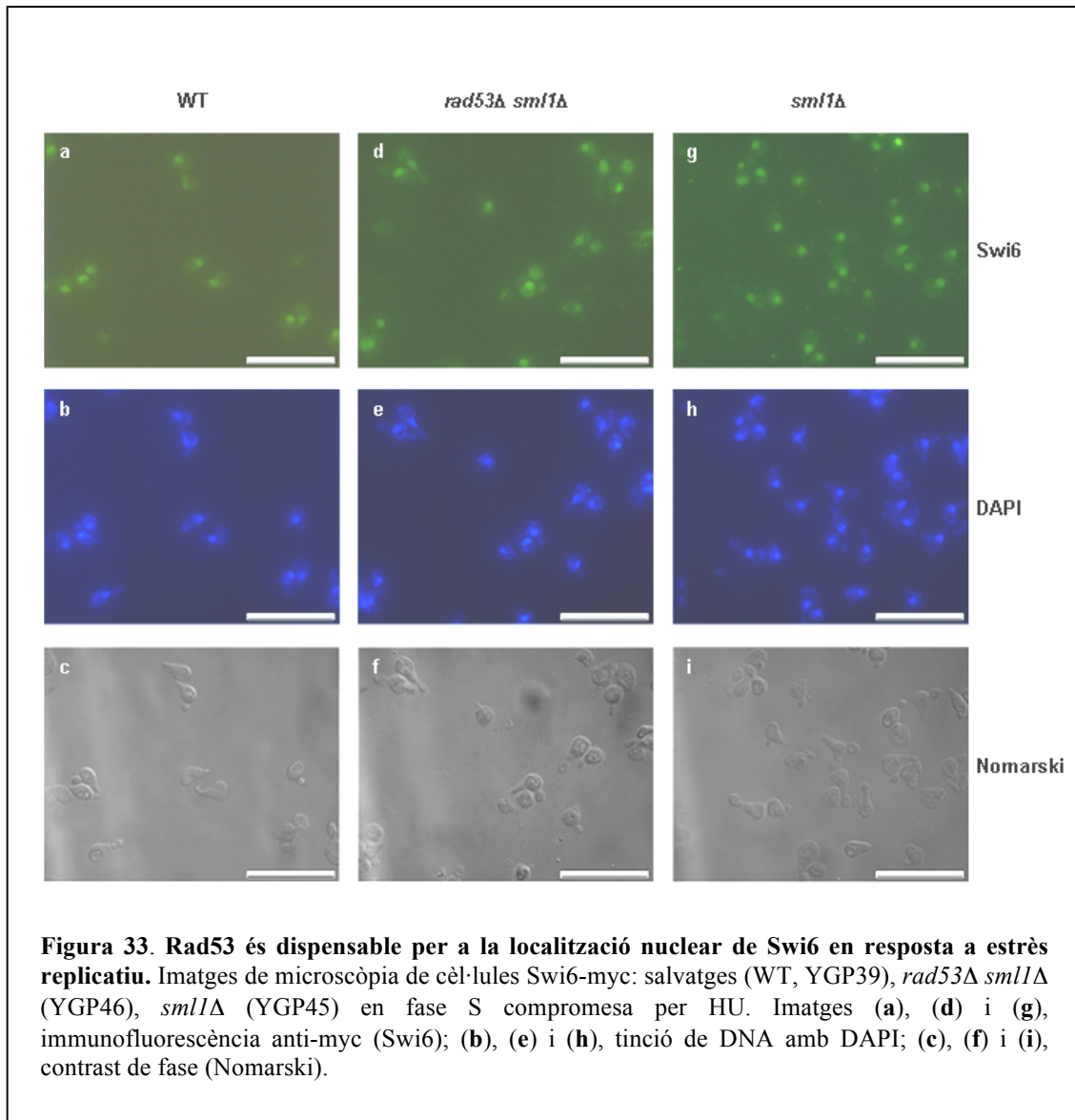
2.2.5 La localització nuclear de Swi6 en resposta a estrès replicatiu no depèn ni de Rad53 ni de Mec1

A continuació vam explorar si la localització nuclear de Swi6 en una fase S compromesa és dependent de la resposta del checkpoint de dany al DNA. Per fer-ho, vam reproduir els experiments realitzats en el punt 2.2.2 amb la soca mutant *rad53Δ*, incapaç d'estabilitzar els nivells de Clb6 en resposta a estrès genotòxic (vegeu punt 1.3.2).

Cultius en creixement exponencial de la soca *rad53Δ sml1Δ* i de la corresponent soca control (*sml1Δ*), van ser sincronitzats en fase G1 amb la feromona α -factor, i després alliberats de forma sincrònica a una fase S en presència de 200 mM d'hidroxiurea (HU) durant 1 hora. Les mostres es van processar per detectar Swi6-myc mitjançant microscòpia d'immunofluorescència (vegeu Materials i Mètodes punt 5.8).

Tal com mostra la Figura 33, Swi6 és nuclear en el mutant *rad53Δ sml1Δ* en una fase S compromesa per estrès replicatiu (Figura 33), igual com en la soca control RAD53. Per tant, malgrat que Rad53 és necessari per a l'estabilització dels nivells de Clb6 en resposta a estrès genotòxic, és dispensable per a la localització nuclear de Swi6 en aquestes condicions. Idèntics resultats es van obtenir amb el mutant hipomòrfic *rad53-21 SML1*.

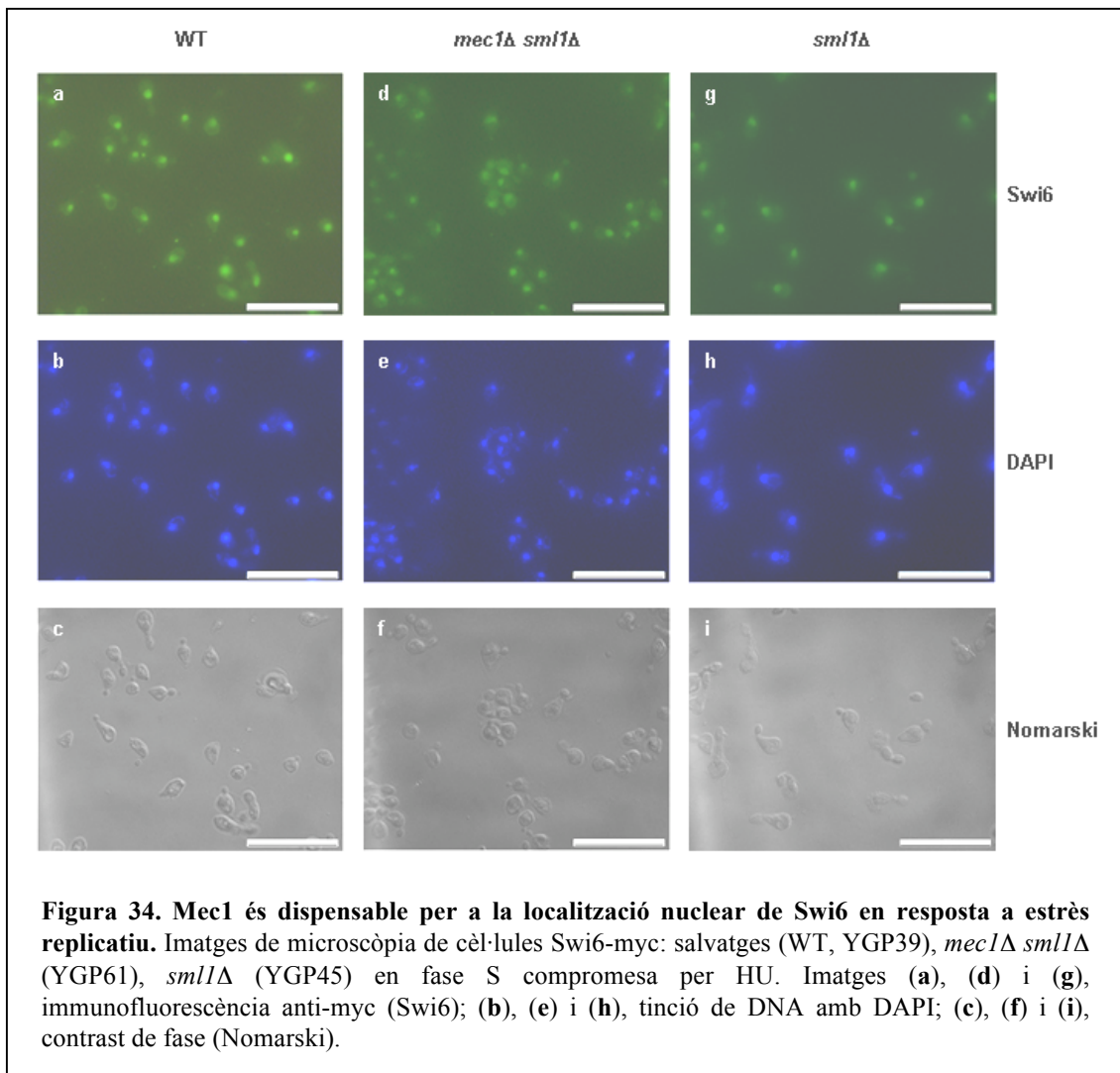
Una possibilitat és que la quinasa transductora central del checkpoint, Mec1, que opera per sobre de Rad53, sigui la responsable, directa o indirecta (per exemple a través de la quinasa efectora Chk1), de la localització nuclear de Swi6.



Per tal d'explorar si Mec1 és necessari per a la localització nuclear de Swi6 en resposta a estrès replicatiu, vam reproduir l'experiment anterior, en aquest cas usant la soca mutant *mec1Δ sml1Δ*.

Cultius en creixement exponencial de la soca *mec1Δ sml1Δ* i de la corresponent soca control (*sml1Δ*), van ser sincronitzats en fase G1 amb la feromona α -factor, i després alliberats de forma sincrònica a una fase S en presència de 200 mM d'hidroxiurea (HU) durant 1 hora. Les mostres es van processar per detectar Swi6-myc mitjançant microscòpia d'immunofluorescència (vegeu Materials i Mètodes punt 5.8).

Tal com mostra la Figura 34, Swi6 és nuclear en el mutant *mec1Δ sml1Δ* en una fase S compromesa per estrès replicatiu (Figura 34), igual com en la soca control MEC1. Per tant, malgrat que Mec1 és necessari per a l'estabilització dels nivells de Clb6 en resposta a estrès genotòxic, és dispensable per a la localització nuclear de Swi6 en aquestes condicions.



Per tant, malgrat que tant Rad53 com Mec1 són necessaris per a l'estabilització de Clb6 en resposta a estrès replicatiu, són dispensables per a la localització nuclear de Swi6 en aquestes condicions.

2.2.6 L'estabilització dels nivells de Clb6 requereix activitat transcripcional dependent d'MBF

A la vista que l'estabilització dels nivells de Clb6 en resposta a estrès genotòxic requereix síntesi *de novo* de Clb6, i que Swi6 és nuclear en una fase S compromesa per estrès replicatiu, vam decidir explorar si l'estabilització de Clb6 en resposta a estrès genotòxic és deguda a una reinducció de la transcripció dependent d'MBF, el factor encarregat de transcriure les ciclins de fase S després d'Start, en fase G1.

El factor de transcripció MBF està format per la subunitat transactivadora Swi6, comuna amb SBF (vegeu Introducció punt 2.2.1), i la subunitat específica per a MBF, Mbp1, que reconeix les caixes MCB en els promotors dels gens regulats per MBF (vegeu Introducció punt 2.2.2). Per tant, en primer lloc, vam estudiar si mutants *mbp1* són capaços d'estabilitzar els nivells de Clb6 en resposta a estrès replicatiu. Per altra banda, vam estudiar si la inhibició d'MBF durant una fase S compromesa per estrès replicatiu, per inducció d'una forma hiperestable del seu repressor Nrm1, suprimeix l'estabilització dels nivells de Clb6.

mbp1-td

Vam generar un mutant condicional termodegró *mbp1-td* (vegeu Materials i Mètodes punt 2.5.5). D'aquesta manera Mbp1 està present i el factor de transcripció MBF funciona de forma normal a temperatura permissiva, mentre que en canviar a temperatura restrictiva i/o sobreexpressar la ubiquitin-lligasa UBR1, Mbp1 és degradada.

Vam usar aquesta soca per estudiar si l'eliminació de Mbp1 durant estrès replicatiu dóna lloc a la desaparició de Clb6.

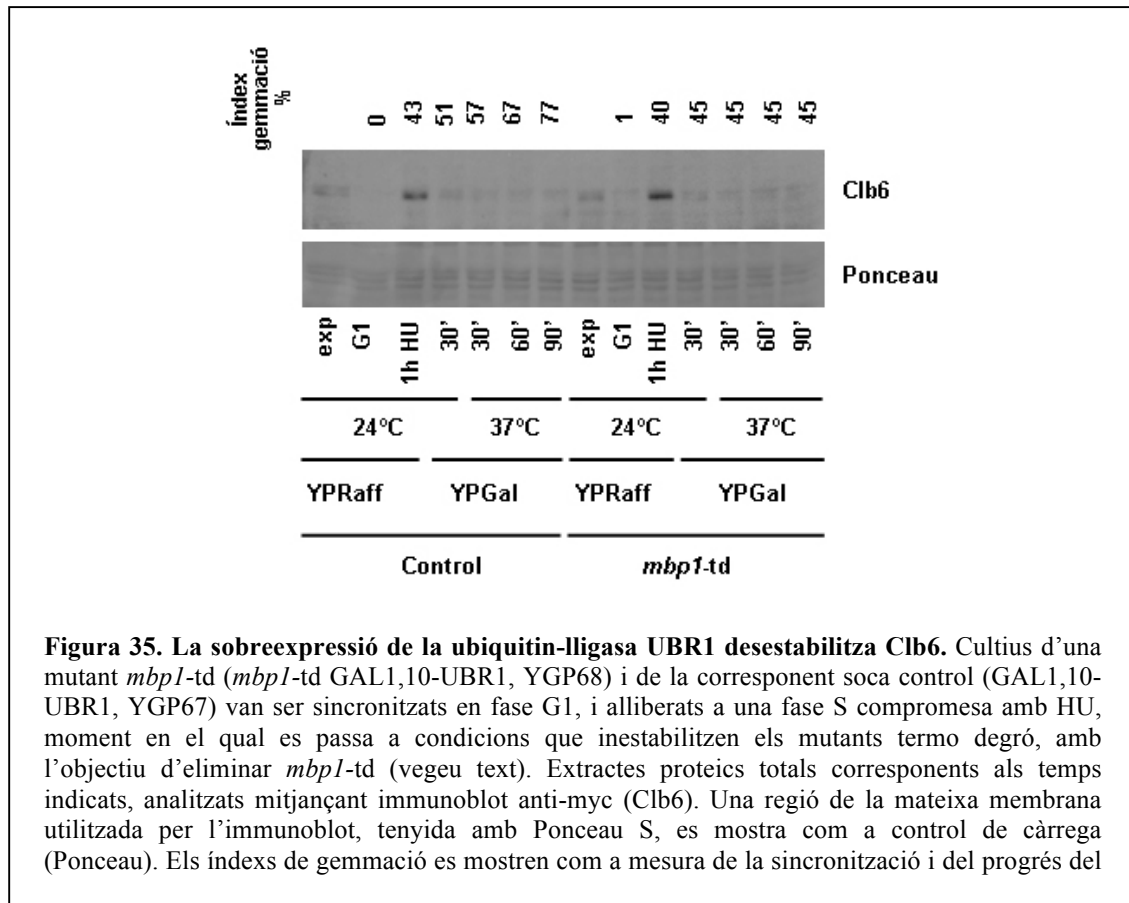
Cultius en creixement exponencial en medi YPRaff i a temperatura permissiva (24°C) de la soca *mbp1-td* GAL-UBR1 i de la corresponent soca control (GAL-UBR1), van ser sincronitzats en fase G1 amb la feromona α -factor. A continuació les cèl·lules van ser alliberades de forma sincrònica a fase S, encara amb rafinosa com a font de carboni i a temperatura permissiva (24°C), en presència de 200 mM HU, durant 1 hora, per tal de generar estrès replicatiu. Seguidament, mantenint els cultius a temperatura permissiva

(24°C) i la presència d'HU, es va canviar la font de carboni a galactosa (YPGal), per tal de sobreexpressar la ubiquitin-lligasa UBR1. Transcorreguts 30 minuts, els cultius es van passar a temperatura restrictiva (37°C) (vegeu Materials i Mètodes punt 3.8). A partir d'aquí es van obtenir alíquotes durant dues hores, en intervals de 30 minuts. Aquestes alíquotes, es van usar per dur a terme l'anàlisi electroforètica de Clb6 (immunoblot) (vegeu Materials i Mètodes punts 5.1, 5.2 i 5.3), així com per l'anàlisi de la progressió del cicle cel·lular mitjançant l'índex de gemmació.

Com s'observa a la Figura 35, les cèl·lules van ser correctament sincronitzades a fase G1 d'acord a l'índex de gemmació. Per altra banda, les cèl·lules van ser després correctament alliberades a fase S, tal com indica la progressió de l'índex de gemmació.

Pel que fa a la ciclina Clb6, desapareix a temperatura restrictiva en sobreexpressar UBR1, condicions d'eliminació de *mpl*-td. Tanmateix, Clb6 desapareix també a la soca control MBP1 GAL-UBR1, de manera que la seva desaparició en aquest sistema experimental no depèn de la desaparició de Mbp1, sinó que probablement és un artefacte de l'acumulació de Ubr1. Per tant, no és possible aprofitar aquesta aproximació per estudiar si l'estabilització dels nivells de Clb6 en resposta a estrès replicatiu és dependent d'MBF.

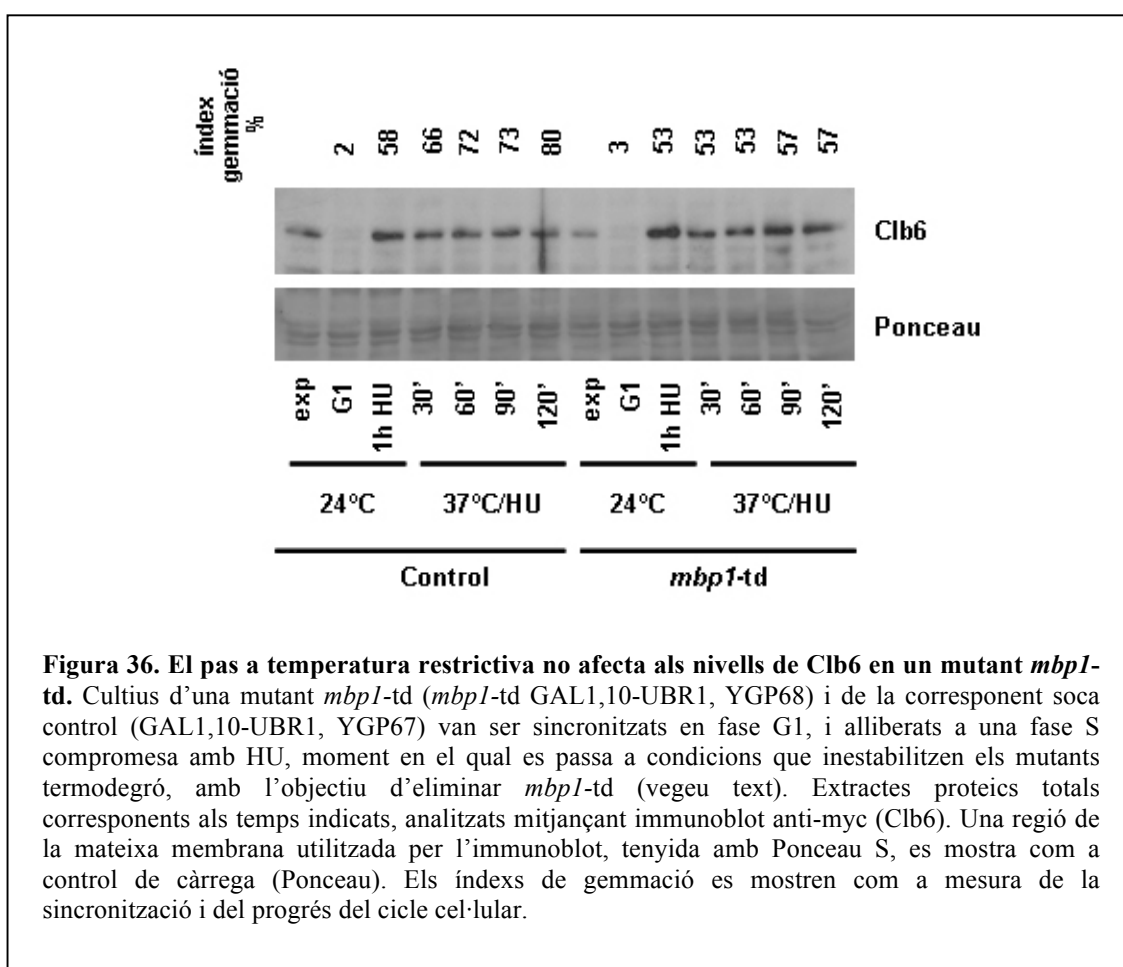
Donat que la sobreexpressió de UBR1 per si sola inestabilitza Clb6, vam decidir explorar si el pas de temperatura permissiva (24°C) a temperatura restrictiva (37°C), sense sobreexpressar UBR1, és suficient per determinar la implicació d'MBF en l'estabilització de Clb6 en resposta a estrès replicatiu.



Cultius en creixement exponencial en medi YPD i a temperatura permissiva (24°C) de la soca *mbp1-td* GAL-UBR1 i de la corresponent soca control (GAL-UBR1), van ser sincronitzats en fase G1 amb la feromona α -factor. A continuació les cèl·lules van ser alliberades de forma sincrònica a fase S, a temperatura permissiva (24°C), en presència de 200 mM HU, durant 1 hora, per tal de generar estrès replicatiu. Aleshores els cultius es van passar a temperatura restrictiva (37°C) (vegeu Materials i Mètodes punt 3.8). A partir d'aquí es van obtenir alíquotes durant dues hores, en intervals de 30 minuts. Aquestes alíquotes, es van usar per dur a terme l'anàlisi electroforètica de Clb6 (immunoblot) (vegeu Materials i Mètodes punts 5.1, 5.2 i 5.3), així com per l'anàlisi de la progressió del cicle cel·lular mitjançant l'índex de gemmació.

