

**CONTROL DE LA MITOSI
PEL MECANISME DE VIGILANCIA
DE FASE S**

Roger Palou Marín

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

2014

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

CONTROL DE LA MITOSI PEL MECANISME DE VIGILÀNCIA DE FASE S

Memòria presentada per optar al grau de
Doctor en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina
per la Universitat Autònoma de Barcelona

2014

Director de la Tesi Doctoral

Co-directora

Doctorand

Dr. David Garcia Quintana

Dra. Gloria Palou Marín

Roger Palou Marín

Al meu avi

Índex

INTRODUCCIÓ.....	15
1 Regulació del cicle cel·lular eucariota	17
1.1 El cicle cel·lular del llevat de gemmació <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
1.2 Mecanismes de control del cicle cel·lular	18
1.2.1 Quinases dependents de ciclines	18
1.2.2 Ciclines	19
1.2.3 Regulació de l'activitat de Cdk1	23
1.2.4 Regulació transcripcional del cicle	26
1.2.5 Regulació per proteòlisis del cicle cel·lular	28
2 Control de l'entrada a mitosi.....	32
2.1 Mitosi en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
2.1.1 Control de la transició metafase-anafase.....	33
2.1.2 Control de la sortida de mitosi	35
3 Mecanismes de vigilància de la integritat genòmica	38
3.1 El mecanisme de vigilància de fase S.....	39
3.1.1 Activació del <i>checkpoint</i> de fase S.....	41
3.1.2 Resposta del <i>checkpoint de fase S</i>	42
3.2 Mecanismes de vigilància de la mitosi.....	45
3.3 El mecanisme de vigilància de la morfologia.....	47
OBJECTIUS.....	49
MATERIALS I MÈTODES	53
1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
2 Medis de cultiu	56
2.1 Generació d'estrès replicatiu.....	57

2.2	Generació de dany al DNA.....	57
3	Tècniques de biologia molecular.....	58
3.1	Amplificació de DNA per PCR	58
3.2	Mutagènesi puntual dirigida per PCR.....	59
3.3	Electroforesi de DNA en gels d'agarosa-bromur d'etidi.....	60
3.4	Clonació	61
3.5	Lligació del producte de PCR i del vector	61
3.6	Transformació d' <i>Escherichia coli</i>	62
3.7	Extracció de DNA plasmídic	62
3.8	Preparació d' <i>E.coli</i> DH5 α competents amb clorur de rubidi	63
3.9	Preparació d' <i>E.coli</i> BL21(DE3)RIL competents amb clorur de calci 64	
3.10	Construccions usades en aquest treball	66
3.11	Extracció de DNA genòmic de llevat	66
4	Generació de soques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67
4.1	Plasmidis usats en aquest treball	67
4.1.1	Col·lecció pFa6a.....	67
4.1.2	Col·lecció pGEX.....	67
4.1.3	Col·lecció pRS	68
4.2	Transformació de llevat.....	68
4.3	Generació de soques de deleció.....	69
4.3.1	Generació de soques <i>bar1</i> Δ	70
4.4	Generació de soques que expressen una proteïna etiquetada .	71
5	Tècniques de biologia cel·lular en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	72
5.1	Determinació de la densitat cel·lular d'un cultiu	72
5.2	Dilucions seriades	72
5.3	Experiments de cicle cel·lular en una fase S no pertorbada	73

5.4	Experiments d'activació del <i>checkpoint de fase S</i>	74
5.5	Experiments de sincronització en Nocodazol	75
5.6	Citometria de flux (FACS, <i>Fluorescent Activated Cell Sorting</i>)	75
6	Tècniques bioquímiques.....	77
6.1	Extracció de proteïna total de cèl·lules de llevat amb àcid tricloroacètic.....	77
6.2	Electroforesi en gel de poliacrilamida desnaturalitzant	78
6.3	Immunoblot i anticossos utilitzats	79
6.4	Assaig quinasa <i>in vitro</i> de Rad53	81
6.5	Immunoprecipitació de proteïnes	82
6.6	Assaig d'activitat Cdk1 mitòtica <i>in vitro</i>	83
6.7	Producció de proteïnes recombinants.....	84
6.8	Purificació de proteïnes recombinants.....	85
6.9	<i>Contour-clamped Homogeneous Electric Field electrophoresis Pulse Field Gel Electroforesi</i>	86
7	Microscòpia de fluorescència.....	87
7.1	Fixació amb metanol-acetona pel recompte d'anafases amb DAPI	87
7.2	Microscòpia amb cèl·lules vives.....	88
8	Taula de soques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilitzades.....	90
9	Taula d'oligonucleòtids utilitzats en aquest treball	94
1	El mecanisme de vigilància de la fase S estabilitza Swe1 en resposta a estrès genotòxic.....	101
1.1	Els nivells de Swe1 s'estabilitzen en resposta a estrès replicatiu	101
1.2	L'estabilització dels nivells de Swe1 en resposta a estrès replicatiu és dependent de Mec1	103

1.2.1	L'estabilització dels nivells de Swe1 en resposta a estrès replicatiu depèn de les dues quinases efectores del <i>checkpoint</i> Rad53 i Chk1.....	105
1.2.2	Mec1 intervé directament en l'estabilització dels nivells de Swe1 en resposta a estrès replicatiu.....	110
1.3	El <i>checkpoint de fase S</i> estabilitza els nivells de Swe1 en resposta a dany al DNA	113
2	El <i>checkpoint de fase S</i> inhibeix l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès genotòxic	115
2.1	Cerca de marcadors de l'activitat Cdk1 mitòtica <i>in vivo</i>	115
2.1.1	Validació de Pol12 com a marcador de l'activitat Cdk1 mitòtica <i>in vivo</i>	115
2.1.2	Anàlisi d'altres marcadors de l'activitat Cdk1 mitòtica <i>in vivo</i> 117	
2.2	L'activitat Cdk1 mitòtica és inhibida en presència d'estrès replicatiu.....	120
2.2.1	La ciclina mitòtica Clb2 s'expressa en presència d'estrès replicatiu.....	122
2.3	Swe1 és dispensable en la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès replicatiu	125
2.4	La inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès replicatiu és dependent de Mec1	127
2.4.1	Rad53 és dispensable en la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès replicatiu.....	127
2.4.2	La inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica és dependent de Mec1	129
2.5	Swe1 i Rad53 inhibeixen de manera redundant l'activitat Cdk1 mitòtica	131

2.5.1	La deleció de les dues quinases efectores del <i>checkpoint de fase S</i> no és suficient per permetre l'activitat Cdk1 mitòtic en resposta a estrès replicatiu	136
2.5.2	L'al·lel no fosforilable Cdk1-19F reemplaça la deleció de Swe1 en el control de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès replicatiu.....	137
2.6	L'al·lel Swe1-AQ reemplaça la deleció de Swe1 en el control de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès replicatiu	140
2.7	El <i>checkpoint de fase S</i> inhibeix l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a dany al DNA.....	142
3	L'activitat Cdk1 mitòtica de cèl·lules exposades a estrès replicatiu està inhibida en un assaig <i>in vitro</i>	148
3.1	L'assaig de l'activitat Cdk1 mitòtica és fàcilment saturat.....	148
3.2	L'activitat Cdk1 de fase M de les cèl·lules exposades a estrès replicatiu mesurada <i>in vitro</i> està inhibida de manera dependent Swe1 a través de la fosforilació de la tirosina 19.....	149
3.3	Control de l'activitat Cdk1 mitòtica pel <i>checkpoint de fase S</i> ..	153
3.3.1	Control de l'activitat Cdk1 mitòtica per Rad53	153
3.3.2	Control de l'activitat Cdk1 mitòtica per Mec1 <i>in vitro</i>	155
3.3.3	Rad53 recombinant inhibeix l'activitat Cdk1 mitòtica <i>in vitro</i>	156
4	Tres vies diferents impedeixen la segregació dels cromosomes en resposta a la presència d'estrès genotòxic	158
4.1	La deleció de Pds1/secarina no permet la segregació cromosòmica en presència de dany al DNA.....	158
4.1.1	La progressió del cycle cel·lular a temperatura permissiva no està alterada en el mutant <i>pds1Δ</i>	160
4.2	La presència d'activitat Cdk1 mitòtica en mutants <i>rad53 swe1</i> no és suficient per permetre la segregació cromosòmica en presència de dany al DNA	162

4.3	Les cèl·lules <i>rad53 swe1 pds1</i> entren en mitosi en presència de dany al DNA.....	163
4.3.1	La soca <i>rad53-21 swe1Δ pds1 Δ</i> segrega cromosomes en presència de dany al DNA sense haver completat la replicació	166
4.4	L'al·lel <i>Swe1-AQ</i> reemplaça el mutant nul <i>swe1Δ</i> pel que fa a la pèrdua de control de la segregació del DNA.....	169
4.5	En absència de <i>Pds1</i> /securina, <i>Rad53</i> impedeix el tall de la cohesina, contribuint a evitar la segregació cromosòmica.....	170
4.6	El mutant de cohesió <i>scc1-73</i> també permet la segregació cromosòmica en presència de dany al DNA en cèl·lules incapaces d'inhibir l'activitat <i>Cdk1</i> mitòtica	173
4.7	El triple <i>rad53 swe1 pds1</i> és incapaç d'evitar l'entrada a mitosi també en presència d'estrès replicatiu.....	179
4.8	La segregació cromosòmica en el triple mutant <i>rad53-21 pds1Δ swe1Δ</i> correlaciona amb fusos mitòtics anafàsics.....	181
4.9	La segregació cromosòmica en presència d'estrès genotòxic no va acompanyada d'alliberació de <i>Cdc14</i> del nuclèol	184
4.10	El <i>checkpoint de fase S</i> conjuntament amb el <i>SAC</i> inhibeixen l'entrada a mitosi en resposta d'estrès genotòxic.....	190
4.10.1	<i>Pds1</i> és redundantment estabilitzat pel <i>checkpoint</i> de fase S i pel <i>checkpoint</i> d'assemblatge del fus mitòtic (<i>SAC</i>) en resposta a estrès genotòxic	193
	DISCUSSIÓ.....	201
1	El <i>checkpoint</i> de fase S inhibeix l'activitat <i>Cdk1</i> mitòtica en resposta a estrès genotòxic	203
1.1	L'estabilització dels nivells de <i>Swe1</i> en una fase S compromesa depèn del <i>checkpoint</i> de fase S.....	204
1.2	Model de regulació de l'activitat <i>Cdk1</i> mitòtica pel <i>checkpoint</i> de fase S	205

1.3	La presència desregulada de l'activitat Cdk1 mitòtica no és suficient per permetre la segregació cromosòmica en presència d'estrès genotòxic en fase S.....	211
2	Estabilització de la cohesió en resposta a estrès genotòxic en fase S	212
2.1	Estabilització de Pds1/securina en presència d'estrès genotòxic en fase S.....	212
2.2	El <i>checkpoint</i> de fase S i el <i>checkpoint</i> d'assemblatge del fus mitòtic (SAC) redundantment participen en l'estabilització de Pds1/securina en resposta a estrès genotòxic en fase S.....	212
2.3	Tanmateix, la deleció de Pds1/securina no és suficient per permetre la segregació cromosòmica en presència d'estrès genotòxic en fase S.....	215
3	La inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica i del tall de cohesina impedeixen la segregació cromosòmica en presència d'estrès genotòxic en fase S.....	216
3.1.1	Conservació d'una regulació redundant en el control de la mitosi en presència d'estrès genotòxic.....	217
3.1.2	El triple mutant <i>rad53 swe1 pds1</i> presenta segregació cromosòmica en presència d'estrès genotòxic sense alliberació de Cdc14	218
3.1.3	Implicació de Rad53 en la regulació de la mitosi de manera independent de l'activitat CDK mitòtica	220
	CONCLUSIONS	223
	BIBLIOGRAFIA	227
	ANNEXOS	251
	Taula de figures	253
	Abreviatures	257

INTRODUCCIÓ

1 Regulació del cicle cel·lular eucariota

1.1 El cicle cel·lular del llevat de gemmació *Saccharomyces cerevisiae*

El cicle de divisió cel·lular eucariota té dues possible formes de divisió del material genètic: la divisió mitòtica i la divisió meiòtica. La divisió mitòtica, implicada en la proliferació cel·lular, consisteix en el repartiment equitatiu del material genètic donant lloc a dues cèl·lules filles idèntiques. La divisió meiòtica, que té com a objectiu generar gàmetes per a la reproducció sexual, consisteix amb una ronda de replicació del material genètic seguit de dues rondes de segregació cromosòmica, de forma que el contingut genètic es redueix a la meitat passant de cèl·lules diploides a haploides. Aquest treball es centra en la regulació de la divisió mitòtica.

El cicle cel·lular mitòtic eucariota comprèn un conjunt de processos ordenats que tenen com a objectiu la generació de dues cèl·lules filles. Això inclou la duplicació (*replicació*) completa i sense errors del genoma, la segregació de les cromàtides germanes als pols oposats de la cèl·lula en divisió i finalment, la separació física de la cèl·lula en dues filles portadores de la informació genètica completa.

El cicle de divisió cel·lular eucariota s'ha dividit històricament en quatre fases (Figura 1):

- Dues fases transitòries o de preparació: G1 (*Gap 1*) que comprèn des del naixement de la cèl·lula filla fins al inici de la replicació i G2 (*Gap 2*), des del final de la replicació fins al inici de la mitosi.
- Dues fases crítiques: la replicació del DNA (fase S, síntesi) i la segregació dels cromosomes (fase M, mitosi).

1.2 Mecanismes de control del cicle cel·lular

Una estricta regulació del cicle cel·lular és crucial per preservar la informació genètica i la viabilitat cel·lular. És essencial, per una banda, que els diferents processos cel·lulars només s'iniciïn quan les cèl·lules estan preparades per acabar satisfactòriament el procés que comencen. Per altra banda, és essencial evitar que processos posteriors en el cicle tinguin lloc quan els previs encara no han acabat. D'aquesta manera, s'aconsegueix que el cicle sigui un conjunt de fenòmens ordenats unidireccionalment.

El control del cicle cel·lular es basa en dos sistemes reguladors acoblats i sincronitzats. En primer lloc, l'activitat Quinasa Dependent de Ciclina (*Cyclin Dependent Kinase* (CDK)), que dispara els diferents processos del cicle cel·lular, i la funció de la qual s'associa a diferents ciclines expressades a les diferents fases del cicle (Figura 1). En segon lloc, un programa transcripcional que dona lloc a onades d'expressió gènica específiques a les diferents fases del cicle. Aquest oscil·lador transcripcional és l'encarregat d'expressar proteïnes que regulen l'activitat CDK, paradigmàticament les ciclines i inhibidors de l'activitat CDK.

La regulació del cicle per part del programa transcripcional implica l'existència de proteïnes la presència de les quals és transitòria al llarg del cicle. S'ha descrit que la major part de complexos presenten dualitat en quant a l'expressió, amb subunitats presents constitutivament i altres de presència acotada en un període del cicle. Així doncs la regulació de l'activitat d'aquests complexos es basa en un assemblatge en el moment en que el complex es necessari, el que es coneix com a assemblatge just-quan-cal (*just-in-time*) (de Lichtenberg et al. 2005).

1.2.1 Quinases dependents de ciclines

Malgrat l'existència de múltiples CDKs en llevat de gemmació (Cdk1, Pho85, Kin28, Ssn3 i Ctk1) només Cdc28/Cdk1 és essencial per la progressió del cicle cel·lular (de Lichtenberg et al. 2005; Hartwell et al. 1973; Jallepalli & Kelly 1997).

Cdk1 és un proteïna quinasa, altament conservada, que fosforila residus aminoacídics serina o treonina anteriors a prolina. Codificada pel gen essencial CDC28, és l'ortòleg de Cdk1 en altres organismes, com per exemple humans, on actuen diferents CDK paràlogues a les diferents fases del cicle (Taula 1). El gen CDC28 s'expressa de manera constitutiva en el cicle mitòtic, a diferència de les ciclines (Mendenhall et al. 1987).

L'activació de Cdk1 requereix com a mínim tres condicions: la fosforilació d'un residu treonina conservat al llaç T (Introducció 1.2.3), l'absència de fosforilació inhibidora a un residu conservat a l'extrem N-terminal (Introducció 1.2.3.1) i la unió d'una subunitat ciclina activadora (Introducció 1.2.2).

1.2.2 Ciclines

Les ciclines, subunitats activadores de les CDKs, varen ser descobertes com a proteïnes que apareixien i desapareixien de manera sincrònica en un cicle cel·lular (Evans et al. 1983). En *S. cerevisiae* s'han identificat nou ciclines que s'associen a Cdk1 en les diferents fases del cicle, conferint especificitat a l'activitat CDK, i que històricament s'ha dividit en dos tipus, ciclines de fase G1 o Cln i ciclines tipus B o Clb (Pines 1995; Morgan 1995)(Taula 1).

	<i>S. cerevisiae</i>		<i>Humans</i>
Fase G1	Cln1,2,3-Cdk1	Fase G1	Ciclina D-Cdk4/6
Fase S	Clb5,6-Cdk1	Transició G1/S	Ciclina E-Cdk2/1
Fase G2	Clb3-4-Cdk1	Fase S-G2	Ciclina A-Cdk1
Fase M	Clb1-2-Cdk1	Fase M	Ciclina B-Cdk1

Taula 1. Correlació dels complexos CDK a *S. cerevisiae* i a humans. En llevat de gemació existeix una única Cdk i múltiples ciclines (Evans et al. 1983; Schwob & Nasmyth 1993; Koch & Nasmyth 1994); en humans existeixen múltiples Cdks i ciclines (Giordano et al. 1989; Fang & Newport 1991; Pines & Hunter 1991).

Introducció

Les ciclins Cln1,2,3 dirigeixen el cicle durant la fase G1 (Nash et al. 1988; Hadwiger et al. 1989; Richardson et al. 1989). El paper essencial de les ciclins de fase S Clb5,6 és disparar la replicació del DNA (Schwob & Nasmyth 1993; Donaldson et al. 1998). Les ciclins Clb3 i Clb4 juguen un paper secundari en la fase G2 (Ghiara et al. 1991; Surana et al. 1991; Fitch et al. 1992; Richardson et al. 1992). El paper essencial de les ciclins mitòtiques Clb1,2 és activar la segregació dels cromosomes (*anafase*), mentre que la seva desaparició és necessària per permetre la divisió en dues cèl·lules (*citoquinesi*) (Ghiara et al. 1991; Surana et al. 1991; Fitch et al. 1992; Richardson et al. 1992). Aquesta seqüència es resumeix a la Figura 1.

En un cicle no pertorbat totes les ciclins, a excepció de Cln3, s'expressen per parelles amb onades de producció i destrucció (Tyers et al. 1993).

