



Eva Lambea Martínez

Tesi Doctoral

**Activació i regulació de la quinasa *Srk1* en resposta
a estrès en *Schizosaccharomyces pombe***

Tesi presentada per

Eva Lambea Martínez

Per tal d'optar al grau de Doctora en Biologia per la Universitat de Barcelona

Barcelona, Maig del 2009

Programa de doctorat de Biologia i Patologia Cel·lulars
Bienni 2004-2006, de la Universitat de Barcelona

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció de la
Doctora Rosa Aligué Alemany en el Departament de
Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències de la
Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona

Barcelona, Maig del 2009

AGRAÏMENTS

La vida és allò que et va succeint mentre t'obstines a fer altres plans... i la veritat és que si fa 9 anys, quan vaig començar la carrera de Biologia, m'haguessin dit que ara estaria escrivint aquests agraiments (amb tot el que comporten), no m'ho hagués cregut. Ara, gairebé 5 anys després d'entrar per la porta del lab de Biologia Cel·lular, marxo amb una tesi sota el braç i mil i una experiències que tant a nivell personal com professional m'han fet créixer com a persona. I és per això que vull agrair a totes les persones que han format part d'aquesta etapa de la meua vida, perquè en menor o major grau heu fet que això sigui possible.

En primer lloc, la "Jefa"!! Rosa, no em puc creure que això s'acabi... recordo perfectament el primer dia que vaig venir a l'entrevista i vam estar xerrant al teu despatx... que contenta me'n vaig anar cap a casa! Des d'aquell dia t'he d'agair moltes coses... la primera de tot, que m'hagis donat l'oportunitat de fer el doctorat al teu grup. Gràcies a tu he après tot el que sé sobre ciència i el més important, a formar part de la ciència. Professionalment t'he d'agair que hagis estat recolzant-me en tota aquesta etapa, que m'hagis donat llibertat per "espavilar-me" quan tocava però sempre molt pendent de mi. Sempre has estat disponible quan t'he necessitat i m'has fet sentir lliure de poder parlar amb tu de qualsevol cosa, ja fos professional o personal. Trobaré molt a faltar les nostres xerrades científiques al teu despatx! Realment, si d'alguna cosa estic molt agraïda és del tracte que has tingut d'igual a igual amb mi durant aquesta darrera etapa i de tota la confiança que has dipositat en mi. M'has fet participar dels teus pensaments, de les teves idees i el més important, m'has ensenyat a pensar. Finalment, no seria just acabar aquestes línies sense agrair-te que absolutament sempre hagis lluitat per les teves "ninetes". Gràcies per fer que siguem un grup tant unit, per comptar amb nosaltres per prendre decisions, per parlar amb nosaltres amb tota llibertat i sinceritat i per obrir-nos les portes de casa teua, juntament amb en Ramon, amb tants i tants sopars que hem celebrat. Et trobaré a faltaaaaar!!!

Al Carles, la Neus i l'Oriol. Gràcies per les paraules d'ànim, les vostres idees i preguntes als seminaris! La veritat és que s'agraeix, sobretot no sent "una mamífer", jeje! Seguiu inculcant als vostres becaris la vostra passió per la ciència i sobretot, seguiu mantenint les tradicions d'aquest laboratori! No seria el mateix sense les calçotades i paellades! Carles, ara qui et farà la competència pels matins??? Jejej...Allà on vagi no sé si trobaré algú tant matiner com tu! ☺.

A l'Eulàlia, la nostra "lab manager"... merci per posar ordre en el nostre desordre! Gràcies per estar pendent de qualsevol cosa, per estar disponible a ensenyar-nos i ajudar-nos sempre, i particularment, per transmetre'm la passió per la docència! M'ha agradat molt fer de profe de pràctiques! Qui sap!? Potser en un futur... ☺. A la Xus, per preguntar-me sempre com estic i què tal em van les coses. Per les estones divertides parlant de les nostres històries!

A las secres, Núria y Carme, muchas gracias por ayudarme con todo el papeleo!! Cuando me he ido de congreso y ahora con la tesis! Gracias por tranquilizarnos con todo el tema burocrático que se nos hace un mundo!

Als que ja no hi són al laboratori: Jorge, Elson, Vero, Marta, Cristina i Sonia. Gràcies per ensenyar-me a caminar pel laboratori quan vaig entrar i no tenia ni idea! Gràcies per tants moments divertits compartits i pels vostres consells!!! Vero, nuestra guitarrista! Espero que te esté yendo todo genial en NY! Te lo mereces!!! Sonia, a ti hay que quererte!!! Gracias por nuestras charlas mientras estuviste aquí, me enseñaron a relativizar las cosas! A ver si llamas, jejeje!!!!

A la gent del servei de proteòmica: M^a José, Eva, Fran i Mariona. No hem coincidit gaire però gràcies perquè quan he tingut un dubte o problema de seguida us mobilitzeu per ajudar! Per les estones compartides al Typhoon!. A la Cristina de radioactivitat, per ensenyar-nos a treballar dins la sala, per transmetre'ns la calma i responsabilitat necessàries i per estar sempre pendent de nosaltres i disposada a ajudar-nos. A Teresita, gracias por las conversaciones tan divertidas que hemos tenido a veces! Ayudan a desconectar!

Als tècnics del nostre laboratori! La Maria, la Sònia i el Jaumet! Moltes gràcies per facilitar-nos tant la feina! De vegades no ens adonem de tot el que ens ajudeu! Gràcies! Sònia, m'ha agradat molt conèixe't. Ets una persona molt especial, transmet tranquil·litat i optimisme! M'ho he passat molt bé xerrant amb tu, ja fos al lab o a l'hora de dinar. Jaumeeet!!! Aix... això se m'acaba!! Gràcies per ajudar-me tant, per mirar-me sempre i per tantes estones divertides que hem passat! M'he rigut moltíssim amb tu! Li dones molta vida al lab!! Sense tu no seria el mateix! Et trobaré molt a faltar!!!

Al Siscu, la Marta, l'Albert i el Josep M^a, els nostres post-docs!!! Merci pels vostres suggeriments i comentaris, per mantenir viu l'esperit científic i per ajudar-nos quan entrem al laboratori! Al principi s'agraeix molt!!

A les noies del confocal! La Maria, l'Anna Bosch i l'Anna Lladó! Ara ja puc dir que sóc la primera pombe en fer *in vivos*! Ha estat un plaer, de veritat. Gràcies per

ensenyar-me tot el que sé de microscopia i per preguntar-me i interessar-vos sempre pels meus experiments. Li heu agafat carinyo als pombitos, oi?? Jejeje. Anna Lladó, et vull agrair especialment que hagis estat amb mi durant tot aquest procés, cercant sempre noves maneres de millorar els procediments i aportant noves idees. Gràcies pels ànims quan al final de tota la jornada no aconseguia res!!! I és que els pombitos són massa tímids i costa fer-lis bones fotos!!! ☺.

Als Carlistes!!! Laia, Jemina, Cecília, Sandra, Maite, Elena, Meritxell, Adam i Albert! Tot i estar separats físicament sempre ens han unit les celebracions i els seminaris!!! Us desitjo molta sort a tots!!! Laia i Jemina, gràcies per les vostres aportacions en la meua cerca de feina!!! Laia, m'ha agradat poder ajudar-te en la teva incursió al món del pombe!!.

Al grup de l'Oriol: l'Ignasi, l'Ana, la Patri, la Raffy, la Mireia, la Paky, la Maria, la Míriam, la Serena i l'Albert. La major part o ja heu acabat o us queda poc. Sigui com sigui, us desitjo molta sort amb tot el que feu i molts ànims en la recta final!!!! Ignasi, gràcies per la teva simpatia, per ajudar-me amb les RT's i per ser tant culé com jo jejej! I sobretot! Per la mega-paella que vam fer a casa teva!!! Anita, gracias por la época de fiestas y por el momento "Pacharán" contigo e Ignasi! No lo olvidaré!! Jejeje... Patriiiii!!! Niñaaaaaaaaa!!! Gracias por ser un ejemplo de superación para todos. Te deseo muchísima suerte en todos tus nuevos proyectos y tu nueva vida! Y tira siempre pa'lante!. Nunca olvidaré tu frase: "Eva, algún día la barca llegará a nuestra orilla". No nos ha ido nada mal, verdad? ☺. Raffy! La nostra bassista!!! Grazie per quei momenti, sicuramente dei più felici di questi 4 anni!! Come ci siamo divertiti!!! Non smettere mai di suonare!!! X-VERG per sempre!!!. Mireia, ha arribat el moment de dir-te que tu sí que has estat una "llum blanca" ;) Sempre superant les dificultats amb realisme i optimisme. Sempre amb els peus a terra sent molt conscient del que haves de fer en cada moment. I el més important, mai has traït els teus valors i les teves idees. M'he enrecordat molt de tu durant l'escriptura d'aquesta tesi, ho he intentat portar tant bé com ho vas fer tu! Gràcies per les nostres converses, sempre tant profitoses! Et desitjo molta sort Dra. Ventura!!! Paky, es podria dir que hem viscut aquesta darrera etapa de forma paral·lela! Gràcies per preguntar sempre! De vegades un petit gest és molt important! No et rendeixis mai perquè ets una gran científica! Vagis on vagis triomfaràs segur... molta sort!!! Maria, Miriam, molts ànims amb la tesi!!! Amb esforç i dedicació s'acaben obtenint resultats!! Seguiu amb aquest optimisme!!! Serena, no hemos tenido la oportunidad de conocernos, pero te deseo mucha suerte en tu tesis y que disfrutes al máximo de esta etapa!!! Mr. Lu... tot i que ara hauria de dir Dr. Lu... quin crack! Gràcies per ser la primera persona des que vaig arribar al laboratori que em va preguntar com estava i com m'anaven les coses.

Gràcies per les nostres converses, per dipositar confiança en mi i per animar-me sempre! Segur que sentiré a parlar de tu!! Molta sort a Sant Francisco!!!

Al grup de la Neus! Gràcies per estar sempre aprop! Sou un encant! La Blanca, la Noe, la Neus, l'Alba, el Carles i la Sandra. Blanquiiiiii!!! Aunque no te lo diga nunca, que te quiero!!!! Eres simplemente genial. Me ha encantado conocerte, compartir desde los cursos de doctorado (cuando nos llamaban Zipi i Zape) a los cafés, charlas y cenas. Nunca he llegado a decírtelo pero te admiro. Eres una gran científica pero sobre todo una gran persona. Sigue siendo así, tan generosa con los demás y luchando por lo que quieres. Llegarás muy lejos, seguro!!! Qué pena que ahora que estás haciendo tus pinitos en pombe yo no esté!!! Noe!! Eres un solete, gracias por ser tan amable con todo el mundo y por estar siempre dispuesta a ayudar! mucha suerte con todo!!! Neus, que això ja està a puntito!!! Segueix sent tant tenaç com tu ets perquè amb esforç s'aconsegueixen grans coses!!! I no et desanimis mai perquè amb optimisme les dificultats se superen millor!!! Estic segura que t'aniran molt bé les coses!! Molta sort!! Alba i Carles, fa poquet que ens coneixem però em dóna la impressió que arribareu lluny! Molts ànims i molta sort guapos!!!! Sandra! El torbellino del lab! T'hem trobat a faltar aquests darrers mesos!! M'hagués agradat tenir-te aprop per demanar-te algun consell en aquest moments... però el moment que tu estàs vivint és molt més important!!! Et desitjo molta sort en tot el que facis i sobretot no canviïs mai!!!.

A la Montse, perquè m'has permès recolzar-me en tu sempre que ho he necessitat. Ets una amiga. Gràcies per preguntar-me sempre com m'anava i per ajudar-me sempre que ho necessitat. Ets un sol!!.

Buff... i arriba el moment d'agrair a les meves nenes pombe! Què difícil!

Primer de tot voldria començar amb la meva mentora, la Maribel. Maribeeel, tu pequeño padawan va a leer la tesis!! Como pasa el tiempo! Aún recuerdo mi primer día y tu frase de: "apunta esto que no te lo voy a repetir!!!" jejeje! Gracias por espavilarme des del primer día, por enseñarme, por tu buen humor, nuestros ratos de risas y por tu apoyo en los momentos difíciles. Espero que nuestra amistad siga mucho tiempo porque me siento muy a gusto con vosotros! Gracias por abrirnos las puertas de vuestra casa y por esos arroces Jose Luis!!! Te debemos un non-stop!!

Mi Sandri, pensaba que llegado el momento las palabras saldrían solas... pero la verdad es que es difícil poder decirte en pocas líneas lo que has sido para mi. Gracias por todo, por enseñarme tantísimo, por entregarme el legado de la Srk1, por animarme en los momentos difíciles, por enseñarme a tener un puntito de fe y por ser mi amiga. Te he echado muchísimo de menos en esta última etapa!!! Gracias por

hacerme sentir que aunque estés en Londres te tengo cerca. ¡ gracias al Toni!!! Por ser siempre tan atento, porque siempre me ha animado y por todos los ratos de risas compartidos!!!

Albeta! La persona que em diu Doctora abans de ser-ho!! Jejeje! Gràcies pels ànims, per les teves correccions lingüístiques d'aquesta tesi i per les bones estones juntes!! Molts ànims que encara que no t'ho sembli, al final sempre acaben sortint les coses!!! A més, hi ha poca gent amb tanta il·lusió per la ciència com tu!! Et desitjo molta sort i et cedeixo la posició de veterana de grup jejeje!! Espero que continuem en contacte!!!

Nat! Definitivament ets única! Gràcies per la teva simpatia, pels teus despistes que ens han donat moments tant divertits, per les nostres xerrades de ciència a les tardes i pel teu bon humor! Molta sort i ànims amb la tesi que tu pots!!!!

Marta, la meua successora... la veritat és que no podries ser millor... segur que acabaràs responent a totes les incògnites de la nostra estimada Srk1!!!! Segueix tant observadora i tenaç com fins ara i tingues un puntet de fe!! Sóc conscient que al principi costen de creure segons quines coses, però ja veuràs com poc a poc la ciència t'anirà portant per camins que no esperaves i et donarà moltes sorpreses!!! Et desitjo molta sort en la teva tesi i gràcies per la teva ajuda en aquests darrers mesos!! Ha estat breu però intens!!!

Germán!!! Amigo!!! Ai! Què diferent ha estat això sense tu!!! Moltes gràcies per tantes coses!! Per la nostra connexió, des del primer moment, perquè ets un encant, perquè m'has fet riure com ningú i m'has escoltat sempre que he necessitat un amic. Per les nostres converses, pels teus consells i per una amistat tant transparent. Espero no perdre mai el contacte amb tu perquè ets una persona molt especial. A més! Ets el nostre Jimmy Hendrix!! Gràcies per tots els moments musicals compartits, per acollir-nos a casa teva!

Albi, mi niña! Buff... podría escribirte un libro entero y me quedaría corta! Lo más valioso que me llevo de estos 4 años y medio es nuestra amistad. Llegado este punto sólo puedo decirte GRACIAS, mil gracias, por todo lo que me has dado. A nivel profesional, tengo que decirte que es un lujo trabajar a tu lado. Vaya donde vaya será muy difícil encontrar a alguien como tú, con la que me he compenetrado tan bien. Aunque no te lo parezca me has enseñado muchísimas cosas! Y a nivel personal, que decirte que no sepas ya... que te quiero un montón, que has sido mi gran apoyo durante todo este tiempo. Cuando he estado de bajón por el motivo que fuese siempre has estado a mi lado escuchándome, ayudándome a relativizar las cosas y animándome en todo momento. Espero que nuestra amistad dure mucho tiempo

porque eres una persona muy especial. Guapa, sigue siempre tan natural y espontánea como tú eres, no dejes que nada ni nadie te frene en tus objetivos porque vales muchísimo! Te quieroooooooooooo!

Als meus amics Irene, Jordi, Laura i Cristian, per seguir tant de prop tot el procés! Gràcies per tantes anècdotes compartides de les nostres respectives tesis, serveixen per adonar-te que no estàs sol! Gràcies per tants i tants sopars amb Play i Wii incloses! Sou increïbles! Espero que estiguem sempre junts!! I molta sort en aquesta etapa final!!! Queda oberta la veda de lectura... ☺

A mi otra familia: Toribio e Isabel. Gracias por estar ahí en todo momento, por acogirme como a una hija y hacerme sentir tan y tan feliz cuando estamos juntos. Gracias por vuestras palabras de ánimo, vuestra generosidad y ayuda, por confiar siempre en mi y quererme tanto. Sois geniales! Os quierooooooooooooooooooooo!!!!!!

A mis abuelos, a Concha y a Maruja, porque aunque ya no estén con nosotros sé lo orgullosos que se sentirían en este momento. A Yoli, mi tía y madrina, porque siempre has estado ahí pendiente de mi y de mis estudios! Gracias por los ánimos, por tu sensibilidad, por quererme tanto! Gracias por interesarte siempre por lo que hago y escucharme cuando he necesitado desahogarme! Quéroche moito!!!

A ma germana, l'Annetà, perquè tot i que no ens veiem tant com abans sé que estàs allà quan ho necessito. I si no mira el gmail!!!! Jejeje... merci per compartir amb mi aquesta etapa, per preguntar-me cada dia com ho porto, per donar-me ànims quan ho he necessitat! Et desitjo molta sort en aquesta etapa personal que comences i saps que em tens pel que necessitis, oi? T'estimo! Al Sergi, perquè sempre té un somriure a la cara i s'interessa pels demés. Ets una gran persona cunyadet!! Molta sort a tu també en la teva nova etapa professional! Estic segura que us anirà molt bé a tots dos!!

Als meus pares, perquè segurament, sense el seu suport jo no estaria escrivint aquestes línies. Mama, aunque me haya quejado mil veces de que fueses "pesada" con los estudios te debo todo lo que he conseguido hasta ahora. ¿Recuerdas como me insistías para que hiciese la tesis? Gracias por estar tan pendiente de nosotras, por inculcarnos el sentido de la responsabilidad y el esfuerzo, porque así es como se consiguen las cosas. Te quiero mami!!!! Papa, gràcies per ser el mirall on sempre m'he vist reflexada. Ets el meu exemple a seguir, tant treballador, constant, pacient i optimista. Ets una de les millors persones que conec i estic molt orgullosa de tu i de tot el que ens heu donat a base d'esforç i sacrifici. Gràcies per interessar-te sempre per mi i les meves coses, per donar-me tant de carinyo! T'estimo papi!! Gràcies als

dos perquè sou el millor exemple que l'Anna i jo hem pogut tenir. Només espero que estigueu tant orgullosos de mi com jo ho estic de vosaltres.

I per últim, gràcies a la meva altra meitat, el Xavi. Tinc tant de coses que agrair-te que no acabaria mai! El millor que m'ha passat mai és conèixe't. Gràcies per la teva inestimable ajuda en tota aquesta tesi! Sense els teus ànims i ajuda m'hagués costat moltíssim!!! Gràcies per ensenyar-me a ser forta, a relativitzar els problemes, a guanyar confiança en mi mateixa i per transmetre'm la calma que tant he necessitat. Gràcies per les teves paraules de "tot anirà bé, ja ho veuràs" i per aguantar-me quan m'he posat dels nervis perquè no em sortien les coses!! Gràcies per intentar entendre el que faig, per interessar-te, per acompanyar-me al lab tants i tants caps de setmana, per escoltar les meves xerrades i per aprendre qui és la Srk1!!!! Ets increïble! I a nivell personal només puc dir-te que cada dia que passa aprenc a ser millor persona gràcies a tu, que estic molt feliç del camí que hem començat junts i que t'estimo moltíssim!! Pinfí, ilu infí!!!!

Barcelona, Maig del 2009

Tu mejor maestro es tu último error.

Si te caes siete veces, levántate ocho.

Als meus pares,

Al Xavi,

INTRODUCCIÓ	1
1. MODEL D'ESTUDI: <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	3
2. LA RESPOSTA A ESTRÈS	4
2.1. Tipus d'estrès	4
2.1.1. Estrès osmòtic	5
2.1.2. Estrès oxidatiu	6
2.1.3. Estrès per calor	8
2.2. Fases de la resposta a estrès	9
2.2.1. Fase primària	9
2.2.2. Fase de resposta	9
2.2.3. Fase d'adaptació	13
2.3. Components de la resposta a estrès en <i>S. pombe</i>	14
2.3.1. Sensors: Mak1, Mak2, Mak3, Mpr1 i Mcs4	15
2.3.2. Transmissors del senyal	21
2.3.2.1. MAPKKK: Wis4 (Wak1/Wik1) i Win1	21
2.3.2.2. MAPKK: Wis1	23
2.3.2.3. MAPK: Sty1	25
2.4. Adaptació a l'estrès: canvis en l'expressió gènica	28
2.4.1. CESR	29
2.4.2. SESR	31
2.5. Efectors de la via de MAPK: Substrats de Sty1	32
2.5.1. Factors de transcripció: Atf1, Pcr1, Pap1 i Prr1	32
2.5.2. Quinases: Cmk1 i Srk1	40
2.6. Regulació negativa de la via de MAPK	48
2.6.1. Pyp1 i Pyp2	48

2.6.2. Ptc1, Ptc2 i Ptc3	50
OBJECTIUS	53
MATERIALS I MÈTODES	57
1.TÈCNiques DE MANIPULACIÓ DE DNA	59
1.1. Extracció del DNA plasmídic	59
1.2. PCR	59
1.3. Mutació puntual o PCR mutagènica	61
1.4. <i>Colony</i> PCR	64
1.5. Digestió de DNA mitjançant enzims de restricció	65
1.6. Lligació de fragments de DNA	66
1.7. Purificació de fragments de DNA	67
1.8. Electroforesi en gel d'agarosa	67
1.9. Plàsmids emprats	68
1.10. Oligonucleòtids emprats	70
2.OBTENCIÓ DE LES SOQUES EMPRADES	72
2.1. Integració d'epítops	74
2.1.1. Integració d'epítops mitjançant el plàsmid pRIP2	74
2.1.2 . Integració d'epítops mitjançant productes de PCR	75
2.2. Deleció de gens	76
2.3. Creuaments genètics	77
3. MEDIS I CONDICIONS DE CULTIU	78
3.1. Medis i condicions de cultiu de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	78
3.1.1. Inducció de promotors <i>nmt1</i>	79
3.1.2. Mètodes de sincronització	80
3.1.2.1. Elutriació	80

3.1.2.2. Mutant termosensible <i>cdc25-22</i>	81
3.1.2.3. Sincronització amb hidroxiurea (HU)	82
3.1.2.4. Sincronització per privació de nitrogen	82
3.2. Medis i condicions de cultiu d' <i>Escherichia coli</i>	83
3.2.1. Producció de cèl·lules competents	83
4. TÈCNiques DE TRANSFORMACIÓ	85
4.1. Transformació en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	85
4.2. Transformació en <i>Escherichia coli</i>	86
5. EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS	86
5.1 Proteïnes de fusió a GST	86
6. OBTENCIÓ DE L'EXTRACTE PROTÈIC DE <i>S. pombe</i>	88
6.1. STOP buffer	88
6.2. TCA	89
7. QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES	90
7.1. Mètode Bradford	90
7.2. Mètode Lowry	91
8. ELECTROFORESI DE PROTEÏNES (SDS-PAGE)	92
9. WESTERN BLOT	95
9.1. Electrotransferència	96
9.2. Immunodetecció	97
10. IMMUNOPRECIPITACIÓ	99
11. ASSAJOS D'ACTIVITAT QUINASA <i>IN VITRO</i>	100
12. ASSAJOS DE SENSIBILITAT EN PLACA	102
13. TÈCNiques DE MICROSCOPIA	102
13.1. Immunocitoquímica indirecta	102

13.2. Microscopia confocal de <i>time-lapse</i>	105
RESULTATS	107
ESTUDI DE LA REGULACIÓ DE LA Srk1 PER LA MAPK Sty1	109
1. La presència de Sty1 és necessària per a l'estabilitat de Srk1	109
2. La fosforilació de la Srk1 en la T463 promou la seva degradació	112
3. La Srk1 fosforilada en T463 es dissocia de la MAPK Sty1	113
4. La unió entre Srk1 i Sty1 inhibeix l'activitat de la primera	115
ESTUDI DE LA FUNCIÓ DE LA Srk1 EN RESPOSTA A ESTRÈS	116
5. La fosforilació de la Srk1 en T463 és necessària per a la resposta a estrès osmòtic	116
6. L'activitat de la Srk1 és necessària per a la inhibició de G2/M en resposta a estrès	117
7. L'exportació nuclear de la Cdc25 és dependent de la Srk1 en condicions d'estrès	119
ESTUDI DE LA REGULACIÓ NEGATIVA DE LA VIA DE MAPKs PER Srk1	121
8. La deleció del gen <i>srk1</i> comporta una hiperactivació de la Sty1	121
9. La sobreexpressió de la SRk1 disminueix la fosforilació de la Sty1	122
10. La Srk1 no regula els nivells de les fosfatases Pyp1 i Pyp2	123
11. L'efecte de la sobreexpressió de la Srk1 en l'activació de la Sty1 no depèn de les fosfatases Pyp1 i Pyp2	125
12. La doble deleció de les Pyp's i la Srk1 comporta un augment de sensibilitat a estrès osmòtic	126
13. La Srk1 fosforila la Wis1 <i>in vitro</i>	126
14. La Srk1 no és la responsable de la fosforilació mantinguda de Wis1 en resposta a estrès osmòtic	128
15. Efecte de la resposta a estrès de la Wis1 no fosforilable per la Srk1	129
16. La sobreexpressió de la Srk1 inhibeix la unió de Wis1 amb Sty1	132
17. La fosforilació de Wis1 per Srk1 disminueix la seva activitat	133

18. La Srk1 no regula la localització de la Wis1	135
19. La Sty1 no surt del nucli en cèl·lules $\Delta srk1$	137
DISCUSSIÓ	139
1. Estudi de la regulació de la Srk1 per la MAPK Sty1	141
2. Estudi de la funció de la Srk1 en resposta a estrès	143
3. Estudi de la regulació negativa de la via de les MAPKs per la Srk1	147
CONCLUSIONS	157
BIBLIOGRAFIA	161
ANNEXE I	185
ANNEXE II	191



1. MODEL D'ESTUDI: *Schizosaccharomyces pombe*

El llevat de fissió *Schizosaccharomyces pombe* va ser descrit per primera vegada l'any 1893 per P. Lindner, qui el va aïllar a partir d'un tipus de cervesa africana, donant-li el nom de *pombe* (cervesa en swahili). Tanmateix, no va ser fins l'any 1950 quan Murdoch Mitchinson va posar de relleu el seu valor per a l'estudi del cicle cel·lular (Mitchinson, 1957).

Filogenèticament, aquest organisme pertany al *filum* dels *ascomycetes*, caracteritzats per la formació d'ascos. Al llarg del segle passat, els fongs *ascomycetes* es van reclassificar freqüentment basant-se en diverses característiques fenotípiques, tals com la forma de l'ascospora, el tipus de divisió cel·lular (gemmació *versus* fissió), presència d'hifes, habilitat per fermentar determinats tipus de sucres o el creixement depenent de les fonts de carboni i nitrogen. Recentment, però, les anàlisis de DNA i RNA han permès determinar la divergència a nivell de seqüència entre els fongs *ascomycetes*. Això ha fet possible quantificar les diferències genètiques entre espècies. Aquestes tècniques de biologia molecular demostren que el llevat de fissió *S. pombe* prové d'una branca ancestral dels *ascomycetes*, denominada *archaeascomycetes* de la qual va separar-se fa 4000 milions d'anys, aproximadament.

El llevat de fissió és un fong unicel·lular amb forma cilíndrica d'uns 3-4 μm de diàmetre i 10-14 μm de llargada. Aquest fenotip allargat és degut a un creixement exclusivament polar i a la divisió mitjançant un septe transversal que separa la cèl·lula mare en dues cèl·lules filles idèntiques (figura 1).

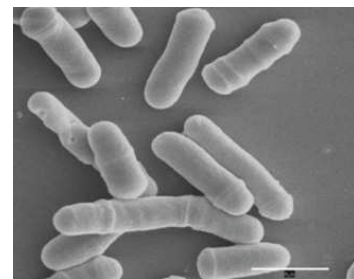


Figura 1. *S. pombe*.

Genèticament, *S. pombe* conté una dotació de 3 cromosomes amb 4940 ORFs predits, aproximadament un 43% dels quals contenen introns.

La importància de la utilització del llevat de fissió radica en una sèrie de característiques que fan que se'l consideri un model excel·lent per a l'estudi en el camp de la biologia cel·lular.



En primer lloc, es considera un bon model per estudiar els mecanismes bàsics que controlen el cicle cel·lular i les respostes a estrès mediambiental en eucariotes, ja que aquests han estat altament conservats al llarg de l'evolució. En segon lloc, les cèl·lules de *S. pombe* són predominantment haploids durant el cicle vegetatiu, essent només diploids en condicions de depleció nutricional, generalment per manca de fonts de nitrogen en el medi. Aquest tret unit a l'elevada taxa de recombinació d'aquestes cèl·lules fa que siguin fàcilment manipulables genèticament. A nivell experimental això es tradueix en que es poden dur a terme deleccions de gens, integracions d'epítops i promotors controlables exògenament, així com mutacions puntuals. Finalment, donada la simplicitat de l'organisme i la curta durada del seu cicle cel·lular (3 hores aproximadament), l'efecte que aquestes modificacions puguin tenir en el genoma són fàcilment avaluables fenotípicament.

2. LA RESPOSTA A ESTRÈS

Les cèl·lules eucariotes es troben constantment exposades a situacions d'estrès tals com canvis en la temperatura, pH, irradiacions, subministrament de nutrients i accés a l'oxigen. Per aquest motiu, els organismes eucariotes han desenvolupat mecanismes que els protegeixen contra aquests canvis i que els permeten adaptar-se a les noves condicions.

La resposta cel·lular a aquests insults ambientals es caracteritza per canvis en l'expressió gènica i en la fisiologia cel·lular i és per això que, actualment, la major part dels estudis sobre la resposta a estrès van enfocats cap a la identificació de les modificacions dels patrons d'expressió gènica (transcriptoma i proteoma), i la seva relació amb els canvis a nivell bioquímic (metaboloma), estructural i funcional que presenten les cèl·lules durant l'estrès (Egel, 2004).

2.1. Tipus d'estrès

L'estudi de la resposta a estrès en diferents organismes ha demostrat que, independentment de les particularitats de cada resposta, tots els mecanismes d'acció comparteixen característiques comunes. En primer lloc, l'exposició a



baixos nivells d'estrès acostuma a desencadenar una resposta de tipus adaptatiu que proporciona una resistència transitòria a nivells més elevats del mateix estrès. En segon lloc, l'adaptació a una forma determinada d'estrès, també comporta un increment en la resistència a formes d'estrès aparentment diferents: és el que es coneix com a protecció creuada. L'estrès hiperosmòtic, per exemple, indueix l'expressió de gens que es consideraven específics de la resposta oxidativa. Aquest fenomen suggereix que diferents formes d'estrès requereixen respostes cel·lulars comunes (Jamieson, 1992; Lee *et al.*, 1995; Moradas-Ferreira and Costa, 2000).

Per tal que la resposta als diferents estressos sigui l'adient, les cèl·lules han desenvolupat una sèrie de mecanismes específics depenent del tipus d'estrès aplicat i amb una resposta proporcional a la intensitat d'aquest. A continuació s'exposaran de forma general els mecanismes específics de resposta amb els quals la cèl·lula fa front a l'estrès osmòtic, oxidatiu i tèrmic.

2.1.1. Estrès osmòtic

L'exposició de les cèl·lules a un medi d'elevada osmolaritat indueix la seva deshidratació ja que es produeix un col·lapse en els sistemes de transport iònic a través de la membrana plasmàtica comportant una pèrdua de viabilitat.

La primera resposta cel·lular a l'estrès osmòtic és l'acumulació d'osmolits compatibles, ja siguin produïts per la mateixa cèl·lula o incorporats del medi. En el cas dels llevats, el principal osmolit és el glicerol. Aquest té com a funció incrementar l'osmolaritat interna davant la del medi extern i permetre així la incorporació d'aigua. A més, es tracta de substàncies de caire inert que no afecten el metabolisme de la cèl·lula (Egel, 2004).

El primer pas per a la síntesi de glicerol és el pas de dihidroxiacetonafofosfat a glicerol-3-fosfat gràcies a l'enzim glicerol-3-fosfat deshidrogenasa. En *S. pombe* existeixen dos gens diferents que codifiquen per aquest enzim, el *gpd1* i el *gpd2* (Ohmiya *et al.*, 1995). La diferència entre ells consisteix en que la inducció del primer és depenent de la ruta de les MAP quinases, i en concret, de l'activació d'Atf1 (veure apartat 2.5.1. *Factors de transcripció*), mentre que *gpd2* és un gen d'expressió constitutiva. Per altra



banda, en resposta a estrès osmòtic s'indueixen grans canvis a nivell morfològic i estructural. Les alteracions en el flux d'aigua a través de la membrana indueixen canvis en el volum cel·lular que acaben traduïnt-se en canvis a nivell estructural (Egel, 2004). Més concretament, l'estrès osmòtic indueix danys en el citoesquelet d'actina que afecten a una gran part dels processos intracel·lulars com el creixement, el transport vesicular, etc. Per altra banda, l'estrès osmòtic també causa problemes d'estructura a nivell de la membrana. L'expressió de gens implicats en el metabolisme lipídic es veu alterada en resposta a aquesta forma d'estrès, fet que acaba per afectar les característiques de flexibilitat i permeabilitat de la membrana. Això acabarà afectant el funcionament de nombrosos transportadors iònics com Sod2 (Jia *et al.*, 1992), Trk1 i Trk2, que depenen d'un correcte ambient lipídic per a la seva activitat (Rep *et al.*, 2000).

2.1.2. Estrès oxidatiu

Tots els organismes aeròbics produeixen com a resultat del seu propi metabolisme formes parcialment reduïdes d'oxigen que es coneixen com espècies reactives d'oxigen (ROS) i que inclouen l'anió superòxid (O_2^-), el peròxid d'hidrogen (H_2O_2) i el radical hidroxil ($OH\cdot$) (Egel, 2004). Aquestes formes són altament nocives per a la cèl·lula degut al seu elevat poder oxidant. La producció d'aquestes molècules normalment té lloc a nivells molt baixos, tot i que constants. Per contrarestar els seus efectes les cèl·lules disposen d'una sèrie d'agents antioxidants i enzims que catalitzen el trencament dels ROS per tal de mantenir un balanç REDOX (Egel, 2004). L'estrès oxidatiu té lloc quan aquest balanç es veu alterat per un augment de la producció de ROS o per condicions que afecten la disponibilitat d'oxigen fins al punt de superar la capacitat antioxidant basal de la cèl·lula. Els efectes nocius de les ROS deriven fonamentalment del fet que presenten una gran capacitat per reaccionar amb diferents molècules com ara lípids, àcids nucleics o proteïnes (Egel, 2004).

El radical hidroxil, per exemple, és capaç de danyar els lípids de la membrana per peroxidació, fet que produeix alteracions en la fluïdesa de la mateixa que afecten també a la funció dels receptors transmembrana i de totes aquelles proteïnes que han d'interaccionar amb ella (Czapski, 1984). Una de les



dianes fonamentals d'aquest radical és també el DNA on pot causar danys a nivell de les bases nitrogenades o del sucre induint trencaments de la cadena senzilla o doble, adductes entre la base nitrogenada i el sucre o unions covalents amb diferents proteïnes que interaccionen amb ell impedit el seu alliberament (Sies, 1993; Sies and Menck, 1992). Tots aquests processos poden induir mutagènesi i bloquejar, per exemple, la replicació del DNA, procés altament important per l'ancoratge i posterior alliberació de complexos protèics (Sies, 1993; Sies and Menck, 1992).

Altres radicals com l'anió superòxid, $O_2\cdot$, inactiven enzims amb nuclis de ferro-sulfur perquè s'uneixen al ferro i oxiden aquest nucli Fe-S inestabilitzant la proteïna i induint la seva degradació (Flint *et al.*, 1993). A més, el ferro alliberat d'aquests nuclis també té capacitat mutagènica (Farr *et al.*, 1986). D'altra banda, l' H_2O_2 és capaç d'oxidar les cadenes laterals dels aminoàcids i induir la introducció de grups carbonil (Stadtman and Levin, 2003), fet que comporta una alteració de l'estructura de la proteïna i una pèrdua de funció.

Per tal de fer front a les ROS, la cèl·lula posseeix diferents activitats enzimàtiques i no enzimàtiques (revisat en Jamieson, 1998). Entre les defenses enzimàtiques trobem la superòxid dismutasa (SOD), un enzim encarregat de catalitzar la dismutació del $O_2\cdot$ a H_2O_2 i O_2 , mantenint d'aquesta manera els nivells baixos d'anió superòxid. Per altra banda, enzims com la catalasa, la glutatió peroxidasa i la tioredoxina peroxidasa s'encarreguen de mantenir baixos els nivells de H_2O_2 catalitzant la seva descomposició en O_2 i H_2O , o utilitzant residus cisteïna per reduir peròxids, respectivament (Jamieson, 1998).

Les defenses no enzimàtiques inclouen el glutatió, la glutaredoxina i la tioredoxina, amb capacitat per reparar els danys induïts per les ROS. S'encarreguen de reduir els ponts disulfur generats per l'oxidació dels residus de cisteïna de determinades proteïnes. El glutatió i la tioredoxina, a més, són necessaris per a l'activitat catalítica de la glutatió peroxidasa i la tioredoxina peroxidasa, participant d'aquesta manera en els processos de reducció dels peròxids (Jamieson, 1998).



En el cas de *S. pombe*, la resposta a estrès oxidatiu ha estat una de les millors caracteritzades, tal i com es veurà més endavant (apartat 2.3.1 *Sensors*) on intervenen les proteïnes Mak1, Mak2, Mak3, Mpr1 i Mcs4 per tal d'activar la cascada de senyalització (figura 5). En aquest cas, la resposta a estrès oxidatiu ve controlada pels factors de transcripció Atf1 i Pap1, i serà en funció de la intensitat de l'estímul quan s'activarà un o l'altre. Així, Pap1 respon a concentracions moderades de H₂O₂ (figura 10) mentre que la via de la Sty1 i l'Atf1 s'activa en presència de concentracions elevades d'agents oxidants (Quinn *et al.*, 2002; Vivancos *et al.*, 2004; Vivancos *et al.*, 2006) (figura 10). Ambdues vies són essencials per a sobreviure sota condicions d'estrès oxidatiu però no són necessàries per a mantenir la viabilitat cel·lular durant el creixement aeròbic.

Els mecanismes de regulació de Pap1 en la resposta a estrès oxidatiu seran comentats ampliament en l'apartat 2.5.1. *Factors de transcripció*.

Una altra proteïna relacionada amb la resposta a estrès oxidatiu és el regulador de la resposta Prr1, tot i que la seva funció no és molt clara (Ohmiya *et al.*, 1999; veure apartat 2.5.1. *Factors de transcripció*).

2.1.3. Estrès per calor

La resposta a elevades temperatures presenta una característica especial en comparació a la resta de respostes a estrès. A diferència de les altres, aquesta via depèn més de la inactivació dels reguladors negatius de la via que d'un augment en l'activitat de la MAPKK, tal i com es comentarà en apartats posteriors (Nguyen *et al.*, 1999).

Estudis en nombrosos organismes mostren que les cèl·lules indueixen la síntesi d'una sèrie de proteïnes petites anomenades HSP (de l'anglès, *heat shock proteins*) en resposta a estrès induït per calor (revisat en Lindsquit and Kim, 1996). En cèl·lules no estressades, les HSPs tenen funció com a xaperones, mentre que durant l'estrès per calor, limiten el dany induït per l'agressió externa segrestant parcialment les proteïnes danyades, evitant l'agregació proteica i facilitant la reactivació o degradació de proteïnes no plegades.



Les HSPs són proteïnes altament conservades, que es poden agrupar en 6 famílies atenent a la seva mida i similitud; Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 i les HSPs petites. És interessant destacar que tant sols dues d'aquestes HSPs pertanyen al grup dels gens CESR, les Hsp9 i Hsp16, mentre que la resta s'indueixen de forma específica en resposta a la calor de forma independent de Sty1 i Atf1 (Chen *et al.*, 2003).

En eucariotes, la transcripció dels gens que codifiquen per les HSPs requereix l'activació del *heat-shock factor*, HSF. Les cèl·lules humanes tenen varis HSFs mentre que el llevat presenta un sol gen que codifica per aquest factor (Egel, 2004). Per altra banda, trobem també altres proteïnes reguladores de la resposta com Skn7 a *S. cerevisiae* i Prr1 a *S. pombe*, les quals contenen dominis d'unió al DNA de tipus HSF. En el cas del llevat de fissió, això podria explicar l'expressió de gens comuns en resposta a la calor i a estrès oxidatiu (Egel, 2004).

2.2. Fases de la resposta a l'estrès

La resposta a les diferents formes d'estrès pot dividir-se en tres fases: la fase primària, la fase de resposta i la fase d'adaptació que es resumiran a continuació (Lodish *et al.*, 2000).

2.2.1. Fase primària

En aquesta fase tenen lloc els canvis immediats a nivell cel·lular com a conseqüència directa de l'exposició a un determinat estrès, ja sigui de tipus osmòtic, oxidatiu o tèrmic. Els danys derivats d'aquestes pertorbacions dependran en gran part de l'estímul aplicat i de la fase de resposta per tal de minimitzar-los (Egel, 2004).

2.2.2. Fase de resposta

En aquesta fase la cèl·lula percep el canvi en el medi extern i les seves conseqüències a nivell intern, transmet el senyal i activa els mecanismes de resposta adients que, normalment, acostumen a posar en marxa programes específics d'expressió gènica. La cascada de senyalització de resposta a estrès es divideix en tres grans blocs: els mecanismes sensors, els mecanismes



transductors del senyal i els mecanismes de resposta a estrès (Lodish *et al.*, 2004).

a) Mecanismes sensors: Són els encarregats de percebre el senyal i transmetre'l a la cascada de quinases transductores del senyal.

b) Mecanismes transductors del senyal: Es tracta de mòduls transmissors del senyal des del/s receptor/s fins el nucli. Aquests mòduls encarregats de transmetre el senyal d'estrès es coneixen amb el nom de SAPK (proteïnes quinases activades per estrès) que pertanyen al grup de les vies de MAPK (proteïnes activades per mitògens). Aquests sistemes es troben altament conservats evolutivament i s'activen en resposta a una gran varietat d'estímuls com ara factors de creixement, irradiacions, canvis en l'osmolaritat, estrès oxidatiu o tèrmic, entre d'altres. Aquestes vies es componen de tres quinases diferents: la MAPKKK (MAP quinasa quinasa quinasa), la MAPKK (MAP quinasa quinasa) i la MAPK (MAP quinasa) i el seu funcionament es basa en una cascada de fosforilacions activadores seqüencials (Junttila *et al.*, 2008; Tibbles and Woodgett, 1999; Wilkinson and Millar, 2000; Chang and Karin 2001; Clotet and Posas, 2007; Tanoue *et al.*, 2000; de Nadal *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2001).

Les MAPKKK poden activar-se tant per fosforilació per altres MAPKKK com per unió a proteïnes petites d'activitat GTPasa pertanyents a la família Ras o Rho i en alguns casos, la seva activació ve donada per oligomerització o relocalització subcel·lular. Les MAPKKK un cop activades són capaces de fosforilar la MAPKK en residus serina (Ser) i treonina (Thr). A seu torn, les MAPKK fosforilen residus treonina i tirosina (Tyr) de seqüències Thr-X-Tyr (fosforilació dual) en les MAPK per tal d'activar-les. Això fa que les MAPKK tinguin doble especificitat. Les MAPK són Ser/Thr quinases que fosforilen els efectors de la cascada de senyalització. Aquests efectors presenten una seqüència específica *consensus* de fosforilació per la MAPK que conté residus prolina en posició P1 (Pro-X-Ser/Thr-Pro) (Wilkinson and Millar, 2000; Chang and Karin, 2001).



L'estructura de les MAPK que componen aquestes cascades és bàsicament la mateixa. Presenten un domini catalític d'entre 250-300 aminoàcids dividit en subdominis dins els quals existeixen seqüències específiques (normalment d'uns 12 aminoàcids) que són imprescindibles per a la seva funció. Aquestes proteïnes catalitzen la transferència gamma fosfat des de l'ATP a un residu hidroxil dels aminoàcids Ser i Thr o Thr i Tyr de la proteïna substrat. En el cas de les MAPKKK existeix, a més a més, un domini N terminal no catalític que sembla tenir propietats autoinhibitòries donat que, si s'elimina aquesta regió, s'aconsegueix l'activació constitutiva d'aquestes quinases en absència d'estímul (Mita *et al.*, 2002).

En mamífer són membres d'aquesta família de MAPKs de resposta a estrès les SAPKs p38 i JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) (figura 2). Aquestes vies de SAPKs poden ser activades per diferents tipus de senyals com ara l'estrès osmòtic, oxidatiu, calor, radiació UV, citocines inflammatòries, etc. El fet de poder respondre a una varietat tant àmplia d'estímuls i que cada MAPKK pugui ser activada per més d'una MAPKKK fa d'aquestes vies uns sistemes molt complexes i alhora altament específics.

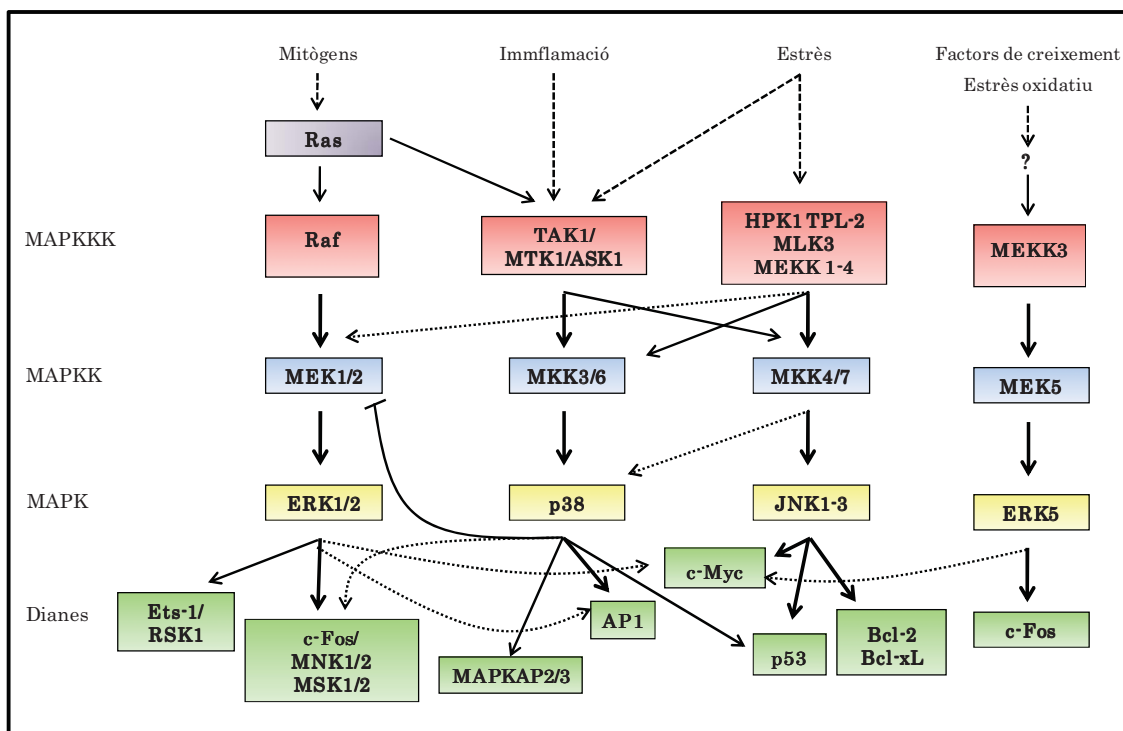


Figura 2. Diagrama esquemàtic de les vies de MAPKs en cèl·lules de mamífer. Adaptació de Juntilla *et al.*, 2007.



En llevat també s'han descrit vies homòlogues a les de mamífer, havent-se aïllat a *S. cerevisiae* la quinasa Hog1 (Brewster *et al.*, 1993) i a *S. pombe* la quinasa Sty1/Spc1/Phh1 (Shiozaki and Russell, 1995; Millar *et al.*, 1995; Kato *et al.*, 1996).

En el llevat de gemmació *S. cerevisiae*, a diferència del model de mamífer, la MAPK Hog1 s'ha implicat bàsicament en la resposta a estrès osmòtic (Brewster *et al.*, 1993; Schuller *et al.*, 1994; veure apartat 2.3. *Components de la resposta*, figura 4). A *S. pombe*, en canvi, la Sty1 juga un paper més similar al de la p38, activant-se en resposta a gran varietat d'estímuls (figura 3, apartat 2.3. *Components de la resposta*). Cal destacar, però, que en *S. pombe*, tot i ser la cascada de senyalització de la Sty1 la principal via de resposta a estrès, s'han descrit altres vies de resposta a estrès diferents de la que es presenta en aquesta tesi. Aquest és el cas de la cascada de MAPKKs constituïda per la MAPK Spm1/Pmk1 (Toda *et al.*, 1996; Zaitsevskaya-Carter and Cooper, 1997), la MAPKK Pek1 (Loewith *et al.*, 2000; Sugiura *et al.*, 1999) i la MAPKKK Mkh1 (Sengar *et al.*, 1997). Aquesta via s'ha implicat en la resposta a diferents alteracions ambientals com ara l'estrès hipo- i hiperosmòtic, la deprivació de glucosa, el dany a la paret o l'estrès oxidatiu (Madrid *et al.*, 2006). Actualment, encara resta desconegut el mecanisme que permet l'activació d'aquesta via.

c) Mecanismes efectors: són els encarregats d'executar la resposta específica a cada tipus d'estrès. Dins d'aquest grup trobem tant proteïnes reguladores del cicle cel·lular, com factors de transcripció encarregats d'estimular o reprimir gens de resposta específica, quinases efectores de les cascades de senyalització cel·lular (veure apartat 2.5.2. *Quinases*), xaperones moleculars, proteïnes del citoesquelet, etc.

Pel que fa als factors de transcripció, que seran comentats més endavant en l'apartat 2.5.1. *Factors de transcripció*, cal destacar el seu important paper en el silenciament o l'activació de l'expressió dels gens necessaris per a conferir la resposta adaptativa a l'estrès imposat. L'activació d'uns factors de transcripció determinats dependrà de l'estrès rebut i la resposta necessària. En el cas de *S. cerevisiae*, s'han descrit nombrosos factors



de transcripció de la via de Hog1, com per exemple Sko1, Msn2/Msn4, Hot1, Msn1, Skn7, Smp1, etc (revisat a Hohmann, 2002; de Nadal *et al.*, 2003). En el cas de *S. pombe*, els factors de transcripció coneguts per a la via de Sty1 són, principalment, l'Atf1, el Pcr1, la Pap1 i el Prr1 (veure apartat 2.5.1. *Factors de transcripció*). Pel que fa a les cèl·lules de mamífer, tot i presentar nombrosos factors de transcripció dependents de les vies de p38 i JNK, cal destacar l'elevada homologia del factor de transcripció ATF-2 amb l'Atf1 de *S.pombe*.

2.2.3. Fase d'adaptació

En aquesta fase la integració de totes les activitats cel·lulars induïdes per estrès porta a restablir el creixement i la proliferació.

En el cas d'estrès hiperosmòtic, els nivells de glicerol intracel·lulars incrementen degut a un augment de la seva síntesi (*v.g.* glicerol-3-fosfat deshidrogenasa) i a una disminució de la seva eliminació al medi. Això comporta una presa d'aigua i que les cèl·lules adoptin una mida que serà crítica pel restabliment del seu creixement i proliferació. Tot aquest mecanisme implica adaptacions en l'estructura de la paret cel·lular i la reorganització de l'actina que assegurin la integritat cel·lular (Lodish *et al.*, 2000).

Sota estrès oxidatiu, el metabolisme cel·lular s'organitza per assegurar els processos de detoxificació mitjançant la concentració cel·lular de components enzimàtics (*v.g.* catalasa, superoxidismutasa) i no enzimàtics (*v.g.* glutatió) (Egel, 2004).

En el cas d'estrès tèrmic s'estimula la producció d'energia i de proteïnes protectores com xaperones, trehalosa, etc., que permeten la supervivència cel·lular (Egel, 2004).



2.3. Components de la resposta a estrès en *S. pombe*

Com s'ha comentat en l'apartat anterior, les cascades de MAPK presenten una estructura jerarquitzada que consta d'una MAPK central activada per una MAPKK que és alhora activada per una MAPKKK. En el cas de la cascada de resposta a estrès en *S. pombe*, la MAPK central és la Sty1 (homòloga a Hog1 i p38), que és fosforilada per la MAPKK Wis1 que pot ser activada per dues MAPKKK, la Wis4/Wak1/Wik1 o la Win1 (Figura 3).

A *S. pombe* la quinasa Sty1 recorda més en el seu funcionament a les quinases de mamífer perquè és necessària per a la resposta a una gran varietat d'estímuls (Millar *et al.*, 1995; Shiozaki and Rusell, 1996; Degols *et al.*, 1996; Degols and Rusell, 1997; Shieh *et al.*, 1997; Shiozaki *et al.*, 1997). Entre d'altres, la Sty1 s'activa en resposta a augments en l'osmolaritat, estrès oxidatiu, calor, radiació UV i deprivació nutricional (figura 3).

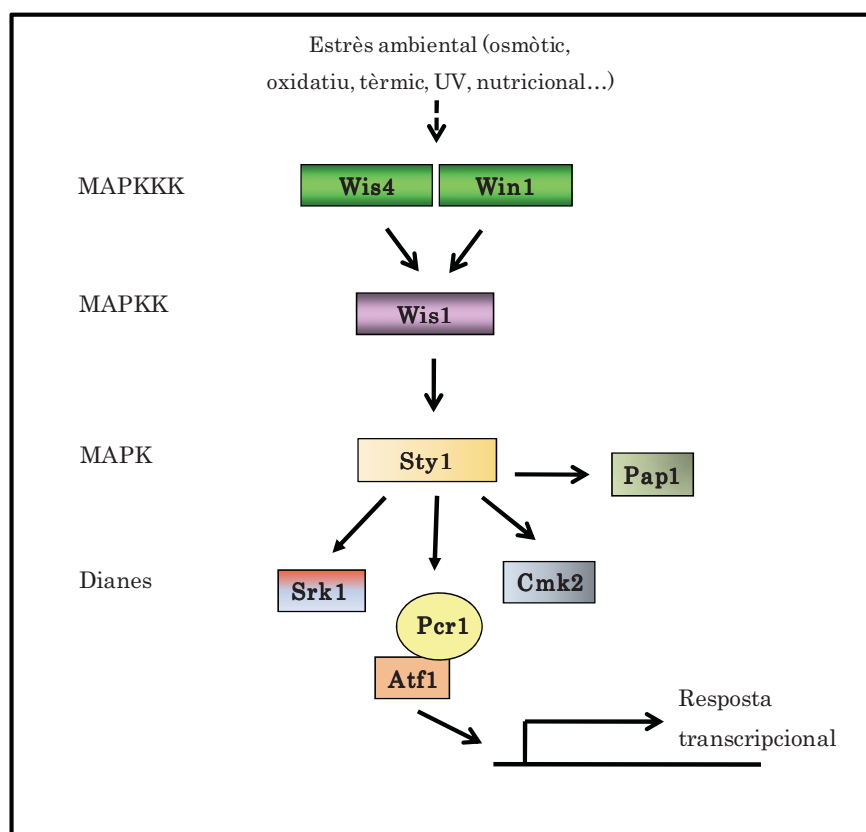


Figura 3. Diagrama esquemàtic de la cascada de senyalització d'estrès a *S. pombe*.



