

"Interpretació artística de diverses soques de *S. Cerevisiae*". Fotografia S. Regot, modificada per J. Planagumà.

## TRANSPORT NUCLEOCITOPLASMÀTIC DE SAPKINASES

Escrit per:

**Regot S., Mas G., de Nadal E. i Posas F.**

Unitat de senyalització cel·lular,  
Universitat Pompeu Fabra.

Treball premiat en la primera edició  
del Premi Gemma Rossell i Romero

### SUMARI

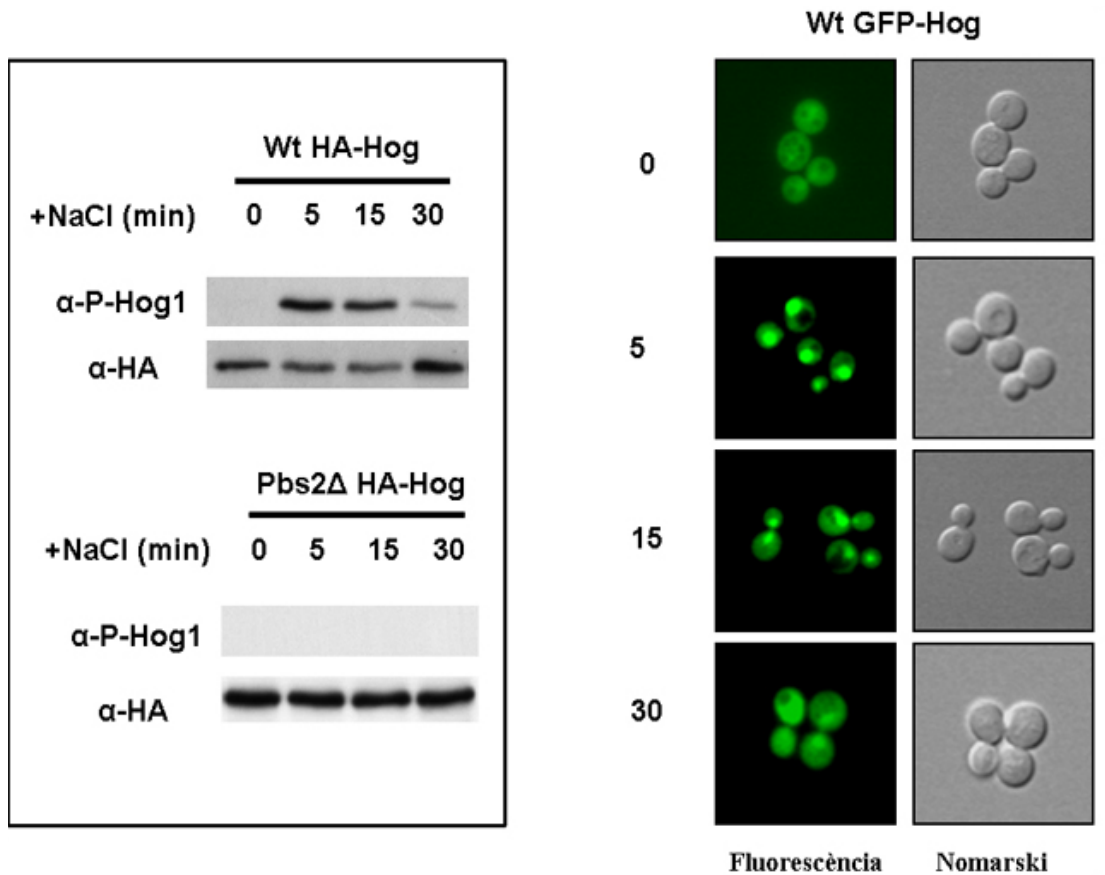
*Les proteïnes de senyalització de tipus MAPK han estat àmpliament estudiades per la seva implicació en processos de canvi de la fisiologia cel·lular. Les MAP cinases que responen a estrès s'anomenen SAPK i són d'especial importància perquè estan implicades en processos d'apoptosi i inflamació, essent en nombroses ocasions mecanismes de patologia molecular. Per aquest motiu és interessant estudiar els processos d'activació i resposta de les vies de les SAPKs. Un dels punts de control en aquestes vies de senyalització és el transport nucleocitoplasmàtic d'aquestes proteïnes, ja que aquest és un pas essencial per generar grans canvis en la fisiologia cel·lular. En aquest treball hem identificat i caracteritzat un component del porus nuclear essencial per a l'adaptació a estrès osmòtic: la nucleoporina Nup188.*