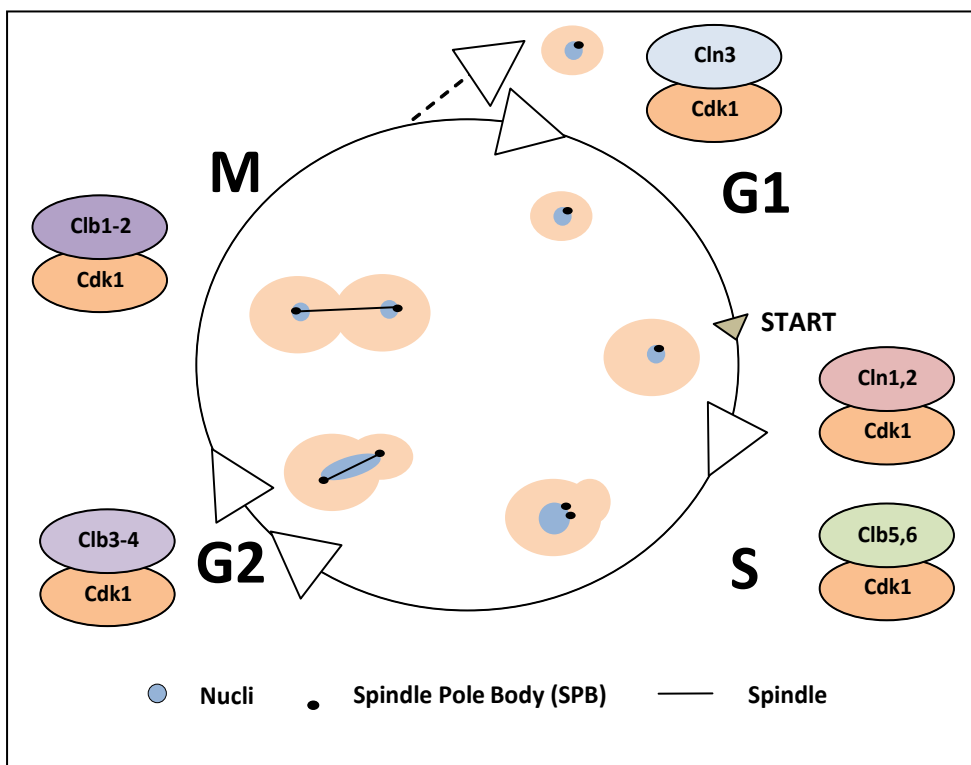


Figura 1. Cicle cel·lular mitòtic de *Saccharomyces cerevisiae*. Una única CDK, Cdk1, s'associa a diferents ciclins dependent de la fase del cicle. L'activitat de Cdk1 regula l'aparició de la gemma, la replicació, la segregació i la divisió cel·lular.

1.2.2.1 Ciclines de fase G1

Les ciclines de fase G1 es divideixen en dos grups funcionals, per un costat Cln3 i per l'altre Cln1 i Cln2.

Cln3, els nivells de la qual són estables al llarg del cycle mitòtic, és regulada per la seva localització subcel·lular (Garí et al. 2001; Wang et al. 2004; Vergés et al. 2007). L'alliberament del seu ancoratge peri-reticle endoplasmàtic, un cop la cèl·lula ha assolit una dimensió que garanteixi iniciar una ronda de replicació i divisió amb garanties (Vergés et al. 2007), permet la seva translocació al nucli, on l'activitat Cln3-Cdk1 és responsable d'activar Start.

Start (punt de Restricció a cèl·lules humanes (Pardee 1974)) és un punt de control en el qual les cèl·lules es comprometen a realitzar un nou cycle de divisió mitòtica. Per superar Start les cèl·lules han d'assolir una mida crítica, en cas contrari no poden creuar aquest punt (Johnston et al. 1977; Schneider et al. 2004).

Les ciclines Cln1 i Cln2 són responsables de fenòmens posteriors a Start entre els quals la gemmació, la duplicació dels cossos polars del fus mitòtic (*Spindle Pole Bodies* (SPB)) o la degradació de Sic1, inhibidor de l'activitat Cdk1 associada a les ciclines de tipus B; degradació que determina l'entrada de les cèl·lules en fase S.

1.2.2.2 Ciclines de fase S

Durant Start es transcriuen també les ciclines de fase S Clb5,6 (Schwob & Nasmyth 1993; Donaldson et al. 1998) (Introducció 1.2.4). Clb5 i Clb6 unides a Cdk1 conformen l'activitat S-Cdk1 encarregada de disparar els orígens de replicació juntament amb l'activitat DDK (Dbf4-Cdc7). Alhora, l'activitat S-Cdk1 impedeix la re-activació d'orígens de replicació que un cop ja han estat disparats (Dahmann et al. 1995; Masumoto et al. 2002; Tanaka et al. 2007; Zegerman & Diffley 2007).

Tot i la similitud de seqüència i funció, Clb5 i Clb6 presenten múltiples diferències essent una de les més rellevants el fet que Clb5 pot disparar orígens de replicació primerencs i tardans, mentre que Clb6 únicament primerencs (Donaldson et al. 1998). Aquest fet es deu a que Clb5 no es degradada fins a l'anafase de forma dependent del sistema ubiquitina-

Introducció

Iligasa APC associat a la subunitat Cdc20 (Shirayama et al. 1999) (Introducció 1.2.5). En canvi, Clb6 es degrada a mitja fase S de forma dependent del sistema ubiquitina-Iligasa SCF associat a la subunitat Cdc4 (Jackson et al. 2006).

1.2.2.3 Ciclines de fase G2 i M

Les ciclines de fase G2 Clb3,4 s'expressen al final de la fase S i són presents fins al final de la mitosi (Fitch et al. 1992; Richardson et al. 1992) (Introducció 1.2.4.). La funció de Clb3,4 està relacionada principalment amb l'assemblatge del fus mitòtic en la transició G2/M (Richardson et al. 1992; Rahal & Amon 2008).

Posteriorment, en la transició G2/M s'expressen les ciclines Clb1,2 (Introducció 1.2.4.), presentant un pic de màxima expressió 10 minuts abans de l'anafase (Fitch et al. 1992; Surana et al. 1991; Richardson et al. 1992; Maher et al. 1995; Koranda et al. 2000). En aquest sentit, l'activitat Cdk1-Clb2 predomina sobre Cdk1-Clb1, ja que la primera representa el 85% de l'activitat quinasa en cèl·lules aturades en mitosi (Surana et al. 1993).

Les ciclines mitòtiques són necessàries per la progressió a mitosi. Per una banda, l'activitat Clb1,2-Cdk1 és essencial per l'activació del Complex Promotor de l'Anafase (APC), responsable de l'eliminació de la proteïna Pds1/secarina, esdeveniment necessari per l'entrada a anafase (Rudner & Murray 2000; Rahal & Amon 2008) (Introducció 1.2.5). Per altre banda, l'activitat Clb1,2-Cdk1 dirigeix l'elongació del fus mitòtic, necessària per la segregació de les cromàtides germanes (Surana et al. 1991; Fitch et al. 1992; Richardson et al. 1992; Amon et al. 1993; Grandin & Reed 1993; Rahal & Amon 2008).

L'activitat Clb1,2-Cdk1 promou també el canvi de creixement polar de la gemma a creixement isotròpic (Grandin & Reed 1993; Lew & Reed 1993).

Per últim, les ciclines mitòtiques poden suplir les funcions de les ciclines de fase S en la replicació del DNA en absència d'aquestes (*clb5Δ clb6Δ*) (Donaldson et al. 1998; Hu & Aparicio 2005).

1.2.3 Regulació de l'activitat de Cdk1

A més de la necessitat de formar el complex amb una ciclina per a la seva activació, Cdk1 està regulada positivament i negativament per fosforilacions i negativament per proteïnes inhibidores.

L'activació de Cdk1 requereix la fosforilació per la quinasa Cak1 de la treonina 169 al llaç T. Aquesta posició de Cdk1 està altament conservada al llarg de l'evolució i és essencial per la progressió del cicle cel·lular (Thuret et al. 1996; Deshaies & Kirschner 1995). La fosforilació de la treonina 169 no mostra canvis periòdics, l'activitat de Cak1 sembla ser constant al llarg del cicle (Espinoza et al. 1996; Sutton & Freiman 1997).

Cdk1 és regulada per una segona fosforilació, aquesta reversible en la tirosina 19 i mediada per la quinasa Swe1. La fosforilació de la tirosina 19 inhibeix l'activitat Cdk1 mitòtica sense afectar l'activitat Cdk1 de fase S (Amon et al. 1992; Sorger & Murray 1992; Booher et al. 1993) (Introducció 1.2.3.1).

Dues proteïnes s'uneixen als complexos Cdk1-ciclina inhibint la seva activitat al bloquejar el centre actiu de Cdk1. Far1 inhibeix els complexos Cdk1-Cln en resposta a la presència de feromones (Peter & Herskowitz 1994; Tyers & Futcher 1993). Sic1 inhibeix els complexos Clb-Cdk1 (Mendenhall 1993; Knapp et al. 1996). Sic1 és expressat al final de la mitosi (Introducció 1.2.4) i juga dos papers. Per una banda, regular la transició G1/S, impedit l'entrada prematura quan després de Start les ciclines de fase S Clb5/6 comencen acumular-se: Sic1 estableix un llindar d'activació de l'activitat Cln-Cdk1. Només quan s'ha acumulat suficient Cln1,2-Cdk1, Sic1 assoleix el grau de fosforilació que el marca per destrucció. La degradació de Sic1 allibera l'activitat Clb5,6-Cdk1 donant lloc al inici de replicació (Schwob et al. 1994; Verma et al. 1997; Feldman et al. 1997; Nash et al. 2001; Kõivomägi et al. 2011). En segon lloc, Sic1 col·labora en la ràpida inactivació de l'activitat Clb-Cdk1, necessària per la sortida de mitosi (Donovan et al. 1994; Toyn et al. 1997; Visintin et al. 1998) (Introducció 2.1.2).

1.2.3.1 *Swe1* i la fosforilació de la Y19

Swe1 és l'ortòleg a *Saccharomyces cerevisiae* de la tirosina-quinasa *Wee1* (Taula 2), inicialment descoberta *Schizosaccaromyces pombe* (Nurse & Thuriaux 1980). *Swe1* s'expressa a G1 amb el mateix patró que les ciclines CLN2 i CLB5 i s'acumula en fase S (Ma et al. 1996). La seva degradació depèn de l'activitat Cdk1 mitòtica i de la quinasa Cdc5, les quals fosforilen *Swe1* promovent-ne la degradació pel sistema ubiquitina-proteasoma APC^{Cdc20} (Thornton & Toczyski 2003; Asano et al. 2005).

Com el seu homòleg en *S. pombe*, *Swe1* fosforila Cdk1 inhibint-ne l'activitat mitòtica (Booher et al. 1993; Russell & Nurse 1987; Gould & Nurse 1989). *Swe1* sembla reconèixer específicament el complex Cdk1-Clb1,2 i en menor mesura també el complex Cdk1-Clb3,4; però no afecta Cdk1 en complex amb ciclines de fase S (Hu & Aparicio 2005).

	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Humans
Quinasa	Wee1/Mik1	Swe1	Wee1/Myt1
Fosforilació a Cdk1	T14Y15/Y15	Y19	Y15/T14

Taula 2. *Swe1* és una quinasa altament conservada. En *S. pombe* Wee1 fosforila la T14 i la Y15 (Gould & Nurse 1989) i Mik1 la Y15 (Den Haese et al. 1995) , en *S. cerevisiae* fosforila la Y19 (Booher et al. 1993) i en Humans fosforila la Y15 de Cdk1 (McGowan & Russell 1993).

Al llevat de gemmació, la fosforilació de Cdk1 a la Y19 és revertida per la tirosina-fosfatasa Mih1, homòloga de Cdc25, fosfatasa encarregada d'eliminar la fosforilació inhibidora en *S. pombe* (Russell & Nurse 1986) (Figura 2).

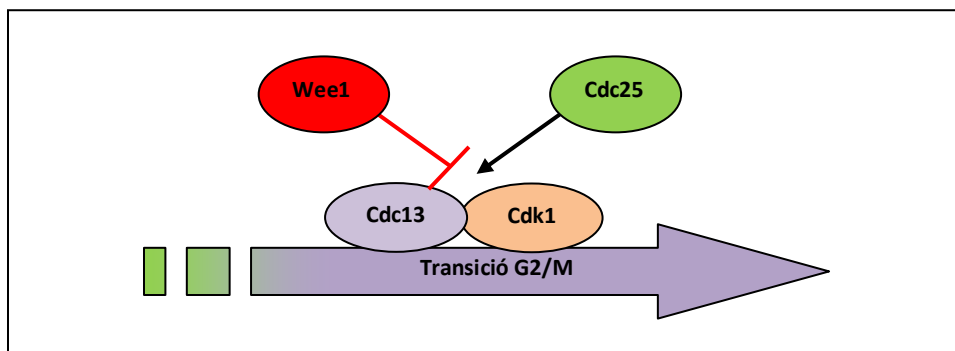


Figura 2. Model de regulació de l'activitat Cdk1 mitòtica en *S. pombe*: Wee1 actua a la transició G2/M inhibint l'activitat CDK mitòtica. Wee1 fosforila la Y15 de Cdc2 inhibint l'activitat Cdk1 de fase M i així l'entrada en mitosi. Aquesta inhibició és revertida per Cdc25 que elimina la fosforilació i permet l'entrada en mitosi.

El paper de Swe1 en la regulació de la mitosi en un cicle no pertorbat en llevat de gemmació no és tant clar com el paper de Wee1 en *S. pombe*. Mentre que al llevat de fissió els mutants de Wee1 presenten una mitosi prematura (Nurse & Thuriaux 1980), la deleció de Swe1 al llevat de gemmació només presenta un petit avançament de l'entrada en mitosi (Harvey & Kellogg 2003; Rahal & Amon 2008; Oikonomou & Cross 2011).

Intrigantment, Swe1 és totalment dispensable en la inhibició de l'entrada en mitosi i el manteniment de la viabilitat en presència d'estrès replicatiu. Si bé la fosforilació de Cdk1 a la Y19 s'estabilitza en presència d'estrès replicatiu, ni l'al·lel no fosforilable de Cdk1-19F ni la deleció *swe1Δ* entren prematurament a mitosi, ni en una fase S pertorbada ni en un cicle no pertorbat (Sorger & Murray 1992; Amon et al. 1992). En contrast, al llevat de fissió Wee1 juga un paper crític en aquest control. Wee1 és estabilitzada en resposta a estrès replicatiu pel *checkpoint de fase S*, el qual també indueix l'expressió d'una quinasa paràloga, Mik1, que reforça la fosforilació de la tirosina 15 de Cdk1. El *checkpoint* de fase S també inhibeix la fosfatasa Cdc25, fet que en conjunt inhibeix l'activitat Cdk1 mitòtica i impedeix l'entrada prematura en mitosi en aquestes condicions (Gould & Nurse 1989; Lundgren et al. 1991; Enoch & Nurse 1990; Rhind et al. 1997; Furnari et al. 1997; Furnari et al. 1999; Rhind & Russell 2001; Lopez-Girona et al. 2001) (Figura 3).

Introducció

Investigar el motiu de l'aparent manca de conservació d'aquest control, essencial per al manteniment de la integritat genòmica front agressions genotòxiques, és l'objectiu central d'aquesta tesi doctoral.

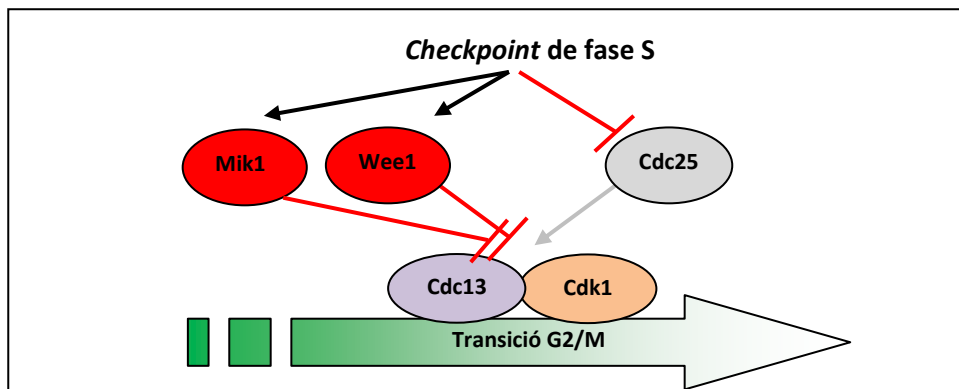


Figura 3. El *checkpoint de fase S* regula la transició G2/M inhibint l'activitat Cdk1 mitòtica, en *S. pombe*. El *checkpoint de fase S* estableix Wee1, induïx l'expressió de Mik1 i inhibeix la fosfatasa Cdc25.

1.2.4 Regulació transcripcional del cicle

Una fracció important dels gens de *S. cerevisiae* presenten una regulació transcripcional al llarg del cicle. Acoblada amb la destrucció regulada de les proteïnes corresponents (Introducció 1.2.5.) constitueixen un segon nivell de regulació del cicle cel·lular i n'asseguren la irreversibilitat, evitant la repetició de processos.

Les cèl·lules eucariotes posseeixen una sèrie de factors de transcripció, expressats i activats seqüencialment, que constitueixen un oscil·lador i que actua de manera independent de l'activitat de Cdk1 (Orlando et al. 2008). L'oscil·lador transcripcional controla, entre d'altres, l'expressió de les diferents ciclines específiques de cadascuna de les fases del cicle cel·lular així com els inhibidors de l'activitat Cdk1. Cal destacar que malgrat actuar de manera independent, l'activitat Cdk1 modula l'oscil·lació transcripcional, i aquesta determina l'expressió de les diferents ciclines activadores de Cdk1 a cada fase, contribuint a generar un sistema més robust (Simmons Kovacs et al. 2012) (Figura 4).

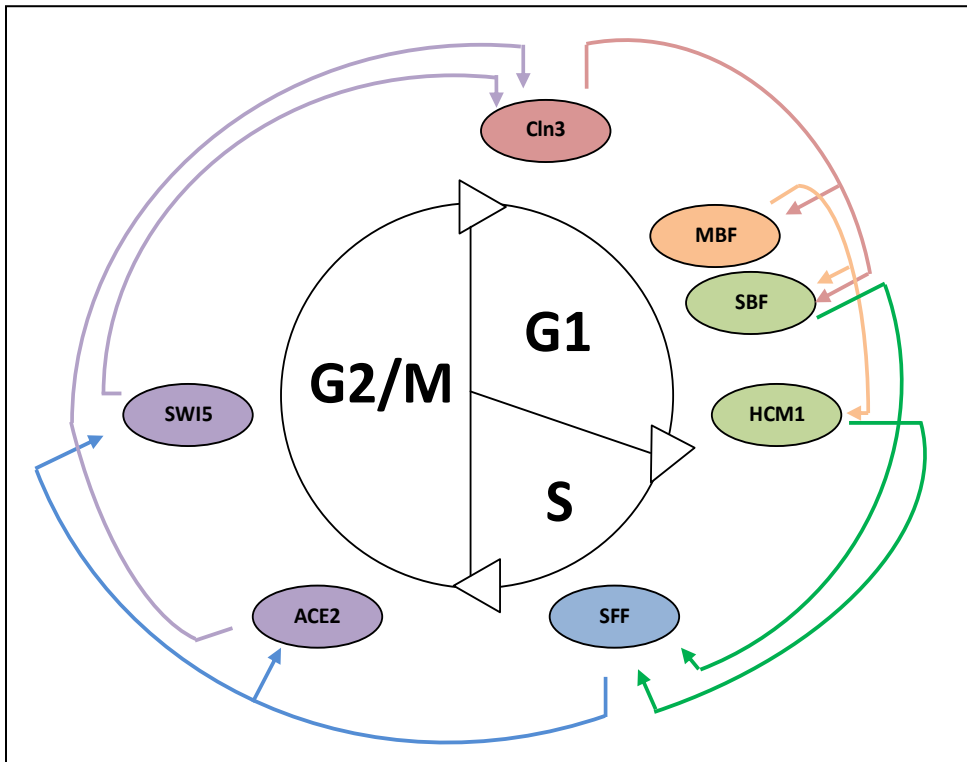


Figura 4. L'oscil·lador transcripcional. Representació esquemàtica de la xarxa de factors de transcripció expressats seqüencialment. Adaptat de (Orlando et al. 2008). Vegeu text.