Donada la similitud amb les vies de mamífer, els mecanismes de resposta a estrès en *S. pombe* han servit en els darrers anys per entendre els mecanismes d'adaptació de les cèl·lules eucariotes a condicions adverses del seu entorn (Egel, 2004).

Una altra característica interessant és el paper que se li ha atribuït als components de la via de la Sty1 en el control de la progressió del cicle cel·lular. De fet, molts dels reguladors d'aquesta via es van aïllar en *screenings* ideats per posar de manifest proteïnes implicades en la regulació del cicle (Warbrick and Fantes, 1991; Millar *et al.*, 1995, Samejima *et al.*, 1997). Mutants d'aquesta via com ara delecions de *wis1* o *sty1* es caracteritzen per un fenotip elongat característic d'un retràs en la transició G2/M que es veu exacerbat quan es tracta les cèl·lules amb estrès (Millar *et al.*, 1995; Shiozaki and Russell, 1995; Warbrick and Fantes, 1991). Així doncs, es considera la via de la Sty1 com a activadora de la mitosi. A continuació s'estudiaran els components de la via per separat.

2.3.1. Sensors: Mak1, Mak2, Mak3, Mpr1 i Mcs4

Com s'ha comentat anteriorment, el fet que diferents tipus de senyals externs siguin capaços d'activar la via de les MAPK de resposta a estrès en *S. pombe* indica la possible existència de varis receptors amb especificitat per a cadascun dels senyals. Aquesta qüestió continua confusa però existeixen dades que semblen indicar que l'existència de diversos receptors és prou factible.

En el cas de *S. cerevisiae* ha estat ben establert que la MAPK Hog1 és regulada en resposta a estrès osmòtic pel sistema de dos components (de l'anglès, *two component phosphorelay system*) format per la histidina quinasa Sln1, la fosfotransferasa Ypd1 i la quinasa reguladora de la resposta Ssk1 (Posas and Saito, 1998; figura 4).

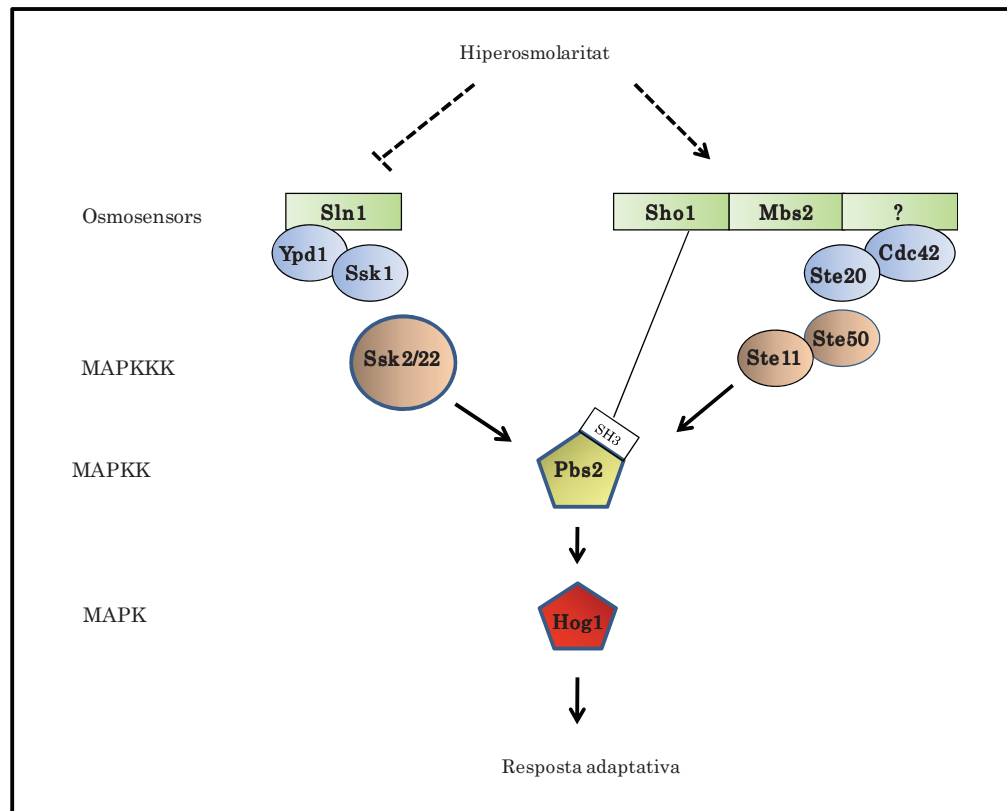


Figura 4. Diagrama esquemàtic de la via de Hog1 en *S. cerevisiae*. Adaptació de Clotet and Posas, 2007.

En condicions de baixa osmolaritat, la Sln1 s'autofosforila en una histidina del seu domini catalític. Aquest grup fosforil és seguidament transferit a un residu aspàrtic (Asp) del seu domini receptor. En aquest estat, la fosfotransferasa Ypd1, mitjançant un intermediari fosforilat a la histidina 64 (His64) d'elevada energia, pot transferir el grup fosforil al domini receptor de la quinasa Ssk1. La Ssk1 fosforilada és inactiva i no pot activar la MAPKKK Ssk2 (figura 4) i per tant, la Hog1 no podrà ser activada. En canvi, quan en el medi extern es dóna un augment de l'osmolaritat, la Sln1 és inhibida permetent que s'activi la via (Posas and Saito, 1998).

En el llevat de fissió *S. pombe*, el camp on s'han desenvolupat més estudis sobre els sensors de la via és el de la resposta a estrès oxidatiu. S'han identificat tres histidina quinases que semblen estar implicades de forma específica en detectar aquest tipus de senyal, la Mak1, Mak2 i Mak3 (Buck *et al.*, 2001; figura 5).

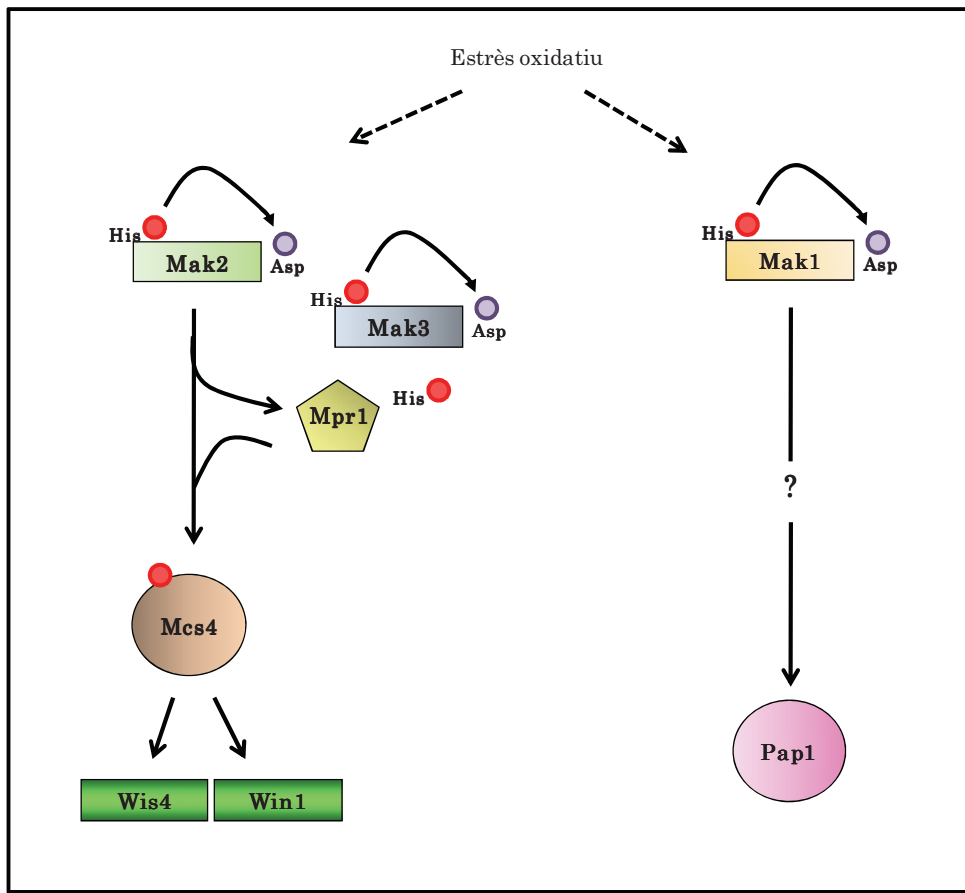


Figura 5. Diagrama esquemàtic de l'activació del mòdul Wis4/Win1-Wis1-Sty1 a *S. pombe*.

Aquestes proteïnes es van identificar inicialment per la seva capacitat per fosforilar la Mcs4 (figura 5), d'aquí el seu nom, Mak (*Mcs4-associated kinase*), i es va creure que estarien estructuralment relacionades amb la Sln1, la histidina quinasa responsable de la percepció del senyal a *S. cerevisiae* (figura 4). Mak2 i Mak3 són proteïnes grans d'uns 2300 aminoàcids, mentre que la Mak1 és més petita amb uns 1600 aminoàcids. A continuació es mostra un diagrama esquemàtic comparatiu de l'estructura de les tres histidines quinases amb la Sln1 de *S. cerevisiae* (figura 6).

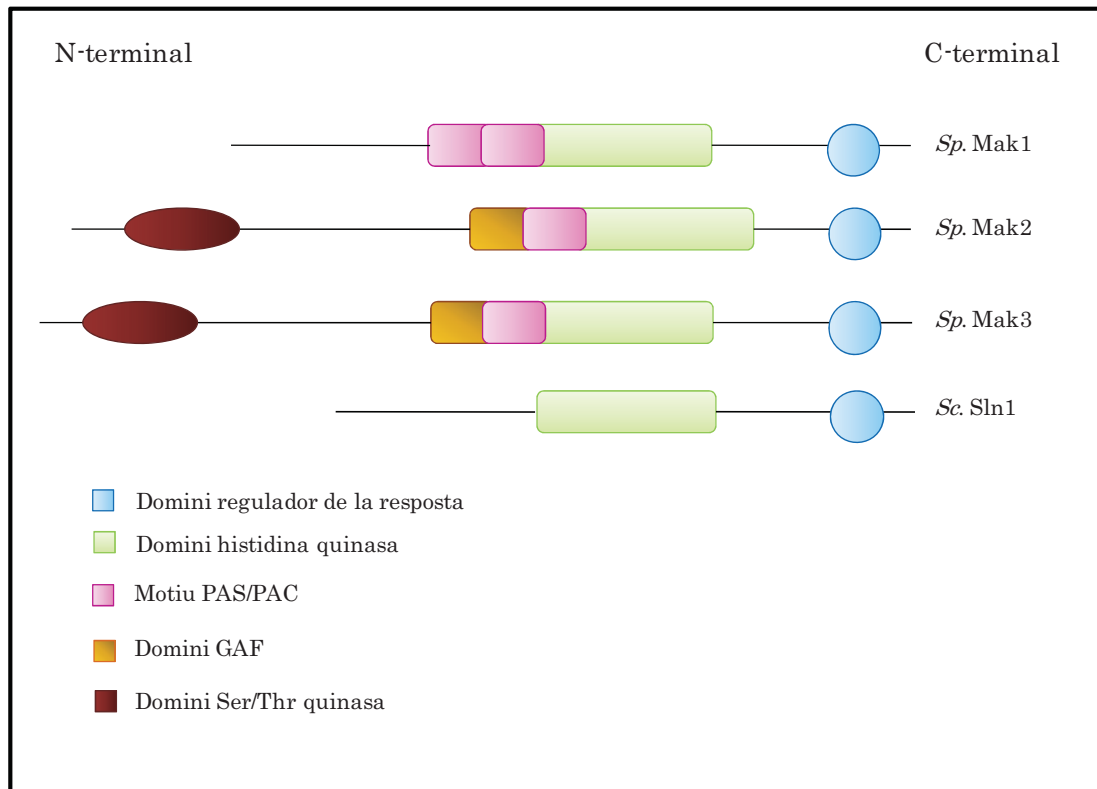


Figura 6. Representació esquemàtica de l'arquitectura de dominis de les histidines quinases Mak1, Mak2 i Mak3 de *S. pombe* i Sln1 de *S. cerevisiae*. Adaptació de Buck *et al.*, 2001.

Com s'observa a la figura 6, totes quatre proteïnes presenten un domini histidina quinasa i dominis reguladors de la resposta al seu extrem carboxil. En el cas de les proteïnes de *S. pombe*, al costat del domini histidina quinasa es troben un o varis dominis PAS/PAC (dos en Mak1 i un en Mak2 i Mak3) característics de proteïnes implicades en la recepció de llum, oxigen, potencial redox, transcripció regulada per oxigen i regulació de ritmes circadians (Crews and Fan, 1999), fet que explicaria que a *S. pombe* aquest mòdul fos l'encarregat de senyalitzar l'estrès oxidatiu i no l'osmòtic. Adjacent a aquesta regió, tant Mak2 com Mak3 contenen un domini GAF, el qual també ha estat identificat en fitocroms, factors de transcripció regulats per l'estat REDOX i receptors d'etilè en plantes. Finalment, a l'extrem amino terminal de Mak2 i Mak3 s'ha identificat un domini similar a les Ser/Thr quinases de procariotes i que no es troba present ni en la seqüència de la Mak1 ni en la de la proteïna Sln1 de *S. cerevisiae* (Buck *et al.*, 2001).



Amb l'objectiu d'investigar les funcions cel·lulars d'aquestes histidines quinases en *S. pombe*, el grup del Dr. Millar va realitzar una sèrie d'experiments que van permetre concloure que tant la Mak2 com la Mak3 són necessàries per a la fosforilació de la Sty1 en resposta a estrès oxidatiu i per l'activació del factor de transcripció Atf1 a través de les proteïnes Mpr1 i Mcs4, que s'explicaran a continuació. Així, en cèl·lules $\Delta mak2$ i $\Delta mak3$ disminueix molt l'expressió dels gens depenents d'Atf1 en resposta a peròxid d'hidrogen (*v.g.* la tirosina fosfatasa 2, *pyp2* i la glutatió peroxidasa, *gpx1*). Per altra banda, tot semblaria indicar que la Mak1 controlaria la transcripció de gens depenents de Pap1-Prr1 (*v.g.* *ctt1*) en resposta a estrès oxidatiu independentment de l'activació de la cascada de la MAPK (Buck *et al.*, 2001; figura 5; apartat 2.1. Tipus d'estrès i 2.5.1. Factors de transcripció).

Un any abans de la identificació de les histidines quinases en *S. pombe* s'havia caracteritzat la que seria la seva diana, la fosfotransferasa Mpr1 (Aoyama *et al.*, 2000; figura 5). La Mpr1 (o Spy1) va ser inicialment identificada per la seva homologia amb la proteïna Ypd1 de *S. cerevisiae*, la qual és especialment significativa en les seqüències d'aminoàcids que envolten el lloc de fosforilació, la His221 (Aoyama *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2000; Buck *et al.*, 2001). La Mpr1 és una proteïna petita d'uns 300 aminoàcids que un cop fosforilada, és capaç d'unir-se a la Mcs4 i transferir-li el grup fosforil de la His221 (Nguyen *et al.*, 2000). Malgrat aquestes semblances inicials, la proteïna de *S. pombe* i la de *S. cerevisiae* presenten diferències notables. En primer lloc, la deleció de *YPD1* és letal perquè condueix a una hiperactivació de la via de Hog1 que resulta tòxica per a la cèl·lula. En canvi, la Mpr1 és un regulador positiu de la Mcs4 i, per tant, la seva deleció no té grans conseqüències per a la cèl·lula en condicions normals (Nguyen *et al.*, 2000). La funció de la Mpr1 queda restringida a la resposta a estrès oxidatiu (Buck *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2000), mentre que la *YPD1* funciona en resposta a estrès osmòtic. Curiosament, tot i que la fosforilació de la Sty1 es veu afectada per la deleció de *mpr1* en resposta a estrès oxidatiu, els mutants de *mpr1* no són més sensibles en comparació a la soca salvatge a aquest tipus d'estrès. A més a més, cal destacar que l'expressió de gens necessaris per a l'adaptació en aquestes condicions (*v.g.* *ctt1*) no es troba disminuïda en el mutant (Nguyen *et al.*, 2000). Aquest comportament



s'interpreta com un efecte compensatori exercit per la Pap1, independent de la Sty1. En un apartat posterior referit a l'estudi específic dels factors de transcripció s'estudiarà més profundament el funcionament d'aquesta via paral·lela (*apartat 2.5.1.Factors de transcripció*).

Finalment, el darrer element d'aquest sistema és la proteïna Msc4 (figura 5). El gen *mcs4* va ser aïllat com a regulador potencial de la mitosi donat que la seva pèrdua rescatava el fenotip de catàstrofe mitòtica que presentaven els mutants *cdc2-3w wee1-50*, on la CDK de *S. pombe*, la Cdc2, es troba hiperactivada (Booher and Beach, 1987; Moltz *et al.*, 1989). Aquest gen, codifica per una proteïna de 522 aminoàcids que està funcionalment i estructuralment relacionada amb la proteïna Ssk1 de *S. cerevisiae* (55% d'identitat en el domini C-terminal; figura 4). Igual que el seu homòleg en el llevat de gemmació, la Msc4 presenta en la seva seqüència proteica un domini regulador de la resposta on, per homologia de seqüència, s'ha pogut identificar un residu altament conservat, l'Asp412 que correspondria a l'Asp554 de la Ssk1 de *S. cerevisiae* i que és necessari per a la seva funció (figures 4 i 5).

Estudis realitzats per Shieh *et al.*, demostren que la Msc4 juga un paper important en la senyalització d'estrès ja que en mutants de la Msc4 l'activació de la proteïna Sty1 es veu molt compromesa. A més a més, en aquests mutants la transcripció de gens de resposta a estrès dependents de la Sty1 es veu greument afectada (*v.g. pyp2, ctt1 i gpd1*). D'aquestes observacions se'n desprèn que la Msc4 és necessària per a la inducció de gens de resposta a estrès. La identificació del residu Asp412 i la seva mutació, però, van revelar que la Msc4 és únicament necessària per a l'activació de la Sty1 en resposta a H₂O₂ (Buck *et al.*, 2001). Per altra banda, s'ha observat que la pèrdua de Msc4 provoca una elongació de les cèl·lules similar a la que es produeix per la pèrdua de Wis1 (veure apartat 2.3.2.2. *MAPKK*) que es veu agreujada en condicions d'elevada osmolaritat o de deprivació nutricional. En canvi, la sobreexpressió de la Msc4 és letal degut a una hiperactivació de la via. Per últim, la sensibilitat dels mutants de *mcs4* no es veu afectada per la deleció de *wis4* (un dels seus substrats, veure apartat 2.2.3.1. *MAPKKK* i figura 5), indicant que ambdues proteïnes funcionen en una via lineal (Shiozaki *et al.*, 1997; Cottarel, 1997; Shieh *et al.*, 1997).



Malgrat tots els descobriments realitzats fins el moment, encara resten algunes incògnites respecte al procés regulat per aquestes proteïnes. Concretament, la fosforilació de la Mcs4 és activadora, donat que la seva interacció amb la Mpr1 és dependent de la presència de la His221 de la última i es veu augmentada en tractar les cèl·lules amb H₂O₂. Sorprenentment, la mutació de la His221 de la Mpr1 (Nguyen *et al.*, 2000) o del Asp412 de la Mcs4 (Buck *et al.*, 2001) augmenten la fosforilació basal de la Sty1. La conclusió que se'n extreu és que la Mcs4 deu regular negativament el mòdul Wis4/Win1-Wis1-Sty1 en condicions normals i de forma positiva en resposta a estrès oxidatiu.

En resum, les histidines quinases de *S. pombe* conformen no un, sinó dos sistemes de transmissió de grups fosforil. La Mak2 i la Mak3 s'encarregarien de transmetre el senyal d'estrès oxidatiu a través de la Mpr1 i la Mcs4 fins al mòdul Wis4/Win1-Wis1-Sty1-Atf1 mentre que la Mak1, també implicada en la resposta a estrès oxidatiu, ho faria a través de la Pap1 (figura 5). Així, com passava en el cas de la deleció de *mpr1*, la deleció de *mak2* i *mak3* tampoc es tradueix en hipersensibilitat al tractament amb H₂O₂, probablement degut a un mecanisme compensatori per part de la via Mak1-Pap1.

Així doncs, sembla ser que aquestes cinc proteïnes Mak1, Mak2, Mak3, Mpr1 i Mcs4 constitueixen un sistema de transmissió del senyal que és imprescindible, com a mínim, en el cas de la resposta a estrès oxidatiu en *S. pombe*. En el cas d'altres tipus d'estrès no està clar quin és el sistema a través del qual la cèl·lula detecta els senyals externs. La resta de components d'aquest sistema sensor romanen encara per identificar.

2.3.2. Transmissors del senyal: La cascada de les MAPK

2.3.2.1. MAPKKK: Wis4 (Wak1/Wik1) i Win1

En *S. pombe* existeixen 2 gens que codifiquen per proteïnes de tipus MAPKKK i que tenen un paper important en les cascades de resposta a estrès. Aquests gens són *wis4* i *win1* (figura 3).

El gen *wis4*, també conegut com *wik1* o *wak1* es va aïllar originàriament com un gen capaç de suprimir el fenotip de termosensibilitat que presentava el triple mutant *win1-1 cdc25-22 wee1-50* (Warbrick and Fantes, 1991). Aquest gen codifica per a la MAPKKK que activa la Wis1



mitjançant la fosforilació de dos residus del domini catalític: la Ser 469 i la Thr473. La proteïna Wis4 consta d'uns 1400 aminoàcids que conformen dominis característics de proteïna quinasa (Hanks and Quinn, 1991) a l'extrem carboxil. A més a més, presenta una elevada homologia amb dues MAPKKK de *S. cerevisiae*, Ssk2 (50%) i Ssk22 (49%). En aquest mateix estudi es va aïllar el gen que codifica per a la proteïna Wis1 (substrat de la Wis4) de la qual se'n parlarà al següent apartat (figura 3).

Wis4 és capaç de fosforilar la Wis1 *in vitro*, modificació post-traducciona que desapareix si es muta la lisina del centre actiu a arginina (Samejima *et al.*, 1997). *In vivo*, la sobreexpressió de la Wis4 augmenta la fosforilació de la Sty1, fet que no té lloc en absència de Wis1. Aquests resultats units als experiments portats a terme per Shieh *et al.*, van indicar que la Wis4 actua per sobre de la Wis1 (figura 3). El fet que la deleció de *wis4* no presentés un fenotip tan sever en resposta a estrès com la deleció de components situats més avall en la via (*wis1* o *sty1*) va fer pensar des d'un principi que tingués un paper redundat en l'activació de la Wis1 (Samejima *et al.*, 1997; Shieh *et al.*, 1997; Shiozaki *et al.*, 1997). D'altra banda, estudis genètics previs suggerien que la proteïna codificada pel gen *win1* podia funcionar també com a MAPKKK, però no va ser fins l'any 1998 quan Samejima *et al.* van resoldre els problemes de clonatge i van identificar-ne el producte gènic.

win1 va ser inicialment identificat com un regulador de la mitosi el fenotip del qual depenia del fons genètic i les condicions nutricionals (Ogden and Fantes, 1986). Posteriorment, es va comprovar que la sobreexpressió de Wis1 o Wis4 comporta un augment de l'activació de la Sty1 i és capaç de restablir la termosensibilitat a 33°C d'un mutant *win1-1 cdc25-22 wee1-50* (Samejima *et al.*, 1998). En aquest mateix estudi, es mostrava que la Wis4 i la Win1 actuen sobre dos llocs de fosforilació molt conservats presents en la proteïna Wis1, la Ser469 i la Thr473, de manera que actuen de forma redundat.

El paper específic de cadascuna d'aquestes MAPKKK ha estat força controvertit ja que en el treball de Samejima *et al.*, se li restava importància a la Wis4 en la senyalització d'estrès osmòtic atorgant-li un paper principal a la Win1 (Samejima *et al.*, 1997). En canvi, treballs realitzats per Shiozaki *et al.*, demostraven que la deleció de Wis4 disminuïa la fosforilació de la Wis1 en



aquest tipus d'estrès (Shiozaki *et al.*, 1997), tot i que no l'eliminava completament. Actualment, s'assumeix que totes dues quinases poden activar la via en resposta a diversos tipus d'estrès.

2.3.2.2. MAPKK: Wis1

De la mateixa forma que els altres components de la via de les MAPK d'estrès a *S. pombe*, el gen *wis1* es va aïllar en *screenings* que buscaven reguladors del cicle cel·lular. Concretament, en un *screening* de gens amb potencial supressor del fenotip termosensible del mutant *cdc25-22 wee1-50 win1-1*; i d'aquí el seu nom Wis1 (*Win1 Suppressing Protein*) (Warbrick and Fantes, 1991/1992). Així doncs, al igual que els components *upstream* de la via, la deleció de *wis1* condueix a un fenotip elongat típic d'un bloqueig de cicle que, a més a més, es veu exacerbat en condicions d'estrès (Warbrick and Fantes, 1991).

Es tracta d'un gen que codifica per una proteïna de 605 aminoàcids i presenta tots els dominis conservats de proteïnes quinases descrits per Hanks and Quinn l'any 1991. En particular, aquesta proteïna presenta un alt grau d'homologia amb el domini catalític de les proteïnes Pbs2 (MAPKK) i Ste7 (Ser/Thr quinasa) de *S. cerevisiae* i la MAPKK Byr1 de *S. pombe* (Hohmann, 2002).

Estructuralment, la Wis1 és similar a les MAPKK de mamífer, presentant un domini catalític C-terminal (Warbrick and Fantes, 1991) i un domini N-terminal d'uns 300 aminoàcids que conté una seqüència rica en prolines, una seqüència d'exportació nuclear (NES) i una zona d'ancoratge per a la MAPK Sty1 imprescindible per a la unió i activació de la Sty1 en resposta a estrès (Nguyen *et al.*, 2002) (figura 7).

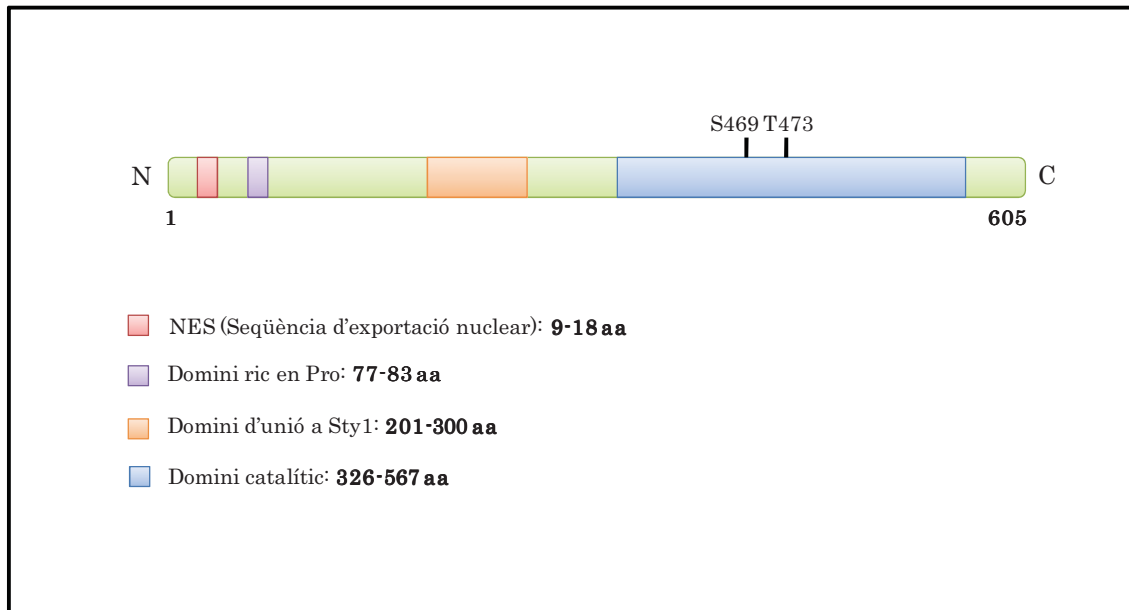


Figura 7. Diagrama esquemàtic de l'estructura de la proteïna Wis1.

Com s'ha comentat en l'apartat anterior, la fosforilació de la Ser469 i la Thr473 per part de les proteïnes Wis4 i Win1 en el lloc d'activació del domini quinasa de la Wis1 és essencial per a l'activació de la proteïna en resposta a estrès.

Per altra banda, la Wis1 és l'única MAPKK capaç d'activar la Sty1 sota condicions d'estrès (Degols *et al.*, 1996) i és per això que la seva deleció presenta la mateixa sensibilitat a elevada osmolaritat i temperatura, agents oxidants o deprivació nutricional que mutacions en el gen de *sty1*. A més a més, en cèl·lules $\Delta wis1$ no es detecta fosforilació de la Sty1 en resposta a cap mena d'estrès (Millar *et al.*, 1995; Shiozaki and Russell, 1995; Degols *et al.*, 1996; Degols and Russell, 1997). Per contra, la sobreexpressió del gen *wis1* comporta una hiperactivació de la via que resulta tòxica (Millar *et al.*, 1992b; Otilie *et al.*, 1992; Shiozaki and Russell, 1995).

Referent a la seva localització, sempre s'ha considerat la Wis1 com una proteïna citoplasmàtica (Gaits *et al.*, 1998), encara que hi ha un estudi realitzat per Nguyen *et al.*, que demostra que la Wis1 transloca al nucli en resposta a estrès alhora que el seu substrat, la MAPK Sty1. Tot i així, cal destacar que aquesta translocació de la Wis1 al nucli no és total, observant-se una localització difusa entre el nucli i el citoplasma (Nguyen *et al.*, 2002).



2.3.2.3. MAPK: Sty1

El gen *sty1* va ser aïllat de forma paral·lela en dos estudis diferents l'any 1995. Per una banda, Millar *et al.* van aïllar mutants d'aquest gen que suprimien el fenotip letal causat per la inactivació de dues fosfatases específiques de Tirosina, la Pyp1 i la Pyp2. Aquestes havien estat prèviament descrites com a reguladors negatius de l'entrada en mitosi (Millar *et al.*, 1992b). És per això que la MAPK rep el nom de Sty1 (*Supressor of tyrosine phosphatase 1*). En aquest mateix estudi es va aïllar també el gen *sty2*, que posteriorment va ser identificat com a *wis1*. En paral·lel, el grup del Dr. Russell va descriure el gen *spc1* (*Supressor of phosphatase 2C*) en un estudi basat en la cerca de mutants que suprimissin el fenotip letal dels mutants dels gens pertanyents a dues fosfatases tipus 2C, la Ptc1 i la Ptc3 (Shiozaki and Russell, 1995). Un any després, al 1996, Kato *et al.* van aïllar el mateix gen al que van anomenar *phh1* (*Pombe homologue of Hog1*) en un estudi de clonatge per PCR d'homòlegs de MAP quinases (Kato *et al.*, 1996).

Aquesta proteïna és membre de la família de les MAP quinases activades per estrès (SAPKs) que inclou la Hog1 de *S. cerevisiae* i les SAPKs de mamífer p38 i JNK. A diferència del que ocorre a *S. cerevisiae*, on la Hog1 és la responsable fonamental de la resposta a increments en l'osmolaritat, la Sty1 s'activa en *S. pombe* en resposta a un gran ventall d'estressos ambientals (Millar *et al.*, 1995; Shiozaki and Russell, 1996; Degols *et al.*, 1996; Degols and Russell, 1997; Shieh *et al.*, 1997; Shiozaki *et al.*, 1997). De fet, la carència de *sty1* indueix fenotips de multisensibilitat a estrès en *S. pombe*. Així, mutants de *sty1* són hipersensibles a elevades osmolaritats induïdes per KCl o sorbitol (Shiozaki and Russell, 1995), estrès tèrmic (Soto *et al.*, 2002), H₂O₂ (Degols *et al.*, 1996), radiació ultraviolada (Degols and Russell, 1997), estrès per metalls pesats com el cadmi i depleció de fonts de nitrogen i carboni (Madrid *et al.*, 2004). Això fa que la Sty1 s'assembli molt més a les MAPK de mamífer que a la Hog1 (Tibbles and Woodgett, 1999). A més, els mutants amb manca de *sty1* presenten problemes de viabilitat en fase estacionària, són incapaçs d'iniciar el programa meiótic en condicions de deprivació de nitrogen i retarden l'inici de la mitosi o inclús no aconsegueixen reiniciar el cicle de divisió cel·lular després d'estrès (Shiozaki and Russell, 1995; Wilkinson *et al.*, 1996). La possible relació entre la



resposta a estrès i la progressió del cicle cel·lular es va confirmar en veure la interacció letal entre mutants de *sty1* i *cdc25* a temperatura permissiva (Millar *et al.*, 1995; Shiozaki and Russell, 1995).

Igual que la resta de components de la família de les MAPKs, sota condicions d'estrès la Sty1 és activada mitjançant la fosforilació per part de la Wis1 en dos residus altament conservats del seu domini catalític, la Thr171 i la Tyr173, en el motiu *consensus* per la MAPKK, TGY (treonina-glicina-tirosina) (Warbrick and Fantes, 1991; Shiozaki and Russell 1995). Per altra banda, aquesta fosforilació no es l'únic element regulador de l'activitat d'aquesta proteïna ja que s'ha demostrat que la regulació de la seva localització és també molt important en la resposta a estrès.

La Sty1 és una proteïna citoplasmàtica en condicions normals i és en resposta a estrès quan la fosforilació d'ambdós residus per part de la Wis1 indueix la seva immediata translocació al nucli, que és totalment abolida en els mutants $\Delta wis1$ (Gaits *et al.*, 1998; Gaits and Russell, 1999). De fet, mutants en els quals s'han modificat els llocs *consensus* de fosforilació per la Wis1 presenten els mateixos fenotips de sensibilitat a estrès osmòtic i la morfologia elongada pròpies d'un mutant $\Delta sty1$ (Gaits *et al.*, 1998).

El transport de la Sty1 al nucli és dependent de diversos factors. Per una banda, és necessària la participació de la proteïna Pim1 (Matsumoto and Beach, 1991; Gaits and Russell, 1999; figura 8). Aquesta proteïna és un factor intercanviador de nucleòtids de guanina per a les GTPases de la família Ran. Aquestes proteïnes han estat àmpliament caracteritzades per la seva implicació en processos d'import nuclear. En mutants termosensibles per aquest gen, no s'observa localització nuclear de la Sty1 en resposta a estrès, malgrat que sí es produeix la fosforilació per part de la Wis1. Aquest fet demostra que el procés de transport al nucli en resposta a estrès és un procés actiu i catalitzat per la Pim1 (figura 8; Gaits and Russell, 1999). A més, la Sty1 no conté en la seva seqüència cap senyal de localització nuclear evident, de manera que probablement el transport tingui lloc a través de la interacció amb una proteïna que formi un complex amb la Sty1 i el transportador. Hi ha dos elements addicionals que s'han postulat com a importants per la translocació de Sty1 al nucli. Un d'ells és



el factor de transcripció Atf1, substrat nuclear de la Sty1 sobre el qual en parlarem més endavant (*apartat 2.5.1. Factors de transcripció*).

Degut a que part de la resposta a estrès té lloc a través de canvis en l'expressió gènica (*apartat 2.4. Adaptació a l'estrès*), cal una interacció (directa o indirecta) de la Sty1 amb factors de transcripció. Això va comportar que l'Atf1 fos durant molt de temps l'únic substrat conegut de la Sty1 (Takeda *et al.*, 1995; Kanoh *et al.*, 1996; Shiozaki and Russell, 1996; Wilkinson *et al.*, 1996). Estudis realitzats per Gaits *et al.* van demostrar que en mutants que no tenen *atf1*, la Sty1 es fosforila en resposta a estrès tal i com té lloc en cèl·lules *wild type* però no es troba localitzada al nucli. Aquest fet que suggereix la idea que aquest factor de transcripció actui com a ancoratge nuclear de la Sty1 en condicions d'estrès (Gaits *et al.*, 1998). Per últim, s'ha descrit que la localització citoplasmàtica de la Wis1 és necessària per a l'activació i posterior translocació de la Sty1 al nucli en resposta a estrès (Nguyen *et al.*, 2002).

Un cop translocada al nucli, la Sty1 roman en aquest compartiment durant un període de temps molt curt (uns 20 minuts aproximadament) després del qual ha de retornar al citoplasma per ser inactivada, ja que és en aquest compartiment on es troben les fosfatases Pyp1 i Pyp2 encarregades de defosforilar la Tyr173 de la Sty1. Aquest transport nucli-citoplasmàtic és dependent de la maquinària d'exportació nuclear, i en concret, de la proteïna exportadora Crm1 (Fornerod *et al.*, 1997; Fukuda *et al.*, 1997a; Ossareh-Nazari *et al.*, 1997; Stade *et al.*, 1997). Aquesta proteïna és un receptor nuclear necessari per exportar proteïnes que continguin NES a través del complex del porus nuclear (figura 8). En mutants de pèrdua de funció parcial d'aquest gen, la localització nuclear de la Sty1 es troba augmentada i perllongada en el temps; fet que també afecta la fosforilació de la Tyr173 (Gaits and Russell, 1999).

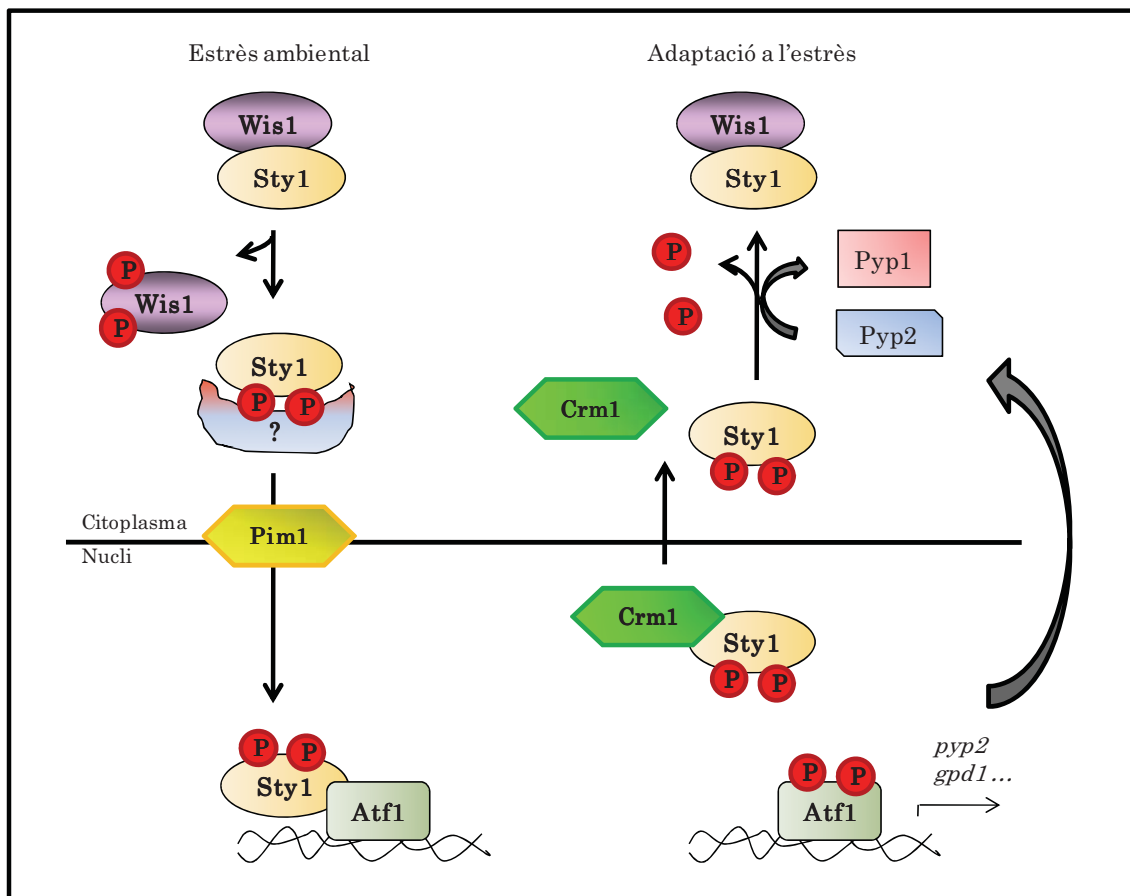


Figura 8. Model del transport nucleo-citoplasmàtic de la Sty1 en *S. pombe*. Adaptació de Gaits and Russell, 1999.

Totes aquestes dades posen de manifest la importància que té la resposta a estrès ambiental en *S. pombe*, no només a nivell de les fosforilacions successives que tenen lloc al llarg de la via de senyalització, sinó també en la regulació dels processos de localització subcel·lular de les diferents proteïnes implicades en aquesta resposta (figura 8).

2.4. Adaptació a l'estrès: canvis en l'expressió gènica

Com s'ha comentat anteriorment, les cèl·lules són capaces de detectar i reaccionar davant els canvis del medi que les envolta. Especialment els organismes unicel·lulars ja que es troben constantment en contacte amb fluctuacions del medi, com ara canvis en les fonts de nutrients, pH, temperatura, elevades osmolaritats o radiacions UV. Per tal de sobreviure i proliferar davant aquests canvis s'han d'induir una sèrie de respostes que inclouen detectar l'estrès rebut, la transmissió del senyal a través de les vies de



les MAPK i canvis compensatoris a nivell fisiològic i d'expressió gènica (Egel, 2004). Com s'ha comentat a l'inici de l'apartat de *Resposta a estrès*, els estudis d'aquest àmbit realitzats en diferents organismes han revelat, en primer lloc, que l'exposició a dosis baixes d'un estrès condueix a una resposta adaptativa que confereix resistència transitòria a dosis més elevades del mateix tipus d'estrès. En segon lloc, l'adaptació a un tipus d'estrès comporta una major resistència a altres estressos, aparentment no relacionats, és a dir, a una protecció creuada (Jamieson, 1992; Lee *et al.*, 1995; Moradas-Ferreira and Costa, 2000). Aquests fenòmens suggereixen que diferents estímuls poden activar mecanismes de defensa semblants, o que existeix un mecanisme de defensa general que confereix un nivell bàsic de protecció.

Estudis de l'expressió gènica mitjançant *microarrays* de DNA (Chen *et al.*, 2003) en llevats han demostrat que tant a *S. pombe* com a *S. cerevisiae* existeix un subgrup de gens l'expressió dels quals pateix canvis en 4 de les 5 condicions assajades, mentre que l'expressió d'un altre subgrup és específica de només un o dos tipus d'estrès. Els gens del primer grup són els anomenats ESR (*Environmental Stress Response*; Gasch *et al.*, 2000) a *S. cerevisiae* i CESR (*Core Environmental Stress Response*) a *S. pombe*. Als gens del segon grup se'ls coneix com a SESR (*Specific Environmental Stress Response*). Dins de cada grup trobem 2 subgrups: els gens induïts i els gens reprimits en resposta a estrès. Els 5 estressos utilitzats en aquest estudi són: estrès oxidatiu (peròxid d'hidrogen, H₂O₂ 0,5mM), estrès per metalls pesants (cadmi, CdSO₄ 0,5mM), estrès per calor (39°C), estrès osmòtic (sorbitol 1M) i dany al DNA (metil metà sulfonat, MMS 0,02% w/v) (Chen *et al.*, 2003).

2.4.1. CESR (*Core Environmental Stress Response*)

Els gens que corresponen a aquest grup varien la seva expressió en resposta a 4 dels 5 estressos utilitzats. Trobem uns 140 gens induïbles i uns 100 gens reprimibles.

- **CESR induïbles:** són gens implicats en una gran varietat de funcions. En general, codifiquen per proteïnes implicades en el metabolisme de carbohidrats (*tps1* i *ntp1* encarregats de la síntesi i



degradació de la trehalosa, respectivament), antioxidants (la catalasa *ctt1*, la glutatió peroxidasa *gpx1*, la tioredoxina *trx2*, la glutaredoxina *grx1*), enzims implicats en processos d'ubiquitinització, l'enzim glicerol-3-fosfat deshidrogenasa o *heat shock proteins hsp19* i *hsp9*. Per altra banda, també trobem els factors de transcripció Atf1 i Pcr1 i proteïnes implicades en senyalització com la Mpr1 i la Srk1, entre d'altres.

- **CESR reprimibles:** l'estrès també comporta una baixada en els nivells d'expressió d'alguns gens. Dins d'aquest grup s'inclouen els gens que es troben majoritàriament associats a la síntesi de proteïnes, transport, transcripció (subunitats I, II, III de la RNA polimerasa), senyalització cel·lular i organització del citoesquelet.

La regulació de tots aquests gens és majoritàriament dependent de la MAPK Sty1 i en menor grau, del factor de transcripció Atf1. Atenent als patrons d'expressió en cèl·lules *wt*, $\Delta sty1$ o $\Delta atf1$, els gens que pertanyen al CESR es poden subdividir en 4 grups segons la seva dependència de la Sty1, de l'Atf1, de tots 2 o de cap d'ells.

1. **Classe 1:** gens que requereixen de la Sty1 i l'Atf1 per a la seva expressió basal i la induïda per estrès (la catalasa, *ctt1*; la tiol transferasa, *grx1*; i la glutatió peroxidasa, *gpx1*).
2. **Classe 2:** gens que requereixen de la Sty1 i l'Atf1 per a la seva inducció en resposta a estrès però no per a la seva expressió basal.
3. **Classe 3:** gens que necessiten la Sty1 per a la inducció però són independents de l'Atf1 (el fosfotransmissor regulador de la resposta a estrès, *mpr1* i la proteïna fosfatasa 2C, *ptc1*).
4. **Classe 4:** gens independents de Sty1 i d'Atf1.

En general, la major part dels gens CESR han resultat ser dependents de la Sty1 i en part també d'Atf1. La conclusió que se n'extreu és que la MAPK Sty1



juga un paper crític en la regulació d'aquests gens en els 5 estressos testats, tot i que hi ha un subgrup (la classe 4) que poden ser induïts en absència de la MAPK. A més a més, les observacions que la Sty1 controla més gens que l'Atf1 suggereixen que la MAPK regula més factors de transcripció. Per altra banda, la Sty1 pot jugar també un paper en la repressió de gens del CESR, donat que l'expressió d'alguns d'ells augmenta en cèl·lules $\Delta sty1$. De fet, ja s'havia parlat d'un paper repressor d'Atf1 en l'expressió de gens depenent de l'estat de fosforilació de la Sty1 (Degols and Russell, 1997), però no es pot considerar un mecanisme general ja que podria ser que la inducció d'aquests gens constituís un mecanisme compensatori de l'absència de la Sty1.

2.4.2. SESR (*Specific Environmental Stress Response*)

Els gens SESR són aquells que juguen un paper específic dins la resposta a estrès. Dins d'aquest grup els gens es poden subdividir en aquells que semblen ser específics d'una resposta a estrès concreta i aquells que s'indueixen en 2 o 3 dels estressos examinats però que no compleixen les característiques per incloure'ls dins el grup dels CESR. La proporció de gens depenents de la Sty1 i l'Atf1 és menor que en el cas dels gens CESR, i únicament se li ha atorgat un paper més important en el cas d'estrès oxidatiu i calor.

Per altra banda, s'ha suggerit que la via de les SAPKs estigués regulant factors que intervenen en la topologia de la cromatina (*tup11* i *tup12*) per tal que l'expressió de certs gens tingui lloc de forma específica en resposta a estrès (Hirota *et al.*, 2003).

Finalment, s'ha relacionat la implicació de la Sty1 en el manteniment de la traducció de proteïnes en resposta a estrès per tal de facilitar l'adaptació. Aquest fenomen és depenent de l'estat de fosforilació de l'eIF2, que s'ha de mantenir defosforilat per ser actiu. En absència de la Sty1 (i també d'Atf1 o Pcr1), l'eIF2 s'hiperfosforila, esdevenint inactiu (Dunand-Sauthier *et al.*, 2005). Això implicaria un nou nivell de regulació per part de la Sty1 en la producció de proteïnes de resposta a estrès.



2.5. Efectors de la via de MAPK: Substrats de Sty1

Com s'ha explicat en l'apartat anterior, els resultats dels *microarrays* mostren que la Sty1 és imprescindible per tal que es pugui donar l'expressió gènica necessària per a l'adaptació i que aquest procés depèn en part del factor de transcripció Atf1. Cal remarcar però, que la Sty1 també pot realitzar les seves funcions a través d'altres substrats com ara les quinases Cmk2 i Srk1, sent aquesta última el tema central d'aquesta tesi. Així doncs, els substrats coneguts de la MAPK Sty1 es poden dividir en dos grans grups: els factors de transcripció com Atf1, Pcr1, Pap1 i Prr1 i les Ser/Thr quinases Cmk2 i Srk1. A continuació s'analitzaran amb detall aquests dos grups.

2.5.1. Factors de transcripció: Atf1, Pcr1, Pap1 i Prr1

Una part fonamental de la resposta a estrès ambiental és l'activació dels programes d'expressió gènica, ja siguin els específics d'un tipus d'estrès determinat o els generals, per tal de garantir la supervivència i proliferació cel·lulars. Aquests mecanismes impliquen l'activació i localització d'una sèrie de factors de transcripció que seran els encarregats de regular l'expressió gènica (figura 9).

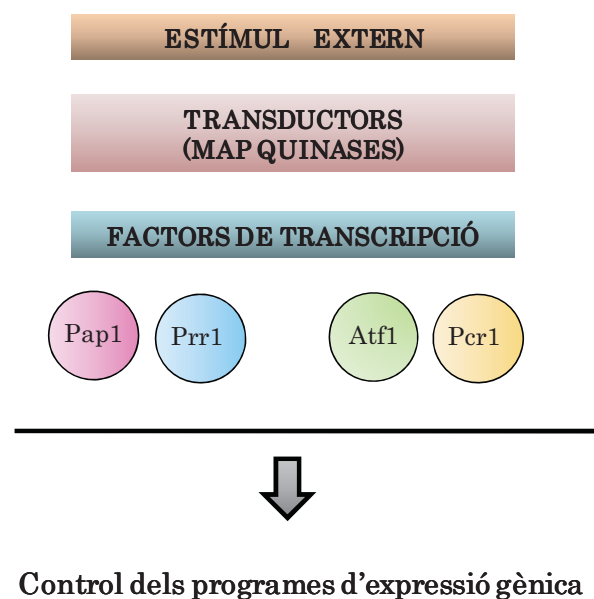


Figura 9. El control dels programes d'expressió gènica és una part fonamental en la resposta a estrès ambiental.

En el cas de *S. pombe*, l'expressió gènica en resposta a estrès ambiental ve regulada principalment pels factors de transcripció Atf1, Pcr1, Pap1 i Prr1.

▪ Atf1 i Pcr1:

El gen *atf1* va ser inicialment descrit en un estudi de seqüenciació del cromosoma II de *S. pombe* (Takeda *et al.*, 1995). Aquest gen codifica per una



proteïna de 566 aminoàcids que pertany a la família de factors de transcripció bZIP (de l'anglès, *Basic leucine zipper*). Aquesta família es caracteritza per presentar en la seva estructura un motiu ric en aminoàcids bàsics, que conformen la zona d'ancoratge al DNA, i una regió rica en leucines, necessària per a l'homo i heterodimerització d'aquests factors de transcripció. Aquesta família es troba altament conservada evolutivament, sent Atf1 més semblant a l'ATF-2 de mamífers, amb un 53% d'identitat, (Tibbles and Woodgett, 1999) que no pas als membres d'aquesta família en *S. cerevisiae* (Fujiwara *et al.*, 1999).

D'acord amb el paper de la Sty1 en la regulació de l'expressió gènica en resposta a estrès, durant molt de temps el factor de transcripció Atf1 va ser l'únic substrat conegut de la MAPK (Takeda *et al.*, 1995; Kanoh *et al.*, 1996; Shiozaki and Russell, 1996; Wilkinson *et al.*, 1996). Aquest factor de transcripció reconeix i s'uneix a zones de DNA conegudes com CRE (Elements de Resposta a AMP cíclic) que presenten la seqüència consens 5'- NTGACGT(C/A)-3' (Takeda *et al.*, 1995; Kanoh *et al.*, 1996).

L'Atf1 és l'encarregat de regular l'expressió de diferents gens en resposta a estrès ambiental de manera dependent de la Sty1. Entre aquests gens es troben la *gpd1* (glicerol-3-fosfat deshidrogenasa), la *ctt1* (catalasa), la *fbp1* (fructosa-1,6-bifosfatasa), la *pyp2* (fosfotirosina fosfatasa 2) de la que se'n parlarà posteriorment, el *ste11* (factor de transcripció essencial en el procés de conjugació) i el mateix *atf1* en resposta a diferents formes d'estrès (Shiozaki and Russell, 1996; Wilkinson *et al.*, 1996; Degols and Russell, 1997; Nakagawa *et al.*, 1999; Nakagawa *et al.*, 2000; Neely and Hoffman, 2000). Per aquest motiu, els mutants $\Delta atf1$ són sensibles a diferents formes d'estrès tal i com ho són els mutants de *sty1* i *wis1* (Shiozaki and Russell, 1996; Wilkinson *et al.*, 1996; Degols and Russell, 1997). Per contra, el mutant d'*atf1* no presenta cap defecte en la progressió del cicle cel·lular ni és sensible a cadmi o arsenit, ni tampoc a drogues com la cicloheximida, staurosporina o anisomicina (Toone *et al.*, 1998). Per altra banda, s'ha observat que aquest mutant tampoc és sensible a radiacions UV o a MMS però sí que és activat per aquests agents i és capaç d'induir l'expressió de *ctt1* en resposta a ells (Degols and Russell, 1997).

Tot i que l'Atf1 es considera un activador de la transcripció de gens de resposta a estrès, existeixen dades que indiquen que en absència d'estrès podria



funcionar com a repressor. És el cas del que van observar Degols i Russell l'any 1997. En aquest estudi, es va veure que en cèl·lules irradiades amb llum UV, la manca de *sty1* induïx cert nivell d'expressió del gen de la catalasa *ctt1* i que aquest nivell d'expressió augmenta si la deleció de *sty1* es combina amb la deleció d'*atf1* (Degols and Russell, 1997). En *S. cerevisiae* s'han trobat dades similars per a la proteïna Sko1 (Proft *et al.*, 2001).