INTRODUCCIÓ

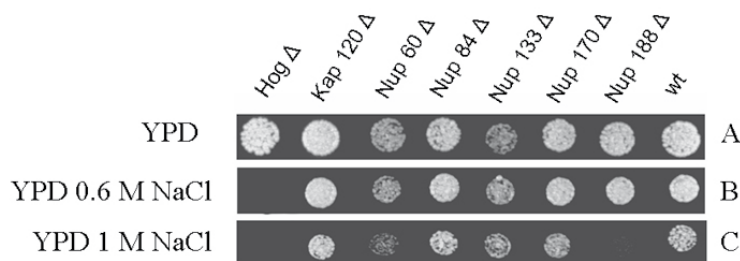
SAPK (stress activated protein kinase) és un terme que s'usa per a designar les proteïnes de tipus MAP cinasa que responen a estrès, per tant són cinases implicades en rutes de transducció de senyals que modulen la fisiologia cel·lular per tal

d'adaptar-se a l'estrès. En mamífers, les principals SAPKs són JNK i p38, que regulen l'apoptosi i la resposta inflamatòria. Per tant, entendre els mecanismes d'activació i de resposta pot generar noves dianes per malalties com l'artritis reumatoide, l'asma, les malalties autoimmunitàries o fins i tot pel càncer (1).

Atesos els coneguts avantatges que suposa treballar amb llevats, en el nostre laboratori estudiem la SAP cinasa Hog1 de *Saccharomyces cerevisiae*, que és homòloga a p38, fins al punt que p38 complementa totalment una soca *hog1Δ*. La via de Hog1 té dues branques d'activació, la de l'osmosensor Sln1 i la branca de Sho1.



**Figura 1.** Anàlisi de la cinètica d'activació de la via de Hog1. Les soques amb HA-Hog1, Pbs2Δ HA-Hog1 i GFP-Hog1 es van fer créixer fins arribar a la fase exponencial. Posteriorment es va produir un estrès de 0.4M NaCl i es van recollir les cèl·lules als temps indicats. D'una banda es va fer l'anàlisi per western blot de les soques amb HA-Hog1 i de l'altra es van prendre les fotos de la soca amb GFP-Hog1.



**Figura 2.** Anàlisi de la capacitat de creixement en medis hiperosmòtics. Les cèl·lules es van fer créixer fins a fase exponencial (OD=0.8), posteriorment es van diluir a OD=0.025, i es van sembrar en els diferents medis 2μl de cada soca.

Aquestes dues branques donen lloc a l'activació, per fosforilació, de la MAPKK de Hog1, Pbs2, que fosforila Hog1 (2). Per tant, la via de Hog1 respon principalment a estrès osmòtic i als 5 minuts de l'estrès veiem com la SAPK es fosforila. A més, al mateix temps la localització al nucli és màxima (Fig 1).

El porus nuclear és una estructura proteica composta aproximadament per unes 30 proteïnes diferents i està implicat tant en el transport de proteïnes com en el de RNA. Pel que fa a la seva localització,

es distingeixen tres tipus de nucleoporines: les simètriques, les nuclears i les citoplasmàtiques, mentre que fisiològicament en trobem dos tipus: les FG nups i les no-FG nups. S'anomenen FG nups perquè tenen repeticions de Phe i Gly que constitueixen els dominis d'acoblament d'importines i exportines (3). Tenint en compte aquesta classificació, el model de transport proposat es basa en l'afinitat diferencial de les proteïnes transportadores per les nucleoporines asimètriques.

De tots els mecanismes de transport coneguts (4) vam pensar que el més apropiat seria un mecanisme independent de transportador, degut a la necessitat que la resposta sigui ràpida, ja que d'aquesta manera Hog1 no ha de competir amb altres proteïnes per la font d'importines de la cèl·lula. De fet, ja s'ha demostrat que la MAPK Erk2 es concentra al nucli a través d'un mecanisme independent de transportador, mitjançant la seva unió directa a la nucleoporina Nup153 (5).