En la fase G1 operen dos factors de transcripció implicats en la regulació de la transició G1/S: SBF (*Swi4/6 Cell-cycle Box Binding Factor*) (Nasmyth & Dirick 1991) i MBF (*Mlu I Cell- CycleBox Binging Factor*) (Verma et al. 1991). Aquests dos factors de transcripció són els anàlegs funcionals d'E2F en humans i la seva regulació és homòloga a la descrita en humans (Cooper 2006). Així doncs, quan la cèl·lula ha assolit una mida suficient, Cln3-Cdk1 fosforila Whi5, que manté SBF i probablement MBF inhibits (de Bruin et al. 2004; Costanzo et al. 2004). Malgrat que SBF i MBF són altament redundants, regulen l'expressió de diferents gens (Bean et al. 2005). SBF típicament activa l'expressió de les ciclines de G1 (CLN1 i CLN2), així com gens implicats en la biosíntesi de membrana i en la gemmació. MBF transcriu les ciclines de fase S (Clb5 i Clb6) i els gens implicats en la replicació i la reparació del DNA, com per exemple Cdc9 o

Introducció

Pol1 (Iyer et al. 2001; Simon et al. 2001; Koch et al. 1993; Nasmyth & Dirick 1991; Verma et al. 1991).

Durant aquesta primera onada transcripcional s'expressa també Hcm1, un factor de transcripció que opera a fase S (Horak et al. 2002). Aquest factor de transcripció de la família *Forkhead* és l'encarregat de dirigir l'expressió de gens involucrats en la segregació cromosòmica, la dinàmica dels fusos mitòtics i el procés de gemmació. A més, dóna lloc a l'expressió dels gens implicats en el factor de transcripció pro-mitòtic SFF, tals com FHK1, FHK2 i NDD1 (Pramila et al. 2006).

El factor de transcripció SFF regula l'expressió d'un conjunt de gens que formen l'anomenat grup de Clb2, implicats en l'entrada i progressió mitosi tal com les ciclines mitòtiques CLB1,2, CDC5 (l'ortòleg en llevat de la família de quinases Polo) o la subunitat CDC20 de la ubiquitina-lligasa reguladora de la mitosi (APC) (Ghiara et al. 1991; Cho et al. 1998; Spellman et al. 1998). Com a part de l'oscil·lador transcripcional, SFF indueix alhora l'expressió dels factors de transcripció ACE2 i SWI5 (Spellman et al. 1998), que regulen la darrera de les onades transcripcionals.

Al final de la fase M, Swi5 i Ace2 activen l'expressió de gens necessaris a G1 (Spellman et al. 1998), com les subunitats del complex MCM2-7 helicasa i SIC1, implicat en la inhibició de l'activitat Clb-Cdk1 a la sortida de mitosi i durant la fase G1 (Knapp et al. 1996; Toyn et al. 1997).

1.2.5 Regulació per proteòlisis del cicle cel·lular

Una fracció important de les proteïnes de *S. cerevisiae* presenten una destrucció regulada a través del sistema ubiquitina-proteasoma. Acoblada a la regulació transcripcional de la seva expressió al llarg del cicle (Introducció 1.2.4.), constitueix un segon nivell de regulació del cicle cel·lular i n'assegura la irreversibilitat, evitant la repetició de processos.

El proteasoma és una màquina molecular encarregada de digerir en polipèptids curts i aminoàcids les proteïnes que se li presenten (Schrader et al. 2009). La unió covalent de les cadenes de poli-ubiquitina serveix com a sistema per marcar les proteïnes per a la seva destrucció al

proteasoma. Els complexos responsables de la poli-ubiquitinació de proteïnes estan formats per tres activitats enzimàtiques:

- (1) L'enzim activador de la ubiquitina (E1) que activa la proteïna ubiquitina de manera dependent d'ATP. En *S. cerevisiae* existeix una única subunitat E1, Uba1.
- (2) L'enzim conjugador d'ubiquitina (E2), presenta la ubiquitina a la proteïna que s'ha de marcar
- (3) L'enzim ubiquitina-ligasa(E3), uneix la ubiquitina a la proteïna diana. És precisament aquesta última activitat enzimàtica la que dóna especificitat a la reacció. Del múltiples complexos E3 presents al llevat de gemmació, dos són essencials per la progressió del cicle cel·lular: SCF (*Skp1, Cullin, F-box*) i APC (*Anaphase Promoting Complex*).

1.2.5.1 Complex SCF

El complex SCF és actiu durant tot el cicle i el marcatge per ubiquitinació dels seus substrats està regulats per la fosforilació de la proteïna a eliminar. En molts casos aquesta fosforilació és dependent de Cdk1, com és el cas de Sic1. La degradació de Sic1 té lloc prèvia fosforilació d'aquest per Cln1,2-Cdk1 i és essencial per l'entrada de les cèl·lules en fase S (Introducció 1.2.3).

La degradació pel sistema ubiquitina-proteasoma també impedeix la repetició de processos cel·lulars ja realitzats prèviament en el cicle (Introducció 1.2.5). En aquest sentit, SCF és responsable de la degradació de Cdc6, component del pre-RC (*pre-Replicating Complex*) i essencial per l'activació dels orígens de replicació. La seva eliminació durant la fase S és un dels nivells de control que eviten la re-replicació (Drury et al. 1997; Nguyen et al. 2001).

1.2.5.2 APC (*Anaphase Promoting Complex*)

APC, el Complex Promotor de l'Anafase, regula la transició metafase-anafase i la sortida de mitosi. APC pot estar unit a dues molècules activadores paràlogues: Cdc20 i Cdh1 que li confereixen afinitat de substrat (Visintin et al. 1997). El paper essencial de Cdc20 és l'entrada a anafase (Yamamoto et al. 1996a; Cohen-Fix et al. 1996; Ciosk et al. 1998;

Introducció

Shirayama et al. 1999; Goh et al. 2000). Cdh1 és necessari per a l'eficient sortida de mitosi (Zachariae et al. 1998; Visintin et al. 1998; Jaspersen et al. 1998; Wasch & Cross 2002).

En la transició metafase-anafase, APC^{Cdc20} és el responsable de la poli-ubiquitinació de la Pds1/securina, una xaperona inhibidora de la proteasa Esp1/separasa. L'activitat Cdk1 mitòtica és necessària per activar la proteasa APC^{Cdc20} (Rudner & Murray 2000; Rudner et al. 2000). La poli-ubiquitinació de Pds1 per APC^{Cdc20} dóna lloc a la seva destrucció via proteasoma. Un cop alliberada la xaperona, la proteasa Esp1 talla la subunitat Mcd1 de la cohesina, pas necessari per possibilitar la segregació de les cromàtides germanes (Cohen-Fix et al. 1996; Yamamoto et al. 1996a; Ciosk et al. 1998; Shirayama et al. 1999; Goh et al. 2000)(Figura 5).

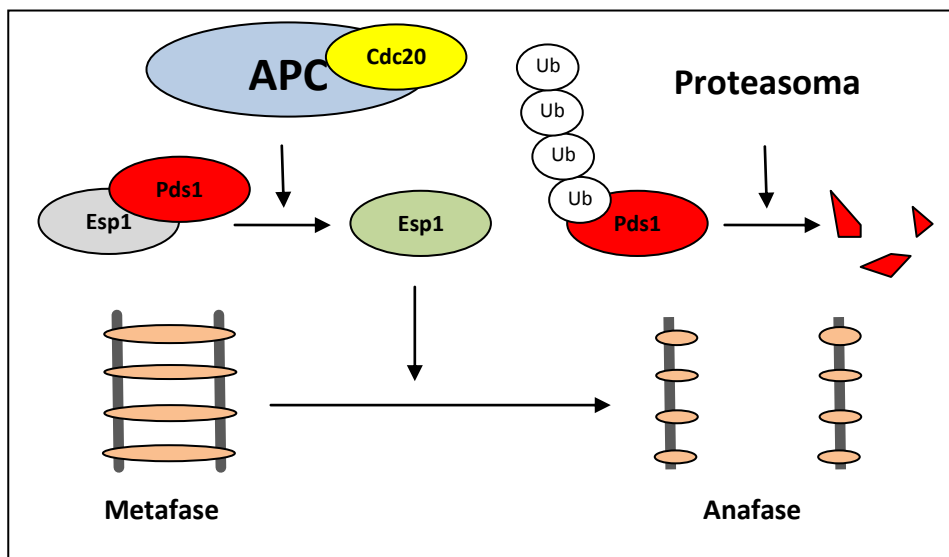


Figura 5. APC^{Cdc20} regula la transició metafase-anafase. Un cop alliberada, Esp1 talla la subunitat Mcd1 de la cohesina que manté les cromàtides germanes unides (el·lipses taronges), permetent la seva segregació. Esquema adaptat de (Zachariae & Nasmyth 1999).

Des del final d'anafase fins a Start del següent cicle, APC presenta com a co-activador la subunitat Cdh1. Mentre que l'expressió de Cdc20 està regulada al llarg del cicle i requereix activitat Cdk1 mitòtica per a la seva activació, la presència de Cdh1 és constant i es manté inhibida per

fosforilació de Cdk1 (Zachariae et al. 1998). L'activació d'APC^{Cdh1} al final de mitosi és donada per desfosforilació per la fosfatasa essencial Cdc14. APC^{Cdh1} promou la completa degradació de les ciclines mitòtiques i juntament amb Sic1 inactiva totalment l'activitat Cdk1 mitòtica, fet essencial per la sortida de mitosi (Jaspersen et al. 1998; Schwab et al. 1997; Visintin et al. 1998; Wasch & Cross 2002) (Introducció 2.1.2). APC^{Cdh1} és inhibida per l'acumulació d'activitat Cln1,2-Cdk1 a Start (Zachariae et al. 1998; Jaspersen et al. 1998; Irniger & Nasmyth 1997; Huang et al. 2001), la qual cosa permet l'acumulació de les ciclines de tipus Clb de nou (en primera instància les ciclines de fase S Clb5,6).

2 Control de l'entrada a mitosi

2.1 Mitosi en *Saccharomyces cerevisiae*

En els organismes eucariotes la fase M o mitosi és la fase ben definida del cicle cel·lular on el material genètic replicat es segrega equitativament a les dues cèl·lules filles. No obstant, existeixen variacions entre els diferents organismes eucariotes. En el llevat de gemmació no es produeix el desmantellament de la membrana nuclear que sí que es dona en cèl·lules animals; és el que es coneix com a mitosi tancada. Aquest fet implica que els fusos mitòtics són nuclears, ancorats als dos pols de la membrana nuclear (Copeland & Snyder 1993). A mesura que s'allarga el fus mitòtic durant l'anafase, el nucli pren una forma allargada. Al final de l'anafase, les dues masses nuclears resten connectats per un petit canal, assolint forma de papallona (Jaspersen & Winey 2004) (Figura 6).

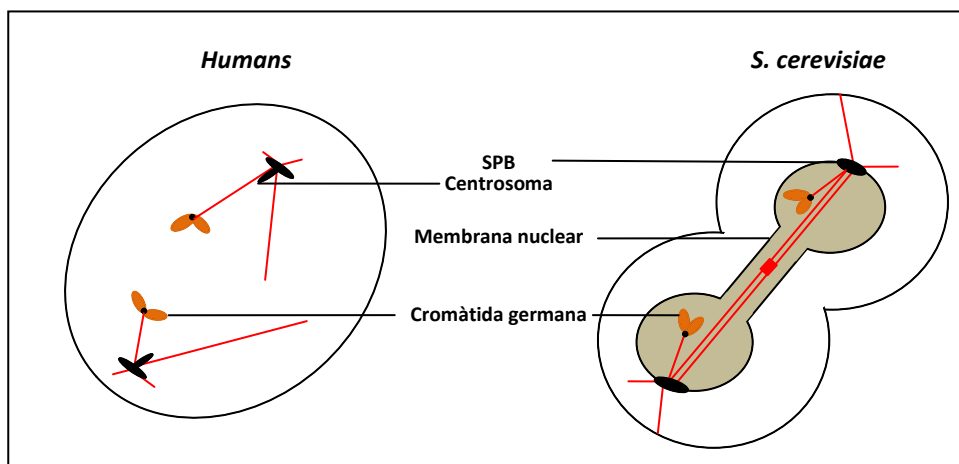


Figura 6. Esquema de l'anafase en cèl·lules humanes i en *Saccharomyces cerevisiae*. En humans, previ a la segregació dels cromosomes té lloc la dissolució de la membrana nuclear. En canvi, el llevat de gemmació presenta una mitosi tancada (vegeu text).

2.1.1 Control de la transició metafase-anafase

La mitosi és promoguda per l'activitat de les quinases pro-mitòtiques, Clb1,2-Cdk1 i Cdc5, essent la metafase el moment en que presenten màxima activitat.

La transició metafase-anafase és el moment crític del cicle cel·lular en que els cromosomes replicats i compactats passen d'estar en l'equador del fus mitòtic a separar-se simètricament cap als dos pols de la cèl·lula. Un cop hi ha unió bipolar de tots i cadascun dels cromosomes, el *checkpoint* d'assemblatge del fus mitòtic (*Spindle Assembly Checkpoint* (SAC)) permet el inici de l'anafase, a través de l'activació d'APC^{Cdc20} (Rieder et al. 1995)(Introducció 1.2.5.2). L'acció d'APC^{Cdc20} comporta l'activació d'Esp1/Separasa, amb el consegüent tal de la cohesina (Introducció 1.2.5.2).

2.1.1.1 Cohesina

Un cop replicades, les cromàtides germanes es mantenen unides mitjançant el complex cohesina. La cohesina és un dels tres complexos SMC (*Structural Maintenance of Chromosome*) presents a les cèl·lules eucariotes i forma un anell multiproteic que atrapa les dues cromàtides germanes (Nasmyth & Haering 2005; Michaelis et al. 1997). El complex cohesina està altament conservat i està format per Smc1, Smc3, Mcd1/Scc1 i Scc3. Mcd1 actua com a frontissa unint el domini ATP de Smc1/3 i la subunitat Scc3 (Haering et al. 2002). A més, Mcd1 interacciona amb les proteïnes Pds1 (Introducció 2.1.1.2.) i el complex Pds5-Rad61 (a continuació), les quals actuen a G1 impeding l'establiment prematur de la cohesió durant G1 (Sutani et al. 2009).

Durant la fase S Smc3 és acetilada per l'acetiltransferasa Eco1 (J. Zhang et al. 2008), la qual cosa fa la cohesina resistent a l'activitat inhibidora de la cohesió del complex Pds5/Rad61, permetent l'establiment de la cohesió (Rowland et al. 2009). Un cop completada la fase S, Eco1 és eliminat pel sistema ubiquitina-proteasoma mediat per la ubiquitina-ligasa SCF/Cdc4, la qual cosa restringeix l'establiment de la cohesió estigui a la fase S (Tóth et al. 1999; Lyons & Morgan 2011).

Introducció

En mitosi la cohesina es dissocia del complex quan la subunitat Mcd1 és tallada per Esp1/Separasa. Activitat que es manté inhibida fins a la transició metafase-anafase per Pds1/securina.

2.1.1.2 Pds1/securina i Esp1/separasa

L'entrada en anafase ve desencadenada per la degradació via ubiquitina-proteasoma de Pds1/securina, un cop aquesta és poli-ubiquitinada per APC^{Cdc20} (Hilioti et al. 2001). L'activació d' APC^{Cdc20} requereix activitat Cdk1 mitòtica (Rudner & Murray 2000; Rudner et al. 2000) i a més l'autorització per part del *checkpoint* d'assemblatge del fus mitòtic (Rieder et al. 1995) (SAC, vegeu 3.2 Introducció).

La desaparició de Pds1 allibera l'activitat proteasa de l'Esp1/Separasa, una proteasa similar a les caspases, que talla la subunitat Mcd1 de la cohesina (Nasmyth & Haering 2005). Aquest tall allibera les cromàtides germanes (Cohen-Fix et al. 1996; Ciosk et al. 1998; Verma et al. 1997; Shirayama et al. 1999), la qual cosa permet la segregació dels cromosomes per la tensió generada pel fus mitòtic (Rahal & Amon 2008).

En vertebrats, la separasa presenta dos nivells de regulació. Per un costat està inhibida per la unió a securina, com succeeix en llevat de gemmació (Waizenegger et al. 2000; Waizenegger et al. 2002). Per altre banda, està inhibida per la fosforilació de Cdk1 mitòtica, la qual és màxima en metafase i disminueix quan les cèl·lules entren a anafase (Stemmann et al. 2001; Gorr et al. 2005). En el cas de llevat de gemmació no s'ha pogut determinar l'existència d'aquest darrer control. Malgrat tot, s'ha observat que la quinasa Cdc5 fosforila Mcd1 en aminoàcids propers al lloc de tall de la Separasa, modulant-ne l'eficiència de tall (Alexandru et al. 2001).

2.1.1.3 Paper de l'activitat Cdk1 mitòtica en l'entrada i la progressió de la mitosi

En *S. cerevisiae*, com a mínim una de les dues ciclins mitòtiques és necessària per l'entrada a mitosis. En absència de les dues ciclins mitòtiques, les cèl·lules romanen amb una única massa de DNA i el fus mitòtic curt (Surana et al. 1991; Fitch et al. 1992; Richardson et al. 1992; Rahal & Amon 2008).

Per una banda l'activitat Cdk1 mitòtica és necessària en la transició metafase-anafase. En la seva absència Pds1 és degradada amb retard, fet que comporta el retard de l'anafase (Rahal & Amon 2008). En aquest sentit diferents subunitats d'APC (Cdc16, Cdc23 i Cdc27) són substrat de Clb2-Cdk1 *in vitro* i els corresponents al·lels no fosforilables comporten un retard en la degradació de Pds1 i l'anafase (Rudner & Murray 2000).

Per altra banda, l'activitat Cdk1 mitòtica és necessària per a l'elongació dels fusos mitòtics, imprescindible per dirigir la segregació dels cromosomes cap als pols de la cèl·lula. En absència d'activitat Cdk1 associada a Clb1/2 o a Clb3 els fusos mitòtics s'allarguen només fins a 3-4µm, col·lapsen i es tornen a formar fins aquesta longitud insuficient (Rahal & Amon 2008).

El paper de l'activitat Cdk1 mitòtica en la progressió de l'anafase està relacionat amb el control de les proteïnes motores dels microtúbuls. S'ha descrit que les proteïnes Kip1 i Cin8 són substrats *in vitro* de l'activitat Cdk1 mitòtica. Així doncs, un al·lel no fosforilable per Cdk1 de Kip1 impedeix la separació dels SPB (Chee & Haase 2010).

2.1.2 Control de la sortida de mitosi

A més del rol en l'entrada en anafase, la Separasa també participa en la sortida de mitosi formant part del complex FEAR (*cdc-Fourteen Early Anaphase Release*) responsable de l'alliberació de la fosfatasa Cdc14 del nuclèol al inici de l'anafase (Tinker-Kulberg & Morgan 1999; Sullivan & Uhlmann 2003).

L'activació de APC al inici de l'anafase no és suficient per promoure una anafase eficaç i completar la sortida de mitosi. L'alliberació de Cdc14 és requerida per contrarestar les fosforilacions de Cdk1 en determinats substrats crítics, fent la transició metafase-anafase més abrupta (Holt et al. 2008), estabilitzant l'elongació dels fusos mitòtics (Pereira & Schiebel 2003; Higuchi & Uhlmann 2005; Khmelinskii et al. 2007) i, finalment, autoritzant la citoquinesi (Visintin et al. 1998; Jaspersen & Morgan 2000).