Poc després de ser aïllat l'*atf1*, diversos estudis van demostrar que activava la transcripció de molts gens mitjançant la formació d'un heterodímer amb el factor de transcripció de tipus bZIP, Pcr1 (Watanabe and Yamamoto, 1996; Wahls and Smith, 1994; Kanoh *et al.*, 1996; Ohmiya *et al.*, 1999). En el cas de cèl·lules de mamífer, s'ha suggerit que la formació d'heterodímers de diferents factors de transcripció de tipus bZIP controla una gran varietat de sistemes de regulació transcripcional que permeten augmentar i diversificar les respostes gèniques (Wolberger, 1998). En el cas del llevat, s'ha descrit que tot i que les cèl·lules amb manca de Pcr1 comparteixen la major part dels fenotips derivats d'estrès de les cèl·lules $\Delta sty1$ i $\Delta atf1$, també presenten característiques diferents. Tant les cèl·lules $\Delta pcr1$ com $\Delta atf1$ són sensibles al fred i ineficients en els processos d'aparellament o *mating* i formació d'espores després d'una depleció de les fonts de nitrogen del medi. Per altra banda, els mutants individuals també són deficients en la recombinació meiòtica degut a que l'heterodímer Atf1/Pcr1 (també conegut com Mts1/Mts2) s'uneix als *hot spots* de manera més eficient que els factors de transcripció individuals (Kon *et al.*, 1997; Wahls and Smith, 1994). La participació del complex Atf1/Pcr1 en el reconeixement dels *hot spots* explica l'observació que molts d'aquests *hot spots* es localitzen a les regions promotores (Wu and Lichten, 1994). Un cop unit als *hot spots*, el complex Atf1/Pcr1 dirigeix la remodelació de la cromatina per tal d'activar la recombinació meiòtica (Yamada *et al.*, 2004). Malgrat aquests descobriments, el paper dels heterodímers Atf1/Pcr1 en resposta a estrès restava encara per elucidar. Tot i que s'ha descrit que tant Atf1 com Pcr1 poden unir-se als promotors de gens regulats per estrès (Kanoh *et al.*, 1996; Watanabe and Yamamoto, 1996), fins fa relativament poc temps no s'havia pogut demostrar que els heterodímers s'unissin amb major afinitat que els factors de transcripció individuals als elements *cis*. Per altra banda, s'havia demostrat que l'Atf1 i no



Pcr1 és necessari per a la supervivència davant un augment en l'osmolaritat del medi (Kon *et al.*, 1997; Kon *et al.*, 1998), suggerint que l'heterodímer jugaria un paper important en els processos de *mating*, meiosis, i la recombinació mitjançada pels *hot spots*, però no en la resistència global a l'estrès.

Així doncs, estudis recents duts a terme pel grup del Dr. Jones (Lawrence *et al.*, 2007) i la Dra. Hidalgo (Sansó *et al.*, 2008) han permès elucidar la regulació i el paper d'aquests dos factors de transcripció en resposta a estrès. Tot i que s'havia demostrat que la Sty1 fosforilava l'Atf1 tant *in vitro* (Wilkinson *et al.*, 1996) com *in vivo* (Shiozaki and Russell, 1996) el paper d'aquesta fosforilació no estava gaire clar. Per una banda se sabia que l'expressió de gens diana d'Atf1 requeria que la Sty1 fos activa però el mecanisme restava desconegut. El grup del Dr. Jones, mitjançant la creació d'un mutant d'*atf1* que conté els 11 residus *consensus* de fosforilació per la MAPK mutats a alanina, va observar que el mutant no presentava una pèrdua de funcionalitat evident ni tampoc exhibia la mateixa sensibilitat a estrès que el mutant $\Delta atf1$. A més a més, el mutant dels llocs de fosforilació podia encara activar la transcripció de moltes de les seves dianes. La conclusió de l'estudi és que la Sty1 més que activar l'Atf1 el que fa és estabilitzar-lo mitjançant la fosforilació. De fet, l'Atf1 presenta un nivell de fosforilació basal que estaria afavorint la seva estabilitat en condicions normals. En resposta a estrès, la seva hiperfosforilació conduiria a l'acumulació d'Atf1 per tal d'afavorir la seva activitat (Lawrence *et al.*, 2007). Com s'ha comentat anteriorment, l'Atf1 interacciona amb Pcr1 (Lawrence *et al.*, 2007; Sansó *et al.*, 2008), i sembla ser que aquesta unió afavoreix l'estabilitat del primer. Finalment, la transcripció i estabilitat del mRNA d'*atf1* també es regulen de forma depenent de la Sty1. En resposta a estrès oxidatiu, per exemple, la proteïna Csx1 s'hiperfosforila i s'uneix al mRNA d'*atf1* (que conté un element ARE), estabilitzant-lo (Rodríguez-Gabriel *et al.*, 2003).

En canvi, el grup de la Dra. Hidalgo, tot i presentar les mateixes evidències que el treball de Lawrence *et al.* en relació a la unió entre Atf1 i Pcr1 i els seus papers similars però no idèntics en resposta a estrès, difereix en relació a l'estabilitat d'Atf1. Mentre que Lawrence *et al.*, afirmen que l'estabilitat d'Atf1 depèn de Sty1 i de Pcr1, en el cas de Sansó *et al.*, indiquen que sota les seves



condicions (l'*atf1* integrat sota el control d'un promotor *nmt41*) no veuen una disminució de la proteïna d'Atf1 en els mutants Δ *sty1* i Δ *pcr1*. En aquest mateix estudi, demostren com l'Atf1 es pot unir a promotors en cèl·lules amb manca de Pcr1, fet que demostra que Atf1 pot actuar també com a homodímer.

En el cas de cèl·lules de mamífer, se sap que en condicions normals l'ATF-2 es troba en una conformació inactiva degut a la interacció intramolecular entre el seu domini d'unió al DNA i l'extrem N-terminal. Perquè la proteïna sigui transcripcionalment activa, cal que aquesta interacció es trenqui mitjançant la unió de l'ATF-2 amb altres proteïnes com l'E1A o el c-Jun, o mitjançant la fosforilació per les SAPKs (Li and Green, 1996). Altres estudis, però, també han suggerit que la fosforilació podria tenir un efecte directe sobre el domini transactivador de la proteïna (Livingstone *et al.*, 1995; van Dam *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 1995). Per últim, s'ha parlat d'un paper protector de la fosforilació en l'estabilitat d'ATF-2, impedit la seva ubiquitinització i posterior degradació pel proteasoma (Firestein and Feuerstein, 1998; Fuchs and Ronai, 1999; Fuchs *et al.*, 2000).

▪ **Pap1:**

Tot i que no s'ha demostrat que la Pap1 sigui una diana directa de la Sty1, la seva translocació al nucli en resposta a H₂O₂ sembla ser dependent de la MAPK (Shiozaki and Russell, 1996; Wilkinson *et al.*, 1996; Toone *et al.*, 1998). És per això que en aquest apartat s'estudiaran amb deteniment els mecanismes de regulació d'aquest factor de transcripció en resposta a estrès.

El gen *pap1* va ser inicialment aïllat com un gen capaç de conferir resistència a staurosporina quan està present a la cèl·lula en elevat nombre de còpies (Toda *et al.*, 1991). Aquest mateix fenotip s'observava en sobreexpressar gens de multiresistència a drogues com *pad1*, *hba2*, *pmd1* o en mutants del transportador nuclear *crm1*.

La Pap1 és un dels components de la família AP-1 de llevat (Toone *et al.*, 1998) que inclou també la Cap1 de *C. Albicans* i la Kap1 de *Kluyveromyces lactis*. Igual que l'Atf1, aquesta família de factors de transcripció es caracteritza per la presència d'un domini bZIP que els permet la formació d'homo o heterodímers. La principal diferència estructural amb la família d'Atf1 radica en



que aquests factors presenten, a més a més, dues regions riques en cisteïnes localitzades al centre i a l'extrem carboxil de la proteïna (el *cysteine-rich domain* o CRD), respectivament (Toone *et al.*, 1998). Aquesta zona rica en cisteïnes de l'extrem C-terminal es considera un sensor de l'estat REDOX de la cèl·lula i participaria en la localització nuclear d'aquestes proteïnes en resposta a estrès oxidatiu.

A diferència d'Atf1, que es localitza predominantment al nucli, la Pap1 conté una seqüència d'exportació nuclear (NES) en el domini C-terminal que fa que, en absència d'estrès, la localització d'aquest factor de transcripció sigui principalment citoplasmàtica. El transportador nuclear Crm1 regula negativament la localització nuclear de Pap1, exportant-la del nucli al citoplasma (Stade *et al.*, 1997; Toone *et al.*, 1998).

La regulació del factor de transcripció Pap1 es du a terme a nivell de modificacions post-traduccionals i de la seva localització subcel·lular. En condicions d'absència d'estrès, Pap1 és una proteïna citoplasmàtica i és en resposta a baixes concentracions d'estrès oxidatiu (H_2O_2 , DEM: Dietil Maleat) quan s'acumula al nucli (Castillo *et al.*, 2002; Kudo *et al.*, 1999). Aquest transport implica la inactivació del transportador nuclear Crm1 que en condicions normals seria l'encarregat de mantenir Pap1 al citoplasma. Així, mutants inactius del gen *crm1* presenten localització nuclear constitutiva de Pap1 (Toone *et al.*, 1998). El mecanisme a través del qual diferents agents oxidants són capaços d'inhibir el transport via Crm1 i permetre la localització nuclear de Pap1 és la modificació post-traduccional dels residus cisteïna del factor de transcripció. D'aquesta manera, es bloqueja l'accés de la proteïna Crm1 al NES present en l'extrem carboxil de Pap1 (Kudo *et al.*, 1999). Aquestes modificacions post-traduccionals depenen del tipus d'agent oxidant utilitzat. El peròxid d'hidrogen indueix una modificació reversible consistent en l'oxidació de dos residus cisteïna (Cys278 i Cys501 o Cys532) separats dins la seqüència de Pap1 que, en unir-se mitjançant ponts disulfur, indueixen un canvi conformacional que impedeix l'accés a Crm1 (Castillo *et al.*, 2002). Per altra banda, el DEM indueix un canvi conformacional no reversible modificant covalentment dues cisteïnes ubicades en l'extrem carboxil de Pap1, on se situa el NES (Castillo *et al.*, 2002).



Dins el nucli, la Pap1 indueix l'expressió de gens necessaris per a la detoxificació dels agents oxidants. Algunes de les dianes d'aquest factor de transcripció són les comentades a l'inici d'aquest apartat: la catalasa *ctt1* (Nakagawa *et al.*, 1995; Nakagawa *et al.*, 1999; Nakagawa *et al.*, 2000), la tioredoxina *trx2* (Toone *et al.*, 1998), la tioredoxina reductasa *trr1* (Casso and Beach, 1996) i la glutatió reductasa *pgr1* (Lee *et al.*, 1997). De manera interessant cal destacar, novament, l'existència, d'un mecanisme de retroalimentació negativa, ja que la inducció de l'expressió gènica de les tioredoxines condueix a la inactivació de Pap1 (ja que reverteixen el seu estat oxidat i actiu) (Vivancos *et al.*, 2004).

En els darrers anys, els treballs de Vivancos *et al.*, 2005 i Bozonet *et al.*, 2005 han permès identificar el regulador de Pap1, la peroxiredoxina Tpx1.

Les peroxiredoxines participen en el procés de detoxificació de l'H₂O₂ a través d'una cisteïna (cisteïna peroxidàtica) a àcid sulfènic (Cys-SOH). Aquest intermediari oxidat pot formar un pont disulfur amb una cisteïna no oxidada d'una altra subunitat, formant un dímer que pot ser reciclat de nou a l'estat monomèric reduït inicial per l'acció d'una tioredoxina (figura 10). Aquest intermediari oxidat a àcid sulfènic és l'encarregat de transmetre el senyal a la Pap1, probablement a través de la formació de dímers (Vivancos *et al.*, 2005). Estudis realitzats per Rabilloud *et al.*, 2002 i Yang *et al.*, 2002 indiquen que l'exposició a dosis elevades d'H₂O₂ pot inactivar les peroxiredoxines degut a que la cisteïna peroxidàtica oxidada a àcid sulfènic pot seguir reaccionant donant lloc a àcid sulfínic. Aquest fet explicaria perquè dosis elevades de l'oxidant no activen la Pap1.

A concentracions més elevades d'oxidant, la Tpx1 s'inactivaria per l'oxidació d'una cisteïna de la seva estructura impedit-se així l'activació de la Pap1 i el factor de transcripció es mantindria inactiu al citoplasma. En aquesta situació s'activa la via de Sty1-Atf1 per activar la transcripció de gens com *ctt1* i *gpx1* que permetin el descens de la concentració d'oxidant fins a nivells que possibilitin l'activació de Pap1. A més, l'Atf1 regula la transcripció de *srx1* que codifica per la sulforedoxina, encarregada de tornar a reduir la Tpx1 i per tant



facilitar l'activació de Pap1 (Bozonet *et al.*, 2005; Vivancos *et al.*, 2004; Vivancos *et al.*, 2006) (figura 10).

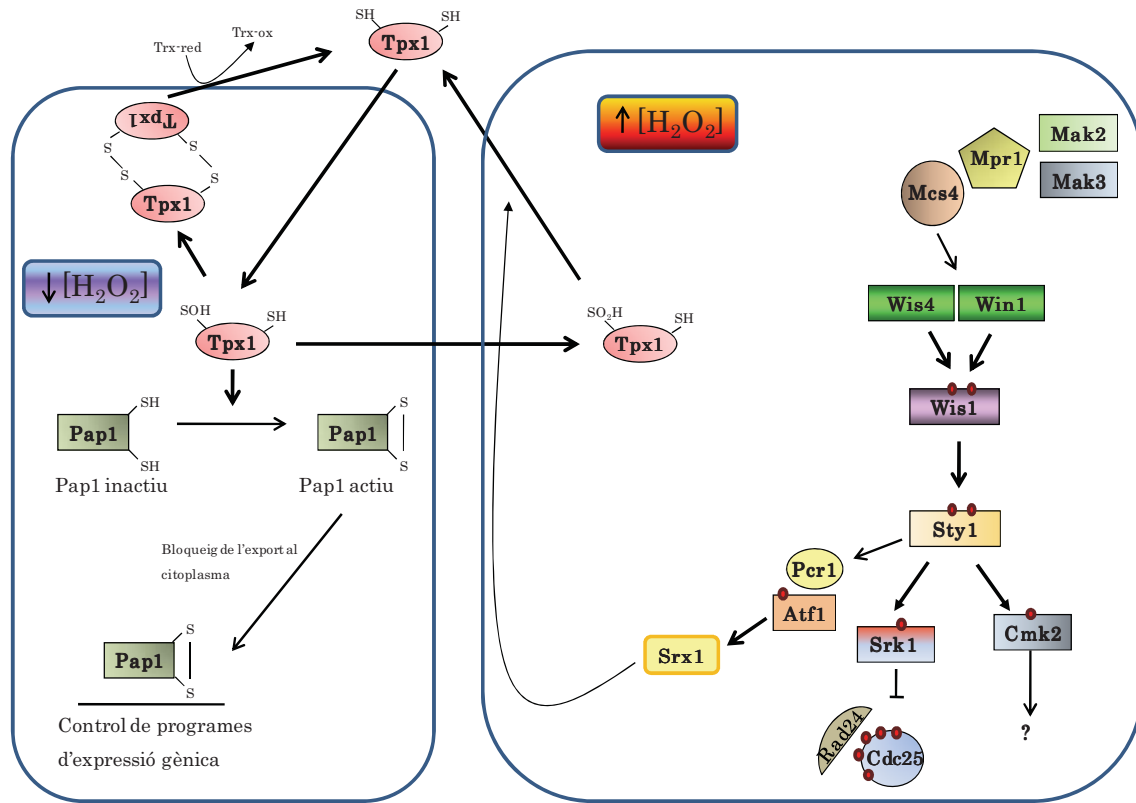


Figura 10. Esquema del model d'activació de Pap1 en resposta a baixes vs elevades concentracions d' H_2O_2 (Vivancos *et al.*, 2005).

En resum, podria dir-se que en funció del tipus i de la concentració d'agent oxidant es posen en marxa mecanismes diferents que impliquen l'activació de factors de transcripció que engeguen els programes d'expressió gènica dirigits a garantir la supervivència cel·lular.

▪ **Prr1:**

Prr1 és una proteïna reguladora de la resposta que presenta un elevat grau d'homologia amb el domini d'ancoratge al DNA situat a la zona amino-terminal del factor de transcripció de xoc tèrmic (Ohmiya *et al.*, 1999). Es troba relacionat amb la Snk7 de *S. cerevisiae* i, al igual que el seu homòleg, presenta



un domini receptor a l'extrem carboxil característic de reguladors de resposta bacterians. Per analogia amb Snk7 es creu que podria participar en l'activació de Pap1 (Ohmiya *et al.*, 1999) i, donat que també comparteix certa similitut amb la Mcs4 (figura 5), també s'ha suggerit que pugui ser activat per una histidina quinasa, com ara la Mak1 (Buck *et al.*, 2001). Els mutants d'aquest gen comparteixen alguns dels fenotips de sensibilitat a agents oxidants de la soca $\Delta pap1$ però, en canvi, no són sensibles a diamida, cicloheximida o anisomicina (Ohmiya *et al.*, 1999).

Pel que fa a la relació de Prr1 amb la cascada de Sty1-Atf1, sembla que seria independent, ja que en mutants $\Delta prr1$ l'activació de Sty1 i l'expressió de gens de resposta a estrès no es veuen afectats (Ohmiya *et al.*, 2000). Malgrat això, curiosament, mutants que no tenen *prp1* presenten els mateixos defectes d'esterilitat que els mutants $\Delta atf1$ degut a la seva incapacitat per induir *ste11* en resposta a deprivació de nitrogen (Greenall *et al.*, 2002). Tot això fa que el paper de Prr1 en la regulació de l'expressió gènica en resposta a diferents formes d'estrès sigui encara confús.

2.5.2. Quinases: Cmk2 i Srk1

Com s'ha indicat al principi d'aquest apartat, a més a més dels factors de transcripció, existeixen altres proteïnes que poden ser regulades per la Sty1. En el nostre grup, s'han descrit dues quinases que són substrats *in vivo* de la MAPK, la Cmk2 (Alemany *et al.*, 2002; Sanchez-Piris *et al.*, 2002) i la Srk1 (Smith *et al.*, 2002; Lopez-Aviles *et al.*, 2005 i part del treball d'aquesta tesi Lopez-Aviles*, Lambea* *et al.*, 2008).

Ambdues proteïnes són homòlogues a la quinasa Rck2 de *S. cerevisiae* (Bilsland-Marchesan *et al.*, 2000; Teige *et al.*, 2001) i a les quinases dependents de calmodulina de mamífer, tot i que en el seu cas no es troben regulades per Ca^{2+}/CaM .

▪ Cmk2:

La Cmk2 és una proteïna de 504 aminoàcids amb un pes molecular de 57 KDa. La seva deleció ha demostrat que no és un gen essencial per a la viabilitat cel·lular en condicions normals (Alemany *et al.*, 2002) i que els nivells



de proteïna es troben regulats al llarg del cicle, sent màxims en post-anafase i mínims en l'entrada en G2. Per contra, la Cmk2 és essencial per a la resposta a estrès oxidatiu ja que els seus mutants són sensibles a aquesta forma d'estrès ambiental. Sota aquest tipus d'insult, la Sty1 interacciona amb la Cmk2 i la fosforila en la Thr411 del domini regulador de l'extrem carboxi-terminal de la proteïna (Sanchez-Piris *et al.*, 2002).

La sobreexpressió d'aquest gen indueix un bloqueig en la fase G2 del cicle depenent de la Cdc2 (CDK de *S. pombe*). Alhora, aquesta sobreexpressió rescata defectes del checkpoint de replicació del DNA, però no de dany al DNA, fet que suggereix que la parada en fase G2 proporcionaria el temps necessari per a reparar les possibles alteracions de la replicació (Alemany *et al.*, 2002).

No està clar quin pot ser el paper d'aquesta quinasa en resposta a estrès oxidatiu però s'ha suggerit que, donat que a *S. cerevisiae* Rck2 és capaç de fosforilar proteïnes implicades en processos de traducció com EF-2 (Teige *et al.*, 2001), la Cmk2 pogués desenvolupar una funció similar en resposta a estrès oxidatiu.

▪ **Srk1:**

La proteïna Srk1, homòloga a la MK2 de cèl·lules de mamífer, ha estat implicada en dos processos essencials de la cèl·lula: la progressió del cicle cel·lular i la resposta a estrès. Degut a la importància d'aquestes funcions, s'abordaran aquests blocs per separat a continuació.

1. Paper de la Srk1 en el control del cicle cel·lular.

El gen de la Srk1 va ser clonat en el nostre grup (Lopez-Aviles *et al.*, 2005) degut a la seva homologia amb les quinases dependents de calmodulina.

srk1 codifica per una Ser/Thr quinasa de 580 aminoàcids amb un elevat grau d'homologia de seqüència amb les quinases Cmk2 de *S. pombe* i Rck2 de *S. cerevisiae*. Tant és així, que la Srk1 conserva els dominis de fosforilació per la MAPK de mamífer p38 i l'ancoratge a MAP quinases present en Rck2. Una de les característiques més importants de la Srk1 és el seu paper controlant l'entrada en mitosi de la cèl·lula a través de la inactivació de la fosfatasa Cdc25 en un cicle normal. Per tal de facilitar la comprensió d'aquest



paper, a continuació es resumirà breument el cicle cel·lular de *Schizosaccharomyces pombe*.

De la mateixa manera que succeeix en organismes superiors, el cicle cel·lular del llevat de fissió consta de 4 fases discretes (figura 11) conegudes com a G1, S, G2 i M. Fruit d'aquest procés, tots els components necessaris per a la supervivència cel·lular així com el material genètic de la cèl·lula mare són duplicats i repartits de forma equitativa entre les cèl·lules filles.

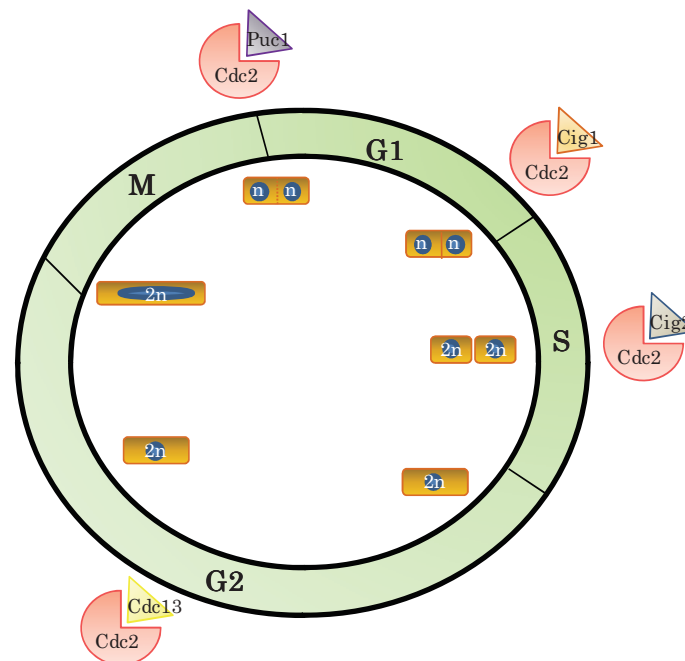


Figura 11. Cicle cel·lular de *Schizosaccharomyces pombe*.

La fase G1 (*Gap phase 1*) es caracteritza per ser una fase activa de síntesi de proteïnes necessàries per als estadis posteriors del cicle. La fase S (síntesi) comença amb l'inici de la replicació a diferents punts del genoma. Quan els orígens de replicació són desactivats es passa a fase G2 (*Gap phase 2*) en la qual les cèl·lules assoleixen la mida adient per a poder entrar en mitosi. En la fase M (mitosi) les cèl·lules amb DNA duplicat segreguen els seus cromosomes en 2 nuclis, procés que anirà seguit de la citocinesi i que conduirà a la separació de les 2 cèl·lules filles.



La transició entre fases està controlada de forma molt acurada mitjançant l'activitat d'una única quinasa, la Cdc2/Cdk1 (Stern and Nurse, 1996), que es pot trobar associada a diferents subunitats reguladores o ciclins depenent de la fase del cicle cel·lular. Fins el moment, s'han descrit 4 ciclins diferents a *S. pombe*: Puc1, Cig1, Cig2 i Cdc13 (Booher and Beach, 1988; Forsburg and Nurse, 1991; Bueno *et al.*, 1991; Bueno and Russell, 1993; Creanor and Mitchinson, 1996). La Puc1 regeix la fase G1, la Cig1 i la Cig2 són ciclins de fase S i la Cdc13 és la responsable de la transició G2/M. Les tres darreres són ciclins de tipus B, mentre que la Puc1 presenta una major similitud amb les ciclins de fase G1 de *S. cerevisiae*. Cal destacar, però, que de totes quatre, la Cdc13 és l'única ciclina essencial per a la viabilitat cel·lular, i pot compensar l'acció de les altres ciclins en cas que aquestes no hi siguin presents (figura 11) (Fisher and Nurse, 1996; Martin-Castellanos *et al.*, 1996). A més a més, les accions d'altres quinases i fosfatases, així com la unió d'altres proteïnes acaben de modular l'activitat de la Cdc2. Més concretament, parlarem de les quinases Wee1 i Mik1 i la fosfatasa Cdc25, degut a la seva relació amb la Srk1.

L'activitat de la Cdc2 és inhibida en fase G2 a través de la fosforilació en la Tyr15 (Gould and Nurse, 1989). Aquesta fosforilació és duta a terme per les quinases Wee1 i Mik1 (figura 12), essent Wee1 la quinasa principal (Nurse, 1975; Russell and Nurse, 1987b; Featherstone and Russell, 1991; Lundgren *et al.*, 1991; Parker and Piwnica-Worms, 1992; McGowan and Russell, 1993; Lee *et al.*, 1994). El significat d'aquesta fosforilació és evitar una activació prematura del complex Cdc2-Cdc13 que podria comportar greus problemes per a la cèl·lula. En canvi, en el moment que es necessiti que la cèl·lula avanci en el cicle, cal que la Tyr15 sigui defosforilada. Aquesta acció és duta a terme principalment per la fosfatasa Cdc25 (figura 12) (Russell and Nurse, 1986; Gould and Nurse, 1989; Gould *et al.*, 1990; Millar *et al.*, 1991; Millar *et al.*, 1992a; Kovelman and Russell, 1996).

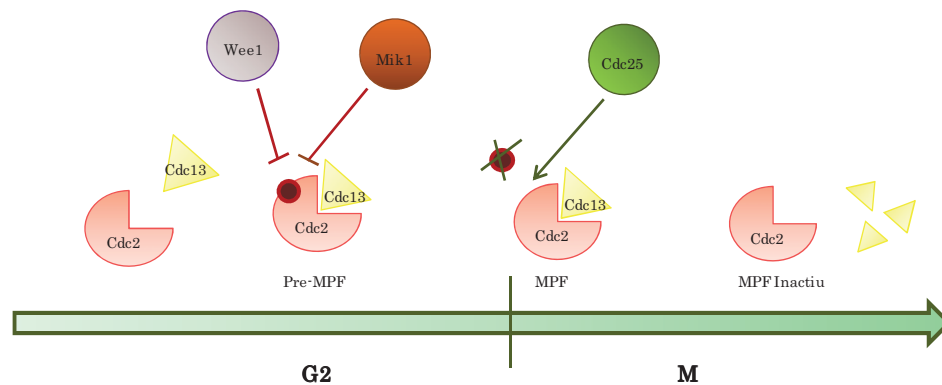


Figura 12. Regulació del complex Cdc2-Cdc13 per Wee1, Mik1 i Cdc25.

El treball realitzat al nostre grup (Lopez-Aviles *et al.*, 2005) va permetre definir el paper de la *Srk1* en el control del cycle cel·lular mitjançant la inhibició de la fosfatasa Cdc25, i per tant mantenint el complex Cdc2-Cdc13 inactiu (figura 13).

En aquest estudi es va observar que la sobreexpressió del gen *srk1* induïx una aturada en la progressió del cycle cel·lular que es manifesta fenotípicament amb l'elongació de les cèl·lules. La tinció DAPI dels nuclis i l'anàlisi de FACS van permetre establir que aquestes cèl·lules es trobaven aturades amb un sol nucli i contingut 2C de DNA, indicatiu d'una aturada en la fase G2 del cycle cel·lular. Per altra banda, la deleció del gen *srk1* provoca que les cèl·lules es divideixin amb un fenotip semi-*wee*, és a dir, entren en mitosi abans d'assolir el tamany corresponent. Per tal d'establir a través de quin substrat la *Srk1* era capaç d'aturar el cycle es van dur a terme una sèrie d'experiments genètics que van permetre concloure que la *Srk1* actuava a través de la Cdc25, inhibint-la. Això es va demostrar sobreexpressant *srk1* en els fons genètics *cdc2-3w* (insensibles a la regulació de Cdc2 per Cdc25) o *cdc2-3w Δcdc25* i observant que no tenia cap efecte. A més a més, en sobreexpressar *srk1* juntament amb *pyp3* (fosfatasa que és capaç de regular la defosforilació de Cdc2 en Tyr15) es reverteix l'aturada de cycle. Aquest fet juntament amb l'observació que la *Srk1* és capaç d'interaccionar i de fosforilar *in vitro* el domini regulador de l'extrem amino de la Cdc25, permet concloure que la *Srk1* exerceix el seu paper a través de la inhibició d'aquesta fosfatasa i per tant, la inactivació de la Cdc2.



Per altra banda, aquests resultats recordaven la regulació de cicle per part de les quinases de *checkpoint* Chk1 i Cds1, les quals fosforilen la Cdc25 per tal d'aturar el cicle fins que l'estrès s'hagi sobrepassat. Així doncs, es va voler estudiar si la Srk1 era capaç de fosforilar la Cdc25 en els mateixos residus que les quinases de *checkpoint*. Els assajos de fosforilació *in vitro* van permetre afirmar que la Srk1 actua fosforilant sinó tots, alguns dels residus que fosforilen la Chk1 i la Cds1 en Cdc25.

En el mateix estudi es va observar que la fosforilació de la Cdc25 per la Srk1 provoca una estabilització de la fosfatasa que es reflecteix en un augment de proteïna, i que aquest acúmul és dependent de la proteïna Rad24. Per altra banda s'ha observat que, un cop fosforilada per la Srk1, la Cdc25 s'acumula al citoplasma de manera que queda allunyada del seu substrat, la Cdc2, i per tant la transició G2/M resta aturada (figura 13; Lopez-Aviles *et al.*, 2005).

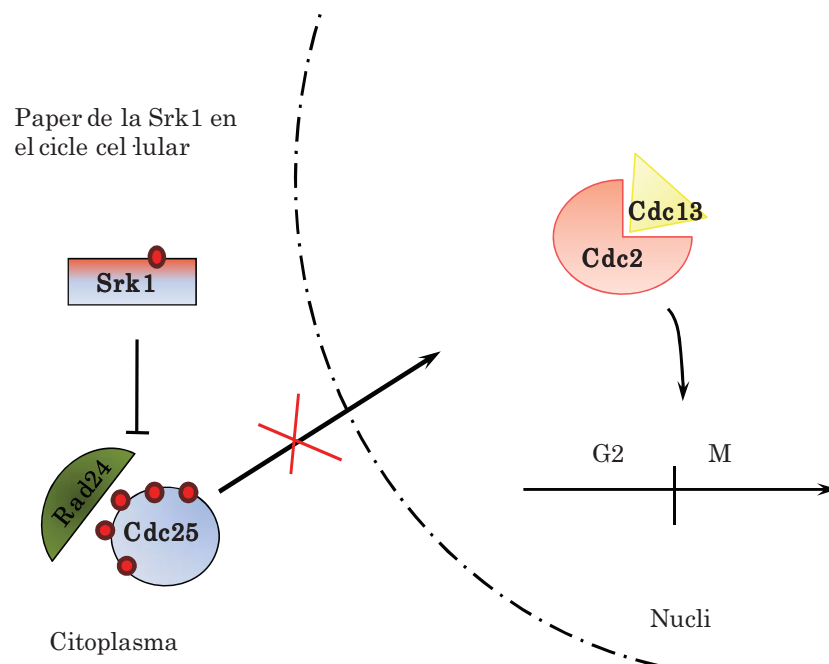


Figura 13. Paper de la Srk1 en el cicle cel·lular.



2. Paper de la *Srk1* en la resposta a estrès.

Paral·lelament als estudis realitzats sobre el paper de la *Srk1* en el control del cicle cel·lular, es va publicar un article que feia referència als primers descobriments de la relació entre aquesta quinasa i la via de la *Sty1*. Aquest treball correspon a la publicació de Smith *et al.*, 2002. Aquest grup va aïllar el gen de la *Srk1* (*Sty1 Regulated Kinase 1*) en un estudi de *microarrays* amb l'objectiu d'identificar gens amb patrons d'expressió incrementats en resposta a estrès osmòtic, oxidatiu i tèrmic de forma dependent de la MAPK *Sty1*. En el cas de la *Srk1*, es va observar que es tracta d'un gen fortament induït en resposta a un ampli espectre d'estressos de manera dependent de la *Sty1*, tal i com es mostra en la figura 14.

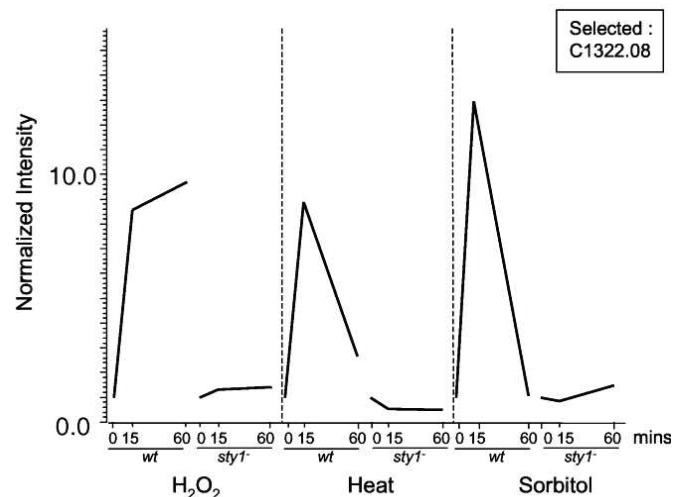


Figura 14. Perfils d'expressió gènica de *srk1* de manera dependent de la *Sty1*. Imatge extreta de Smith *et al.*, 2002.

Experiments de co-immunoprecipitació van posar de manifest que, al igual que ocorre amb la *Rck2* i *Hog1* a *S. cerevisiae*, la *Srk1* és capaç d'interaccionar amb la *Sty1* en resposta a diferents formes d'estrès ambiental (Smith *et al.*, 2002). De la mateixa manera, es va demostrar que la *Srk1* és fosforilada per la *Sty1*, igual que ocorre amb les seves homòlogues a *S. cerevisiae*.



Per tal de determinar si la *Srk1* actuava per sobre o per sota de la *Sty1* en la cascada de senyalització, es va estudiar l'efecte que tenia la sobreexpressió o deleció de *srk1* sobre l'activació i localització nuclear de la MAPK en resposta a estrès. El resultat indica que en cap dels casos es veu afectada la fosforilació o localització nuclear de la *Sty1*. En aquest mateix estudi es demostra que la deleció de *srk1* rescata parcialment la letalitat induïda per la sobreexpressió de la *Wis1*. Aquests resultats suggereixen que la *Srk1* es troba per sota de la *Sty1* en la via de les MAPK de resposta a estrès.

Pel que fa a la localització de la *Srk1* en resposta a estrès, s'ha observat que aquesta proteïna transloca al nucli i que aquest procés és dependent de la fosforilació per part de la *Sty1* (Smith *et al.*, 2002). En aquest treball es proposava que els substrats de la *Srk1* es trobessin dins el nucli però no va ser fins els descobriments duts a terme en el nostre grup (López-Avilés *et al.* 2005) que es va aclarir aquesta incògnita.

Donat que la *Srk1* interacciona amb la *Sty1* i es fosforila en resposta a estrès, era possible pensar que aquesta activació comportés la regulació de la progressió del cicle cel·lular via *Cdc25* sota aquestes condicions. Així, estudis del nostre grup van demostrar que la fosforilació de la *Srk1* per part de la *Sty1* en resposta a estrès osmòtic, indueix l'estabilització de la *Cdc25* en forma inactiva al citoplasma degut a la seva unió amb la *Rad24*. Aquest fet demostra el paper de la *Srk1* com a controladora de l'activitat de la *Cdc25* en resposta a estrès ambiental no genotòxic (López-Aviles *et al.*, 2005).

En darrer lloc, en el treball de Smith *et al.*, es proposava un paper negatiu de la *Srk1* en el desenvolupament sexual, donat que la sobreexpressió de la *Srk1* abolia el bloqueig en fase G1 en resposta a limitacions en la disponibilitat de nitrogen. Recolzant aquests resultats es mostrava que la deleció de *srk1* donava lloc a una hiperactivació del programa meiòtic. Això s'explicaria perquè en cèl·lules $\Delta srk1$ la fase G2 és més curta, fet que comporta que la fase G1 sigui més extensa de l'habitual i propiciant així la meiosi.



2.6. Regulació negativa de la via de MAPK

La senyalització a través de la via de les MAP quinases comporta l'activació de diferents mecanismes de resposta a l'estrès ambiental. Per altra banda, cal destacar que és de vital importància que un cop la font d'estrès hagi desaparegut o la cèl·lula s'hagi adaptat a ella, aquests mecanismes han de ser inactivats correctament (Shiozaki and Russell, 1995; Millar *et al.*, 1995).

Com s'ha indicat anteriorment, l'activació de la ruta implica una sèrie de fosforilacions successives que han de ser revertides per tal que la cascada torni al seu estat basal. S'han identificat diverses fosfatases implicades en aquest procés, algunes del les quals depenen de la pròpia ruta de MAPKs per a la seva expressió/activació constituint així un cicle de retroalimentació negativa de la via (Shiozaki and Russell., 1995; Millar *et al.*, 1995). En *S. pombe* existeixen principalment dos grups de fosfatases: les fosfatases que defosforilen exclusivament residus Tyr (*v.g.* Pyp1 i Pyp2) o Tyr i Thr (*v.g.* Cdc25, de la qual ja s'ha parlat anteriorment) i les fosfatases que defosforilen específicament residus Ser i Thr (Ptc1, Ptc2 i Ptc3). A continuació s'estudiaran amb més detall els dos grups.

2.6.1. Pyp1 i Pyp2

Es tracta de dues tirosina fosfatases que van ser inicialment descrites per la seva capacitat de regular negativament l'entrada en mitosi, reminiscent dels mutants de *sty1* i *wis1* (Ottillie *et al.*, 1992; Millar *et al.*, 1992b). De fet, treballs posteriors mostren com la sobreexpressió de *pyp1* provoca un bloqueig en el cicle en resposta a elevada osmolaritat. A més a més, els mutants de *pyp1* presenten una acceleració en la fase de mitosi que concorda amb el fenotip semi-*wee* d'aquestes cèl·lules. Aquestes dades, unides al fet que la deleció de *pyp1* rescata l'aturada en cicle d'un mutant de *cdc25* o, la sobreexpressió de *wee1*, van fer pensar en un paper inhibitori de la mitosi (Millar *et al.*, 1992b).

El paper de la Pyp1 i la Pyp2 en la via de senyalització de la resposta a estrès es va identificar per l'efecte que la deleció d'ambdós gens produïa sobre la Sty1. La letalitat sintètica del doble mutant podia ser suprimida mitjançant mutacions en *sty1* o en *wis1*. A més, la sobreexpressió de *wis1* produïa el mateix fenotip letal que la sobreexpressió de *pyp1* en un fons $\Delta pyp2$ excepte si es



combinava amb la mutació *sty1-1*. D'altra banda, el nivell de fosforilació de la Sty1 era superior en mutants $\Delta pyp1$. Tot això semblava indicar que el fenotip degut a la deleció de *pyp1* i *pyp2* era degut a una hiperactivació de la MAPK (Millar *et al.*, 1992b).

Posteriorment, es va descriure que les dues fosfatases s'unien a la Sty1 i la defosforilaven en la Tyr173, inactivant-la (Shiozaki and Russell., 1995; Millar *et al.*, 1995) (figura 15).

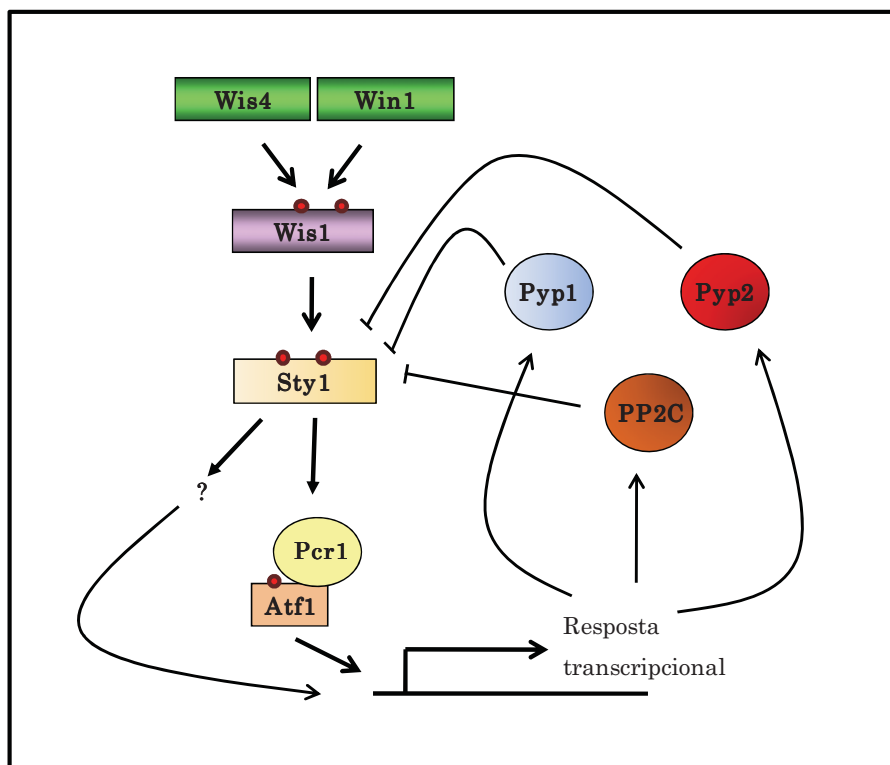


Figura 15. Inactivació de la via de resposta a estrès en *S. pombe*.

El gen de *pyp1* s'expressa de forma constitutiva a la cèl·lula i en resposta a estrès s'indueix més fortament de forma dependent de la Sty1. La Pyp2, a diferència de la Pyp1, únicament s'activa en resposta a estrès i el fet que l'expressió de *pyp2* depengui de l'activació de la Sty1 constitueix un mecanisme de retroalimentació negativa de la via (Millar *et al.*, 1995). Actualment, se sap que l'expressió de *pyp2* es veu induïda en resposta a diferents formes d'estrès, i



que ve regulada pel factor de transcripció Atf1 (Shiozaki and Russell, 1995; Chen *et al.*, 2003).

Per altra banda, cal remarcar que la Pyp1 juga un paper rellevant en la regulació de la resposta a estrès tèrmic, on actua com a moduladora fonamental de l'activitat de la Sty1 (Nguyen and Shiozaki, 1999). De fet, en aquestes condicions sembla que l'activació per fosforilació de la Wis1 no és necessària ja que si es muten els dos llocs de fosforilació per les MAPKKK l'activació de la Sty1 no es veu afectada, fet que suggereix que, sota aquestes condicions, hi ha un cert grau d'activació basal de la Wis1 que és independent de les MAPKKK (Shiozaki *et al.*, 1998). Sembla ser que l'estrès tèrmic actuaria induint principalment la inactivació de la Pyp1, que juntament amb l'activació basal de la Wis1 i l'autofosforilació de la Sty1 proporcionarien una activació transitòria que podria ser atenuada per les Ser/Thr fosfatases Ptc1 i Ptc3 (Nguyen and Shiozaki, 1999).

2.6.2. Ptc1, Ptc2 i Ptc3

Fins el moment, la defosforilació de la Tyr173 per part de la Pyp1 es considerava el major mecanisme pel qual s'inactivava la Sty1 i per tant, calia esperar que la sobreexpressió de Pyp1 disminuís els nivells de Sty1 fosforilada. En canvi, es va observar que no hi havia un augment de la defosforilació de la MAPK i això va fer pensar en l'existència d'alguna altra fosfatasa que estigués afectant a l'altre residu fosforilable del domini catalític de la MAPK, la Thr171. Així és com es va demostrar que les fosfatases Ptc1 i Ptc3, de la família de Ser/Thr fosfatases PP2C, participen també en la modulació de la resposta, defosforilant la Thr171 per tal d'atenuar l'activació de la Sty1 (Nguyen *et al.*, 1999).

Aquestes proteïnes pertanyen al grup de les Serina/Treonina fosfatases, les quals en funció de la seva especificitat de substrat, requeriment de cations divalents per a la seva activitat i sensibilitat a inhibidors es poden dividir en dues classes diferents: les de tipus 1 (PP1) i les de tipus 2 (PP2A, PP2B i PP2C) (Cohen and Cohen, 1989; Cohen *et al.*, 1990). La principal diferència entre els dos tipus de fosfatases és que les de tipus 1 defosforilen la subunitat β de la quinasa fosforilada i són inhibides per concentracions nanomolars



d'inhibidors d'aquestes fosfatases com ara l'àcid ocadàic. En canvi, les fosfatases de tipus 2 fosforilen preferentment la subunitat α de les quinases fosforilades i no es veuen afectades per l'acció dels inhibidors. Els tres enzims de tipus 2, PP2A, PP2B i PP2C difereixen en que mentre la PP2A no necessita cations divalents, PP2B i C són dependents de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ i Mg^{2+} , respectivament (Cohen and Cohen, 1989; Cohen *et al.*, 1990; Shiozaki *et al.*, 1994). A continuació, es parlarà de les fosfatases Ptc1, 2 i 3 de *S. pombe* que pertanyen a la família de les PP2C.

ptc1, *ptc2* i *ptc3* són gens codificants per a elements de la classe PP2C que és l'única que requereix magnesi per a la seva activitat i és resistent a inhibidors de fosfatases com l'àcid ocadàic. Aquesta família de fosfatases es troba altament conservada amb membres que van des de mamífers (Tamura *et al.*, 1989; Wenk *et al.*, 1992) a plantes com l'*Arabidopsis thaliana* (Leung *et al.*, 1994), passant pels llevats (Maeda *et al.*, 1993; Shiozaki *et al.*, 1994).

Les fosfatases tipus PP2C contenen característiques particulars en la seva estructura ja que es presenten com a proteïnes monomèriques a diferència de les altres tres classes que formen heteròmers amb les seves subunitats reguladores, les quals són les responsables de l'especificitat de substrat, localització cel·lular o regulació de l'activitat (Cohen and Cohen, 1989). El grup de fosfatases 2C ha estat implicat en la regulació de rutes de senyalització en diferents models. En *A. Thaliana* per exemple, l'ABI1 és necessari per a una resposta correcta a l'àcid abscísic (Leung *et al.*, 1994) mentre que PTC1 i PTC3 de *S. cerevisiae* són supressors multicòpia de mutacions de SLN1 (Maeda *et al.*, 1994; figura 4).

ptc1 va ser aïllat com a supressor multicòpia de la mutació termosensible *sw01-26* (Shiozaki *et al.*, 1994). Sw01 és una proteïna de xoc tèrmic equivalent a la Hsp90 d'eucariotes superiors i les seves mutacions indueixen un fenotip de lisi cel·lular a temperatura restrictiva (Shiozaki *et al.*, 1994). *ptc1* s'indueix en resposta a estrès tèrmic i la seva deleció provoca la mort de les cèl·lules en aquest tipus d'estrès (Shiozaki *et al.*, 1994). Totes aquestes dades suggereixen que el paper d'aquesta proteïna seria especialment rellevant



en la resposta a estrès tèrmic i que, novament, existeix un mecanisme de retroalimentació de la via a través de *ptc1* (figura 15).




El fet que Ptc1 contribuís només a una part de la regulació de l'activitat PP2C total a la cèl·lula va portar a la cerca de nous gens candidats que codifiquessin per a proteïnes d'aquesta família (Shiozaki *et al.*, 1994). Amb aquesta finalitat es van aïllar *ptc2* i *ptc3* (Shiozaki and Russell, 1995). Així com les cèl·lules $\Delta ptc1$ són sensibles a estrès tèrmic, el mutant $\Delta ptc1\Delta ptc3$ i el triple mutant $\Delta ptc1\Delta ptc2\Delta ptc3$ presenten problemes relacionats amb l'estabilitat osmòtica i el control de la forma cel·lular, que es veuen exacerbats en sotmetre les cèl·lules a elevades temperatures. Tots aquests fenotips es suprimien en presència d'estabilitzadors osmòtics i amb la mutació del gen *wis1* (Shiozaki and Russell, 1995).



Tal i com s'ha comentat durant la introducció, en el nostre grup s'ha caracteritzat la quinasa *Srk1* i el seu paper en la regulació de la transició G2/M (López-Avilés *et al.*, 2005). Tanmateix, estudis paral·lels d'*arrays* de DNA van permetre descriure que el gen *srk1* és fortament induït en resposta a un ampli espectre d'estressos de manera depenent de la *Sty1* i que la MAPK fosforila la *Srk1 in vitro* (Smith *et al.*, 2002).

Tot i aquestes evidències experimentals, resta per identificar el mecanisme molecular de la funció de la *Srk1* en resposta a estrès. Per altra banda, resultats obtinguts durant la realització d'aquesta tesi, indiquen un possible paper de la *Srk1* com a regulador negatiu de la via de les MAPKs.

Per tant, els objectius concrets d'aquesta tesi són els següents:

-  Estudi de la regulació de la *Srk1* per la MAPK *Sty1*.
-  Estudi de la funció de la *Srk1* en resposta a estrès.
-  Estudi de la regulació negativa de la via de les MAPK per la *Srk1*.

Fruit d'aquest treball s'ha publicat l'article *Activation of Srk1 by the mitogen-activated protein kinase Sty1/Spc1 precedes its dissociation from the kinase and signals its degradation*. *Mol Biol Cell*, **19**, 1670-1679; que conté els resultats de la primera part d'aquesta tesi (*Annex II*).



1. TÈCNIQUES DE MANIPULACIÓ DEL DNA

1.1. Extracció de DNA plasmídic: mini i midiprep

L'extracció de DNA plasmídic a petita escala (miniprep) es va realitzar emprant el kit NucleoSpin® Plasmid QuickPure de Macherey-Nagel seguint el protocol indicat pel fabricant. Per tal d'aïllar DNA a mitjana escala (midiprep) es va emprar el Nucleobond® Xtra Midi Plus de Macherey-Nagel seguint les indicacions del fabricant.

1.2. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

La reacció en cadena de la polimerasa permet l'amplificació de seqüències de DNA específiques mitjançant l'ús d'oligonucleòtids homòlegs a les regions flanquejants de la seqüència d'interès. La reacció estàndard de PCR consta dels següents components:

	PCR	CONTROL
DNA motlle 0,1 µg/µl	1 µl	-
Oligonucleòtid 5' 100 µM	0,5 µl	0,5 µl
Oligonucleòtid 3' 100 µM	0,5 µl	0,5 µl
dNTPs 25 mM	0,4 µl	0,4 µl
MgCl ₂ 50 mM	1,5 µl	1,5 µl
Tampó 10x	5 µl	5 µl
Polimerasa*	0,5 µl	0,5 µl
Aigua estèril	40,6 µl	41,6 µl

Taula 1. Components de la reacció de PCR.

*Polimerasa: depenent de les condicions s'han utilitzat 2 enzims diferents

- *EcoTaq DNA polymerase* d'ECOGEN (5U/µl)

- *High Fidelity* de ROCHE

Un cop preparada la reacció, aquesta se sotmet als següents cicles de temperatura en un termociclador:



- 1.- 3 min a 94°C
- 2.- 1 min a 94°C
- 3.- 1 min a 55°C
- 4.- 3 min a 72°C
- 5.- Repetir 30 vegades des del pas nº 2
- 6.- 10 min a 72°C i mantenir a 15°C

Aquestes concentracions dels diferents components, així com els cicles emprats són orientatius, podent ser modificats en funció del producte de PCR que es vol obtenir. A continuació s'indiquen algunes consideracions que cal contemplar abans de dissenyar la reacció de PCR:

▪ Oligonucleòtids: generalment han de tenir una mida d'entre 18 i 24 nt, amb un percentatge de GCs del 40-60%. És important que no tinguin una estructura secundària molt forta i que no formin dímers entre ells.

▪ Temperatura de *melting* (T_m): és la temperatura a la que els oligonucleòtids se separaren de la regió complementària. Aquesta es calcula en base a la següent fórmula:

$$T_m = [2x(\text{nombre d'As i Ts})] + [4x(\text{nombre de Cs i Gs})]$$

És important que els dos oligonucleòtids tinguin una T_m semblant, perquè aquest paràmetre és necessari per tal de dissenyar els cicles de la reacció.

▪ MgCl₂: els ions Mg²⁺ formen un complex amb els dNTPs que és el substrat que reconeix la polimerasa. Un excés de Mg²⁺ en la reacció pot conduir a un augment en la síntesi de productes inespecífics i, per contra, un dèficit d'aquest ió pot provocar que l'eficiència de la reacció sigui molt baixa.

▪ Cicles d'amplificació: el primer pas en la reacció (3 min a 94°C) permet que la polimerasa s'activi, donat que a temperatura ambient la seva activitat és molt baixa. Un cop s'ha dut a terme aquest primer pas, s'inicien els cicles d'amplificació:



- 1.- *Desnaturalització del DNA motlle*: aquest pas permet que les dues cadenes de DNA se separin per tal que siguin accessibles als oligonucleòtids i a la polimerasa.
- 2.- *Unió dels oligonucleòtids (annealing)*: per tal que es doni la unió dels oligonucleòtids a la regió complementària del motlle cal que la temperatura disminueixi. Aquesta es calcula en base a la T_m dels oligonucleòtids, essent aproximadament entre 5 i 10°C inferior a aquesta. Generalment, però, aquesta temperatura es calcula de forma empírica.
- 3.- *Extensió*: En aquest pas augmenta la temperatura fins a 72°C per tal que la polimerasa assoleixi la seva activitat màxima.

Un cop aquest cicle s'ha repetit entre 25 i 35 vegades, es deixa que la polimerasa faci una darrera extensió de la cadena durant 10 min.

1.3. Mutació puntual o PCR mutagènica

Aquesta tècnica permet la introducció de mutacions puntuals en un gen que es trobi clonat dins un vector. Amb aquesta finalitat es va emprar el kit *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* de la casa Stratagene.

Aquest mètode es basa en l'amplificació d'un plàsmid que contingui el gen que es vol mutar mitjançant uns oligonucleòtids que continguin la mutació que es vol introduir. Aquests oligonucleòtids han de ser complementaris a la mateixa regió del gen i en el seu disseny s'han de tenir en compte diverses consideracions:

- Han de tenir una mida entre 25 i 45 nt amb una T_m superior o igual a 78°C. La T_m en aquest cas es calcula amb la següent fórmula:

$$T_m = 81,5 + 0,41x(\%GC) - 675/nt \text{ totals} - \% \text{ de desaparellaments}$$



- De forma òptima els oligonucleòtids han de tenir un contingut de GCs del 40% i preferentment acabar amb aquests nucleòtids.

La reacció es prepara de la següent manera:

	PCR	CONTROL
DNA motlle	x µl (5–50 ng)	x µl (5–50 ng)
Oligonucleòtid 5'	x µl (125 ng)	-
Oligonucleòtid 3'	x µl (125 ng)	-
dNTPs	1 µl	1 µl
Tampó 10x	5 µl	5 µl
Polimerasa <i>Pfu Turbo</i> (2,5 U/ µl)	2 µl	2 µl
Aigua estèril	qsp 50 µl	qsp 50 µl

Taula 2. Components de la reacció de PCR mutagènica.