Com s'observa a la Figura 36, les cèl·lules van ser correctament sincronitzades a fase G1 d'acord a l'índex de gemmació. Per altra banda, les cèl·lules van ser després correctament alliberades a fase S, tal com indica la progressió de l'índex de gemmació.

Pel que fa a la ciclina Clb6, el pas a temperatura restrictiva no és suficient per afectar els seus nivells. Donat que no podem detectar *mbp1*-td en immunoblot (Figura 36), aquest resultat indica que o bé aquestes condicions no són suficients per degradar *mbp1*-td, o bé la presència de Mbp1 no és indispensable pel manteniment dels nivells de Clb6 en resposta a estrès replicatiu.



mbp1Δ

Donada la incertesa del resultat obtingut amb el mutant *mbp1-td*, vam optar per treballar amb un mutant *mbp1Δ*, malgrat tractar-se d'un sistema menys robust: la majoria de gens transcrits de forma dependent d'MBF mostren, en la soca *mbp1Δ*, una expressió basal al llarg del cicle cel·lular (de Bruin, Kalashnikova et al. 2006). Malgrat això, donat que l'expressió basal dels gens dependents d'MBF en els mutants *mbp1Δ* assoleix nivells significativament inferiors als que es donen sota el control d'MBF (de Bruin, Kalashnikova et al. 2006), vam considerar la possibilitat que el mutant *mbp1Δ* pogués presentar un defecte en l'estabilització dels nivells de Clb6 en resposta a estrès replicatiu.

Cultius en creixement exponencial de la soca *mbp1Δ* i de la corresponent soca control salvatge van ser sincronitzats en fase G1 amb la feromona α -factor, i després alliberats de forma sincrònica a una fase S en absència o en presència de 200 mM d'hidroxiurea (HU). L'HU genera estrès replicatiu, amb la consegüent activació del mecanisme de vigilància de la fase S (vegeu Materials i Mètodes punts 2.3, 3.3 i 3.4). A partir d'aquí es van obtenir alíquotes durant aproximadament un temps de generació, en intervals de 10 minuts. Aquestes alíquotes es van usar per dur a terme l'anàlisi electroforètica de Clb6 i Rad53 (immunoblots) (vegeu Materials i Mètodes punts 5.1, 5.2 i 5.3), així com per l'anàlisi de la progressió del cicle cel·lular mitjançant l'índex de gemmació i la progressió del contingut de DNA per citometria de flux (FACS) (vegeu Materials i Mètodes punt 3.9).

Com s'observa a la Figura 37A, les cèl·lules van ser correctament sincronitzades a fase G1, d'acord al contingut 1C de DNA que s'observa en la citometria de flux i a l'índex de gemmació. Per altra banda, les cèl·lules van ser després correctament alliberades, i de forma sincrònica, a fase S, tal com indiquen la progressió de l'índex de gemmació i, en el cas de les cèl·lules alliberades a una fase S no pertorbada, la progressió del contingut de DNA des de 1C a 2C.

L'aparició d'estrès replicatiu generat amb HU és controlada tant per la no progressió del contingut de DNA (Figura 37A, HU), com per l'aparició de la forma hiperfosforilada activa de Rad53 (Figura 37B, HU) (vegeu Introducció punt 4.2).

Pel que fa a Clb6, en la soca *mbp1Δ*, en un cicle no pertorbat (Figura 37, YPD), la ciclina perd l'estricta regulació al llarg del cicle cel·lular observada en la soca salvatge, tal i com ha estat descrit per als gens dependents d'MBF en els mutants *mbp1* (de Bruin, Kalashnikova et al. 2006): l'absència d'Mbp1 impedeix la repressió dels gens dependents d'MBF per Nrm1 en fase S (vegeu Introducció punt 3.2).

Per altra banda, en una fase S compromesa per estrès replicatiu, els nivells de Clb6 a la soca *mbp1Δ* disminueixen de forma progressiva (Figura 37B, *mbp1Δ*, YPD), en contrast amb l'estabilització a la soca control salvatge (Figura 37B, WT, YPD). La relativa persistència de Clb6 en el mutant *mbp1Δ* és compatible amb l'expressió basal limitada descrita per als gens dependents d'MBF en els mutants *mbp1* (de Bruin, Kalashnikova et al. 2006).

Aquest resultat encoratja, però no demostra, la possibilitat que el manteniment dels nivells de Clb6 en resposta a estrès replicatiu sigui dependent d'MBF.

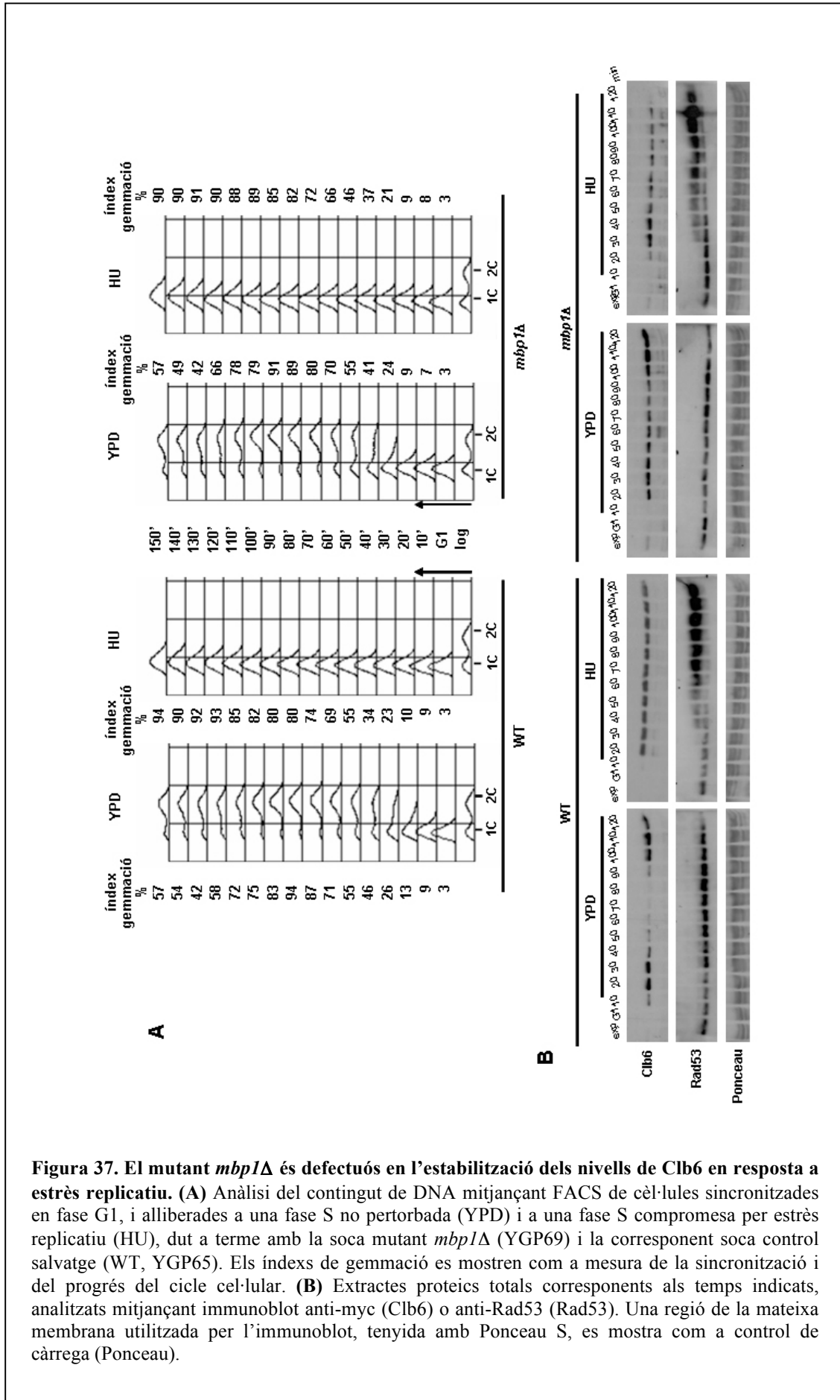


Figura 37. El mutant *mbp1Δ* és defectuós en l'estabilització dels nivells de Clb6 en resposta a estrès replicatiu. (A) Anàlisi del contingut de DNA mitjançant FACS de cèl·lules sincronitzades en fase G1, i alliberades a una fase S no pertorbada (YPD) i a una fase S compromesa per estrès replicatiu (HU), dut a terme amb la soca mutant *mbp1Δ* (YGP69) i la corresponent soca control salvatge (WT, YGP65). Els índexs de gemmació es mostren com a mesura de la sincronització i del progrés del cicle cel·lular. **(B)** Extractes proteics totals corresponents als temps indicats, analitzats mitjançant immunoblot anti-myc (Clb6) o anti-Rad53 (Rad53). Una regió de la mateixa membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Ponceau).

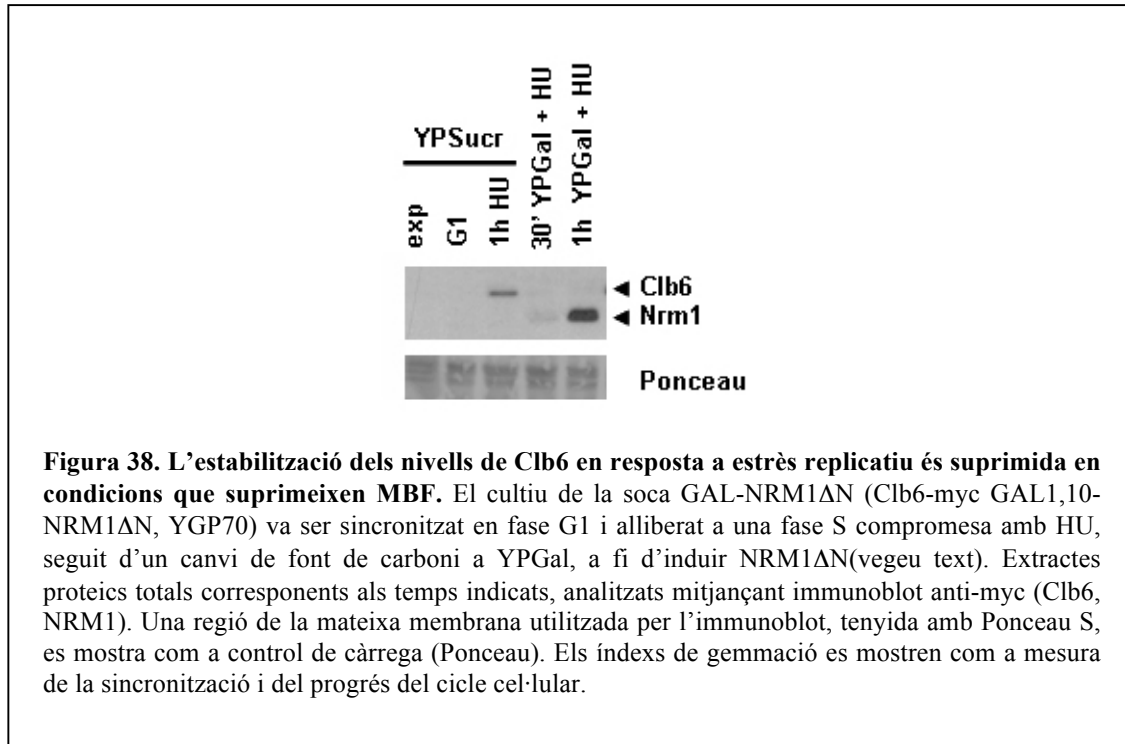
NRM1ΔN

Donades les limitacions de les aproximacions amb els mutants *mbp1* per determinar si l'estabilització dels nivells de Clb6 en resposta a estrès replicatiu és dependent d'MBF, vam decidir utilitzar l'aproximació complementària: una soca que sobreexpressa una forma hiperestable d'Nrm1, el repressor de l'activitat MBF.

La soca GAL-NRM1ΔN en creixement exponencial en medi YPSucr va ser sincronitzada en fase G1 amb la feromona α -factor, i després alliberada de forma sincrònica a una fase S en presència de 200 mM d'hidroxiurea (HU) durant 1 hora (vegeu Materials i Mètodes punts 2.3, 3.3 i 3.4). A continuació, mantenint l'HU, es va canviar la font de carboni a galactosa (YPGal), per tal d'induir NRM1ΔN. A partir d'aquí es van obtenir alíquotes cada 30 minuts, durant 1 hora. Aquestes alíquotes es van usar per dur a terme l'anàlisi electroforètica de Clb6 (immunoblot) (vegeu Materials i Mètodes punts 5.1, 5.2 i 5.3), així com l'índex de gemmació.

Com s'observa a la Figura 38, les cèl·lules van ser correctament sincronitzades a fase G1 d'acord a l'índex de gemmació. Per altra banda, les cèl·lules van ser després correctament alliberades a fase S, tal com indica la progressió de l'índex de gemmació.

Pel que fa a la ciclina de fase S Clb6, els seus nivells estan estabilitzats en presència d'HU, però la proteïna desapareix ràpidament en induir NRM1ΔN. Per tant, l'estabilització dels nivells de Clb6 és suprimida en condicions que reprimeixen MBF (de Bruin, Kalashnikova et al. 2006), indicant que requereix transcripció dependent d'MBF. Aquest resultat suggereix per tant que, en resposta a estrès replicatiu, pot donar-se reactivació del factor de transcripció de fase G1 MBF en fase S. A aquest respecte, quan aquest treball de tesi estava en fase de conclusió, el grup de Curt Wittenberg ha reportat en *S. pombe* la reactivació d'MBF pel mecanisme de vigilància de la fase S en resposta a estrès replicatiu (de Bruin, Kalashnikova et al. 2008), la qual cosa dóna suport a les nostres observacions.



3 Paper de l'estabilització de Clb6

Per tal d'abordar l'estudi de la funció de l'estabilització de Clb6 en una fase S compromesa, seria útil conèixer per què en una fase S no pertorbada a la cèl·lula li interessa eliminar tant aviat Clb6, mentre que l'altra ciclina de fase S, Clb5, es manté present a llarg de tota la fase S fins a la mitosi. Desafortunadament la resposta a aquesta qüestió es desconeix. La ciclina de fase S Clb6 ha estat molt poc estudiada, probablement degut a la manca de fenotip de la seva deleció en un cycle cel·lular no pertorbat (Schwob and Nasmyth 1993; Donaldson, Raghuraman et al. 1998).

3.1 Genètica reversa: efecte de la deleció de Clb6

Estudis previs mostren que Clb6 és dispensable per al correcte temps d'inici i progressió de la replicació (Donaldson, Raghuraman et al. 1998). Pel contrari, les soques *clb5Δ* inicien la replicació puntualment, conduïdes per Clb6, però la seva duració queda afectada dràsticament degut a que només Cdc28-Clb5 pot disparar els orígens de replicació tardans

(Donaldson, Raghuraman et al. 1998). Avui sabem que això és degut a la desaparició de Clb6 a mitja fase S (Jackson, Reed et al. 2006). Tanmateix, si la resposta a estrès genotòxic implica l'estabilització de la ciclina de fase S Clb6, és raonable pensar que la deleció de Clb6 pugui donar lloc a algun defecte en aquesta resposta. La manca de fenotip de *clb6Δ* en un cicle cel·lular no pertorbat no exclou un possible fenotip en una fase S compromesa. Per aquest motiu, vam optar per una aproximació de genètica reversa per començar a explorar el paper de l'estabilització dels nivells de Clb6 en resposta a estrès genotòxic.

3.1.1 Clb6 és prescindible en el control de la replicació en resposta a estrès genotòxic

Clb6 podria ser prescindible en una replicació no pertorbada, però ser requerida en una fase S compromesa. Per exemple, Clb6 podria ser necessària per reiniciar les forquilles aturades per estrès replicatiu, o per activar els orígens de replicació tardans després d'estrès replicatiu. Alternativament, Clb6 podria participar en el manteniment de l'estabilitat de les forquilles de replicació, provinents d'orígens de replicació primerencs, que progressen al llarg del DNA lesionat.

3.1.1.1 *clb6Δ* reinicia amb normalitat la replicació després d'estrès replicatiu

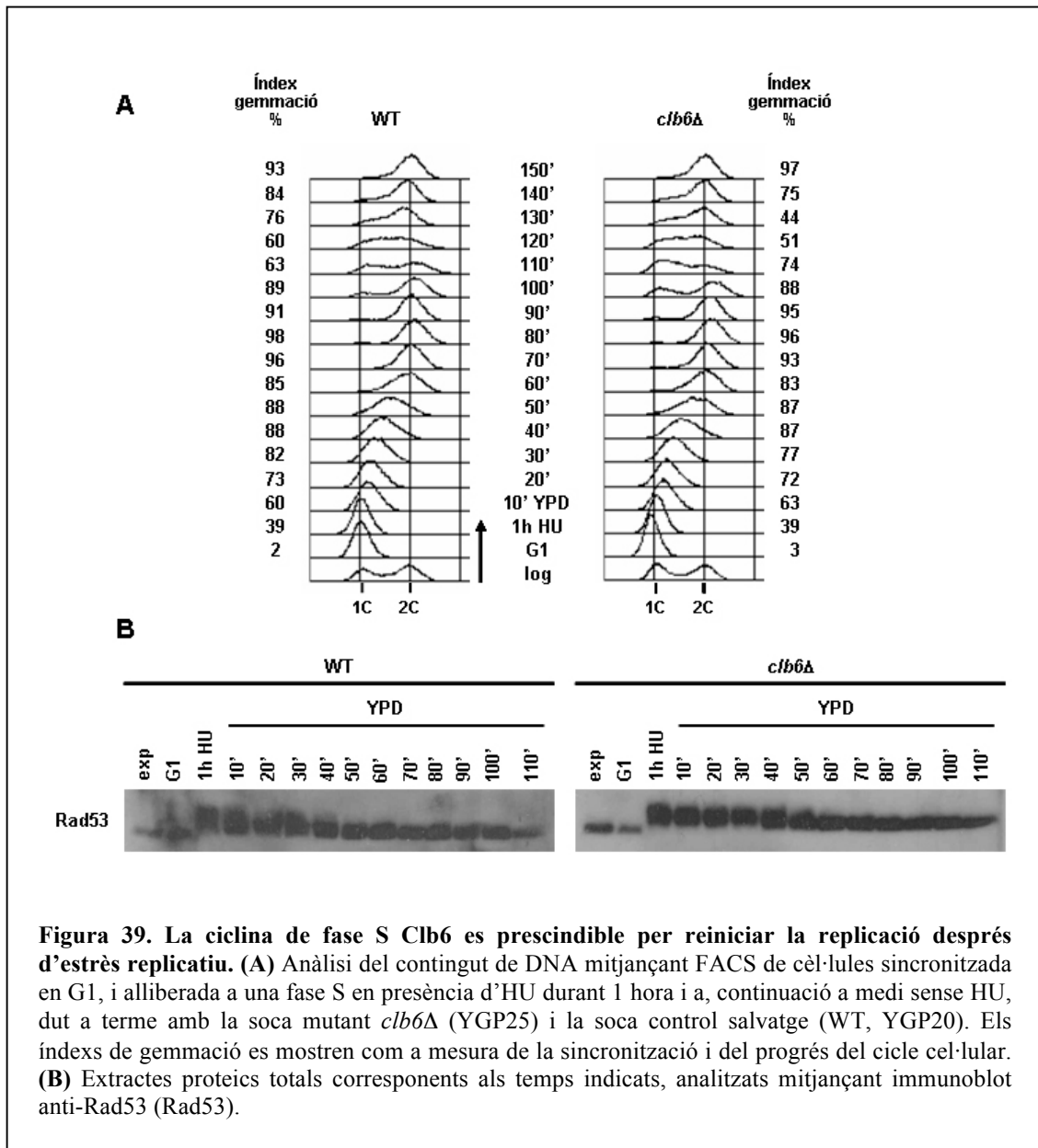
Vam explorar si Clb6 és necessari per reiniciar la replicació després d'estrès replicatiu. Si Clb6 fos necessari per reanar les forquilles de replicació aturades per estrès replicatiu, o per activar els orígens de replicació tardans després d'estrès replicatiu, el mutant *clb6Δ* presentaria un alentiment de la progressió de la replicació un cop les cèl·lules s'han recuperat de l'estrès.

Cultius en creixement exponencial de la soca *clb6Δ* i de la corresponent soca control salvatge van ser sincronitzats en fase G1 amb la feromona α -factor, i després alliberats de forma sincrònica a una fase S en presència de 200 mM d'hidroxiurea (HU) durant 1 hora, a fi d'activar el mecanisme de vigilància de la fase S, i d'estabilitzar Clb6 en el cas de la soca control salvatge. A continuació es va eliminar l'HU, permetent la recuperació de l'estrès replicatiu (vegeu Materials i Mètodes punt 3.5). A partir d'aquí es van obtenir

alíquotes durant aproximadament un temps de generació, en intervals de 10 minuts. Aquestes alíquotes es van usar per dur a terme l'anàlisi electroforètica de Rad53 (immunoblot) (vegeu Materials i Mètodes punts 5.1, 5.2 i 5.3), així com per l'anàlisi de la progressió del cicle cel·lular mitjançant l'índex de gemmació i la progressió del contingut de DNA per citometria de flux (FACS) (vegeu Materials i Mètodes punt 3.9).

Com s'observa a la Figura 39, les cèl·lules van ser correctament sincronitzades a fase G1, d'acord al contingut 1C de DNA que s'observa en la citometria de flux i a l'índex de gemmació. Per altra banda, les cèl·lules van ser després correctament alliberades, i de forma sincrònica, a fase S, tal com indica la progressió de l'índex de gemmació. La generació d'estrès replicatiu en presència d'HU impedeix la progressió de la replicació (Figura 39A) i dona lloc a l'aparició de la forma hiperfosforilada, activa de Rad53 (Figura 39B). Un cop transferides les cèl·lules a medi sense HU, per tal de permetre la recuperació de l'estrès replicatiu, s'observa la progressió del contingut de DNA des de 1C a 2C, i la posterior divisió cel·lular (Figura 39A) i inactivació de Rad53 (Figura 39B).

Pel que fa a la deleció de Clb6, la progressió de la replicació després d'estrès replicatiu és indistingible de la observada en la soca control salvatge (Figura 39A). Aquest resultat descarta que Clb6 jugui un paper determinant en la rearmada de les forquilles de replicació aturades per estrès replicatiu, o en l'activació dels orígens de replicació tardans després d'estrès replicatiu.