Al llarg del cicle, Cdc14 és retinguda inactiva en el nuclèol unit a la proteïna Net1 (Shou et al. 1999; Visintin et al. 1999). L'alliberació de

Introducció

Cdc14 té lloc per fosforilació de Net1, de manera dependent de Cdk1 i Cdc5 (Shou et al. 2002; Visintin et al. 2003). Aquest fenomen té lloc en dues onades regulades independentment. Inicialment, té lloc una alliberació a nucli anomenada FEAR (*Cdc14 Early Anaphase Release*) (Stegmeier et al. 2002) i posteriorment una alliberació tant a nucli com a citoplasma dependent de MEN (*Mitòtic Exit Network*) (Figura 7).

En l'alliberació dependent de FEAR hi participa Esp1/Separasa. La Separasa talla Cdc55, la subunitat reguladora de la fosfatasa tipus PP2 (PP2A). PP2A manté hipofosforilada Net1, segrestant així en el nuclèol Cdc14. D'aquesta manera, Esp1 resulta necessària per reduir l'activitat de la fosfatasa PP2A^{Cdc55} sobre Net1, permetent així la fosforilació de Net1 per l'activitat Cdk1 mitòtica i Cdc5 i la conseqüent alliberació de Cdc14 (Queralt et al. 2006; Queralt & Uhlmann 2008b; Shou et al. 2002; Visintin et al. 2003). Aquesta onada promou una transició metafase-anafase més abrupta (Holt et al. 2008) i l'estabilització de l'elongació dels fusos mitòtics (Pereira & Schiebel 2003; Higuchi & Uhlmann 2005; Khmelinskii et al. 2007).

L'alliberació dependent de MEN porta Cdc14 també al citoplasma (Jaspersen et al. 1998; Yoshida et al. 2002; D'Amours et al. 2004) i be possibilitada per FEAR, que permet la desfosforilació de cert components de la via MEN (Pereira et al. 2002). Aquesta onada de Cdc14 comporta la desfosforilació, entre altres, de Cdh1 i Swi5, essencial per a la sortida de mitosi (1.2.5.2 i 1.2.4 Introducció, respectivament). Cdc14 contribueix en el tancament de l'activitat de Cdk1 desfosforilant la subunitat co-activadora d'APC Cdh1 i l'inhibidor de les ciclines Clb Sic1: el complex APC^{Cdh1} és inactiu en el inici de mitosi degut a la fosforilació per Cdk1 i, un cop activat per desfosforilació per Cdc14, elimina completament les ciclines de tipus CLB (Harper et al. 2002; Schwab et al. 1997; Visintin et al. 1997; Zachariae et al. 1998; Jaspersen et al. 1998; Visintin et al. 1998). L'eliminació de l'activitat Cdk1 mitòtica permet la citoquinesi, tancant el cicle de divisió cel·lular (Wasch & Cross 2002).

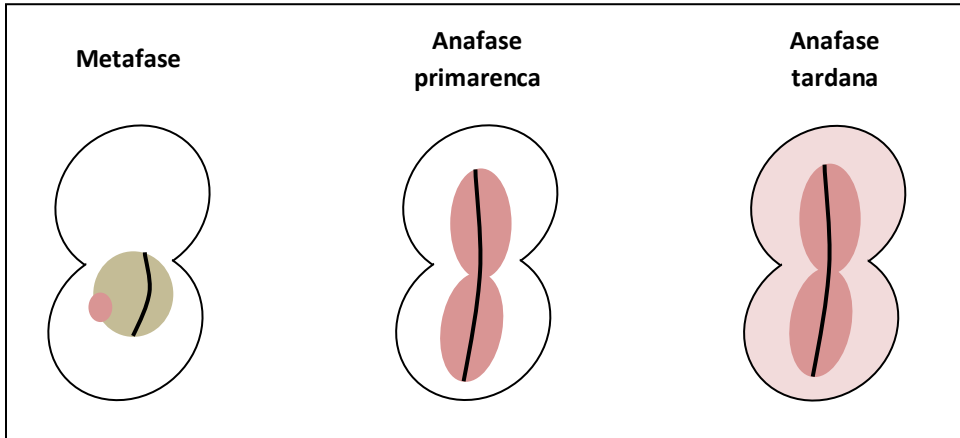


Figura 7. L'alliberació de Cdc14 té lloc en dues onades. Primer té lloc l'alliberació de Cdc14 dependent de FEAR. Posteriorment, té lloc l'alliberació dependent de MEN, en etapes més avançades de l'anafase. En rosa es representa Cdc14 i en gris el nucli.

3 Mecanismes de vigilància de la integritat genòmica

Per tal d'assegurar el manteniment de la integritat genètica i la viabilitat cel·lular és crucial que una fase del cicle no comenci fins que l'anterior hagi conclòs. Per exemple és essencial que ni la segregació dels cromosomes ni la divisió cel·lular no s'iniciïn fins que aquests hagin estat completament replicats. Per garantir aquesta dependència les cèl·lules eucariotes posseeixen mecanisme de vigilància (*checkpoint*) que operen per damunt del doble oscil·lador Cdk1/programa transcripcional que controla el cicle cel·lular no pertorbat.

Els *checkpoints* actuen com a sistemes *feed-forward* (per contraposició als controls feedback, que actuen sobre un esdeveniment previ en funció del rendiment d'un esdeveniment posterior). Els mecanismes de vigilància estan estructurats en cascades de transducció de senyal, constituïts per complexos sensors del senyal, quinases transductores centrals i elements efectors. Les quinases transmeten i amplifiquen la senyal, actuant sobre múltiples proteïnes diana.

El primer *checkpoint* va ser identificat com un mecanisme que, en resposta a la presència de dany al DNA, atenua la progressió de la replicació i impedeix l'entrada a mitosi amb l'objectiu de donar temps a la cèl·lula per reparar el dany (Hartwell & Weinert 1989; Weinert & Hartwell 1988). Aquest primer *checkpoint*, ara preferentment anomenat *checkpoint* (o mecanisme de vigilància) de la fase S (Weinert 1992), que és el que ocupa aquesta tesi doctoral, és clau per preservar la integritat del genoma i la viabilitat cel·lular. Cal tenir present que la inestabilitat genòmica és una de les forces motores del càncer en humans (Cahill et al. 1999; Hanahan & Weinberg 2011).

Amb posterioritat s'han identificat múltiples *checkpoints* crítics en la regulació del cicle cel·lular eucariota, que es presenten a continuació.

3.1 El mecanisme de vigilància de fase S

Els mecanismes de vigilància de fase S o *checkpoint* de fase S s'encarrega de respondre a situacions que posen en perill la correcta replicació dels cromosomes (estrès genotòxic): dany al DNA i estrès replicatiu per manca de dNTPs. El DNA està constantment exposat a estrès genotòxic, tant endogen, com l'oxidació o la hidròlisis de les bases nitrogenades, com exogen, com la radiació ionitzant o els agents mutagènics (Gale et al. 1987; De Bont & van Larebeke 2004). Si bé el dany al DNA es pot produir en qualsevol fase del cicle cel·lular, és la fase S on les cèl·lules són més vulnerables, ja que els cromosomes es troben descompactats i les bases nitrogenades a la cadena senzilla de DNA són més accessible als agents genotòxics que dins la doble cadena (Zhou & Bartek 2004). A més, és precisament durant la fase S que una lesió (reparable) no reparada es pot convertir en una mutació (permanent) per replicació.

En *S. cerevisiae* la quinasa transductora central del *checkpoint* de fase S és Mec1, ortòleg d'ATM i ATR en humans (Kato & Ogawa 1994; Weinert et al. 1994; Sun et al. 1996). Existeix una segona quinasa homòloga d'ATM, Tel1, però sembla jugar un paper minoritari en el *checkpoint de fase S* (Mantiero et al. 2007). Mec1 activa Rad53, la quinasa efectora principal del *checkpoint* (Sun et al. 1996), responsable de difondre el senyal actuant sobre diferents proteïnes diana.

Mec1 també activa la quinasa efectora Chk1 per impedir l'entrada en mitosi (Sanchez et al. 1999) (Figura 8). Si bé Chk1 és essencial per respondre a lesions que no poden ser detectades a fase S i són detectades G2/M, com per exemple trencament de doble cadena (l'anomenat *checkpoint* de dany al DNA), Chk1 és dispensable en la resposta a lesions que són detectades a fase S (*checkpoint* de fase S). Mentre que tant els muntants *rad53* com els mutants *mec1* presenten una elevada sensibilitat a estrès genotòxic, els mutants *chk1* no (Sanchez et al. 1999; Allen et al. 1994a).

El *checkpoint de fase S* està altament conservat evolutivament. Les proteïnes transductores en els diferents organismes formen part de la família de les quinases relacionades amb la fosfoinositol-3 quinasa (PIKK)

Introducció

(Keith & Schreiber 1995). Mentre que les quinases efectores formen part de la família de serina-treonina quinases CHK (Melo & Toczyski 2002).

En humans, mutacions en la línia germinal en gens que codifiquen elements d'aquest *checkpoint* donen lloc a síndromes familiars de predisposició al càncer, com Li-Fraumeni (Chk2/Rad53) (Bell et al. 1999) o Ataxia-Telangiectasia (ATM/Mec1) (Savitsky et al. 1995; Morrow et al. 1995). De fet, el *checkpoint* de fase S ha estat definit com a barrera anti-càncer en el inici de la tumorigènesis (Bartkova et al. 2005; Bartkova et al. 2006): les cèl·lules en estadis inicials pre-malignes tenen activat el *checkpoint* de fase S per fer front a l'estrès replicatiu oncogènic. És només quan es produeix la mutació d'un dels gens implicats en aquest control que es detecta la desregulació proliferativa i la inestabilitat genòmica característica de les lesions malignes (Bartkova et al. 2005; Bartkova et al. 2006).

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

Figura 8. Checkpoint de fase S. El *checkpoint* de fase S està altament conservat al llarg de l'evolució. En la taula es mostren les principals proteïnes implicades en aquest mecanisme de control en *S. cerevisiae* i els respectius ortòlegs en *S. pombe* i humans.

3.1.1 Activació del *checkpoint* de fase S

El senyal que activa el *checkpoint* és la presència de trams extensos de ssDNA (DNA de cadena senzilla) recoberts per RPA (*Replicating Protein A*), una proteïna d'unió protectora de l'ssDNA (Zou & Elledge 2003). Si bé la presència de trams de ssDNA és intrínseca a l'obertura de la doble hèlix de DNA durant la replicació, els trams anòmalament llargs es generen quan es desacoblen l'helicasa replicativa (MCM) i les DNA polimerases de la maquinària de replicació (Lopes et al. 2006; Byun et al. 2005; Lambert et al. 2003; Lambert & Carr 2005). Això ocorre quan les polimerases s'aturen, sigui perquè troben una lesió al DNA o perquè els manquen els dNTPs precursors de la síntesi del DNA (estrès replicatiu). En aquesta tesi ens referirem globalment a aquestes condicions com estrès genotòxic.

Els trams de ssDNA-RPA a partir d'una longitud crítica recluten el complex sensor (Yang & Zou 2006) i el complex Mec1/Ddc2 (Zou & Elledge 2003). El complex sensor és necessari per a l'activació de Mec1 i per reclutar les proteïnes adaptadores necessàries per l'activació de les quinases efectores del *checkpoint* (Parrilla-Castellar et al. 2004; Majka et al. 2006).

Segons el tipus de dany els complexos sensors varien. En cas d'estrès genotòxic, sensat en fase S pel *checkpoint de fase S*, els complexos Rcf2-5/Rad24 i Rad17/Mec1/Ddc1 es recluten a les forquilles de replicació afectades (Griffiths et al. 1995; Kondo et al. 2001; Melo et al. 2001). En canvi, en resposta a trencaments de doble cadena, sensats a G2/M pel *checkpoint* de dany al DNA, actua el complex Mre11/Rad50/Xrs2 (Lisby et al. 2004).

Un cop activada Mec1, fosforila la quinasa efectora Rad53 (Pellicoli et al. 1999). Les proteïnes adaptadores participen de l'activació de Rad53 presentant la quinasa efectora a Mec1. En *S. cerevisiae* existeixen dues proteïnes adaptadores, una actua en resposta dany al DNA, Rad9 (Sweeney et al. 2005), i l'altra en resposta a estrès replicatiu, Mrc1 (Alcasabas et al. 2001).

La fosforilació de Rad53 per Mec1 promou la formació de dímers de Rad53, fet que permet l'autohiperfosforilació de la quinasa *en trans* (Lee et al. 2003). Essent aquesta forma de Rad53 la plenament activa (Pellicoli

Introducció

et al. 1999). L'actuació de diferents proteïnes adaptadores determinaria el patró d'hiperfosforilació de Rad53, ajustant-lo a la resposta requerida per superar els diferents estressos (Sweeney et al. 2005; Smolka et al. 2005; Travesa et al. 2008). Rad53 actiu difon i amplifica la senyal, fosforilant les proteïnes diana responsables de dur a terme la resposta del *checkpoint* (Gilbert et al. 2001).

3.1.2 Resposta del *checkpoint de fase S*

L'activació del *checkpoint* de fase S en resposta a estrès genotòxic activa una resposta, destinada a resoldre el problema (Figura 9):

- Impedeix l'entrada en mitosi, evitant la segregació de les cromàtides germanes fins que l'estrès hagi estat superat (Sanchez et al. 1999).
- Estabilitza les forquilles de replicació aturades per lesió al DNA o per estrès replicatiu (Tercero & Diffley 2001). Les forquilles de replicació aturades són altament recombinogèniques (Admire et al. 2006) i per tant, són una font d'inestabilitat si no són estabilitzades pel *checkpoint*.
- Inhibeix els orígens de replicació que encara no han estat disparats, minimitzant així tant l'exposició del DNA obert a l'agent genotòxic (Santocanale & Diffley 1998).
- Indueix una resposta transcripcional que té com a objectiu respondre a la situació d'estrès genotòxic (Zhou & Elledge 1993; Travesa et al. 2012; Palou et al. 2010).

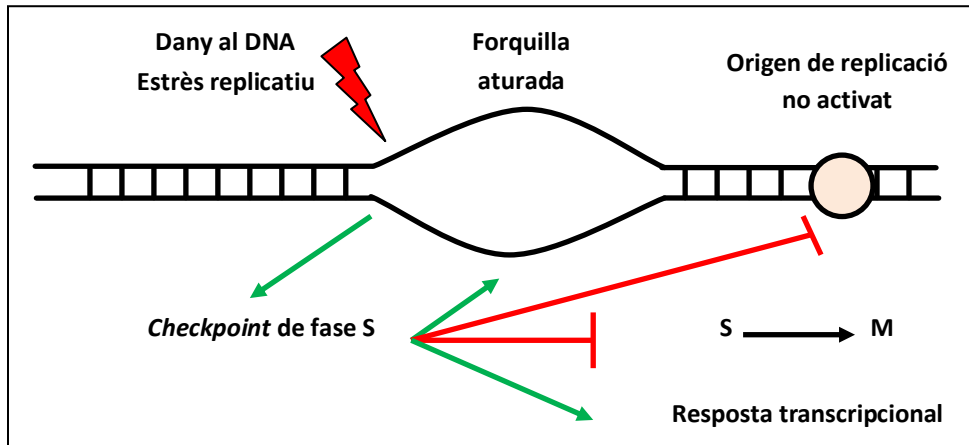


Figura 9. Resposta del *checkpoint* de fase S. Estabilitza les forquilles de replicació aturades. Inhibeix els orígens de replicació que no han estat activats. Impedeix l'entrada en mitosi. Indueix una resposta transcripcional per superar l'estrès genotòxic.

3.1.2.1 Inhibició de la mitosi

El *checkpoint de fase S* evita l'entrada de les cèl·lules a mitosi fins que l'estrès genotòxic ha estat superat. S'evita així la segregació de cromosomes danyats o no acabats de replicar, fet que generaria aneuploidia i inestabilitat genòmica (Hartwell & Kastan 1994).

En el cas del llevat de fissió *S. pombe* la inhibició de l'entrada en mitosi en presència d'estrès genotòxic passa per la inhibició directa de l'activitat Cdk1 mitòtica via fosforilació de la Y15 de Cdc2 per les quinases Wee1, Mik1 i la inhibició de la fosfatasa Cdc25 (Gould & Nurse 1989; Lundgren et al. 1991; Enoch & Nurse 1990; Rhind et al. 1997; Furnari et al. 1997; Furnari et al. 1999; Rhind & Russell 2001; Lopez-Girona et al. 2001) (Introducció 1.2.3.1).

La comprensió d'aquesta regulació en cèl·lules de mamífer és més limitada i roman controvertida. En cèl·lules humanes, un mecanisme similar al del llevat de fissió sembla regular l'entrada a mitosi en resposta a trencaments de doble cadena al DNA. En aquestes condicions la quinasa efectora Chk1 fosforila la fosfatasa Cdc25C, la qual cosa estabilitza la fosforilació de la Y15 de Cdk1; significativament, la sobre-expressió d'un al·lel no fosforilable de Cdc25C aboga l'atura a G2 a cèl·lules amb trencaments de doble cadena de DNA (Peng et al. 1997).

Introducció

Altres estudis, però, mostren que l'absència de Cdc25C encara permet una aturada normal a G2/M en ratolins (Chen et al. 2001). A més, l'expressió de l'al·lel no fosforilable per Wee1 de Cdk1-AF en cèl·lules humanes aturades al principi de fase S per inhibidors de la síntesi de DNA no és suficient per tal que les cèl·lules entrin a mitosi (Jin et al. 1996).

Finalment, en llevat de gemmació, a l'aturada pre-anafase en resposta a estrès genotòxic, es va observar que el *checkpoint de fase S* no requeria el control de l'activitat Cdk1 mitòtica per fosforilació de la Y19 per Swe1 (Sorger & Murray 1992; Amon et al. 1992). Posteriorment es va identificar que en resposta dany al DNA de tipus talls de doble cadena (generat per radiació ionitzant o amb el mutant telomèric *cdc13*) o dímers de pirimidina resultat d'irradiar amb llum UV, el *checkpoint* de dany al DNA impedeix que les cèl·lules progressin a anafase a través de l'estabilització de Pds1/securina (Introducció 2.3.2). Aquesta estabilització és dependent de Mec1 i té lloc a través de la quinasa efectora del *checkpoint* Chk1 (Sanchez et al. 1999; Gardner et al. 1999; Cohen-Fix & Koshland 1997; Clarke et al. 2001).

Arran de la dispensabilitat de Swe1 i la fosforilació de la Y19 de Cdk1, i del paper essencial de l'estabilització de Pds1/securina, s'ha assumit que el mecanisme mitjançant el qual es bloca l'entrada en anafase en cas necessari no està conservat al llevat de gemmació (per exemple (Rahal & Amon 2008)). Tanmateix, aquest tipus d'agressions genotòxiques no són sensades fins G2/M (pel *checkpoint* de dany al DNA), i no proveeixen evidència experimental directa sobre el mecanisme emprat per *checkpoint* de fase S per bloquejar la mitosi quan es produeixen problemes durant la replicació dels cromosomes.