Els cicles d'amplificació emprats difereixen lleugerament dels recomanats per la casa comercial:

- 1.- 30 segons a 95°C.
- 2.- 30 segons a 95°C.
- 3.- 30 segons a 55°C.
- 4.- 4 min per Kb del plàsmid a 68°C.
- 5.- Repetir des del pas 2 de 12 a 18 vegades (12 per mutacions puntuals i 18 per deleccions o insercions d'aminoàcids).



Un cop realitzada la PCR el producte es digereix amb l'enzim DpnI. Aquest enzim digereix específicament el DNA metilat, de manera que elimina de la reacció el DNA emprat com a motlle. La reacció es llavors transformada en cèl·lules DH5α competents (apartat 4.2 *Transformació en E. coli*).

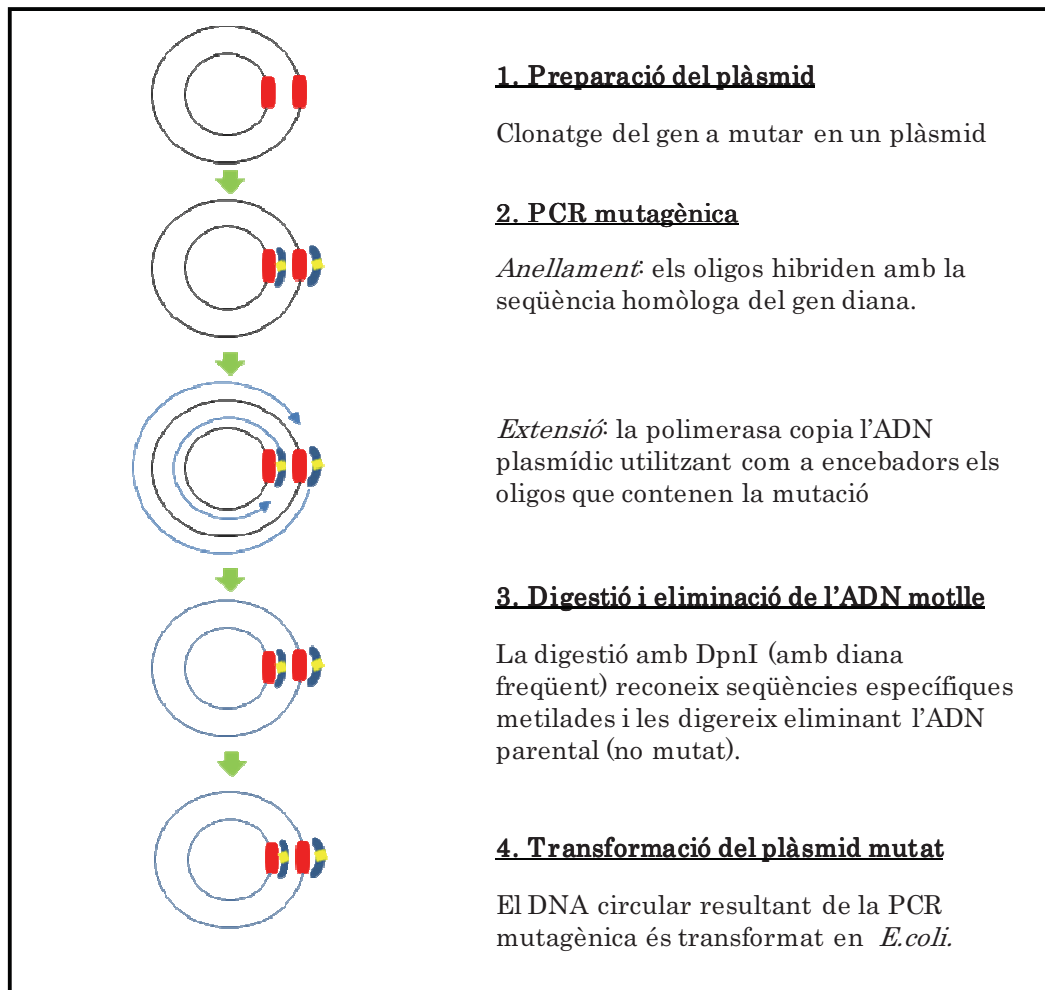


Figura 1. Diagrama esquemàtic de la PCR mutagènica.

Cal tenir en compte que el producte de PCR, tot i tenir estructura de plàsmid presenta un tall en cadascuna de les cadenes, corresponent al punt on començava cadascun dels oligonucleòtids. Per tant, el bacteri haurà de reparar aquests talls i en conseqüència l'eficiència del procés no és tan elevada com en una transformació normal. Tanmateix és molt convenient posar un control de la reacció de PCR (Taula 2). Normalment, s'acostuma a afegir una reacció amb



DNA motlle i sense oligos de manera que podrem comprovar que l'enzim DpnI hagi funcionat correctament ja que no creixeran colònies en la placa control.

Un cop obtingudes les colònies es du a terme l'extracció del DNA plasmídic (apartat 1.1 *Extracció de DNA plasmídic*) i la seqüenciació per tal de comprovar que s'ha aconseguit mutar el gen.

1.4. *Colony PCR*

Aquesta tècnica permet l'amplificació del DNA genòmic del llevat. És molt útil per tal d'amplificar un gen d'interès i clonar-lo en un vector, o per identificar les colònies on el gen d'interès ha estat substituït per un marcador mitjançant recombinació homòloga. Per altra banda, la *Colony PCR* es pot utilitzar per identificar colònies d'una tètrada que porten un reemplaçament gènic concret.

El protocol a seguir és el següent:

- Picar una colònia de placa o un pellet provinent d'un cultiu líquid amb una punta de pipeta estèril (evitar l'ús d'escuradents de fusta ja que poden interferir amb l'alliberament del DNA de les cèl·lules de llevat o amb la mateixa reacció de PCR).
- Ressuspendre les cèl·lules de la punta estèril en 10 µl de solució de zimoliasa(*) per aconseguir esferoplasts.
- Incubar 15 minuts a 37°C.
- Utilitzar 2 µl dels esferoplasts per una reacció de PCR de 50 µl.



PCR	
DNA motlle	2 µl
Oligonucleòtid 5' 100 µM	0,5 µl
Oligonucleòtid 3' 100 µM	0,5 µl
dNTPs 25 mM	0,4 µl
MgCl₂ 50 mM	1,5 µl
Tampó 10x	5 µl
<i>EcoTaq polymerase</i>	0,5 µl
Aigua estèril	39,6 µl

Taula 3. Components de la reacció de *Colony PCR*.

*Solució de Zimoliasa:

2,5 mg/ml de *Zymolyase 20T*

1.2 M Sorbitol

0,1 M fosfat de sodi, pH 7,4

Les alíquotes de solució de zimoliasa poden emmagatzemar-se a -20°C durant 6 mesos.

1.5. Digestió del DNA mitjançant enzims de restricció

La digestió del DNA mitjançant enzims de restricció permet obtenir fragments que podran ser posteriorment emprats en reaccions de lligació per tal de clonar un gen en un plàsmid. D'altra banda, les reaccions de digestió també s'utilitzen per tal de comprovar construccions, donat que en funció de si un plàsmid conté un insert o no, el patró de restricció que s'obtindrà serà diferent.

En la realització d'aquesta tesi s'han utilitzat principalment enzims de la casa comercial Invitrogen.

En termes generals, les reaccions s'han dut a terme seguint les següents proporcions:



DNA (0,1 µg/µl)	5 µl
Tampó 10x	2 µl
Enzim	1 µl
Aigua estèril	12 µl

La reacció s'incuba a la temperatura que indica la casa comercial (generalment a 37°C) durant un temps aproximat de 2-3 h. Alguns enzims tenen activitat durant períodes més llargs de temps i es poden incubar tota la nit.

Quan s'han de realitzar digestions amb més d'un enzim, es poden utilitzar conjuntament, sempre i quan els dos enzims requereixin el mateix tampó o els dos tampons siguin compatibles. En aquest cas les proporcions utilitzades són les següents:

DNA (0,1 µg/µl)	5 µl
Tampó 10x	2 µl
Enzim n ^o 1	0,8 µl
Enzim n ^o 2	0,8 µl
Aigua estèril	11,4 µl

Si pel contrari, els tampons d'ambdós enzims no fossin compatibles caldria purificar el producte de la primera digestió abans de realitzar la segona (apartat 1.7 *Purificació de fragments de DNA*).

1.6. Lligació de fragments de DNA

Aquesta tècnica permet unir fragments de DNA sempre que els extrems siguin compatibles, bé perquè han estat digerits amb el mateix enzim de restricció o bé perquè presentin extrems roms. D'aquesta manera es poden clonar gens o fragments de gens en diferents plàsmids.



Per tal de facilitar la reacció és important que la quantitat de molècules d'insert present sigui tres vegades superior a la quantitat de molècules de plàsmid. Aquesta proporció es calcula tenint en compte la concentració de cada mostra però també considerant la mida del fragment respecte el plàsmid.

La reacció es realitza de la següent manera:

	LLIGACIÓ	CONTROL
Plàsmid	x μ l	x μ l
Insert	y μ l	-
Tampó 5x	3 μ l	3 μ l
Lligasa*	1 μ l	1 μ l
Aigua estèril	11-x-y μ l	11-x μ l

Taula 4. Components de la reacció de lligació.

* *T4 DNA ligase* d'Invitrogen

Les reaccions s'incuben durant un mínim de 6h a 16°C, i els productes es transformen en cèl·lules DH5 α competents (apartat 4.2 *Transformació en E. coli*).

1.7. Purificació de fragments de DNA

Per tal de purificar productes de PCR o bandes de DNA a partir de gels d'agarosa s'ha fet servir el kit NucleoSpin®Extract de la casa Macherey-Nagel seguint les indicacions del fabricant.

1.8. Electroforesi de DNA en gel d'agarosa

Aquesta tècnica permet la separació de molècules de DNA en funció del seu pes molecular. En aquesta tesi s'ha emprat l'electroforesi de DNA en gel d'agarosa a l'1% per tal de visualitzar els productes de PCR, analitzar patrons de



restricció o comprovar el rendiment d'un procés d'extracció de DNA plasmídic. Aquests gels es preparen en tampó TAE (Tris-Acetata 40 mM, EDTA 1 mM) on es dissol l'agarosa sòlida (1 g per 100 ml). La barreja s'ha d'escalfar per tal que l'agarosa es dissolgui completament. Un cop s'ha refredat, s'afegeix bromur d'etidi a una concentració final de 0,5 µg/ml i s'aboca en una cubeta fins que s'ha solidificat.

Les mostres preparades amb tampó de mostra 6x (GeneRuler™) es carreguen en el gel (submergit en TAE) i es sotmeten a un voltatge de 50-100 V. El DNA té càrrega negativa de manera que en aplicar el camp elèctric es desplaçarà cap a l'ànode (pol positiu). Donat que l'agarosa forma un entramat que dificulta el pas de les molècules a través del gel, les mostres avancen més fàcilment com més petites són. D'aquesta manera, aquest gel permet separar els diferents fragments de DNA en funció de la seva mida.

El bromur d'etidi s'intercala en l'ADN i permet visualitzar els diferents fragments en irradiar el gel amb llum UV. Com a referència s'ha utilitzat el marcador de pes molecular *1Kb DNA ladder*, de GeneRuler™.

1.9. Plàsmids emprats

En la següent taula es recullen els plàsmids utilitzats durant la realització d'aquesta tesi doctoral.

Plàsmid	Dianes d'inserció	Procedència
pGEX-KG-<i>srk1</i>	NdeI-NotI	Estoc laboratori
pGEX-KG-<i>srk1K153A</i>	NdeI-NotI	Estoc laboratori
pGEX-KG-<i>sty1</i>	NdeI-NotI	Dra. E. Hidalgo
pGEX-KG-<i>sty1KA</i>	NdeI-NotI	Dra. E. Hidalgo
pGEX-KG-<i>atf1</i>	NdeI-NotI	Dr. J. Millar



pGEX-KG-<i>cdc25II</i>⁵⁶⁻¹⁴⁵	NdeI-NotI	Estoc laboratorí
pGEX-KG-<i>srk1</i>^{Δ30-420}	NdeI-NotI	Estoc laboratorí
pGEX-KG-<i>srk1</i>¹⁻⁴⁰³-KA	NdeI-NotI	Estoc laboratorí
pGEX-KG-<i>srk1KA-T463A</i>	NdeI-NotI	El present treball
pGEX-KG-<i>srk1KA-T463D</i>	NdeI-NotI	El present treball
pINV1-<i>sty1.HA</i>	NdeI-NotI	Estoc laboratorí
pINV1-<i>sty1.HA-DEGRON</i>	NdeI-NotI	Estoc laboratorí
pREP41-<i>srk1-HA</i>	NdeI-NotI	El present treball
pREP41-<i>srk1-T463A-HA</i>	NdeI-NotI	El present treball
pREP41-<i>srk1-T463D-HA</i>	NdeI-NotI	El present treball
pREP1-<i>srk1-HA</i>	NdeI-NotI	Estoc laboratorí
pREP1-<i>srk1-K153A-HA</i>	NdeI-NotI	Estoc laboratorí
pGEX-KG-<i>wis1</i>	NdeI-NotI	El present treball
pGEX-KG-<i>wis1-5A</i>	NdeI-NotI	El present treball
pGEX-KG-<i>wis1-T225E/S226D</i>	NdeI-NotI	El present treball
pGEX-KG-<i>wis1-K349R</i>	NdeI-NotI	El present treball
pGEX-KG-<i>wis1-4A-K349R</i>	NdeI-NotI	El present treball
pGEX-KG-<i>wis1-5A-K349R</i>	NdeI-NotI	El present treball

Taula 5. Plàsmids emprats en aquest treball.



1.10. Oligonucleòtids emprats

En la següent taula es recullen els oligonucleòtids utilitzats durant la realització d'aquesta tesi doctoral.

Oligonucleòtid	Seqüència	Objectiu
Srk1 fwd	5'CACACACATATGCGTTTTAAAAGTATTCAGCAAAATATCGAGGA3'	Oligos per clonar els gens <i>srk1</i> , <i>srk1T463A</i> i <i>srk1T463D</i> en els plàsmids pGEX i pREP41 amb les dianes NdeI i NotI
Srk1 rev	5'CACACAGCGGCCGCGCCACTTTTTGTCTGATGTCGACGATTATAC3'	
Srk1-T463A 5'	5'GTTTCAGCCGCTCGTGCTCCTGGTGTAACT3'	Oligos per mutar la Thr463 del gen <i>srk1</i> a Ala. En vermell la mutació puntual.
Srk1-T463A 3'	5'GTTAACACCAGGAGCACGAGCGGCTGATAC3'	
Srk1-T463D 5'	5'CGGTTTCAGCCGCTCGTGATCCTGGTGTAACTCG3'	Oligos per mutar la Thr463 del gen <i>srk1</i> a Asp. En vermell la mutació puntual.
Srk1-T463D 3'	5'CGAGTTAACACCAGGATCACGAGCGGCTGAACCG3'	
Wis1-K349R 5'	5'GGTGTCACCTATGGCCTTGCGCGAAATTAAGTTGTCC3'	Oligos per mutar la K349 del gen <i>wis1</i> a Arg. En vermell la mutació puntual.
Wis1-K349R 3'	5'GGACAACCTAATTTTCGCGCAAGGCCATAGTGACACC3'	
Wis1-S17A fwd	5'CGCGCGCATATGTCTTCTCCAAATAATCAACCCTTGCTTGCTCATTGAGACAGCTGGCTATTTCTCCTACCGCACCTCCCGG3'	Oligos per mutar la S17 del gen <i>wis1</i> a Ala amb les dianes NdeI i NotI . En vermell la mutació puntual.
Wis1 rev	5'GGCGCTCTTAAAGAGAAAGGTGAAAAAAGAAAGCTGCGGCCGCGCG3'	
Wis1-S96A fwd	5'GCCTACGGTCAGACTTGGCAGATCTACGGCCAGTCGGAGTCGTAACCTCTTAACTCTGAC3'	Oligos per mutar la S96 del



Wis1-S96A rev	5'GTCAAGGTTAAGAGAGTTACGACTCCGA CT GGCC GTAGATCTGCCAAGTCTGACCG TAGGC3'	gen <i>wis1</i> a Ala. En vermell la mutació puntual.
Wis1-S159A fwd	5'GGCCTTCCATGCATCTAGATCAAAA GCA ATGCCGGAAGTAGTCAACAAGATCAG3'	Oligos per mutar la S159 del gen <i>wis1</i> a Ala. En vermell la mutació puntual.
Wis1-S159A rev	5'CTGATCTTGTTGACTACTTCCGGCATT C G TTTTGATCTAGATGCATGGAAGGCC3'	
Wis1-T225A fwd	5'GGAATCCTTTACTCAACCGTCCA GCGTC CTTCAATCGACAAAACGAGAATCCGTCG3'	Oligos per mutar la T225 del gen <i>wis1</i> a Ala. En vermell la mutació puntual.
Wis1-T225A rev	5'CGACGGATTCTCGTTTGTCGATTGAAGG ACGCT GGACGGTTGAGTAAAGGATTCC3'	
Wis1-S226A fwd	5'GGAATCCTTTACTCAACCGTCCAAC GGC C TTCAATCGACAAAACGAGAATCCGTCG3'	Oligos per mutar la S226 del gen <i>wis1</i> a Ala. En vermell la mutació puntual.
Wis1-S226A rev	5'CGACGGATTCTCGTTTGTCGATTGAA GG CC GTTGGACGGTTGAGTAAAGGATTCC3'	
Wis1-T225E fwd	5'GGAATCCTTTACTCAACCGTCCA GAGTC CTTCAATCGACAAAACGAGAATCCGTCG3'	Oligos per mutar la T225 del gen <i>wis1</i> a Glu
Wis1-T225E rev	5'CGACGGATTCTCGTTTGTCGATTGAAGG ACTCT GGACGGTTGAGTAAAGGATTCC3'	
Wis1-S226D fwd	5'GGAATCCTTTACTCAACCGTCCAAC GA T TTCAATCGACAAAACGAGAATCCGTCG3'	Oligos per mutar la S226 del gen <i>wis1</i> a Asp
Wis1-S226D rev	5'CGACGGATTCTCGTTTGTCGATTGAA AT CC GTTGGACGGTTGAGTAAAGGATTCC3'	

Taula 6. Oligonucleòtids emprats en aquest treball.



2. OBTENCIÓ DE LES SOQUES EMPRADES

Les soques emprades en la realització d'aquesta tesi i els seus genotips es recullen en la taula 7 a continuació. Les soques que utilitzem al laboratori contenen mutacions en els gens *ura4* i *leu2* de manera que es poden transformar amb plàsmids que continguin aquests marcadors i seleccionar-les segons la seva auxotrofia. Aquesta característica permet que es puguin dur a terme manipulacions genètiques com les integracions i les delecions que s'exposaran a continuació.

Soca	Genotip	Procedència
Wt (RA0104)	<i>h- leu1-32 ura4-D18</i>	Estoc laboratori
Δsty1 (JM1160)	<i>h- sty1::ura4+ leu1-32 ura4-D18</i>	J. Millar
Δwis1 (RA0770)	<i>h- wis1::ura4+ leu1-32 ura4-D18</i>	Estoc laboratori
Δsrk1 (RA1102)	<i>h- srk1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Estoc laboratori
Δatf1 (RA0772)	<i>h- atf1::ura4+ leu1-32 ura4-D18</i>	Estoc laboratori
Δsrk1 Δatf1 (RA1449)	<i>h- srk1::kanMX6 atf1::ura4+ leu1-32 ura4-D18</i>	Estoc laboratori
srk1-HA (RA1380)	<i>h- srk1-HA::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Estoc laboratori
srk1-HA Δsty1 (RA1648)	<i>h- srk1-HA::kanMX6 sty1::ura4+ leu1-32 ura4-D18</i>	El present treball
srk1-T463A-HA (RA1737)	<i>h- srk1-T463A-HA::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	El present treball
srk1-T463D-HA (RA1715)	<i>h- srk1-T463D-HA::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	El present treball
cdc25-GFP (KGY4337)	<i>h- cdc25-GFP:Kan^R ura4-D18 ade6-M210 leu1-32</i>	Dra. K. Gould
cdc25-GFP Δsrk1 (RA1726)	<i>h- cdc25-GFP:Kan^R srk1::ura4+ ura4-D18 ade6-M210 leu1-32</i>	El present treball



<i>cdc25-9A</i> (S1299)	<i>h+ cdc25-9A leu1-32</i>	Dr. San-Segundo i Dra. Piwnica- Worms
<i>nmt82::srk1-K153A-HA</i> (RA1928)	<i>h- nmt82::srk1KA-HA::ura4+</i> <i>srk1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	El present treball
<i>pyp1-12myc</i> (RA1843)	<i>h- pyp1-12myc::ura4+ leu1-32 ura4-D18</i>	Dr. P. Russell
<i>pyp1-12myc Δsrk1</i> (RA1920)	<i>h- pyp1-12myc::ura4+ srk1::kanMX6</i> <i>leu1-32 ura4-D18</i>	El present treball
<i>pyp2-12myc</i> (RA1844)	<i>h- pyp2-12myc::ura4+ leu1-32 ura4-D18</i>	Dr. P. Russell
<i>pyp2-12myc Δsrk1</i> (RA1922)	<i>h- pyp2-12myc::ura4+ srk1::kanMX6</i> <i>leu1-32 ura4-D18</i>	El present treball
<i>pyp1-12myc Δwis1</i> (RA2003)	<i>h- pyp1-12myc::ura4+ wis1::kanMX6</i> <i>leu1-32 ura4-D18</i>	El present treball
<i>pyp2-12myc Δwis1</i> (RA2004)	<i>h- pyp2-12myc::ura4+ wis1::kanMX6</i> <i>leu1-32 ura4-D18</i>	El present treball
<i>Δpyp1</i> (RA1423)	<i>h+ pyp1::leu2 leu1-32 ura4-D18</i>	Dr. J. Millar
<i>Δpyp2</i> (RA1424)	<i>h+ pyp2::leu2 leu1-32 ura4-D18 ade6-</i> <i>704</i>	Dr. J. Millar
<i>Δpyp1 Δsrk1</i> (RA1866)	<i>h- pyp1::ura4+ srk1::kanMX6 leu1-32</i> <i>ura4-D18</i>	El present treball
<i>Δpyp2 Δsrk1</i> (RA1919)	<i>h- pyp2::ura4+ srk1::kanMX6 leu1-32</i> <i>ura4-D18</i>	El present treball
<i>Δwis1 kan</i> (RA1973)	<i>h+ wis1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Estoc laboratori
<i>wis1-12myc</i> (RA1425)	<i>h- wis1-12myc::ura4+ leu1-32 ura4-D18</i>	Dr. P. Russell
<i>wis1-12myc Δsrk1</i> (RA1563)	<i>h- wis1-12myc::ura4+ srk1::kanMX6</i> <i>leu1-32 ura4-D18</i>	El present treball



<i>sty1-HA (RA0705)</i>	<i>h- sty1-HA::ura4⁺ leu1-32 ura4-D18</i>	Dr. J. Millar
<i>sty1-HA Δsrk1 (RA1362)</i>	<i>h- sty1-6His-HA::ura srk1::kanMX6 leu1-32 ura4-D18</i>	Estoc laboratori

Taula 7. Soques emprades en aquest treball.

2.1. Integració d'epítops:

Aquesta tècnica permet detectar la proteïna endògena sense haver d'utilitzar un anticòs específic dirigit contra la proteïna.

La integració d'epítops a continuació del gen endogen es pot aconseguir mitjançant un procés de recombinació homòloga. En les cèl·lules de *S. pombe* aquest tipus de recombinació es dona amb una freqüència força elevada. Així, en transformar un plàsmid que contingui una seqüència de replicació autònoma, el 0,1% de les colònies obtingudes hauran integrat el plàsmid en la zona homòloga del genoma. Aquesta freqüència de recombinació es pot augmentar si es realitza un tall amb un enzim de restricció en la zona d'interès del plàsmid.

Així, la integració d'epítops es pot dur a terme mitjançant dos mètodes que s'explicaran a continuació:

2.1.1. Integració d'epítops mitjançant el plàsmid pRIP2:

En primer lloc cal clonar el gen d'interès en el plàsmid pRIP2 (que no conté seqüència de replicació autònoma, ARS). A continuació, es digereix amb l'enzim PstI i un enzim que talli la seqüència del gen. D'aquesta manera s'elimina el promotor *nmt* del plàsmid i part de la seqüència amino-terminal del gen. Aquest fragment lineal restant es purifica i es transforma en la soca desitjada, seguint el protocol de transformació amb acetat de liti que s'exposarà més endavant (apartat 4.1 *Transformació en S. pombe*). Per últim, se sembren les cèl·lules en plaques de medi selectiu, considerant que el plàsmid pRIP2 conté una còpia del gen *ura4⁺*.

Per tal de descartar que la integració del plàsmid no sigui estable, les colònies obtingudes es repliquen en medi ric (no selectiu) tres vegades. Si el



plàsmid no s'ha integrat en el genoma, es perdrà en absència de selecció. Finalment, les colònies es tornen a fer créixer en medi selectiu per detectar les colònies que han integrat el plàsmid de forma estable.

2.1.2. Integració d'epítops mitjançant productes de PCR:

Alternativament, la integració d'epítops també es pot dur a terme mitjançant la transformació d'un fragment de PCR que contingui un marcador de selecció com ara el gen *ura4⁺* o el gen de resistència a la kanamicina (*kan*).

El fragment de PCR s'obté emprant com a motlle els plàsmids pFA6a-kanMX6 descrits per Bahler *et al.* (Bahler *et al.*, 1998a). Els oligonucleòtids que s'utilitzen han de tenir una mida d'aproximadament 100nt, i es dissenyen de la següent manera:

- Oligonucleòtid 5': ~80 nt corresponents a la seqüència final del gen sense el codó de parada, seguits de ~20 nt corresponents al plàsmid de la kanamicina.
 - Oligonucleòtid 3': ~80 nt corresponents a una regió del terminador del gen allunyada aproximadament 80-200 nt del codó de parada, seguits de ~20 nt corresponents al plàsmid de la kanamicina.
- Aquests oligonucleòtids han d'haver estat purificats per HPLC.

La reacció de PCR es du a terme com s'indica a continuació:

Oligonucleòtid 5' 100 µM.....	0,5 µl
Oligonucleòtid 3' 100 µM.....	0,5 µl
DNA motlle 0,1 µg/µl.....	1 µl
Tampó 10x.....	5 µl
MgCl ₂ 50 mM.....	1,5 µl
dNTPs 25 mM.....	0,4µl
Polimerasa.....	1µl
Aigua estèril.....	41,1µl



- 1.- 3 min a 94°C
- 2.- 1 min a 94°C
- 3.- 1 min a 55°C
- 4.- 2 min a 72°C
- 5.- Repetir 35 vegades des del pas 2
- 6.- 10 min a 72°C
- 7.- Mantenir a 15°C

El producte de PCR es purifica i es transforma en la soca triada segons el protocol de transformació amb acetat de liti.

A diferència del mètode anterior, en aquest cas les cèl·lules es plaquegen en medi ric (YES) i és a l'endemà, un cop han crescut, que es fa una rèplica en medi selectiu (YES suplementat amb geneticina 100 µg/ml per la resistència a kanamicina o EMM-LHA per gens amb *ura4⁺*). De nou, per tal de seleccionar només aquells transformants estables, les colònies es repliquen durant tres dies en medi YES i a continuació es fa una rèplica en medi selectiu.

2.2. Deleció de gens:

De la mateixa manera que es poden integrar epítops, la recombinació homòloga també permet deleccionar gens. La deleció de gens és útil perquè permet analitzar la funció d'una proteïna en observar l'efecte que produeix la seva pèrdua. Aquesta es pot dur a terme mitjançant l'ús de fragments de PCR com en el cas anterior, utilitzant com a motlle els plàsmids pFA6a-kanMX6.

En aquest cas, els oligonucleòtids emprats hauran de dissenyar-se atenent a les següents consideracions:

- Oligonucleòtid 5': ~80 nt corresponents a una regió situada immediatament abans de l'origen de transcripció seguits de 20 nt corresponents al plàsmid.



- Oligonucleòtid 3': ~80 nt corresponents a una regió situada immediatament després del codó de parada seguits de 20 nt corresponents al plàsmid.

La reacció es du a terme com en el cas de les integracions. Un cop obtingut el fragment de PCR el procediment que es segueix és el mateix que en el cas de la integració d'epítops mitjançant fragments de PCR. Aquest mètode és el més emprat en l'actualitat, però alternativament els gens es poden disruptar mitjançant la introducció del gen *ura4*⁺ en el marc de lectura del gen i la transformació d'aquest fragment en la soca.

2.3. Creuaments genètics:

Aquesta tècnica permet obtenir dobles mutants a partir dels mutants senzills, mitjançant un procés de conjugació. És necessari per tant que les dues soques tinguin un tipus d'aparellament diferent (h^+ o h^-) i que cadascuna de les mutacions porti un marcador diferent (*v.g.* *ura4*⁺, resistència a kanamicina, ...).

Durant la conjugació de les dues soques, bé per un procés de recombinació homòloga o bé per l'orientació aleatòria dels cromosomes en la placa metafàsica s'obtenen espores que poden contenir les dues mutacions. El procediment que s'utilitza és el següent:

- Barrejar 20 μ l dels cultius exponencials de cadascuna de les soques, formant una gota en una placa de ME.
- Incubar a 25°C durant 3 dies i observar la presència d'ascos zigòtics a la placa (figura 2). Aquests es distingeixen dels ascos azigòtics perquè presenten una aparença corbada, en contraposició als azigòtics, que són rectes.

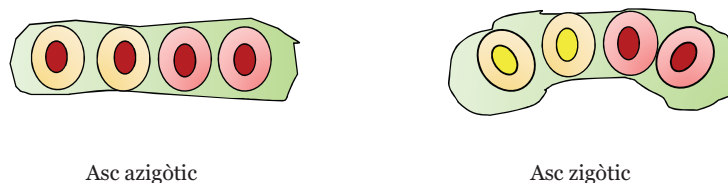


Figura 2. Dibuix esquemàtic dels ascos zigòtics i azigòtics de *S. pombe*.



- Digerir els ascx per alliberar les espores mitjançant l'addició de 5 µl de Glusulasa (barreja de glucuronidasa i sulfatasa provinent del cargol *Helix pomatia*, de Perkin-Elmer) a 1 ml d'aigua estèril on prèviament s'han resuspès les cèl·lules. Incubar un mínim de 12 h a temperatura ambient (o/n a 25°C en agitació).
- Sembrar les espores en plaques de YES per facilitar el seu creixement i posteriorment fer rèpliques de les colònies obtingudes en plaques de medi selectiu.

3. MEDIS I CONDICIONS DE CULTIU

3.1. Medis i condicions de cultiu de *Schizosaccharomyces pombe*

Les soques de *S. pombe* es van fer créixer a 30°C excepte en el cas de les soques termosensibles que es van cultivar a 25°C.

Els medis que es van emprar (elaborats segons Moreno *et al.*, 1991) es recullen en la següent taula:

MEDI	COMPOSICIÓ
YES (medi ric utilitzat pel creixement vegetatiu)	<ul style="list-style-type: none"> - 0,5%(w/v) extracte de llevat. - 3,0%(w/v) glucosa. - 225 mg/l dels aminoàcids L-adenina, L-histidina, L-leucina, L-lisina i uracil en forma d'hidroclorur.
EMM (medi mínim emprat per seleccionar les soques segons la seva auxotrofia)	<ul style="list-style-type: none"> - 3 g/l hidrogen-ftalat de potassi. - 2,2 g/l Na₂HPO₄. - 5 g/l NH₄Cl. - 2% glucosa. - 20 ml/l sals*. - 1 ml/l vitamines**. - 0,1 ml/l minerals***.



ME (medi emprat per a la conjugació de soques de diferent tipus sexual)	<ul style="list-style-type: none"> - 3% extracte <i>bacto-malt</i>. - 225 mg/l dels aminoàcids L-adenina, L-histidina, L-leucina i uracil en forma d'hidroclorur. - pH 5,5 (ajustat amb NaOH). 				
<p>NOTA: L'EMM es va suplementar amb 225 mg/l dels aminoàcids essencials L-adenina, L-histidina, L-leucina o uracil segons l'auxotrofia de la soca que es volia seleccionar.</p> <table border="0" data-bbox="225 728 1388 1344"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> <p>*Estoc 50x:</p> <p>52,5 g/l MgCl₂·6H₂O</p> <p>0,735 g/l CaCl₂·2H₂O</p> <p>50 g/l KCl</p> <p>2 g/l Na₂SO₄</p> </td> <td style="vertical-align: top; padding-left: 20px;"> <p>**Estoc 1000x:</p> <p>1 g/l àcid pantotènic</p> <p>10 g/l àcid nicotínic</p> <p>10 g/l inositol</p> <p>10 mg/l biotina</p> </td> <td style="vertical-align: top; padding-left: 20px;"> <p>***Estoc 10000x:</p> <p>5 g/l àcid bòric</p> <p>4 g/l MnSO₄</p> <p>4 g/l ZnSO₄·7H₂O</p> <p>2 g/l FeCl₂·6H₂O</p> <p>0,4 g/l àcid molíbdic</p> <p>1 g/l KI</p> <p>0,4 g/l CuSO₄·5H₂O</p> <p>10 g/l àcid cítric</p> </td> </tr> </table> <p>En tots els casos, el medi sòlid es va obtenir per addició de 20 g/l d'agar.</p> <p>Per les plaques d'estrès osmòtic s'han emprat les següents concentracions 0,6 i 0,8 M KCl.</p>			<p>*Estoc 50x:</p> <p>52,5 g/l MgCl₂·6H₂O</p> <p>0,735 g/l CaCl₂·2H₂O</p> <p>50 g/l KCl</p> <p>2 g/l Na₂SO₄</p>	<p>**Estoc 1000x:</p> <p>1 g/l àcid pantotènic</p> <p>10 g/l àcid nicotínic</p> <p>10 g/l inositol</p> <p>10 mg/l biotina</p>	<p>***Estoc 10000x:</p> <p>5 g/l àcid bòric</p> <p>4 g/l MnSO₄</p> <p>4 g/l ZnSO₄·7H₂O</p> <p>2 g/l FeCl₂·6H₂O</p> <p>0,4 g/l àcid molíbdic</p> <p>1 g/l KI</p> <p>0,4 g/l CuSO₄·5H₂O</p> <p>10 g/l àcid cítric</p>
<p>*Estoc 50x:</p> <p>52,5 g/l MgCl₂·6H₂O</p> <p>0,735 g/l CaCl₂·2H₂O</p> <p>50 g/l KCl</p> <p>2 g/l Na₂SO₄</p>	<p>**Estoc 1000x:</p> <p>1 g/l àcid pantotènic</p> <p>10 g/l àcid nicotínic</p> <p>10 g/l inositol</p> <p>10 mg/l biotina</p>	<p>***Estoc 10000x:</p> <p>5 g/l àcid bòric</p> <p>4 g/l MnSO₄</p> <p>4 g/l ZnSO₄·7H₂O</p> <p>2 g/l FeCl₂·6H₂O</p> <p>0,4 g/l àcid molíbdic</p> <p>1 g/l KI</p> <p>0,4 g/l CuSO₄·5H₂O</p> <p>10 g/l àcid cítric</p>			

Taula 8. Medis de cultiu de *S. pombe* emprats en aquest treball.

3.1.1. Inducció de promotors *nmt1*

Els experiments de sobreexpressió van ser duts a terme mitjançant l'ús de plàsmids de tipus pREP. Aquests deriven del plàsmid pUC i contenen promotors de tipus *nmt* (*no message thiamine*). Aquests promotors són reprimits per la presència de tiamina (Vit B1) en el medi de cultiu (5mM). Per contra, en absència d'aquesta s'indueix l'expressió dels gens sota el control del promotor (Maundrell,



1990; Maundrell, 1993). Existeixen diferents versions del promotor *nmt* (*nmt1*, *nmt41* i *nmt81*) que difereixen en la seva potència d'inducció, essent el més fort el *nmt1*, seguit del *nmt41* i el *nmt81* (Basi *et al.*, 1993).

En termes generals, el procediment seguit va ser el següent:

- Inocular la soca en medi mínim suplementat amb els aminoàcids necessaris i tiamina (5 mM) per tal de mantenir el promotor reprimat.
- Fer créixer les cèl·lules fins a assolir una densitat òptica a 600 nm de 0,5-1, indicativa de que les cèl·lules es troben en fase exponencial del creixement.
- Diluir el cultiu en medi amb tiamina (cultiu control) i sense tiamina considerant que ha d'estar en fase exponencial un cop transcorregudes les hores de sobreexpressió desitjades. Cal tenir en compte que petites restes de tiamina procedents del cultiu inicial poden afectar l'expressió del gen. Es recomana, per tant, rentar les cèl·lules amb aigua estèril abans de dur a terme la inducció.

3.1.2. Mètodes de sincronització

La major part de cèl·lules d'un cultiu asincrònic de *S. pombe* es troben en fase G2, ja que aquesta és la més llarga del cicle cel·lular. Per tal de sincronitzar cultius en una mateixa fase del cicle existeixen diferents mètodes que s'exposen a continuació:

3.1.2.1. Elutriació

Aquest mètode és considerat el d'elecció per a la sincronització de cultius donat que no implica l'addició de drogues ni l'ús de mutants termosensibles que podrien alterar el resultat de l'experiment. L'elutriació es basa en el principi que les cèl·lules de cada fase concreta del cicle presenten una mida diferent, essent les més petites aquelles que es troben a l'inici de la fase G2. Considerant això, el mètode consisteix en la separació diferencial de cèl·lules en funció de la seva mida mitjançant l'aplicació de dues forces de signe contrari. Breument, un cultiu exponencial de *S. pombe* és introduït dins el rotor JE-5.0 d'una centrífuga Beckman J6 mitjançant una bomba de flux la força del qual podem controlar. Degut a la força centrífuga, les cèl·lules es dipositen a la base del rotor, atenent a



la seva mida (les més grans a la part més baixa i les més petites a la part superior). Mentre la força del flux aplicat no superi la força centrífuga, la situació es mantindrà així, però, en el moment en que es comenci a augmentar el flux, les cèl·lules més petites (aquelles que es trobaven a la part superior del cultiu) poden ser arrossegades i extretes del rotor. Aquestes cèl·lules (que per la seva mida es troben al principi de fase G2) són llavors recollides en medi fresc, on proliferaran de forma sincrònica (fig. 3).

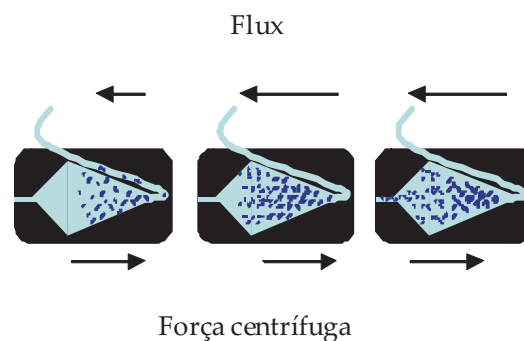


Fig3. Esquema de funcionament d'un elutriador.

La població que es recupera amb aquest mètode és aproximadament un 5% de la inicial i s'ha de tenir en compte a l'hora de calcular la mida del cultiu de partida.

3.1.2.2. Mutant termosensible *cdc25-22*

La sincronització amb el mutant termosensible *cdc25-22* es caracteritza per la inactivació de la fosfatasa Cdc25 a la temperatura restrictiva de 36°C. Aquest canvi provoca una inhibició de la transició G2/M i un bloqueig en la fase G2 presentant les cèl·lules un fenotip elongat característic de la inhibició de cicle.

Així doncs, per utilitzar aquest sistema de sincronització se segueixen els següents passos:

- Creuament genètic (*Materials i Mètodes; apartat 2.3*) de la soca termosensible *cdc25-22* amb la soca que volem sincronitzar.
- Un cop obtingut el creuament el cultiu s'incuba a temperatura permissiva de 25°C fins que assoleix una OD exponencial de 0,5-1.



- A continuació el cultiu s'incuba a temperatura restrictiva de 36°C durant 4 hores per tal de bloquejar les cèl·lules en fase G2.
- Un cop transcorregut el temps de bloqueig, les cèl·lules s'alliberen a temperatura permissiva i es procedeix a la recollida dels punts. El grau de sincronització es monitoritza mitjançant el càlcul de l'índex de septació en cadascun dels punts recollits.

Cal destacar que aquest tipus de sincronització és dels més efectius podent obtenir fins un 50-60% de cèl·lules sincronitzades.

3.1.2.3. Sincronització amb hidroxiiurea (HU)

Aquest és el tipus de sincronització que s'ha utilitzat en aquesta tesi.

La sincronització amb hidroxiiurea permet la sincronització de cultius en fase G1/S a través del bloqueig de la síntesi de dNTPs. La hidroxiiurea inhibeix l'enzim ribonucleòtid reductasa, de manera que impedeix que tingui lloc la replicació del DNA i atura les cèl·lules al principi de fase S.

Bàsicament, el procediment que s'ha de seguir consisteix en tractar les cèl·lules amb una concentració de 10 mM d'HU durant 4 h. Passat aquest temps, el cultiu es centrifuga i es renta amb medi sense HU per finalment resuspendre'l en medi fresc i agafar els punts pertinents. Es pot aconseguir una millor sincronització si el bloqueig es fa a 25°C i en medi mínim. El grau de sincronització es monitoritza mitjançant el càlcul de l'índex de septació en cadascun dels punts recollits.

En aquest cas, el mètode no és tant efectiu com l'anterior ja que la proporció de cèl·lules sincronitzades acostuma a ser d'un 30%.

3.1.2.4. Sincronització per deprivació de nitrogen

Aquest tipus de sincronització provoca el bloqueig de les cèl·lules en fase G1, degut a que la manca de nitrogen del medi impedeix que les cèl·lules puguin assolir la mida necessària per a poder progressar a la següent fase del cicle. D'aquesta manera, les cèl·lules sincronitzades amb medi deprivat es caracteritzen per presentar un fenotip arrodonit de menor tamany.



El procediment consisteix bàsicament en fer créixer la soca a sincronitzar en medi mínim suplementat amb tots els aminoàcids fins que el cultiu està exponencial ($OD=0,5-1$). A continuació, el cultiu es centrifuga i sobre el *pellet* obtingut es realitzen tres cicles de rentats amb H_2O estèril per retirar el nitrogen del medi. Després, el *pellet* es ressuspèn en medi mínim deprivat de nitrogen i s'incuba 4 hores a $25^{\circ}C$. Finalment, el cultiu és ressuspès en medi mínim suplementat per a procedir a la recollida de mostres. El grau de sincronització es monitoritza mitjançant el càlcul de l'índex de septació.

3.2. Medis i condicions de cultiu d'*Escherichia coli*

Les soques d'*E.coli* emprades en aquest treball són DH5 α , per a l'obtenció de DNA plasmídic i BL21 per a l'obtenció de proteïnes recombinants.

Els cultius es van fer créixer segons els protocols prèviament descrits per Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1998). El medi utilitzat en aquest cas va ser LB (*Luria-Bertani*) i els cultius es van incubar a $37^{\circ}C$.

- **LB:**

- 10 g/l triptona

- 5 g/l extracte de llevat

- 10 g/l NaCl

Quan va ser necessari, aquest medi va ser suplementat amb antibiòtics. D'aquesta manera es poden seleccionar els bacteris que contenen un determinat plàsmid en funció de la seva resistència. En aquest estudi els antibiòtics emprats van ser ampicil·lina (50 mg/l) i cloramfenicol (20 mg/l).

3.2.1. Producció de *E. coli* competents

El procediment a seguir per tal de produir cèl·lules d' *E. coli* competents és el que s'exposa a continuació:



- **DIA 1:** Es piquen bacteris amb la nansa de sembra i es fan créixer en 4ml de medi o/n a 37°C. S'afegeix un tub amb només 4 ml de medi com a control.
 - Medi LB per DH5α.
 - Medi SOC per INV αF'.
 - Medi LB+Cloramfenicol per B834 i BL21.
 - Medi LB+Kanamicina+Tetraciclina per DH10.

- **DIA 2:**
 - Crèixer els 4 ml de cultiu o/n en 250 ml del mateix medi fins que la D.O.=0,7 a $\lambda=600$ nm.
 - Centrifugar (Sorvall, rotor GSA) el cultiu a 5000 rpm 5 minuts a 4°C (repartir els 250 ml en 2 tubs de 250 ml de centrífuga). Els dos tubs han de pesar exactament el mateix.
 - Descartar sobrenedant.
 - Resuspendre el *pellet* en 50 ml de 100mM MgCl₂ (a 4°C), 25 ml si es fan 2 tubs.
 - Deixar en gel 30 minuts.
 - Centrifugar a 5000 rpm 5 minuts a 4°C.
 - Descartar en sobrenedant.
 - Resuspendre el *pellet* en 10 ml de 100mM CaCl₂ (a 4°C), 5 ml si es fan 2 tubs.
 - Deixar en gel 30-90 minuts.
 - Centrifugar a 5000 rpm 5 minuts a 4°C.
 - Descartar el sobrenedant.
 - Resuspendre el *pellet* en 20 ml de 5mM CaCl₂ – 15% glicerol 60% (preparar-ho al moment: 15 ml de 100mM CaCl₂ + 5 ml glicerol 60%).
 - Aliquotar les cèl·lules (300 µl) i congelar a -80°C ràpidament.

- **DIA 3:** Comprovar l'eficiència de transformació amb una quantitat coneguda de DNA.



4. TÈCNIQUES DE TRANSFORMACIÓ

4.1. Transformació en *Schizosaccharomyces pombe*

La transformació de DNA a *S. pombe* permet tant la integració d'epítops i promotors controlables en els gens endògens, com la delecció de gens i la incorporació de plàsmids en forma episomal. El mètode seguit es basa en l'ús de cèl·lules fetes competents mitjançant el tractament amb acetat de liti (Norbury and Moreno, 1997). El procediment consta del següents passos:

- Inocular la soca de *S. pombe* en 5 ml de YES i créixer durant tota la nit a 30°C.
- L'endemà, diluir aquest cultiu, portant-lo a un volum final de 50 ml i deixar créixer 3 h més per tal d'assegurar que aquestes cèl·lules es troben en fase exponencial del creixement.
- Centrifugar el cultiu 5 min a 2500 rpm i descartar el sobrenedant.
- Resuspendre en 50 ml d'aigua estèril i centrifugar de nou.
- Resuspendre en un *ependorf* amb 1 ml d'aigua estèril.
- Centrifugar 1 min a 8000 rpm i descartar el sobrenedant.
- Resuspendre en 1 ml d'acetat de liti* (LiAc-TE).
- Centrifugar 1 min a 8000 rpm i descartar el sobrenedant.
- Resuspendre les cèl·lules en 500 µl d'acetat de liti.
- Dels 500 µl, usar-ne 100 µl per la transformació i afegir 2 µl de ssDNA** i de 5 a 10 µl del plàsmid. Incubar 10 min a 30°C.
- Afegir 260µl de PEG*** i incubar a 30°C entre 30 i 60 min.
- Afegir 43 µl de DMSO i incubar 5 min a 42°C.
- Centrifugar 1 min a 8000 rpm i descartar el sobrenedant.
- Rentar el pellet amb 1ml d'aigua estèril. Centrifugar de nou i descartar sobrenedant.
- Resuspendre en 100µl d'aigua estèril i plaquejar en medi selectiu en funció de l'auxotrofia o la resistència a antibiòtic de la soca.

*LiAc-TE: 0,1 M acetat de liti, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA.

**ssDNA: 10 mg/ml de DNA d'esperma de salmó.

***LiAc-TE-PEG: 40% PEG4000 en LiAc-TE



4.2. Transformació en *E. Coli*

La transformació de DNA es va realitzar en la soca d'*E. coli* DH5 α per a l'amplificació de DNA plasmídic i en la soca BL21 per a l'expressió de proteïna. El protocol exposat a continuació, és el descrit per Kushner (Kushner, 1978):

- Incubar d'1 a 10 μ l de DNA plasmídic amb 100 μ l de cèl·lules fetes competents (amb CaCl₂ i MgCl₂) i incubar durant 30-60 min en gel.
- Realitzar un xoc tèrmic de 45 s a 42°C i mantenir en gel durant 2 min més.
- Afegir 1 ml de medi LB i incubar durant 1 h a 37°C en agitació, per tal de que les cèl·lules es recuperin.
- Centrifugar durant 15 s a màxima velocitat i descartar el sobrenedant.
- Plaquejar en medi LB suplementat amb l'antibiòtic corresponent.

La resistència d'una soca a un antibiòtic ve donada pel plàsmid amb que ha estat transformada. En el cas de les cèl·lules BL21, aquestes ja són resistents a cloramfenicol de *per se* (donat que contenen el plàsmid pLys), de manera que la selecció en aquest cas és doble.

5. EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS

5.1. Proteïnes de fusió a GST

L'expressió de proteïnes de fusió a GST (glutatió-S-transferasa) es va realitzar emprant la soca d'*E. coli* BL21. El plàsmid en que es va clonar el gen codificant per la proteïna d'interès en cada cas va ser el plàsmid pGEX-KG. Aquest permet fusionar l'epítot GST a l'extrem N-terminal de la proteïna i, d'aquesta manera, un cop expressada, la proteïna pot purificar-se mitjançant boles de glutatió-sefarosa a partir de l'extracte total.

El procediment que es va seguir s'explica a continuació:

En primer lloc s'ha d'induir l'expressió de la proteïna:



- Inocular la soca de BL21 en 50 ml de LB suplementat amb ampicil·lina i cloramfenicol i fer créixer tota la nit a 37°C.
- L'endemà, amplificar aquest cultiu portant-lo a un volum final de 1 l i incubar de nou a 37°C fins que el cultiu tingui una densitat òptica a 595 nm de 0,8-1,2.
- Induir l'expressió de la proteïna mitjançant l'adició d'IPTG 0,5 mM i incubant durant 4 h més a temperatura ambient.
- Centrifugar el cultiu en el rotor GSA d'una centrífuga Sorvall durant 10 min a 5000 rpm a 4°C. El *pellet* obtingut es pot conservar a -80°C.

Un cop s'ha obtingut el *pellet*, les cèl·lules s'han de lisar per tal d'extreure'n la proteïna:

- Resuspendre el *pellet* en 10 ml de NETN* amb inhibidors de proteases**. Transferir la suspensió a un tub de 50 ml de polipropilè.
- Sonicar la suspensió per tal de disminuir la viscositat deguda a l'alliberament del DNA bacterià.
- Centrifugar a 15000 rpm durant 15 min a 4°C en el rotor SS34 d'una centrífuga Sorvall. Recollir el sobrenedant.

En darrer lloc, la proteïna de fusió es purifica incubant el lisat amb un columna d'afinitat de glutatió-sefarosa:

- Rentar 1ml de la reïna de glutatió-sefarosa 4B (GE Healthcare) una vegada amb 10 ml de PBS fred i una vegada amb 10 ml de NETN, per tal d'equilibrar-la. Centrifugar 3 min a 3000 rpm i descartar el sobrenedant.
- Afegir el lisat de BL21 a la reïna i incubar 2 h a 4°C en agitació. Centrifugar la barreja 5 min a 3000 rpm i descartar el sobrenedant.
- Fer dos rentats de la reïna amb 50 ml de NETN i rentar de nou amb 1 ml de NET. Centrifugar i descartar el sobrenedant.
- En darrer lloc, eluir la proteïna afegint a la reïna 1ml de tampó d'elució*** i incubant 30 min a 4°C en agitació. Centrifugar 5 min a 3000 rpm i recollir el sobrenedant, que serà l'eluit1. Repetir el procés per tal d'obtenir una segona fracció de proteïna purificada (eluit2).
- Conservar la proteïna a -80°C.



*NET: 20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA.

NETN: 20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% NP-40 (o Igepal).

**Inhibidors de proteases: 10 µg/ml aprotinina, 5 µg/ml leupeptina, 1 mM PMSF.

***Tampó d'elució: 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 100 mM NaCl, 10 mM Glutatió, 2 mM DTT.

En alguns casos, pot ser necessari digerir la proteïna de fusió amb trombina per tal d'eliminar el GST. Donat aquest cas, després d'un rentat amb PBS, es resuspendrà la reïna en 1000 µl de PBS en lloc d'eluir la proteïna i s'afegiran 1000 µl de trombina (0,1 unitat/µl). Aquesta barreja s'incubarà 1h a 30°C i a continuació es centrifugarà per tal de separar el sobrenedant (que contindrà la proteïna digerida i la trombina) de la reïna (que contindrà el GST). Per tal d'eliminar la trombina de la mostra, aquesta s'incubarà amb una reïna de PABA (para-amino-benzamidina) (en una proporció de 75 µl de la reïna per cada 6 unitats de trombina) durant 30 min a temperatura ambient. El sobrenedant resultant contindrà únicament la proteïna digerida.

6. OBTENCIÓ DE L'EXTRACTE PROTEIC DE *S. pombe*

Donat que les cèl·lules de *S. pombe* estan recobertes d'una paret, la lisi s'ha de dur a terme mitjançant l'acció combinada d'un tampó de lisi i de fricció mecànica. Actualment es poden fer servir 2 solucions diferents per tal d'aturar les reaccions que tinguin lloc dins les cèl·lules abans de trencar-les. Aquestes dues solucions són el *STOP Buffer* i el TCA que s'expliquen amb detall a continuació.

6.1. STOP Buffer

El procés consta del següents passos:

- Per tal d'obtenir el pellet, existeixen 2 mecanismes diferents:
 - Centrifugar 20 ml de cultiu durant 5 min a 3000 rpm. En el cas de que es vulgui analitzar l'activació de Sty1, afegir gel a l'interior tub per tal d'evitar que la calor generada en la centrifugació pugui activar la MAPK.
 - Utilitzar la rampa de buit de poliuretà (PALL Corporation).



- Resuspendre en 1 ml de *STOP buffer**, centrifugar 1 min a 8000 rpm a 4°C. Recollir el *pellet* que es pot conservar a -80°C.
- Resuspendre el *pellet* en 200 µl de tampó de lisi** amb inhibidors de proteases*** i afegir boles de vidre fins ¾ del volum final.
- Sotmetre les cèl·lules a 3 pols d'agitació a 6000 rpm en la *FAST-PREPT*TM a 4°C. Controlar el grau de lisi mitjançant l'observació de les mostres al microscopi.
- Foradar la base de l'*ependorf* i introduir-lo en un altre *ependorf*. Centrifugar 1 min a 8000 rpm a 4°C per tal de separar l'extracte de les boles de vidre.
- Centrifugar de nou aquest extracte 2 min a 14000 rpm per tal d'eliminar possibles restes cel·lulars de l'extracte.
- Recollir el sobrenedant i guardar-lo a -80°C.

**STOP buffer*: 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 10 mM EDTA, 1 mM NaN₃.

**Tampó de lisi: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 0,1% Tritó X-100, 10% Glicerol, 50 mM NaF.

***Inhibidors de proteases: 1 mM PMSF, 1 µg/ml Aprotinina, 1 µg/ml Leupeptina, 1 mM Na₂VO₃.

6.2. TCA (àcid tricloroacètic)

L'extracció de proteïnes de llevat en àcid tricloroacètic (TCA) és el mètode d'elecció en la majoria d'aplicacions, per la seva capacitat extractiva i la immediata inactivació de proteases, fosfatases i quinases.