3.1.1.2 *clb6Δ* inhibeix els orígens i estabilitza les forquilles de replicació amb normalitat en presència de dany al DNA

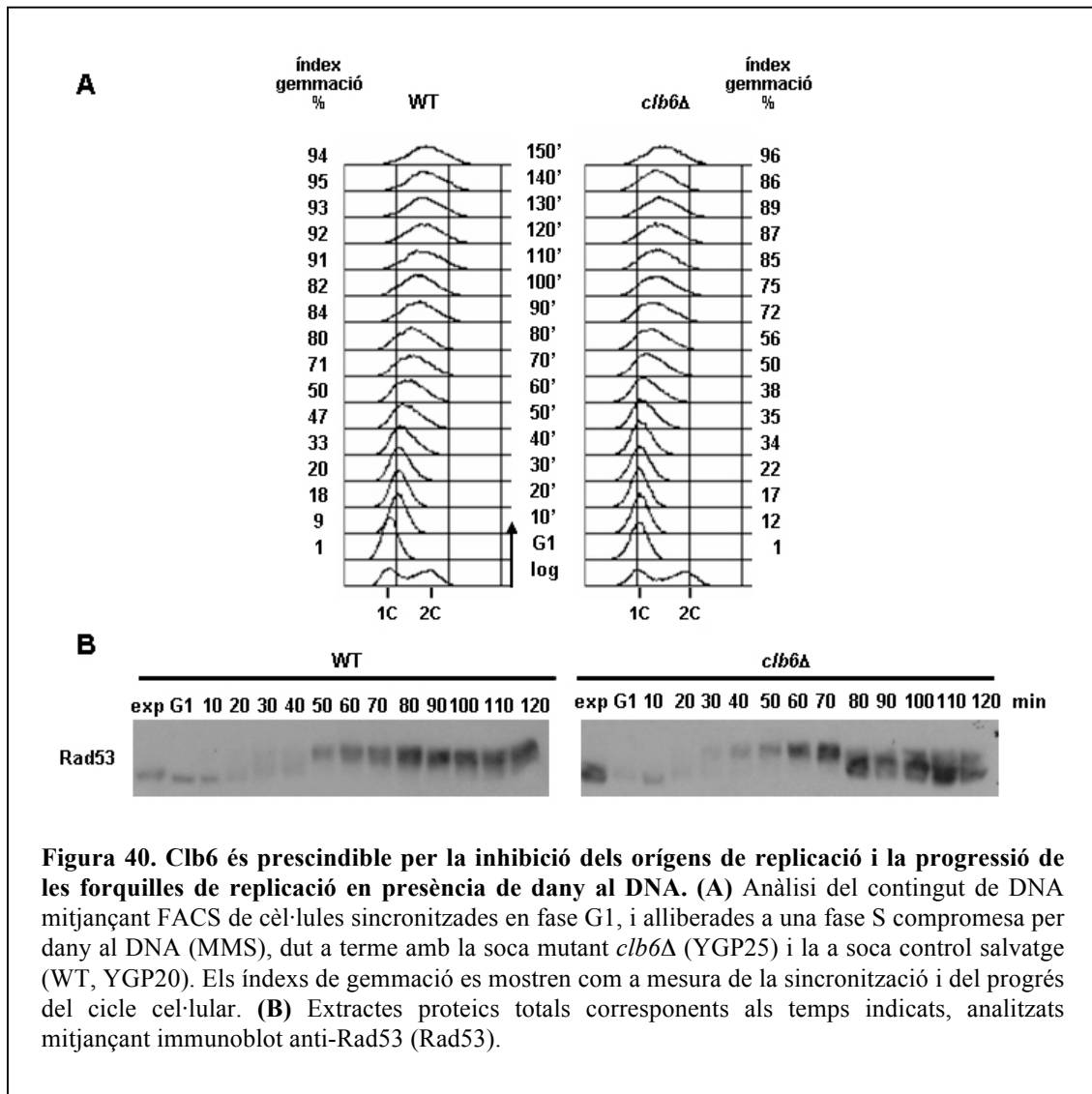
El mecanisme de vigilància de la fase S protegeix la replicació front a estrès genotòxic a dos nivells: bloquejant l'activació dels orígens de replicació tardans (Santocanale and Diffley 1998; Shirahige, Hori et al. 1998) i estabilitzant les forquilles de replicació provinents d'orígens primerencs aturades front una lesió al DNA (Tercero and Diffley 2001) o per estrès replicatiu. L'estrès replicatiu comporta l'aturada de la replicació, la qual

cosa no permet estudiar si aquesta protecció està efectada en algun d'aquests dos nivells. Per això, vam optar per abordar la possible implicació de Clb6 en algun d'aquests dos controls en presència de dany al DNA. A diferència de l'estrès replicatiu, en presència de dany al DNA la replicació progressa, degut a les forquilles provinents d'orígens primerencs, però ho fa lentament, degut a la inhibició dels orígens de replicació tardans (Tercero, Longhese et al. 2003). La pèrdua de control sobre l'estabilitat de les forquilles de replicació (amb la inhibició dels orígens inalterada) donaria lloc a una aturada total de la replicació. La pèrdua específica de control sobre els orígens de replicació, donaria lloc a una replicació ràpida, com succeeix en els mutants de checkpoint de la fase S malgrat la presència de dany al DNA (Tercero, Longhese et al. 2003). Finalment, la pèrdua simultània dels dos controls donaria lloc també a una replicació ràpida, per activació dels orígens de replicació, com succeeix en els mutants de checkpoint de la fase S malgrat la presència de dany al DNA (Paulovich and Hartwell 1995).

Cultius en creixement exponencial de la soca *clb6Δ* i de la corresponent soca control salvatge van ser sincronitzats en fase G1 amb la feromona α -factor, i després alliberats de forma sincrònica a una fase S en presència de 0,033% (v/v) metilmetanosulfonat (MMS). L'MMS genera dany per metilació al DNA, amb la consegüent activació del mecanisme de vigilància de la fase S (vegeu Materials i Mètodes punt 2.3 i 3.4). A partir d'aquí es van obtenir alíquotes durant aproximadament un temps de generació, en intervals de 10 minuts. Aquestes alíquotes es van usar per dur a terme l'anàlisi electroforètica de Rad53 (immunoblot) (vegeu Materials i Mètodes punts 5.1, 5.2 i 5.3), així com per l'anàlisi de la progressió del cicle cel·lular mitjançant l'índex de gemmació i la progressió del contingut de DNA per citometria de flux (FACS) (vegeu Materials i Mètodes punt 3.9).

Com s'observa a la Figura 40A, les cèl·lules van ser correctament sincronitzades a fase G1, d'acord al contingut 1C de DNA que s'observa en la citometria de flux i a l'índex de gemmació. Per altra banda, les cèl·lules van ser després correctament alliberades, i de forma sincrònica, a fase S, tal com indiquen la progressió de l'índex de gemmació i la lenta progressió del contingut de DNA. L'aparició de la forma hiperfosforilada, activa de Rad53 (Figura 40B) confirma la generació de dany al DNA.

En presència de dany al DNA la soca *clb6Δ* mostra un ritme de progressió de la replicació del DNA indistingible que el de la soca control salvatge (Figura 40A). Per tant, aquest resultat descarta que, en resposta a dany al DNA, Clb6 jugui un paper determinant en la inhibició dels orígens de replicació (la progressió de la replicació és tan lenta com la de la soca control salvatge), o en la progressió de les forquilles de replicació (la replicació és tan ràpida com la de la soca control salvatge).



3.1.2 *clb6Δ* manté la inhibició de l'activitat CDK-M en presència d'estrès replicatiu

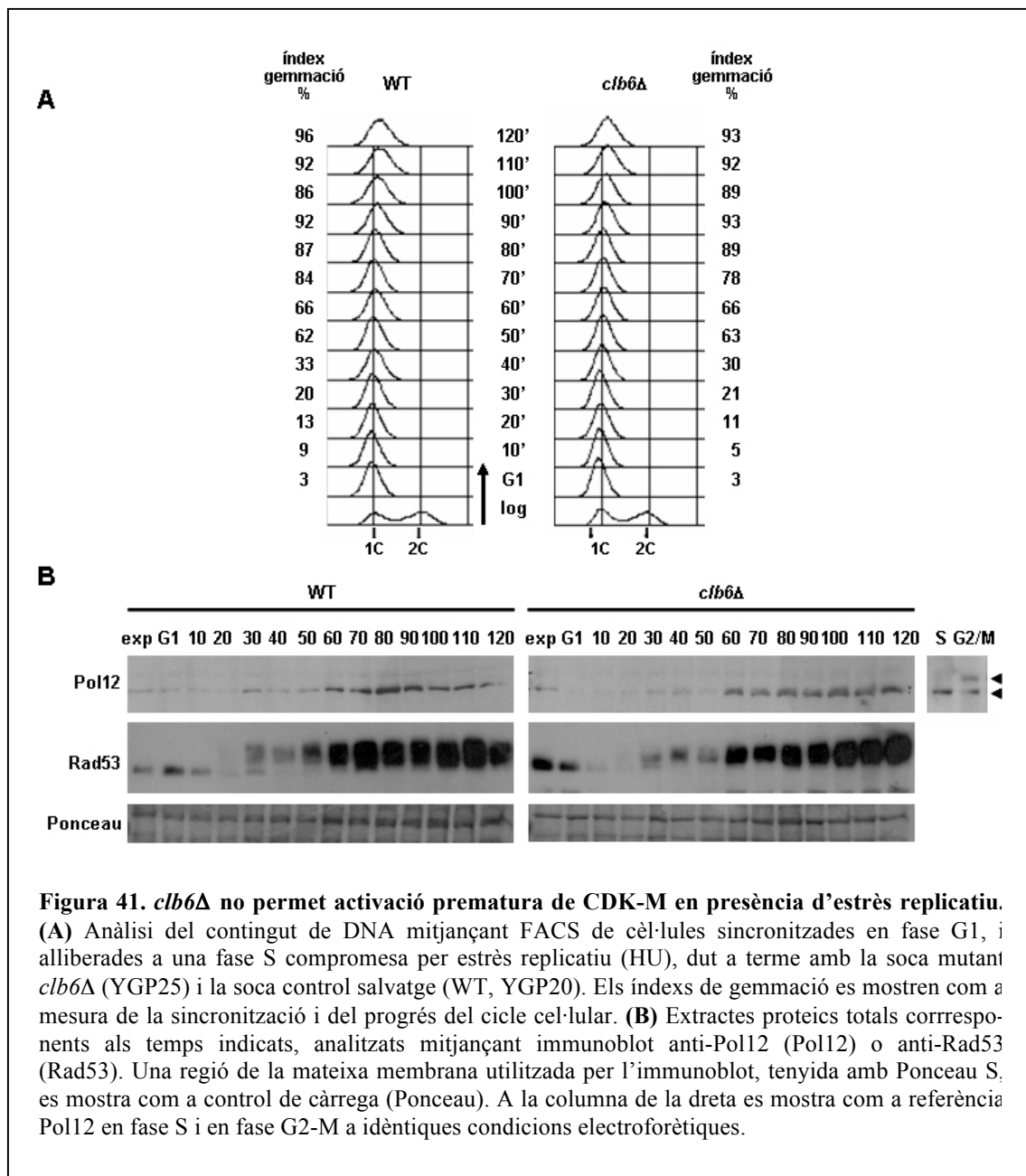
Donat que havia estat descrit que el mutant *clb6Δ* és incapaç mantenir inhibida l'activitat CDK de fase M en presència d'estrès replicatiu (Basco, Segal et al. 1995), vam voler explorar si aquesta funció justificaria l'estabilització dels nivells de Clb6 en resposta a estrès genotòxic. L'observació original havia estat feta mesurant l'activitat CDK associada a Clb2 en un assaig quinasa *in vitro*, amb la histona H1 com a substrat, a partir d'immunoprecipitats de soques que sobreexpressen CLB2. En el nostre cas vam optar per mesurar l'activitat CDK-M *in vivo* d'acord al patró de fosforilació de Pol12, la subunitat B de la DNA polimerasa α /primasa.

Cultius en creixement exponencial de la soca *clb6Δ* i de la corresponent soca control salvatge van ser sincronitzats en fase G1 amb la feromona α -factor, i després alliberats de forma sincrònica a una fase S en presència de 200 mM d'hidroxiurea (HU). L'HU genera estrès replicatiu, amb la consegüent activació del mecanisme de vigilància de la fase S (vegeu Materials i Mètodes punts 2.3 i 3.4). A partir d'aquí es van obtenir alíquotes durant aproximadament un temps de generació, en intervals de 10 minuts. Aquestes alíquotes es van usar per dur a terme l'anàlisi electroforètica de Pol12 i Rad53 (immunoblots) (vegeu Materials i Mètodes punts 5.1, 5.2 i 5.3), així com per l'anàlisi de la progressió del cicle cel·lular mitjançant l'índex de gemmació i la progressió del contingut de DNA per citometria de flux (FACS) (vegeu Materials i Mètodes punt 3.9).

Com s'observa a la Figura 41A, les cèl·lules van ser correctament sincronitzades a fase G1, d'acord al contingut 1C de DNA que s'observa en la citometria de flux i a l'índex de gemmació. Per altra banda, les cèl·lules van ser després correctament alliberades, i de forma sincrònica, a fase S, tal com indica la progressió de l'índex de gemmació.

L'aparició d'estrès replicatiu generat amb HU és controlada tant per la no progressió del contingut de DNA (Figura 41A), com per l'aparició de la forma hiperfosforilada activa de Rad53 (Figura 41B) (vegeu Introducció punt 4.2).

Com mostra l'immunoblot anti-Pol12 de la Figura 41B, en el mutant *clb6Δ* en presència d'estrès replicatiu, Pol12 roman en la seva forma hipofosforilada, sense que aparegui el doblet característic degut a fosforilació per CDK-M. Per tant, d'acord a aquest marcador, l'absència de Clb6 no permet l'aparició prematura d'activitat CDK-M.



3.1.3 Clb6 és prescindible per a la viabilitat front a estrès genotòxic

Per tal d'explorar si l'absència de Clb6 dona lloc a un defecte en la resposta a estrès genotòxic més enllà de l'estudiat als punts 3.1.1 i 3.1.2, vam analitzar si el mutant *clb6Δ* presenta sensibilitat en placa a estrès replicatiu o a dany al DNA.

Per això, vam realitzar dilucions seriades en medi ric en, en presència de 200 mM HU, o en presència de 0,022% (v/v) MMS. Vam comparar una soca mutant *clb6Δ*, una soca salvatge com a control no sensible, i una soca *mec1Δ* com a control de sensibilitat (vegeu Materials i Mètodes, punt 3.2).

Com s'observa a la Figura 42, *clb6Δ* no mostra pèrdua de viabilitat ni en presència d'HU, ni en presència d'MMS, i creix al mateix ritme que la soca salvatge, mentre que la soca *mec1Δ* no és viable en aquestes condicions.

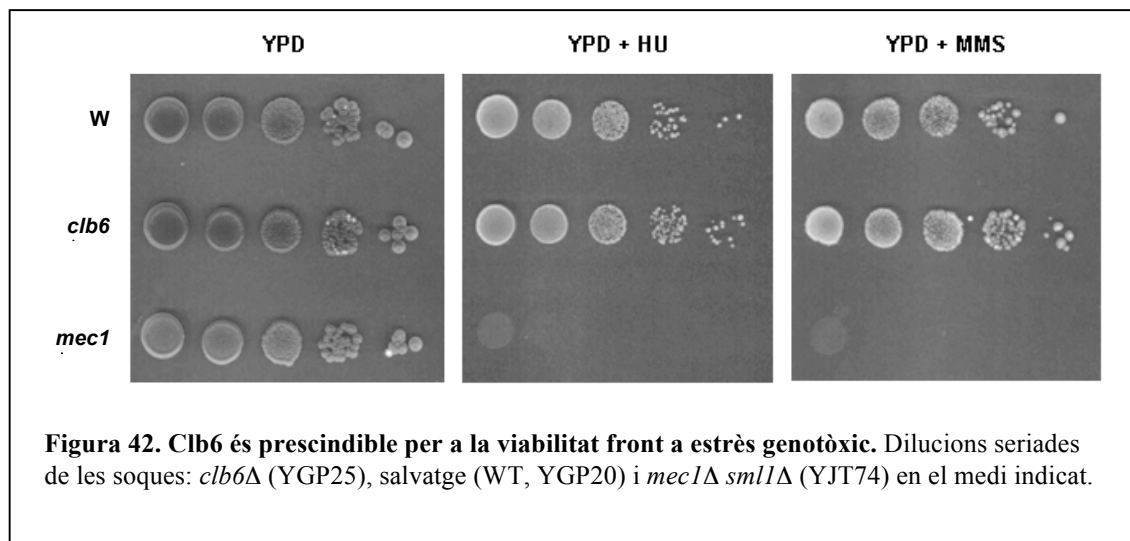


Figura 42. Clb6 és prescindible per a la viabilitat front a estrès genotòxic. Dilucions seriades de les soques: *clb6Δ* (YGP25), salvatge (WT, YGP20) i *mec1Δ sml1Δ* (YJT74) en el medi indicat.

Per tant, la deleció de Clb6 no afecta a la viabilitat de les cèl·lules front a estrès replicatiu o a dany per metilació del DNA.

3.1.4 La deleció de Clb6 no dona lloc a un defecte que activi Rad53

En un estudi a gran escala d'interaccions sintètiques, s'ha descrit que la doble mutació *clb6* i *rad53* presenta un defecte sintètic de creixement (Pan, Ye et al. 2006). Per aquest

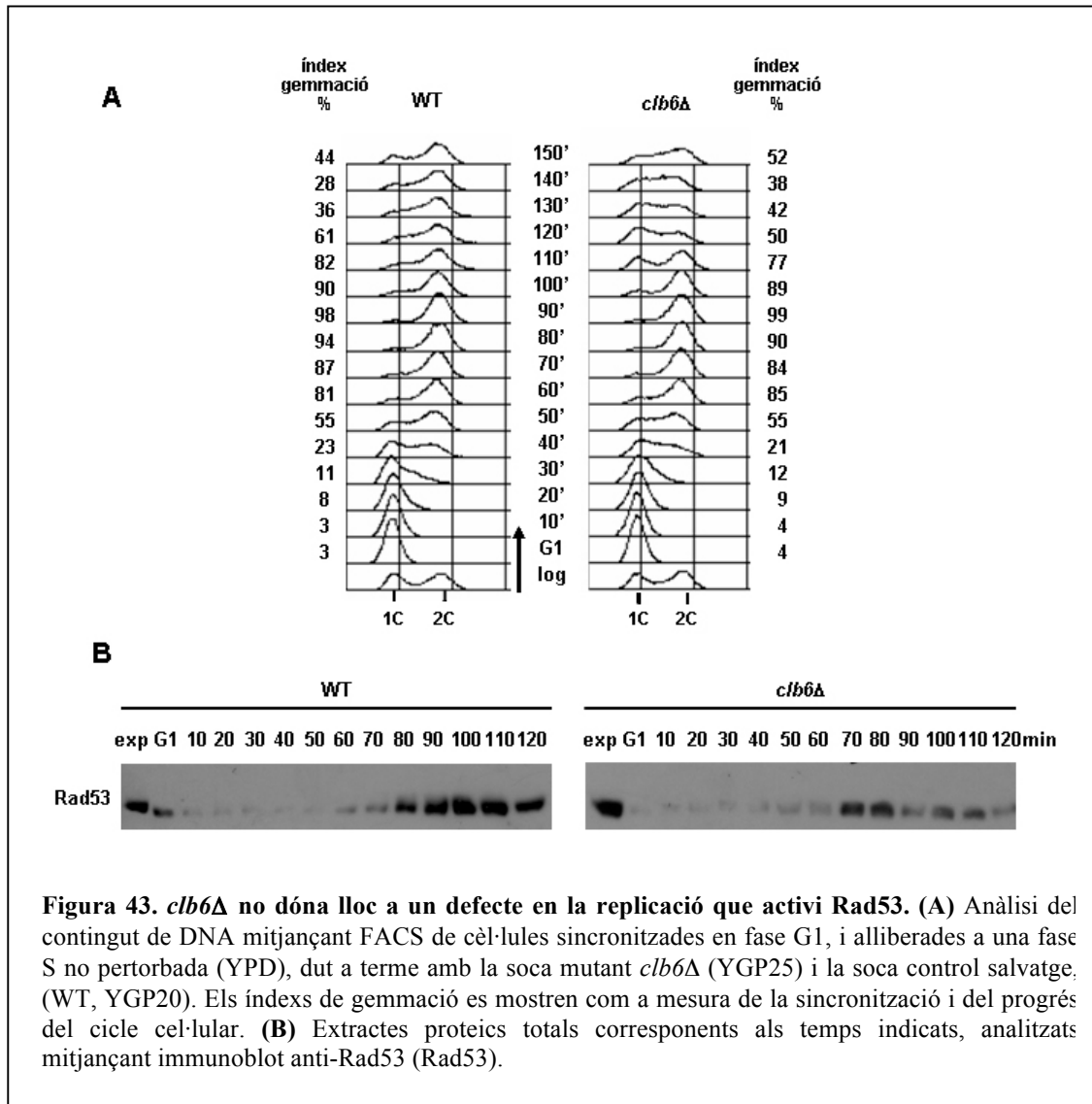
motiu vam decidir explorar si l'absència de Clb6 dóna lloc a l'activació del mecanisme de vigilància de la fase S en una fase S no pertorbada. La hipòtesi de treball essent que la pèrdua de capacitat d'estabilització dels nivells de Clb6 donaria lloc a un defecte indetectable fenotípicament, degut a que la resta de resposta del mecanisme de vigilància de la fase S roman intacta.

Cultius en creixement exponencial de la soca *clb6Δ* i del seu corresponent control salvatge, van ser sincronitzats en fase G1 amb la feromona α -factor, i després alliberats de forma sincrònica a una fase S no pertorbada en medi ric (YPD) (vegeu Materials i Mètodes punts 3.3). A partir d'aquí es van obtenir alíquotes durant aproximadament un temps de generació, en intervals de 10 minuts. Aquestes alíquotes, es van usar per dur a terme l'anàlisi electroforètica de Rad53 (immunoblot) (vegeu Materials i Mètodes punts 5.1, 5.2 i 5.3), així com per l'anàlisi de la progressió del cicle cel·lular mitjançant l'índex de gemmació i la progressió del contingut de DNA per citometria de flux (FACS) (vegeu Materials i Mètodes punt 3.9).