Aquesta tesi doctoral parteix de l'observació al nostre laboratori que tant Swe1 com Pds1/securina són de fet prescindibles per impedir l'anafase en resposta a condicions d'estrès genotòxic estàndards com estrès replicatiu agut amb hidroxürea o dany per metilació del DNA amb metanosulfonat de metil. I per altra banda, que els nivells de Swe1 i de fosforilació de la Y19 de Cdk1 són estabilitzats en aquestes condicions, observació més compatible amb l'existència de múltiples nivells

redundants de control que no pas amb la irrellevància de la inhibició de Cdk1 mitòtica per fosforilació de tirosina. En aquest sentit, un article recent del laboratori de Paul Nurse, que va identificar el control de la mitosi per Wee1 sobre Cdk1 mitòtica al llevat de fissió (Russell & Nurse 1987; Gould & Nurse 1989; Enoch & Nurse 1990), treballant amb un mòdul ciclina mitòtica-Cdk1 no regulable, mostra que el cicle cel·lular progressa de manera sorprenentment controlada, suggerint l'existència de capes addicionals de control (Coudreuse & Nurse 2010).

3.2 Mecanismes de vigilància de la mitosi

Els *checkpoints* que actuen en la mitosi són essencials per garantir la correcta segregació dels cromosomes i, per tant, per assegurar el manteniment de la ploïdia, la integritat genòmica i la viabilitat. En *Saccharomyces cerevisiae* existeixen tres mecanismes de vigilància que operen en mitosi, el SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*), el SPOC (*Spindle Position Checkpoint*) i el NoCut *checkpoint*.

El SAC actua en la transició metafase-anafase i evita la segregació dels cromosomes fins que els quinetocors no s'han unit correctament al fus mitòtic i estan tots sota tensió bipolar (Rieder et al. 1995). Posteriorment, actua el SPOC el qual evita la sortida de mitosi fins que el fus mitòtic està correctament orientat, del pol de la cèl·lula mare al pol de la cèl·lula filla. Per tant, mentre que el SAC evita genera soques aneuploides, amb un o varis cromosomes addicionals, el SPOC evita que tot el material genètic quedi en la cèl·lula mare (Caydasi & Pereira 2012)(Figura 10). Finalment, el NoCut *checkpoint* evita la citoquinesi si es detecten problemes durant l'anafase (Norden et al. 2006).

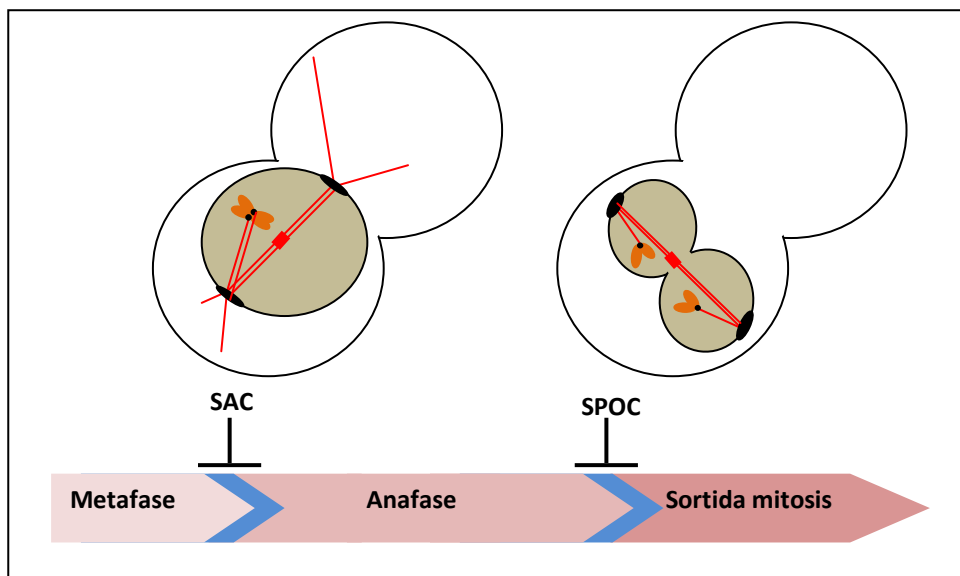


Figura 10. El SAC inhibeix la transició metafase-anafase en absència d'unió bipolar. El SPOC inhibeix la sortida de mitosi si el fus mitòtic no està alineat del pol de la cèl·lula mare a la cèl·lula filla.

L'activació del SAC ve mediada per la falta d'unió bipolar i la manca de tensió centromèrica, fet que indueix la formació del complex mitòtic del *checkpoint* (MCC) en els quinetocors. Aquest complex està format, entre d'altres, per Mad2, mediador central del SAC, i la subunitat activadora d'APC, Cdc20. El SAC manté Cdc20 inactiva per auto-ubiquitinació (Yu 2007) impedit l'activació d'APC i per tant l'entrada en anafase (Hwang et al. 1998; Kim et al. 1998). Un cop els microtúbuls s'han unit correctament als quinetocors, el SAC s'inactiva i les cèl·lules poden progressar en l'anafase (Vanoosthuyse & Hardwick 2009). Respecte la senyal que permet la inactivació del *checkpoint* hi ha certa controvèrsia. Mentre alguns resultats suggereixen que la tensió dels centròmers conseqüència de la unió bipolar dóna lloc a la senya inactivadora (Liu et al. 2009), altres mostren que la ocupació dels centròmers per part dels microtúbuls és la senyal que inactiva el SAC (Maresca & Salmon 2009).

L'activació del SPOC es dóna en resposta a la incorrecta orientació del fus mitòtic. En aquestes condicions l'SPOC evita la citoquinesi inhibint la via MEN (Introducció 2.1.2.), donant temps a la cèl·lula per resoldre aquesta incorrecta orientació (Bardin et al. 2000). L'SPOC actua sobre el

component central de MEN, la GTPasa Tem1, evitant així l'alliberació de Cdc14 (Pereira et al. 2000; Ro et al. 2002), essencial per la citoquinesi. Quan es resol el posicionament del fus mitòtic, el pas de l'SPB a través del coll de la gemma permet l'activació de Tem1 en ser exposada a Let1, el seu activador, i en conseqüència la sortida de mitosi (Piatti et al. 2006).

Un tercer *checkpoint* assegura finalment que els cromosomes estan totalment segregats abans de permetre la citoquinesi. El *NoCut checkpoint* és el mecanisme de vigilància encarregat de detectar la presència de cromosomes no segregats en la zona on tindrà lloc l'abscisió (Norden et al. 2006; Mendoza & Barral 2008; Mendoza et al. 2009). La senyal d'activació del *checkpoint* prové del complex CPC (*Chromosome Passenger Complex*) format per Ipl1 i el seu regulador Sli15 (Vader et al. 2006). Aquesta senyal convergeix en la localització dels efectors del *NoCut checkpoint* Boi1 i Boi2 en el lloc del tall del coll de la gemma (Norden et al. 2006). La localització dels efectors del *checkpoint* al coll de la gemma té lloc en cada anafase, però en el cas de defectes en la segregació cromosòmica, com presència de DNA en la zona mitja del fus mitòtic, Boi1 i Boi2 romanen al coll de la gemma retardant l'abscisió (Mendoza & Barral 2008; Mendoza et al. 2009).

3.3 El mecanisme de vigilància de la morfologia

El *checkpoint* morfològic coordina la formació de la gemma i el citoesquelet amb els processos que tenen lloc en el nucli durant el cicle cel·lular. El mecanisme de vigilància atura les cèl·lules abans de la segregació del DNA quan detecta problemes en la formació de la gemma (Lew 2003).

L'aturada del cicle mediada pel *checkpoint* morfològic té lloc gràcies a la fosforilació de la tirosina 19 de Cdk1 (Sia et al. 1996). La regulació de la fosforilació d'aquesta tirosina depèn de l'acció de la quinasa Swe1 i de la fosfatasa Mih1 (Introducció 1.2.3.1). En resposta a estressos que afecten al citoesquelet, com és el cas de la Latrunculina A que indueix la despolimerització dels filaments d'actina, Swe1 és estabilitzat i Mih1 inhibit (Sia et al. 1998; Harrison et al. 2001; Anastasia et al. 2012). L'acció conjunta sobre Swe1 i Mih1 estabilitza la fosforilació de la tirosina 19,

Introducció

inhibint principalment l'activitat Cdk1 de fase G2 i M (Lianga et al. 2013; Keaton et al. 2007). Les cèl·lules aturades pel *checkpoint* morfogènic resten a G2 amb fusos mitòtic curts fins que els problemes en el citoesquelet han estat resolts. Així doncs, Swe1 i la fosforilació de la tirosina 19 juguen un rol important evitant la segregació del DNA en condicions en que això seria perjudicial per les cèl·lules.

OBJECTIUS

L'objectiu d'aquesta tesi doctoral és elucidar el mecanisme com la segregació dels cromosomes incompletament replicats o danyats és impedita a l'organisme eucariota model *Saccharomyces cerevisiae*.

MATERIALS I MÈTODES

1 *Saccharomyces cerevisiae*

Aquest treball d'estudi del cicle cel·lular ha estat realitzat amb *Saccharomyces cerevisiae*, també anomenat llevat de gemmació degut a la seua mecanisme de divisió. Es tracta d'un organisme eucariota que presenta molts avantatges per ser utilitzat com a eina d'estudi del cicle cel·lular:

- és un organisme model ja que múltiples mecanismes de regulació del cicle són conservats en eucariotes superiors, com els humans;
- es pot determinar en quina fase del cicle cel·lular es troben les cèl·lules d'estudi amb un microscopi òptic dependent de la mida i la forma de la gemma;
- existeixen múltiples procediments per sincronitzar de manera reversible una població de cèl·lules en creixement exponencial;
- el temps de divisió és relativament curt (90 minuts a 30°C en medi ric) de manera que permet fer experiments d'estudi d'un cicle de manera acurada;
- la manipulació genètica és relativament fàcil gràcies a que és un organisme que tendeix a resoldre els de trencaments de doble cadena mitjançant recombinació homòloga. Per tant, en presència d'una seqüència de DNA homòloga a una regió del genoma i amb extrems lliures, aquesta reemplaçarà el material genòmic corresponent. Aquesta capacitat de ser modificat genèticament sumat a l'existència de la forma haploide permet la deleció de gens en un únic pas.

El fons genètic de *Saccharomyces cerevisiae* amb que s'ha treballat és W303 (Thomas & Rothstein 1989). Aquesta soca ha estat modificada genèticament per tal que es mantingui haploide al llarg de les generacions; s'ha deletat la endonucleasa HO, promotora del canvi heterotàl·lic, evitant així canvis espontanis de tipus heterotàl·lic. Per tant, totes les soques amb que s'ha treballat són haploides i del tipus heterotàl·lic Mat-a, fet que permet la seva sincronització amb el pèptid α -factor. Aquest pèptid és una feromona segregada de manera natural

Materials i mètodes

per les cèl·lules Mat- α i que atura les cèl·lules haploides Mat-a en fase G1, previ a Start (pre-Start), en expectativa d'acoblar-se per generar una cèl·lula diploide. Aquest pèptid (WHWLQLKPGQPMY) es sintetitza i s'usa per sincronitzar de manera reversible una població de cèl·lules Mat-a en fase G1. Posteriorment es poden alliberar les cèl·lules de manera sincrònica a Start i posteriorment a fase S.

Per altra banda, W303 presenta mutacions puntuals en un únic gen de les vies de síntesi de nutrients essencials: *ade2-1* (el gen ADE2 es troba en la via síntesi d'adenina), *his3-11,15* (gen implicat en la síntesi d'histidina), *leu2-3* (implicat en la síntesi de leucina), *trp1-1* (implicat en la síntesi de triptòfan) i *ura3* (implicat en la síntesi d'uracil). Aquestes mutacions impedeixen que la soca salvatge pugui créixer en plaques de medi selectiu en que manqui algun d'aquests nutrients. Això permet utilitzar aquests marcadors auxotròfics per la selecció de transformants ja que al restaurar la copia salvatge del gen es recupera la capacitat de créixer en un medi selectiu en absència dels nutrients anteriors.

2 Medis de cultiu

El medi ric líquid utilitzat és el YPD (*Yeast Peptone Dextrose*: 1% (p/v) extracte de llevat; 2% (p/v) peptona; 2% (p/v) glucosa). Es pot substituir la dextrosa per altres sucres (rafinosa, sucrosa o galactosa) dependent de les necessitats de l'experiment.

El medi mínim definit (SD: *Synthetic minimal media Dextrose*), conté 0,67% (p/v) base nitrogenada (YNB), 2% (p/v) glucosa o el sucre requerit per l'experiment i, segons el marcador auxotròfic que es desitgi utilitzar: 40 μ g/ml adenina, histidina, leucina, triptòfan i/o uracil.

Els estocs concentrats dels aminoàcids, les bases nitrogenades, els sucres es filtren (filtres de 0.2 μ m) i s'afegeixen a la resta del medi autoclavat un cop aquest s'ha temperat a 55°C.

El medi de contra-selecció d'aquelles cèl·lules que espontàniament han mutat el gen URA3 restaurat consta d'1mg/ml d'àcid 5-fluorooròtic (5-

FOA) en medi SC (*Synthetic Complete*): 2mg/ml *Drop-out mix without Uracil* (Sigma), 0.67% (p/v) de YNB, 2% (p/v) glucosa, 50µg/ml uracil.

El medi LB (*Luria Broth*) es compon de 1% (p/v) bacto-triptona, 0.5% (p/v) extracte de llevat, 0.5% (p/v) de clorur de sodi. El medi Psi-broth per preparar cèl·lules DH5α competents (Materials i Mètodes 3.7) consta de 2% (p/v) triptona, 0.5% (p/v) extracte de llevat, 0.5% (p/v) MgSO₄·7H₂O, ajustat a pH 7.6.

Els medis sòlids tenen la mateixa composició que la descrita pels medis líquids més un 2% (p/v) d'agar.

2.1 Generació d'estrès replicatiu

Per tal d'activar el *checkpoint de fase S* mitjançant estrès replicatiu s'ha utilitzat hidroxiiurea (HU). Aquesta genera estrès replicatiu per inhibició de les ribonucleòtid reductases (RNRs), ja que s'uneix el seu centre catalític, de manera reversible. Quan la cèl·lula comença la replicació en presència d'estrès replicatiu generat per HU en el medi, ràpidament s'acaben els desoxiribonucleòtids (dNTPs), fet que comporta l'aturada de les forquilles de replicació i l'activació del *checkpoint de fase S*.

La hidroxiiurea s'ha utilitzat a 200 mM, tant en medi líquid com en plaques.

2.2 Generació de dany al DNA

Per tal de generar dany al DNA s'ha utilitzat metanosulfonat de metil (MMS), un agent alquilant que metila principalment adenina i guanosina, provocant un desaparellament de les bases en la regió afectada. Aquestes metilacions impedeixen la progressió de les forquilles de replicació, fet que activa el *checkpoint de fase S*.

El MMS és un agent que en augmentar la temperatura a la que es realitza el tractament de les cèl·lules augmenta la seva toxicitat. Això provoca que a temperatures elevada es treballi a menor concentració: a 24°C i 30°C es treballa a 0.033% (v/v) en medi líquid, mentre que a 37°C es treballa a un 0.022% (v/v). En medi sòlid s'ha treballat a 0.022%.

3 Tècniques de biologia molecular

3.1 Amplificació de DNA per PCR

S'ha usat PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Mullis & Faloona 1987) per tal d'amplificar seqüència de DNA per clonar gens, generar cassetes de deleció o d'etiquetat de proteïnes o que substitueixen un promotor endogen per un d'induïble, per exemple, per galactosa, GAL1,10.

Per amplificar les seqüències d'interès s'han dissenyat oligonucleòtids específics als extrems d'aquestes (Taula 5):

- Si la seqüència amplificada s'ha d'incorporar en un vector plasmídic en els extrems 5' dels oligonucleòtids s'introdueix la seqüència diana per als enzims de restricció que seran usats per clonar el producte de PCR en el plasmidi desitjat.
- Si la seqüència amplificada s'ha d'integrar en el genoma del llevat, per tal de deleccionar un gen mitjançant marcador auxotròfics, els oligonucleòtids incorporen en l'extrem 5' 60 nucleòtids que es corresponen a la seqüència adjacent a la regió del genoma que es vol reemplaçar (Materials i Mètodes 4.3).
- Si la seqüència amplificada s'ha d'integrar en el genoma del llevat al extrem C-terminal d'una proteïna per tal d'etiquetar-la, els oligonucleòtids incorporen en l'extrem 5' 60 nucleòtids que es corresponen a la seqüència adjacent a la regió del genoma que es vol reemplaçar (Materials i Mètodes 4.4).

Les reaccions de PCR en el termociclador *DOPPIO Thermal Cycler VWR 732-1210* consten de dos tipus de cicles en funció de la polimerasa utilitzada. En el cas de la polimerasa *Phusion*:

- Desnaturalització: 2 minuts a 98°C
- 28 cicles:
 - Desnaturalització: 5 segons per DNA plasmídics i 10 segons per genòmic, a 98°C
 - Anellament: 10 segons a 55°C
 - Extensió: 15segons/Kb per DNA plasmídics i 30segons/Kb per genòmic, a 72°C
- Extensió final: 4 minuts a 72°C

En el cas de la polimerasa *KOD*:

- Desnaturalització: 2 minuts a 95°C
- 30 cicles:
 - Desnaturalització: 20 segons a 95°C
 - Anellament: 10 segons a 55°C
 - Extensió: 25segons/Kb a 72°C
- Extensió final: 8 minuts a 72°C

3.2 Mutagènesi puntual dirigida per PCR

Per tal de generar mutants puntuals s'ha emprat PCR (Materials i Mètodes 3.1). Per cada mutació puntual es generen dos oligonucleòtids de 20 nucleòtids, complementaris i dissenyats específicament amb la mutació puntual al centre (Edelheit et al. 2009).

Un vegada es té el gen amb el seu promotor clonat en un vector de la col·lecció pRS es procedeix a realitzar la PCR usant el vector, amb el gen i el promotor, com a motlle (Materials i Mètodes 3.4).

Materials i mètodes

Es fan dues PCR independents amb la polimerasa Phusion, per evitar mutacions addicionals, cada una amb un dels oligonucleòtids realitzant el següent cicle:

- Desnaturalització: 2 minuts a 98°C
- 30 cicles:
 - Desnaturalització: 5 segons per DNA plasmídics
 - Anellament: 10 segons a 55°C
 - Extensió: 15segons/Kb per DNA plasmídics a 72°C
- Extensió final: 7 minuts a 72°C

A continuació es combinen les dues PCR i es desnaturalitzen a 95°C durant 5 minuts i es deixa temperar per tal que es combinin els productes de PCR. De totes les combinacions possibles només interessa aquella que presenta en les dues cadenes del DNA la mutació d'interès. Per aïllar aquesta combinació de tota la resta és digereix el producte de PCR amb DpnI a 37°C tota la nit. L'enzim DpnI només talla DNA metilat i donat que el producte de PCR no està metilat, només actuarà sobre el DNA motlle salvatge.

Finalment es transforma tot el producte de la digestió amb DpnI a *E. coli* DH5α (Materials i Mètode 3.4).

Per tal de determinar si s'ha introduït la mutació desitjada s'extreu el DNA plasmídic (Materials i Mètode 3.7) i es seqüència.

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

L'electroforesi en gels d'agarosa ens permet la separació de les molècules de DNA en conformació lineal segons la seva mida. És usada per verificar que els productes de PCR, tan per clonació com per generació de cassetes, presenten la mida esperada així com per verificar tots els passos durant el procés de clonació.

S'ha treballat amb gels d'1% (p/v) d'agarosa (*Agarose D-1 Low EEO-GQT*) en tampó TAE (50 mM Tris-Àcid Acètic pH 8.5, 2mM EDTA) tenyint amb 0,5 µg/ml de bromur d'etidi. El bromur d'etidi és un agent intercalant

fluorescent que s'uneix al DNA i en ser exposat a llum UV (365 nm) emet una llum taronja, la qual és vint vegades major després d'unir-se al DNA.