El protocol a seguir és el següent:

- Recollir 2-15 ml de cultiu exponencial.
- Centrifugar 5 minuts a 3000 rpm o aspirar amb la rampa de buit de poliuretà.
- Resuspendre en 1 ml de 20% TCA i transferir al tub de la *Fastprep*TM. Posar en gel.
- Centrifugar 1 minut a 13000 rpm, descartar el sobrenedant.
- Rentar les cèl·lules amb 1 ml de 1M Tris-base (*Trizma*, sense ajustar el pH).
- Resuspendre les cèl·lules amb 100 µl de tampó de mostres 2x.



- Bullir 2 minuts 95°C.
- Afegir 200 µl de *glass beads*.
- Bullir 2 minuts 95°C.
- Trencar les cèl·lules amb la *FastprepTM* (FP120 BIO101 Thermo Electron Corporation).
- Bullir 2 minuts 95°C.
- Fer 2 o 3 forats al cul de l'eppendorf i posar-lo dins d'un eppendorf nou.
- Centrifugar 1 minut a 8000 rpm.
- Treure l'eppendorf superior i centrifugar 2 minuts a 14000 rpm.
- Transferir el sobrenedant a un nou eppendorf.
- Guardar l'extracte a -20°C.

7. QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES

Per a la valoració de la concentració de proteïna total en un extracte s'utilitzen principalment dos mètodes: el mètode Bradford i el mètode Lowry. El mètode d'elecció és el Bradford, per la seva sensibilitat, senzillesa en la preparació i rapidesa en l'obtenció dels resultats. Tot i això, aquest mètode presenta certes limitacions, ja que està influït per diversos components que sovint es troben presents en les solucions on estan dissoltes les proteïnes (>0,1% SDS, ...). En aquests casos s'utilitza el mètode Lowry, que no està distorsionat per aquests components. Ambdós mètodes es basen en la quantificació de l'absorbància a una determinada longitud d'ona del canvi de color que experimenta un reactiu químic en reaccionar amb les proteïnes. La determinació de la concentració es realitza per comparació amb una recta patró de concentracions creixents conegudes de proteïna, que generalment és l'albumina sèrica bovina.

7.1. Mètode Bradford

Aquest mètode es basa en el canvi de coloració que pateix el reactiu de Bradford (*Bio-Rad protein assay dye reagent concentrate*) en entrar en contacte amb els enllaços peptídics de la proteïna. Aquests canvis es poden



valorar mitjançant la mesura de l'absorbància a 595 nm. La concentració es calcula en base als valors obtinguts amb una mostra patró de concentració coneguda, elaborada amb BSA (albúmina sèrica bovina). La recta patró es prepara de la següent manera:

Concentració	BSA 0,1 mg/ml	Aigua	Reactiu de Bradford
0µg/µl	0 µl	800µl	200µl
4µg/µl	40µl	760µl	200µl
8µg/µl	80µl	720µl	200µl
10µg/µl	100µl	700µl	200µl
15µg/µl	150µl	650µl	200µl

Taula 9. Proporcions de cadascun dels reactius emprats per a la quantificació de proteïnes pel mètode Bradford.

La mostra problema es prepara de la mateixa manera, afegint 1 µl de mostra a 799 µl d'aigua i 200µl del reactiu de Bradford.

Després de barrejar el reactiu cal incubar 10 min a temperatura ambient abans de llegir l'absorbància a 595 nm. És important sempre fer duplicats tant de la recta patró com de la mostra.

7.2. Mètode Lowry

El procediment és similar a l'anterior però canvien els reactius i la mesura de l'absorbància és a 750 nm:

- La recta patró es prepara amb diferents concentracions de BSA (de 2 a 20 mg/ml) fins a un volum final de 500 µl en aigua mQ. Les mostres a quantificar es preparen de la mateixa manera, agafant de 2 a 10 µl de mostra. Els punts de la recta patró i de les mostres es preparen per duplicat.



- S'hi afegeix 2,5 ml de Solució A*. Es barreja i s'incuba 10 minuts a temperatura ambient.
- S'hi addicionen 250 µl de Solució B**, es barreja i s'incuba 30 minuts a temperatura ambient.
- Es llegeix l'absorbància en un espectrofotòmetre a 750 nm.
- La concentració de la mostra s'obté per interpolació en la recta patró a partir del valor de l'absorbància.

A continuació es mostra la recta patró del mètode Lowry:

Concentració	BSA 0,1 mg/ml	Aigua
0 µg/µl	0 µl	500 µl
5 µg/µl	50 µl	450 µl
10 µg/µl	100 µl	400 µl
20 µg/µl	200 µl	300 µl
40 µg/µl	400 µl	100 µl

Taula 10. Proporcions de cadascun dels reactius emprats per a la quantificació de proteïnes pel mètode Lowry.

*Solució A: es barregen les solucions 1, 2 i 3 amb la proporció 48:1:1.

- Solució 1: 2% Na₂CO₃, 0,1 N NaOH.

- Solució 2: 0,5% CuSO₄.

- Solució 3: 1,0% Tartrat sòdic.

**Solució B: dilució del reactiu de fenol (1:1) amb aigua.

- Reactiu de fenol: Folin-Ciocalteu (Merck).

8. ELECTROFORESI DE PROTEÏNES (SDS-PAGE)

L'electroforesi de proteïnes mitjançant gels de SDS-poliacrilamida en condicions desnaturalitzants permet la separació de les proteïnes presents en una mostra en funció del seu pes molecular (Laemmli, 1970). Les mostres que es



volen analitzar són tractades prèviament amb un detergent aniònic, el SDS (dodecil sulfat sòdic). Aquest tractament confereix càrrega negativa a les proteïnes, anul·lant la seva càrrega intrínseca. L'aplicació a continuació d'un corrent elèctric promou la migració de les proteïnes a través de la matriu porosa de poliacrilamida cap el pol positiu del camp (ànode).

Donat que el tractament amb el detergent anul·la la pròpia càrrega de la proteïna, la velocitat de migració dependrà únicament de la mida d'aquesta, essent inversament proporcional al logaritme del pes molecular.

La matriu de poliacrilamida està formada per una barreja d'acrilamida i bis-acrilamida, i la concentració d'aquests polímers en el gel determinarà la mida del por resultant. Això influirà en la idoneïtat d'un tipus de gel o un altre per a la correcta separació de la mostra. Així, si es volen separar proteïnes de pes molecular gran, s'empraran gels de baixa concentració d'acrilamida/bis-acrilamida, és a dir, gels amb pors grans. En canvi, si es volen separar proteïnes de baix pes molecular, serà més adequat emprar gels amb por petit o d'alta concentració d'acrilamida/bis-acrilamida.

Els gels per a l'electroforesi de proteïnes consten de dues fases:

- Gel empaquetador: correspon a la part superior del gel i donat que té una baixa concentració d'acrilamida (3,6%) permet que la mostra s'empaqueti en el límit amb la següent fase del gel.
- Gel resolutiu: situat a la part inferior del gel, permet la separació de les proteïnes degut a que conté un major percentatge d'acrilamida (que pot variar de 8-15%).

En la taula 11 es recullen les proporcions que s'han de seguir per preparar els gels.



Components	Gel resolutiu				Gel empaquetador
	8%	10%	12%	15%	
Solució 1*	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	-
Solució 2**	2,8 ml	3,4 ml	4 ml	5 ml	0,36 ml
Solució 3***	-	-	-	-	1,5 ml
Aigua	2,2 ml	1,6 ml	1 ml	-	1,2 ml
TEMED	14 µl	14 µl	14 µl	14 µl	7,5 µl
PSA 13%	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	30 µl
Vfinal	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	3 ml

Taula 11. Volums necessaris per a la preparació de gels resolutius i empaquetadors de 1,5 mm de gruix.

*Solució 1: 0,75M Tris-HCl, 0,29% SDS, pH 8,8.

**Solució 2: 30% acrilamida, 0,8% Bis-acrilamida.

***Solució 3: 0,25M Tris-HCl, 0,29% SDS, pH 6,8.

El PSA (persulfat amònic) actua com a iniciador de la reacció i el TEMED com a agent catalitzador.

Les mostres es preparen calculant la quantitat de proteïna que es vol carregar i afegint $\frac{1}{3}$ part d'aquest volum de tampó de mostra $4x^*$, és a dir $\frac{1}{4}$ part del volum final. Un cop preparades, les mostres es bullen durant 5 min i es carreguen en el gel. Per tal de poder aplicar el corrent elèctric, l'elèctrode i els gels hauran d'estar submergits en una cubeta que contingui tampó electròlit**. El corrent aplicat serà el corresponent a un amperatge constant de 35 mA per



gel. En el nostre cas, els gels emprats corresponen al sistema *CBS (Scientific Company, Inc.)*.

*Tampó de mostra 4x: 40 mM Fosfat sòdic pH 7,0, 0,40% Glicerol, 10% SDS, 0,2% DTT, blau de bromofenol.

**Tampó electròlit: 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina, 0,1% SDS, pH 8,3.

Tinció de gels de poliacrilamida amb Coomassie Blue:

Per tal de poder visualitzar el patró de proteïnes que han estat separades mitjançant un gel de poliacrilamida, aquest s'ha de tenyir mitjançant una solució de *Coomassie Blue*.

Aquesta tinció consisteix en la incubació durant aproximadament 15 min a temperatura ambient en agitació suau amb una solució del colorant* i el posterior tractament amb una solució destenyidora** que permeti eliminar-ne l'excés.

*Solució de tinció: 2,5 mg/ml Coomassie Blue G-250, 45% Metanol, 10% Àcid acètic.

**Solució destenyidora: 50% Metanol, 10% Àcid acètic.

9. WESTERN BLOT

Aquesta tècnica permet la detecció d'una proteïna concreta present en una mostra mitjançant la reacció entre aquesta i un anticòs dirigit contra ella. Prèviament, la mostra ha d'haver estat separada mitjançant un gel de poliacrilamida i transferida a una membrana de nitrocel·lulosa o PVDF (fluorur de polivinilidè). Aquesta tècnica consta de 2 passos que s'explicaran amb detall a continuació:

- Electrotransferència.
- Immunodetecció.



9.1. Electrotransferència

Aquest procés consisteix en la transferència de les proteïnes presents en un gel de poliacrilamida cap a una membrana de nitrocel·lulosa o PVDF mitjançant l'aplicació d'un camp elèctric. Les proteïnes de la mostra, en tenir càrrega negativa migraran cap el pol positiu de l'electrode on es trobaran am la membrana i quedaran retingudes. Tot el sistema es trobarà submergit en un tampó de transferència* que permeti la transmissió del camp elèctric. El muntatge del sistema es mostra a continuació:

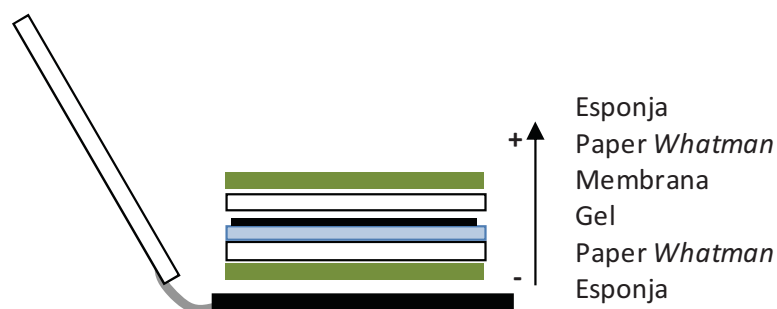


Figura 4. Esquema del muntatge de la transferència del gel d'acrilamida.

*Tampó de transferència: 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM Glicina, 0,02% SDS, 20% etanol.

Un cop muntat el sistema, s'aplicarà un camp elèctric de 60V durant 2 hores o bé de 20V durant tota la nit, a 4°C en ambdós casos per tal d'evitar l'escalfament de la mostra.

Cal remarcar que les membranes de PVDF s'han d'haver hidratat prèviament abans de dur a terme la transferència, incubant-les breument amb metanol i equilibrant-les llavors amb el tampó de transferència.



9.2. Immunodetecció

Com ja s'ha dit, aquesta tècnica permet la detecció d'una proteïna concreta mitjançant l'ús d'anticossos que reaccionen específicament contra un epítop present en la proteïna. Es tracta d'una tècnica de detecció indirecta, donat que l'anticòs que dóna el senyal no s'uneix a la proteïna directament, sinó que ho fa a través d'un anticòs primari, que en aquest cas sí que reacciona amb la proteïna. Així diferenciarem dos tipus d'anticòs:

- **Anticòs primari:** Aquest anticòs reconeix específicament un (anticossos monoclonals) o més epítops (anticossos policlonals) continguts en la proteïna. S'obtenen inoculant la proteïna purificada (o fragments) en animals per tal de generar una resposta immunològica i extraient-ne després la sang per tal de separar l'anticòs. Quant als anticossos monoclonals, aquests són produïts en ratolins i, en aquest cas, se n'extrau la melsa i se'n disgreguen les cèl·lules per tal d'establir línies cel·lulars que sintetitzin anticossos contra un únic epítop. En el cas d'anticossos policlonals, aquests es generen en animals més grans, com ara conills o cabres els quals són sagnats per tal d'obtenir una barreja d'anticossos dirigits contra diferents epítops de la proteïna.
- **Anticòs secundari:** Aquest anticòs reconeix la regió constant present en l'anticòs primari i que és igual per tots els anticossos generats en una mateixa espècie animal. Així, s'obtenen inoculant anticossos de l'espècie on s'ha generat l'anticòs primari en un animal d'una espècie diferent. Els anticossos secundaris porten conjugat un enzim (peroxidasa o fosfatasa alcalina) que en reaccionar amb el seu substrat donen lloc a un senyal detectable, proporcional a la quantitat de proteïna present a la mostra. La finalitat d'utilitzar un anticòs secundari és que permet amplificar el senyal, que seria molt baix si només s'emprés un sol anticòs.



El passos que s'han de seguir per dur a terme aquesta tècnica es mostren a continuació:

- Hidratar la membrana on s'han transferit les proteïnes submergint-la en metanol absolut i rentant-la després amb aigua destilada i TBS*.
- Bloquejar la membrana mitjançant la incubació amb una solució de bloqueig** per tal d'evitar que els anticossos s'uneixin de forma inespecífica a la membrana. Aquesta incubació es fa durant 1h a temperatura ambient, en agitació suau.
- Incubar la membrana en la solució de l'anticòs primari*** durant 2 h a temperatura ambient o bé durant tota la nit a 4°C. La dilució de l'anticòs serà diferent depenent de cada anticòs.
- Realitzar 3 cicles de rentat de 5 min a temperatura ambient amb TBST*.
- Incubar la membrana amb l'anticòs secundari dissolt en la solució d'anticòs*** en una proporció 1:2000. En el nostre cas l'enzim secundari emprat estava conjugat a l'enzim peroxidasa (HRP).
- Realitzar dos rentats de 5 min amb TBST i un darrer rentat de 10 min amb TBS.
- Per tal de detectar el senyal de l'anticòs, tractar la membrana amb el substrat proporcionat pel sistema de detecció (*EZ-ECL Chemiluminescence Detection Kit for HRP*, de Biological Industries) i captar la quimioluminiscència en una pel·lícula fotogràfica (*Fuji Medical X-Ray film*, de Fujifilm).

*TBS: 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl

TBST: TBS 0,05% Tween-20

**Solució de bloqueig: 5% de llet en pols dissolta en TBST.

***Solució d'anticòs: 2,5% de llet en pols dissolta en TBST. En alguns casos, quan la casa comercial així ho indiqui, la solució de bloqueig així com la solució d'anticòs es prepara amb BSA enlloc d'amb llet.



A la següent taula es recullen els anticossos emprats en aquest treball:

Antigen	Font	Tipus	Dilució
HA (12CA5)	Roche	Monoclonal	1:1000
HA	Sigma	Policlonal	1:1000
PSTAIR	Upstate	Policlonal	1:2000
Myc (9E10)	Upstate	Monoclonal	1:1000
Fosfo-p38	Cell Signaling	Policlonal	1:1000
HOG1 (Y-215)	Santa Cruz	Monoclonal	1:1000
Actina	Immuno (MP Biomedicals)	Monoclonal	1:2000

Taula 12. Anticossos emprats en aquesta tesi.

10. IMMUNOPRECIPITACIÓ

Aquesta tècnica consisteix en la purificació de proteïnes concretes presents en una mostra mitjançant l'ús d'anticossos dirigits contra aquestes. L'anticòs reconeix específicament la proteïna i, posteriorment, la incubació de la mostra amb una reïna de proteïna A o G permet la separació del complex anticòs-proteïna de la resta de l'extracte. Les proteïnes A i G són d'origen bacterià i tenen una gran afinitat pels anticossos. El procediment que es segueix és el següent:

- Preparar de 500 fins a 1000 µg d'extracte en un volum final de 300 µl de tampó de lisi amb inhibidors*. Afegir el volum d'anticòs aconsellat per la casa comercial (generalment es fan servir dilucions 1:100-1:300).
- Incubar la reacció durant tota la nit en agitació suau a 4°C.
- L'endemà, afegir a la mostra 30 µl de la reïna de proteïna A o G. Prèviament, aquesta reïna haurà estat equilibrada mitjançant 3 rentats amb 1 ml del mateix tampó de lisi. Incubar durant 1 h a 4°C.



- Centrifugar 1 min a 8000 rpm i recollir el sobrenedant com la fracció no unida.
- Realitzar 3 cicles de rentat de la reïna amb 1 ml de tampó de lisi.
- Ressuspendre la reïna amb 30 µl de tampó de mostra 2x i córrer en un gel SDS-PAGE, juntament amb la fracció no unida.
- Per últim, la transferència a una membrana i la immunodetecció de proteïnes concretes permetrà determinar interaccions de la nostra proteïna d'interès amb d'altres també presents en la mostra inicial i que han co-immunoprecipitat amb aquesta.

* El tampó de lisi emprat, així com els inhibidors de proteases, són els mateixos que ja s'han esmentat per a l'obtenció d'extractes totals de *S. pombe*.

En alguns casos, es poden utilitzar directament *beads* fusionades a l'anticòs, de manera que ens estalviariem el pas d'incubació amb proteïna A o G. En aquest cas l'extracte cel·lular s'incuba amb 30 µl d'aquestes *beads* tota la nit en agitació suau a 4°C, i l'endemà es realitzen 3 cicles de rentat de la reïna amb 1 ml de tampó de lisi i es resuspèn amb 30 µl de tampó de mostra 2x i es corren les mostres en un gel SDS-PAGE.

11. ASSAJOS D'ACTIVITAT QUINASA *IN VITRO*

Els assajos quinasa permeten per una banda determinar si una proteïna és substrat d'una quinasa d'activitat coneguda i per altra banda analitzar l'activitat d'una quinasa donades unes condicions concretes.

En aquest treball s'han realitzat assajos quinasa emprant proteïnes purificades, així com assajos quinasa en què la quinasa havia estat immunoprecipitada a partir d'un extracte total de *S. pombe*. En aquest darrer cas, el substrat era també una proteïna purificada.



En termes generals, en un assaig quinasa es mesura la incorporació de P^{32} radiactiu (en forma d'ATP) en un substrat a través d'una reacció catalitzada per una quinasa.

La reacció es prepara de la següent manera:

Substrat.....	2 μ g
Quinasa.....	1 μ g
Tampó quinasa 10x*.....	3 μ l
ATP 2,5mM.....	3 μ l
[γ^{32} -P] ATP**.....	0,2 μ l
Aigua.....	qsp 30 μ l

*Tampó quinasa 10x: 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM MgCl₂, 5 mM β -mercaptoetanol.

**[γ^{32} -P] ATP de Perkin-Elmer (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)

Aquestes quantitats poden variar, essent únicament orientatives. Per exemple, la quantitat d'ATP es pot augmentar si es vol que el senyal sigui més específic (quan s'obtenen bandes inespecífiques) o, per contra, es pot disminuir si el senyal obtingut és molt baix. La quantitat d'ATP radiactiu que s'ha indicat correspon a un ATP que no ha decaigut encara. Així, cada quinze dies (semivida del P^{32}) des que l'ATP ha començat a decaure s'ha de afegir el doble del volum inicial.

Tots els components es poden barrejar de forma normal, excepte l'ATP radiactiu que s'ha d'incorporar en una cambra habilitada per a treballar amb isòtops radiactius. A partir d'aquest punt tot el procés s'ha de dur a terme en aquesta cambra, darrera d'una mampara de metacrilat.

La reacció s'incuba durant 30 min a 30°C i, transcorregut aquest temps, la reacció s'atura afegint 10 μ l de tampó de mostra 4x. A continuació les mostres es corren en un gel de poliacrilamida i aquest es tenyeix amb *Coomassie Blue*. Per tal de detectar el senyal de fosforilació, el gel s'asseca sobre un paper *whatman* i



s'exposa en una placa que l'amplificarà. L'autoradiografia es visualitzarà mitjançant l'escanner Typhoon (Trio Variable Mode Imager).

En el cas dels assajos quinasa en que el que es vol determinar és l'activitat quinasa d'una proteïna present en una mostra de *S. pombe*, aquesta s'immunoprecipitarà segons el protocol descrit en l'apartat anterior i la reïna resultant s'incubarà amb la resta de components de la reacció, que conservaran les mateixes proporcions que en el cas anterior però sense considerar el volum de la reïna.

12. ASSAJOS DE SENSIBILITAT EN PLACA

Aquests assajos permeten determinar la viabilitat d'un determinat mutant o bé la interacció gènica entre determinats gens.

En la realització d'aquest treball, els mutants a analitzar, així com la soca control, van ser crescuts en medi ric (YES) o mínim (EMM), depenent del cas, fins a obtenir cultius en fase exponencial. A continuació, es va realitzar un banc de dilucions seriades dels cultius (des de 10^6 fins a 10^3) i es van inocular 10 μ l de cada dilució sobre plaques de medi sòlid, contenint l'estrès corresponent. La formació de colònies es va analitzar després de 2 dies de creixement a 30°C.

13. TÈCNiques DE MICROSCOPIA

13.1. Immunocitoquímica indirecta

Aquesta tècnica permet analitzar la localització subcel·lular d'una proteïna mitjançant l'ús d'anticossos dirigits contra aquesta. Aquests anticossos són ahora reconeguts per un anticòs secundari que porta conjugat un fluorocrom que pot ser visualitzat amb un microscopi de fluorescència.

Per tal que les proteïnes conservin la seva localització, les cèl·lules s'han de fixar amb metanol abans de començar el procés de marcatge. El protocol que s'utilitza és el següent:



- Centrifugar 1 ml de cultiu a 8000 rpm durant 1min. Descartar el sobrenedant i resuspendre en 0,5 ml de metanol a -20°C. D'aquesta manera les cèl·lules es poden conservar durant mesos a -20°C.
- Centrifugar les cèl·lules durant 1 min a 8000 rpm. Descartar el metanol i resuspendre en aigua autoclavada. Deixar que les cèl·lules s'hidratin durant 10 min.
- Realitzar dos cicles de rentat amb 1 ml de tampó PEM. Centrifugar 1 min a 8000 rpm i descartar el sobrenedant.
- Incubar les cèl·lules amb 500 µl de tampó PEMS amb 2 mg/ml de zimoliasa 20T (de Seikagaku) per tal de digerir la paret. Incubar 10 min a 37°C.
- Fer tres rentats amb 1 ml de tampó PEMS. Centrifugar 1 min a 8000 rpm i descartar el sobrenedant.
- Incubar les cèl·lules amb 1 ml de tampó PEMS a l'1% de tritó X-100 per permeabilitzar-les. Incubar 30 s a temperatura ambient.
- Realitzar tres rentats amb tampó PEM. Centrifugar 1 min a 8000 rpm i descartar el sobrenedant.
- Resuspendre les cèl·lules en 1 ml de tampó PEMBAL i incubar en agitació suau 30 min a temperatura ambient. Centrifugar 1 min a 8000 rpm i descartar el sobrenedant.
- Resuspendre de nou les cèl·lules en 200 µl de tampó PEMBAL on s'ha diluït l'anticòs primari (la dilució dependrà de l'anticòs, però oscil·larà entre 1:100 i 1:300). Incubar en agitació durant 16 h a temperatura ambient.
- Fer tres rentats amb tampó PEMBAL. Centrifugar 1 min a 8000 rpm i descartar el sobrenedant.
- Resuspendre les cèl·lules en 200 µl de tampó PEMBAL on s'ha diluït l'anticòs secundari (a una concentració 1:200). Incubar durant 6 h a temperatura ambient. A partir d'aquest punt les mostres s'han de protegir de la llum mitjançant paper d'alumini.
- Fer dos rentats amb PEMBAL. Centrifugar 1 min a 8000 rpm i descartar el sobrenedant.



- Resuspendre en 100 µl de solució DAPI i incubar 1 min a temperatura ambient per tal de tenyir el DNA. Centrifugar 1 min a 8000 rpm i descartar el sobrenedant.
- Rentar amb 1 ml d'aigua autoclavada.
- Resuspendre aproximadament en 30 µl d'aigua autoclavada i de la suspensió resultant estendre 5 µl en un portaobjectes. Un cop evaporada l'aigua, muntar la preparació amb una gota de *mowiol*.
- Deixar assecat abans d'observar al microscopi. En aquesta tesi el microscopi emprat ha estat el de *wide field* Leica DMI 6000B.

PEM: 100 mM PIPES, 1 mM EGTA, 1 mM Mg₂SO₄ pH 6,9

PEMS: PEM suplementat amb 1,2 M sorbitol

PEMBAL: PEM suplementat amb 100 mM hidrocloreur de lisina, 0,1% NaN₃ i 1% BSA.

DAPI: Dilució 1:1000 d'una solució estoc d'1mg/ml de DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrat) en aigua autoclavada.

Mowiol:

- Barrejar 2,4 g de *mowiol* (Calbiochem) amb 6 g de glicerol i agitar durant 1h.
- Afegir 6 ml d'aigua mQ i agitar 2 h més.
- Afegir 12 ml de Tris-HCl 0,2 M pH 8,5 i agitar 30 min més.
- Escalfar durant 10 min a 50°C.
- Centrifugar 15 min a 6500 rpm i aliquotar el sobrenedant.

Els anticossos per immunocitoquímica que es van emprar són els següents:

	Antigen	Font	Tipus	Dilució
Anticossos primaris	HA (12CA5)	Roche	Monoclonal	1:500
	Myc (9E10)	Upstate	Monoclonal	1:500
Anticossos secundaris	Anti-mouse 594	Alexa	Policlonal	1:200
	Anti-mouse 488	Alexa	Policlonal	1:200

Taula 13. Anticossos emprats en les immunocitoquímiques.



13.2. Microscòpia confocal de *time-lapse*

Aquesta tècnica permet analitzar la localització subcel·lular d'una proteïna i el seu seguiment *in vivo*, mitjançant l'ús de làsers dirigits contra el fluorocrom fusionat a la proteïna d'interès.

En aquesta tesi s'ha treballat amb la soca Cdc25-GFP. El làser utilitzat per visualitzar la GFP és la línia 488 del làser d'Argó del microscopi confocal espectral Leica TCS-SP5. Amb aquesta mateixa línia de làser també prenem imatge de DIC (Differential Interference Contrast, Nomarski).

El procediment per tal de poder fer microscopia de *time-lapse* amb cèl·lules de *S. pombe* és el següent:

- MATERIAL NECESSARI:

- Plaques d'agarosa al 3% amb H₂O (es preparen el dia abans i es deixen solidificar a 4°C).
- Cubreobjectes de 22 mm.
- Cambra *attofluor* de *Molecular Probes*.
- Xeringa acoblada a un tub amb punta d'agulla (en el nostre cas va ser necessària degut a que necessitàvem inocular estrès a les cèl·lules mentre feiem el *time-lapse* i sense desenfocar la mostra).
- Solució d'estrès (en el nostre cas una solució de KCl 0,6 M).

- PROCEDIMENT (figura 4):

- Es fa créixer el cultiu fins que les cèl·lules estiguin exponencials.
- Un cop solidificades les plaques d'agarosa es retalla un quadrat petit (0,5 cm x 0,5 cm aprox).
- Es col·loca una gota de cultiu (uns 2 µl) sobre el quadrat d'agarosa i esperem a que s'assequi.
- Mentre s'asseca la gota preparem la cambra amb el cubreobjectes al mig.



- Un cop seca la gota, el quadrat es col·loca cap per avall sobre el cubreobjectes amb molta cura de que no quedin bombolles que puguin interferir amb la imatge (figura 4).
- Afegim oli a la part inferior de la cambra i enfoquem amb l'objectiu 63x d'oli. Mantenim la temperatura a 30°C durant l'adquisició.
- Característiques de l'adquisició: Format 512x512 píxels. *Zoom*:4. *Pinhole*:2. *Line Accumulation*:2. Velocitat: 400 bidireccional. Temps total: variable, entre 1h30 i 3h. Interval de temps entre adquisicions: 30 segons.

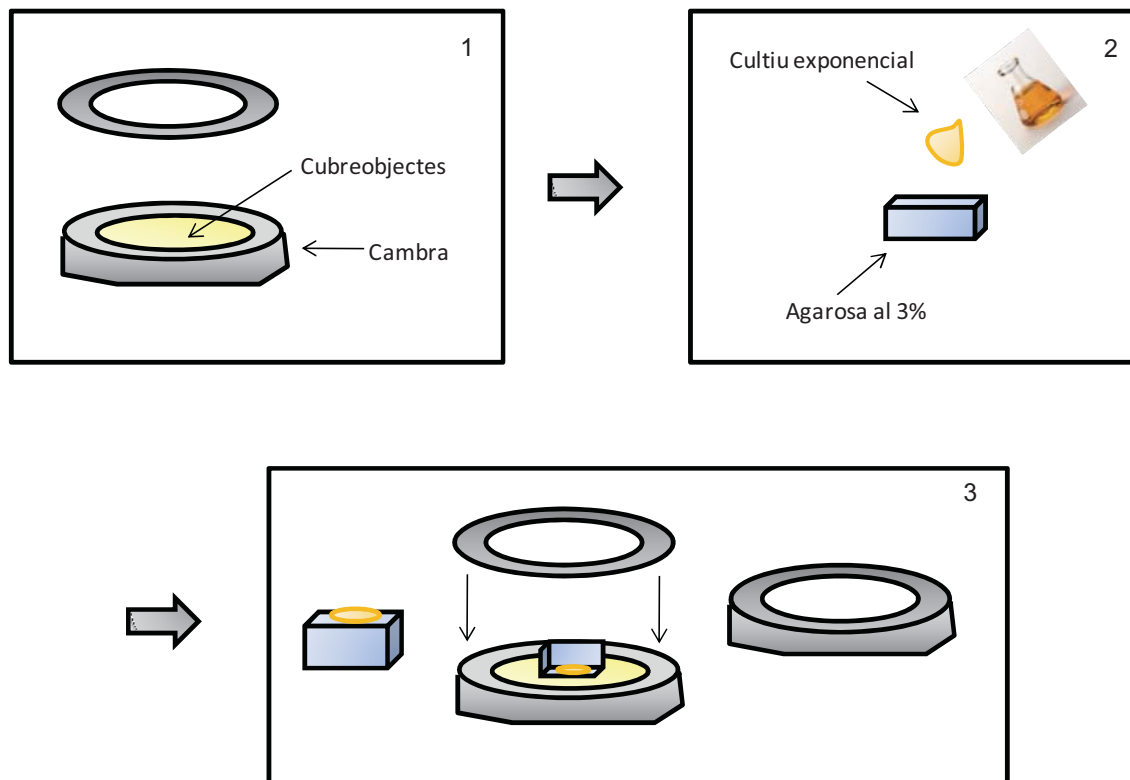


Figura 4. Esquema del muntatge de la cambra amb les cèl·lules de llevat per microscòpia de *time-lapse*.



ESTUDI DE LA REGULACIÓ DE LA Srk1 PER LA MAPK Sty1

1. La presència de la Sty1 és necessària per a l'estabilitat de la Srk1

Estudis realitzats en el nostre grup han permès establir que la Sty1 fosforila la treonina 463 de la Srk1 per tal d'activar-la (López-Avilés*, Lambea*, 2008). Donats aquests antecedents vam voler determinar si la Sty1 era l'única quinasa responsable de l'activació de la Srk1 en resposta a estrès. Amb aquesta finalitat vam realitzar un assaig quinasa per tal de mesurar l'activitat de la Srk1 en resposta a estrès en absència de la Sty1. Cèl·lules $\Delta sty1$ on la Srk1 endògena conté incorporat un epítip HA (hemaglutinina) van ser sotmeses a estrès osmòtic (1M KCl) i posteriorment, la Srk1 es va immunoprecipitar a diferents temps de l'exposició a estrès. L'activitat de la Srk1 dels immunoprecipitats es va analitzar utilitzant el fragment Cdc25⁵⁶⁻¹⁴⁵, prèviament descrit (López-Avilés *et al.*, 2005), com a substrat. Tal i com esperàvem, no vam detectar activitat de la Srk1 en cèl·lules $\Delta sty1$, en comparació amb el control (figura 1; panell superior). Sorprenentment, però, en la soca $\Delta sty1$ s'observa una disminució dramàtica dels nivells de la proteïna Srk1, tal i com s'observa en la figura 1 (panell inferior).

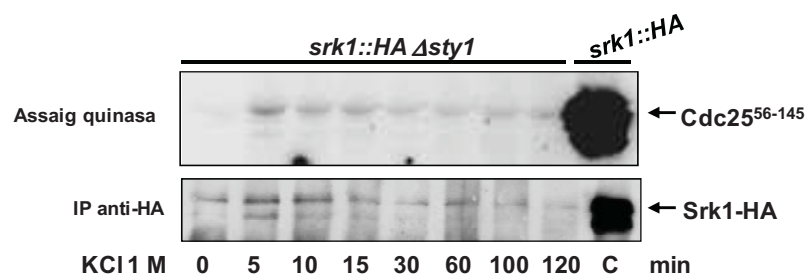


Figura 1. Activitat de la Srk1 en cèl·lules $\Delta sty1$. Cèl·lules $\Delta sty1$ contenint el gen endogen *srk1* fusionat a l'epítip HA (*srk1-HA*) van ser exposades a 1M KCl i la Srk1 va ser immunoprecipitada als temps indicats amb l'anticòs anti-HA. L'assaig quinasa *in vitro* es va realitzar utilitzant els immunoprecipitats i com a substrat el fragment Cdc25⁵⁶⁻¹⁴⁵ (panell superior). El darrer carril correspon a l'activitat de la Srk1 en cèl·lules *wt*. Els *Western Blots* de les mostres immunoprecipitades es van analitzar mitjançant l'anticòs anti-HA per tal de monitoritzar la presència de proteïna (panell inferior).



El mateix ocorre quan comparem en paral·lel l'expressió de la Srk1 en extractes totals de cèl·lules *wt* i Δ *sty1* exposades a estrès osmòtic (figura 2). En aquest cas, tampoc es detecten nivells de proteïna en la soca Δ *sty1*. Aquest fet ens va fer pensar que potser la Sty1 podia estar regulant, a més de la seva activitat, l'estabilitat de la Srk1.

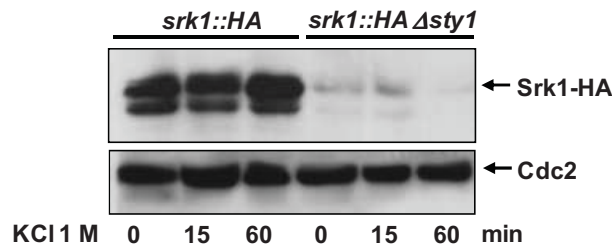


Figura 2. Nivells de Srk1 en cèl·lules Δ *sty1*. Cèl·lules *wt* i Δ *sty1* contenint el gen endogen *srk1* fusionat a l'epítot HA (*srk1-HA*) van ser exposades a 1M KCl i els nivells de proteïna de la Srk1 van ser analitzats mitjançant *Western Blot* amb l'anticòs anti-HA (panell superior). La mateixa membrana va ser incubada amb l'anticòs anti-PSTAIR per detectar la Cdc2 com a control de càrrega.

Per tal de confirmar aquesta observació, l'estabilitat de la proteïna Srk1 es va analitzar utilitzant un altre abordatge experimental, el que es coneix com el *cassette* DEGRON. Vam analitzar l'expressió de la proteïna Srk1 en una soca Δ *sty1* on el gen *sty1* s'expressa sota el control del promotor induïble de la invertasa (*inv1*) (Iacovoni *et al.*, 1999) en un plàsmid que conté el “*cassette DEGRON induït per calor*” (Sanchez-Diaz *et al.*, 2004) fusionat al N-terminal del gen *sty1* (pINV1-DEGRON:Sty1-HA). El canvi de glucosa per sucrosa en el medi porta a la ràpida inducció del promotor de *inv1*, i per tant, en aquest cas, a la inducció de la Sty1 (Iacovoni *et al.*, 1999). Posteriorment, la proteïna de fusió es pot degradar en canviar el cultiu a la temperatura restrictiva de 37°C, que fa que l'epítot DEGRON adopti una conformació que és reconeguda per la maquinària d'ubiquïtinització (Sanchez-Diaz *et al.*, 2004). Aquest mètode ens permet doncs, analitzar l'estabilitat de la Srk1 a mida que els nivells de la Sty1 disminueixen. Així doncs, cèl·lules Δ *sty1* amb el gen endogen *srk1* fusionat al epítot HA que contenen el plàsmid pINV1-DEGRON:Sty1-HA van ser canviades de temperatura permissiva a restrictiva, i ambdues proteïnes (Sty1 i Srk1) van ser detectades per *Western Blot* a diferents temps després del canvi de temperatura. Com s'observa en la figura 3A, a mida que es degrada la Sty1,



l'estabilitat de la *Srk1* va disminuint, indicant l'existència d'un altre nivell de regulació de la *Srk1* més enllà del transcripcional per part de la *Sty1*. De fet, en cèl·lules de mamífer s'ha descrit que l'estabilitat de la MAPKAPK-2 (MK2) és dependent de la presència de la MAPK p38 (Kotlyarov *et al.*, 2002). En aquestes cèl·lules, ambdues proteïnes formen un complex estable i inactiu en condicions normals. L'absència d'una d'elles fa que l'altra sigui inestable i viceversa. Per altra banda, com s'ha comentat a la introducció, treballs recents en *S. pombe* indiquen que l'estabilitat del factor de transcripció *Atf1* depèn d'un nivell de fosforilació basal per part de la *Sty1* (Lawrence *et al.*, 2007). Amb l'objectiu de determinar si l'estabilitat de la *Srk1* depèn de l'activitat de la *Sty1*, es van analitzar els nivells de proteïna de la *Srk1* en una soca $\Delta wis1$ (on la *Sty1* no pot ser activada) sota condicions normals i d'estrès. Tal i com s'observa en la figura 3B, els nivells de proteïna de la *Srk1* són iguals en la soca *wt* i $\Delta wis1$, tant en condicions normals com en resposta a estrès, indicant que al igual que ocorre en cèl·lules de mamífer, és la presència i no l'activitat de la *Sty1* el que permet que la *Srk1* sigui estable.

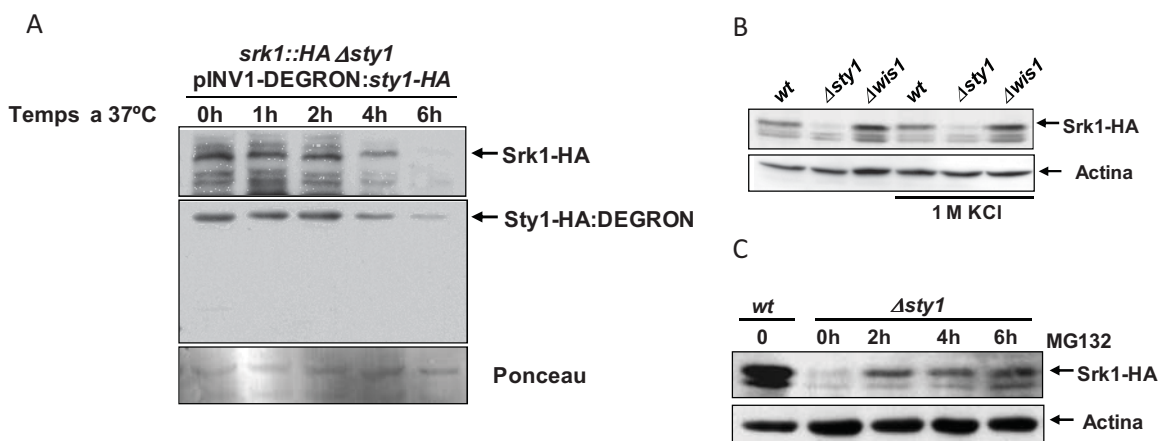


Figura 3. Estabilització de la *Srk1* per la *Sty1*. (A) Cèl·lules *srk1-HA Δsty1* van ser transformades amb el plàsmid pINV-DEGRON-*Sty1* expressant DEGRON-*Sty1* sota el control del promotor del gen de la *INV1* a 25°C. Les cèl·lules van ser canviades a temperatura restrictiva, 37°C, es van agafar mostres als temps indicats i els Western Blots es van incubar amb l'anticòs anti-HA per detectar en paral·lel els nivells de les proteïnes *Srk1* (panell superior) i *Sty1* (panell del mig). Com a control de càrrega es va fer un Ponceau a la membrana (panell inferior). (B) Cèl·lules *wt*, $\Delta sty1$ i $\Delta wis1$ contenen el gen *srk1* endogen fusionat a l'epítip HA van ser exposades a 1M KCl durant 30 minuts. El Western Blot dels extractes proteïcs es va dur a terme amb l'anticòs anti-HA per detectar els nivells de *Srk1*. La mateixa membrana va ser incubada amb anticòs anti-actina com a control de càrrega. (C) Cèl·lules *srk1-HA Δsty1* van ser exposades a l'inhibidor del proteasoma MG132 (concentració final de 50 μ M) i les mostres van ser recollides als temps indicats. Els nivells de *Srk1* van ser monitoritzats mitjançant Western Blot amb l'anticòs anti-HA. La mateixa membrana va ser incubada amb anticòs anti-actina com a control de càrrega.



Finalment, amb l'objectiu d'establir si la manca de Sty1 promou la pèrdua de la Srk1 per degradació, cèl·lules $\Delta sty1$ van ser tractades amb l'inhibidor del proteasoma MG132, i els nivells de proteïna de la Srk1 van ser analitzats mitjançant *Western Blot* a diferents temps del tractament. Tal i com es mostra en la figura 3C, els nivells de proteïna de la Srk1 es recuperen en afegir l'inhibidor, suggerint que la unió entre ambdues quinases evitaria la degradació de la Srk1.

2. La fosforilació de la Srk1 en T463 promou la seva degradació

Per tal d'estudiar l'efecte *in vivo* de la fosforilació de la treonina 463, vam decidir examinar els nivells de proteïna de la Srk1 en cèl·lules on el gen endogen va ser fusionat a l'epítot HA (*srk1-HA*) o reemplaçat pels mutants *srk1-T463A* (*srk1-T463A-HA*) o *srk1-T463D* (*srk1-T463D-HA*). Tal i com es mostra en la figura 4, els nivells de proteïna del mutant *srk1-T463D* són inferiors als de la Srk1 control (carrils 1 i 2). Per contra, els nivells de proteïna del mutant *srk1-T463A* no varien en comparació amb la Srk1 (carrils 4 i 5). Aquestes observacions ens van portar a comprovar si els nivells baixos de proteïna del mutant *srk1-T463D* eren deguts a una pèrdua en l'estabilitat i posterior degradació del mateix. Així doncs, cèl·lules que contenien l'al·lel *srk1-T463D-HA*, van ser tractades amb MG132 i en aquest cas els nivells de proteïna es van restablir (carril 3). Aquests resultats indiquen que la fosforilació en la T463 promou la inestabilitat i degradació de la proteïna Srk1.

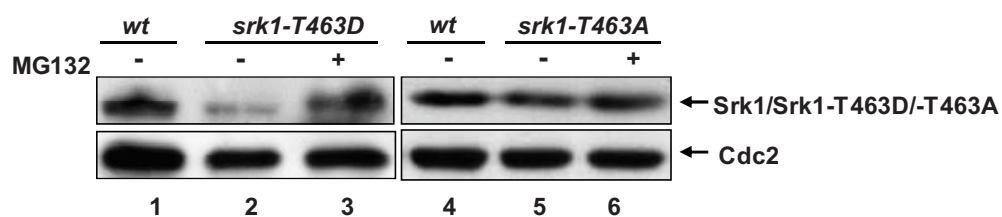


Figura 4. Degradació de la proteïna Srk1T463D via proteasoma. Els gens *srk1-HA*, *srk1-T463D-HA* i *srk1-T463A-HA* van ser integrats sota el promotor endogen de la Srk1 i els nivells de proteïna van ser detectats mitjançant *Western Blot* amb anticòs anti-HA (panell superior). Posteriorment, les cèl·lules que contenen els al·lels *srk1-T463D* i *srk1-T463A* van ser tractades amb MG132 (concentració final de 50 μ M; panell superior, carrils 3 i 6). Els nivells de proteïna Cdc2 van ser detectats mitjançant l'anticòs anti-PSTAIR com a control de càrrega (panell inferior).



Per tal de confirmar que la fosforilació de la Srk1 per la Sty1 promou la inestabilitat de la primera, vam analitzar els nivells de proteïna de la Srk1 en resposta a estrès, un cop fosforilada per la Sty1. Tenint en compte que els nivells de proteïna de la Srk1 són constants al llarg del cicle (López-Avilés *et al.*, 2005) i que la Srk1 és fortament induïda en resposta a estrès de forma dependent de la Sty1 (Smith *et al.*, 2002, Chen *et al.*, 2003), primerament, vam tractar les cèl·lules *srk1-HA* amb Cicloheximida per tal d'inhibir la síntesi *de novo* de la Srk1 induïda en resposta a estrès. A continuació, les cèl·lules van ser exposades a 0,8 M KCl i els nivells de proteïna van ser analitzats a diferents temps mitjançant *Western Blot*. Tal i com es mostra a la figura 5, els nivells de la proteïna Srk1 disminueixen en resposta a estrès. Aquests resultats recolzen la nostra hipòtesi, que la fosforilació de la Srk1 per la Sty1 induïx la seva inestabilitat i degradació.

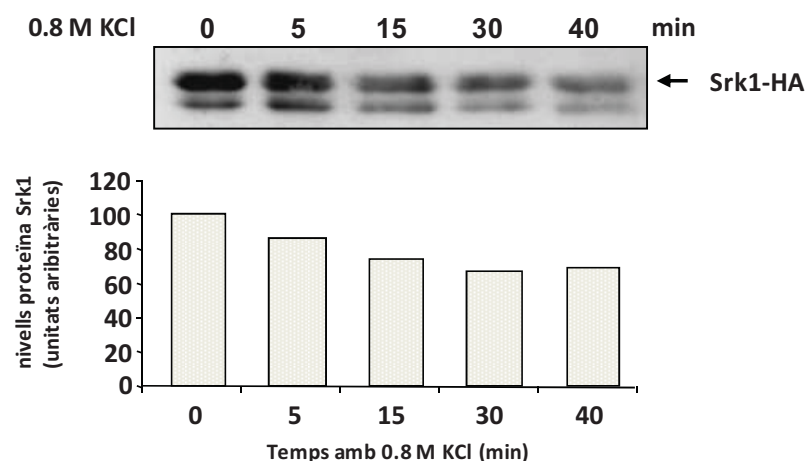


Figura 5. Estabilitat de la Srk1 *in vivo*. Cèl·lules *srk1-HA* van ser tractades amb cicloheximida (100 µg/ml) i exposades a estrès osmòtic (0,8 M KCl). Les mostres van ser processades per monitoritzar els nivells de proteïna amb l'anticòs anti-HA (panell superior) i quantificades i normalitzades amb els nivells control de la Cdc2 (panell inferior), detectats amb l'anticòs anti-PSTAIR.

3. La Srk1 fosforilada en T463 es dissocia de la MAPK Sty1

El grup de la Dra. Jannet Quinn va descriure que la Srk1 també s'uneix *in vivo* tant a la forma activa com a la inactiva de la MAPK Sty1 (Smith *et al.*, 2002). Els resultats obtinguts fins el moment mostren que l'estabilitat de la Srk1 probablement requereix de la seva unió amb la Sty1 (ja que en cèl·lules $\Delta sty1$ no es detecten nivells de proteïna de la Srk1). Per altra banda, hem



observat que la fosforilació de la *Srk1* en la T463 per part de la *Sty1* promou la seva inestabilitat (fet que observem en el mutant *Srk1-T463D*). Aquestes observacions suggereixen que la fosforilació de la *Srk1* per la *Sty1* indueix, a més a més de l'activació de la primera, la dissociació d'ambdues proteïnes. Amb la finalitat de determinar si la fosforilació de la *Srk1* per la *Sty1* promou la seva separació d'ambdues proteïnes, vam examinar la unió entre la *Sty1* i els fosfomutants de la *Srk1*. Així doncs, les proteïnes *Srk1*, *Srk1-T463D* i *Srk1-T463A* es van sobreexpressar i immunoprecipitar per examinar la seva unió amb la *Sty1* mitjançant *Western Blot*. Tal i com es mostra en la figura 6A, la *Srk1-T463D* presenta menor afinitat que la *Srk1* i la *Srk1-T463A* per la *Sty1*, indicant que la fosforilació de la *Srk1* indueix la seva dissociació de la *Sty1*.

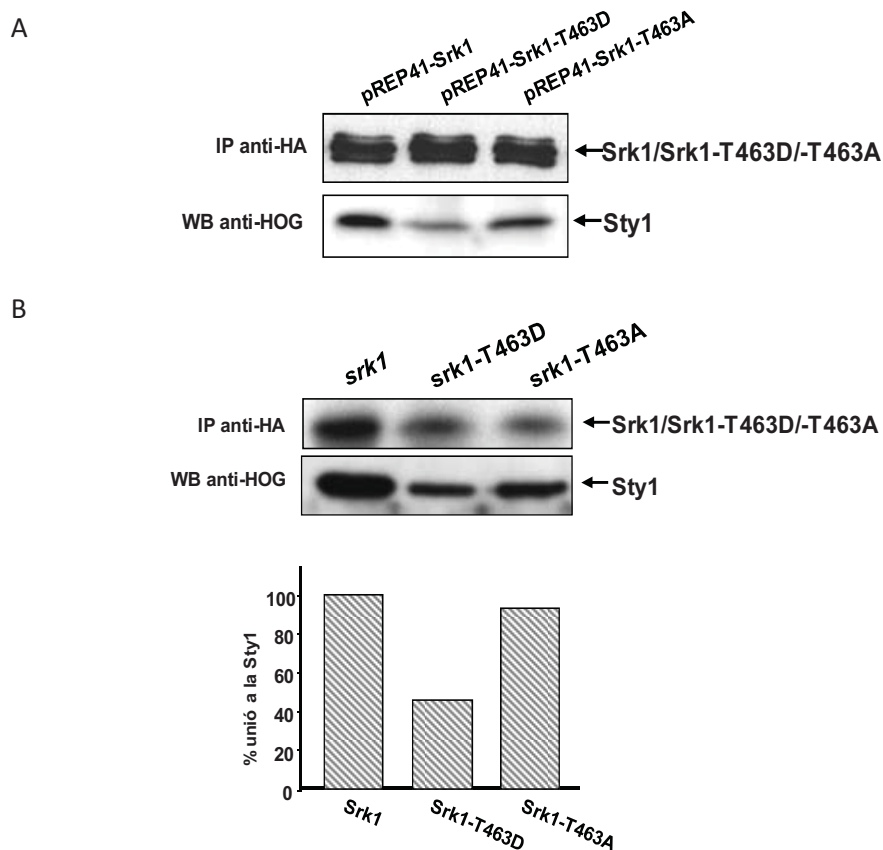


Figura 6. Anàlisi de la unió de la *Srk1* i la *Sty1*. (A) *srk1*, *srk1-T463D* i *srk1-T463A* sobreexpressats sota el control del promotor *nmt41* van ser immunoprecipitats amb anticòs anti-HA (carril superior) i la *Sty1* unida va ser detectada amb anti-HOG (panell inferior). (B) El mateix assaig que en A va ser dut a terme immunoprecipitant *Srk1*, *Srk1-T463D* i *Srk1-T463A* controlades pel promotor endogen. La unió de la *Srk1* amb la *Sty1* va ser normalitzada en relació a la *Srk1* immunoprecipitada (gràfic).



Per tal de confirmar aquesta observació, i evitar possibles artefactes de la sobreexpressió, es va realitzar el mateix experiment immunoprecipitant la Srk1, Srk1-T463D i Srk1-T463A de cèl·lules on el gen endogen *srk1* havia estat reemplaçat per *srk1-HA*, *srk1-T463D-HA* i *srk1-T463A-HA*. La unió d'aquestes proteïnes amb la Sty1 es va analitzar mitjançant *Western Blot*. Tal com esperàvem, la Srk1-T463A expressada sota el control del promotor endogen, i per tant, a nivells fisiològics, presenta una afinitat per la Sty1 similar a la de la Srk1, mentre que la Srk1-T463D presenta una afinitat reduïda per la MAPK (figura 6B).

4. La unió entre la Srk1 i la Sty1 inhibeix l'activitat de la primera

El fet que la fosforilació de la Srk1 en la T463 per la Sty1 l'activi, i que posteriorment indueixi la seva dissociació suggereix que, probablement, la unió entre ambdues proteïnes inhibeix l'activitat de la Srk1. Així doncs, vam decidir examinar l'activitat de la Srk1 unida i no unida a la Sty1 inactiva (Sty1KA) i posteriorment, vam realitzar un assaig quinasa *in vitro*. Tal i com havíem previst, l'activitat de la Srk1 disminueix quan es troba unida a la Sty1KA, en comparació amb l'activitat que presenta quan es troba sola (figura 7).

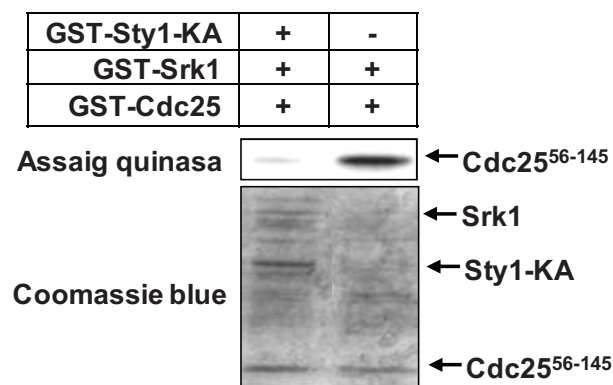


Figura 7. Activitat de la Srk1 unida a Sty1. Assaig quinasa *in vitro*. GST-Srk1 i GST-Srk1 pre-incubada amb GST-Sty1-KA van ser analitzades utilitzant el fragment de Cdc25 (Cdc25⁵⁶⁻¹⁴⁵) com a substrat (panell superior). El gel SDS-PAGE de l'assaig quinasa va ser tenyit amb Coomassie Blue (panell inferior).



ESTUDI DE LA FUNCIÓ DE *Srk1* EN RESPOSTA A ESTRÈS

5. La fosforilació de la *Srk1* en T463 és necessària per a la resposta a estrès osmòtic

A continuació vam decidir analitzar la resposta a estrès dels fosfomutants de la *Srk1*. Amb aquesta finalitat, cèl·lules *wt*, Δ *srk1*, Δ *sty1*, *srk1-T463D* i *srk1-T463A* van ser plaquejades en medi ric contenint 0,8M KCl, per tal d'induir estrès osmòtic. En la figura 8A s'observa com les cèl·lules que contenen l'al·lel *srk1-T463D* són viables, mentre que aquelles amb l'al·lel *srk1-T463A* són igual de sensibles a estrès que la soca Δ *srk1*. Com a control de sensibilitat a estrès osmòtic hem utilitzat la soca Δ *sty1*.