Com s'observa a la Figura 43A, les cèl·lules van ser correctament sincronitzades a fase G1, d'acord al contingut 1C de DNA que s'observa en la citometria de flux i a l'índex de gemmació. Per altra banda, les cèl·lules van ser després correctament alliberades, i de forma sincrònica, a fase S, tal com indiquen la progressió de l'índex de gemmació i, la progressió del contingut de DNA des de 1C a 2C.

Pel que fa a la implicació de Clb6 en la replicació, tal i com havia estat reportat amb anterioritat (Donaldson, Raghuraman et al. 1998), la deleció de la ciclina de fase S Clb6 en presència de Clb5 no afecta l'inici de la replicació, ni el ritme de progressió de la replicació (Figura 43A).

Per altra banda, l'absència de Clb6 no dóna lloc a una activació detectable de Rad53, d'acord amb la seva mobilitat electroforètica inalterada, ni en fase S, ni en les subsegüents fases del cicle cel·lular (Figura 43B).



Per tant, malgrat la descrita interacció sintètica *clb6 rad53* (Pan, Ye et al. 2006), el possible defecte produït per absència de Clb6 no dona lloc a la plena activació de Rad53 que es correlaciona amb la seva forma hiperfosforilada (vegeu Introducció punt 4.2)

3.2 Aproximació complementària: efecte de la sobreexpressió de Clb6 en una fase S no pertorbada

Que el mutant *clb6* Δ no presenti un defecte obvi en la resposta a estrès genotòxic no exclou que Clb6 hi jugui un paper. Altres processos crítics com són la inhibició de la re-replicació (Nguyen, Co et al. 2001), o la inhibició de la síntesi d'histones (Singh, Paik et al. 2009), estan controlats per múltiples vies redundants o solapades, de manera que la mutació d'una sola no dóna lloc a cap fenotip obvi.

Per tant, vam optar per l'aproximació complementària: estudiar l'efecte de la presència continuada de Clb6 en un cicle cel·lular no pertorbat. Amb aquesta aproximació, en absència d'estrès genotòxic, i sense l'emascament degut a la resposta massiva mediat pel mecanisme de vigilància de la fase S, podria ser possible desvetllar per què la cèl·lula elimina Clb6 a mitja fase S en condicions normals, i el paper de la seva estabilització en una fase S compromesa.

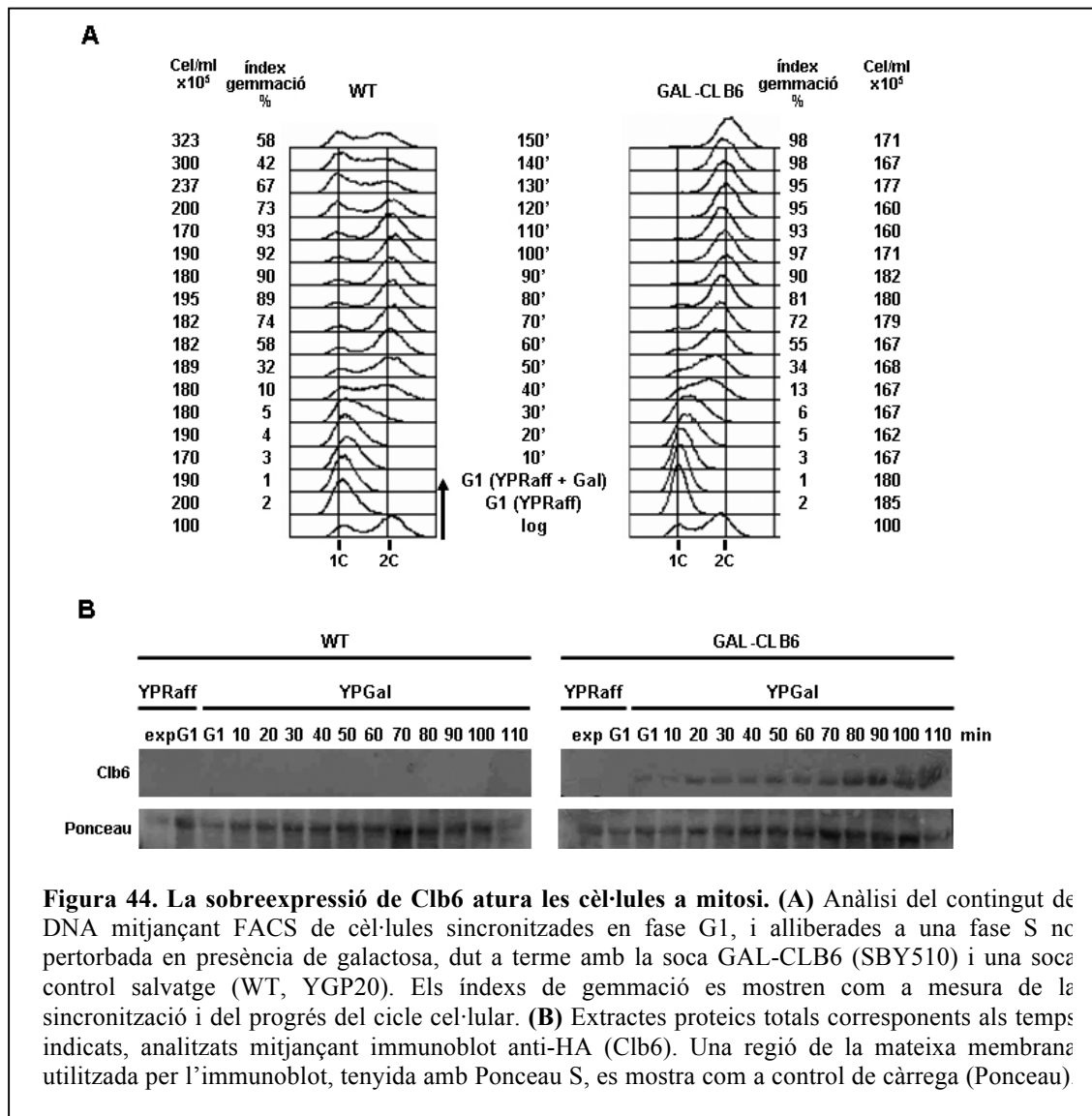
3.2.1 La sobreexpressió de CLB6 atura les cèl·lules a mitosi

Per posar de manifest el paper de Clb6, vam estudiar l'efecte de l'acumulació de Clb6, impedit la seva desaparició, en una fase S no pertorbada.

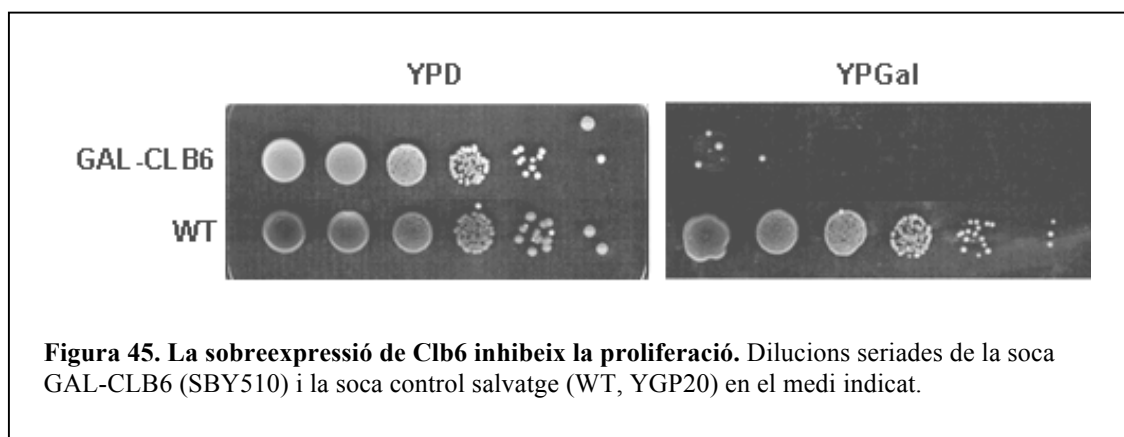
La soca GAL-CLB6 i una soca control salvatge, en creixement exponencial en medi YPRaff, van ser sincronitzades en fase G1 amb la feromona α -factor. Mantenint l' α -factor i la rafinosa, es va addicionar un 2% de galactosa (YPSucr + Gal) al medi i es va incubar durant 30 minuts. A continuació, les cèl·lules van ser alliberades de forma sincrònica a una fase S no pertorbada en presència de galactosa (YPGal) (vegeu Materials i Mètodes punt 3.6). A partir d'aquí es van obtenir alíquotes durant 150 minuts, en intervals de 10 minuts. Aquestes alíquotes, es van usar per dur a terme l'anàlisi de la progressió del cicle cel·lular mitjançant l'índex de gemmació, la densitat cel·lular i la progressió del contingut de DNA per citometria de flux (FACS) (vegeu Materials i Mètodes punt 3.9). L'anàlisi electroforètica de Clb6 (immunoblot) (vegeu Materials i Mètodes punts 5.1, 5.2 i 5.3), es va usar com a control de l'acumulació de la ciclina.

Les cèl·lules van ser correctament sincronitzades a fase G1, d'acord al contingut 1C de DNA que s'observa en la citometria de flux i a l'índex de gemmació (Figura 44A). Per altra banda, les cèl·lules van ser després correctament alliberades, i de forma sincrònica, a fase S, tal com indiquen la progressió de l'índex de gemmació i la progressió del contingut de DNA (Figura 44A). La Figura 44B mostra l'efectiva acumulació de Clb6 expressada sota el promotor GAL1,10 induït amb galactosa.

Com s'observa a la Figura 44A, les dues soques entren en fase S alhora, tal com indiquen la progressió de l'índex de gemmació i l'inici de la replicació. En canvi, mentre que les cèl·lules control salvatge es divideixen amb normalitat, les cèl·lules que sobreexpressen Clb6 s'aturen amb un contingut 2C de DNA i no es divideixen. L'estabilització de l'índex de gemmació i de la densitat cel·lular confirmen l'aturada. A més, l'anàlisi microscòpica (vegeu Materials i Mètodes punt 3.10) mostra que les cèl·lules estan aturades amb una sola massa nuclear i que, per tant, l'aturada és prèvia a l'anafase.



Aquesta aturada contrasta amb la manca d'efecte de la sobreexpressió de Clb5 que proliferen a un ritme similar al de les cèl·lules control salvatge (Jacobson, Gray et al. 2000). A més, les cèl·lules GAL-CLB5 creixen en plaques de YPGal (Jacobson, Gray et al. 2000), en clar contrast amb la nostra observació amb les cèl·lules GAL-CLB6 (vegeu Figura 45).



Per determinar si aquesta aturada es manté a temps superiors i si és reversible, vam reproduir l'experiment descrit a la Figura 44, però en aquest cas prenent alíquotes cada 20 minuts, durant 240 minuts, i a continuació vam tancar l'expressió de Clb6 amb glucosa (*glucose shut-off*).

La Figura 46 mostra que l'aturada en mitosi persisteix, en les cèl·lules que sobreexpressen Clb6, 240 minuts després d'alliberar de l' α -factor. Aquesta aturada és reversible, tal i com reflexen l'increment de densitat (vegeu Materials i Mètodes 3.1) i l'oscil·lació de l'índex de gemmació després de reprimir l'expressió de Clb6.

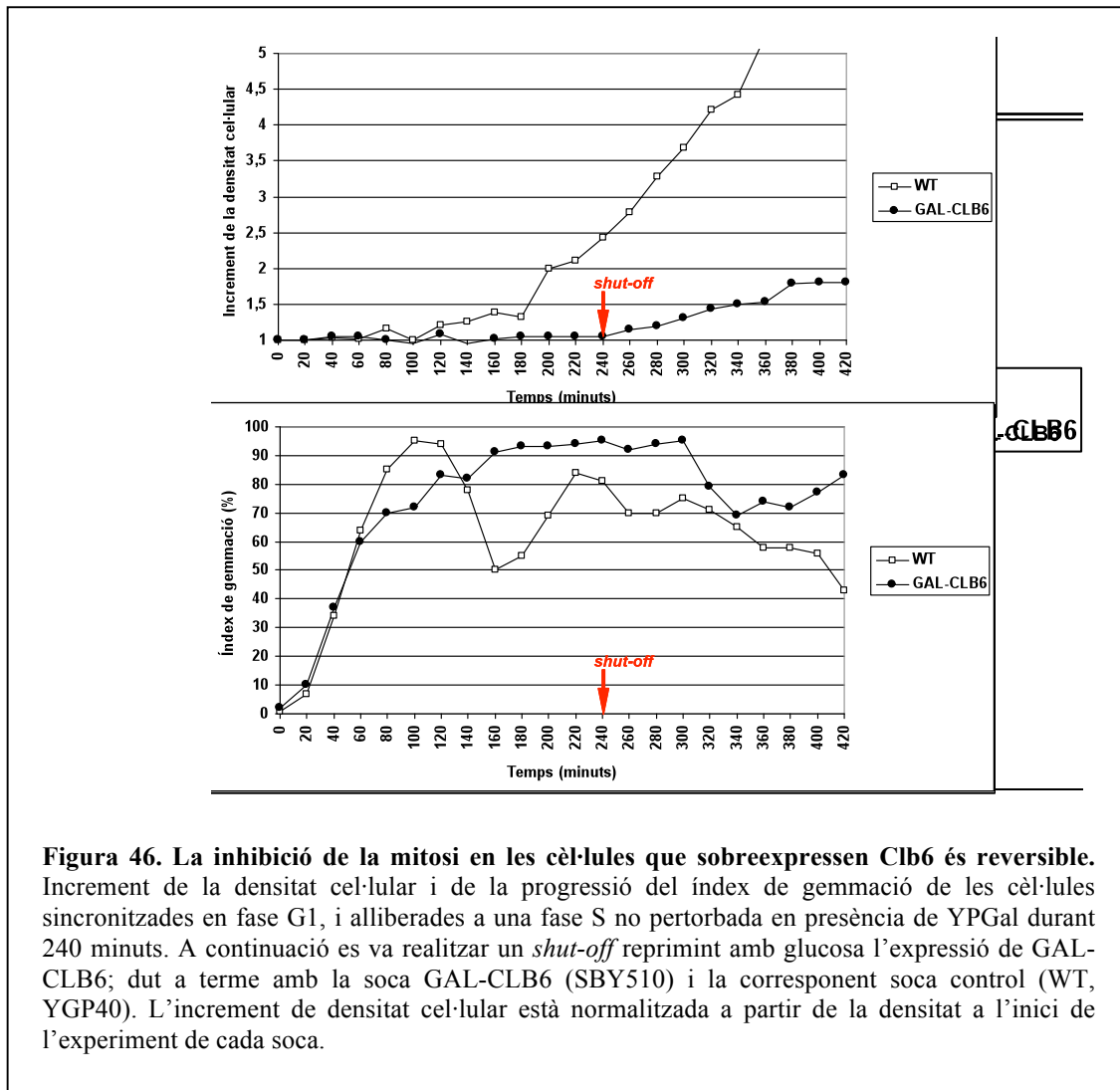
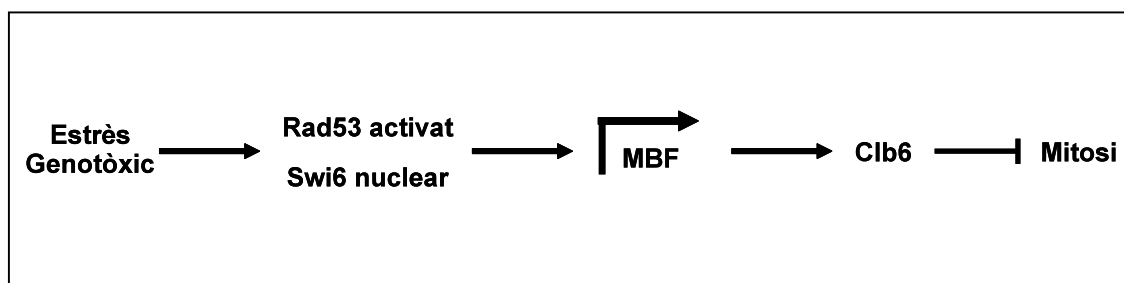


Figura 46. La inhibició de la mitosi en les cèl·lules que sobreexpressen Clb6 és reversible. Increment de la densitat cel·lular i de la progressió del índex de gemmació de les cèl·lules sincronitzades en fase G1, i alliberades a una fase S no pertorbada en presència de YPGal durant 240 minuts. A continuació es va realitzar un *shut-off* reprimint amb glucosa l'expressió de GAL-CLB6; dut a terme amb la soca GAL-CLB6 (SBY510) i la corresponent soca control (WT, YGP40). L'increment de densitat cel·lular està normalitzada a partir de la densitat a l'inici de l'experiment de cada soca.

DISCUSSIÓ

1 A partir dels resultats originals d'aquest treball de tesi proposem el següent model:



El mecanisme de vigilància de la fase S estabilitza els nivells de la ciclina de fase S Clb6 en resposta a estrès genotòxic

A partir d'identificar la ciclina de fase S Clb6 com a substrat fosforilat directament per Rad53 *in vitro*, identifiquem que efectivament existeix un control de Clb6 dependent de Rad53 *in vivo* en una fase S compromesa.

El radio-assaig quinasa *in vitro* que ha permès identificar Clb6 com a substrat de Rad53 ha mostrat ser, fins al moment, altament específic pel que fa a falsos positius: les proteïnes positives en l'assaig han estat dianes prèviament conegudes (com Dbf4), o noves dianes que han estat posteriorment confirmades *in vivo* (com és el cas de Clb6, entre d'altres actualment en estudi en el laboratori). Desconeixem la seva qualitat pel que fa a falsos negatius.

La presència d'estrès replicatiu o de dany per metilació del DNA dóna lloc a l'estabilització dels nivells de Clb6. Fins molt recentment es considerava que les dues ciclins de fase S, expressades sota el control d'MBF després d'Start, a fase G1, eren presents a la cèl·lula fins a l'activació de la ubiquitin-lligasa APC, a mitosi. Avui sabem, però, que això que és cert per a Clb5 no ho és per a Clb6, que és eliminada en fase S per SCF^{Cdc4} (Jackson, Reed et al. 2006). Els nostres resultats mostren que, en presència d'estrès genotòxic, Clb6 perdura més enllà de la seva curta finestra de temps al voltant de la transició G1-S.

Aquesta estabilització és, a més, dependent del mecanisme de vigilància de la fase S: tant de la quinasa transductora central Mec1, com de la quinasa efectora Rad53. En el mutant *mec1* la desaparició de Clb6 en una fase S compromesa no és tan dràstica com en els mutants *rad53*. No obstant, el comportament de Clb6 ja apareix alterat en el mutant *mec1* en una fase S no pertorbada, mostrant una major estabilitat de Clb6. Si bé desconeixem el motiu d'aquesta major estabilitat, cal tenir present que la deleció de Mec1 selecciona sistemàticament la duplicació del cromosoma IV (Gasch, Huang et al. 2001). Aquesta duplicació implica un augment de dosi en multitud de factors que poden afectar els nivells de Clb6: RNA polimerases, proteïnes implicades en el silenciament gènic, reguladors d'activitat ubiquitin-lligasa/proteasoma, etc.

Pel que fa a l'altra ciclina de fase S, no hem estat capaços d'identificar Clb5 com a substrat de Rad53 *in vitro*. Si bé en aquest cas la quantitat limitant de substrat pot haver donat lloc a un fals negatiu, l'anàlisi per immunoblot d'extractes de cèl·lules exposades a estrès replicatiu no mostra tampoc alteracions apreciables, ni en la mobilitat de Clb5 ni en els seus nivells, respecte a una fase S no pertorbada.

L'estabilització de Clb6 requereix síntesi *de novo*

Si bé la fosforilació per Rad53 identificada *in vitro* podia fer pensar en una estabilització directa de la ciclina, els experiments en que s'inhibeix la síntesi proteica amb cicloheximida mostren que la presència continuada de Clb6 no és deguda a l'estabilització de la proteïna, sinó que és el resultat del balanç entre un recanvi (*turnover*) que segueix molt elevat, i la síntesi *de novo*, a favor d'aquesta darrera.

Aquesta observació descarta a més que l'estabilització sigui deguda a la inhibició de l'activitat de la ubiquitin-lligasa SCF^{Cdc4} pel mecanisme de vigilància de la fase S.

La transcripció de les ciclines de fase S es dona exclusivament en fase G1, sota el control d'MBF, un factor de transcripció que opera característicament en fase G1, essent inactivat quan les cèl·lules entren en fase S (Nasmyth 1983; Sidorova, Mikesell et al. 1995; Queralt and Igual 2003; Geymonat, Spanos et al. 2004; de Bruin, Kalashnikova et al. 2006). Per altra banda, com és habitual en una proteïna inestable i de presència regulada en el cicle cel·lular, l'mRNA de CLB6 és inestable, desapareixent en fase S (Schwob and Nasmyth

1993). Per tant, el fet que l'eliminació de la cicloheximida permeti la reparició de Clb6 confirma que el mecanisme de vigilància de la fase S promou la síntesi de nova Clb6, i no d'un factor necessari per estabilitzar Clb6.

Això implica que el mecanisme de vigilància de la fase S reactiva la transcripció de CLB6 i/o que estabilitza el seu mRNA. La transcripció de Clb6 en una fase S compromesa implicaria, per tant, o bé la sorprenent reactivació d'MBF en fase S, o bé la d'un factor de transcripció alternatiu, no identificat, capaç de transcriure Clb6 en una fase S compromesa per estrès genotòxic. De no implicar transcripció, el mecanisme de vigilància de la fase S hauria d'actuar estabilitzant el transcrit de CLB6.

L'estabilització dels nivells de Clb6 requereix activitat MBF en fase S

Per identificar la dependència d'MBF ha calgut vèncer dues barreres conceptuals. La primera la visió d'MBF (i d'SBF) com a factors de transcripció que operen exclusivament en fase G1. La segona, la reportada exclusió nuclear de Swi6 en fase S, la subunitat transactivadora d'MBF (i d'SBF), com a mecanisme d'inactivació de l'activitat transcripcional de fase G1.