Per tal de determinar la mida dels fragments de DNA s'ha usat *1Kb DNA ladder* (New England Biolabs). Les bandes que componen aquest marcador presenten una quantitat coneguda de DNA fet que ha permès l'estimació de la quantitat de DNA present, mitjançant la comparació de les intensitats de bandes de longitud similar.

3.4 Clonació

El ORF (*Open Reading Frame*) que es vol introduir en un vector plasmídic s'amplifica mitjançant PCR usant com a motlle DNA genòmic de la soca desitjada (Materials i Mètodes 3.10). El producte de PCR es purifica mitjançant el sistema *Epoch*. El DNA resultant es corre en un electroforesi de DNA en gels d'agarosa-bromur d'etidi per tal de verificar la qualitat i quantitat d'aquest. La concentració del DNA s'estima per comparació amb els diferents fragments, de mida i concentració conegudes, que componen el marcador de mida de DNA *1Kb DNA ladder* (New England Biolabs), que es còrrer en el mateix gel.

El plasmidi on es clonarà el DNA i 100ng del producte de PCR purificat es digereixen, per separat, amb els enzims de restricció (New England Biolabs) escollits per realitzar el clonatge seguint les condicions i requeriments d'incubació indicades pel fabricant. Posteriorment el vector és desfosforilat per evitar la seva re-circularització, afavorida respecte la lligació del plasmidi amb l'insert. Per desfosforilar el vector s'afegeixen 5 unitat de fosfatasa antàrtica (New England Biolabs) i s'incuba a 37°C durant 15 minuts; posteriorment s'inactiva l'enzim 5 minuts a 65°C.

3.5 Lligació del producte de PCR i del vector

Per lligar el plasmidi i el insert s'usa T4 DNA lligasa (Roche), en un volum final de reacció de 10µl i usant com a tampó el proporcionat pel fabricant. La relació molar de insert/vector és de 1:7, facilitant així la reacció. Com a control de lligació es fa una reacció amb vector en absència d'insert; així doncs el nombre de colònies que després de transformar obtinguem ens indicaran el nombre de falsos positius.

Materials i mètodes

La reaccions s'incuben durant tota la nit, a 16°C usant un termociclador. El producte resultant de la lligació s'amplifica mitjançant la transformació d'aquest en *E.coli* DH5 α (Materials i Mètodes 2.5).

3.6 Transformació d'*Escherichia coli*

Per transformar *E. Coli* DH5 α s'usen cèl·lules competents preparades prèviament i guardades a -80°C (2.6 Materials i Mètodes).

50 μ l de cèl·lules competents i la reacció de lligació s'incuben durant 30 minuts en gel i posteriorment es sotmeten a un xoc tèrmic, 90 segons a 42°C. Tot seguit les cèl·lules es refreden en gel durant un minut per reduir la mortalitat del procés.

Seguidament s'afegeix 1 ml de LB (Materials i Mètodes 2) a les cèl·lules i aquestes s'incuben durant 1 hora a 37°C, temps suficient per tal que expressin la resistència antibiòtica abans de ser plaquejades en plaques LB complementades amb 100 μ g/ml d'ampicil·lina (LBA) com a selecció. Únicament les cèl·lules transformades amb una molècula de DNA circular poden créixer en plaques selectives, donant lloc a colònies.

Un nombre de colònies adequat segons la taxa de falsos positius obtinguda en la lligació control s'inoculen en 5ml de LBA, durant tota la nit a 37°C. Posteriorment es procedeix a l'extracció de DNA plasmídic (Materials i Mètodes 2.6) i a la comprovació de la presència d'insert mitjançant la digestió de vector amb els enzims de restricció adequats (Materials i Mètodes 2.3). El resultat de la restricció es visualitza a través d'electroforesi de DNA en gels d'agarosa-bromur d'etidi (Materials i Mètodes 2.2).

3.7 Extracció de DNA plasmídic

L'extracció de DNA plasmídic és realitza amb un kit casolà (*Epoch System*). El seu funcionament és el mateix que el d'un sistema comercial ja que es basa en una sílica immobilitzada en una columna, l'única diferència és que els tampons de rentat de les columnes es preparen al laboratori.

El cultiu d'*E. Coli* saturat es centrifuga en una centrifuga *Sigma 1-15P* a 16000 g durant 1 minut, a temperatura ambient.

Les cèl·lules es resuspenen suaument en el tampó MX1 (50mM Tris-HCl, 10mM EDTA pH 8.0, 100 µg/ml RNasa A). Posteriorment s'afegeix el tampó de lisis MX2 (200mM NaOH, 1% SDS), s'inverteix 8-10 vegades i es deixa 5 minuts a temperatura ambient. Posteriorment s'afegeix el tampó de neutralització MX3 (4M clorur de guanidini, 0.5M acetat de potassi pH 4.2), s'inverteix 8-10 vegades i es centrifuga de nou a 16000 g durant 10 minuts per eliminar les restes cel·lulars.

El sobrenedant s'introdueix a la columna i es centrifuga a baixa velocitat per immobilitzar les molècules de DNA a la sílica de la columna. Posteriorment es fan una sèrie de rentant amb diferents tampons per tal d'eliminar les restes del procés d'extracció. Finalment s'elueix el DNA en una solució de 10 mM Tris-HCl pH 8.5.

El DNA purificat pot ser usat directament o conservat a -20°C.

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

Les cèl·lules competents per la transformació s'han generat per un mètode química basat en l'ús del clorur de rubidi. Aquest compost debilita la paret cel·lular dels bacteris i en aquestes condicions les cèl·lules són aptes per la transformació mitjançant el xoc tèrmic.

S'inocula un cultiu a partir d'una única colònia de DH5α, despertada prèviament, en 20 mL de LB (Materials i Mètodes 2) i s'incuba a 37°C, durant tota la nit, a 200 rpm. L'endemà, s'inocula 1 ml del cultiu saturat en 100 ml de medi Psi-broth (Materials i Mètodes 2). El cultiu es creix a 37°C fins que la densitat òptica a 550nm es troba entre 0.48 i 0.6. A partir d'aquests punt els posteriors passos es realitzen a la cambra freda.

Un cop refredat el cultiu (15 minuts en aigua-gel) es centrifuga 5 minuts a 3000g a 4°C. S'elimina el sobrenedant i es resuspenent la cèl·lules amb agitació suau en tampó TbfI prèviament refredat (30 mM acetat de potassi; 100 mM clorur de rubidi; 10 mM clorur de calci; 50 mM clorur de manganès; 15% (v/v) glicerol).

Materials i mètodes

Es tornen a centrifugar les cèl·lules en les mateixes condicions que anteriorment, s'elimina el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules en 4ml de Tbfll fred (10mM MOPS; 75mM clorur de calci; 10mM clorur de rubidi; 15% (v/v) glicerol). Es deixen en 15 minuts i es poden transformar directament o aliquotar en tubs eppendorf estèrils, en volums de 60µl de cèl·lules. Les cèl·lules no transformades es congelen en nitrogen líquid i es guarden en un congelador a -80°C.

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

E. coli BL21(DE3)RIL és una soca dissenyada específicament per l'expressió, en elevades quantitats, de proteïnes recombinants (Kleber-Janke & Becker 2000). Aquestes modificacions són:

- deleció de les proteases Lon i Omp-t, per tal d'evitar la degradació de la proteïna sobre-expressada.
- L'expressió de la proteïna recombinant està dirigida pel promotor víric T7. Les soques BL21(DE3) contenen el factor de transcripció del bacteriòfag T7 induïble per isopropil β-D-1-tiogalactopiranosid (IPTG), un anàleg sintètic de la galactosa que no pot ser metabolitzar per *E. coli*.
- Específic de la soca BL21(DE3)RIL és la presència de còpies extres dels tRNA d'Arginina, Isoleucina i Leucina, corregint així la major presència d'aquests aminoàcids en les proteïnes de *S. cerevisiae* respecte les d'*E. coli*. D'aquesta manera s'evita el truncament de la proteïna sobre-expressada per manca de determinants tRNA.
- Aquesta soca també presenta un plasmidi no integratiu que permet la selecció amb l'antibiòtic cloramfenicol (50µg/ml) i que inhibeix fortament l'expressió del sistema en absència d'inducció per IPTG.

A diferència del que succeeix amb la soca d'*E. coli* DH5α, BL21(DE3)RIL assoleix uns rendiments de competència baixos en fresc, inacceptable després de congelar les cèl·lules en nitrogen líquid. Per això les cèl·lules

competents es preparen en fresc mitjançant un mètode simplificat respecte el descrit anteriorment (Materials i Mètodes 2.7).

S'inocula un cultiu a partir d'una colònia recent despertada d'*E. coli* BL21(DE3)RIL, en 20 ml de LB (Materials i Mètodes 2) i s'incuba tota la nit a 37°C a 200 rpm. L'endemà, s'inocula 1 ml del cultiu saturat en 5ml de LB complementat amb 50µg/ml de cloramfenicol. El cultiu es deixa incubant en les mateixes condicions que l'anterior durant 90 minuts.

A partir d'aquest punt tot el procediment es realitza en la càmera freda o en gel. Després de refreda les cèl·lules durant 15 minuts en aigua-gel i es centrifuguen a 1900g, durant 5 minuts a 4°C. Finalment s'elimina el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules suaument, a la càmera freda, en 500 µl de clorur de calci i es mantenen en gel fins al moment de la transformació. Per cada constructe que es vol transformar s'usen 50 µl de les cèl·lules.

3.10 Construccions usades en aquest treball

Construcció	Vector-Insert	Usada en
pAFS-125	pRS304 GFP-Tub1	YRP117, 119, 144 i 160
pGP25	pGEX-6P-3-Clb2 clonat amb BamHI i Sall	BL21(DE3)RIL
pGP48	pRS306-Swe1-AQ-13myc clonat amb SacI i SacII	YRP99, 100, 101 i 107
pGQ3	pRS306-Cdk1-19F clonat amb XhoI i NotI	YRP48 i 70
pGQ10	pGEX-6P-1-Rad53 clonat amb EcoRI i SmaI	BL21(DE3)RIL
pRP9	pRS306-scc1-73 clonat amb BamHI	YRP170 i 175

Taula 3. Construccions usades en aquest treball. Es mostren el nom, el vector i l'insert corresponent amb els enzims de restricció utilitzats per a la clonació i el nom de la soca en que el constructe ha estat utilitzat.

3.11 Extracció de DNA genòmic de llevat

Es centrifuguen les cèl·lules d'un cultiu saturat i el pèl·let es resuspèn en tampó de lisis (100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM EDTA; 0.1% (v/v) SDS).

S'afegeix un volum de sorra de vidre i un volum de fenol/cloroform/isoamil alcohol (25:24:1). Les cèl·lules es vortexen a màxim potència durant 90 segons, lisant-les mecànicament. A continuació, es centrifuguen les cèl·lules durant 3 minuts a 16.000 g a

temperatura ambient, separant la fase aquosa de la orgànica; i es recupera la fase aquosa que conté els àcids nucleïcs sense proteïnes.

El DNA es precipita afegint un volum d'isopropanol. Es barreja la mescla i s'incuba en gel, un mínim de 15 minuts, per permetre la precipitació del DNA cromosòmic.

El DNA es recupera per centrifugació, en una centrífuga *Sigma 1-15P*, a 16.000 g durant 20 minuts a temperatura ambient. El DNA precipitat es renta dues vegades amb etanol del 70% (v/v). Finalment el pèl·let es dissol en 5 µl de resuspensió (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) complementat amb RNasa (0.01 µg/ml RNasa A). Les mostres s'incuben 3 hores a 37°C o tota la nit a temperatura ambient, solubilitzant-se així el pèl·let i eliminant el RNA extret juntament amb el DNA.

4 Generació de soques de *Saccharomyces cerevisiae*

4.1 Plasmidis usats en aquest treball

4.1.1 Col·lecció pFa6a

Els plasmidis de la col·lecció pFa6a-KanMX6 (Bähler et al. 1998) s'han utilitzat per generar soques que expressin proteïnes fusionades a una etiqueta a l'extrem C-terminal de la proteïna. No s'ha usat etiquetes a N-terminal ja que és la primera regió en ser traduïda i és molt important pel plegament i l'estabilitat de la proteïna.

Els plasmidis pFa6a s'usen com a motlle per amplificar un cassat integrable al genoma del llevat, amb la seqüència de l'etiqueta d'interès juntament a 6 còpies del gen KanMX que codifica per la resistència a l'antibiòtic geneticina (G418). Les etiquetes que s'han usat en aquest treball han estat 13myc i 3HA.

4.1.2 Col·lecció pGEX

S'han usat el plasmidi pGEX-6P-3 per la producció de proteïnes recombinant en *E. coli* BL21(DE3)RIL (*Amersham*). Aquest vector permet l'expressió de proteïnes recombinants fusionades amb la proteïna

Materials i mètodes

Glutatió-S-Transferasa (GST) a l'extrem N-terminal mitjançant la inducció amb IPTG, ja que el gen d'interès es troba sota la regulació del promotor Tac. El vector presenta el gen de resistència a l'ampicil·lina permetent la selecció dels clons transformats. També presenta la seqüència de reconeixement de la proteasa PreScission entre la seqüència del GST i de la proteïna d'interès. D'aquesta manera, una vegada produïda i purificada la proteïna és pot aconseguir la proteïna d'interès sense cap etiqueta en l'extrem N-terminal (Materials i Mètodes 6.8).

4.1.3 Col·lecció pRS

S'ha utilitzar la col·lecció pRS com a plantilla per amplificar els cassetes auxotròfics que s'usaran per la delecció de gens (Materials i Mètodes 4.3) i per la introducció d'una segona copia d'un gen en la soques d'interès. Aquests vectors presenten els gens salvatges corresponents als marcadors auxotròfics propis de la soca W303 i resistència a ampicil·lina per la selecció dels clons transformats.

4.2 Transformació de llevat

El procediment utilitzat per la transformació del llevat de gemmació es fonamenta en la generació de porus en la paret cel·lular i la posterior transformació per xoc tèrmic (Gietz et al. 1992). Per transformar les cèl·lules es parteix de 10 ml de cultiu de la soca a transformar en fase exponencial (10^7 cèl·lules/ml). El pèl·let de cèl·lules es renta dues vegades amb aigua estèril; una tercera vegada en 100mM acetat de sodi pH 7.5, 10 mM Tris-HCl pH7.5, 1 mM EDTA, i finalment es resuspenen a una concentració de $2 \cdot 10^9$ cèl·lules/ml.

A aquesta suspensió de cèl·lules s'afegeixen 2 µg del DNA que es vol transformar i 5 µl de ssDNA a 10mg/ml. El DNA monocadena d'esperma de salmó actua com a transportador del DNA a transformar augmentant així les probabilitats del DNA d'entrar a la cèl·lula (Schiestl & Gietz 1989). Per tal de facilitar que el DNA entri en contacte amb les cèl·lules a transformar s'afegeixen 300 µl de 50% (p/v) polietilenglicol 3350 en la solució en el mateix tampó amb que s'han rentant les cèl·lules (100mM acetat de liti pH 7.5, 10 mM Tris-HCl pH 7.5 i 1 mM EDTA).

La barreja s'incuba durant 30 minuts a 30°C i seguidament s'afegeixen DMSO a una concentració final del 10% (v/v). A continuació, es sotmeten les cèl·lules a xoc tèrmic, 15 minuts a 42°C i un minuts en gel.

Per últim les cèl·lules es resuspenen en 200 µl de 10mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA i es sembren en plaques de medi selectiu (Bartel et al. 1993).

Per tal d'eliminar possible falsos positius es fa una segona selecció en el medi selectiu adequat. Finalment, per comprovar que s'ha integrat la modificació desitjada en el genoma es realitza una PCR sobre DNA genòmic (Materials i Mètodes 3.1 i 3.6) o en el cas d'etiqueta proteïnes es realitza un immunoblot a partir d'extractes cel·lulars totals (Materials i Mètodes 6.1, 6.2, 6.4).

4.3 Generació de soques de deleció

El DNA per deleccionar un gen s'obté a partir de PCR del gen salvatge (prototròfic) corresponent a un dels marcadors auxotròfics escollits (Materials i Mètodes 3.1) usant la col·lecció pRS com a motlle (Materials i Mètodes 4.1.3). En la PCR s'usen encebadors que presenten en l'extrem 5' 60 nucleòtids homòlegs a la regió flanquejant del gen que es vol deleccionar i en l'extrem 3' 20 nucleòtids que hibriden amb els vector pRS (Figura 11).

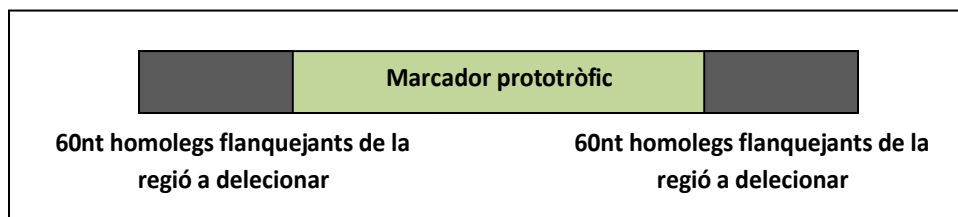


Figura 11. Estructura del producte de PCR usat per deleccionar gens.

En transformar el producte de PCR en les cèl·lules de llevat, la delecció del gen d'interès gràcies a l'activació de la maquinària de recombinació homòloga, activada al detectar la presència d'un fragment de DNA de doble cadena amb extrems no protegits (Figura 12).

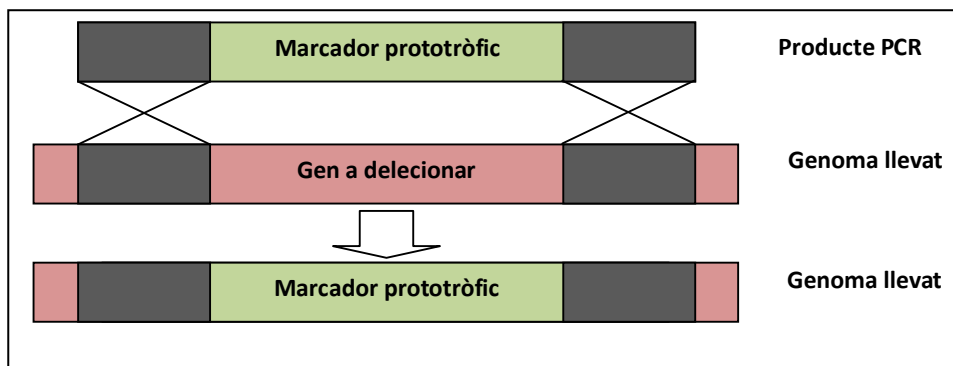


Figura 12. Esquema del procés de recombinació homòloga.

Les cèl·lules transformades es sembren sobre medi selectiu i les colònies que creixen es tornen a sembrar en medi selectiu, en un procés de segona selecció, per eliminar possible falsos positius.

Per comprovar que s'ha deletat el gen d'interès i que el producte de PCR no s'ha integrat en un lloc inespecífic en el genoma, és fa una PCR (Materials i Mètodes 3.1) usant com a plantilla el DNA genòmic dels clons transformats (Materials i Mètodes 3.10). Els oligonucleòtids usats per la comprovació de la delectió són externs a la regió que es desitja deletar del gen. La diferència de longitud entre el marcador auxotròfic utilitzar i el gen d'interès a deletar permet determinar si s'ha reemplaçat de manera específica el gen d'interès.