Si a més a més analitzem l'activitat quinasa d'aquests fosfomutants (figura 8B), veiem que el mutant *Srk1-T463D* és el que presenta una major activitat en termes d'autofosforilació, mentre que el mutant *Srk1-T463A* presenta una activitat similar a la de la *Srk1*. Tot això indica, que per a respondre a l'estrès, no és suficient amb que la *Srk1* sigui catalíticament activa, sinó que cal que sigui fosforilada per la MAPK *Sty1*.

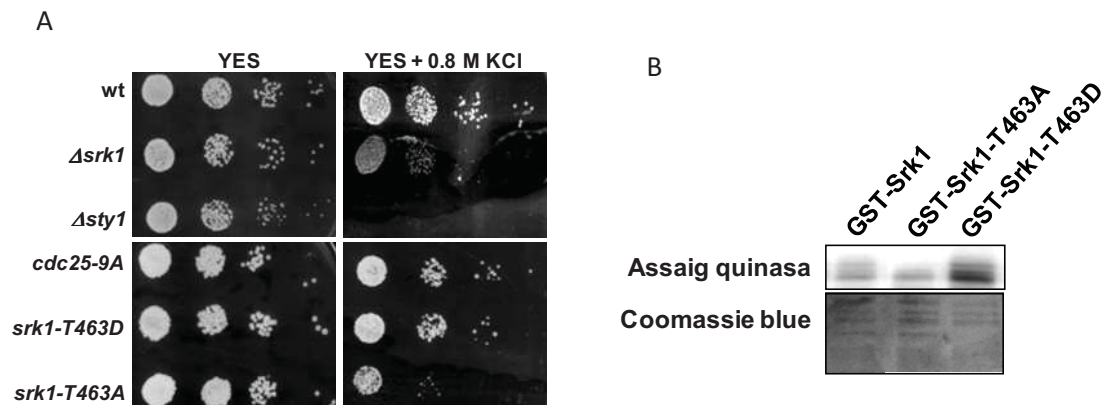


Figura 8. Resposta a estrès de *Srk1-T463A* i *Srk1-T463D*. (A) Dilucions seriades de cultius exponencials de les soques *wt*, Δ *srk1*, Δ *sty1*, *cdc25-9A*, *srk1-T463D* i *srk1-T463A*. Les cèl·lules van ser plaquejades en medi ric (YES) i medi ric amb 0,8 M KCl (YES+0,8M KCl). La formació de colònies va ser analitzada després de dos dies de creixement a 30°C. (B) Assaig quinasa *in vitro* dels fosfomutants de la *Srk1* purificats de bacteri. GST-Srk1, GST-Srk1-T463D i GST-Srk1-T463A van ser assajats i la seva autofosforilació mesurada (panell superior). El gel SDS-PAGE de l'assaig quinasa va ser tenyit amb Coomassie Blue (panell inferior).



6. L'activitat de la *Srk1* és necessària per a la inhibició de G2/M en resposta a estrès

Com s'ha descrit en treballs anteriors, en el llevat de fissió, la *Srk1* regula negativament l'inici de la mitosi (López-Avilés *et al.*, 2005). Per tal de determinar si l'activació de la *Srk1* en resposta a estrès osmòtic inhibeix la transició G2/M, vam analitzar la progressió del cicle cel·lular en cèl·lules $\Delta srk1$ sota condicions d'estrès. Cèl·lules *wt* i $\Delta srk1$ van ser sincronitzades en fase S amb HU (hidroxiurea) i posteriorment alliberades en presència de KCl (0,6 M). Dissortadament, vam observar que ambdues soques presentaven el mateix patró de progressió en el cicle, una aturada temporal abans de mitosi. En aquest punt ens vam plantejar que de la mateixa manera que la via de resposta a dany al DNA, la via de resposta a estrès osmòtic actua controlant dues respostes: la primera retardant la progressió del cicle cel·lular, i la segona permetent la ràpida resposta a l'estrès. Així doncs, per tal de determinar l'efecte de la deleció de *srk1* en la cinètica del cicle cel·lular *per se*, l'experiment es va repetir en un fons genètic que no permetés la resposta a estrès osmòtic. Com ja s'ha comentat durant la introducció, l'exposició de cèl·lules de llevat a augments en l'osmolaritat del medi indueix la síntesi i activació del factor de transcripció *Atf1*, el qual és responsable de la transcripció de diversos gens necessaris per a la resposta a estrès i posterior adaptació (Shiozaki and Russell, 1996; Wilkinson *et al.*, 1996). Així doncs, el gen *atf1* va ser deletat per tal d'evitar la resposta immediata. Les cèl·lules $\Delta atf1$ i el doble mutant $\Delta atf1 \Delta srk1$ van ser sincronitzades en fase S amb HU i alliberades en absència o presència de 0,6M KCl. En aquest cas, vam observar com, en condicions control, les dues soques avancen en el cicle de forma sincrònica assolint un pic de septació d'un 40% als 150 minuts posteriors al bloqueig. Les cèl·lules $\Delta atf1$ presenten un retràs en la transició G2/M, al igual que ja estava descrit per les cèl·lules *wt* (figura 9A), mentre que el doble mutant acaba entrant en cicle. Aquest resultat indica que la *Srk1* és necessària per inhibir la transició G2/M en presència d'estrès osmòtic.

A continuació vam voler analitzar l'activitat *in vivo* de la *Srk1* en resposta a estrès osmòtic. Cèl·lules *srk1-HA* i *srk1-KA-HA* van ser exposades a diferents concentracions d'estrès osmòtic (0,6 i 0,8 M KCl) i posteriorment la *Srk1* va ser



immunoprecipitada. Com a substrat de l'assaig quinasa es va utilitzar el fragment de la Cdc25 (Cdc25⁵⁶⁻¹⁴⁵). Com s'observa en la figura 9B, la Srk1 s'activa en resposta a estrès osmòtic de manera dosi-depenent i fosforila la Cdc25. Tal com indica el resultat obtingut amb el mutant inactiu de la Srk1 (Srk1-KA), la fosforilació de Cdc25 és específica de la Srk1 i no d'una altra quinasa que poguéssim estar immunoprecipitant amb les nostres mostres.

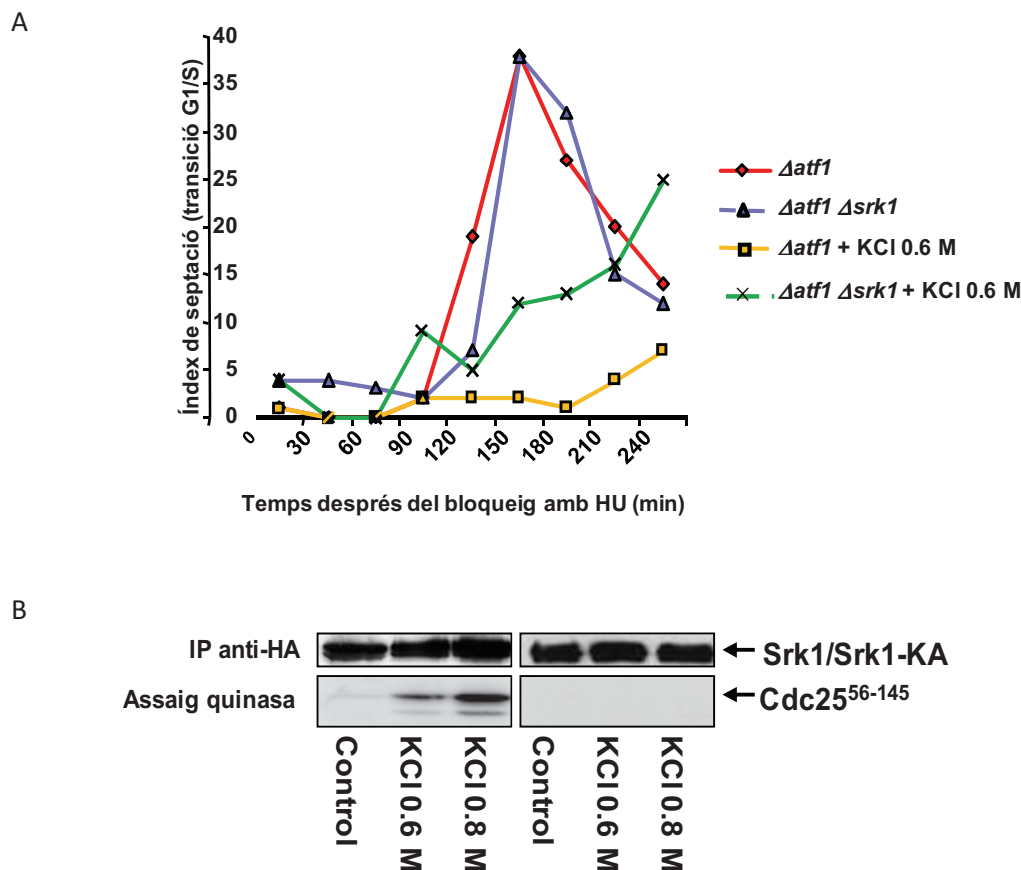


Figura 9. Regulació de la transició G2/M per l'activitat de la Srk1 en resposta a estrès. (A) Cèl·lules $\Delta atf1$ i $\Delta atf1 \Delta srk1$ van ser sincronitzades amb HU (10 mM) durant 3 h a 25°C. A continuació, els cultius van ser alliberats en medi YES en presència o absència de 0,6M KCl. L'índex de septació, indicador del percentatge de cèl·lules que han finalitzat la mitosi, va ser mesurat a diferents temps corresponents als minuts després de l'alliberació de la HU i l'addició de KCl. (B) La Srk1 activada en resposta a estrès fosforila la Cdc25. Les cèl·lules van ser exposades a diferents dosis de KCl (0,6M i 0,8M) durant 15 minuts i a continuació, la Srk1-HA (panell esquerre) i la Srk1-KA-HA (panell dret) van ser immunoprecipitades amb l'anticòs anti-HA (panells superiors). L'activitat quinasa va ser assajada utilitzant el fragment de la Cdc25 (Cdc25⁵⁶⁻¹⁴⁶) com a substrat (panells inferiors).



Després d'observar que en resposta a estrès, la Cdc25 es substrat de la Srk1, vam voler analitzar la sensibilitat a estrès osmòtic del mutant *cdc25-9A*. Aquest mutant conté nou residus consensus de fosforilació per la Srk1 mutats a alanina (Ala) i per tant, expressa una proteïna (Cdc25-9A) incapaç de ser fosforilada per la Srk1 (López-Avilés *et al.*, 2005). Si observem la figura 8A, veurem que les cèl·lules *cdc25-9A* presenten sensibilitat parcial al medi que conté 0,8M KCl en comparació amb les cèl·lules *wt*. Per contra, aquest mutant no és tant sensible a estrès osmòtic com les cèl·lules $\Delta srk1$ o $\Delta sty1$. Això indica que probablement, la Srk1 tingui altres substrats diferents a la Cdc25 en resposta a estrès osmòtic, i per tant, seria molt interessant d'analitzar aquest aspecte.

7. L'exportació nuclear de la Cdc25 és dependent de la Srk1 en condicions d'estrès

Com s'havia descrit anteriorment en el nostre grup (López-Aviles *et al.*, 2005), la Cdc25 és substrat directe de la Srk1. A més a més, s'havia observat que dependent de l'activació de la Srk1 s'indueïa la interacció entre la Cdc25 i Rad24 i la localització citoplasmàtica de la Cdc25.

Amb aquesta antecedents vam decidir analitzar la localització subcel·lular de la Cdc25 durant la resposta a estrès i si aquesta era dependent de la Srk1. Cèl·lules *wt* i $\Delta srk1$ que contenen la Cdc25 endògena fusionada al GFP (Cdc25-GFP) van ser sincronitzades en fase S amb HU (*Materials i Mètodes; apartat 3.1.2*) i alliberades en medi ric amb 0,6M KCl. L'obtenció d'imatges *in vivo* es va dur a terme mitjançant la microscòpia confocal de *time-lapse*. Com s'observa en la figura 10A, en cèl·lules *wild type*, la Cdc25 és ràpidament exportada del nucli en resposta a estrès osmòtic (10 minuts) i mantinguda al citoplasma durant tot el *time-course*. En canvi, en el cas de la soca Cdc25-GFP $\Delta srk1$, la Cdc25 no és exportada del nucli (figura 10B), fet que permet concloure que la Cdc25 és exportada del nucli en resposta a estrès osmòtic de manera dependent de la Srk1.

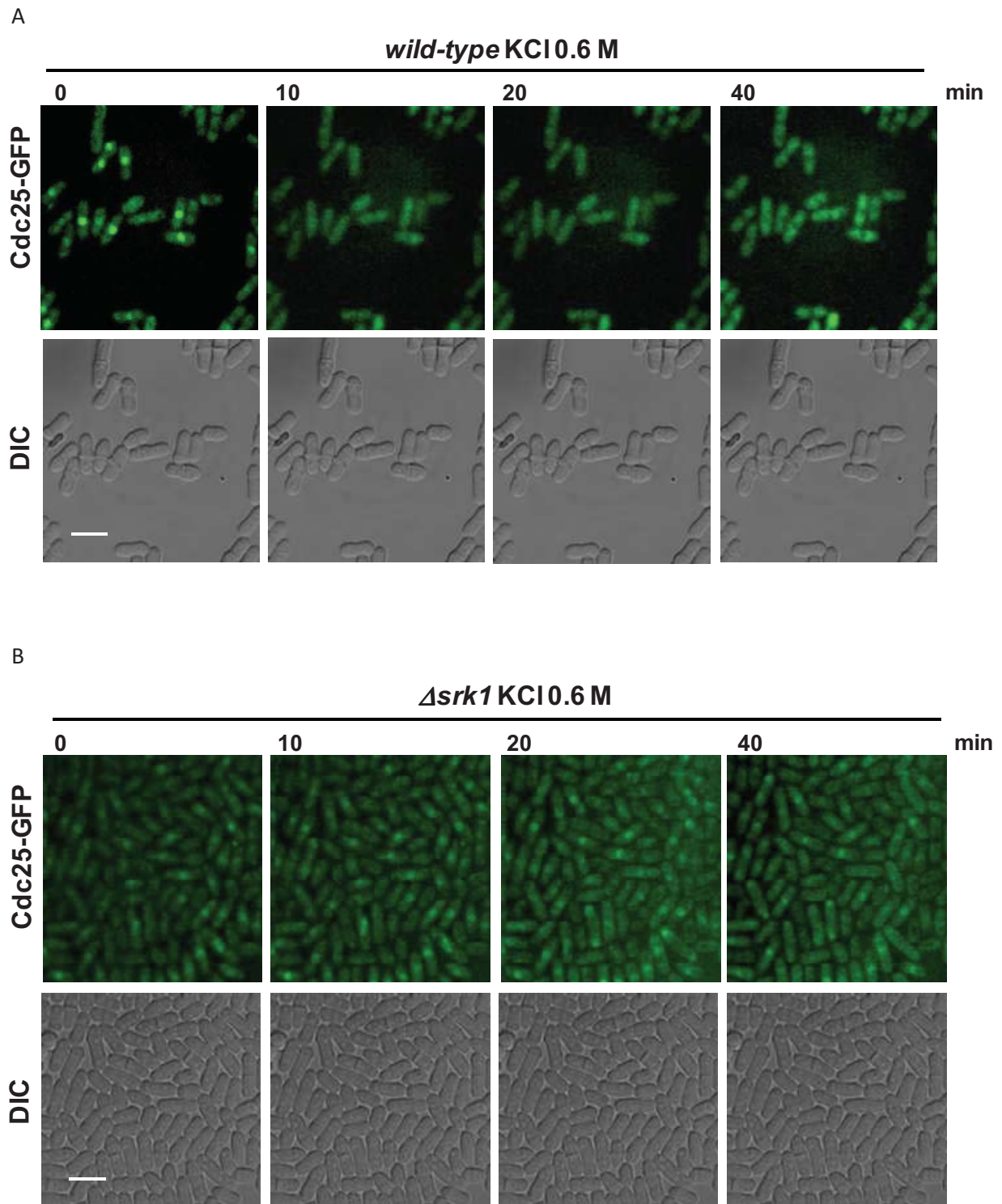


Figura 10. Localització de la Cdc25 en resposta a estrès. Cèl·lules *wild type* (A) i $\Delta srk1$ (B) contenint la Cdc25 endògena fusionada a GFP (Cdc25-GFP) van ser sincronitzades amb HU (10 mM) 3 h a 25°C i alliberades durant 60 minuts en medi ric. A continuació, les dues soques van ser exposades a medi YES+0,6M KCl. La localització de la Cdc25-GFP es va monitoritzar mitjançant microscòpia confocal de *time-lapse* en intervals de 10 minuts. Simultàniament, es van adquirir les imatges de contrast d'interferència diferencial (DIC). Barra d'escala, 10 μ m.



ESTUDI DE LA REGULACIÓ NEGATIVA DE LA VIA DE LES MAPKs PER LA *Srk1*

8. La deleció del gen *srk1* comporta una hiperactivació de la Sty1

Sabent que la *Srk1* és substrat directe de la Sty1 i coneixent el seu paper en resposta a estrès osmòtic, el següent objectiu que ens vam plantejar va ser estudiar la resposta a estrès de cèl·lules $\Delta srk1$. Amb aquesta finalitat, vam monitoritzar la fosforilació de la Sty1 durant un *time-course* d'estrès osmòtic (1M KCl) mitjançant *Western Blot* amb l'anticòs anti-P-p38 en cèl·lules *wt*, $\Delta srk1$ i *srk1-K153A*. Com s'observa en la figura 11, el tractament amb estrès osmòtic condueix a l'activació de la Sty1 en les tres soques, però sorprenentment, en les cèl·lules delecionades per *srk1* la fosforilació de la Sty1 es manté al llarg del temps. A més a més, aquest efecte és depenent de l'activitat de la *Srk1*, ja que en el mutant catalíticament inactiu (*Srk1KA*), també s'observa una hiperactivació de la via.

Aquest fet indicaria que, en absència de la *Srk1* i més concretament quan aquesta és inactiva, la Sty1 no pot ser inhibida correctament.

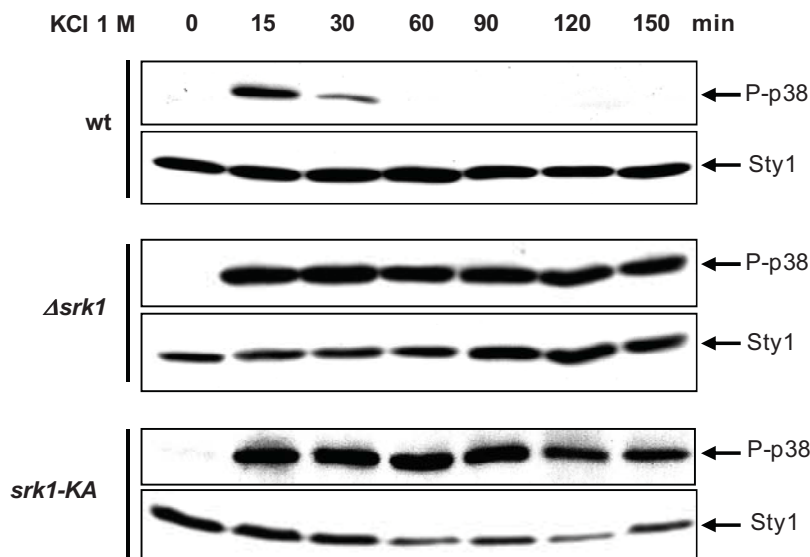


Figura 11. Cinètica d'activació de la Sty1. Cèl·lules *wt*, $\Delta srk1$ i *srk1-KA* van ser tractades amb KCl 1 M i es van recollir mostres als temps indicats. A continuació, els extractes cel·lulars es van analitzar mitjançant *Western Blot* emprant anticossos anti-P-p38 (panells superiors) i anti-Hog1 (panells inferiors) per detectar la forma activa i els nivells totals de la Sty1, respectivament.



9. La sobreexpressió de la *Srk1* disminueix la fosforilació de la *Sty1*

Per tal de determinar si la hiperactivació de la via era dependent de la *Srk1* vam realitzar l'experiment contrari. Vam sobreexpressar la *Srk1* i la *Srk1KA* sota el control del promotor *nmt1* i vam estudiar l'activació de la *Sty1* en resposta a estrès d'aquestes cèl·lules. En concordança amb el resultat anterior, en aquest cas vam observar que la sobreexpressió de la *Srk1* disminueix l'activació de la *Sty1* (figura 12A; panell del mig). Aquest no és un artefacte de la sobreexpressió perquè la resposta a estrès és normal en cèl·lules on s'indueix l'expressió de la quinasa inactiva *Srk1KA* (figura 12B; panell del mig). A més a més, sembla ser un fet comú a diferents tipus d'estrès, ja que en el cas d'estrès oxidatiu també s'observa una disminució de l'activació de la *Sty1* en sobreexpressar la *Srk1*.

Aquests resultats indiquen que la sobreexpressió de la *Srk1* impedeix una correcta activació de la *Sty1* en resposta a estrès.

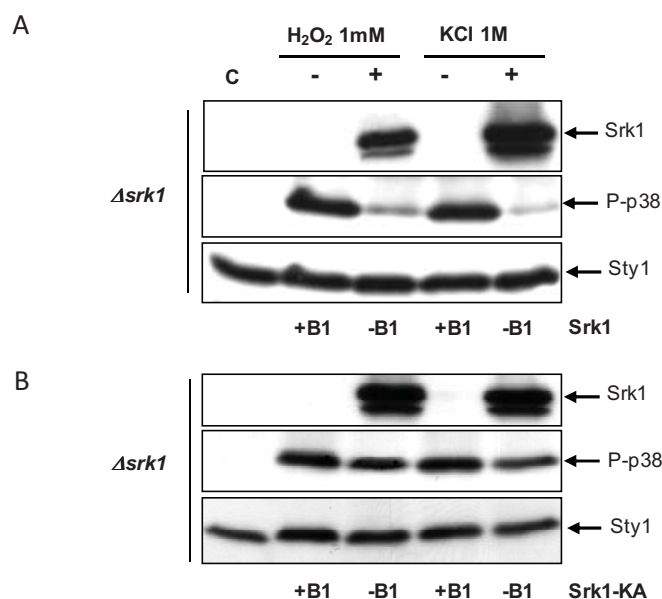


Figura 12. Efecte de la sobreexpressió de la *Srk1* sobre l'activació de la *Sty1*. Cèl·lules $\Delta srk1$ transformades amb els plàsmids pREP1-*srk1*-HA (A) i pREP1-*srk1KA*-HA (B) van ser crescudes en presència o absència (sobreexpressió) de B1 durant 24 hores. A continuació els cultius van ser dividits i tractats o no amb H_2O_2 1mM i KCl 1M durant 30 min i 15 min, respectivament. Els extractes cel·lulars es van analitzar mitjançant *Western Blot* emprant els anticossos anti-HA (per detectar la *Srk1* com a control de la sobreexpressió; panells superiors), anti-P-p38 (per monitoritzar la forma activa de la *Sty1*; panells del mig) i anti-Hog1 (per a detectar es nivells de *Sty1* total; panells inferiors).

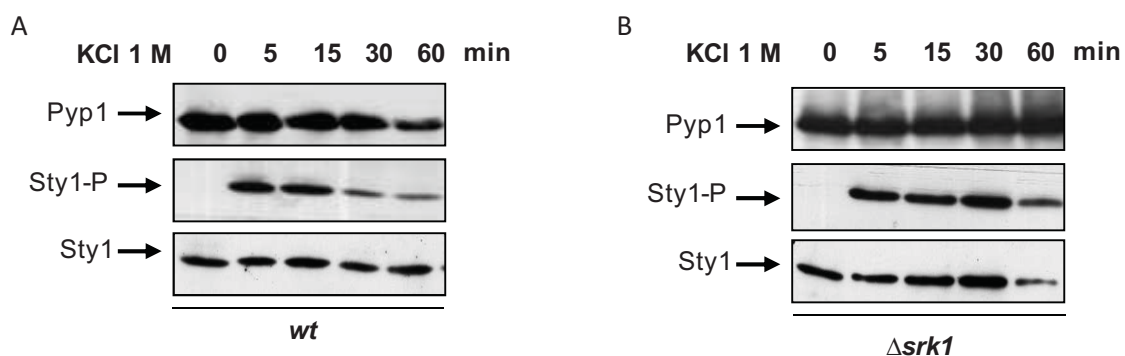


10. La *Srk1* no regula els nivells de les fosfatases *Pyp1* i *Pyp2*

Els resultats anteriors indiquen que la *Srk1* podria estar involucrada en el mecanisme de retroalimentació negativa de la via per tal d'evitar la toxicitat produïda per una hiperactivació d'aquesta. Així doncs, se'ns planteja la següent qüestió: a través de quina/es proteïna/es podria estar actuant? Una primera aproximació podria ser que la *Srk1* estabilitzés les fosfatases encarregades d'inactivar la *Sty1*, la *Pyp1* i la *Pyp2*. Per tal de comprovar-ho vam estudiar els nivells de les fosfatases en una soca $\Delta srk1$ en comparació amb una *wt*. Com s'observa en la figura 13, els nivells de *Pyp1* (figura 13B; panell superior) i *Pyp2* (figura 13E; panell superior) no varien respecte el control (figura 13A i D; panells superiors) en cèl·lules $\Delta srk1$, fet que indica que els nivells d'aquestes fosfatases no estan regulats per la *Srk1*.

Per altra banda, però, aquest experiment ens va servir per demostrar que en cèl·lules $\Delta srk1$ la fosforilació mantinguda de la *Sty1* correspon realment a la forma activa de la MAPK, ja que l'expressió del gen *pyp2* és totalment dependent de l'activació de la *Sty1* en resposta a estrès (Chen *et al.*, 2003; figura 13E, panell superior).

Com a control negatiu de l'expressió d'aquestes fosfatases, es va realitzar el mateix experiment en cèl·lules $\Delta wis1$, on la *Sty1* no pot ser activada en resposta a estrès. Tal i com es mostra en la figura 13F (panell superior), observem que no hi ha transcripció de *Pyp2*, fet que es veu reflectit en la manca de nivells de proteïna observats en el *Western Blot*. En el cas de la *Pyp1*, ja s'havia descrit que aquesta fosfatasa presenta una expressió constitutiva independent de l'activació de la *Sty1*. (figura 13C, panell superior).



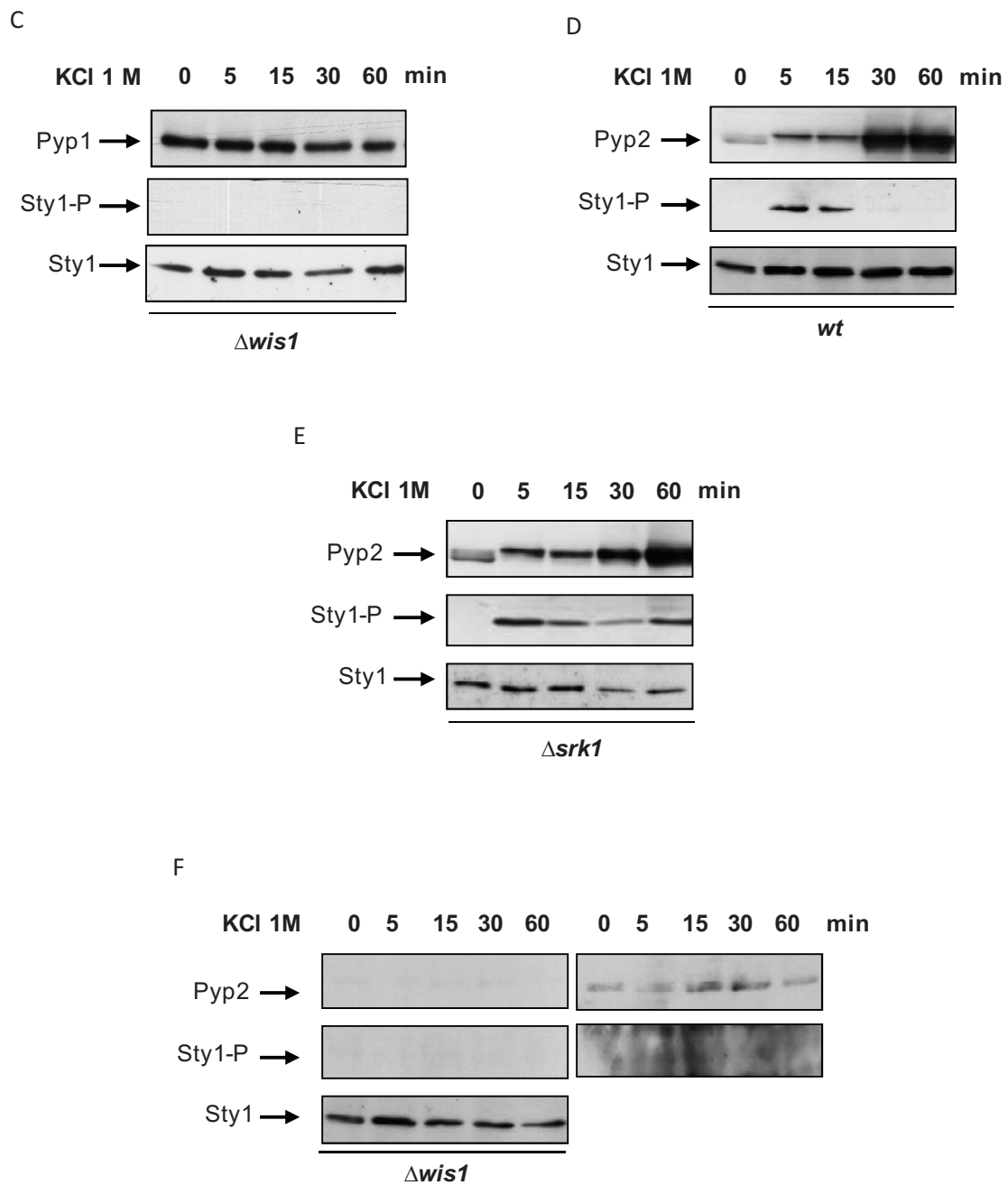


Figura 13. Nivells de les Pyp's en reposta a estrès. (A) (B) (D) (E) Cèl·lules *wt* i *Δsrk1* amb els gens *pyp1* i *pyp2* endògens fusionats a l'epítip 12myc van ser sotmeses a estrès osmòtic (1M KCl) i els nivells de fosfatases monitoritzats mitjançant *Western Blot* amb l'anticòs anti-myc (panells superiors). L'activació de la Sty1 va ser detectada amb anticòs anti-P-p38 (panells del mig) i els nivells totals de MAPK amb anti-Hog1 (panells inferiors). (C) (F) El mateix que en A, B, D i E per una soca *Δwis1*.



11. L'efecte de la sobreexpressió de la *Srk1* en l'activació de la *Sty1* no depèn de les fosfatases *Pyp1* i *Pyp2*

Donat que la *Srk1* no regula els nivells de les fosfatases *Pyp1* i *Pyp2*, una altra possibilitat seria que en regulés la seva activitat. Així, si la *Srk1* activés les fosfatases, seria un mecanisme de retroalimentació negativa que permetria silenciar ràpidament la via per tal d'evitar la toxicitat deguda a una hiperactivació de la *Sty1*. En el nostre cas, en sobreexpressar la *Srk1* estariem evidenciant un mecanisme que en condicions normals només es donaria després d'un tractament perllongat amb estrès. Amb aquesta finalitzat vam decidir estudiar l'efecte de la sobreexpressió de la *Srk1* en soques delecionades per *pyp1* o *pyp2*. Tal i com es mostra en la figura 14, la disminució de la fosforilació de la *Sty1* en sobreexpressar la *Srk1* no depèn de les *Pyp*'s, ja que la resposta en ambdós mutants és igual a la del *wt*. Cal destacar l'observació que en cèl·lules $\Delta pyp1$ s'observa una activació basal de la *Sty1*, fet que és lògic, ja que en condicions normals, els nivells basals de la *Pyp1* serveixen per inactivar la *Sty1*.

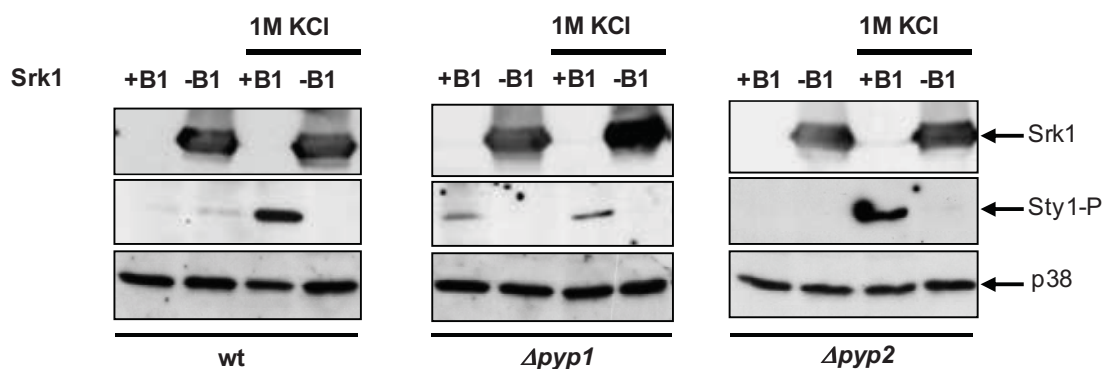


Figura 14. Activitat de la *Sty1* en sobreexpressar *Srk1* en cèl·lules $\Delta pyp1$ i $\Delta pyp2$. Cèl·lules *wt*, $\Delta pyp1$ i $\Delta pyp2$ transformades amb el plàsmid pREP1-*srk1*-HA van ser crescudes en presència o absència (sobreexpressió) de B1 durant 24 hores. A continuació els cultius van ser dividits i tractats o no amb KCl 1M durant 15 min. Els extractes cel·lulars es van analitzar mitjançant *Western Blot* emprant els anticossos anti-HA (per detectar la *Srk1* com a control de la sobreexpressió; panells superiors), anti-P-p38 (per monitoritzar la forma activa de la *Sty1*; panells del mig) i anti-Hog1 (per a detectar els nivells de la *Sty1* total; panells inferiors).



12. La doble deleció de les Pyp's i la Srk1 comporta un augment de sensibilitat a estrès osmòtic

Els resultats obtinguts fins el moment indiquen que la Srk1 no regula negativament la via de les MAPKs a través de les fosfatases Pyp1 i Pyp2. Aquest fet es confirma en analitzar la sensibilitat a estrès de les soques *wt*, $\Delta pyp1$, $\Delta pyp1\Delta srk1$, $\Delta pyp2$, $\Delta pyp2\Delta srk1$ i $\Delta srk1$ on veiem que els dobles mutants presenten major sensibilitat a les concentracions d'estrès assajades (0,6 i 0,8 M KCl) que els mutants senzills de les Pyp's (figura 15). Aquest resultat indica que la regulació negativa de la via per part de la Srk1 i les Pyp's és additiva.

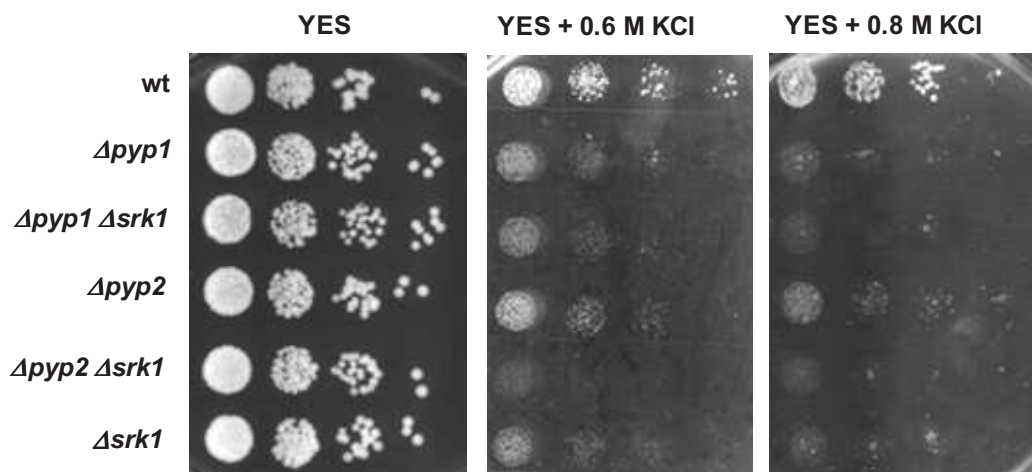


Figura 15. Sensibilitat a estrès de les deleccions de les Pyp's i la Srk1. Dilucions seriades de cultius exponencials de cèl·lules *wt*, $\Delta pyp1$, $\Delta pyp1\Delta srk1$, $\Delta pyp2$, $\Delta pyp2\Delta srk1$ i $\Delta srk1$ van ser plaquejades en medi ric (YES) i medi ric amb 0,6 M i 0,8 M KCl (YES+0,6M KCl i YES+0,8M KCl). La formació de colònies va ser analitzada després de 2 dies de creixement a 30°C.

13. La Srk1 fosforila la Wis1 *in vitro*

Donats els resultats anteriors, una altra possibilitat és que la Srk1 estigui regulant negativament la via a través de la MAPKK Wis1 mitjançant la seva fosforilació (fosforilació inhibidora). Prèviament, ja s'havia observat que la Wis1 pateix modificacions post-traduccionals diferents a les fosforilacions consens als residus Ser469 i Thr473. Experiments realitzats pel Dr. Rodríguez-Gabriel mostren que la Wis1 pateix una fosforilació després del tractament amb estrès



osmòtic que es manté en el temps, indicant que no pot ser una fosforilació activadora donat que persisteix quan la Sty1 ja és inactiva (comunicació personal). Aquesta informació ens va fer pensar que potser la Srk1 era la responsable d'aquesta fosforilació inhibidora sobre la Wis1 i que seria a través d'aquest mecanisme que la Srk1 contribuiria a silenciar la via.

Per tal de comprovar que la Wis1 és substrat directe de la Srk1 vam realitzar un assaig quinasa *in vitro* amb la GST-Srk1 com a quinasa i la GST-Wis1K349R (catalíticament inactiva) com a substrat. Com s'observa en la figura 16, la Srk1 fosforila la Wis1 *in vitro*.

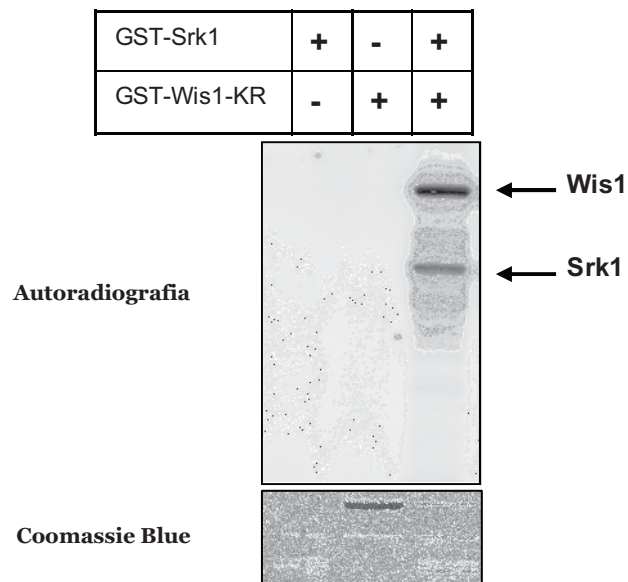


Figura 16. La Srk1 fosforila la Wis1 *in vitro*. Assaig quinasa *in vitro* amb la proteïna purificada de bacteri GST-Wis1K349R com a substrat de la quinasa GST-Srk1 (panell superior). Tinció amb Coomassie Blue del gel (panell inferior).



14. La *Srk1* no és la responsable de la fosforilació mantinguda de *Wis1* en resposta a estrès osmòtic

Com ja s'ha comentat anteriorment, la *Wis1* pateix un retardament en la seva mobilitat electroforètica en resposta a estrès osmòtic que es manté al llarg del temps molt després que la *Sty1* ja sigui inactiva. Donat que havíem vist que la *Wis1* era substrat de la *Srk1* *in vitro*, vam pensar que podria ser l'encarregada de la fosforilació mantinguda de la *Wis1* després de la resposta a estrès.

Per tal de confirmar-ho, vam decidir comparar la resposta a estrès de la *Wis1* en cèl·lules *wt* i Δ *srk1*. Vam tractar cèl·lules *Wis1*-12myc i *Wis1*-12 myc Δ *srk1* amb estrès osmòtic (1M KCl) i vam analitzar la *Wis1* mitjançant *Western Blot*. Com s'observa en la figura 17, tant en la soca *wt* com en la Δ *srk1*, la *Wis1* pateix un *shift* que es manté durant el temps (a temps on la *Sty1* ja s'ha inactivat) i que, aparentment, no és inhibït en cèl·lules amb manca de *Srk1*. Aquest resultat indicaria que la *Srk1* no és la responsable de la fosforilació mantinguda de la *Wis1* en resposta a estrès osmòtic.

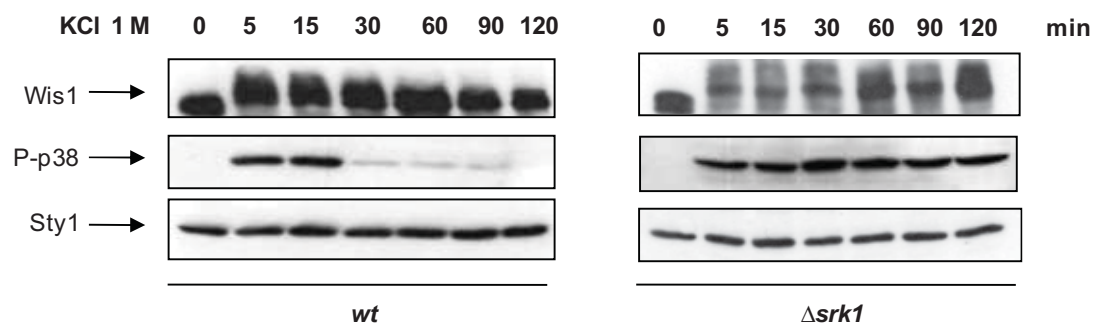


Figura 17. Anàlisi de la *Wis1* en resposta a estrès. Cèl·lules *wt* i Δ *srk1* amb el gen *wis1* endogen fusionat a l'epítot 12myc van ser sotmeses a estrès osmòtic (1M KCl) i les mostres van ser recollides als diferents temps indicats. Els extractes van ser analitzats mitjançant *Western Blot* amb anticossos anti-myc (per detectar la *Wis1*; panells superiors), anti-P-p38 (per monitoritzar l'activació de la *Sty1*; panells del mig) i anti-PSTAIR (com a control de càrrega; panells inferiors).



15. Efecte de la resposta a estrès de la Wis1 no fosforilable per la Srk1

Malgrat que el retardament electroforètic de la Wis1 no sembla dependre de la Srk1 vam voler estudiar si la Srk1 era capaç de fosforilar la Wis1 *in vivo*.

Amb aquesta finalitat, vam analitzar la seqüència de la MAPKK per identificar els residus consensus de fosforilació per la Srk1. Tal i com es mostra en la figura 18, la Wis1 presenta 4 residus *consensus* per la Srk1 (R-X-X-S/T): la Ser17 (continguda dins la seqüència NES; *Resultats* figura 20A), la Ser96, la Ser159 i la Ser226 (continguda dins el domini d'unió a la MAPK Sty1; *Resultats* figura 20A).

MSSPNNQPLS	CSLRQLSISP	TAPPGDVGTP	GSLLSLSSSS	SSNTDSSGSS	LGSLSLNSNS
SGSDNDSKVS	SPSREIPSDP	PLPRAVPTVR	LGRSTSSRSR	NSLNLDMKDP	SEKPRRSLPT
AAGQNNIGSP	PTPPGPFPGG	LSTDIQEKLK	AFHASRSKSM	PEVVKISSP	TTPIVGMGQR
GSYPLNSQL	AGRLSNPDK	SPNMPESGLA	KSLAAARNPL	LNRPTSFNRQ	TRIRRAPPK
LDLSNSNPTS	PVSPSSMASR	RGLNIPPTLK	QAVSETPFST	FSDILDAKSG	TLNFKNKAVL
NSEGVNFSSG	SSFRINMSEI	IKLEELGKGN	YGVVYKALHQ	PTGVTMALKE	IRLSLEEATF
NQIIMELDIL	HKAVSPYIVD	FYGAFVVEGS	VFICMEYMDA	GSMDKLYAGG	IKDEGLVART
YAVVQGLKT	LKEEHNIHR	DVKPTNVLVN	SNGQVKLCDF	GVSGNLVASI	SKTNIGCQSY
MAPERIRVGG	PTNGVLTYTV	QADVWSLGLT	ILEMALGAYP	YPPEYSYSIF	AQLSAICDGD
PPSLPDSFSP	EARDFVNKCL	NKNPSLRPDY	HELANHPWLL	KYQNADVDMA	SWAKGALKEK
GEKRS					

Figura 18. Residus consensus per la Srk1 en Wis1. Seqüència proteica de la Wis1 amb els residus consensus de fosforilació per la Srk1 marcats en vermell.

A continuació, vam decidir mutar els 4 possibles residus fosforilables per Srk1 dins la seqüència de la Wis1. Així doncs, mitjançant mutacions puntuals els vam mutar a un residu no fosforilable, l'alanina (Wis1-4A). En aquest cas esperàriem que la fosforilació observada *in vitro* per part de la Srk1 desaparegués. Així, un cop obtingut el mutant, es van expressar les proteïnes de fusió a GST en bacteri, GST-Wis1 i GST-Wis1-4A-KR (forma inactiva) i es van utilitzar en un assaig quinasa *in vitro* com a substrat de la GST-Srk1. Com s'observa en la figura 19, la Srk1 encara és capaç de fosforilar la Wis1-4A-KR.

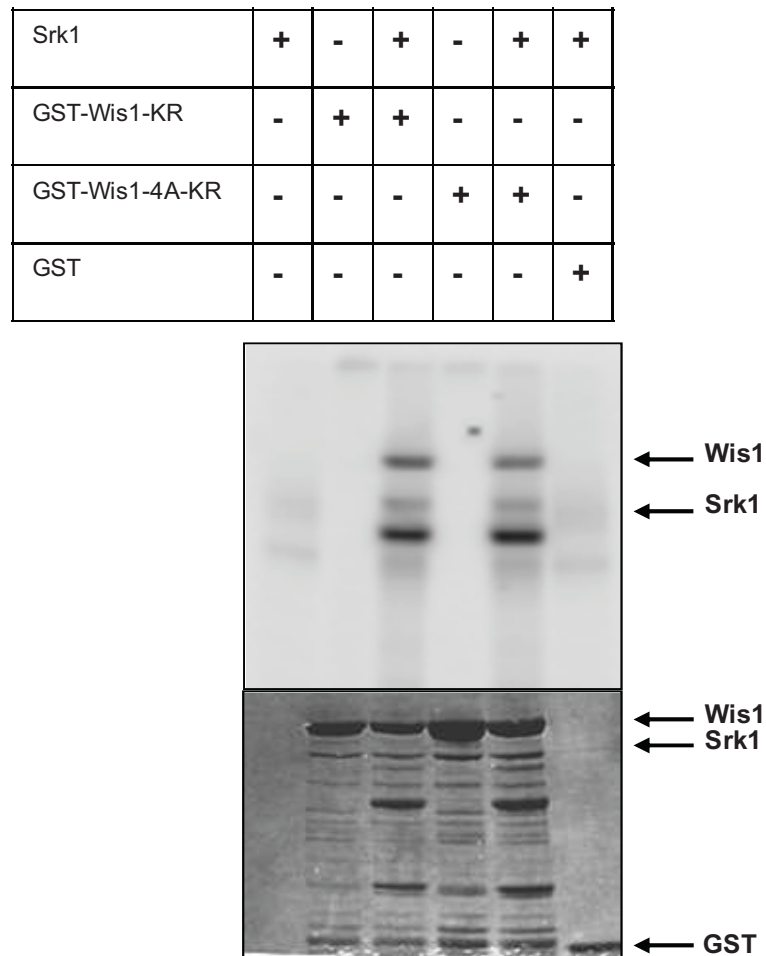


Figura 19. Fosforilació de la Wis1-4A-KR *in vitro*. Assaig quinasa *in vitro* amb GST-Wis1 i GST-Wis1-4A-KR purificades de bacteri com a substrat de GST-Srk1. El gel SDS-PAGE de l'assaig quinasa va ser tenyit amb Coomassie Blue (panell inferior).

Aquest resultat ens va fer pensar que possiblement la Srk1 estigués fosforilant un residu no *consensus* dins la seqüència de la Wis1. Per tal d'elucidar aquesta incògnita, vam enviar les proteïnes GST-Wis1KR i GST-Wis1-4A-KR fosforilades per la GST-Srk1 i la GST-Wis1KR sense fosforilar (com a control) al Servei de Proteòmica del CNIC. Mitjançant la seqüenciació de fosfopèptids duta a terme al servei de proteòmica, es va detectar un nou residu no *consensus* en la seqüència de Wis1 fosforilat per la Srk1 (figura 20B). Es tracta de la Thr225, curiosament adjacent a la S226 situades ambdues dins del domini d'unió a la Sty1 (figura 20A).

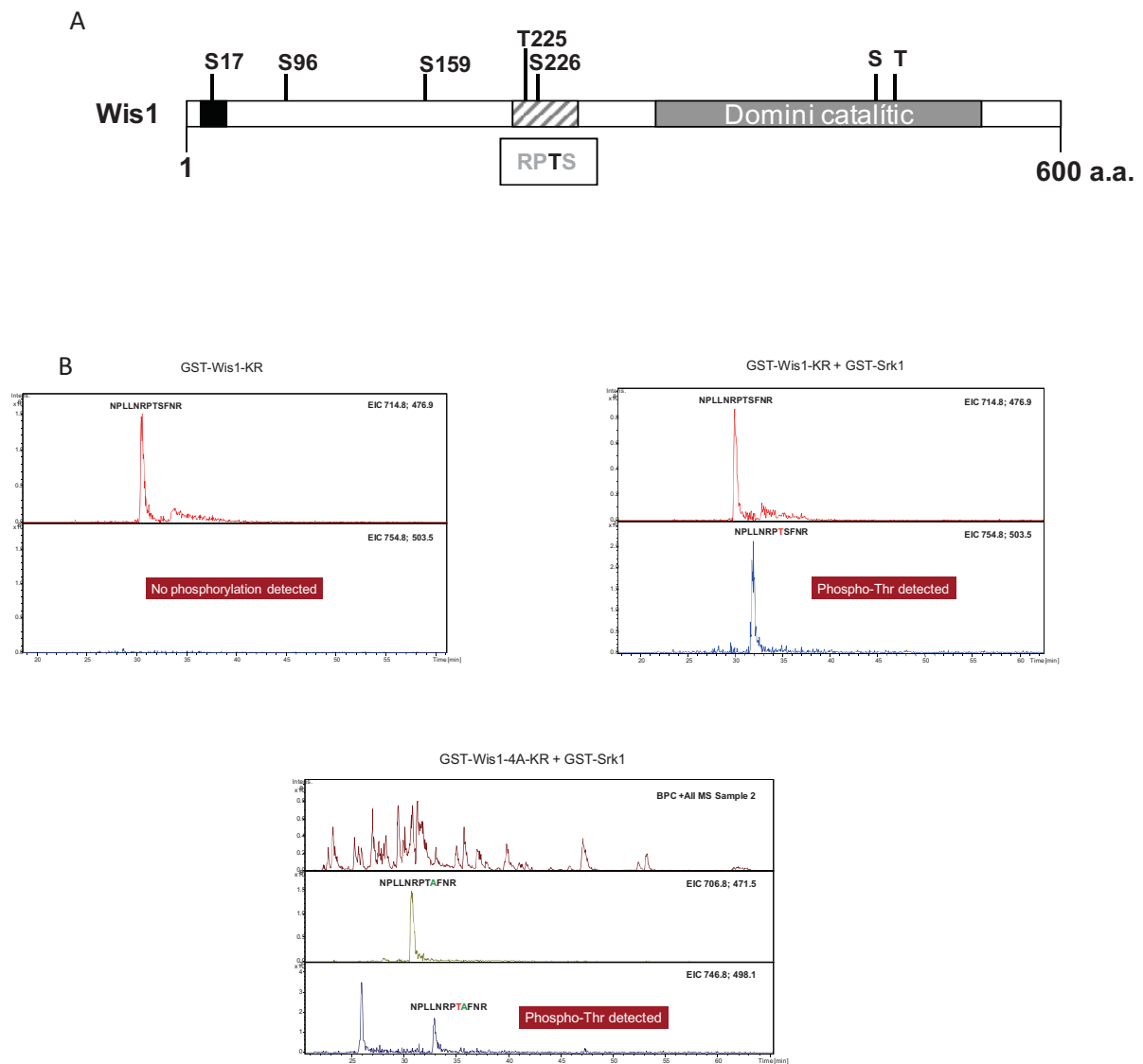


Figura 20. La Srk1 fosforila la Wis1 en la Thr225. (A) Diagrama esquemàtic de la seqüència proteica de la Wis1 amb els 4 residus consensus per la Srk1 i la T225. La regió negra correspon a la seqüència NES i la regió ratllada correspon al domini d'unió a la MAPK Sty1. (B) Resultats de LC-MS de la seqüenciació de fosfopèptids. S'observa com en el primer gràfic (GST-Wis1-KR) no hi ha fosforilació de la Wis1 ja que no ha estat incubada amb la Srk1. En el segon gràfic (GST-Wis1-KR + GST-Srk1), es detecta fosforilació en la T225 al igual que en el tercer gràfic (GST-Wis1-4A-KR + GST-Srk1).

Un cop obtinguts aquests resultats, vam decidir mutar la T225 a Ala i sotmetre aquest mutant a un nou assaig quinasa *in vitro* utilitzant la Srk1 com a quinasa. Com s'observa en la figura 21, en aquest cas, la fosforilació de la Wis1 queda pràcticament abolida en el mutant. Així doncs, podem dir que la Srk1 també fosforila la Wis1 en la T225, tot i no ser un residu *consensus*.