#### MATERIALS I MÈTODES

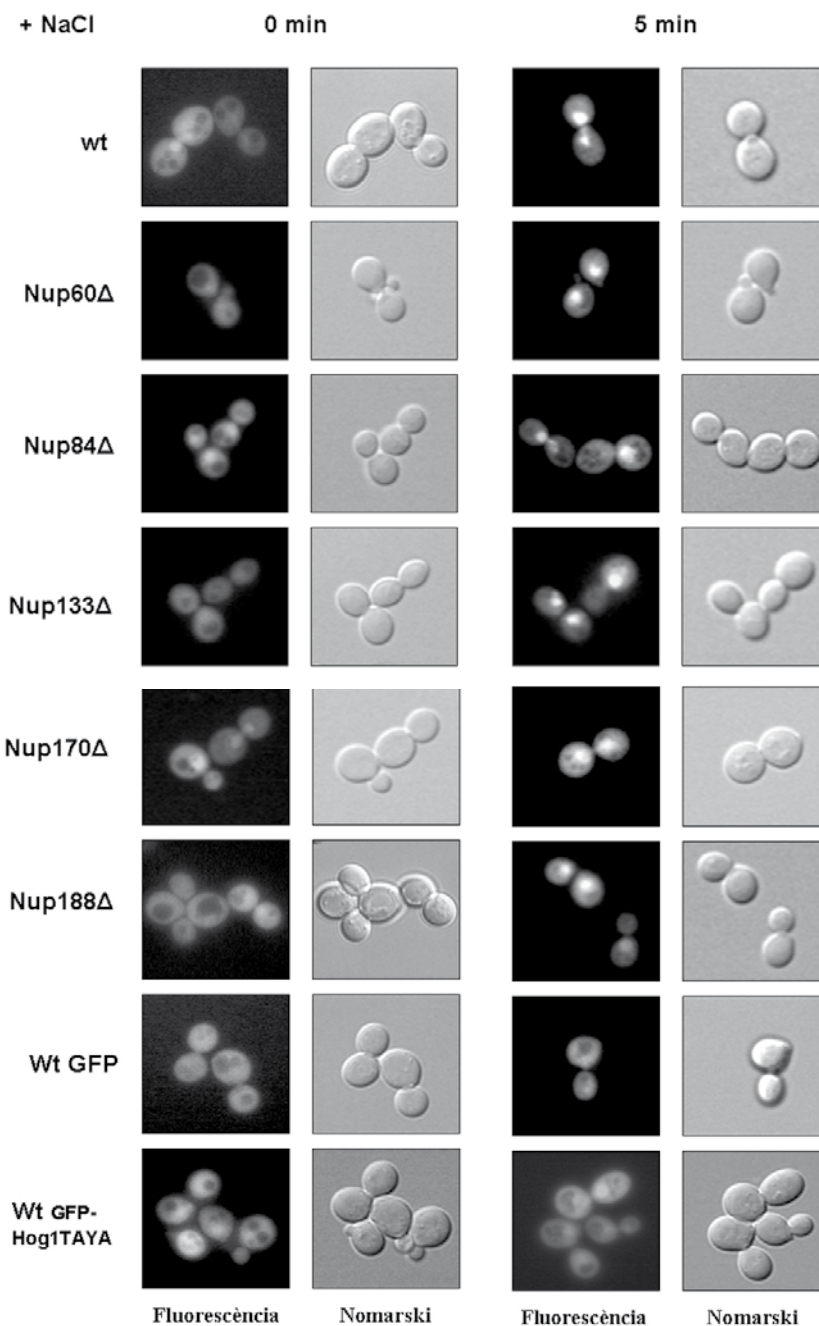
Les soques s'han generat truncant per recombinació els ORFs desitjats de la soca BY4741. Per tal de visualitzar la localització subcel·lular de Hog1 s'ha utilitzat un plàsmid pRS416 amb la construcció GFP-Hog1, GFP o GFP-Hog1TAYA i un microscopi de fluorescència Nikon Eclipse E600 a 100 augments. Les imatges s'han obtingut amb una càmera Orca II Dual Scan Cooled CCD (Hamamatsu) i el software de captura d'imatges ha estat l'Aquacosmos 2.0.