4.3.1 Generació de soques *bar1Δ*

Per tal de deletar el gen *BAR1* no es pot recórrer a l'estratègia general de delectió ja que el gen es troba en una regió amb seqüències altament repetides. Cal utilitzar una estratègia específica per aconseguir un rendiment de transformació suficientment elevat.

S'usa el vector pJGst1 (Reneke et al. 1988) en que està clonat la regió que flanqueja el gen *BAR1*, amb el gen salvatge *URA3* per la seva selecció. La seqüència de DNA per transformar la soca d'interès s'obté per digestió del plasmidi amb els enzims de restricció *EcoRI* i *Sall*, obtenint un fragment de 5.1Kb.

Les cèl·lules transformades es seleccionen en plaques de medi mínim sense uracil i les colònies transformades es sotmeten a segona selecció per eliminar falsos positius. Es comprova la integració sincronitzant les cèl·lules amb la feromona α -factor diluïda (50ng/ml).

4.4 Generació de soques que expressen una proteïna etiquetada

Per tal d'etiquetar una proteïna cal reemplaçar l'extrem C-terminal de la proteïna per l'etiqueta d'interès. *S. cerevisiae* permet integrar una etiqueta en el locus del gen d'interès de manera que aquest és expressat des del seu propi promotor com una proteïna de fusió.

El DNA per etiquetar una proteïna s'obté per PCR (Materials i Mètodes 3.1) usant com a plantilla els plasmidis de la col·lecció pFa6a-KanMX6 (Materials i Mètodes 4.1.1). Les etiquetes usades en aquest treball són 13-myc i 3-HA. Els oligonucleòtids per obtenir el producte de PCR específic es caracteritzen per: (1) *Forward*: en l'extrem 5' presenta 60 nucleòtids corresponents a la seqüència final del gen a etiquetar sense incloure el codó d'aturada (2) *Revers*: en l'extrem 5' presenta 60 nucleòtids corresponents a la seqüència del genoma posterior al codó STOP del gen. El producte de PCR obtingut presenta l'etiqueta i sis còpies del marcador de selecció KanMX6, flanquejat de les seqüències homologues a la regió gènica que és vol reemplaçar (Figura 13).

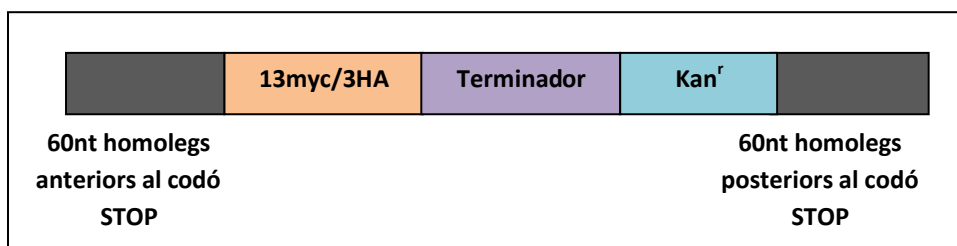


Figura 13. Estructura del producte de PCR utilitzar per etiquetar proteïnes en l'extrem C-terminal.

Materials i mètodes

Les cèl·lules de llevat es transformen amb el producte de PCR descrit anteriorment (Materials i Mètodes 4.2) per la integració d'aquest en el genoma. Es plaquegen en plaques de YPD sense selecció i es deixen creixen durant 2240 minuts, temps necessari per tal que s'expressi la resistència a la geneticina. L'endemà és seleccionen els clons resistents fent repliques de les plaques en medi ric més G418 (200 µg/ml).

La comprovació dels clons es realitza mitjançant immunoblot a partir d'extractes cel·lulars totals (Materials i Mètodes 6.1, 6.2 i 6.4) amb anticossos monoclonals contra l'etiqueta desitjada (9E10 per l'etiqueta myc o 12CA5 per HA).

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

5.1 Determinació de la densitat cel·lular d'un cultiu

La densitat cel·lular d'un cultiu es determina comptant en un microscopi òptic el nombre cèl·lules en una cambra de *Neubauer*. Prèviament cal diluir i sonicar la mostra per realitzar un recompte acurat. Les mostres es soniquen 10 segons a 50W (sonicador *Sonic Dismembrator (Dynatech)*) per tal de individualitzar les cèl·lules i així poder distingir les diferents fases del cicle.

5.2 Dilucions seriades

És un mètode per determinar en placa la sensibilitat d'una soca a un determinat agent genotòxic.

Es parteix de cultius saturats de les soques que es volen estudiar i es dilueixen a $2 \cdot 10^7$ cèl·lules/ml. Seguidament es fan 5 dilucions seriades 1:10 de cada cultiu i es plaquegen 12 µl de cada dilucions en plaques de medi ric sense estrès, com a control, i en plaques amb 200 mM HU o 0.022% (v/v) MMS.

5.3 Experiments de cycle cel·lular en una fase S no pertorbada

Per tal d'estudiar el comportament d'una determinada proteïna al llarg del cycle, la replicació del DNA o la segregació del material genètic en un determinat muntant.

Els experiments es realitzen en medi ric a 30°C, exceptuant en aquells casos en que es treballa amb un muntant termosensible que es treballa a 24°C (Figura 14).

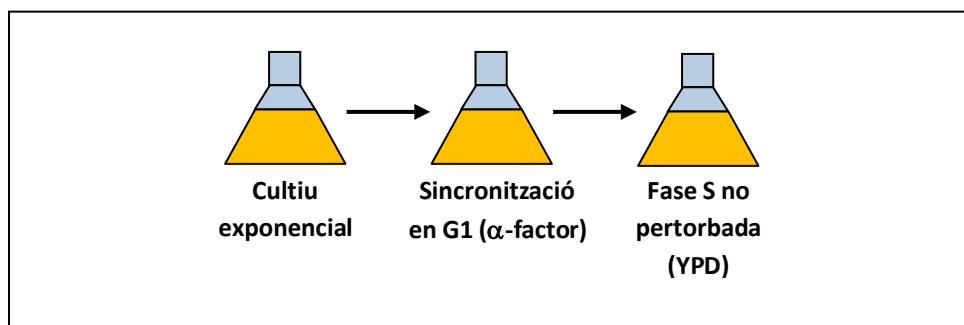


Figura 14. Experiment de cycle cel·lular en una fase S no pertorbada.

S'inocula un cultiu a partir d'una colònia fresca i s'incuba en un agitador orbital a 200 rpm durant tota la nit. L'endemà es determina la densitat del cultiu cel·lular (Materials i Mètodes 5.1) i es dilueix en medi ric a una densitat de $5 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml.

Els cultius es deixen créixer el temps d'una generació per tal que la densitat del cultiu es dupliqui fins a $1 \cdot 10^7$ cèl·lules/ml. En aquest punt es recull les alíquotes necessàries del cultiu i la resta es sincronitza en fase G1 pre-Start afegint al medi la feromona α -factor. En el cas de cèl·lules *bar1Δ* s'usa una concentració de feromona de 50 ng/ml.

Després d'un temps i mig de generació es determina la sincronia del cultiu contant les cèl·lules a la cambra de Neubauer (Materials i Mètodes 3.1), determinant l'índex de gemmació (BI; [(nombre de cèl·lules gemmades)/(nombre cèl·lules totals)·100]). Es considera que un cultiu presenta una bona sincronia si l'índex de gemmació és inferior al 5%. Si el

valor del BI índex és superior al 5% el cultiu es deixa més temps en presència de α -factor per tal d'aconseguir el grau de sincronia desitjat.

Quan la sincronia és inferior al 5% es renten les cèl·lules tres vegades amb medi ric sense α -factor, per tal d'alliberar les cèl·lules de l'aturada en G1 pre-Start. Finalment les cèl·lules es resuspenen en medi ric sense α -factor de manera que aquestes entren sincrònicament en el cicle.

5.4 Experiments d'activació del *checkpoint de fase S*

Per tal d'estudiar el comportament d'una determinada proteïna en resposta a estrès genotòxic, la replicació del DNA o la segregació del material genètic en un determinat muntant.

Els experiments es realitzen en medi ric a 30°C, exceptuant en aquells casos en que es treballa amb un muntant termosensible que es treballa a 24°C (Figura 15).

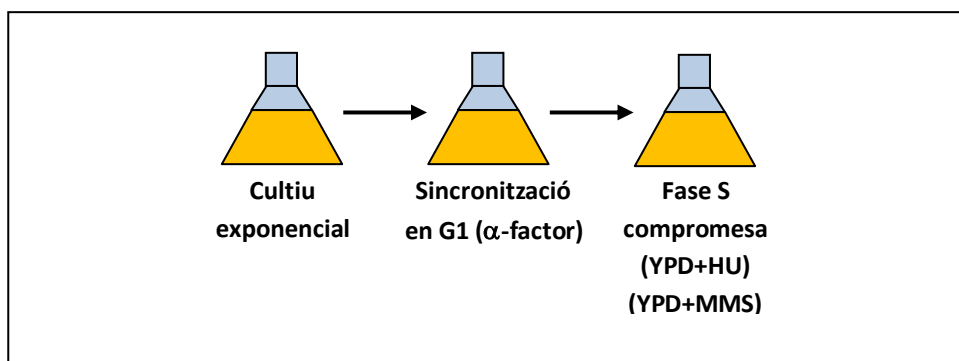


Figura 15. Experiment d'activació del *checkpoint de fase S*.

Les cèl·lules es sincronitzen en G1 pre-Start amb α -factor tal i com es descriu en el punt 5.3 (a dalt). Un cop les cèl·lules estan sincronitzades es renten tres vegades amb medi ric sense α -factor, per tal d'alliberar les cèl·lules de l'aturada en G1 pre-Start. Finalment les cèl·lules es resuspenen en medi ric sense α -factor i s'alliberen en presència d'un agent genotòxic. L'estrès replicatiu es genera per la presència de 200 mM d'hidroxiurea (HU) (Materials i Mètodes 2.1) mentre que el dany al DNA per metilació és generat per 0.033% (v/v) metanosulfonat de metil (MMS) (Materials i Mètodes 2.2).

5.5 Experiments de sincronització en Nocodazol

El nocodazol (Noc) es un agent que interfereix la polimerització de microtúbuls sincronitzant les cèl·lules en la transició G2/M.

Cèl·lules sincronitzades a G2/M amb nocodazol s'utilitzen com a control de màxim activitat del complex Clb2-Cdk1.

Els experiments es realitzen en medi ric a 30°C (Figura 16).

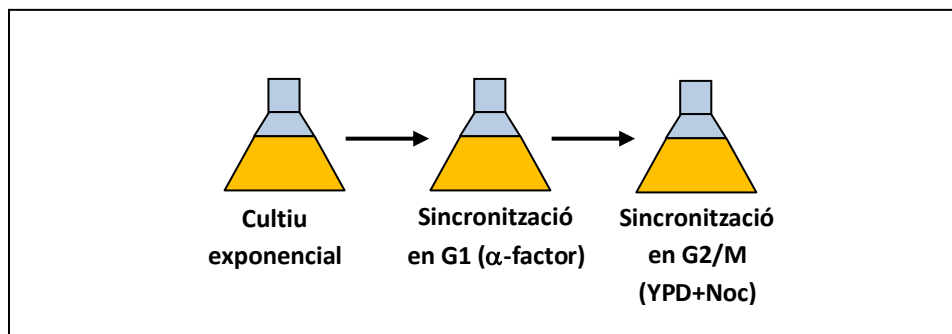


Figura 16. Experiment de sincronització en la transició G2/M.

Les cèl·lules es sincronitzen en G1 pre-Start amb α -factor tal i com es descriu en el punt 5.3 (a dalt). Un cop les cèl·lules estan sincronitzades es renten tres vegades amb medi ric sense α -factor, per tal d'alliberar les cèl·lules de l'aturada en G1 pre-Start. Finalment les cèl·lules es resuspenen en medi ric sense α -factor en presència de nocodazol (15 μ g/ml), agent que sincronitza les cèl·lules a metafase.

5.6 Citometria de flux (FACS, *Fluorescent Activated Cell Sorting*)

La citometria de flux és una tècnica que ens permet determinar la quantitat de DNA que hi ha en una cèl·lula mitjançant la tinció amb un agent intercalant, el iodur de propidi. D'aquesta manera es pot determinar en quina fase del cicle es troba una població cel·lular, el seu grau de sincronia i el ritme de progressió de la replicació.

Per tal que la tinció sigui quantitativa cal fixar les cèl·lules amb etanol i posteriorment eliminar el RNA ja que el iodur de propidi s'intercalerà també en les doble cadenes de DNA. Finalment les cèl·lules s'han de

Materials i mètodes

tractar amb pepsina per una correcta tinció del nucli amb iodur de propidi.

De l'ordre de $1 \cdot 10^7$ cèl·lules/ml són fixades amb 1 ml de etanol 70% (v/v) un mínim de 16 hores a 4°C.

Un cop fixades, per tal d'eliminar el RNA, es rehidraten fent dos rentats amb 1 ml de Tris-HCl pH 7.8. Seguidament les mostres s'incuben amb 200 µg/ml de RNasa A, en el mateix tampó dels rentats durant tota la nit a 24°C.

L'endemà, per permetre la tinció amb iodur de propidi es realitza una digestió parcial de les cèl·lules amb pepsina. Aquestes s'incuben amb 5 mg/ml de pepsina diluïda en 50 mM HCl, durant 30 minuts a 37°C. Passat aquest temps es renten les cèl·lules amb tampó de FACS (200 mM Tris-HCl pH 7.8, 211 mM NaCl, 78 mM MgCl₂), eliminant el medi àcid que manté activa la pepsina i evitant així una major degradació de les cèl·lules.

Seguidament les cèl·lules tractades es tenyeixen resuspenent-les en 0,5 ml de tampó de FACS amb iodur de propidi a 20 µg/ml. En aquest medi es mantenen estable a 4°C fins que s'analitzen.

Per l'anàlisi de les mostres, 50 µl de cèl·lules prèviament tenyides es dilueixen en 1 ml de 50 mM Tris-HCl pH 7.8. La suspensió es sonica durant 10 segons a 50W (sonicador *Sonic Dismembrator*, Dynatech). Sonicar es vital per poder assegurar que cada lectura es correspon a una única cèl·lula; si no es sonica les parelles de cèl·lules en G1 es contenen com una cèl·lula que ja ha replicat (contingut 2C de DNA).

Les mostres s'han analitzat en un *FACScan Calibur* (Becton-Dickinson), llegint l'emissió de fluorescència del iodur de propidi en el canal (FL2-H). Les dades s'han graficat com a nombre d'esdeveniments (Y) respecte la fluorescència de la sonda (X), en un total de 20.000 esdeveniments.

6 Tècniques bioquímiques

6.1 Extracció de proteïna total de cèl·lules de llevat amb àcid tricloroacètic

Aquest mètode d'extracció total de proteïna presenta un elevat rendiment i alhora inactiva de forma immediata les proteases, quinases i fosfatases. Es basa en el trencament mecànic de les cèl·lules per agitació amb sorra de vidre i la posterior precipitació de les proteïnes per acció de l'àcid.

De l'ordre de 10^7 cèl·lules de llevat, a les que prèviament s'ha eliminat el medi de cultiu i s'han rentant amb aigua freda, són resuspeses en 200 μ l de 20% (v/v) d'àcid tricloroacètic (TCA). S'afegeix el mateix volum de sorra de vidre i es vortexa 1 minut a velocitat màxima i a temperatura ambient. Es recupera el lisat i es renta la sorra de vidre dues vegades amb 200 μ l de 5% (v/v) TCA. Cada rentant es recupera per tal d'obtenir la mateixa quantitat de proteïna possible.

Les proteïnes desnaturalitzades es recuperen centrifugant a baixa velocitat, 800 g durant 10 minuts a temperatura ambient.

Es descarta acuradament el sobrenedant i es dissol el pèl·let en un volum adequat de tampó de càrrega de mostres electroforètiques (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 8% (v/v) glicerol, 4% (v/v) 2-mercaptoetanol, 1.6% (p/v) SDS, 0.008% (p/v) blau de bromofenol). Les restes de TCA que queden en el pèl·let desborden la capacitat tamponadora del tampó de càrrega, per això s'afegeixen 0.2 volums de 1 M Tris base, neutralitzant l'efecte de l'àcid. Si no es corregeix el pH de les mostres es podria produir proteòlisi àcida en el següent pas del procés.

Finalment les mostres es bullen durant 3 minuts i es centrifuguen 800 g durant 10 minuts a temperatura ambient, eliminant així el material insoluble. Els sobrenedant es poden carregar directament en un gel de SDS-PAGE (Materials i Mètodes 6.2) o es poden congelar a -20°C (en cas de congelar les mostres cal bullir-les de nou abans d'aplicar-les al gel).

6.2 Electroforesi en gel de poliacrilamida desnaturalitzant

L'electroforesi en gel de poliacrilamida desnaturalitzant (SDS-PAGE) permet separar les proteïnes en funció de la seva massa molecular (Laemmli 1970). La posterior visualització es pot realitzar per immunoblot o per tinció directa de les proteïnes en el gel.

El detergent aniònic dodecilsulfat de sodi (SDS) s'uneix a les proteïnes, atorgant-hi càrrega negativa, de manera proporcional a la seva massa així la densitat de càrrega per les diferents proteïnes es la mateixa. Per tant, en un camp elèctric el moviment de les proteïnes és inversament proporcional a la seva mida, impulsades per la diferència de potencial que hi ha entre els dos pols de l'electroforesi.

S'han utilitzat gels de 1.5 mm de gruix i de diferents concentracions d'acrilamida total: 7.5%, 10% o 12% (v/v) en funció de la massa molecular de la proteïna d'estudi. La relació acrilamida-bisacrilamida s'ha mantingut constant (37.5:1; BioRad).

Per tal de visualitzar en quina regió del gel de poliacrilamida s'espera la proteïna d'interès s'han utilitzat marcadors de pes molecular:

- *Broad Range Prestained Standard* (Fermentas) si les mostres s'analitzen per immunoblot,
- *Broad Range Standard* (BioRad) si les mostres s'analitzen per tinció directa (blau de Coomassie).

Els gels es corren en tampó d'electroforesi (25 mM Tris-Glicina pH 8.3, 0.1% (p/v) SDS) utilitzant una font de corrent elèctric *Power-Pac Basic* (BioRad). Les condicions de voltatge i temps per separar les proteïnes són les següents:

- Anàlisi de Clb2: 10% acrilamida, 15 minuts d'aplicació a 90 V i 60 minuts de 195 V.
- Anàlisi de Cdc28 i de la seva fosforilació en la tirosina 19: 10% acrilamida, 15 minuts d'aplicació a 90 V i 60 minuts a 195 V.
- Anàlisi de Mcd1-13myc: 10% acrilamida, 15 minuts d'aplicació a 90 V i 60 minuts a 195V.

- Anàlisi de Mms4-3HA: 7.5% acrilamida, 15minuts d'aplicació a 90 V i 75 minuts 190 V.
- Anàlisi Mob1-3HA: 12% acrilamida, 15 minuts d'aplicació a 90 V i 62 minuts 195 V.
- Anàlisi de Pds1-13myc: 7.5% acrilamida, 15 minuts d'aplicació a 90 V i 60 minuts a 195 V
- Anàlisi de Pol12 (86 i 91 KDa): 7.5% acrilamida, 50 minuts d'aplicació a 120 V i 62 minuts a 195 V
- Anàlisi de Swe1-13myc: 7.5% acrilamida, 50 minuts d'aplicació a 120 V i 62 minuts a 195 V

6.3 Immunoblot i anticossos utilitzats

La proteïnes un cop separades per SDS-PAGE (Materials i Mètodes 6.2) s'electrotransfereixen a una membrana de nitrocel·lulosa (*Protran BA85*) per transferència semiseca (*Panther Semidry Electroblotter*, Owl Scientific) o submergida (BioRad) i posteriorment s'analitzen per immunoblot (*western blot*).