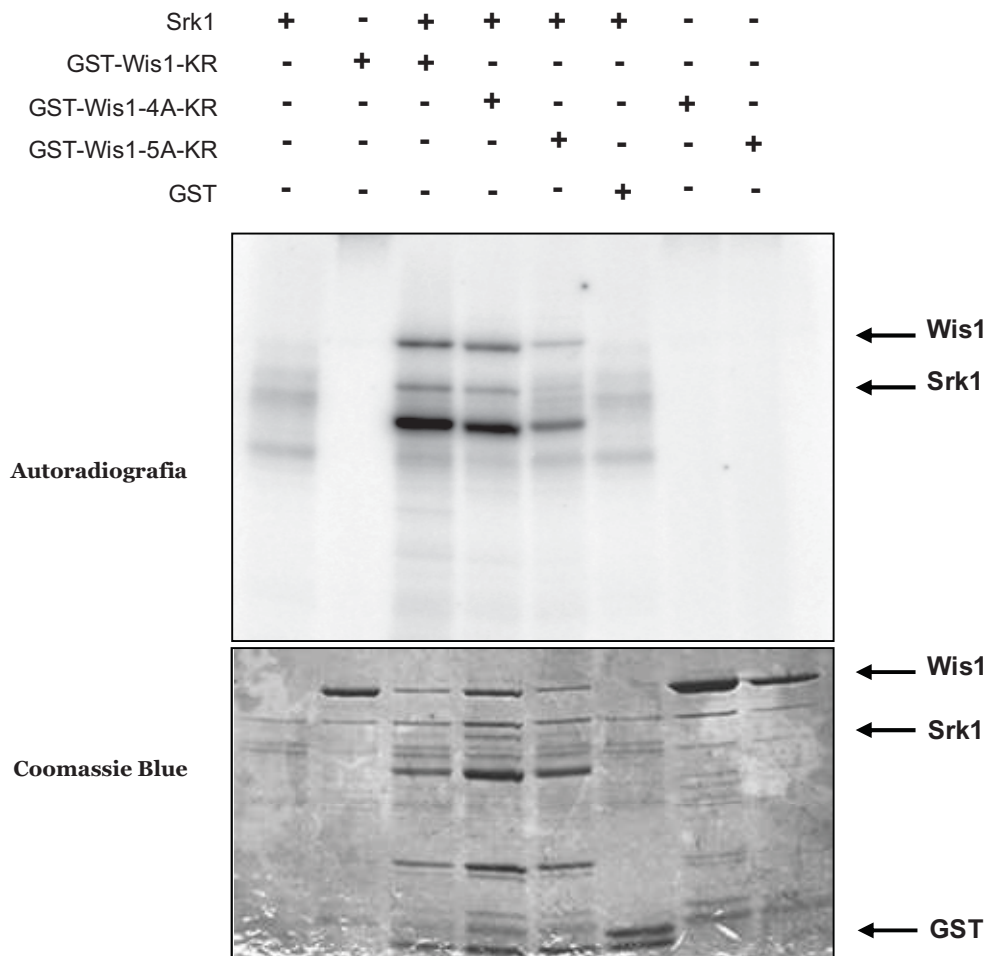


Figura 21. Fosforilació de la Wis-5A per la Srk1 *in vitro*. Assaig quinasa *in vitro* amb GST-Wis1, GST-Wis1-4A-KR i GST-Wis1-5A-KR purificades de bacteri com a substrat de GST-Srk1. El gel SDS-PAGE de l'assaig quinasa va ser tenyit amb Coomassie Blue (panell inferior).

16. La sobreexpressió de la Srk1 inhibeix la unió de la Wis1 amb la Sty1

Tornant a analitzar la seqüència proteica de la proteïna Wis1, vam observar que els residus T225 i S226, es troben dins el domini d'unió a la MAPK Sty1 (200-300 aa). Així doncs, ens vam plantejar si la funció de la Srk1 era inhibir la unió entre la Wis1 i la Sty1 i així evitar l'activació de la via. Una primera aproximació per confirmar-ho va ser sobreexpressar la Srk1 sota el control d'un promotor *nmt1* en cèl·lules Wis1-12myc $\Delta srk1$ i vam estudiar la unió entre la Wis1 i la Sty1 mitjançant la immunoprecipitació de les mostres i el



posterior *Western Blot*. Com s'observa en la figura 22, quan sobreexpressem la *Srk1*, la unió entre la *Wis1* i la *Sty1* desapareix, fet que suggereix que possiblement, la *Srk1* pugui fosforilar la *Ser225 in vivo* per tal d'inhibir la unió entre les dues quinases i així silenciar la via.

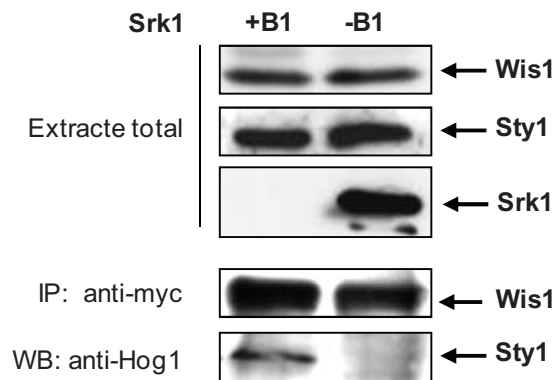


Figura 22. La sobreexpressió de la *Srk1* inhibeix la unió entre *Wis1* i *Sty1*. Cèl·lules *wt* amb el gen *wis1* endogen fusionat a l'epítip 12myc transformades amb el plàsmid pREP1-*srk1-HA* van ser crescudes en absència/presència de B1 durant 24 h. A continuació es va immunoprecipitar la *Wis1* amb l'anticòs anti-myc i la seva unió a *Sty1* es va detectar mitjançant *Western Blot* amb l'anticòs anti-Hog1. Com a controls, es va detectar la *Wis1*, la *Sty1* i la *Srk1* dels extractes totals amb anti-myc, anti-Hog1 i anti-HA, respectivament.

17. La fosforilació de la *Wis1* per la *Srk1* disminueix la seva activitat

Un cop observat que aquests residus semblen afectar l'afinitat entre la *Wis1* i la *Sty1*, vam voler estudiar amb assajos de fosforilació *in vitro*, per una banda, l'efecte de la fosforilació de la *Wis1* per part de la *Srk1* en la seva funció, i per l'altra, l'activitat quinasa dels mutants de fosforilació de la *Wis1* (*Wis1-ED* i *Wis1-5A*).

En el primer cas, vam purificar les proteïnes recombinants GST-*Wis1* i GST-*Wis1-5A* i les vam incubar prèviament amb la GST-*Srk1*. A continuació vam afegir GST-*Sty1-KA* (forma catalíticament inactiva) com a substrat de la MAPKK *Wis1*. Com s'observa a la figura 23A, la *Wis1* fosforila en menor grau la *Sty1* que la *Wis1-5A*. Això s'explicaria tenint en compte que la *Wis1-5A* no pot ser fosforilada per la *Srk1*, i que per tant, en aquest cas, l'afinitat per la *Sty1* del mutant de la *Wis1* hauria de ser major que el de la proteïna *Wis1 wild type*.



En segon lloc, vam voler assajar l'activitat dels fosfomutants de la Wis1. Així doncs, les proteïnes GST-Wis1, GST-Wis1-5A i GST-Wis1-ED van ser sotmeses a un assaig quinasa *in vitro* utilitzant com a substrat la GST-Sty1-KA. Com s'aprecia a la figura 23B, totes tres quinases s'autofosforilen i fosforilen la Sty1-KA, tot i que el mutant Wis1-ED ho fa en menor grau. Això concordaria amb que aquest mutant (que mimetitzaria la fosforilació per Srk1) presenta menor afinitat per la Sty1 i per tant l'activa en menor grau.

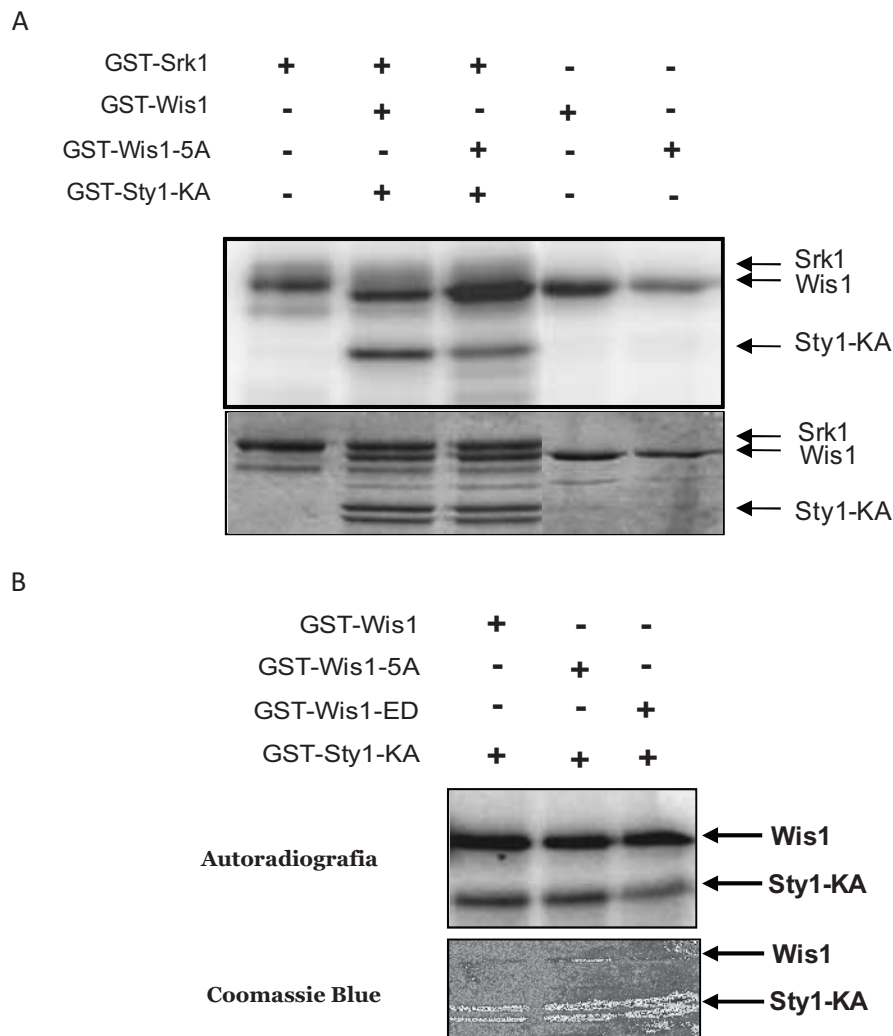


Figura 23. Activitat de Wis1 i Wis1-5A en presència de Sk1. (A) Assaig quinasa *in vitro* amb GST-Wis1, GST-Wis1-5A purificades de bacteri. Les proteïnes recombinants es van incubar prèviament amb la GST-Srk1 i a continuació es va assajar la seva activitat utilitzant com a substrat GST-Sty1-KA. El gel SDS-PAGE de l'assaig quinasa va ser tenyit amb Coomassie Blue (panell inferior). (B) Assaig quinasa *in vitro* amb GST-Wis1, GST-Wis1-5A purificades de bacteri i com a substrat la GST-Sty1-KA. El gel SDS-PAGE de l'assaig quinasa va ser tenyit amb Coomassie Blue (panell inferior).



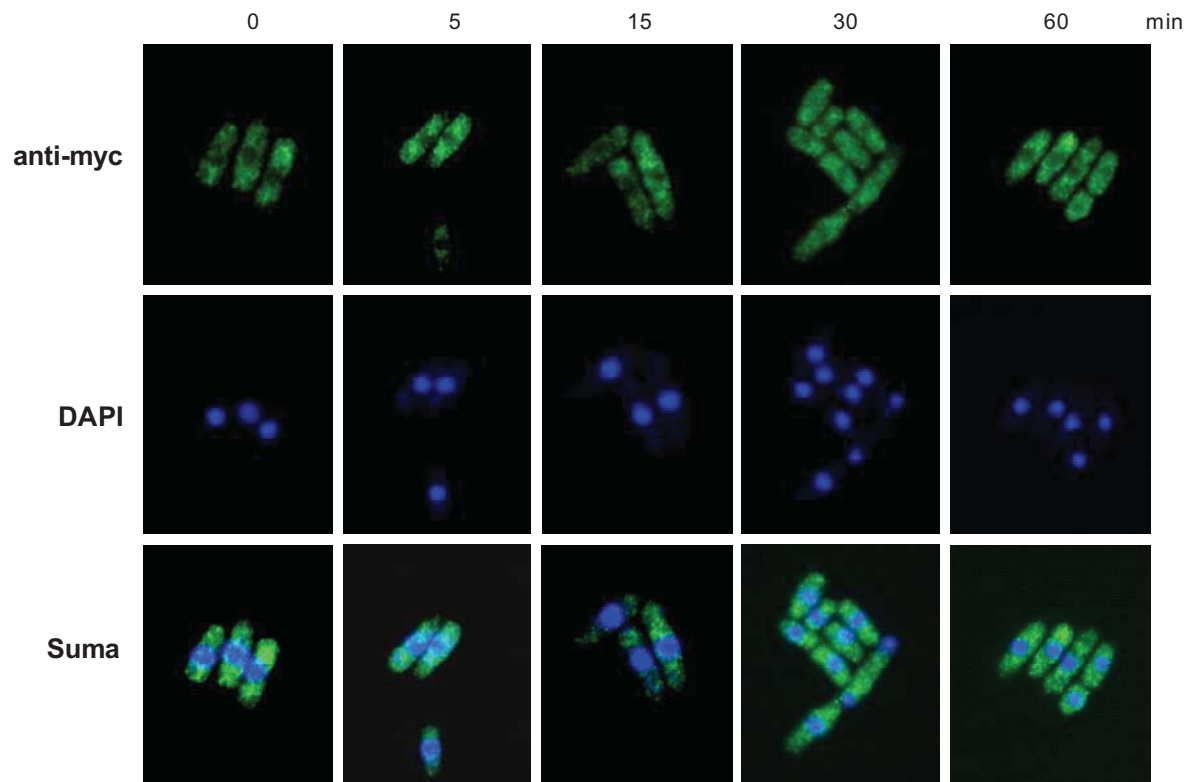
18. La *Srk1* no regula la localització de la *Wis1*

En veure que l'afinitat entre la *Wis1* i la *Sty1* es veu afectada per la *Srk1*, vam voler estudiar si succeïa el mateix amb la seva localització. En primer lloc, per tal d'estudiar si la localització de la *Wis1* depèn de la *Srk1*, cèl·lules *wild type* i $\Delta srk1$ amb la *Wis1* endògena fusionada a l'epítip *myc* van ser tractades amb estrès osmòtic i les mostres processades per a la posterior immunocitoquímica indirecta. Com s'observa en la figura 24A, sota les nostres condicions, la localització de la *Wis1* no varia al llarg de l'exposició a estrès, sent predominantment citoplasmàtica. Inicialment, estudis de localització de la *Wis1* on s'utilitzava aquesta mateixa soca (*Wis1:12myc*), establien que la MAPKK era predominantment citoplasmàtica, ja que no s'observava una translocació al nucli en resposta a estrès (Gaits *et al.*, 1998). Estudis posteriors, però, duts a terme pel grup del Dr. Shiozaki, mostren una translocació transitòria de la *Wis1* al nucli en resposta a estrès, en aquest cas utilitzant la soca *Wis:GFP* (Nguyen *et al.*, 2002). Nosaltres no descartem aquesta possible translocació de la *Wis1* al nucli, però sota les nostres condicions, no hem aconseguit veure-ho. Per altra banda, si observem la localització de la *Wis1* en la soca $\Delta srk1$ (figura 24B), veiem que tampoc varia (citoplasmàtica), fet que indicaria que la *Srk1* no regula la localització de la *Wis1* en resposta a estrès.



A

wis12myc 1M KCl



B

wis12myc Δsrk1 1M KCl

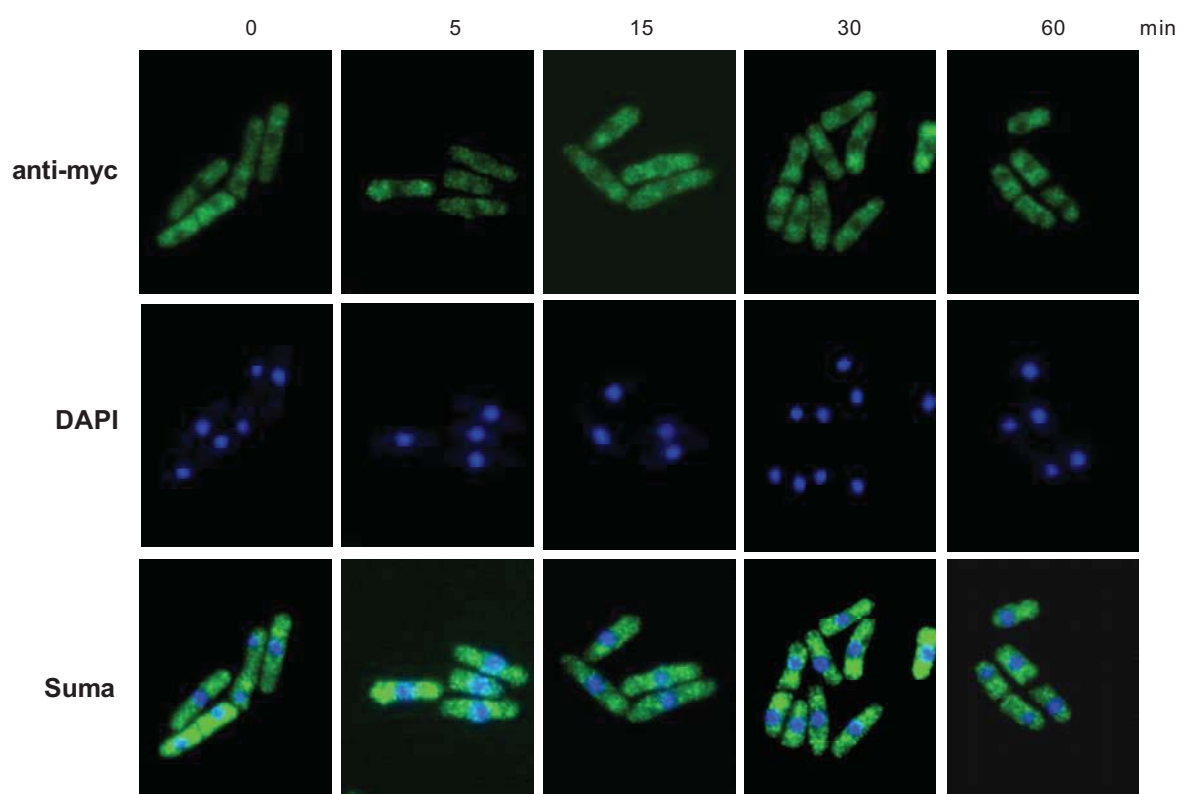




Figura 24. Localització de Wis1:12myc en cèl·lules *wt* i $\Delta srk1$. (A) Un cultiu exponencial de cèl·lules *wis:12myc* va ser tractat amb 1 M KCl. Es van recollir mostres als temps indicats i les cèl·lules van ser fixades amb metanol. Es van realitzar les immunocitoquímiques amb l'anticòs anti-myc (9E10) per determinar la localització de la Wis1 (panell superior) i es van tenyir els nuclis amb DAPI (panell central). La sobreposició de les dues tincions es veu en el panell inferior. (B) El mateix procediment que en (A) però amb cèl·lules *wis:12myc* $\Delta srk1$.

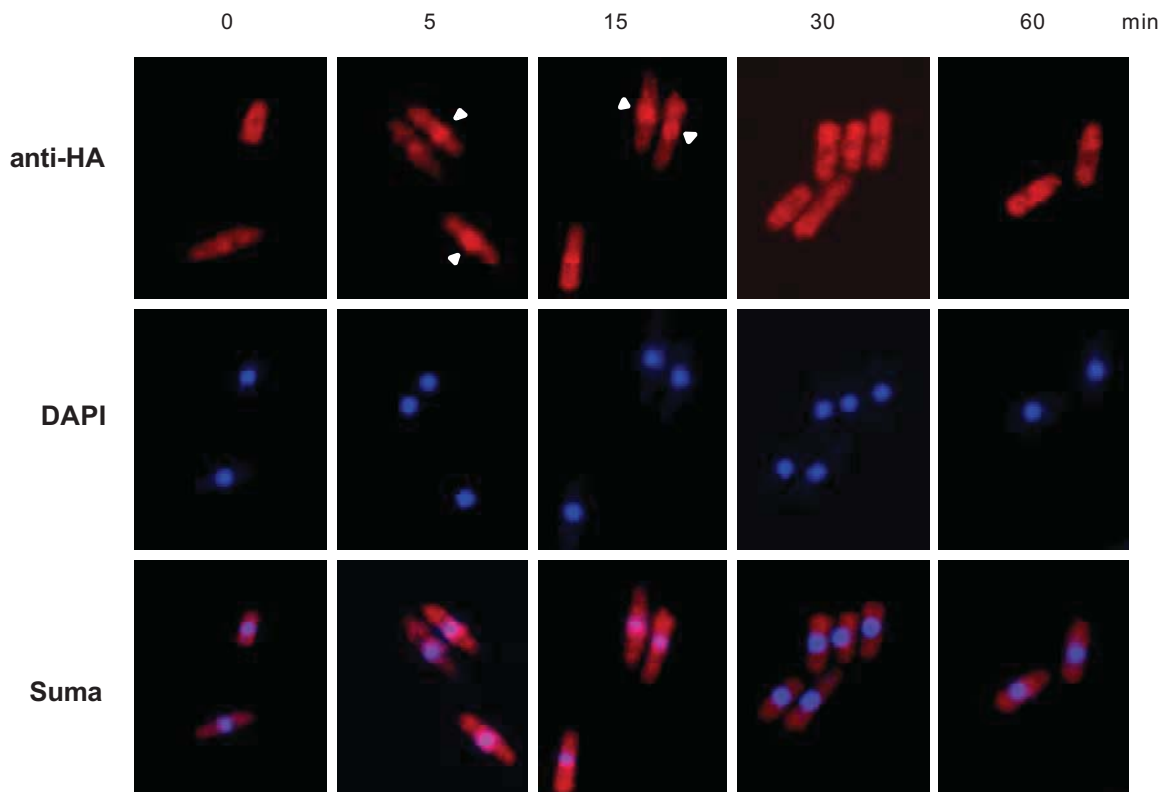
19. La Sty1 no surt del nucli en cèl·lules $\Delta srk1$

A continuació, després de veure que la *Srk1* no regula la localització de la Wis1, vam voler estudiar l'efecte de la seva absència en la localització de la Sty1. Amb aquesta finalitat, cèl·lules *wild type* i $\Delta srk1$ amb la Sty1 endògena fusionada a l'epítot HA van ser tractades amb estrès osmòtic i les mostres processades per a la posterior immunocitoquímica indirecta. Com s'observa a la figura 25A, tal i com s'havia descrit prèviament (Gaits *et al.*, 1998), la Sty1 transloca ràpidament al nucli en resposta a estrès (als 5 minuts) i posteriorment és exportada cap al citoplasma (als 30 minuts).

En canvi, en cèl·lules $\Delta srk1$, observem que la Sty1 entra al nucli però no pot ser exportada al citoplasma posteriorment (figura 25B).

A

Sty1HA 1M KCl



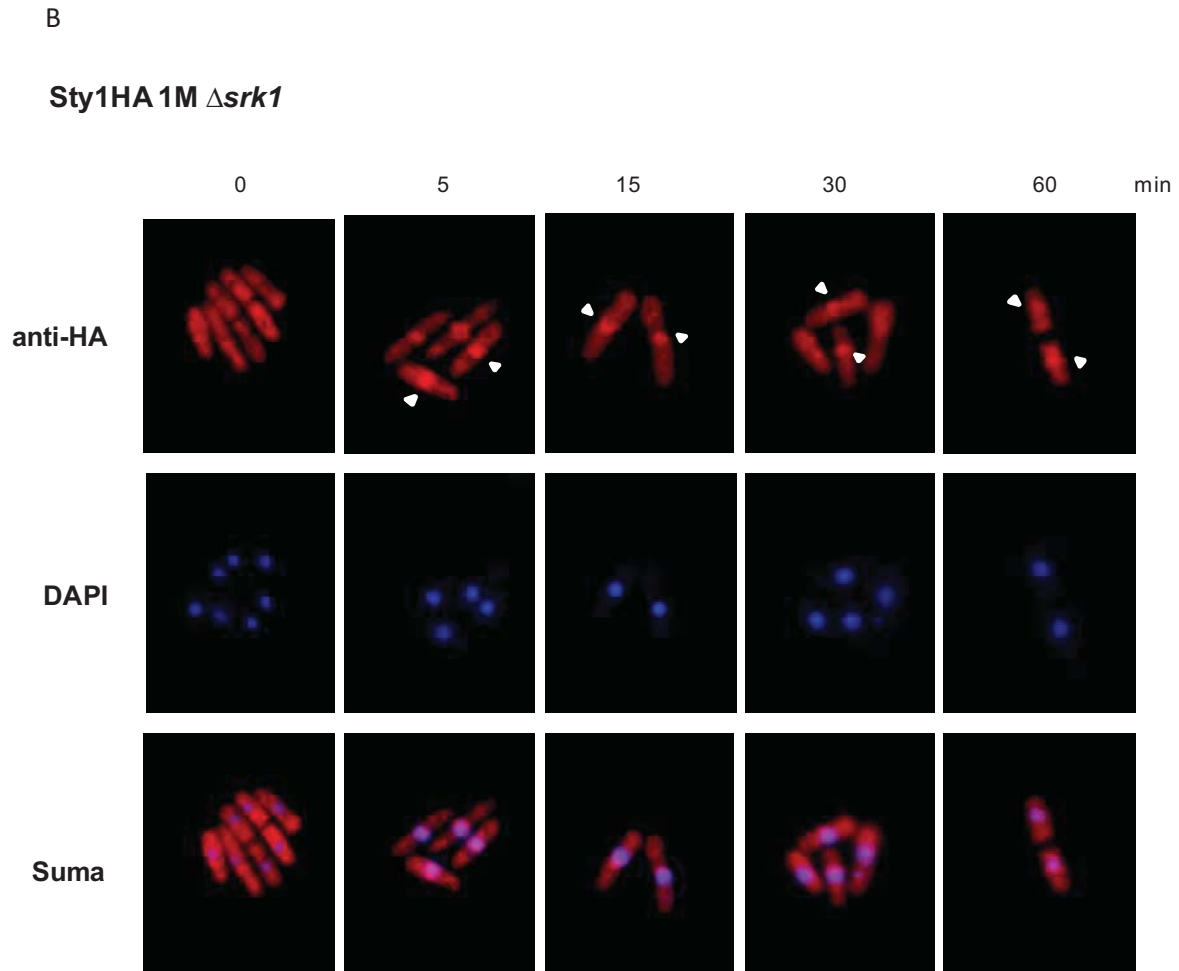


Figura 25. Localització de Sty1:HA en cèl·lules *wt* i $\Delta srk1$. (A) Un cultiu exponencial de cèl·lules *sty1:HA* va ser tractat amb 1 M KCl. Es van recollir mostres als temps indicats i les cèl·lules van ser fixades amb metanol. Es van realitzar les immunocitoquímiques amb l'anticòs anti-HA (12CA5) per determinar la localització de la Wis1 (panell superior) i es van tenyir els nuclis amb DAPI (panell central). La sobreposició de les dues tincions es veu en el panell inferior. (B) El mateix procediment que en (A) però amb cèl·lules *sty1:HA $\Delta srk1$* .



Les cèl·lules eucariotes, i sobretot els organismes unicel·lulars com els llevats, es troben constantment exposades a situacions d'estrès tals com canvis en la temperatura, pH, irradiacions, subministrament de nutrients, estrès osmòtic i accés a l'oxigen. Per aquest motiu els organismes eucariotes han desenvolupat mecanismes de resposta programats que els protegeixen contra aquests canvis i que els permeten adaptar-se a les noves condicions (Egel, 2004).

Tal i com s'ha comentat durant aquesta tesi, la resposta cel·lular a aquests insults ambientals es caracteritza per una resposta immediata corresponent a l'activació de la via de les MAPKs, i una resposta secundària a aquest efecte però de vital importància: els canvis en l'expressió gènica i en la fisiologia cel·lular (Egel, 2004). Així doncs, l'activació de la MAPK Sty1 és un pas clau per a la generació de respostes adaptatives que permeten la supervivència cel·lular a l'estrès. Per altra banda, la modulació de la progressió del cicle cel·lular és essencial per a l'adaptació a l'estrès imposat. En aquesta tesi mostrem els efectes múltiples de la fosforilació de la Srk1 per la MAPK Sty1 durant la resposta a estrès, i presentem la quinasa Srk1 com el component que coordina la resposta a l'estrès i el control del cicle cel·lular.

ESTUDI DE LA REGULACIÓ DE LA Srk1 PER LA MAPK Sty1

La Srk1 va ser inicialment identificada com una proteïna quinasa l'expressió de la qual es veia fortament induïda en resposta a estrès de manera dependent de la MAPK Sty1 (Smith *et al.*, 2002). Tanmateix, fins el moment, l'única quinasa descrita capaç de fosforilar la Srk1 en resposta a estrès és la MAPK Sty1. En aquest treball, mitjançant assajos de fosforilació *in vitro* hem pogut demostrar que aquesta és una fosforilació activadora que té lloc en el residu treonina 463 (Thr463) (López-Avilés, S*, Lambea E* *et al.*, 2008).

Per altra banda, estudis duts a terme per analitzar si l'activitat de la Srk1 era dependent de la MAPK Sty1, van comportar resultats addicionals inesperats. Si bé esperàvem que en deletar *sty1* l'activitat observada per la Srk1 fos



nul·la en resposta a estrès, el que vam obtenir va ser una disminució dràstica dels nivells de proteïna. En conseqüència, l'activitat associada a aquests extractes era també inapreciable. Recolzant aquesta observació, l'estudi dels nivells de la *Srk1* en una soca $\Delta sty1$ van fer palesa la inestabilitat de la *Srk1* en absència de la MAPK *Sty1*. Així doncs, aquest fet indicava un mecanisme més de regulació de la *Srk1* per la *Sty1*. De manera interessant, s'han realitzat observacions similars en cèl·lules de mamífer per a la MK2 (l'homòleg humà de la *Srk1*) i la MAPK p38. En condicions normals, ambdues proteïnes s'uneixen formant un complex estable i inactiu. D'aquesta manera s'estabilitzen, fet que es desprèn de l'observació que els ratolins *knock out* per una de les quinases presenten uns nivells molt baixos de l'altra (Kotlyarov *et al.*, 2002; Sudo *et al.*, 2005). A *S. pombe* no s'havia descrit un comportament similar per a la *Sty1* amb cap dels seus substrats. En canvi, recentment sí que s'ha descrit que la fosforilació del factor de transcripció *Atf1* per la *Sty1* contribueix a la seva estabilitat. En condicions normals un nivell basal de fosforilació és suficient per mantenir uns nivells mínims del factor de transcripció (Lawrence *et al.*, 2007). D'altra banda, tal i com s'ha fet referència a l'apartat d'introducció d'aquesta tesi, l'*Atf1* s'estabilitza a través de la seva unió amb la *Pcr1*, que es alhora subjecte de la regulació transcripcional per *Atf1*. Així, la *Sty1* estabilitza l'*Atf1* per fosforilació, però aquest factor de transcripció també és estable per la seva unió a la *Pcr1*. En conseqüència, en cèl·lules $\Delta pcr1$ els nivells d'*Atf1* són molt baixos. En el cas de la *Srk1* nosaltres hem pogut determinar que l'estabilitat de la proteïna és depenent de la presència de la *Sty1* en la cèl·lula. A més, aquest és un efecte independent de la seva activitat, doncs la proteïna segueix essent estable en una soca on s'ha deletat el gen *wis1* i on la MAPK no pot ser activada en resposta a estrès.

Hom podria pensar que l'efecte de la *Sty1* sobre l'estabilitat de la *Srk1* fos degut a la regulació de la transcripció del gen *srk1*, però hem observat que els nivells de *Srk1* desapareixen en paral·lel a la degradació de la *Sty1* i que es recuperen en afegir l'inhibidor del proteasoma MG132. Per altra banda, la utilització del mutant *Srk1*-T463D ens ha permès observar que la fosforilació de la *Srk1* per la *Sty1* no només l'activa, sinó que també indueix la seva inestabilitat



i degradació pel proteasoma. Recolzant aquesta observació, l'estudi dels nivells de proteïna de la *Srk1* en resposta a estrès un cop fosforilada per la *Sty1*, mostra que, efectivament, la *Srk1* es degrada un cop és activada en resposta a estrès. Tots aquests resultats indiquen que l'estabilitat de la *Srk1* requereix de la unió amb la *Sty1*, i que un cop fosforilada per la MAPK, la *Srk1* esdevé inestable. Així, la fosforilació de la *Srk1* per la *Sty1* induiria, a més de la seva activació, la dissociació del complex *Srk1-Sty1* i la desestabilització de la primera. Recolzant aquesta hipòtesi, el mutant *Srk1-T463D* mostra una menor afinitat per la *Sty1* en comparació amb el mutant no fosforilable *Srk1-T463A*, que presenta una *ratio* d'unió molt similar a la de la *Srk1* normal.

ESTUDI DE LA FUNCIO DE LA *Srk1* EN RESPOSTA A ESTRÈS

La *Sty1* fosforila i activa la *Srk1* en la T463. Malgrat això, sembla que la fosforilació en aquest residu activi la *Srk1* perquè s'afavoreixi la dissociació de la MAPK. Així, la separació de la *Sty1* seria suficient per a l'activació de la *Srk1*. Aquesta conclusió es recolza amb l'observació de l'activitat dels fosfomutants de la *Srk1*. Per una banda, observem que el mutant *Srk1-T463A* és catalíticament actiu en un assaig quinasa *in vitro*, a nivells molt similars als de la *Srk1*. A més a més, l'activitat *in vitro* de la *Srk1* pot ser inhibida si permetem la seva unió prèvia amb la *Sty1KA*. Per altra banda, l'anàlisi *in vivo* de l'efecte de la fosforilació de la T463 mostra que la mutació d'aquest residu a Ala (*Srk1-T463A*) provoca un augment de sensibilitat a estrès osmòtic en placa d'aquesta soca, molt similar al de la deleció del gen *srk1* ($\Delta srk1$). Això indica que l'activitat catalítica de la *Srk1-T463A* no és suficient per a la funció de la *Srk1* en la resposta a estrès, recolzant la importància de la fosforilació de la T463 per la *Sty1* per a l'execució del paper de la *Srk1* en resposta a estrès. De manera conjunta, aquestes observacions apunten a un mecanisme addicional de la regulació de la *Srk1* per la *Sty1*.

Un cop observada la regulació de la *Srk1* per la MAPK *Sty1*, vam voler analitzar el paper de la *Srk1* en resposta a estrès. Fins el moment, a la *Srk1* se li



havia atribuït un paper no essencial en el control del cicle cel·lular (López-Avilés *et al.*, 2005). En aquest article, tal i com s'indica a la introducció, es descriu com la *Srk1* fosforila la *Cdc25* per tal d'inhibir-la promovent la seva unió a una proteïna 14-3-3, *Rad24*, i la seva estabilització al citoplasma. En el cas de la resposta a estrès, estudis previs indiquen que la *Srk1* s'indueix i es fosforila en resposta a estrès de forma depenent de la MAPK (Smith *et al.*, 2002). Evidències experimentals del nostre grup mostren que la *Srk1* és ràpidament activada en resposta a estrès i que la seva activitat augmenta de forma dosi-depenent, de manera que la MAPK *Sty1* garanteix que la resposta a estrès sigui proporcional al tipus i gravetat d'insult aplicat. Tot i això, l'activitat de la *Srk1* durant el cicle és molt més baixa que l'observada en resposta a estrès. Una possible interpretació d'aquest fet seria que durant el cicle cel·lular uns nivells baixos d'activitat de la *Srk1* fossin suficients per a mantenir la fosfatasa en el seu estat inactiu durant la fase G2. Per altra banda, en resposta a estrès, l'activació de la *Srk1* haurà de ser superior per a garantir una resposta correcta, fet que se'n desprèn de les observacions que la funció de la *Srk1* és necessària per a mantenir la integritat cel·lular.

Per altra banda, en el llevat de fissió, s'ha descrit que l'estrès indueix una aturada temporal de la transició G2/M que no és depenent del *checkpoint* de dany al DNA o del *checkpoint* del fus mitòtic (Kawasaki *et al.*, 2006). Els resultats presentats en aquesta tesi indiquen que l'aturada temporal en la transició G2/M en resposta a estrès és depenent de la *Srk1*. Una altra evidència que recolza aquest fet ve donada per l'observació que les cèl·lules $\Delta srk1$ són sensibles a estrès osmòtic de manera similar a les cèl·lules que presenten l'al·lel *cdc25-9A*, el qual no pot ser fosforilat per la *Srk1*. Aquests resultats posen de manifest el paper de la *Srk1* regulant el cicle sota condicions d'estrès a través de la fosfatasa *Cdc25*. Cal destacar, però, que la sensibilitat de la soca $\Delta srk1$ a estrès osmòtic és superior a la de la *cdc25-9A*, suggerint un paper addicional de la *Srk1* en resposta a estrès. Seria interessant, doncs, realitzar la cerca de nous substrats de la *Srk1* per tal de comprendre en la seva totalitat els efectes i funcions d'aquesta proteïna.



Per tal d'examinar l'efecte de la *Srk1* en la cinètica del cicle cel·lular després d'un tractament amb estrès osmòtic vam utilitzar el mutant $\Delta atf1$, defectiu en la resposta adaptativa a l'estrès. El motiu d'aquest abordatge experimental va ser el següent: les vies de resposta a estrès osmòtic controlen dues respostes: l'aturada temporal del cicle cel·lular i la resposta i adaptació a l'estrès. Aquesta idea és consistent amb estudis similars duts a terme a *S. cerevisiae*, on mutants d'osmoregulació basada en la síntesi del glicerol van ser utilitzats per analitzar el paper de *Swe1* i *Hog1* en la regulació del cicle cel·lular després d'estrès hiperosmòtic (Alexander *et al.*, 2001). En conjunt, els nostres resultats indiquen que la *Srk1* no forma part de la ràpida resposta adaptativa a l'estrès, sinó que és necessària per coordinar la progressió del cicle cel·lular sota aquestes condicions.

Observacions dutes a terme pel grup de la Dra. Jannet Quinn van descriure que la *Srk1* transloca al nucli en resposta a estrès de forma depenent de la *Sty1* (Smith *et al.*, 2002). En el nostre treball mostrem com la localització del substrat de la *Srk1*, la *Cdc25*, depèn de la quinasa en resposta a estrès. Així, l'estudi de la localització subcel·lular de la fosfatasa de *Cdc25* en resposta a estrès revela un comportament diferent en el cas d'una soca *wt* i una soca $\Delta srk1$. En el cas de la soca *wt* observem que als 10 minuts de la imposició de l'estrès, la *Cdc25* que es trobava dins el nucli transloca al citoplasma, de forma concordant amb l'activació de la *Sty1* i la *Srk1*. En canvi, en la soca $\Delta srk1$, la *Cdc25* es manté dins del nucli durant tot l'experiment, fet que indica que l'exclusió de la *Cdc25* del nucli depèn de la *Srk1*. Aquestes observacions concorden amb resultats previs del nostre grup que descriuen que l'associació entre la *Cdc25* i la *Rad24* és fortament induïda en resposta a estrès de manera depenent de la *Srk1* (López-Avilés *et al.*, 2005). Així, en resposta a estrès, la *Srk1* activada per la MAPK *Sty1* controla la transició G2/M a través de la fosforilació de la *Cdc25* promovent la seva unió a *Rad24* i la seva translocació al citoplasma. Aquesta fosforilació de la *Cdc25* per la *Srk1* és inhibidora, ja que té lloc en residus que han estat prèviament descrits com a diana d'altres quinases que inactiven la *Cdc25*. Cal no oblidar que tot i inhibir-la, la fosforilació de la *Cdc25* estabilitza la proteïna a través de l'associació a una proteïna 14-3-3. Una manera



d'interpretar aquest comportament seria que en resposta a estrès la cèl·lula procura aturar el cicle cel·lular per tal de poder respondre a l'insult i adaptar-se a ell. Aquest comportament ha estat observat també per altres grups, que han descrit la seva importància per a la viabilitat cel·lular (Kawasaki *et al.*, 2006). Atenent a les particularitats del cicle cel·lular en *S. pombe*, on les cèl·lules es troben de forma general en fase G2, té sentit que aquest bloqueig en resposta a estrès es doni a través de la inactivació del regulador positiu d'aquesta fase, la Cdc25 (figura 1). Un cop superat l'estrès, la cèl·lula procedirà a dividir-se i per poder fer-ho de la forma més ràpida possible utilitzarà els reguladors del cicle que ja havia sintetitzat prèviament. En el cas que aquests haguessin estat degradats, la reentrada en cicle cel·lular seria molt més lenta ja que caldria tornar a sintetitzar-los. Això suposaria per una banda una despesa energètica elevada que a més a més seria perjudicial en condicions d'estrès.

Els resultats presentats en els dos primers blocs d'objectius d'aquesta tesi ens han permès dissenyar el següent model (figura 1): en condicions normals, la *Srk1* i la *Sty1* es trobarien formant un complex inactiu al citoplasma. En resposta a estrès osmòtic, s'activa la via de les MAPKs, on en últim terme la *Wis1* fosforila la *Sty1* en la T171 i Y173, activant-la. A continuació, la *Sty1* fosforila la *Srk1* en la T463 per tal d'activar-la i ambdues proteïnes transloquen al nucli on es dissocien. Dins el nucli, la *Sty1* regula la transcripció dependent d'estrès (CESR) en gran part mediada per l'activació dels factors de transcripció de tipus b-ZIP, en el cas d'estrès osmòtic majoritàriament activant l'*Atf1* (Takeda *et al.*, 1995; Shiozaki and Russell, 1996; Wilkinson *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 1999; Nguyen *et al.*, 2000). Per altra banda, la *Srk1* fosforila la *Cdc25* promovent la seva unió a la *Rad24* i la seva exclusió del nucli, de manera que l'allunya del seu substrat, la *Cdc2*, inhibint així el cicle cel·lular. A continuació, la *Srk1* fosforilada per la *Sty1*, que és inestable, es degrada via proteasoma. D'aquesta manera es posa de manifest la importància d'aquests dos mecanismes per a l'adaptació a l'estrès imposat: per una banda l'activació de la transcripció gènica i per l'altra la modulació transitòria de la progressió del cicle cel·lular.

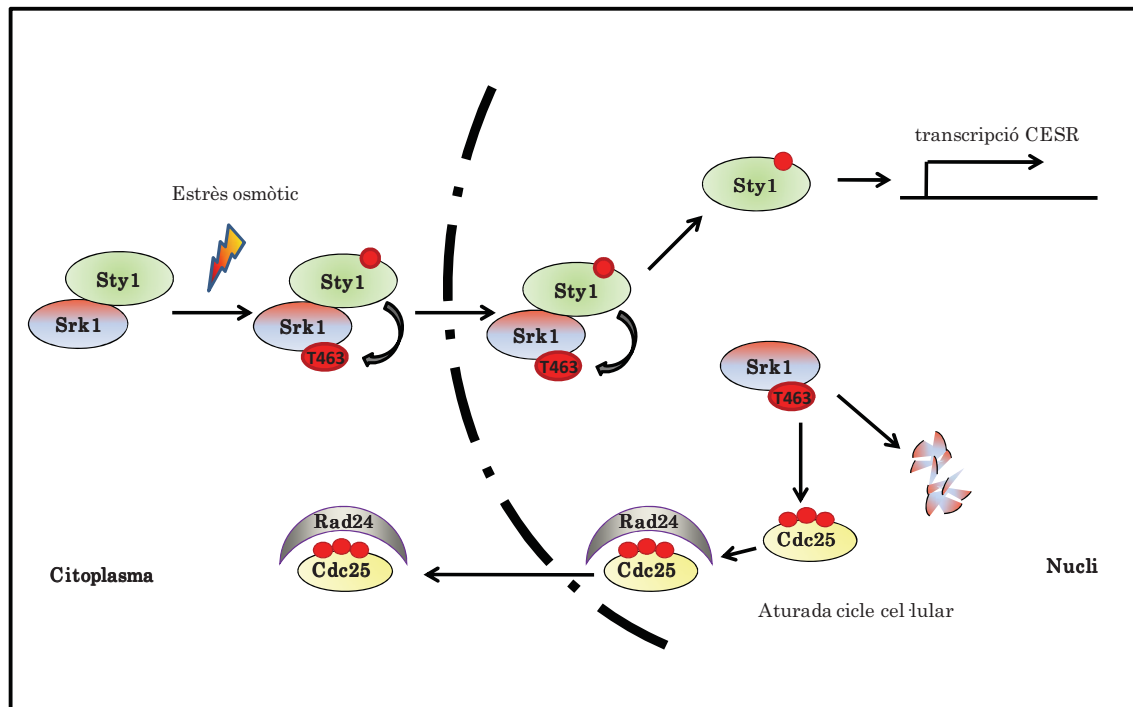


Figura 1. Model d'activació i regulació de la Srk1 en resposta a estrès.

ESTUDI DE LA REGULACIÓ NEGATIVA DE LA VIA DE LES MAPKs PER LA Srk1

Estudis previs ja havien descrit que la Srk1 és regulada per la Sty1 per dos mecanismes diferents, el transcripcional i el post-transcripcional (Smith *et al.*, 2002). Com mostrem en el nostre treball, en resposta a estrès, la Sty1 regula l'activitat de la Srk1 sobre el control del cicle cel·lular mitjançant la fosforilació en la T463. A més a més, l'expressió del gen *srk1* és fortament induïda en resposta a estrès de manera dependent de la Sty1 (Smith *et al.*, 2002). Així doncs, un cop establert que la Srk1 és substrat directe de la MAPK i coneixent el seu paper en resposta a estrès osmòtic, el darrer objectiu d'aquesta tesi s'ha basat en intentar donar resposta a la qüestió que quedava oberta: quin és el significat fisiològic de que la MAPK Sty1 per una banda indueixi la inestabilitat i degradació de la Srk1 a més de la seva activació, i que per l'altra, de manera concomitant, promogui la seva transcripció? Una explicació senzilla del per què la Sty1 indueix la degradació de la Srk1 seria la d'assegurar que l'activitat de la



quinasa sobre el control del cicle cel·lular tingui lloc dins d'una finestra temporal estreta, ja que sinó, la cèl·lula romandria aturada indefinidament i no es podria avançar en cicle un cop s'hagués donat l'adaptació a l'estrès. Així doncs, podria ser que aquest augment de transcripció de la *Srk1* en resposta a estrès tingués la finalitat de restablir els nivells de proteïna, els quals són constants al llarg del cicle cel·lular (López-Avilés *et al.*, 2005).

Per altra banda, els darrers experiments presentats en aquesta tesi semblen indicar un paper negatiu de la *Srk1* sobre la via de la MAPK *Sty1*. Experiments duts a terme per analitzar la resposta a estrès en cèl·lules $\Delta srk1$ mostren que la MAPK *Sty1* es manté fosforilada al llarg del temps, a diferència de la soca *wt*, que presenta un pic d'activació. A més a més, observem que aquest és un efecte directe de l'activitat de la *Srk1*, ja que si utilitzem l'al·lel inactiu (*srk1-KA*) observem el mateix efecte que en el mutant delecionat per *srk1*. En canvi, la sobreexpressió de la *Srk1* veiem que es tradueix en una disminució molt significativa de l'activació de la MAPK. Tots aquests resultats suggereixen un possible paper de la *Srk1* en la regulació negativa de la via i ens plantegen la següent qüestió: a través de quin element de la via podria estar actuant la *Srk1* per tal de silenciar-la? Amb la finalitat d'elucidar aquesta incògnita, una primera aproximació podria ser que la *Srk1* actués a través de les tirosina fosfatases *Pyp1* i *Pyp2*.

Com s'ha comentat a la introducció, la senyalització a través de la via de les MAP quinases comporta l'activació de diferents mecanismes de resposta a l'estrès ambiental. Per altra banda, cal destacar que és de vital importància que un cop la font d'estrès hagi desaparegut o la cèl·lula s'hagi adaptat a ella, aquests mecanismes han de ser inactivats correctament (Shiozaki and Russell, 1995; Millar *et al.*, 1995). Donat que l'activació de la ruta implica una sèrie de fosforilacions successives, aquestes hauran de ser revertides mitjançant l'acció de fosfatases implicades en aquest procés. En el cas de *S. pombe* està ben establert que les fosfatases *Pyp1* i *Pyp2* s'uneixen i defosforilen la Tyr173 de la *Sty1* en resposta a estrès per tal d'inactivar-la. Així doncs, el primer abordatge experimental va ser determinar si la nova funció que intentàvem descriure per



la *Srk1* era la d'estabilitzar les fosfatases. Malauradament, l'anàlisi dels nivells de proteïna de Pyp1 i Pyp2 en una soca *wt* i $\Delta srk1$ va determinar que aquests no varien. En el cas de Pyp1 s'havia descrit que aquesta fosfatasa s'expressa de manera constitutiva i que en resposta a estrès s'indueix més fortament de manera depenent de la Sty1 (Millar *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2003). La Pyp2, en canvi, únicament s'activa en resposta a estrès i el fet que la seva expressió depengui totalment de l'activació de la Sty1 constitueix un mecanisme de retroalimentació negativa de la via (Millar *et al.*, 1995). Són aquestes diferències entre ambdues fosfatases les que expliquen que en el *Western Blot* s'observin uns nivells basals de Pyp1 superiors als de Pyp2 i que a més a més, la Pyp2 pateixi una acumulació en els darrers punts de l'experiment. Finalment, però, aquest experiment ens va permetre determinar que la fosforilació mantinguda de la Sty1 en cèl·lules $\Delta srk1$ correspon a la forma activa de la MAPK, ja que l'expressió del gen *pyp2* és totalment depenent de l'activació de la Sty1 en resposta a estrès (Chen *et al.*, 2003).

El següent pas, doncs, va ser determinar si l'activitat negativa de la *Srk1* depenia de l'acció de les fosfatases. Dissortadament, la sobreexpressió de la *Srk1* provoca el mateix efecte tant en una soca *wt* com en les soques $\Delta pyp1$ i $\Delta pyp2$. Cal remarcar, que en el cas de la soca $\Delta pyp1$, en el carril de no sobreexpressió (+B1) sense estrès s'observa una certa activitat basal de la MAPK Sty1. Això és degut a que aquesta fosfatasa d'expressió constitutiva és l'encarregada de mantenir la Sty1 inactivada en condicions normals.

Recolzant els resultats anteriors, l'anàlisi de sensibilitat en placa dels mutants de les fosfatases i dels dobles mutants amb *Srk1* indiquen que la *Srk1* i les Pyp's actuarien en vies diferents ja que presenten efectes additius. En conclusió, aquests resultats semblarien indicar que la regulació negativa de la via de MAPK en resposta a estrès per la *Srk1* no és a través de les tirosina fosfatases Pyp1 i Pyp2.

Un altre possible candidat seria la pròpia MAPKK encarregada de fosforilar la Sty1, la Wis1. Una primera evidència que recolzaria aquesta hipòtesi seria el fet que la Wis1 pot experimentar una fosforilació en residus diferents als



d'activació (Ser469 i Thr473) en resposta a xoc tèrmic (Shiozaki *et al.*, 1998). A més, aquesta fosforilació és dependent de l'activitat de la Sty1. En aquest treball es comentava que en vertebrats s'havia suggerit la fosforilació inhibidora de les MAPKKs catalitzada per les MAPKs (Brunet *et al.*, 1994; Gotoh *et al.*, 1994; Saito *et al.*, 1994). D'altra banda, experiments realitzats al grup del Dr. Rodríguez-Gabriel també han permès observar una fosforilació de la Wis1 en residus altres que la Ser469 i Thr473 en resposta a estrès osmòtic (comunicació personal). De la mateixa manera que succeïa amb el cas anteriorment citat, es tracta d'una fosforilació independent de les MAPKKs i no pot tenir caràcter activador, doncs encara es pot observar en moments en que la Sty1 ja és inactiva. Aquests resultats indiquen que la Wis1 pot patir altres fosforilacions a part de les activadores, que serien dependents de l'activitat de la MAPK i que probablement tindrien un paper inhibidor sobre la seva funció.

Donada la nostra observació de l'efecte de la sobreexpressió de la Srk1 en la fosforilació de la Sty1 ens vam plantejar que la Srk1 pogués estar inhibint la Wis1. A favor d'aquesta hipòtesi, una primera evidència és que la Srk1 pot fosforilar eficientment la Wis1 en un assaig quinasa *in vitro*. En la seqüència de la Wis1 trobem quatre residus potencialment fosforilables per la Srk1 (R-X-X-T/S), la S17, S96, S159 i S226. Tots quatre es troben continguts en la regió N-terminal de la proteïna, i dos dels quals presenten característiques particulars. En primer lloc, la S17 es troba continguda dins la regió corresponent a la seqüència d'exportació nuclear de la Wis1. En segon lloc, la Wis1 conté un domini essencial per a la unió de la MAPK Sty1 entre els aminoàcids 200 i 300 (Nguyen *et al.*, 2002). Més concretament, en aquesta regió es troben dos motius que compleixen el *consensus* d'ancoratge de les MAPKs R-R-X₄₋₆-L/I-X-L/I (Bardwell and Thorner, 1996; Bardwell *et al.*, 2001). D'acord amb això, en aquesta regió, trobem un altre candidat per a la fosforilació per la Srk1, la S226.

Així doncs, amb la intenció de caracteritzar els residus fosforilats per la Srk1 vam generar el mutant Wis-4A (amb els quatre residus *consensus* per la Srk1 mutats a alanina). L'assaig quinasa *in vitro* va revelar que el mutant continuava fosforilant-se per la Srk1, fet que ens va fer plantejar-nos que, de



manera puntual, la *Srk1* estigués fosforilant algun residu que no fos *consensus*. Mitjançant seqüenciació de fosfopèptids vam identificar el residu T225 (adjacent a la Ser226), el qual vam validar com a diana de la *Srk1* mitjançant assajos quinasa *in vitro*.

Un cop identificat el residu, i observant que es troba inclòs dins la regió d'unió a la MAPK *Sty1*, ens vam plantejar d'analitzar si la *Srk1* fosforilava la *Wis1* afectant així la seva unió amb la MAPK. Aquest seria un mecanisme possible per tal d'impedir que l'activació de la *Sty1* fos sostinguda, donat que interrompria la transmissió del senyal cap a la MAPK. Un resultat que recolza aquesta teoria és el fet que la sobreexpressió de la *Srk1* inhibeix la unió entre la *Wis1* i la MAPK *Sty1*. Per altra banda, hem observat en assajos quinasa *in vitro* que la *Wis1* presenta menor afinitat per la *Sty1* que el mutant *Wis1-5A*, fet que es tradueix en una menor activitat. Això s'explicaria perquè el mutant no pot ser fosforilat per la *Srk1* i per tant romandrà unit a la *Sty1*, fet que es reflecteix en un augment d'activitat quinasa. En canvi, la *Wis1*, en ser fosforilada per la *Srk1*, se separarà de la MAPK fent que es tradueixi en nivell més baixos d'activitat *in vitro*. Per altra banda, l'estudi de l'activitat catalítica del mutant mimètic de fosforilació (*Wis1-T225E/S226D*) indica que aquest presenta menor activitat quinasa, presumiblement perquè les modificacions post-traduccionals que hem afegit mimetitzen la fosforilació per la *Srk1*. Tot i així, caldria estudiar la unió dels mutants *Wis1-5A* (no fosforilable) i *Wis1-ED* (mimètic de fosforilació) amb la MAPK *Sty1*, on caldria esperar que el mutant *Wis1-ED* presentés una afinitat molt reduïda en comparació amb el control.