#### RESULTATS

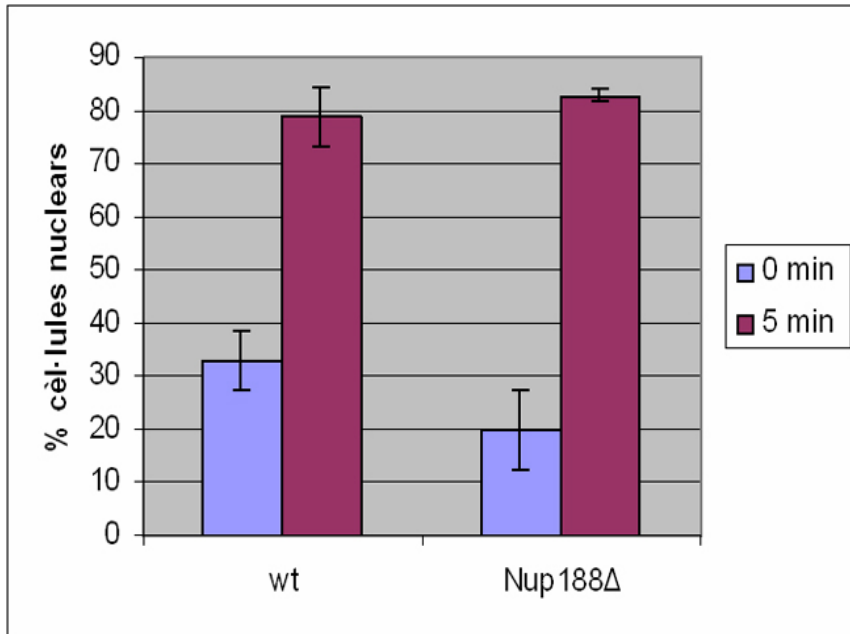
Per tal d'identificar els components del porus nuclear essencials per al transport de Hog1, es van analitzar un seguit de garbellaments (screenings) fets sobre soques delecionades, cadascuna en un gen, per tots i cada un dels gens del llevat. Els garbellaments analitzaven el creixement i l'activitat transcripcional en medis hiperosmòtics. D'aquestes anàlisis vam ex-

treure una sèrie de components del porus nuclear que, si estaven delecionats, produïen anomalies en el correcte funcionament de la via. Les soques seleccionades van ser NUP188Δ, NUP170Δ, NUP84Δ, NUP60Δ, NUP133Δ i KAP120Δ (importina).

L'anàlisi detallada d'aquestes soques va mostrar que una soca de llevat deficient en Nup188 és incapaç de créixer en un medi hiperosmòtic (1M NaCl) (Fig. 2.C) mentre que en medis amb menys concentració de NaCl (0,6M NaCl) les cèl·lules podien adaptar-se (Fig. 2.B). Això ens



**Figura 3.** Anàlisi de la localització de GFP-Hog1. Les cèl·lules es van fer créixer fins a fase exponencial (OD=0.8), posteriorment es van fer les fotos a temps 0 i es van estressar els cultius a 0.4M NaCl. Als 5 minuts de l'estrès es van prendre les fotos a temps 5. En totes les soques veiem la construcció GFP-Hog1 excepte en els controls negatius (GFP i GFP-Hog1TAYA). Aquests controls no tenen la fluorescència localitzada al nucli en resposta a l'estrès.



**Figura 4.** Recompte de cèl·lules amb diferents patrons de localització de GFP-Hog1. Es van comptar cèl·lules en fase exponencial als temps indicats després de l'estrès en funció del patró de localització de GFP-Hog1. Els resultats s'han obtingut de tres experiments independents.

indica que la via és operativa però falla a l'hora d'adaptar-se a estressos extrems.

L'anàlisi de la localització de GFP-Hog1 en les soques seleccionades va mostrar un patró de localització nuclear en resposta a estrès osmòtic (5 minuts a 0,4M NaCl) també en la soca Nup188Δ (Fig. 3), amb què a més es va realitzar un recompte de cèl·lules amb GFP-Hog1 al nucli que va demostrar significativament que en resposta a estrès la proteïna de fusió GFP-Hog1 es localitza predominantment al nucli en un fons Nup188Δ de forma similar a l'observat en la soca salvatge (Fig. 4). Com a controls es van utilitzar la localització de GFP i GFP-Hog1TAYA en resposta a NaCl. Hog1TAYA és un mutant de Hog1 que té mutades la Tre i la Tyr que són fosforilades per Pbs2, a Ala. Per tant aquest mutant no pot activar Hog1.