Per aquest motiu, la primera qüestió que ens vam plantejar abordar cronològicament a aquest respecte va ser investigar si Swi6, que en una fase S no pertorbada és exclòs del nucli (Geymonat, Spanos et al. 2004), és nuclear en una fase S compromesa per estrès genotòxic. Contra pronòstic, aquest resulta ser el cas.

No obstant, vist des d'ara, és possible que aquesta condició no fos necessària: en les nostres mans no observem mai un patró d'exclusió nuclear total de Swi6 en una fase S no pertorbada, sinó un senyal cel·lular general difús (vegeu Figura 29; aquest senyal no és soroll de fons –vegeu la Figura 30 a idèntiques condicions de preparació i d'exposició). Si bé no aportem suport experimental en aquest sentit, és possible que només la fracció de Swi6 associada a SBF, però no l'associada a MBF, experimenti exclusió nuclear en una fase S no pertorbada. A aquest respecte ha estat descrit que l'exclusió nuclear és necessària per al llicenciament de Swi6 per a l'activitat SBF a la següent fase G1, però dispensable per a l'activitat MBF (Queralt and Igual 2003). Possiblement tampoc no sigui

necessària per a la inactivació d'MBF, que compta amb un repressor específic en fase S, Nrm1 (de Bruin, Kalashnikova et al. 2006).

En qualsevol cas, el senyal de Swi6 esdevé intensament nuclear en fase S sotmesa a estrès replicatiu.

Aquest treball de tesi també ha donat lloc a dues observacions inesperades pel que fa a la resposta canònica a estrès genotòxic. En primer lloc, la deleció de Dun1, la quinasa sota Rad53 que media la resposta transcripcional a estrès genotòxic coneguda fins al moment (Huang, Zhou et al. 1998; Gasch, Huang et al. 2001), no afecta a l'estabilització de Clb6 en resposta a estrès replicatiu. De fet, l'estudi genòmic que investiga la resposta transcripcional a estrès genotòxic mediada per Mec1 i Dun1, no identifica ni Clb6 ni altres gens regulats per MBF (Gasch, Huang et al. 2001). En segon lloc, la localització nuclear de Swi6 en una fase S compromesa és independent de Mec1 i de Rad53. Aquesta observació contrasta amb el fet que Swi6 sigui substrat de Rad53 (Sidorova and Breeden 1997) (discutit més endavant).

El fet que l'estabilització dels nivells de Clb6 en una fase S compromesa sigui dependent de Rad53 i d'MBF, però que la presència nuclear de Swi6 sigui independent de Rad53 es pot reconciliar si considerem que la reactivació d'MBF en fase S requereix no només Swi6 nuclear, sinó també superar la repressió exercida per Nrm1. Quan aquest treball de tesi estava en fase de conclusió, el grup de Curt Wittenberg va reportar que al llevat de fissió *S. pombe*, el checkpoint de la fase S inactiva nrm1 en resposta a estrès replicatiu (de Bruin, Kalashnikova et al. 2008). De confirmar-se aquesta regulació en el llevat de gemmació, aquest punt de control seria suficient perquè l'expressió de Clb6 en resposta a estrès genotòxic fos dependent de Rad53.

Paper de Clb6 en la resposta a estrès genotòxic

Hauria ajudat a determinar el paper de l'estabilització dels nivells de Clb6 en resposta a estrès genotòxic conèixer la funció específica d'aquesta ciclina de fase S respecte Clb5. Malauradament la informació existent sobre Clb6 és mínima. Això és degut al fet que, de les dues ciclines de fase S, Clb5 i Clb6, la deleció *clb6* Δ no presenta un fenotip obvi, mentre que la deleció *clb5* Δ allarga dràsticament la durada de la replicació dels cromosomes (Donaldson, Raghuraman et al. 1998). No ha estat fins recentment que s'ha

descobert que Clb6 és específicament eliminada en fase S, en forma mediada per la ubiquitin-ligasa SCF^{Cdc4} (Jackson, Reed et al. 2006), i no a mitosi per APC com és el cas de Clb5. Aquesta diferència, a més de donar una explicació al fet que Clb6 pugui activar orígens de replicació primerencs però no tardans (i per tant explicar el fenotip dels mutants *clb5*), apunta a que Clb6 jugui un paper específic important en el control del cicle cel·lular (al marge de la improbable conservació sota pressió darwiniana d'una ciclina prescindible): per què la cèl·lula ha restringit la presència de Clb6 a una finestra de temps tan curta a l'entorn de la transició G1-S? Per què la permanència de Clb6 més enllà de mitja fase S (en una fase S no pertorbada) representaria un problema tal que requereix la seva eliminació avançada? Aquesta pauta, a més, està conservada a mamífers, on de les ciclins E i A, capaces d'iniciar la replicació, la ciclina E és eliminada per SCF^{Cdc4} en fase S (Strohmaier, Spruck et al. 2001).

Clb6 ha estat implicada en l'exclusió nuclear de Swi6 (Geymonat, Spanos et al. 2004). Aquesta exclusió és necessària pel llicenciament de l'activitat transcripcional dependent d'SBF (Queralt and Igual 2003). No obstant, aquesta funció no justifica que la cèl·lula hagi d'eliminar Clb6 a mitja fase S, en comptes de fer-ho alhora que Clb5, a través d'APC a anafase. En canvi, podria ser un de les raons per estabilitzar els nivells de Clb6: de cara a excloure Swi6 del nucli un cop l'estrès genotòxic ha estat superat.

Com reconciliar una funció rellevant amb la manca de fenotip dels mutants *clb6*? A la vista que Clb6 forma part de la resposta mediada pel *checkpoint* de la fase S a estrès genotòxic, hem sondejat el possible fenotip del mutant *clb6Δ* en una fase S compromesa. No hem pogut, però, identificar un defecte que suggereixi una funció específica de Clb6, ni que expliqui el benefici de l'estabilització de la seva presència en resposta a estrès genotòxic. És possible que Clb6 no estigui implicada en els processos estudiats, o que Clb6 constitueixi una de diverses vies de control solapat (*redundant*), de manera que la disrupció d'una sola d'aquestes vies no doni lloc a un fenotip detectable. Aquesta situació es dona en el control d'altres processos crítics, tals com la inhibició de la re-replicació (Nguyen, Co et al. 2001), o la inhibició de la síntesi d'histones (Singh, Paik et al. 2009), en les que la disrupció d'una sola via de control no dona lloc a un fenotip detectable.

La interacció genètica entre Rad53 i Clb6 presenta un defecte sintètic de creixement (Pan, Ye et al. 2006). Aquesta interacció revela un cop més que Clb6 juga un paper rellevant. El

defecte sintètic podria ser compatible amb que l'absència de Clb6 doni lloc a un malfuncionament (en una fase S no pertorbada) que requereixi una resposta mediada per Rad53. La intervenció de Rad53 faria que aquest defecte fos indetectable, mentre que en absència de Rad53 el defecte seria suficient com per afectar el creixement. De donar-se mediació de Rad53 hauria de ser transitòria, ja que els mutants *clb6Δ* no presenten un creixement alentit (Basco, Segal et al. 1995) i nosaltres no detectem l'aparició de les formes hiperfosforilades de Rad53 que es correlacionen amb la seva plena activació.

Donada la manca de resultats de la genètica reversa, vam optar per una aproximació complementària: estudiar l'efecte de la presència continuada de Clb6 en una fase S no pertorbada. Vam raonar que ara, sense l'emascament degut a l'activació de vies de control solapades (*redundants*) sota el mecanisme de vigilància de la fase S, podria ser possible posar al descobert el paper de Clb6.

Un experiment obvi que no pot ser abordat és estudiar si la sobreexpressió de Clb6 rescata parcialment la letalitat dels mutants *rad53* a baixes dosis d'agents genotòxics. Malauradament aquesta aproximació no és possible ja que la sobreexpressió de Clb6 inhibeix el creixement per si sola.

Els experiments de progressió en el temps confirmen que la sobreexpressió de Clb6 en una fase S no pertorbada bloqueja el cicle cel·lular amb un contingut aparentment completament replicat de DNA. Les cèl·lules progressen a anafase de forma alentida comparades amb les control, i no es divideixen. Si bé desconeixem el mecanisme que media el bloqueig de la mitosi, afavorim que no es tracti d'un efecte directe, sinó el resultat d'afectar un procés previ: si Clb6 jugués un paper *feed-forward* a llarga distància, no seria necessari un mecanisme d'eliminació específic previ a APC. La destrucció de Clb6 a mitja fase S en un cicle no pertorbat apunta més bé a un control exercit sobre un esdeveniment de la transició G2-M.

Precisament a favor d'un paper de Clb6 en el control de G2-M, el grup d'Steve Reed havia publicat que els mutants *clb6* presenten unes fases G1 i G2 més curtes i que, en conseqüència proliferen més ràpidament que els controls isogènics salvatges (Basco, Segal et al. 1995). A nivell de creixement de dilucions seriades en placa, nosaltres no som capaços d'apreciar diferències en el ritme de creixement degudes a la deleció de Clb6.

Tampoc som capaços de confirmar *in vivo* la seva observació *in vitro* que els mutants *clb6Δ* perden la capacitat de reprimir l'activitat CDK-M en resposta a estrès replicatiu (Basco, Segal et al. 1995). No obstant, l'experiment del grup d'Steve Reed implica la sobreexpressió de CLB2 i és possible que els nivells assolits en alguns casos depassin el llindar d'estabilitat de Swe1 (Asano, Park et al. 2005; Harvey, Charlet et al. 2005). De fet els nivells de Clb2 que s'observen en els extractes cel·lulars totals corresponents al mutant *clb6Δ*, són superiors als assolits en la soca control salvatge (Basco, Segal et al. 1995).

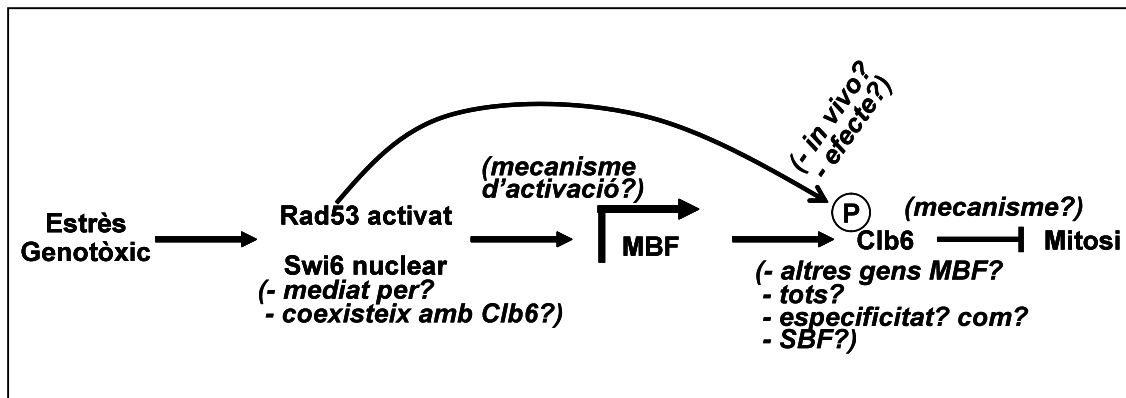
Finalment, donat que per mantenir la presència de la ciclina més enllà de la finestra de temps a la qual és present en una fase S no pertorbada ha calgut recórrer a la seva sobreexpressió, no podem descartar que l'efecte observat, l'aturada del cicle cel·lular a mitosi, sigui artificial. Tanmateix diferents consideracions ho fan poc probable. Per exemple, l'acumulació de Clb6 podria titrar Cdc28, fent-la inaccessible a la ciclina promotora de la mitosi, Clb1,2. Tanmateix, la sobreexpressió de Clb5 sota el mateix promotor induïble per galactosa no bloqueja la divisió cel·lular en mitosi, ni impedeix el creixement en plaques de YPGal (Jacobson, Gray et al. 2000) com sí que ocorre amb la sobreexpressió de Clb6 (tot i que Clb5 presenta una vida mitja en fase S superior a la de Clb6, i que per tant sobreexpressada sota el mateix promotor és d'esperar que doni lloc a l'acumulació d'uns nivells superiors de proteïna). Una altra font artificial podria provenir de l'acumulació d'uns nivells de Clb6 pre-Start suficientment elevats com per superar la capacitat de l'inhibidor de l'activitat CDK-S Sic1. En aquest cas l'activitat CDK-S prematura podria inhibir parcialment la transcripció dependent d'SBF i MBF, i això tenir conseqüències de llarg abast en la progressió del cicle cel·lular. Tanmateix és destacable el fet que les cèl·lules que sobreexpressen Clb6 gemmen puntualment i amb ritme normal, inicien la replicació puntualment, i el procés de replicació no es veu alentit.

El cas de Clb6: una resposta transcripcional amb efecte immediat?

La resposta del mecanisme de vigilància de la fase S es dona a dos nivells. Per una banda, una resposta immediata, basada en la fosforilació directa de proteïnes diana per part de les quinases transductores i efectores, amb l'objectiu fonamental d'aturar la progressió del cicle cel·lular i protegir la replicació. I per altra banda, una resposta transcripcional, gradual, amb l'objectiu de respondre adequadament l'estrès i al dany. Considerem que el cas de Clb6 pot constituir, des del punt de vista temporal, un cas singular, ja que és estable

en fase S per un període de temps coincident amb el que requereix l'activació del checkpoint de la fase S. D'aquesta manera, donat el seu elevat recanvi (*turnover*), la ciclina produïda per l'activació transcripcional mediada pel checkpoint substitueix la ciclina original, amb el resultat que els nivells de Clb6 es mantenen constants sense temps de latència.

2 A partir dels resultats d'aquest treball de tesi, s'obren els següents interrogants:



Es produeix activació canònica d'MBF en una fase S compromesa?

Que l'estabilització dels nivells de la ciclina de fase S Clb6 requereixi activitat MBF no prova que en resposta a estrès genotòxic es produeixi una activació canònica d'MBF. No obstant, a l'agost de 2008, quan ja havíem arribat a la conclusió que l'estabilització dels nivells de Clb6 en una fase S compromesa requereix activitat MBF, el grup de Curt Wittenberg va reportar que al llevat de fissió *S. pombe*, el checkpoint de la fase S reactiva MBF en resposta a estrès replicatiu (de Bruin, Kalashnikova et al. 2008). Aquesta observació ha estat després confirmada, també en *S. pombe*, pel grup de Nicholas Rhind (Dutta, Patel et al. 2008). Aquest segon treball mostra que els 17 gens regulats per MBF a fase G1 a *S. pombe* són induïts a una fase S sotmesa a estrès replicatiu.

Això inclou la ciclina *cig2*, anàloga funcional i de comportament a Clb5. En canvi, nosaltres no observem acumulació de Clb5, a *S. cerevisiae*, en resposta a estrès replicatiu,

malgrat que l'expressió d'aquesta ciclina de fase S també depèn d'MBF (Schwob and Nasmyth 1993; Donaldson, Raghuraman et al. 1998), i malgrat que experiments de *shut-off* mostren que el recanvi de Clb5 està disminuït en resposta a estrès genotòxic (Germain, Hendley et al. 1997). Un patró d'expressió dependent d'MBF diferent en una fase S compromesa respecte al de fase G1, és fàcil de conceptualitzar sobre la base que els promotors de diferents gens regulats per MBF poden presentar diferències a nivell de llocs d'unió de corepressors o coactivadors. La unió d'un corepressor, distint de Nrm1, no responsiu al checkpoint de la fase S, permetria mantenir inactiva la transcripció d'aquell subgrup de gens regulats per MBF l'expressió dels quals seria innecessària, o desavantatjosa, en la resposta a estrès genotòxic.

Finalment, no sabem tampoc si Swi6 nuclear en una fase S compromesa implica la reactivació també de la transcripció dependent d'SBF en resposta a estrès genotòxic.

Es produeix fosforilació de Clb6 per Rad53 *in vivo*?

La connexió entre Clb6 i la resposta a estrès genotòxic s'inicia amb la identificació de Clb6 com a substrat de Rad53 *in vitro*. Malgrat que s'ha confirmat que en resposta a una fase S compromesa es dona l'estabilització dels nivells de Clb6 en forma dependent de Rad53, no hem demostrat que Rad53 fosforili directament Clb6 *in vivo*. Un fet que complica extraordinàriament l'estudi de dianes de Rad53 en *Saccharomyces cerevisiae* és l'absència d'una seqüència consens de fosforilació com la que existeix per als seu ortòlegs Chk1 i Chk2 en altres espècies (R-X-X-S/T). La col·lecció de llocs reals fosforilats per Rad53, identificats per anàlisis proteòmiques, no mostren cap preferència per aquesta seqüència, ni per seqüències degenerades (vegeu per exemple (Smolka, Albuquerque et al. 2005; Sweeney, Yang et al. 2005; Chen, Smolka et al. 2007)). La identificació de fosforilacions requereix en aquest cas l'aplicació d'anàlisis proteòmiques que (en la nostra experiència amb Dbf4, col·laborant amb laboratoris líders internacionals) no garanteixen la identificació de tots els llocs fosforilats.

A favor de la fosforilació de Clb6 per Rad53 *in vivo*, durant el transcurs del treball d'aquesta tesi es va publicar els resultats d'un abordatge proteòmic a gran escala per identificar dianes de la resposta a dany al DNA en cèl·lules humanes (Matsuoka, Ballif et al. 2007). L'aproximació seguida per aquests autors parteix de proteïnes fosforilades en

SQ/TQ, la seqüència reconeguda per les quinases ATM/ATR, ortòlogues de Mec1 en *Saccharomyces cerevisiae*. Entre les proteïnes identificades hi ha la ciclina E, anàloga funcional i de comportament de Clb6. Si bé aquesta fosforilació seria deguda a ATM/ATR (Mec1), i no a les quinases efectores Chk1/Chk2 (Rad53), aquesta observació dóna suport a que Clb6 pugui ser fosforilada *in vivo* per Rad53, la quinasa efectora del checkpoint de la fase S al llevat de gemmació. La ciclina A, de funció i comportament anàlegs a Clb5, no apareix entre les més de 700 proteïnes identificades (Matsuoka, Ballif et al. 2007).

De donar-se fosforilació de Clb6 per Rad53 *in vivo*, la seva funció és altra que l'estabilització dels nivells de Clb6 en resposta a estrès genotòxic: malgrat que aquesta estabilització es dóna de forma dependent del mecanisme de vigilància de la fase S, no es produeix a nivell d'estabilització directa de la ciclina.

De produir-se fosforilació de Clb6 per Rad53, aquesta tampoc afectaria la seva associació a Cdc28, que veiem inalterada en presència d'estrès replicatiu. Podria però afectar la seva activitat, o modificar l'afinitat pels seus substrats.

Finalment no és possible assegurar ni descartar si la potencial fosforilació de Clb6 per Rad53 podria estar implicada en afavorir la localització nuclear de Swi6 en una fase S compromesa. Si bé d'entrada aquesta localització és independent de Mec1-Rad53 (vegeu següent apartat), aquest fet per si sol no permet descartar que Rad53 jugui, malgrat tot, un paper en compatibilitzar la co-existència de Cdc28-Clb6 i Swi6 al nucli, ja que els mutants *rad53* són incapaços d'estabilitzar Clb6, i per tant no presenten l'activitat que promou l'exclusió. En cèl·lules salvatges la presència de Clb6 pot requerir la inhibició de la interacció de Cdc28-Clb6 amb Swi6, que pot ser mediada per fosforilació per Rad53 de Clb6 i/o la descrita de Swi6 (Sidorova and Breeden 1997).

Localització nuclear de Swi6 en fase S compromesa

Si bé aquest no és el centre del nostre interès, l'observació que Swi6 és nuclear en una fase S compromesa, probablement en presència de l'activitat Cdc28-Clb6 que és responsable de la seva exclusió en una fase S no pertorbada (Geymonat, Spanos et al. 2004), i en forma independent de Rad53 (malgrat que Swi6 (Sidorova and Breeden 1997) i possiblement també Clb6, és fosforilada per Rad53), obre una sèrie d'interrogants.

Cdc28-Clb6 ha estat implicada en l'exclusió nuclear de Swi6. Aquesta exclusió és necessària pel llicenciament de l'activitat transcripcional dependent de SBF (Queralt and Igual 2003). Si bé aquesta funció no justifica que la cèl·lula hagi d'eliminar Clb6 a mitja fase S, en comptes de fer-ho alhora que Clb5, a través d'APC a anafase, sí que podria ser un dels motius per establir els nivells de Clb6: de cara a excloure Swi6 del nucli un cop l'estrès genotòxic ha estat superat.

Malgrat que Swi6 és substrat de Rad53 (Sidorova and Breeden 1997), en les nostres mans la localització nuclear de Swi6 durant una fase S compromesa per estrès replicatiu és independent de Rad53. És a més, independent de Mec1, la quinasa transductora central que opera per sobre de Rad53, la qual cosa exclou també la possibilitat que Mec1 estigui actuant directament o a través d'una branca paral·lela a Rad53 (per exemple a través de Chk1).

Una alternativa és Tel1, una quinasa paràloga a Mec1, l'ortòleg en humans de la qual, ATM, juga un paper central en la resposta a dany al DNA. Si bé, en el llevat de gemmació Tel1 no sembla jugar un paper essencial en la resposta del checkpoint de la fase S (Morrow, Tagle et al. 1995), en absència de Mec1 i a elevades dosis de dany al DNA, la presència de Tel1 permet una activació parcial de Rad53 (Mantiero, Clerici et al. 2007). A més, la deleció de Tel1 incrementa la sensibilitat a dany al DNA del mutant hipomòrfic *mec1-1* (Morrow, Tagle et al. 1995).

No es pot descartar la intervenció d'una altra quinasa, activada en resposta a estrès genotòxic, però que no formi part de la cascada de senyalització del mecanisme de vigilància de la fase S. El cas de Swi6 no seria únic: el factor de llicenciament dels orígens de replicació Cdt1 és destruït en fase S en resposta a dany al DNA en una forma independent de les quinases del checkpoint (Higa, Mihaylov et al. 2003; Jin, Arias et al. 2006; Ralph, Boye et al. 2006). Una quinasa no pertanyent a la cascada de senyalització del checkpoint podria ser activada en resposta a estrès genotòxic, de forma independent de Mec1/Tel1. Per exemple l'aturada de les forquilles de replicació, la generació de ssDNA-RPA o el desacoblament de l'helicasa i la DNA polimerasa podrien afavorir l'activació d'aquesta quinasa, o bé simplement afavorir la seva interacció amb un substrat específic. A aquests respecte, recentment s'han implicat en la resposta a estrès genotòxic dues

quinases no pertanyents al, ni activades pel, checkpoint: la MAP quinasa p38MAPK/MK2 (Reinhardt, Aslanian et al. 2007) i la caseïna quinasa CK2 (Wu, Luo et al. 2008).