Finalment, en observar que l'afinitat entre la *Wis1* i la *Sty1* es veu afectada per la *Srk1*, vam decidir estudiar si succeïa el mateix amb la seva localització. En primer lloc vam estudiar la localització subcel·lular de la *Wis1* en una soca *wt* i una soca $\Delta srk1$. Com s'ha comentat en la introducció d'aquesta tesi, anàlisis previs sobre la localització de la *Wis1* indiquen que el seu estudi es força complex. El treball realitzat pel grup del Dr. Russell utilitzant la soca *Wis1:12myc* descriu la *Wis1* com una proteïna citoplasmàtica en resposta a estrès (Gaits *et al.*, 1998). Per contra, el grup del Dr. Shiozaki mostra amb la



soca Wis1:GFP que la Wis1 entra de manera ràpida i transitòria al nucli en resposta a estrès (Nguyen *et al.*, 2002), tot i que no s'observa una entrada massiva. En les nostres mans, i sota les nostres condicions no hem estat capaços d'observar una entrada de la Wis1 al nucli en resposta a estrès. Primerament es va intentar fer microscopia de *time-lapse* amb la soca Wis1:GFP (provinent del laboratori del Dr. Shiozaki), però els resultats van ser infructuosos. A continuació es van realitzar immunocitoquímiques indirectes amb la soca Wis1:12myc, on com ja s'havia descrit al treball de Gaits *et al.*, 1998, no vam observar una entrada de la Wis1 al nucli en resposta a estrès. Pensant que potser l'epítip 12myc fos massa gran i dificultés l'entrada de la MAPKK al nucli, vam repetir l'experiment sobreexpressant la Wis1 a nivells similars als d'un *wt*, aquest cop fusionada a l'epítip HA. Malauradament, en aquest cas tampoc vam presenciar una entrada al nucli de la MAPKK en resposta a estrès. Així doncs, en aquesta tesi presentem els resultats obtinguts per immunocitoquímica indirecta, amb la soca Wis1:12myc per tal de descartar possibles artefactes de la sobreexpressió amb l'epítip HA. Els resultats d'aquestes immunocitoquímiques revelen que la *Srk1* no afecta la localització de la Wis1 en resposta a estrès, ja que en tots dos casos s'observa una localització citoplasmàtica de la MAPKK.

Per altra banda, els estudis de localització de la Sty1 revelen que, a diferència del *wt*, on la MAPK entra al nucli als 5 minuts del tractament amb estrès i comença a sortir entre els 20-30 minuts, en el cas de la soca $\Delta srk1$, la sortida de la Sty1 del nucli es veu greument afectada. Com s'indica a la introducció, la translocació de la Sty1 al nucli depèn de la importina Pim1, mentre que el seu transport del nucli cap al citoplasma és dependent de l'exportina Crm1. Aquesta proteïna és un receptor nuclear necessari per a exportar proteïnes que continguin NES a través del porus nuclear. Ja s'havia identificat prèviament una possible seqüència NES-like en la Sty1 i que a més a més, la MAPK és capaç d'interaccionar tant *in vitro* com *in vivo* amb la Crm1. Recolzant aquestes observacions, mutants de pèrdua de funció parcial del gen *crm1* afecten la localització de la MAPK, fent que aquesta resti al nucli de forma perllongada en el temps, i que això es tradueixi en una fosforilació mantinguda de la Sty1 (Gaits and Russell, 1999). Per altra banda, estudis duts a terme pel



grup de la Dra. Hidalgo han descrit que l'exportació nuclear de la Sty1 també depèn de la proteïna d'unió a Ran, Hba1 (també coneguda com Caf1) (Castillo *et al.*, 2003). En aquest estudi es descriu com l'Hba1 faria de *scaffold* entre l'exportina Crm1 i el seu substrat, en el nostre cas, la Sty1. Concretament, en mutants del gen *hba1*, la Sty1 queda retinguda al nucli, fet que també comparteix el factor de transcripció Pap1. Així doncs, l'exportació de proteïnes del nucli al citoplasma depèn de l'associació de 3 factors: l'exportina, la proteïna d'unió a Ran i del *cargo* (proteïna que conté el NES) (Lei *et al.*, 2002; Macara, 2001; Mattaj and Englmeier, 1998). En el nostre cas, aquest efecte sobre la localització de la Sty1 que observem en delectonar la *Srk1* explicaria la bioquímica que mostra un manteniment de la forma fosforilada i activa de la Sty1 en resposta a estrès. Si en aquestes condicions la Sty1 no surt del nucli no podrà ser defosforilada per les fosfatases Pyp1 i Pyp2, que es troben al citoplasma. Una primera hipòtesi segons els resultats de localització obtinguts podria ser que la *Srk1*, abans de ser degradada, estabilitzés la unió de la Sty1 amb el transportador nuclear Crm1 per facilitar la seva sortida del nucli (figura 2). Donat que coneixem que la *Srk1* no pot fosforilar la Sty1 *in vitro*, hom podria pensar que fosforilés la Crm1 directament (ja que conté dos residus *consensus* per la *Srk1* dins la seva seqüència; R-X-X-S/T). Una altra opció podria ser que la *Srk1* fosforilés la *Ran binding protein* Hba1 (descrita com a fosfoproteïna, Turi *et al.*, 1996). En aquest cas, si analitzem la seqüència de l'Hba1 cercant residus *consensus* per la *Srk1* (R-X-X-S/T), no en trobem cap. Tot i així, no podem descartar que la *Srk1* pogués fosforilar un residu no *consensus*, tal i com ho fa amb la T225 de la Wis1. En aquest cas, sí que trobem un residu d'aquest tipus dins la seqüència de Hba1 que correspon al motiu R-X-S). Finalment, també podria ser que la *Srk1* actués a través d'una altra proteïna no descrita fins el moment. Així doncs, no podem descartar que la *Srk1* tingui un paper en la sortida de la MAPK Sty1 del nucli a través de la maquinària d'exportació nuclear.

Tot i així, considerem que aquesta hipòtesi no seria gaire factible, ja que si la *Srk1* afectés la maquinària d'exportació nuclear en general, es veuria afectada la sortida de moltes altres molècules que depenen d'aquest sistema d'exportació,



no només la Sty1. Tanmateix, hauríem d'observar que la Sty1 es mantingués durant molt més temps retinguda al nucli en cèl·lules $\Delta srk1$ i els nostres resultats mostren que la presència de la Sty1 al nucli no és tant mantinguda com la seva fosforilació (als 90 minuts ja comencem a observar Sty1 fora del nucli, alhora que continua fosforilada).

Així doncs, analitzant els resultats obtinguts amb la MAPKK Wis1 podríem plantejar una segona hipòtesi alternativa. Els nostres resultats suggereixen que la Srk1 sintetitzada *de novo* seria l'encarregada de separar la Wis1 de la Sty1 per tal d'interrompre el senyal de la cascada de les MAPK i així permetre que les fosfatases defosforilin la MAPK per tal de silenciar la via (figura 2). Així doncs, cabria la possibilitat de pensar que en el cas de les cèl·lules $\Delta srk1$, la Sty1 pogués sortir del nucli, però com no hi ha Srk1 sintetitzada *de novo* per inactivar la Wis1, la Sty1, tot i poder ser defosforilada per les Pyp's, tornarà a ser fosforilada i activada per la MAPKK i per tant tornarà a translocar al nucli. Aquest fet concordaria amb observacions prèvies dutes a terme pel grup del Dr. Russell, on l'estudi de l'activació i localització de la Sty1 en el mutant de $\Delta pyp2$ va revelar que la Sty1 es manté retinguda al nucli més temps i això es veu reflectit bioquímicament en el perllongament de l'estat fosforilat de la MAPK (Gaits and Russell, 1999). Els autors atribueixen la localització nuclear sostinguda de la Sty1 en el mutant $\Delta pyp2$ a una presumible relocalització ràpida al nucli degut a la baixa activitat fosfatasa del citoplasma en aquest fons genètic. En aquest cas, a diferència del que observem en la deleció de *srk1*, la Sty1 acaba sortint del nucli i defosforilant-se als 40-50 minuts del tractament amb estrès. Aquest fet podria relacionar-se amb l'activitat de l'altra tirosina fosfatasa, Pyp1, que de manera coordinada amb l'acció de la Srk1 acabaria promovent la inactivació de la via. Per altra banda, cal tenir present un altre possible factor, les serina/treonina fosfatases (Ptc's) que també s'activen de forma dependent de la Srk1 per tal de contribuir en aquest procés de silenciament de la via.

En resum, segons els resultats obtinguts fins el moment, el paper de la Srk1 en resposta a estrès es podria dividir en dues funcions: una primera funció on la Srk1 fosforilada i activada per la MAPK Sty1 en resposta a estrès



s'encarregaria d'inactivar transitòriament el cycle cel·lular per tal que la cèl·lula pugui activar la resposta transcripcional a estrès i adaptar-se a ell. Aquesta funció la realitzaria a través de la fosforilació de la Cdc25 promovent la seva unió a Rad24 i la seva acumulació al citoplasma (figura 1).

La segona funció correspondria a la duta a terme per la Srk1 sintetitzada *de novo* per la MAPK Sty1 en resposta a estrès. En aquest cas, fosforilaria la Wis1 en la Thr225 no permetent l'associació entre la MAPKK Wis1 i la MAPK Sty1 (figura 2). D'aquesta manera s'evitarà que la Wis1 activi novament la MAPK i per tant, la Sty1 podrà ser defosforilada i inactivada per les fosfatases Pyp1 i Pyp2, silenciament així la via. D'aquesta forma trobem diversos mecanismes de retroalimentació negativa de la via dependents de la pròpia MAPK, per una banda l'activació de la transcripció de les fosfatases encarregades de defosforilar-la i per l'altra l'activació de la transcripció de la Srk1 per tal d'evitar que la via torni a activar-se (figura 2).

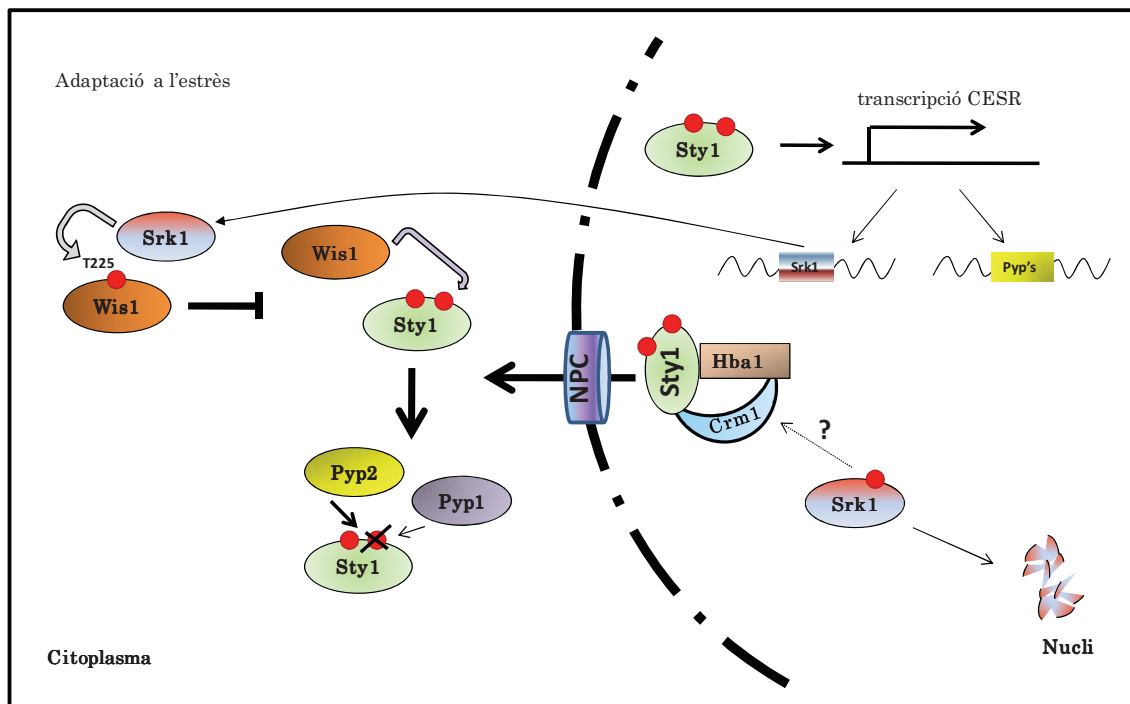


Figura 2. Model del paper de la Srk1 sintetitzada *de novo* en la regulació negativa de la via en resposta a estrès osmòtic.



- La Sty1 fosforila i activa la Srk1 en el residu Thr463.
- La MAPK Sty1 és necessària per l'estabilitat de la Srk1 (en cèl·lules $\Delta sty1$ la Srk1 no és estable).
- L'estabilitat de la Srk1 depèn de la presència de la MAPK Sty1 i no de la seva activitat.
- La unió entre la Srk1 i la Sty1 (en estat inactiu) inhibeix l'activitat de la Srk1 *in vitro*.
- La fosforilació de la Srk1 en la Thr463 per la Sty1 promou la dissociació de la Srk1 de la MAPK i posterior degradació via proteasoma.
- La fosforilació de la Srk1 en la Thr463 per la Sty1 és necessària per a la resposta a estrès osmòtic.
- L'activitat de la Srk1 és necessària per a la inhibició de la transició G2/M en resposta a estrès.
- L'exportació nuclear de la Cdc25 és dependent de la Srk1 en condicions d'estrès.
- La Srk1 és necessària per inactivar la via de la MAPK després de la resposta a estrès:
 - La deleció del gen *srk1* comporta una hiperactivació de la MAPK Sty1.
 - L'activitat de la Srk1 redueix la fosforilació de la Sty1.
- La Srk1 no regula els nivells de les fosfatases inhibidores de la via de MAPKs, Pyp1 i Pyp2.
- La Srk1 no inhibeix l'activació de la Sty1 a través de les fosfatases Pyp1 i Pyp2.
- La inhibició de la via de MAPKs a través de les fosfatases (Pyp's) i de la Srk1 és paral·lela.



-
- La Srk1 fosforila la Wis1 *in vitro*.
 - La Wis1 presenta quatre residus *consensus* i un no *consensus* de fosforilació per la Srk1. La mutació dels cinc residus anul·la la fosforilació de la MAPKK Wis1 per la Srk1 *in vitro*.
 - La fosforilació de Wis1 per la Srk1 podria estar afectant la unió entre Wis1 i Sty1. La sobreexpressió de la Srk1 redueix la unió de Wis1 amb Sty1.
 - La Srk1 no regula la localització subcel·lular de la Wis1 en resposta a estrès.
 - La sortida de Sty1 del nucli en resposta a estrès es veu retardada en absència de la Srk1.



BIBLIOGRAFIA

1. Alemany V, Sanchez-Piris M, Bachs O, and Aligue R (2002) Cmk2, a novel serine/threonine kinase in fission yeast. *FEBS Letters*, **524**, 79-86.
2. Alexander MR, Tyers M, Perret M, Craig BM, Fang KS, and Gustin MC (2001) Regulation of cell cycle progression by Swe1p an Hog1p following hypertonic stress. *Mol Biol Cell*, **12**, 53-62.
3. Aoyama K, Mitsubayashi Y, Aiba H, and Mizuno T (2000) Spy1, a Histidine-Containing Phosphotransfer Signaling Protein, Regulates the Fission Yeast Cell Cycle through the Mcs4 Response Regulator. *J Bacteriol*, **182**, 4868-4874.
4. Bahler J, Wu JQ, Longtine MS, Shah NG, McKenzie A, III, Steever AB, Wach A, Philippsen P, and Pringle JR (1998a) Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *YEAST*, **14**, 943-951.
5. Bardwell AJ, Flatauer LJ, Matsukuma K, Thorner J, and Bardwell L (2001) A conserved docking site in MEKs mediates high-affinity binding to MAP kinases and cooperates with a scaffold protein to enhance signal transmission. *J Biol Chem*, **276**, 10374-10386.
6. Bardwell L and Thorner J (1996) A conserved motif at the amino termini of MEKs might mediate high-affinity interaction with the cognate MAPKs. *Trends in Biochemical Sciences*, **21**, 373-374.
7. Basi G, Schmid E, and Maundrell K (1993) TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe* nmt1 promoter affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene*, **123**, 131-136.
8. Bilsland-Marchesan E, Arino J, Saito H, Sunnerhagen P, and Posas F (2000) Rck2 Kinase Is a Substrate for the Osmotic Stress-Activated Mitogen-Activated Protein Kinase Hog1. *Mol Cell Biol*, **20**, 3887-3895.



9. Booher R and Beach D (1987) Interaction between cdc13+ and cdc2+ in the control of mitosis in fission yeast; dissociation of the G1 and G2 roles of the cdc2+ protein kinase. *EMBO J*, **7**, 2321-2327.
10. Booher R and Beach D (1988) Involvement of cdc13+ in mitotic control in *Schizosaccharomyces pombe*: possible interaction of the gene product with microtubules. *EMBO J*, **7**, 2321-2327.
11. Bozonet SM, Findlay VJ, Day AM, Cameron J, Veal EA, and Morgan BA (2005) Oxidation of a eukaryotic 2-Cys peroxiredoxin is a molecular switch controlling the transcriptional response to increasing levels of hydrogen peroxide. *J Biol Chem*, **280**, 23319-23327.
12. Brewster JL, de Valoir T, Dwyer ND, Winter E, and Gustin MC (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*, **259**, 1760-1763.
13. Brunet A, Pages G, and Pouyssegur J (1994) Growth factor-stimulated MAP kinase induces rapid retrophosphorylation and inhibition of MAP kinase kinase (MEK1). *FEBS Lett*, **346**, 299-303.
14. Buck V, Quinn J, Pino TS, Martin H, Saldanha J, Makino K, Morgan BA, and Millar JBA (2001) Peroxide Sensors for the Fission Yeast Stress-activated Mitogen-activated Protein Kinase Pathway. *Mol Biol Cell*, **12**, 407-419.
15. Bueno A and Russell P (1993) Two fission yeast B-type cyclins, Cig2 and Cdc13, have different functions in mitosis. *Mol Cell Biol*, **13**, 2286-2297.
16. Bueno A, Richardson H, Reed SI, and Russell P (1991) A fission yeast B-type cyclin functioning early in the cell cycle. *Cell*, **66**, 149-159.
17. Casso D and Beach D (1996) A mutation in a thioredoxin reductase homolog suppresses p53-induced growth inhibition in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet*, **252**, 518-529.
18. Castillo EA, Ayte J, Chiva C, Moldon A, Carrascal M, Abian J, Jones N, and Hidalgo E (2002) Diethylmaleate activates the transcription factor Pap1 by



covalent modification of critical cysteine residues. *Molecular Microbiology*, **45**, 243-254.

19. Castillo EA, Vivancos AP, Jones N, Ayté J, and Hidalgo E (2003) Schizosaccharomyces pombe cells lacking the Ran-binding protein Hba1 show a multidrug resistance phenotype due to constitutive nuclear accumulation of Pap1. *JBC*, **278**, 40565-40572.

20. Chang L and Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades (2001). *Nature*, **410**, 37-40. Review.

21. Chen D, Toone WM, Mata J, Lyne R, Burns G, Kivinen K, Barzma A, Jones N, and Bahler J (2003) Global Transcriptional Responses of Fission Yeast to Environmental Stress. *Mol Biol Cell*, **14**, 214-229.

22. Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, and Cobb MH (2001) MAP kinases. *Chem Rev*, **101**, 2449-2476.

23. Clotet J and Posas F (2007) Control of cell cycle in response to osmostress: lessons from yeast. *Methods Enzymol*, **428**, 63-76. Review.

24. Cohen P and Cohen PT (1989) Protein phosphatases come of age. *J Biol Chem*, **264**, 21435-21438.

25. Cohen PT, Brewis ND, Hughes V, and Mann DJ (1990). Protein serine/threonine phosphatases; an expanding family. *FEBS Lett*, **268**, 355-359.

26. Cottarel G (1997) Mcs4, a Two-Component System Response Regulator Homologue, Regulates the Schizosaccharomyces pombe Cell Cycle Control. *Genetics*, **147**, 1043-1051.

27. Creanor J and Mitchinson JM (1996) The kinetics of the B cyclin p56cdc13 and the phosphatase p80cdc25 during the cell cycle of the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *J Cell Sci*, **109**, 1647-1653.



- 28.** Crews ST and Fan CM (1999) Remembrance of things PAS: regulation of development by bHLH-PAS proteins. *Curr Opin Genet Dev*, **9**, 580-587.
- 29.** Czapski (1984) Reaction of .OH. *Methods Enzymol*, **105**, 209-215.
- 30.** de Nadal E, Alepuz PM, and Posas F (2002) Dealing with osmostress through MAP kinase activation. *EMBO Rep*, **3**, 735-740. Review.
- 31.** de Nadal E, Casadomé L, and Posas F (2003) Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol*, **23**, 229-237.
- 32.** Degols G and Russell P (1997) Discrete roles of the Spc1 kinase and the Atf1 transcription factor in the UV response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*, **17**, 3356-3363.
- 33.** Degols G, Shiozaki K, and Russell P (1996) Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*, **16**, 2870-2877.
- 34.** Dunand-Sauthier I, Walker CA, Narasimhan J, Pearce AK, Wek RC, and Humphrey TC (2005) Stress-activated protein kinase pathway functions to support protein synthesis and translational adaptation in response to environmental stress in fission yeast. *Eukaryot Cell*, **4**, 1785-1793.
- 35.** Egel R. The molecular Biology of *Schizosaccharomyces pombe*. Genetics, Genomics and Beyond. Springer ed. Heidelberg: 2004.
- 36.** Farr SB, D'Ari R, and Touati D (1986). Oxygen-dependent mutagenesis in *Escherichia coli* lacking superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 8268-8272.
- 37.** Featherstone C and Russell P (1991) Fission yeast p107wee1 mitotic inhibitor is a tyrosine/serine kinase. *Nature*, **349**, 808-811.



- 38.** Firestein R and Feuerstein N (1998) Association of Activating Transcription Factor 2 (ATF2) with the Ubiquitin-conjugating Enzyme hUBC9. IMPLICATION OF THE UBIQUITIN/PROTEASOME PATHWAY IN REGULATION OF ATF2 IN T CELLS. *J Biol Chem*, **273**, 5892-5902.
- 39.** Fisher DL and Nurse P (1996) A single fission yeast mitotic cyclin B p34cdc2 kinase promotes both S-phase and mitosis in the absence of G1 cyclins. *EMBO J*, **15**, 850-860.
- 40.** Flint DH, Smyk-Randall E, Tuminello JF, Draczynska-Lusiak B, and Brown OR (1993) The inactivation of dihydroxy-acid dehydratase in Escherichia coli treated with hyperbaric oxygen occurs because of the destruction of its Fe-S cluster, but the enzyme remains in the cell in a form that can be reactivated. *J Biol Chem*, **284**, 25547-25552.
- 41.** Fornerod M, Ohno M, Yoshida M and Mattaj IW (1997) CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell*, **90**, 1051-1060.
- 42.** Forsburg S L and Nurse P (1991) Identification of a G1-type cyclin puc1+ in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe [published erratum appears in Nautre 1991 Aug 15; 352(6336):648]. *Nature*, **351**: 245-248.
- 43.** Fuchs SY and Ronai Z (1999) Ubiquitination and Degradation of ATF2 Are Dimerization Dependent. *Mol Cell Biol*, **19**, 3289-3298.
- 44.** Fuchs SY, Tappin I, and Ronai Z (2000) Stability of the ATF2 Transcription Factor Is Regulated by Phosphorylation and Dephosphorylation. *J Biol Chem*, **275**, 12560-12564.
- 45.** Fujiwara D, Kobayashi O, Yoshimoto H, Harashima S, and Tamai Y (1999) Molecular mechanism of the multiple regulation of the Saccharomyces cerevisiae ATF1 gene encoding alcohol acetyltransferase. *Yeast*, **15**, 1183-1197.



- 46.** Fukuda M, Asano S, Nakamura T, Adachi M, Yoshida M, Yanagida M and Nishida E (1997a). CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature*, **390**, 308-310.
- 47.** Gaits F and Russell P (1999) Active Nucleocytoplasmatic Shuttling Required for Function and Regulation of Stress-Activated Kinase Spc1/Sty1 in Fission Yeast. *Mol Biol Cell*, **10**, 1395-1407.
- 48.** Gaits F, Degols G, Shiozaki K, and Russell P (1998) Phosphorylation and association with the transcription factor Atf1 regulate localization of Spc1/Sty1 stress-activated kinase in fission yeast. *Genes Dev*, **12**, 1464-1473.
- 49.** Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, and Brown PO (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell*, **11**, 4241-4257.
- 50.** Gotoh Y, Matsuda S, Takenaka K, Hattori S, Iwamatsu A, Ishikawa M, Kosako H, and Nishida E (1994) Characterization of recombinant Xenopus MAP kinase kinases mutated at potential phosphorylation sites. *Oncogene*, **9**, 1891-1898.
- 51.** Gould KL and Nurse P (1989) Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2+* protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature*, **342**, 39-45.
- 52.** Gould KL, Moreno S, Tonks NK, and Nurse P (1990) Complementation of the mitotic activator, p80cdc25, by a human protein-tyrosine phosphatase. *Science*, **250**, 1573-1576.
- 53.** Greenall A, Hadcroft AP, Malakasi P, Jones N, Morgan BA, Hoffman CS, and Whitehall SK (2002) Role of Fission Yeast Tup1-like Repressors and Prr1 Transcription Factor in Response to Salt Stress. *Mol Biol Cell*, **13**, 2977-2989.
- 54.** Gupta S, Campbell D, Derijard B, and Davis RJ (1995) Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science*, **267**, 389-393.



- 55.** Hanks SK and Quinn AM (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol*, **200**, 38-62.
- 56.** Hirota K, Hoffmann CS, Shibata T, and Ohta K (2003) Fission yeast Tup1-like repressors repress chromatin remodeling at the *fbp1+* promoter and the *ade6-M26* recombination hotspot. *Genetics*, **165**, 505-515.
- 57.** Hohmann S (2002) Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev*, **66**, 300–372.
- 58.** Iacovoni JS, Russell P, and Gaits F (1999) A new inducible protein expression system in fission yeast based on the glucose-repressed *inv1* promoter. *Gene*, **232**, 53-58.
- 59.** Jamieson DJ (1992) *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J Bacteriol*, **174**, 6678-6681.
- 60.** Jamieson DJ (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**, 1511–1527.
- 61.** Jia ZP, McCullough N, Martel R, Hemmingsen S, and Young PG (1992) Gene amplification at a locus encoding a putative Na⁺/H⁺ antiporter confers sodium and lithium tolerance in fission yeast. *EMBO J*, **11**, 1631-1640.
- 62.** Junttila MR, Li SP, and Westermarck J (2008) Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J*, **22**, 954-965. Review.
- 63.** Kanoh J, Watanabe Y, Ohsugi M, Iino Y, and Yamamoto M (1996) *Schizosaccharomyces pombe* *gad7+* encodes a phosphoprotein with a bZIP domain, which is required for proper G1 arrest and gene expression under nitrogen starvation. *Genes Cells*, **1**, 391-408.



- 64.** Kato T, Jr., Okazaki K, Murakami H, Stettler S, Fantes PA, and Okayama H (1996) Stress signal, mediated by a Hog1-like MAP kinase, controls sexual development in fission yeast. *FEBS Lett*, **378**, 207-212.
- 65.** Kawasaki Y, Nagao K, Nakamura T, and Yanagida M (2006) Fission yeast MAP kinase is required for the increased securin-separase interaction that rescues separase mutants under stresses. *Cell Cycle*, **5**, 1831-1839.
- 66.** Kon N, Krawchuk MD, Warren BG, Smith GR, and Wahls WP (1997) Transcription factor Mts1/Mts2 (Atf1/Pcr1, Gad7/Pcr1) activates the M26 meiotic recombination hotspot in pombe. *PNAS*, **94**, 13765-13770.
- 67.** Kon N, Schroeder SC, Krawchuk MD, and Wahls WP (1998) Regulation of the Mts1-Mts2-Dependent ade6-M26 Meiotic Recombination Hot Spot and Developmental Decisions by the Spc1 Mitogen-Activated Protein Kinase of Fission Yeast. *Mol Cell Biol*, **18**, 7575-7583.
- 68.** Kotlyarov A, Yannoni Y, Fritz S, Laass K, Telliez J, Pitman D, Lin L, and Gaestel M (2002) Distinct cellular functions of MK2. *Mol Cell Biol*, **22**, 4827-4835.
- 69.** Kovelman R and Russell P (1996) Stockpiling of Cdc25 during a DNA replication checkpoint arrest in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*, **16**, 86-93.
- 70.** Kudo N, Taoka H, Toda T, Yoshida M, and Horinouchi S (1999) A Novel Nuclear Export Signal Sensitive to Oxidative Stress in the Fission Yeast Transcription Factor Pap1. *J Biol Chem*, **274**, 15151-15158.
- 71.** Kushner S. An improved method for transformation of *Escherichia coli* with colE1 derived plasmids. 1978. Elsevier, Amsterdam. Ref Type: Generic.
- 72.** Laemmli (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.



73. Lawrence CL, Maekawa H, Worthington JL, Reiter W, Wilkinson CRM, and Jones N (2007) Regulation of *Schizosaccharomyces pombe* Atf1 Protein Levels by Sty1-mediated Phosphorylation and Heterodimerization with Pcr1. *J Biol Chem*, **282**, 5160-5170.
74. Lee J, Dawes IW, and Roe JH (1995) Adaptive response of *Schizosaccharomyces pombe* to hydrogen peroxide and menadione. *Microbiology*, **141**, 3127-3132.
75. Lee J, Dawes IW, and Roe JH (1997) Isolation, Expression, and Regulation of the pgr1+ Gene Encoding Glutathione Reductase Absolutely Required for the Growth of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*, **272**, 23042-23049.
76. Lee MS, Enoch T, and Piwnicka-Worms H (1994) mik1+ encodes a tyrosine kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15. *J Biol Chem*, **269**, 30530-30537.
77. Lei EP and Silve PA (2002) Protein and RNA export from the nucleus. *Dev Cell*, **2**, 261-272.
78. Leung J, Bouvier-Durand M, Morris PC, Guerrier D, Cheddor F, and Giraudat J (1994) Arabidopsis ABA response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science*, **264**, 1448-1452.
79. Li XY and Green MR (1996) Intramolecular inhibition of activating transcription factor-2 function by its DNA-binding domain. *Genes Dev*, **10**, 517-527.
80. Lindquist S and Kim G (1996) Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. *PNAS*, **93**, 5301-5306.
81. Livingstone C, Patel G, and Jones N (1995) ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO J*, **14**, 1785-1797.



- 82.** Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, and Darnell J. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. New York: W.H. Freeman and Company; 2000.
- 83.** Loewith R, Hubberstey A, and Young D (2000) Skh1, the MEK component of the mkh1 signaling pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci*, **113**, 153-160.
- 84.** Lopez-Aviles S, Grande M, Gonzalez M, Helgesen AL, Alemany V, Sanchez-Piris M, Bachs O, Millar JBA, and Aligue R (2005) Inactivation of the Cdc25 Phosphatase by the Stress-Activated Srk1 Kinase in Fission Yeast. *Molecular Cell*, **17**, 49-59.
- 85.** López-Avilés S*, Lambea E*, Moldón A, Grande M, Fajardo A, Rodríguez-Gabriel MA, Hidalgo E, and Aligue R (2008) Activation of Srk1 by the mitogen-activated protein kinase Sty1/Spc1 precedes its dissociation from the kinase and signals its degradation. *Mol Biol Cell*, **19**, 1670-1679.
- 86.** Lundgren K, Walworth N, Booher R, Dembski M, Kirschner M, and Beach D (1991) mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell*, **64**, 1111-1122.
- 87.** Macara IG (2001) Transport into and out of the nucleus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, **65**, 570-594.
- 88.** Madrid M, Soto T, Franco A, Paredes V, Vicente J, Hidalgo E, Gacto M, and Cansado J (2004) A Cooperative Role for Atf1 and Pap1 in the Detoxification of the Oxidative Stress Induced by Glucose Deprivation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*, **279**, 41594-41602.
- 89.** Madrid M, Soto T, Khong HK, Franco A, Vicente J, Perez P, Gacto M, and Cansado J (2006) Stress-induced Response, Localization, and Regulation of the Pmk1 Cell Integrity Pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*, **281**, 2033-2043.



- 90.** Maeda T, Tsai AY, and Saito H (1993) Mutations in a protein tyrosine phosphatase gene (PTP2) and a protein serine/threonine phosphatase gene (PTC1) cause a synthetic growth defect in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **13**, 5408-5417.
- 91.** Maeda T, Wurgler-Murphy SM, and Saito H (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, **369**, 242-245.
- 92.** Martin-Castellanos C, Labib K, and Moreno S (1996) B-type cyclins regulate G1 progression in fission yeast in opposition to the p25rum1 cdk inhibitor. *EMBO J*, **15**, 839-849.
- 93.** Mattaj IW and Englmeier L (1998) Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem*, **67**, 265-306.
- 94.** Matsumoto T and Beach D (1991) Premature initiation of mitosis in yeast lacking RCC1 or an interacting GTPase. *Cell*, **66**, 347-360.
- 95.** Maundrell K (1990) nmt1 of fission yeast. A high transcribed gene completely repressed by thiamine. *J Biol Chem*, **265**, 10857-10864.
- 96.** Maundrell K (1993) Thiamine-repressible expression vectors pREP and PRIP for fission yeast. *Gene*, **123**, 127-130.
- 97.** McGowan CH and Russell P (1993) Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *EMBO J*, **12**, 75-85.
- 98.** Millar JB, Buck V, and Wilkinson MG (1995) Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate and osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes and Dev*, **9**, 2117-2130.
- 99.** Millar JB, Lenaers G, and Russell P (1992a) Pyp3 PTPase acts as a mitotic inducer in fission yeast. *EMBO J*, **11**, 4933-4941.



- 100.** Millar JB, McGowan CH, Lenaers G, Jones R, and Russell P (1991) p80cdc25 mitotic inducer is the tyrosine phosphatase that activates p34cdc2 kinase in fission yeast. *EMBO J*, **10**, 4301-4309.
- 101.** Millar JB, Russell P, Dixon JE, and Guan KL (1992b) Negative regulation of mitosis by two functionally overlapping PTPases in fission yeast. *EMBO J*, **11**, 4943-4952.
- 102.** Mita H, Tsutsui J, Takekawa M, Witten EA, and Saito H (2002) Regulation of MTK1/MEKK4 Kinase Activity by Its N-Terminal Autoinhibitory Domain and GADD45 Binding. *Mol Cell Biol*, **22**, 4544-4555.
- 103.** Mitchinson JM (1957) The growth of single cells: I. *Schizosaccharomyces pombe*. *Experimental Cell Research*, **13**, 244-262.
- 104.** Moltz L, Booher R, Young P, and Beach D (1989) cdc2 and the Regulation of Mitosis: Six Interacting mcs Genes. *Genetics*, **122**, 773-782.
- 105.** Moradas-Ferreira P and Costa V (2000) Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death. *Redox Rep*, **5**, 277-285. Review.
- 106.** Moreno S, Klar A, and Nurse P (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol*, **194**, 795-823.
- 107.** Nakagawa CW, Mutoh N, and Hayashi Y (1995) Transcriptional Regulation of Catalase Gene in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*: Molecular Cloning of the Catalase Gene and Northern Blot Analyses of the Transcript. *J Biochem (Tokyo)*, **118**, 109-116.
- 108.** Nakagawa CW, Yamada K, Mutoh N (1999) Identification of the catalase gene promoter region involved in superinduction in *Schizosaccharomyces pombe* caused by cycloheximide and hydrogen peroxide. *FEMS Microbiol Lett*, **173**, 373-378.



- 109.** Nakagawa CW, Yamada K, and Mutoh N (2000) Role of Atf1 and Pap1 in the induction of the catalase gene of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biochem*, **127**, 233-238.
- 110.** Neely LA and Hoffman CS (2000) Protein kinase A and mitogen-activated protein kinase pathways antagonistically regulate fission yeast *fbp1* transcription by employing different modes of action at two upstream activation sites. *Mol Cell Biol*, **20**, 6426-6434.
- 111.** Nguyen AN and Shiozaki K (1999) Heat shock-induced activation of stress MAP kinase is regulated by threonine- and tyrosine-specific phosphatases. *Genes Dev*, **13**, 1653-1663.
- 112.** Nguyen AN, Ikner AD, Shiozaki M, Warren SM, and Shiozaki K (2002) Cytoplasmic Localization of Wis1 MAPKK by Nuclear Export Signal Is Important for Nuclear Targeting of Spc1/Sty1 MAPK in Fission Yeast. *Mol Biol Cell*, **13**, 2651-2663.
- 113.** Nguyen AN, Lee A, Place W, and Shiozaki K (2000) Multistep Phosphorelay Proteins Transmit Oxidative Stress Signals to the Fission Yeast Stress-activated Protein Kinase. *Mol Biol Cell*, **11**, 1169-1181.
- 114.** Norbury C and Moreno S (1997) Cloning cell cycle regulatory genes by transcomplementation in yeast. *Methods Enzymol*, **283**, 44-49.
- 115.** Nurse P (1975) Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature*, **256**, 547-551.
- 116.** Ogden JE and Fantes PA (1986) Isolation of a novel type of mutation in the mitotic control of *Schizosaccharomyces pombe* whose phenotypic expression is dependent on the genetic background and nutritional environment. *Curr Genet*, **10**, 509-514.



- 117.** Ohmiya R, Kato C, Yamada H, Aiba H, and Mizuno T (1999) Isolation of multicopy suppressors of the calcium sensitivity of a mutant lacking the bZIP transcription factor Atf1 in fission yeast. *Mol Gen Genet*, **261**, 297-306.
- 118.** Ohmiya R, Yamada H, Kato C, Aiba H, and Mizuno T (2000) The Prr1 response regulator is essential for transcription of *ste11+* and for sexual development in fission yeast. *Mol Gen Genet*, **264**, 441-451.
- 119.** Ohmiya R, Yamada H, Nakashima K, Aiba H, and Mizuno T (1995) Osmoregulation of fission yeast: cloning of two distinct genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase, one of which is responsible for osmotolerance for growth. *Mol Microbiol*, **18**, 963-973.
- 120.** Ossareh-Nazari B, Bachelerie F and Dargemont C (1997) Evidence for the role of Crm1 in signal-mediated nuclear protein export. *Science*, **278**, 141-144.
- 121.** Otilie S, Chernoff J, Hanning G, Hoffman CS, and Erikson RL (1992) The fission yeast genes *pyp1+* and *pyp2+* encode protein tyrosine phosphatases that negatively regulate mitosis. *Mol Cell Biol*, **12**, 5571-5580.
- 122.** Parker LL and Piwnica-Worms H (1992) Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science*, **257**, 1955-1957.
- 123.** Posas F and Saito H (1998) Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J*, **17**, 1385-1394.
- 124.** Proft M, Pascual-Ahuir A, de Nadal E, Arino J, Serrano R, and Posas F (2001) Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J*, **20**, 1123-1133.
- 125.** Quinn J, Findlay VJ, Dawson K, Millar JB, Jones N, Morgan BA, and Toone WM (2002). Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H₂O₂ levels in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*, **13**, 805-816.



- 126.** Rabilloud T, Heller M, Gasnier F, Luche S, Rey C, Aebersold R, Benahmed M, Louisot P, and Lunardi J (2002) Proteomics Analysis of Cellular Response to Oxidative Stress. EVIDENCE FOR IN VIVO OVEROXIDATION OF PEROXIREDOXINS AT THEIR ACTIVE SITE. *J Biol Chem*, **277**, 19396-19401.
- 127.** Rep M, Krantz M, Thevelein JM, and Hohmann S (2000). The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem*, **275**, 290-300.
- 128.** Rodriguez-Gabriel MA, Burns G, McDonald WH, Martin V, Yates JR, III, Bahler J, and Russell P (2003) RNA-binding protein Csx1 mediates global control of gene expression in response to oxidative stress. *EMBO J*, **22**, 6256-6266.
- 129.** Russell P and Nurse P (1986) *Schizosaccharomyces pombe* and *saccharomyces cerevisiae*: A look at yeasts divided. *Cell*, **45**, 781-782.
- 130.** Russell P and Nurse P (1987b) Negative regulation of mitosis by *wee1+*, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell*, **49**, 559-567.
- 131.** Saito Y, Gomez N, Campbell DG, Ashworth A, Marshall CJ, and Cohen P (1994) The threonine residues in MAP kinase kinase 1 phosphorylated by MAP kinase in vitro are also phosphorylated in nerve growth factor-stimulated rat pheochromocytoma (PC12) cells. *FEBS Lett*, **341**, 119-124.
- 132.** Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 1998. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Ref Type: Generic.
- 133.** Samejima I, Mackie S, and Fantes PA (1997) Multiple modes of activation of the stress-responsive MAP kinase pathway in fission yeast. *EMBO J*, **16**, 6162-6170.
- 134.** Samejima I, Mackie S, Warbrick E, Weisman R, and Fantes PA (1998) The Fission Yeast Mitotic Regulator *win1+* Encodes an MAP Kinase Kinase Kinase



That Phosphorylates and Activates Wis1 MAP Kinase Kinase in Response to High Osmolarity. *Mol Biol Cell*, **9**, 2325-2335.

135. Sanchez-Diaz A, Kanemaki M, Marchesi V, and Labib K (2004) Rapid depletion of budding yeast proteins by fusion to a heat-inducible degen. *Sci STKE*, **223**, 1-20.

136. Sanchez-Piris M, Posas F, Alemany V, Winge I, Hidalgo E, Bachs O, and Aligue R (2002) The Serine/Threonine Kinase Cmk2 Is Required for Oxidative Stress Response in Fission Yeast. *J Biol Chem*, **277**, 17722-17727.

137. Sansó M, Gogol M, Ayté J, Seidel C, and Hidalgo E (2008) Transcription Factors Pcr1 and Atf1 Have Distinct Roles in Stress- and Sty1-Dependent Gene Regulation. *Eukaryot Cell*, **7**, 826-835.

138. Schuller C, Brewster JL, Alexander MR, Gustin MC, and Ruis H (1994) The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *EMBO J*, **13**, 4382-4389.

139. Sengar AS, Markley NA, Marini NJ, and Young D (1997) Mkh1, a MEK kinase required for cell wall integrity and proper response to osmotic and temperature stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*, **17**, 3508-3519.

140. Shieh JC, Wilkinson MG, Buck V, Morgan BA, Makino K, and Millar JB (1997) The Mcs4 response regulator coordinately controls the stress-activated Wak1-Wis1-Sty1 MAP kinase pathway and fission yeast cell cycle. *Genes Dev*, **11**, 1008-1022.

141. Shiozaki and Russell (1996) Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev*, **10**, 2276-2288.



- 142.** Shiozaki K and Russell P (1995) Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAP kinase kinase homolog in the osmoregulation of fission yeast. *EMBO J*, **14**, 492-502.
- 143.** Shiozaki K, Akhavan-Niaki H, McGowan CH, and Russell P (1994) Protein phosphatase 2C, encoded by *ptc1+*, is important in the heat shock response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*, **14**, 3742-3751.
- 144.** Shiozaki K, Shiozaki M, and Russell P (1998) Heat Stress Activates Fission Yeast Spc1/Sty1 MAPK by a MEKK-Independent Mechanism. *Mol Biol Cell*, **9**, 1339-1349.
- 145.** Shiozaki K, Shiozaki M, and Russell P (1997) Mcs4 mitotic catastrophe suppressor regulates the fission yeast cell cycle through the Wlk1-Wis1-Sty1 kinase cascade. *Mol Biol Cell*, **8**, 409-419.
- 146.** Sies H (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*, **215**, 213-219.
- 147.** Sies H and Menck CF (1992) Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutat Res*, **275**, 367-375.
- 148.** Smith DA, Toone WM, Chen D, Bahler J, Jones N, Morgan BA, and Quinn J (2002) The *Srk1* Protein Kinase Is a Target for the Sty1 Stress-activated MAPK in Fission Yeast. *J Biol Chem*, **277**, 33411-33421.
- 149.** Soto T, Beltran FF, Paredes V, Madrid M, Millar JBA, Vicente-Soler J, Cansado J, and Gacto M (2002) Cold induces stress-activated protein kinase-mediated response in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *European Journal of Biochemistry*, **269**, 5056-5065.
- 150.** Stade K, Ford CS, Guthrie C, and Weis K (1997) Exportin 1 (*Crm1p*) is an essential nuclear export factor. *Cell*, **90**, 1041-1050.



- 151.** Stadtman ER and Levine RL (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, **25**, 207-218.
- 152.** Stern B and Nurse P (1996) A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genk*, **12**, 345-350.
- 153.** Sudo T, Kawai K, Matsuzaki H, and Osada H (2005) p38 mitogen-activated protein kinase pplays a key role in regulating MAPKAP2 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **337**, 415-421.
- 154.** Sugiura R, Toda T, Dhut S, Shuntoh H, Kuno T, and Kuno T (1999) The MAPK kinase Pek1 acts as a phosphorylation-dependent molecular switch. *Nature*, **399**, 479-483.
- 155.** Takeda T, Toda T, Kominami K, Kohnosu A, Yanagida M, and Jones N (1995) *Schizosaccharomyces pombe atf1+* encodes a transcription factor required for sexual development and entry into stationary phase. *EMBO J*, **14**, 6193-6208.
- 156.** Tamura S, Lynch KR, Lerner J, Fox J, Yasui A, Kikuchi K, Suzuki Y, and Tsuiki S (1989) Molecular cloning of rat type 2C (IA) protein phosphatase mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 1796-1800.
- 157.** Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T, and Nishida E (2000) A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol*, **2**, 110-116.
- 158.** Teige M, Scheikl E, Reiser V, Ruis H, and Ammerer G (2001) Rck2, a member of the calmodulin-protein kinase family, links protein synthesis to high osmolarity MAP kinase signaling in budding yeast. *PNAS*, **98**, 5625-5630.
- 159.** Tibbles LA and Woodgett JR (1999) The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 1230-1254. Review.



- 160.** Toda T, Shimanuki M, and Yanagida M (1991) Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast FUS3 and KSS1 kinases. *Genes Dev*, **12**, 60-73.
- 161.** Toda T, Dhut S, Superti-Furga G, Gotoh Y, Nishida E, Sugiura R, and Kuno T (1996) The fission yeast *pmk1+* gene encodes a novel mitogen-activated protein kinase homolog which regulates cell integrity and functions coordinately with the protein kinase C pathway. *Mol Cell Biol*, **16**, 6752-6764.
- 162.** Toone WM, Kuge S, Samuels M, Morgan BA, Toda T, and Jones N (1998) Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1 . *Genes Dev*, **12**, 1453-1463.
- 163.** Turi TG, Mueller UW, Sazer S, and Rose JK (1996) Characterization of a nuclear protein conferring brefeldin A resistance in *Schizosaccharomyces pombe*. *JBC*, **271**, 9166-9171.
- 164.** van Dam H, Wilhelm D, Herr I, Steffen A, Herrlich P, and Angel P (1995) ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *EMBO J*, **14**, 1798-1811.
- 165.** Vivancos AP, Castillo EA, Biteau B, Nicot C, Ayté J, Toledano MB, and Hidalgo E (2005) A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H₂O₂-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 8875-8880.
- 166.** Vivancos AP, Castillo EA, Jones N, Ayté J, and Hidalgo E (2004) Activation of the redox sensor Pap1 by hydrogen peroxide requires modulation of the intracellular oxidant concentration. *Mol Microbiol*, **52**, 1427-1435.
- 167.** Vivancos AP, Jara M, Zuin A, Sansó M, and Hidalgo E (2006) Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H₂O₂ levels, different response pathways. *Mol Genet Genomics*, **276**, 495-502.



- 168.** Wahls WP and Smith GR (1994) A heteromeric protein that binds to a meiotic homologous recombination hot spot: correlation of binding and hot spot activity. *Genes Dev*, **8**, 1693-1702.
- 169.** Warbrick E and Fantes PA (1991) The wis1 protein kinase is a dosage-dependent regulator of mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J*, **10**, 4291-4299.
- 170.** Warbrick E and Fantes PA (1992) Five novel elements involved in the regulation of mitosis in fission yeast. *Mol Gen Genet*, **232**, 440-446.
- 171.** Watanabe Y and Yamamoto M (1996) *Schizosaccharomyces pombe* pcr1+ encodes a CREB/ATF protein involved in regulation of gene expression for sexual development. *Mol Cell Biol*, **16**, 704-711.
- 172.** Wenk J, Trompeter HI, Pettrich KG, Cohen PT, Campbell DG, and Mieskes G (1992) Molecular cloning and primary structure of a protein phosphatase 2C isoform. *FEBS Lett*, **297**, 135-138.
- 173.** Wilkinson MG and Millar JB (2000) Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *FASEB J*, **14**, 2147-2157. Review.
- 174.** Wilkinson MG, Samuels M, Takeda T, Toone WM, Shieh JC, Toda T, Millar JB, and Jones N (1996) The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes Dev*, **10**, 2289-2301.
- 175.** Wolberger C (1998) Combinatorial transcription factors. *Curr Opin Genet Dev*, **8**, 552-559.
- 176.** Wu TC and Lichten M (1994) Meiosis-induced double-strand break sites determined by yeast chromatin structure. *Science*, **263**, 515-518.
- 177.** Yamada T, Mizuno K, Hirota K, Kon N, Wahls WP, Hartsuiker E, Murofushi H, Shibata T, and Ohta K (2004) Roles of histone acetylation and



chromatin remodeling factor in a meiotic recombination hotspot. *EMBO J*, **23**, 1792–1803.

178. Yamada K, Nakagawa CW, and Mutoh N (1999) *Schizosaccharomyces pombe* homologue of glutathione peroxidase, which does not contain selenocysteine, is induced by several stress and works as an antioxidant. *Yeast*, **15**, 1125-1132.

179. Yang KS, Kang SW, Woo HA, Hwang SC, Chae HZ, Kim K, and Rhee SG (2002) Inactivation of Human Peroxiredoxin I during Catalysis as the Result of the Oxidation of the Catalytic Site Cysteine to Cysteine-sulfinic Acid. *J Biol Chem*, **277**, 38029-38036.

180. Zaitsevskaya-Carter T and Cooper JA (1997) Spm1, a stress-activated MAP kinase that regulates morphogenesis in *S. pombe*. *EMBO J*, **16**, 1318-1331.

ANNEXE I: LLISTAT DE PRODUCTES

PRODUCTE	CASA COMERCIAL	REFERÈNCIA
Acetat de liti (LiAc)	Sigma	L6883
Àcid acètic	Merck	1.00062.2500
Àcid bòric	Sigma	B0252
Àcid cítric	Sigma	C0759
Àcid molíbdic	Sigma	M0878
Àcid nicotínic	Sigma	N4126
Àcid pantotènic hemicalcium salt	Sigma	P2250
Àcid tricloroacètic (TCA)	Fluka	91233
Acida sòdica	Sigma	S2002
Acrilamida (Protogel)	National Diagnostics	EC-890
L-Adenina hidrociorur	Sigma	A8751
Alexa α-mouse 594	Invitrogen	A11005
Alexa α-mouse 488	Invitrogen	A11001
Anti-actina	Sta. Cruz Biotech, Inc.	Sc-1615
Anti-Cdc2 (PSTAIR)	Upstate	06-923
Anti-HA (12CA5)	Roche	11583816001
Anti-HA	Sta. Cruz Biotech, Inc.	Sc-7392
Anti-HA agarose beads	Sigma	A2095
Anti-Hog1 (Y215)	Sta. Cruz Biotech, Inc.	Sc-9079
Anti-myc (9E10)	Upstate	05419
Anti-fosfo-p38 (T180/Y182)	Cell Signaling	9211
Agarosa	Pronadisa	8023
Agar	Pronadisa	1802.00
Ampicil·lina	Sigma	A9518
Aprotinina	Sigma	A1153
ATP (Adenosine 5'Triphosphatedi Sodium salt)	Sigma	A7699
ATP (γ-32P)	Perkin-Elmer	PE NG 502A500UC
d-Biotina	Sigma	B4501
Blau de bromofenol	Biorad	161.0404
B-mercaptoetanol	Merck	805740
Bradford (BIORAD Protein Assay)	Biorad	500-0006
Bromur d'Etidi	Sigma	E1510

Blau de Coomassie	Brilliant Blue 250 R (Sigma)	B0770
BSA (Albúmina sérica bovina)	Sigma	A7906
Carbonat de sodi anhidre	Merck	1.06392.1000
Cloramfenicol	Sigma	C0378
Clorur d'amoni	Sigma	A4514
Clorur de Calci dihidratat	Calbiochem	208291
Clorur de Ferro sextahidratat	Sigma	F2877
Clorur de Magnesi	Fluka	63064
Clorur de Potassi	Fluka	60128
Clorur de Sodi	Fluka	71380
DAPI	Sigma	D2629
DMSO	Sigma	D2438
DTT	Sigma	D9779
ECL	Biological Industries	20-500-120
EcoTaq DNA pol	Ecogen	ETAQ500
EDTA	Sigma	E4884
EGTA	Sigma	E4378
Enzims de restricció	Invitrogen	-----
Etanol ABS	Merck	1.00983.1000
Extracte bacto-malt	Pronadisa	1708.00
Extracte de llevat	Pronadisa	1702.00
Follin	Merck	1.09001.0500
Fosfat de sodi dibàsic	Sigma	S5136
Fluorur de Sodi	Sigma	S7920
Glass beads	Sigma	G8772
Glicerol	Sigma	G7893
Glicina	MP Biomedic	808838
Glucosa	Sigma	G8270
Glusulasa	Perkin-Elmer	NE154001EA
Glutatió	Sigma	G4251
Glutatió-Sefarosa 4B	GE Healthcare	17-0756-01
Guanidina	Sigma	G4505
G-418 (Gentamicina)	Sigma	G8168
Hidrogen-ftalat de Potassi	Fluka	60359
Hidroxid de Sodi (NaOH)	Merck	6498
Hidroxiurea (HU)	Sigma	H8627
High Fidelity	Roche	11.732.650.001
L-Histidina hidroclorur	Sigma	H5659
HRP-α-mouse	Biorad	170-6516
HRP-α-rabbit	Biorad	170-6515

Immobilized protein A	Pierce	20334
Myo-Inositol	Sigma	I5125
Iodur de Potassi	Sigma	P8256
IPTG	Appllichem	A100810025
L-Leucina hidrocloreur	Sigma	L8000
Leupeptina	Sigma	L2884
L-Lisina hidrocloreur	Sigma	L8662
Llet en pols descremada	Sveltesse (Nestlé)	-----
Lligasa (T4 DNA ligase)	Invitrogen	15224-017
Marcador de DNA	1 Kb <i>ladder</i> Generuler (Fermentas)	SM0311
Marcador de proteïna (Dual Precision Plus Protein™ Standards Dual Color)	Biorad	161-0374
Metanol	Merck	1.06009.2500
Mowiol	Calbiochem	475904
NP-40 (Igepal CA630)	Sigma	I3021
Ortovanadat de Sodi	Sigma	S6508
PABA (p-aminobenzoic acid)	Sigma	A0129
PEG (Polietilenglicol)	Sigma	P3640
Persulfat amònic (PSA)	Aldrich	21,558/9
PIPES	Sigma	P7986
PMSF	Sigma	T7626
Ponceau-S	Sigma	P7170
Protein G-Sepharose 4B	Sigma	P3296
SDS	Fluka	71729
Sorbitol	Sigma	S1876
ssDNA	BD	S0277
Sulfat de Coure	Sigma	C1297
Sulfat de Magnesi	Fluka	63138
Sulfat de Manganès	Sigma	M7634
Sulfat de Zinc heptahidratat	Sigma	Z4750
Tiamina (B1)	Sigma	T4625
Sodium potassi tartrat tetrahidratat	Fluka	60412
TEMED	Biorad	161-0801
Triptona	Pronadisa	1612.00
Tris	Serva	37190
Tritó X-100	Sigma	X-100
Trombina (Thrombin protease)	Amersham	27-0846-01

Tween-20	Sigma	P1379
Uracil hydrochlorur	Sigma	U0750
Zymolyase 20T	Seikagaku Corp.	120491