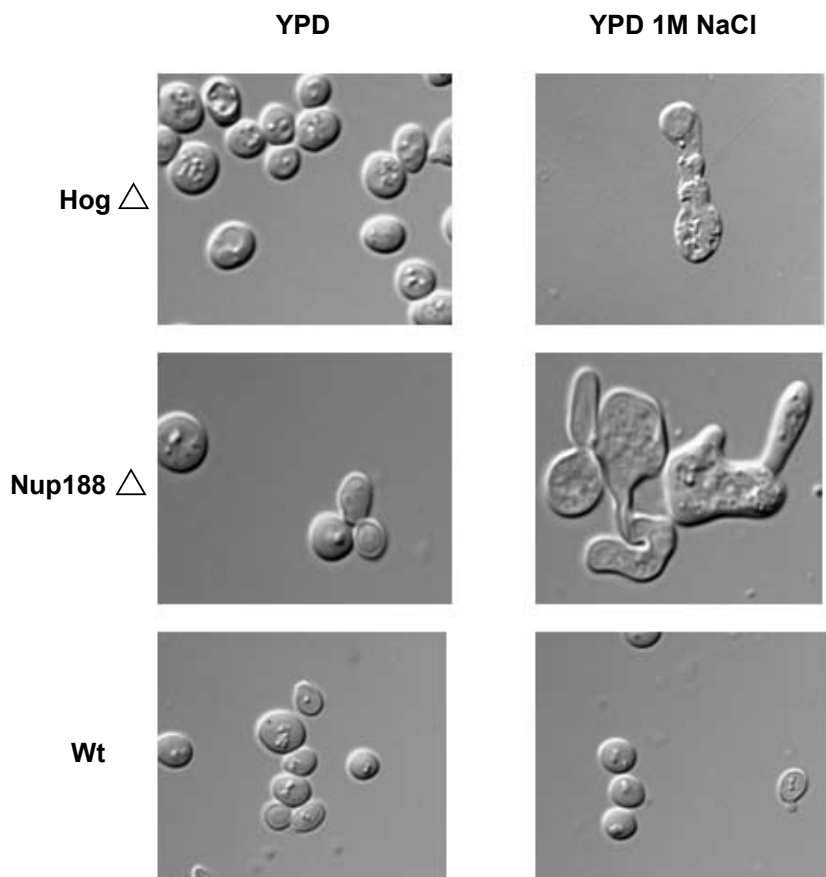
Ja que la localització no estava alterada en una soca que era clarament osmosensible (Fig. 5) vam decidir analitzar el comportament de la via a d'altres nivells.

La cinètica de fosforilació de Hog1 en un fons Nup188Δ és completament correcta

(Fig 6) i l'activitat transcripcional es veu lleugerament disminuïda només per alguns gens de resposta purament a estrès osmòtic com és el cas de STL1, mentre que amb GRE2 i CTT1 no es veuen canvis (Fig 7). Això ens pot fer pensar que Nup188 és necessària entre els processos de fosforilació i transcripció.

#### DISCUSSIÓ

A partir de tots els experiments realitzats podem afirmar que la Nup188 és necessària per a l'osmoadaptació de forma específica, però que la localització de Hog1 no se'n veu afectada, per tant podem dir que no és essencial per al transport nucleocitoplasmàtic de la SAP cinasa. Analitzant la funcionalitat de la via en altres nivells hem vist que la fosforilació de Hog1 és completament normal, i la transcripció cau només per STL1, mentre que

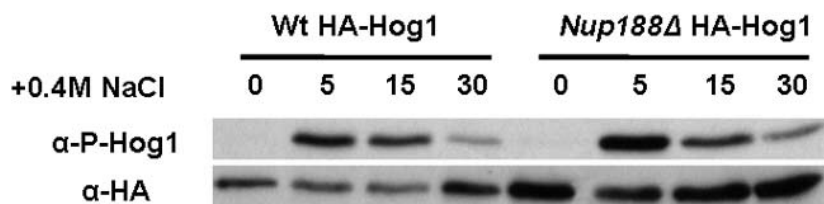


**Figura 5.** Fenotip d'osmosensibilitat en placa. Les cèl·lules es van fer créixer en plaques de YPD o YPD 1M NaCl i el dia següent es van picar colònies per a fer les fotos.