Una altra possibilitat és l'alliberament prematur de la fosfatasa Cdc14 del nuclèol al nucli en resposta a estrès genotòxic. En un cicle cel·lular no pertorbat Cdc14 és la responsable de revertir la fosforilació de Swi6 per Cdc28-Clb6 al final de la fase M (Geymonat, Spanos et al. 2004). Si bé Cdc14 està segrestada al nuclèol en una fase S no pertorbada (Shou, Seol et al. 1999; Visintin, Hwang et al. 1999; Shou, Azzam et al. 2002; Stegmeier, Visintin et al. 2002; Queralt and Uhlmann 2008), durant el treball d'aquesta tesi vam especular amb la possibilitat que en una fase S pertorbada Cdc14 pugui ser alliberada al nucleoplasma. Recentment, s'ha reportat l'alliberament de Cdc14 del nuclèol al nucleoplasma en resposta a dany al DNA generat en fase G2 (Bassermann, Frescas et al. 2008). Interessantment, aquesta translocació en resposta a estrès genotòxic compleix el requisit de ser independent de les quinases transductores centrals del checkpoint ATM/ATR (Bassermann, Frescas et al. 2008).

Encara que la localització nuclear de Swi6 en una fase S compromesa sigui independent de Mec1-Rad53, aquest fet per si sol no descarta que Rad53 jugui, malgrat tot, un paper en compatibilitzar la co-existència de Cdc28-Clb6 i Swi6 al nucli: els mutants *rad53* són incapaçs d'estabilitzar Clb6, i per tant no presenten l'activitat que promou l'exclusió. En cèl·lules salvatges la presència de Clb6 pot requerir la fosforilació per Rad53 de Swi6 i/o de la ciclina per inhibir la interacció i consegüent exclusió.

Funció de Clb6 en una fase S no pertorbada / en una fase S compromesa

Altres avingudes a explorar en el futur poden venir de la mà de definir esdeveniments del cicle cel·lular que tenen com a punt d'inflexió mitja fase S. A coneixement nostre, aquest seria el cas de si més no dos processos: la síntesi d'histones i la síntesi de dNTPs. Ambdues síntesis han de ser altes al inici de la replicació en la fase S, quan encara cal replicar tot el genoma, però han d'estar regulades a la baixa a partir de mitja fase S. En el cas dels dNTPs, per evitar la pèrdua de fidelitat de les DNA polimerases que es donaria a concentracions excessivament elevades d'aquests. En el cas de les histones cal evitar la toxicitat associada a nivells excessius d'histones (Singh, Paik et al. 2009), per desacoblament de la seva síntesi respecte als requeriments per a l'assemblatge de la

cromatina corresponent al tram final de la replicació dels cromosomes. A favor d'un paper de Clb6 en el control de la síntesi d'histones, l'activitat CDK associada a ciclina E ha estat implicada en l'activació de factors de transcripció específics dels gens de les histones en fase S (Zhao, Kennedy et al. 2000). Al llevat de gemmació, l'aturada d'aquesta transcripció coincideix en el temps amb la desaparició de Clb6 (Alain Verreault i Akash Gunjan, comunicació personal). L'estabilització dels nivells de Clb6 pel mecanisme de vigilància de la fase S podria assegurar a la cèl·lula la reactivació de la síntesi d'histones un cop superat l'estrès genotòxic. Els nostres resultats han portat a iniciar una col·laboració amb els laboratoris d'Alain Verreault i d' Akash Gunjan per explorar aquesta línia.

Un altre nivell al qual podria estar implicat Clb6 és l'assemblatge de diferents formes de cromatina al llarg de la fase S, perpetuant d'aquesta manera el context epigenètic. En aquest sentit, resulta especialment interessant la interacció genètica entre CLB6 i ARP8. Arp8 és un factor implicat en el remodelatge de la cromatina, recombinació mitòtica i resposta a dany al DNA. Els mutant *arp8* mostren també sensibilitat a HU. La doble mutació *clb6 arp8* presenta un pronunciat defecte sintètic de creixement, de magnitud similar a la doble mutació *clb5 clb6* (Collins, Miller et al. 2007). Interessantment Clb5 presenta una interacció genètica amb Arp8 en el sentit oposat: el doble mutant *clb5 arp8* presenta una supressió del fenotip d'*arp8* (Collins, Miller et al. 2007).

Una altra possibilitat és que la presència o absència de Clb6 determini l'elecció de la reparació mitjançant NHEJ (*non homologous end joining*) al principi de la fase S, o mitjançant HR (*homologous recombination*) quan la majoria del genoma ja disposa de dues cromàtides germanes. A aquest respecte, en humans, un fragment C-terminal de la ciclina E generat per proteòlisi mediada per caspases en resposta a estrès genotòxic, interacciona amb Ku70 (Mazumder, Plesca et al. 2007), una de les proteïnes que formen el complex de reconeixement dels trencaments de doble cadena de DNA (DSB) per a ser reparats mitjançant NHEJ.

Tampoc es pot descartar que Clb6 jugui un paper inhibidor del procés de maduració del fus mitòtic o de l'assemblatge de la placa cinetocòrica. La sobreexpressió de ciclina E en cèl·lules humanes en cultiu dona lloc a un tipus molt específic d'inestabilitat genòmica: aneuploidia per guanys i pèrdues de cromosomes complets (Spruck, Won et al. 1999),

apuntant a un defecte en la segregació del material genètic. Interessantment, aquest efecte és específic de ciclina E (Clb6), mentre que ni la sobreexpressió de ciclina D (CLN), ni la de ciclina A (Clb5) tenen cap efecte a aquest nivell (Spruck, Won et al. 1999).

CONCLUSIONS

1. La ciclina de fase S Clb6 és fosforilada directament *in vitro* per Rad53, la quinasa efectora del mecanisme de vigilància de la fase S.
2. Els nivells de Clb6 són estabilitzats *in vivo* en resposta a estrès genotòxic de forma dependent de Rad53.
3. L'estabilització dels nivells de Clb6 en resposta a estrès replicatiu no estabilitza directament la proteïna: requereix síntesi *de novo*.
4. Aquesta síntesi *de novo* és específicament de Clb6, i no d'un factor necessari per estabilitzar Clb6.
5. L'estabilització de Clb6 en resposta a estrès replicatiu està disminuïda en mutants del factor de transcripció MBF, i es suprimeix quan es sobreexpressa el repressor d'MBF Nrm1.
6. Per tant, l'estabilització de Clb6 en resposta a estrès replicatiu requereix activitat MBF. Aquesta activitat es dona en fase S: en el moment d'obtenir aquests resultats MBF era considerat un factor de transcripció exclusiu de fase G1.
7. En una fase S compromesa per estrès replicatiu Swi6 és nuclear. L'activitat d'MBF requereix la subunitat transactivadora Swi6, que és exclosa del nucli en una fase S no pertorbada.
8. La deleció de Clb6 no dona lloc a un defecte detectable en la resposta a estrès genotòxic: les cèl·lules són viables i les forquilles de replicació romanen estables.
9. Per posar en evidència el paper del manteniment de Clb6 en resposta a estrès genotòxic, hem sobreexpressat la ciclina en una fase S no pertorbada. La presència continuada de Clb6 bloqueja la progressió del cicle cel·lular en mitosi, en un estadi previ a anafase.

10. Aquests resultats suggereixen que Clb6 pot ser un element efector de la branca S-M del mecanisme de vigilància de la fase S, que estaria constituïda per diversos punts de control solapat.

11. Aquest paper justificaria que Clb6 hagi de ser eliminada *avançadament*, i no per APC. Això no seria necessari si Clb6 jugués un paper *feed-forward* a més llarga distància.

BIBLIOGRAFIA

- Admire, A., L. Shanks, et al. (2006). "Cycles of chromosome instability are associated with a fragile site and are increased by defects in DNA replication and checkpoint controls in yeast." *Genes Dev* **20**(2): 159-73.
- Aerne, B. L., A. L. Johnson, et al. (1998). "Swi5 controls a novel wave of cyclin synthesis in late mitosis." *Mol Biol Cell* **9**(4): 945-56.
- Agarwal, R., Z. Tang, et al. (2003). "Two distinct pathways for inhibiting pds1 ubiquitination in response to DNA damage." *J Biol Chem* **278**(45): 45027-33.
- Alcasabas, A. A., A. J. Osborn, et al. (2001). "Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53." *Nat Cell Biol* **3**(11): 958-65.
- Allen, J. B., Z. Zhou, et al. (1994). "The SAD1/RAD53 protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast." *Genes Dev* **8**(20): 2401-15.
- Amon, A., U. Surana, et al. (1992). "Regulation of p34^{CDC28} tyrosine phosphorylation is not required for entry into mitosis in *S. cerevisiae*." *Nature* **355**(6358): 368-71.
- Amon, A., M. Tyers, et al. (1993). "Mechanisms that help the yeast cell cycle clock tick: G2 cyclins transcriptionally activate G2 cyclins and repress G1 cyclins." *Cell* **74**(6): 993-1007.
- Andrews, B. J. and I. Herskowitz (1989). "Identification of a DNA binding factor involved in cell-cycle control of the yeast HO gene." *Cell* **57**(1): 21-9.
- Andrews, B. J. and I. Herskowitz (1989). "The yeast SWI4 protein contains a motif present in developmental regulators and is part of a complex involved in cell-cycle-dependent transcription." *Nature* **342**(6251): 830-3.
- Aparicio, O. M., A. M. Stout, et al. (1999). "Differential assembly of Cdc45p and DNA polymerases at early and late origins of DNA replication." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16): 9130-5.
- Aparicio, O. M., D. M. Weinstein, et al. (1997). "Components and dynamics of DNA replication complexes in *S. cerevisiae*: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase." *Cell* **91**(1): 59-69.
- Asano, S., J. E. Park, et al. (2005). "Concerted mechanism of Swe1/Wee1 regulation by multiple kinases in budding yeast." *Embo J* **24**(12): 2194-204.
- Bahler, J., J. Q. Wu, et al. (1998). "Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*." *Yeast* **14**(10): 943-51.
- Bartel, P., C. T. Chien, et al. (1993). "Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system." *Biotechniques* **14**(6): 920-4.
- Bartkova, J., Z. Horejsi, et al. (2005). "DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis." *Nature* **434**(7035): 864-70.
- Bartkova, J., N. Rezaei, et al. (2006). "Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints." *Nature* **444**(7119): 633-7.
- Basco, R. D., M. D. Segal, et al. (1995). "Negative regulation of G1 and G2 by S-phase cyclins of *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **15**(9): 5030-42.
- Bassermann, F., D. Frescas, et al. (2008). "The Cdc14B-Cdh1-Plk1 axis controls the G2 DNA-damage-response checkpoint." *Cell* **134**(2): 256-67.
- Bean, J. M., E. D. Siggia, et al. (2005). "High functional overlap between MluI cell-cycle box binding factor and Swi4/6 cell-cycle box binding factor in the G1/S transcriptional program in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **171**(1): 49-61.
- Bell, D. W., J. M. Varley, et al. (1999). "Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome." *Science* **286**(5449): 2528-31.
- Bell, S. P. and B. Stillman (1992). "ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex." *Nature* **357**(6374): 128-34.

- Blow, J. J. and P. Nurse (1990). "A cdc2-like protein is involved in the initiation of DNA replication in *Xenopus* egg extracts." *Cell* **62**(5): 855-62.
- Booher, R. N., R. J. Deshaies, et al. (1993). "Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins." *Embo J* **12**(9): 3417-26.
- Bousset, K. and J. F. Diffley (1998). "The Cdc7 protein kinase is required for origin firing during S phase." *Genes Dev* **12**(4): 480-90.
- Breeden, L. and K. Nasmyth (1987). "Cell cycle control of the yeast HO gene: cis- and trans-acting regulators." *Cell* **48**(3): 389-97.
- Brewer, B. J., J. D. Diller, et al. (1993). "The topography of chromosome replication in yeast." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **58**: 425-34.
- Broek, D., R. Bartlett, et al. (1991). "Involvement of p34cdc2 in establishing the dependency of S phase on mitosis." *Nature* **349**(6308): 388-93.
- Byun, T. S., M. Pacek, et al. (2005). "Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint." *Genes Dev* **19**(9): 1040-52.
- Cahill, D. P., K. W. Kinzler, et al. (1999). "Genetic instability and darwinian selection in tumours." *Trends Cell Biol* **9**(12): M57-60.
- Calzada, A., B. Hodgson, et al. (2005). "Molecular anatomy and regulation of a stable replisome at a paused eukaryotic DNA replication fork." *Genes Dev* **19**(16): 1905-19.
- Calzada, A., M. Sanchez, et al. (2000). "The stability of the Cdc6 protein is regulated by cyclin-dependent kinase/cyclin B complexes in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **275**(13): 9734-41.
- Carr, A. M. (1997). "Control of cell cycle arrest by the Mec1sc/Rad3sp DNA structure checkpoint pathway." *Curr Opin Genet Dev* **7**(1): 93-8.
- Clarke, D. J., M. Segal, et al. (2001). "Mec1p regulates Pds1p levels in S phase: complex coordination of DNA replication and mitosis." *Nat Cell Biol* **3**(7): 619-27.
- Clotet, J., X. Escote, et al. (2006). "Phosphorylation of Hsl1 by Hog1 leads to a G2 arrest essential for cell survival at high osmolarity." *Embo J* **25**(11): 2338-46.
- Cobb, J. A., L. Bjergbaek, et al. (2003). "DNA polymerase stabilization at stalled replication forks requires Mec1 and the RecQ helicase Sgs1." *Embo J* **22**(16): 4325-36.
- Cobb, J. A., T. Schleker, et al. (2005). "Replisome instability, fork collapse, and gross chromosomal rearrangements arise synergistically from Mec1 kinase and RecQ helicase mutations." *Genes Dev* **19**(24): 3055-69.
- Cocker, J. H., S. Piatti, et al. (1996). "An essential role for the Cdc6 protein in forming the pre-replicative complexes of budding yeast." *Nature* **379**(6561): 180-2.
- Cohen-Fix, O., J. M. Peters, et al. (1996). "Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p." *Genes Dev* **10**(24): 3081-93.
- Coleman, T. R., P. B. Carpenter, et al. (1996). "The *Xenopus* Cdc6 protein is essential for the initiation of a single round of DNA replication in cell-free extracts." *Cell* **87**(1): 53-63.
- Colomina, N., E. Gari, et al. (1999). "G1 cyclins block the Ime1 pathway to make mitosis and meiosis incompatible in budding yeast." *Embo J* **18**(2): 320-9.
- Collins, S. R., K. M. Miller, et al. (2007). "Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map." *Nature* **446**(7137): 806-10.

- Connolly, B., C. I. White, et al. (1988). "Physical monitoring of mating type switching in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **8**(6): 2342-9.
- Cooper, K. (2006). "Rb, whi it's not just for metazoans anymore." Oncogene **25**(38): 5228-32.
- Costanzo, M., J. L. Nishikawa, et al. (2004). "CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast." Cell **117**(7): 899-913.
- Chen, S. H., M. B. Smolka, et al. (2007). "Mechanism of Dun1 activation by Rad53 phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **282**(2): 986-95.
- Cheng, L., T. Collyer, et al. (1999). "Cell cycle regulation of DNA replication initiator factor Dbf4p." Mol Cell Biol **19**(6): 4270-8.
- D'Amours, D., F. Stegmeier, et al. (2004). "Cdc14 and condensin control the dissolution of cohesin-independent chromosome linkages at repeated DNA." Cell **117**(4): 455-69.
- D'Urso, G., R. L. Marraccino, et al. (1990). "Cell cycle control of DNA replication by a homologue from human cells of the p34cdc2 protein kinase." Science **250**(4982): 786-91.
- Dahmann, C., J. F. Diffley, et al. (1995). "S-phase-promoting cyclin-dependent kinases prevent re-replication by inhibiting the transition of replication origins to a pre-replicative state." Curr Biol **5**(11): 1257-69.
- De Bont, R. and N. van Larebeke (2004). "Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data." Mutagenesis **19**(3): 169-85.
- de Bruin, R. A., T. I. Kalashnikova, et al. (2008). "DNA replication checkpoint promotes G1-S transcription by inactivating the MBF repressor Nrm1." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(32): 11230-5.
- de Bruin, R. A., T. I. Kalashnikova, et al. (2006). "Constraining G1-specific transcription to late G1 phase: the MBF-associated corepressor Nrm1 acts via negative feedback." Mol Cell **23**(4): 483-96.
- de Bruin, R. A., W. H. McDonald, et al. (2004). "Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5." Cell **117**(7): 887-98.
- de Lichtenberg, U., L. J. Jensen, et al. (2005). "Dynamic complex formation during the yeast cell cycle." Science **307**(5710): 724-7.
- Detweiler, C. S. and J. J. Li (1997). "Cdc6p establishes and maintains a state of replication competence during G1 phase." J Cell Sci **110 (Pt 6)**: 753-63.
- Diffley, J. F. and J. H. Cocker (1992). "Protein-DNA interactions at a yeast replication origin." Nature **357**(6374): 169-72.
- Donaldson, A. D., W. L. Fangman, et al. (1998). "Cdc7 is required throughout the yeast S phase to activate replication origins." Genes Dev **12**(4): 491-501.
- Donaldson, A. D., M. K. Raghuraman, et al. (1998). "CLB5-dependent activation of late replication origins in *S. cerevisiae*." Mol Cell **2**(2): 173-82.
- Donovan, J. D., J. H. Toyn, et al. (1994). "P40SDB25, a putative CDK inhibitor, has a role in the M/G1 transition in *Saccharomyces cerevisiae*." Genes Dev **8**(14): 1640-53.
- Donovan, S., J. Harwood, et al. (1997). "Cdc6p-dependent loading of Mcm proteins onto pre-replicative chromatin in budding yeast." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(11): 5611-6.
- Drury, L. S., G. Perkins, et al. (1997). "The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast." Embo J **16**(19): 5966-76.
- Drury, L. S., G. Perkins, et al. (2000). "The cyclin-dependent kinase Cdc28p regulates distinct modes of Cdc6p proteolysis during the budding yeast cell cycle." Curr Biol **10**(5): 231-40.

- Dutta, C., P. K. Patel, et al. (2008). "The DNA replication checkpoint directly regulates MBF-dependent G1/S transcription." *Mol Cell Biol* **28**(19): 5977-85.
- Elsasser, S., Y. Chi, et al. (1999). "Phosphorylation controls timing of Cdc6p destruction: A biochemical analysis." *Mol Biol Cell* **10**(10): 3263-77.
- Epstein, C. B. and F. R. Cross (1992). "CLB5: a novel B cyclin from budding yeast with a role in S phase." *Genes Dev* **6**(9): 1695-706.
- Evans, T., E. T. Rosenthal, et al. (1983). "Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division." *Cell* **33**(2): 389-96.
- Fang, F. and J. W. Newport (1991). "Evidence that the G1-S and G2-M transitions are controlled by different cdc2 proteins in higher eukaryotes." *Cell* **66**(4): 731-42.
- Feldman, R. M., C. C. Correll, et al. (1997). "A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p." *Cell* **91**(2): 221-30.
- Ferguson, B. M., B. J. Brewer, et al. (1991). "A yeast origin of replication is activated late in S phase." *Cell* **65**(3): 507-15.
- Ferguson, B. M. and W. L. Fangman (1992). "A position effect on the time of replication origin activation in yeast." *Cell* **68**(2): 333-9.
- Ferreira, M. F., C. Santocanale, et al. (2000). "Dbf4p, an essential S phase-promoting factor, is targeted for degradation by the anaphase-promoting complex." *Mol Cell Biol* **20**(1): 242-8.
- Fitch, I., C. Dahmann, et al. (1992). "Characterization of four B-type cyclin genes of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Biol Cell* **3**(7): 805-18.
- Friedman, K. L., J. D. Diller, et al. (1996). "Multiple determinants controlling activation of yeast replication origins late in S phase." *Genes Dev* **10**(13): 1595-607.
- Gale, J. M., K. A. Nissen, et al. (1987). "UV-induced formation of pyrimidine dimers in nucleosome core DNA is strongly modulated with a period of 10.3 bases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(19): 6644-8.
- Gambus, A., R. C. Jones, et al. (2006). "GIN5 maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks." *Nat Cell Biol* **8**(4): 358-66.
- Gari, E., T. Volpe, et al. (2001). "Whi3 binds the mRNA of the G1 cyclin CLN3 to modulate cell fate in budding yeast." *Genes Dev* **15**(21): 2803-8.
- Gasch, A. P., M. Huang, et al. (2001). "Genomic expression responses to DNA-damaging agents and the regulatory role of the yeast ATR homolog Mec1p." *Mol Biol Cell* **12**(10): 2987-3003.
- Germain, D., J. Hendley, et al. (1997). "DNA damage inhibits proteolysis of the B-type cyclin Clb5 in *S. cerevisiae*." *J Cell Sci* **110** (Pt 15): 1813-20.
- Geymonat, M., A. Spanos, et al. (2004). "Clb6/Cdc28 and Cdc14 regulate phosphorylation status and cellular localization of Swi6." *Mol Cell Biol* **24**(6): 2277-85.
- Ghiara, J. B., H. E. Richardson, et al. (1991). "A cyclin B homolog in *S. cerevisiae*: chronic activation of the Cdc28 protein kinase by cyclin prevents exit from mitosis." *Cell* **65**(1): 163-74.
- Gibson, D. G., J. G. Aparicio, et al. (2004). "Diminished S-phase cyclin-dependent kinase function elicits vital Rad53-dependent checkpoint responses in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **24**(23): 10208-22.
- Gietz, D., A. St Jean, et al. (1992). "Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells." *Nucleic Acids Res* **20**(6): 1425.
- Gilbert, C. S., C. M. Green, et al. (2001). "Budding yeast Rad9 is an ATP-dependent Rad53 activating machine." *Mol Cell* **8**(1): 129-36.

- Giordano, A., P. Whyte, et al. (1989). "A 60 kd cdc2-associated polypeptide complexes with the E1A proteins in adenovirus-infected cells." *Cell* **58**(5): 981-90.
- Grandin, N. and S. I. Reed (1993). "Differential function and expression of *Saccharomyces cerevisiae* B-type cyclins in mitosis and meiosis." *Mol Cell Biol* **13**(4): 2113-25.
- Griffiths, D. J., N. C. Barbet, et al. (1995). "Fission yeast rad17: a homologue of budding yeast RAD24 that shares regions of sequence similarity with DNA polymerase accessory proteins." *Embo J* **14**(23): 5812-23.
- Hadwiger, J. A., C. Wittenberg, et al. (1989). "The *Saccharomyces cerevisiae* CKS1 gene, a homolog of the *Schizosaccharomyces pombe* suc1+ gene, encodes a subunit of the Cdc28 protein kinase complex." *Mol Cell Biol* **9**(5): 2034-41.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Harper, J. W., J. L. Burton, et al. (2002). "The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more." *Genes Dev* **16**(17): 2179-206.
- Hartwell, L. H. (1974). "*Saccharomyces cerevisiae* cell cycle." *Bacteriol Rev* **38**(2): 164-98.
- Hartwell, L. H. (1976). "Sequential function of gene products relative to DNA synthesis in the yeast cell cycle." *J Mol Biol* **104**(4): 803-17.
- Hartwell, L. H. and M. B. Kastan (1994). "Cell cycle control and cancer." *Science* **266**(5192): 1821-8.
- Hartwell, L. H., R. K. Mortimer, et al. (1973). "Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of cdc Mutants." *Genetics* **74**(2): 267-286.
- Hartwell, L. H. and M. W. Unger (1977). "Unequal division in *Saccharomyces cerevisiae* and its implications for the control of cell division." *J Cell Biol* **75**(2 Pt 1): 422-35.
- Harvey, S. L., A. Charlet, et al. (2005). "Cdk1-dependent regulation of the mitotic inhibitor Wee1." *Cell* **122**(3): 407-20.
- Hayles, J., D. Fisher, et al. (1994). "Temporal order of S phase and mitosis in fission yeast is determined by the state of the p34cdc2-mitotic B cyclin complex." *Cell* **78**(5): 813-22.
- Hereford, L. M. and L. H. Hartwell (1974). "Sequential gene function in the initiation of *Saccharomyces cerevisiae* DNA synthesis." *J Mol Biol* **84**(3): 445-61.
- Hicks, J. B. and I. Herskowitz (1976). "Interconversion of Yeast Mating Types I. Direct Observations of the Action of the Homothallism (HO) Gene." *Genetics* **83**(2): 245-258.
- Higa, L. A., I. S. Mihaylov, et al. (2003). "Radiation-mediated proteolysis of CDT1 by CUL4-ROC1 and CSN complexes constitutes a new checkpoint." *Nat Cell Biol* **5**(11): 1008-15.
- Hodgson, B., A. Calzada, et al. (2007). "Mrc1 and Tof1 regulate DNA replication forks in different ways during normal S phase." *Mol Biol Cell* **18**(10): 3894-902.
- Horak, C. E., N. M. Luscombe, et al. (2002). "Complex transcriptional circuitry at the G1/S transition in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genes Dev* **16**(23): 3017-33.
- Huang, M., Z. Zhou, et al. (1998). "The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor." *Cell* **94**(5): 595-605.
- Ikui, A. E., V. Archambault, et al. (2007). "Cyclin and cyclin-dependent kinase substrate requirements for preventing rereplication reveal the need for concomitant activation and inhibition." *Genetics* **175**(3): 1011-22.
- Iyer, V. R., C. E. Horak, et al. (2001). "Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF." *Nature* **409**(6819): 533-8.

- Jackson, A. L., P. M. Pahl, et al. (1993). "Cell cycle regulation of the yeast Cdc7 protein kinase by association with the Dbf4 protein." *Mol Cell Biol* **13**(5): 2899-908.
- Jackson, L. P., S. I. Reed, et al. (2006). "Distinct mechanisms control the stability of the related S-phase cyclins Clb5 and Clb6." *Mol Cell Biol* **26**(6): 2456-66.
- Jacobson, M. D., S. Gray, et al. (2000). "Testing cyclin specificity in the exit from mitosis." *Mol Cell Biol* **20**(13): 4483-93.
- Jallepalli, P. V. and T. J. Kelly (1997). "Cyclin-dependent kinase and initiation at eukaryotic origins: a replication switch?" *Curr Opin Cell Biol* **9**(3): 358-63.
- Jaspersen, S. L., J. F. Charles, et al. (1998). "A late mitotic regulatory network controlling cyclin destruction in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Biol Cell* **9**(10): 2803-17.
- Jensen, R. E. and I. Herskowitz (1984). "Directionality and regulation of cassette substitution in yeast." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **49**: 97-104.
- Jin, J., E. E. Arias, et al. (2006). "A family of diverse Cul4-Ddb1-interacting proteins includes Cdt2, which is required for S phase destruction of the replication factor Cdt1." *Mol Cell* **23**(5): 709-21.
- Johnston, G. C., J. R. Pringle, et al. (1977). "Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Exp Cell Res* **105**(1): 79-98.
- Johnston, L. H., B. A. Morgan, et al. (1996). "A yeast transcription factor activating G1 cyclin expression has similarity to bacterial signal transduction proteins." *Biochem Soc Trans* **24**(1): 49-54.
- Kamimura, Y., Y. S. Tak, et al. (2001). "Sld3, which interacts with Cdc45 (Sld4), functions for chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*." *Embo J* **20**(8): 2097-107.
- Kanemaki, M. and K. Labib (2006). "Distinct roles for Sld3 and GINS during establishment and progression of eukaryotic DNA replication forks." *Embo J* **25**(8): 1753-63.
- Kanemaki, M., A. Sanchez-Diaz, et al. (2003). "Functional proteomic identification of DNA replication proteins by induced proteolysis in vivo." *Nature* **423**(6941): 720-4.
- Kato, R. and H. Ogawa (1994). "An essential gene, ESR1, is required for mitotic cell growth, DNA repair and meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*." *Nucleic Acids Res* **22**(15): 3104-12.
- Katou, Y., Y. Kanoh, et al. (2003). "S-phase checkpoint proteins Tof1 and Mrc1 form a stable replication-pausing complex." *Nature* **424**(6952): 1078-83.
- Keith, C. T. and S. L. Schreiber (1995). "PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints." *Science* **270**(5233): 50-1.
- Knapp, D., L. Bhoite, et al. (1996). "The transcription factor Swi5 regulates expression of the cyclin kinase inhibitor p40SIC1." *Mol Cell Biol* **16**(10): 5701-7.
- Koch, C., T. Moll, et al. (1993). "A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G1 to S phase." *Science* **261**(5128): 1551-7.
- Koch, C. and K. Nasmyth (1994). "Cell cycle regulated transcription in yeast." *Curr Opin Cell Biol* **6**(3): 451-9.
- Kondo, T., T. Wakayama, et al. (2001). "Recruitment of Mec1 and Ddc1 checkpoint proteins to double-strand breaks through distinct mechanisms." *Science* **294**(5543): 867-70.
- Koonin, E. V., S. F. Altschul, et al. (1996). "BRCA1 protein products ... Functional motifs." *Nat Genet* **13**(3): 266-8.
- Koranda, M., A. Schleiffer, et al. (2000). "Forkhead-like transcription factors recruit Ndd1 to the chromatin of G2/M-specific promoters." *Nature* **406**(6791): 94-8.

- Kramer, E. R., N. Scheuringer, et al. (2000). "Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1." *Mol Biol Cell* **11**(5): 1555-69.
- Krishnan, V., S. Nirantar, et al. (2004). "DNA replication checkpoint prevents precocious chromosome segregation by regulating spindle behavior." *Mol Cell* **16**(5): 687-700.
- Kuhne, C. and P. Linder (1993). "A new pair of B-type cyclins from *Saccharomyces cerevisiae* that function early in the cell cycle." *Embo J* **12**(9): 3437-47.
- Kupiec, M., B. Byers, et al. (1997). "Meiosis and sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. In *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: Cell cycle and biology*." *Cold Spring Harbor Laboratory Press* vol. **3** (eds J.R. Pringle, J.R. Broach and E.W. Jones): 889-1036.
- Labib, K., J. A. Tercero, et al. (2000). "Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression." *Science* **288**(5471): 1643-7.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lambert, S. and A. M. Carr (2005). "Checkpoint responses to replication fork barriers." *Biochimie* **87**(7): 591-602.
- Lee, S. J., M. F. Schwartz, et al. (2003). "Rad53 phosphorylation site clusters are important for Rad53 regulation and signaling." *Mol Cell Biol* **23**(17): 6300-14.
- Lengronne, A. and E. Schwob (2002). "The yeast CDK inhibitor Sic1 prevents genomic instability by promoting replication origin licensing in late G(1)." *Mol Cell* **9**(5): 1067-78.
- Lew, D. J. and S. I. Reed (1993). "Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins." *J Cell Biol* **120**(6): 1305-20.
- Lew, D. J. and S. I. Reed (1995). "A cell cycle checkpoint monitors cell morphogenesis in budding yeast." *J Cell Biol* **129**(3): 739-49.
- Lisby, M., J. H. Barlow, et al. (2004). "Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins." *Cell* **118**(6): 699-713.
- Liu, Z., L. M. Cashion, et al. (1997). "A mammalian gene expression vector with blue-white selection for efficient subcloning in *Escherichia coli*." *Anal Biochem* **246**(2): 264-7.
- Lopes, M., C. Cotta-Ramusino, et al. (2001). "The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks." *Nature* **412**(6846): 557-61.
- Lopes, M., M. Foiani, et al. (2006). "Multiple mechanisms control chromosome integrity after replication fork uncoupling and restart at irreparable UV lesions." *Mol Cell* **21**(1): 15-27.
- Luo, J., N. L. Solimini, et al. (2009). "Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction." *Cell* **136**(5): 823-37.
- MacKay, V. L., B. Mai, et al. (2001). "Early cell cycle box-mediated transcription of CLN3 and SWI4 contributes to the proper timing of the G(1)-to-S transition in budding yeast." *Mol Cell Biol* **21**(13): 4140-8.
- Maher, M., F. Cong, et al. (1995). "Cell cycle-regulated transcription of the CLB2 gene is dependent on Mcm1 and a ternary complex factor." *Mol Cell Biol* **15**(6): 3129-37.
- Majka, J., A. Niedziela-Majka, et al. (2006). "The checkpoint clamp activates Mec1 kinase during initiation of the DNA damage checkpoint." *Mol Cell* **24**(6): 891-901.
- Mallory, J. C. and T. D. Petes (2000). "Protein kinase activity of Tel1p and Mec1p, two *Saccharomyces cerevisiae* proteins related to the human ATM protein kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25): 13749-54.

- Mantiero, D., M. Clerici, et al. (2007). "Dual role for *Saccharomyces cerevisiae* Tel1 in the checkpoint response to double-strand breaks." *EMBO Rep* **8**(4): 380-7.
- Masumoto, H., S. Muramatsu, et al. (2002). "S-Cdk-dependent phosphorylation of Sld2 essential for chromosomal DNA replication in budding yeast." *Nature* **415**(6872): 651-5.
- Matsuoka, S., B. A. Ballif, et al. (2007). "ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage." *Science* **316**(5828): 1160-6.
- Mazumder, S., D. Plesca, et al. (2007). "Interaction of a cyclin E fragment with Ku70 regulates Bax-mediated apoptosis." *Mol Cell Biol* **27**(9): 3511-20.
- Melo, J. and D. Toczyski (2002). "A unified view of the DNA-damage checkpoint." *Curr Opin Cell Biol* **14**(2): 237-45.
- Melo, J. A., J. Cohen, et al. (2001). "Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo." *Genes Dev* **15**(21): 2809-21.
- Mendenhall, M. D. (1993). "An inhibitor of p34CDC28 protein kinase activity from *Saccharomyces cerevisiae*." *Science* **259**(5092): 216-9.
- Mendenhall, M. D., C. A. Jones, et al. (1987). "Dual regulation of the yeast CDC28-p40 protein kinase complex: cell cycle, pheromone, and nutrient limitation effects." *Cell* **50**(6): 927-35.
- Mendenhall, M. D., H. E. Richardson, et al. (1988). "Dominant negative protein kinase mutations that confer a G1 arrest phenotype." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(12): 4426-30.
- Morgan, D. O. (1995). "Principles of CDK regulation." *Nature* **374**(6518): 131-4.
- Morrow, D. M., D. A. Tagle, et al. (1995). "TEL1, an *S. cerevisiae* homolog of the human gene mutated in ataxia telangiectasia, is functionally related to the yeast checkpoint gene MEC1." *Cell* **82**(5): 831-40.
- Moyer, S. E., P. W. Lewis, et al. (2006). "Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(27): 10236-41.
- Nash, P., X. Tang, et al. (2001). "Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication." *Nature* **414**(6863): 514-21.
- Nash, R., G. Tokiwa, et al. (1988). "The WHI1+ gene of *Saccharomyces cerevisiae* tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog." *Embo J* **7**(13): 4335-46.
- Nasmyth, K. (1983). "Molecular analysis of a cell lineage." *Nature* **302**(5910): 670-6.
- Nasmyth, K. (1985). "A repetitive DNA sequence that confers cell-cycle START (CDC28)-dependent transcription of the HO gene in yeast." *Cell* **42**(1): 225-35.
- Nasmyth, K. and L. Dirick (1991). "The role of SWI4 and SWI6 in the activity of G1 cyclins in yeast." *Cell* **66**(5): 995-1013.
- Nguyen, V. Q., C. Co, et al. (2001). "Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms." *Nature* **411**(6841): 1068-73.
- Ogas, J., B. J. Andrews, et al. (1991). "Transcriptional activation of CLN1, CLN2, and a putative new G1 cyclin (HCS26) by SWI4, a positive regulator of G1-specific transcription." *Cell* **66**(5): 1015-26.
- Orlando, D. A., C. Y. Lin, et al. (2008). "Global control of cell-cycle transcription by coupled CDK and network oscillators." *Nature* **453**(7197): 944-7.
- Osborn, A. J. and S. J. Elledge (2003). "Mrc1 is a replication fork component whose phosphorylation in response to DNA replication stress activates Rad53." *Genes Dev* **17**(14): 1755-67.
- Pan, X., P. Ye, et al. (2006). "A DNA integrity network in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Cell* **124**(5): 1069-81.

- Parrilla-Castellar, E. R., S. J. Arlander, et al. (2004). "Dial 9-1-1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex." *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9): 1009-14.
- Paulovich, A. G. and L. H. Hartwell (1995). "A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage." *Cell* **82**(5): 841-7.
- Pellicioli, A., C. Lucca, et al. (1999). "Activation of Rad53 kinase in response to DNA damage and its effect in modulating phosphorylation of the lagging strand DNA polymerase." *Embo J* **18**(22): 6561-72.
- Piggott, J. R., R. Rai, et al. (1982). "A bifunctional gene product involved in two phases of the yeast cell cycle." *Nature* **298**(5872): 391-3.
- Pines, J. (1995). "Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view." *Biochem. J* **308**: 697-711.
- Pines, J. and T. Hunter (1991). "Human cell division: the involvement of cyclins A and B1, and multiple cdc2s." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **56**: 449-63.
- Pringle, J. R. and L. H. Hartwell (1981). "The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle." In J. N. Strathern, E. W. Jones, and J. R. Broach (ed.), (The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*. Life cycle and inheritance. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y): p. 97-142.
- Queralt, E. and J. C. Igual (2003). "Cell cycle activation of the Swi6p transcription factor is linked to nucleocytoplasmic shuttling." *Mol Cell Biol* **23**(9): 3126-40.
- Queralt, E. and F. Uhlmann (2008). "Separase cooperates with Zds1 and Zds2 to activate Cdc14 phosphatase in early anaphase." *J Cell Biol* **182**(5): 873-83.
- Radcliffe, P., J. Trevethick, et al. (1997). "Deregulation of CLN1 and CLN2 in the *Saccharomyces cerevisiae* whi2 mutant." *Yeast* **13**(8): 707-15.
- Rahal, R. and A. Amon (2008). "Mitotic CDKs control the metaphase-anaphase transition and trigger spindle elongation." *Genes Dev* **22**(11): 1534-48.
- Ralph, E., E. Boye, et al. (2006). "DNA damage induces Cdt1 proteolysis in fission yeast through a pathway dependent on Cdt2 and Ddb1." *EMBO Rep* **7**(11): 1134-9.
- Reed, S. I. (1980). "The selection of amber mutations in genes required for completion of start, the controlling event of the cell division cycle of *S. cerevisiae*." *Genetics* **95**(3): 579-88.
- Reed, S. I. (1980). "The selection of *S. cerevisiae* mutants defective in the start event of cell division." *Genetics* **95**(3): 561-77.
- Reinhardt, H. C., A. S. Aslanian, et al. (2007). "p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage." *Cancer Cell* **11**(2): 175-89.
- Reneke, J. E., K. J. Blumer, et al. (1988). "The carboxy-terminal segment of the yeast alpha-factor receptor is a regulatory domain." *Cell* **55**(2): 221-34.
- Richardson, H., D. J. Lew, et al. (1992). "Cyclin-B homologs in *Saccharomyces cerevisiae* function in S phase and in G2." *Genes Dev* **6**(11): 2021-34.
- Richardson, H. E., C. Wittenberg, et al. (1989). "An essential G1 function for cyclin-like proteins in yeast." *Cell* **59**(6): 1127-33.
- Russell, P. and P. Nurse (1986). "cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast." *Cell* **45**(1): 145-53.
- Salah, S. M. and K. Nasmyth (2000). "Destruction of the securin Pds1p occurs at the onset of anaphase during both meiotic divisions in yeast." *Chromosoma* **109**(1-2): 27-34.
- Sanchez, Y., J. Bachant, et al. (1999). "Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms." *Science* **286**(5442): 1166-71.

- Santocanale, C. and J. F. Diffley (1996). "ORC- and Cdc6-dependent complexes at active and inactive chromosomal replication origins in *Saccharomyces cerevisiae*." Embo J **15**(23): 6671-9.
- Santocanale, C. and J. F. Diffley (1998). "A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication." Nature **395**(6702): 615-8.
- Schiestl, R. H. and R. D. Gietz (1989). "High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier." Curr Genet **16**(5-6): 339-46.
- Schneider, B. L., Q. H. Yang, et al. (1996). "Linkage of replication to start by the Cdk inhibitor Sic1." Science **272**(5261): 560-2.
- Schwab, M., A. S. Lutum, et al. (1997). "Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis." Cell **90**(4): 683-93.
- Schwartz, M. F., J. K. Duong, et al. (2002). "Rad9 phosphorylation sites couple Rad53 to the *Saccharomyces cerevisiae* DNA damage checkpoint." Mol Cell **9**(5): 1055-65.
- Schwob, E., T. Bohm, et al. (1994). "The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*." Cell **79**(2): 233-44.
- Schwob, E. and K. Nasmyth (1993). "CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*." Genes Dev **7**(7A): 1160-75.
- Searle, J. S., K. L. Schollaert, et al. (2004). "The DNA damage checkpoint and PKA pathways converge on APC substrates and Cdc20 to regulate mitotic progression." Nat Cell Biol **6**(2): 138-45.
- Segurado, M. and J. F. Diffley (2008). "Separate roles for the DNA damage checkpoint protein kinases in stabilizing DNA replication forks." Genes Dev **22**(13): 1816-27.
- Sheu, Y. J. and B. Stillman (2006). "Cdc7-Dbf4 phosphorylates MCM proteins via a docking site-mediated mechanism to promote S phase progression." Mol Cell **24**(1): 101-13.
- Shimada, K., P. Pasero, et al. (2002). "ORC and the intra-S-phase checkpoint: a threshold regulates Rad53p activation in S phase." Genes Dev **16**(24): 3236-52.
- Shirahige, K., Y. Hori, et al. (1998). "Regulation of DNA-replication origins during cell-cycle progression." Nature **395**(6702): 618-21.
- Shirayama, M., A. Toth, et al. (1999). "APC(Cdc20) promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5." Nature **402**(6758): 203-7.
- Shou, W., R. Azzam, et al. (2002). "Cdc5 influences phosphorylation of Net1 and disassembly of the RENT complex." BMC Mol Biol **3**: 3.
- Shou, W., J. H. Seol, et al. (1999). "Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex." Cell **97**(2): 233-44.
- Sia, R. A., H. A. Herald, et al. (1996). "Cdc28 tyrosine phosphorylation and the morphogenesis checkpoint in budding yeast." Mol Biol Cell **7**(11): 1657-66.
- Sidorova, J. M. and L. L. Breeden (1997). "Rad53-dependent phosphorylation of Swi6 and down-regulation of CLN1 and CLN2 transcription occur in response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*." Genes Dev **11**(22): 3032-45.
- Sidorova, J. M., G. E. Mikesell, et al. (1995). "Cell cycle-regulated phosphorylation of Swi6 controls its nuclear localization." Mol Biol Cell **6**(12): 1641-58.
- Sikorski, R. S. and P. Hieter (1989). "A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **122**(1): 19-27.
- Simon, I., J. Barnett, et al. (2001). "Serial regulation of transcriptional regulators in the yeast cell cycle." Cell **106**(6): 697-708.
- Singh, R. K., J. Paik, et al. (2009). "Generation and management of excess histones during the cell cycle." Front Biosci **14**: 3145-58.