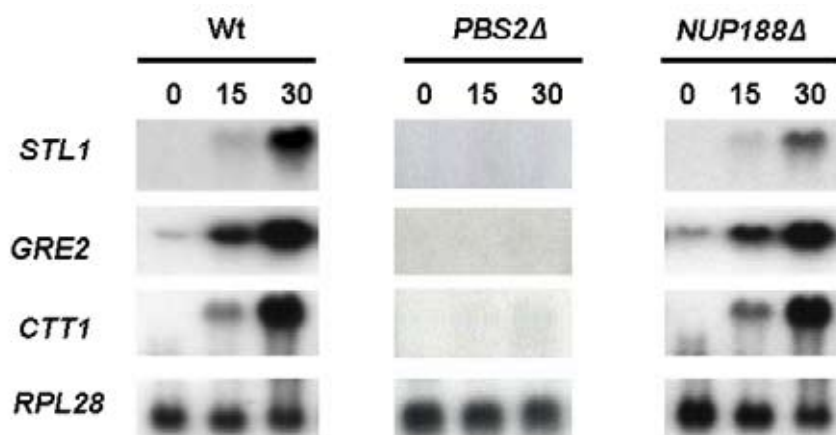
GRE2 i CTT1 no estan afectats. La transcripció de STL1 depèn del factor de transcripció Hot1, que és específic d'estrès osmòtic, mentre que GRE2 i CTT1 depenen d'altres factors i són gens que responen també a estrès oxidatiu i estrès tèrmic (6 i 7).

Per tant podria ser que es produís un defecte en el transport de RNAm específic d'estrès, i per aquest motiu la cèl·lula falla a l'hora adaptar-se a estressos extrems. Anant més enllà, i pel fet que no més gens molt específics d'estrès osmòtic es veuen afectats, podríem pensar que

Nup188 pot ser necessària per regular el porus nuclear i prioritzar el transport de certs RNAm de forma dependent de Hog1. És comprensible pensar que durant un estrès important els mecanismes de resposta han de competir amb d'altres processos i per tant s'han de prioritzar al màxim per tal d'assegurar la supervivència cel·lular. Per tant, el que podria passar és que hi hagi components del porus nuclear que estan permanentment preparats per transportar aquests RNAm i d'aquesta forma la cèl·lula assegura una via de transport sense competència.



**Figura 6.** Anàlisi per western blot de la cinètica de fosforilació de Hog1 en un fons Nup188 Δ. Les cèl·lules es van fer créixer fins a fase exponencial, posteriorment es van estressar amb 0.4M NaCl i es van recollir als temps indicats. Els extractes proteics de les cèl·lules es van analitzar per western blot.



**Figura 7.** Anàlisi per northern blot de la transcripció de gens de resposta a estrès en un fons Nup188Δ. Les cèl·lules es van fer créixer fins a fase exponencial, posteriorment es van estressar amb 0.4M NaCl i es van recollir als temps indicats per realitzar l'anàlisi per northern blot.

## AGRAÏMENTS

Agraïco a la Gemma, l'Encarna, l'Elisabeth i tots aquells que han fet possible la primera edició del premi Gemma Rossell i Romero, que ens hagin donat l'oportunitat d'exposar la nostra feina i d'obrir-nos pas una mica més en el món de la ciència

## REFERÈNCIES

- Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*. 2002 Dec 6;298(5600):1911-2. Review
- de Nadal E, Alepuz PM, Posas F. Dealing with osmstress through MAP kinase activation. *EMBO Rep*. 2002 Aug;3(8):735-40. Review.
- RoutMP, Aitchison JD, Suprapto A, Hjertaas K, Zhao Y, Chait BT. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol*. 2000 Feb 21;148(4):635-51
- Wente SR. Gatekeepers of the nucleus. *Science*. 2000 May 26;288(5470):1374-7. Review.
- Witehurst AW, Wilsbacher JL, You Y, Luby-Phelps K, Moore MS, Cobb MH. ERK2 enters the nucleus by a carrier-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 May 28;99(11):7496-501.
- Garay-Arroyo A, Covarrubias AA. Three genes whose expression is induced by stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 1999 Jul;15(10A):879-92.
- Wieser R, Adam G, Wagner A, Schuller C, Marchler G, Ruis H, Krawiec Z, Bilinski T. Heat shock factor-independent heat control of transcription of the CTT1 gene encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1991 Jul 5;266(19):12406-11.