- Skowyra, D., K. L. Craig, et al. (1997). "F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex." *Cell* **91**(2): 209-19.
- Smolka, M. B., C. P. Albuquerque, et al. (2005). "Dynamic changes in protein-protein interaction and protein phosphorylation probed with amine-reactive isotope tag." *Mol Cell Proteomics* **4**(9): 1358-69.
- Sogo, J. M., M. Lopes, et al. (2002). "Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects." *Science* **297**(5581): 599-602.
- Sorger, P. K. and A. W. Murray (1992). "S-phase feedback control in budding yeast independent of tyrosine phosphorylation of p34cdc28." *Nature* **355**(6358): 365-8.
- Spruck, C. H., K. A. Won, et al. (1999). "Deregulated cyclin E induces chromosome instability." *Nature* **401**(6750): 297-300.
- Stegmeier, F., R. Visintin, et al. (2002). "Separase, polo kinase, the kinetochore protein Slk19, and Spo12 function in a network that controls Cdc14 localization during early anaphase." *Cell* **108**(2): 207-20.
- Stinchcomb, D. T., K. Struhl, et al. (1979). "Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator." *Nature* **282**(5734): 39-43.
- Strohmaier, H., C. H. Spruck, et al. (2001). "Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line." *Nature* **413**(6853): 316-22.
- Sun, Z., D. S. Fay, et al. (1996). "Spk1/Rad53 is regulated by Mec1-dependent protein phosphorylation in DNA replication and damage checkpoint pathways." *Genes Dev* **10**(4): 395-406.
- Sun, Z., J. Hsiao, et al. (1998). "Rad53 FHA domain associated with phosphorylated Rad9 in the DNA damage checkpoint." *Science* **281**(5374): 272-4.
- Surana, U., H. Roberts, et al. (1991). "The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae*." *Cell* **65**(1): 145-61.
- Sweeney, F. D., F. Yang, et al. (2005). "Saccharomyces cerevisiae Rad9 acts as a Mec1 adaptor to allow Rad53 activation." *Curr Biol* **15**(15): 1364-75.
- Szyjka, S. J., C. J. Viggiani, et al. (2005). "Mrc1 is required for normal progression of replication forks throughout chromatin in *S. cerevisiae*." *Mol Cell* **19**(5): 691-7.
- Taba, M. R., I. Muroff, et al. (1991). "Changes in a SWI4,6-DNA-binding complex occur at the time of HO gene activation in yeast." *Genes Dev* **5**(11): 2000-13.
- Takayama, Y., Y. Kamimura, et al. (2003). "GINS, a novel multiprotein complex required for chromosomal DNA replication in budding yeast." *Genes Dev* **17**(9): 1153-65.
- Tanaka, S., T. Umemori, et al. (2007). "CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast." *Nature* **445**(7125): 328-32.
- Tercero, J. A. and J. F. Diffley (2001). "Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint." *Nature* **412**(6846): 553-7.
- Tercero, J. A., M. P. Longhese, et al. (2003). "A central role for DNA replication forks in checkpoint activation and response." *Mol Cell* **11**(5): 1323-36.
- Thomas, B. J. and R. Rothstein (1989). "Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA." *Cell* **56**(4): 619-30.
- Thornton, B. R. and D. P. Toczyski (2003). "Securin and B-cyclin/CDK are the only essential targets of the APC." *Nat Cell Biol* **5**(12): 1090-4.
- Tourriere, H., G. Versini, et al. (2005). "Mrc1 and Tof1 promote replication fork progression and recovery independently of Rad53." *Mol Cell* **19**(5): 699-706.
- Toyn, J. H., A. L. Johnson, et al. (1997). "The Swi5 transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae* has a role in exit from mitosis through induction of the cdk-inhibitor Sic1 in telophase." *Genetics* **145**(1): 85-96.

- Travesa, A., A. Duch, et al. (2008). "Distinct phosphatases mediate the deactivation of the DNA damage checkpoint kinase Rad53." *J Biol Chem* **283**(25): 17123-30.
- Tyers, M. (1996). "The cyclin-dependent kinase inhibitor p40^{SIC1} imposes the requirement for Cln G1 cyclin function at Start." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(15): 7772-6.
- Tyers, M., G. Tokiwa, et al. (1993). "Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins." *Embo J* **12**(5): 1955-68.
- Vaze, M. B., A. Pellicioli, et al. (2002). "Recovery from checkpoint-mediated arrest after repair of a double-strand break requires Srs2 helicase." *Mol Cell* **10**(2): 373-85.
- Venclovas, C. and M. P. Thelen (2000). "Structure-based predictions of Rad1, Rad9, Hus1 and Rad17 participation in sliding clamp and clamp-loading complexes." *Nucleic Acids Res* **28**(13): 2481-93.
- Verges, E., N. Colomina, et al. (2007). "Cyclin Cln3 is retained at the ER and released by the J chaperone Ydj1 in late G1 to trigger cell cycle entry." *Mol Cell* **26**(5): 649-62.
- Verma, R., R. S. Annan, et al. (1997). "Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase." *Science* **278**(5337): 455-60.
- Verma, R., A. Patapoutian, et al. (1991). "Identification and purification of a factor that binds to the Mlu I cell cycle box of yeast DNA replication genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(16): 7155-9.
- Visintin, R., K. Craig, et al. (1998). "The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation." *Mol Cell* **2**(6): 709-18.
- Visintin, R., E. S. Hwang, et al. (1999). "Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus." *Nature* **398**(6730): 818-23.
- Visintin, R., S. Prinz, et al. (1997). "CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis." *Science* **278**(5337): 460-3.
- Visintin, R., F. Stegmeier, et al. (2003). "The role of the polo kinase Cdc5 in controlling Cdc14 localization." *Mol Biol Cell* **14**(11): 4486-98.
- Wang, H., E. Gari, et al. (2004). "Recruitment of Cdc28 by Whi3 restricts nuclear accumulation of the G1 cyclin-Cdk complex to late G1." *Embo J* **23**(1): 180-90.
- Wang, H., D. Liu, et al. (2001). "Pds1 phosphorylation in response to DNA damage is essential for its DNA damage checkpoint function." *Genes Dev* **15**(11): 1361-72.
- Wasch, R. and F. R. Cross (2002). "APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit." *Nature* **418**(6897): 556-62.
- Weinert, T. A. and L. H. Hartwell (1988). "The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*." *Science* **241**(4863): 317-22.
- Weinert, T. A., G. L. Kiser, et al. (1994). "Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair." *Genes Dev* **8**(6): 652-65.
- Weinreich, M. and B. Stillman (1999). "Cdc7p-Dbf4p kinase binds to chromatin during S phase and is regulated by both the APC and the RAD53 checkpoint pathway." *Embo J* **18**(19): 5334-46.
- Wijnen, H., A. Landman, et al. (2002). "The G(1) cyclin Cln3 promotes cell cycle entry via the transcription factor Swi6." *Mol Cell Biol* **22**(12): 4402-18.
- Wilmes, G. M., V. Archambault, et al. (2004). "Interaction of the S-phase cyclin Clb5 with an "RXL" docking sequence in the initiator protein Orc6 provides an origin-localized replication control switch." *Genes Dev* **18**(9): 981-91.

- Wold, M. S. (1997). "Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism." *Annu Rev Biochem* **66**: 61-92.
- Wu, L., K. Luo, et al. (2008). "MDC1 regulates intra-S-phase checkpoint by targeting NBS1 to DNA double-strand breaks." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(32): 11200-5.
- Yaglom, J., M. H. Linskens, et al. (1995). "p34Cdc28-mediated control of Cln3 cyclin degradation." *Mol Cell Biol* **15**(2): 731-41.
- Yang, X. H. and L. Zou (2006). "Checkpoint and coordinated cellular responses to DNA damage." *Results Probl Cell Differ* **42**: 65-92.
- Yoon, H. J., S. Loo, et al. (1993). "Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* CDC7 function during the cell cycle." *Mol Biol Cell* **4**(2): 195-208.
- Yoshida, S., K. Asakawa, et al. (2002). "Mitotic exit network controls the localization of Cdc14 to the spindle pole body in *Saccharomyces cerevisiae*." *Curr Biol* **12**(11): 944-50.
- Zachariae, W., M. Schwab, et al. (1998). "Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex." *Science* **282**(5394): 1721-4.
- Zegerman, P. and J. F. Diffley (2007). "Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast." *Nature* **445**(7125): 281-5.
- Zhao, J., B. K. Kennedy, et al. (2000). "NPAT links cyclin E-Cdk2 to the regulation of replication-dependent histone gene transcription." *Genes Dev* **14**(18): 2283-97.
- Zhao, X., A. Chabes, et al. (2001). "The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage
- A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools." *Embo J* **20**(13): 3544-53.
- Zhao, X., B. Georgieva, et al. (2000). "Mutational and structural analyses of the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 define its Rnr1 interaction domain whose inactivation allows suppression of mec1 and rad53 lethality." *Mol Cell Biol* **20**(23): 9076-83.
- Zhao, X., E. G. Muller, et al. (1998). "A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools." *Mol Cell* **2**(3): 329-40.
- Zhao, X. and R. Rothstein (2002). "The Dun1 checkpoint kinase phosphorylates and regulates the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(6): 3746-51.
- Zhou, B. B. and J. Bartek (2004). "Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection." *Nat Rev Cancer* **4**(3): 216-25.
- Zhou, Z. and S. J. Elledge (1993). "DUN1 encodes a protein kinase that controls the DNA damage response in yeast." *Cell* **75**(6): 1119-27.
- Zou, L., D. Cortez, et al. (2002). "Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin." *Genes Dev* **16**(2): 198-208.
- Zou, L. and S. J. Elledge (2003). "Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes." *Science* **300**(5625): 1542-8.

ANNEXOS

Definicions

Checkpoint de la fase S: Via de transducció de senyals que s'activa en presència d'estrès genotòxic durant la replicació del DNA i que genera una resposta global a la cèl·lula que permet fer front a aquest estrès.

Estrès genotòxic: Estrès generat per qualsevol substància o condició que compromet l'estabilitat genòmica de la cèl·lula i provoca l'activació dels mecanismes de vigilància o *checkpoints*. L'estrès genotòxic pot estar causat per dany al DNA o per estrès replicatiu.

Dany al DNA: Qualsevol lesió del DNA, ja sigui produïda per causes endògenes o exògenes, que compromet la integritat genòmica i provoca l'activació dels checkpoints. Hi ha una gran varietat de lesions: trencaments de doble cadena, metilacions, dímers de timidina...

Estrès replicatiu: Estrès genotòxic degut a una disminució dels dNTPs, els precursors del DNA, que comporta una aturada de les forquilles de replicació durant la fase S. Les forquilles de replicació aturades són altament inestables i recombinogèniques si el checkpoint no s'activa degudament.

Recuperació del checkpoint: Procés d'inactivació de la via de senyalització del checkpoint un cop la lesió al DNA ha estat reparada o l'estrès replicatiu superat.

Abreviatures

1C	1 contingut de DNA
2C	2 continguts de DNA
AEBSF	4-(2-aminoetil)-benzenosulfonil fluorit-HCl
BSA	albúmina de sèrum boví
CDK	quinasa dependent de ciclina
CDK-M	quinasa dependent de ciclina de la fase M
CDK-S	quinasa dependent de ciclina de fase S
DDK	quinasa dependent de Dbf4
DMSO	dimetilsulfòxid
DNA	àcid desoxiribonucleic
dNTP	desoxiribonucleòtid trifosfat
DSB	trencament de doble cadena de DNA
DTT	ditiotretitol
EDTA	àcid etilendiaminotetraacètic
EGTA	àcid etilenglicol-bis (b-aminoetileter)- N, N, N', N'-tetraacètic
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Gal	galactosa
GST	Gluthation-S-Transferasa
HU	Hidroxiurea
IPTG	β -D-isopropil-tiogalactopiranosid
Kb	Quilobase
LB	medi de cultiu <i>Lysogeny Broth</i>
LBA	medi de cultiu <i>Lysogeny Broth</i> amb ampil·lina
MCM	<i>minichromosome maintenance</i>
MMS	metilmetà sulfonat
NP-40	Nonidet P-40
ORC	complex de reconeixement dels orígens
PAGE	electroforesi en gel de poliacrilamida
PCNA	<i>Proliferating Cell NuclearAntigen</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Raf	rafinosa
RFC	factor de replicació C
RNA	àcid ribonucleic
RNR	ribonucleòtid reductasa
RPA	proteïna de replicació A
SDS	dodecilsulfat de sodi
ssDNA	DNA de cadena senzilla
TAE	tampó Tris/Acetat/EDTA
TBS	tampó Tris salí
TCA	àcid tricloroacètic
TE	tampó Tris/EDTA
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamina
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometà
WT	soca salvatge, nativa (<i>wild type</i>)
YP	medi ric de <i>S. cerevisiae</i> (<i>Yeast extract/Peptone</i>)
YPD	medi ric amb glucosa (<i>Dextrose</i>)
YPGal	medi ric amb galactosa (<i>Galactose</i>)
YPRaff	medi ric amb rafinosa (<i>Raffinose</i>)

YPSucr medi ric amb sucrosa (*Sucrose*)

Llistat de reactius utilitzats i cases comercials

Acrilamida:bisacrilamida (37,5:1) – BioRad (ref. 161-0148)
Agarosa – Laboratoris Conda (D-1 low EEQ-GQT, ref. 8017)
Agar – Laboratoris Conda (ref. 1800.00)
AEBSF – Melford (ref. MB2003)
Anticossos
 Anti-Rad53 (YC-19) – Santacruz (ref. SC-6749)
 Anti- c-myc (clone 9E10) – Roche (ref. 11667149001)
 Anti-3HA (clone 12CA5) – Roche (ref. 11583816001)
 Anti-IgG-HRP (de cabra) – Santacruz (ref. SC-2020)
 Anti-IgG-HRP (de ratolí) – Dako (ref. P0161)
Anti-HA High affinity Matrix (clone 3F10) – Roche (ref. 11815016001)
Aprotinina – Roche (ref. 1583794)
APS – Melford (ref. A1512-100G)
Blau de Coomassie – Sigma (Brilliant Blue 250 R)
Bromur d'Etidi – Bio-Rad (ref. 161-0433)
BSA certificada lliure d'immunoglobulines – Sigma (ref. A7030)
Clorur de Magnesi – Sigma (ref. M-2670)
Clorur de Manganès – Merck (ref. 105927)
DMSO – Sigma (ref. D2650-100ML)
DNA polimerasa (PCR) – Finnzyme (ref. 11969064001)
dNTPs (A,T,G,C) – Roche (Phusion High-Fidelity DNA polimerase)
Enzims de restricció – New England Biolabs
Extracte de llevat – BD (Bacto™ Yeast Extract, ref. 212750)
 – Laboratoris Conda (ref. 1702.00)
EDTA – Sigma (ref. E-6758)
EGTA – Sigma (ref. E-8145)
Fenol:cloroform: isoamilalcohol – Sigma (ref. P3803-250ML)
Fosfatasa antàrtica – New England Biolabs (Ref. M02895)
Glicina – Melford (ref. G0709)
Galactosa – Sigma (ref. G0750-100G)
Glucosa – Merck (ref. 36922074)
G418 – Melford (ref. G0175)
Hidroxiurea – Sequoia (ref. SRP03960h)
Immunoblot detecció – Healthcare (ref. RPN2132)
Iodur de propidi – Sigma (ref. P4170-1G)
IPTG – Melford (ref. MB1008)
Leupeptina – Roche (ref. 253286)
Lisozim – Sigma (ref. L6876-1G)
Llet en pols descremada – Sveltesse (Nestle)
Marcador de DNA – New England Biolabs (1 Kb ladder, ref. N3232S)
Marcador de proteïna – Fermentas (ref. SM0441)
Metilmetanosulfonat – Sigma-Aldrich (ref. 129925-5G)
Ortovanadat de Sodi – Sigma (ref. S-6508)
Pepsina – Sigma (ref. P7012-1G)
Pepstatina – Roche (ref. 11524488001)

Peptona – BD (Bacto™ Peptone, ref. 211677)
– OXOID (Bactoeriological Peptone, ref. 736279)
Ponceau-S – Sigma (ref. P-3504)
Rafinosa – Sigma (ref. R0250-100G)
Ribonucleasa A – Sigma (ref. P5125-100MG)
SDS – Melford (ref. S1030)
Sucrosa – Sigma (ref.S7903-250MG)
T4 DNA ligasa – Roche (ref. 12759622)
TCA – Sigma (ref. T0699-250ML)
TEMED – BioRad (ref. 101-0800)
Triptona – Laboratoris Conda (ref. 1612.00)
Tris base – Sigma (ref. T-1503)
Tween-20 – Bio-Rad (ref. 170-6531)
Uracil – Sigma (ref. U-0750)
Yeast nitrogen base – Difco (ref. 291940)
2-Propanol – Fluka (ref. 59304-100ML)
5FOA – Melforsd (ref. 703-95-7)

AGRAÏMENTS

I per últim els agraïments. Sembla que va ser ahir que començava il·lusionada i expectant el doctorat i ara, ja han passat més de quatre anys i ha arribat el final. És un moment per fer balanç, hi han hagut moments màgics, plens d'alegria i felicitat i també moments més agredolços, però tots han fet que cresqués com a persona en tots els àmbits. En aquesta etapa m'han acompanyat persones de tota la vida i altres que he conegut en el transcurs d'aquests anys, totes i cadascuna d'elles han fet que aquest període de la meua vida fos especial i inoblidable. A totes elles gràcies.

Primer de tot, agrair al director d'aquesta tesi, Dr. David G. Quintana, haver-me donat l'oportunitat d'incorporar-me al seu grup, malgrat tots els problemes inicials. Gràcies per la teua dedicació i esforç durant tot aquest temps. Per ensenyar-me a fer ciència i "ciència ben feta", i no haver perdut la paciència en el procés. Gràcies per haver-me tornat la il·lusió en la ciència i haver fet que tornes a ser, no solsament una feina, sinó també, una passió.

En segon lloc vull donar les gràcies als Drs. Juan Emilio Felú, Andrés Esteban i Fàtima Bosch. Els dos primers per haver-me mostrat les dues cares de la ciència i haver fet possible que acabes fent la tesi amb el David i, a la Dr. Bosch, haver-me adoptat, com un becari més del seu grup, durant la meua primera etapa pre-doctoral.

També vull donar les gràcies a aquelles persones que amb els seus consells, suport i experiències viscudes, em van ajudar en els mals moments, que en van ser uns quants. En especial a l'Alba C, la Tura, l'Assumpció, la Mercè, en Jordi Bernués i la Carme Solsona. Tots vosaltres d'una manera o altre m'heu ajudat a tots els nivells (personal i professional) per arribar a aquest moment. No canviu mai.

Agrair al Dr. Joaquín Ariño i al seu grup de Veterinària, el Dr. Steven Haase, el Dr. Steven Sedgwick i el Dr. Curt Wittenberg totes les soques cedides per dur a terme aquest treball. I també donar les gràcies a Alain Verrault i Akash Gunjan per la comunicació de resultats no publicats en relació al control de la transcripció d'histones.

Per fi arriba el moment d'agrair a les meves dues famílies al laboratori el dia a dia compartit.

A la meua primera família, els "nois" i "noies" del CBATEG. L'Alba, la Tura, la Silvie, l'Ivet, l'Ari, la Vicky, la Pi, la Ju, la Vero, la Mireia, la Marta, les Annes, en Carles, els Alberts, en Xavi, en Miquel, en Joel, l'Edu, Mr. Callejas, en Cris, l'Antonio, en Pedro, Sense oblidar-me dels habitants de la 4^a i la 5^a, ni dels tècnics i administratius (Jenny, Lúdia, Carles, Teresa,...). Agrair especialment a l'Alba, la Tura, la Teresa i algun que altre, que m'hauré descuidat, tots els moments compartits (bons, dolent, agredolços, ...). Gràcies per ser com sou i haver-me brindat la vostra amistat.

A la meva segona família, però no per això menys important: la Unitat de Biofísica.

Un agraïment molt especial a les meves dues companyes de grup, l'Alba i l'Anna. Gràcies per haver-me guiat pel món dels llevats amb paciència i entusiasme. Sense oblidar-me de les incorporacions més recents, l'Àngel i el Roger. A l'Àngel agrair-li les xerrades de ciència i al Roger la seva il·lusió i dedicació encomanadisses. Us desitjo el millor als dos.

Als companys de laboratori, els Cateninos, amb la Neus, la Gabri, en David, la Bea, l'Ero i la Montse. Gràcies per tots els moments inoblidables que meu fet viure.

Sense deixar-nos de la secció de biofísica: Amb la Xell i els seus desastres que sempre et fan somriure i la seva predisposició a ajudar-te davant d'un problema informàtic. Amb la Rosana, la Núria, la Sílvia i la Carme i, el seu bon humor contagiós; sempre disposades a escoltar-te. Amb l'Oliver i les seues entusiasmes per la ciència. I un llarg etcètera de becaris i post-docs que donen caliu a la unitat. A tots ells gràcies, per compartir-ho amb mi i suportar les meves corredisses.

També donar les gràcies per la seva bona predisposició en tot moment als jefes de la Unitat i al personal administratiu (la Mercè, la Sílvia i l'Elodia).

Als amics de sempre per haver-me fet costat en els bons moments i els mals moments (que han estat uns quants), per haver escoltat les batalletes del laboratori i tot i això, continua el meu costat. Gràcies: Gerard, Manel, Guillem, Jesús i Dami, Guillermo i José Manuel, Aitor i Lur, Sergio i Míriam, el trio calavera madrilenyo, Al i Josep, Carles, i un llarg etcètera, no tinc paraules per expressar el que signifiquen per mi.

Als "validos rojos" per ser la meua vàlvula d'escapament en els bon i els mals moments. Gràcies.

A la "marea amarilla" per haver-me donat la vostra amistat; cuidar sempre d'en Valentino i preocupar-vos per mi i els meus experiments. Gràcies: Alexio, Stephano, Philipo, Paolo, Davide, Limoncelli, Angelo, les meves mames italianes, Formeu grocs i vermells part de la meua família italiana. No canvieu

I per últim però, no menys important la meua família: els meus pares, sense vosaltres no seria on sóc ni seria com sóc, gràcies per recolzar-me en tot i animar-me en els moments baixos, ajudant-me en tot moment. Al meu germà, en Roger, no podria tenir-ne un de millor. Gràcies per ser com ets i aconsellar-me sempre, no canviïs mai, Espero que en el futur pugui estar al teu costat de la mateixa forma que ho has estat tu. Als meus avis i a les tietes postisses per pensar sempre amb mi i animar-me. Gràcies a tots pel vostre amor incondicional. I per descomptat, al Valentino, gràcies per ser com ets i compartir-ho amb mi. Gràcies per mostrar-me que amb un somriure la vida és millor.

I finalment donar les gràcies a Generalitat de Catalunya per la beca predoctoral de la qual he estat beneficiària durant 4 anys, beca finançada amb el suport del Departament d'Universitats, Recerca i Societat i el Fons Social Europeu

Bellaterra, abril 2009