La transferència semiseca es fa a amperatge constant, d'acord al percentatge d'acrilamida del gel i la massa molecular de les proteïnes a transferir (de 2 a 3,2 mA/cm²), durant 60 minuts. La transferència submergida es fa a voltatge constant, 70 minuts a 100 V.

El tampó de transferència ha estat modificat respecte el tampó Towbin (Tris-Glicina pH 9.1, 0.0373% (p/v) SDS, 20% (v/v) metanol):

- Conté SDS per augmentar l'eficiència de la transferència
- Presenta pH alcalí per tal de minimitzar els nombre de proteïnes amb càrrega nul·la per coincidència del pH del tampó amb el seu punt isoelèctric.

La membrana amb les proteïnes transferides es tenyeix amb Ponceau S (0.2% (p/v) Ponceau S, 3% (v/v) TCA). La tinció permet veure les proteïnes més abundants que s'han pogut transferir a la membrana. D'aquesta manera es controla l'eficiència de la transferència i alhora s'usa aquesta tinció com a control de càrrega.

Materials i mètodes

Les membranes, un cop escanejades, es destenyeixen rentant-les amb TBS-Tween (100 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween-20). Seguidament es bloquegen amb TBST i 5% (p/v) llet desnatada en pols durant 20 minuts. El bloqueig impedeix la unió inespecífica de l'anticòs a la membrana.

Posteriorment, les membranes s'introdueixen en una dilució de l'anticòs primari, contra la proteïna o etiqueta d'interès, i s'incuben durant 90 minuts a temperatura ambient. Els anticossos primaris utilitzats són:

- 6D2 α -Pol12 (monoclonal de ratolí, ascites, cedit pel Dr. Marco Foiani) dilució 1:2000 en TBST i 1% de llet.
- 9E10 α -myc (monoclonal de ratolí, sobrenedant d'hibridoma), dilució 1:500 en TBST.
- 12CA5 α -HA (monoclonal de ratolí, sobrenedant d'hibridoma), dilució 1:100 en TBST.
- γ C-20 α -Cdc28 (policlonal de cabra, sc-6709, Santa Cruz Biotechnology), dilució 1:500 en TBST i 5% de llet.
- γ -180 α -Clb2 (policlonal de conill, sc-9071, Santa Cruz Biotechnology), dilució 1:2000 en TBST i 1% llet.
- α -pY15-Cdk1 (policlonal de conill, Cell Signaling #9111), dilució 1:1000 en TBST i 1% de llet.

A continuació, s'elimina l'excés d'anticòs primari fent tres rentats de 5 minuts amb TBST. Tot seguit, s'incuba la membrana durant 35 minuts amb l'anticòs secundari que correspongui:

- Pels anticossos primaris de ratolí: anti-IgG de ratolí conjugat amb peroxidasa de rave rusticà (HRP) (*Thermo Scientific 31430*), dilució 1:3000 en TBST.
- Pels anticossos primaris de cabra: anti-IgG de cabra conjugat amb HRP (Santa Cruz Biotechnology sc-2020), dilució 1:2000 en TBST i 5% de llet.
- Pels anticossos primaris de conill: anti-IgG de conill conjugat amb HRP (Dako P0450), dilució 1:2000 en TBST i 1% de llet.

Finalment, s'elimina l'excés d'anticòs secundari fent tres rentats de 5 minuts amb TBST i s'incuba la membrana amb el reactiu luminescent *ECL Western Blotting Detection System* (Amersham), durant 5 minuts, amb agitació manual, a temperatura ambient. S'elimina l'excés de reactiu, per tal d'aconseguir un revelat net, i s'exposa a pel·lícules fotogràfiques *Super-RX Fuji Medical X-Ray* (Fujifilm).

6.4 Assaig quinasa *in vitro* de Rad53

Prèviament en el laboratori s'han optimitzat les condicions d'aquest assaig pel que fa referència a la concentració de Rad53, substrat i temps d'incubació (Duch et al. 2011).

La reacció és duu a terme posant en contacte 1 µg de Rad53 recombinant (Materials i Mètodes 6.8) i 500 ng de la proteïna recombinant candidata a ser substrat de Rad53, en 30 µl de tampó de reacció quinasa preparat en fresc (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂, 1 mM DTT, 1 mM AEBSF, 2 mM NaF).

Per tal que la reacció de fosforilació tingui lloc s'afegeix 100 µM ATP sense marcatge i 5 µCi de γ-[³²P]-ATP i s'incuba 1 hora a 30°C amb agitació suau (Thermomix Eppendorf). La reacció s'atura afegint tampó de càrrega d'electroforesi i bullint-les durant 3 minuts (Materials i Mètodes 6.2).

Les mostres es resolen en un gel SDS-PAGE i aquest es tenyeix amb Commassie blue (Materials i Mètodes 6.2) per ubicar les proteïnes usades per l'assaig i així tenir un control de la posició on s'esperen les proteïnes d'interès en cas d'estar fosforilades.

A continuació s'exposa una pel·lícula fotogràfica *Super-RX Fuji Medical X-Ray* (Fujifilm) a la radiació β emesa pel ³²P incorporat en les proteïnes fosforilades.

6.5 Immunoprecipitació de proteïnes

Les immunoprecipitacions s'han usat per analitzar l'activitat Cdk1 mitòtica en diferents fons genètics i en presència de diferents estressos cel·lulars. Per aquest motiu, s'han utilitzat extractes proteics en condicions natives.

De l'ordre de $1.5 \cdot 10^9$ cèl·lules/ml en les condicions d'interès es centrifuguen a 2800 g, durant 5 minuts a 4°C i es renten en tampó d'immunoprecipitació fred i sense inhibidors (50 mM Tris-HCl pH 7.2, 150mM NaCl, 10% glicerol, 1mM EDTA). A continuació, el pèl·let cel·lular es sotmet a ràpida congelació en N₂ líquid i s'emmagatzema a -80°C.

Per extreure les proteïnes en condicions natives es descongela el pèl·let en gel i es resuspen en 2 ml de tampó d'immunoprecipitació fred complementat amb inhibidors de fosfatases (0,5 mM Na₄P₂O₇, 2 mM NaF, 2 mM β-glicerolfosfat), proteases (1mM AEBSF, 0,15 μM aprotinina, 1 μM leupeptina, 1 μM pepstatina), 1mM DTT i 0.1% (v/v) del detergent nonidet-P40. Tot el procediment té lloc a 4°C.

Es transfereix la suspensió a un tub Duran de vidre fred de 40 ml al qual s'afegeixen 2 ml de sorra de vidre. La lisis cel·lular té lloc mecànicament, es vortexa la suspensió durant 30 segons, a la màxima potència, i es deixa un minut en gel, evitant que la mostra s'escalfi i les proteïnes es desnaturalitzin. Aquest procés es repeteix 6 cops. Els lisats es deixen 1 hora en gel a la càmera freda per tal de maximitzar el procés d'extracció cel·lular.

A continuació, es centrifuguen els extractes en tubs eppendorf de 2 ml prèviament refredats, durant 20 minuts a 16.000g a 4°C per eliminar el material insoluble. El sobrenedant, que conté les proteïnes solubles en estat natiu, es transferit a un nou eppendorf fred.

Les immunoprecipitacions s'han realitzat contra proteïnes etiquetades amb 3HA o 13myc emprant resina Anti-3HA (Sigma) o Anti-13myc (Sigma). S'han emprat 20 μl de matriu per immunoprecipitació, prèviament equilibrats amb el tampó d'immunoprecipitació complet.

La matriu s'incuba 1 hora amb els extractes nadius a 4°C, en rotació suau mitjançant una noria. Seguidament, es centrifuga la matriu amb els extractes durant 1 minut, a 500g a 4°C i s'elimina el sobrenedant. Es fan 5 rentats amb tampó d'immunoprecipitació complet, fred, per tal d'eliminar l'excés de proteïnes unides a la matriu, no a l'anticòs.

Les proteïnes immunoprecipitades s'alliberen de la interacció amb l'anticòs bullint la matriu en tampó de càrrega d'electroforesi (Materials i Mètodes 6.2). Finalment la detecció és fa per immunoblot contra la proteïna immunoprecipitada (Materials i Mètodes 6.2).

6.6 Assaig d'activitat Cdk1 mitòtica *in vitro*

Es realitza una immunoprecipitació com en l'apartat anterior amb la diferència que 40 µl de matriu s'incuben amb 300 µg d'extracte proteic total. L'extracte es quantifica pel mètode Bradford; aquest pas es essencial per aconseguir un assaig quantitatiu ja que un excés de proteïna satura la reacció.

Una vegada incubada la reina amb l'extracte es centrifuga a 500 g, 1 minut a 4°C i s'elimina l'extracte. La matriu es renta tres vegades amb tampó de rentat (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40) i es divideix en dos: una part serà usada per l'assaig *in vitro* d'activitat Cdk1 mitòtica i l'altre serà analitzada per immunoblot i usada com a control que l'assaig es fa sobre la mateixa quantitat de proteïna immunoprecipitada (Materials i Mètodes 6.2).

La fracció usada per analitzar l'activitat Cdk1 mitòtica és rentada, de manera acurada, dos cop amb 25 mM MOPS. D'aquesta manera, s'equilibra la matriu amb el tampó en que està diluïda la histona H1 de timus de vedella que s'usa com a substrat de la reacció.

La histona H1 no és un substrat natural de l'activitat Cdk1 mitòtica però històricament s'ha usat com a substrat per quantificar l'activitat del complex Clb2-Cdk1 *in vitro*.

A continuació, s'afegeix el tampó de reacció Cdk1 *in vitro* (1mM β-glicerolfosfat, 1 mM AEBSF, 0.15 µM aprotinina, 1 µM leupeptina, 15 mM

Materials i mètodes

MOPS, 5 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM NaVO₄) i es deixa temperar la reacció 15 minuts a temperatura ambient.

Finalment, s'afegeix 0.2 mM ATP, 5μCi de γ-[³²P]-ATP i 6 μg d'histona H1 de vedella i s'incuba 15 minuts a 30°C en agitació suau (Thermomix Eppendorf). La reacció s'atura afegint tampó de càrrega d'electroforesi i bullint-les durant 3 minuts (Materials i Mètodes 6.2).

Les mostres es resolen en un gel SDS-PAGE i aquest es tenyeix amb Commassie blue (Materials i Mètodes 6.2) com a control de càrrega de la histona H1. A continuació s'exposa una pel·lícula fotogràfica *Super-RX Fuji Medical X-Ray* (Fujifilm) sensible a la radiació β emesa pel ³²P incorporat al substrat.

6.7 Producció de proteïnes recombinants

S'inocula un cultiu a partir d'una colònia fresca de BL21(DE3)RIL que conté el constructe d'interès en medi LB amb Ampicil·lina (100μg/ml) i Cloramfenicol (50μg/ml) (Materials i Mètodes 3.8). S'incuba tota la nit a 37°C, en una incubadora orbital a 200 rpm.

L'endemà, 500 ml de LB amb Ampicil·lina i Cloramfenicol s'inoculen amb 20 ml del cultiu saturat i es deixen incubar en les mateixes condicions fins que assoleixi una OD_{600nm} pròxim a 0.6. Quan el cultiu està en fase exponencial s'agafa una alíquota d'1 ml (control no induït) i s'afegeix IPTG a 1 mg/ml per tal d'induir l'expressió de la proteïna heteròloga d'interès.

El cultiu induït s'incuba durant 2 hores en les mateixes condicions. Seguidament es recull alíquota d'1ml (control d'inducció) i es centrifuga el cultiu 10 minuts a 8000g a 4°C. Es descarta el sobrenedant i les cèl·lules es resuspenen en 25 ml de tampó de lisis prèviament refredat (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 2 mM DTT, 1.5 mM EDTA, 1 mM AEBSF). La suspensió cel·lular es congela en nitrogen líquid i es conserva a -80°C fins que es confirmi la inducció i es procedeixi a la purificació de la proteïna recombinant.

Per confirmar la inducció de la proteïna recombinant es recórrer a les alíquotes recollides durant la inducció. Les cèl·lules d'*E. coli* es

centrifuguen 30 segons a 16000 g i es bullen amb tampó de càrrega electroforètica (Materials i Mètodes 6.2). A continuació, es centrifuguen les mostres a 2.800g, durant 10 minuts a temperatura ambient, per eliminar el material no soluble. Els sobrenedats es carreguen en un gel SDS-PAGE (Materials i Mètodes 6.2). Les proteïnes es tenyeixen mitjançant *Commassie blue* per comprovar si la proteïna d'interès s'ha induït. En cas afirmatiu es procedeix a la purificació de la proteïna congelada a -80°C.

6.8 Purificació de proteïnes recombinants

Totes les etapes de la purificació de la proteïna sobre-expressada tenen lloc a la cambra freda, a 4°C.

Les cèl·lules d'*E. coli* (Materials i Mètodes 6.8) es descongelen en gel. Per la seva lisis s'incuben 15 minuts en gel amb lisozim a una concentració final 0.1 mg/ml. Tot seguit, es duen a terme 5 polsos de sonicació a 50W (Sonicador *Sonic Desmembrator* (Dynatech)), de 30 segons cada un, amb un minut en gel entre cada pols.

Per solubilitzar la proteïna, s'afegeix 1% (v/v) de Tritó-X100 i s'incuba durant 1 hora a la cambra freda amb rotació suau (Roller Bottle), facilitant l'extracció. A continuació, els lisats es clarifiquen centrifugant a 12.000g, 10 minuts a 4°C.

L'extracte un cop clarificat es transfereix a un tub cònic de 50 ml que conté 200 µl de matriu Glutatió-Sefarosa (GE Healthcare); aquesta quantitat de matriu permet la purificació, aproximadament, de 5 mg de proteïna. Prèviament la matriu ha estat equilibrada amb tampó de lisis. L'extracte es deixa 1 hora rotant a la cambra freda per tal que tingui lloc la unió de la proteïna recombinant fusionada a GST amb la matriu.

Es recupera la matriu amb la proteïna unida per centrifugació a 500 g, durant 1 minuts a 4°C. S'elimina el sobrenedant i es renta la matriu 5 cops amb tampó de lisis fred.

Per tal d'escindir la proteïna GST de la proteïna recombinant cal tractar la matriu amb la proteasa PreScission. Aquesta reconeix una seqüència d'aminoàcids específica, present entre la proteïna d'interès i el GST.

Materials i mètodes

L'etiqueta s'allibera incubant la matriu durant 16 hores a 4°C amb 2 unitats de PreScission en el tampó de tall (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT).

Es determina la concentració de proteïna recombinant purificada per electroforesi SDS-PAGE mitjançant tinció de les proteïnes del gel amb *Commassie blue* (0.1% (p/v) Comassie Brilliant Blue, Sigma). Es compara la intensitat de la banda de la proteïna purificada amb les quantitats conegudes de les proteïnes del marcador de pes molecular (*Broad Range Standard*, BioRad).

6.9 *Contour-clamped Homogeneous Electric Field electrophoresis Pulse Field Gel Electroforesi*

El *Contour-clamped Homogeneous Electric Field electrophoresis - Pulse Field Gel Electroforesi* (CHEF-PFGE) és una tècnica que permet la separació de molècules de DNA majors de 20Kb de manera eficient gràcies al canvi periòdic d'orientació del camp elèctric (Schwartz & Cantor 1984).

Entre altres aplicacions permet distingir si els cromosomes estan completament replicats; únicament els cromosomes que han estat replicats poden sortir del pou, aquells que encara estan replicant tenen una conformació que no els permet avançar en el gel.

Per aplicar les mostres cal immobilitzar les cèl·lules en els pous de càrrega amb agarosa. De manera que el primer pas consisteix en generar els pous d'electroforesi amb les cèl·lules en el seu interior.

Es recullen $1 \cdot 10^8$ cèl·lules de *S. cerevisiae* en les condicions d'estudi desitjades i es centrifuguen a 1800 g durant 5 minuts a 4°C. El pèl·let obtingut es renta dues vegades en 50 mM EDTA fred i posteriorment, es resuspenen les cèl·lules en 50 µl de la solució anterior.

A continuació es preparen els pous d'agarosa que contindran les cèl·lules amb el DNA que es vol analitzar. Mentre es mantenen els pèl·lets en aigua-gel, es desfà 1% (p/v) d'agarosa de baix punt de fusió, temperant-la en un bany a 80°C. Seguidament es resuspenen les cèl·lules amb 100 µl de Solució 1 (1 M Sorbitol, 60 mM EDTA, 1 M Citrat de sodi, 0.005% 2-

mercaptoetanol, 70 unitats de lítica) i 300 µl de l'agarosa de baix punt de fusió dissolta i s'introdueix la mescla en els pous d'electroforesi motlle.

Un cop solidificats els pous es retiren del motlle i s'introdueixen en tubs eppendorf nous. A continuació es procedeix a l'eliminació del RNA i de la paret cel·lular, per això es tracten els pous amb 400 µl de Solució 2 (450 mM EDTA, 7.5% (v/v) 2-mercaptoetanol, 10 mM Tris HCl 7.0, 10 µg/ml RNasa A) durant 2 hores a 37°C. S'atura la reacció posant les mostres en gel durant 10 minuts.

Per tal que els cromosomes es separin segons la seva mida i conformació les cèl·lules es desproteïtzen amb proteïnasa K (250 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.0, 1% (p/v) Sarkosyl, 1 mg/ml proteïnasa K), incubant els pous tota la nit a 37°C.

L'endemà es treu acuradament tot el sobrenedant i els pous es deixen en solució d'emmagatzemat (50 mM EDTA, 50% glicerol (v/v)).

Es corren els pous en un gel 1% (p/v) d'agarosa (Materials i Mètodes 3.2) sense bromur d'etidi. Un cop els pous han estat introduïts en els carrils del gel de manera que no quedin bombolles entre el pous i el carril, es segella el carril afegint l'agarosa sobrant del gel.

Es corre el gel durant 2240 minuts a 14°C aplicant un cap elèctric de 6 V/cm² que va canviant de direcció cada 60 segons.

El gel es tenyeix submergint-lo amb una solució de bromur d'etidi i es fotografia prèvia il·luminació amb llum UV.

7 Microscòpia de fluorescència

7.1 Fixació amb metanol-acetona pel recompte d'anafases amb DAPI

Es determina el nombre de cèl·lules en anafase mitjançant microscòpia de fluorescència de les cèl·lules fixades amb metanol-acetona i tenyides amb 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

Materials i mètodes

De l'ordre de $1 \cdot 10^7$ cèl·lules/ml són sonicades durant 10 segons en gel a 50W (sonicador *Sonic Dismembrator (Dynatech)*) per tal d'aconseguir cèl·lules individualitzades. Seguidament, es centrifuguen a 3.000g, 30 segons a 4°C i s'elimina completament el medi. El pèl·let es resuspen en metanol i es guarda durant un mínim de 6 minuts al congelador a -20°C per tal de fixar i permeabilitzar les cèl·lules.

A continuació, s'elimina completament el metanol centrifugant a 3.000g durant 30 segons a 4°C i es resuspenen les cèl·lules en acetona.

Les mostres poden ser visualitzades directament o conservades a -20°C.

Pel recompte de cèl·lules que estan segregant el seu DNA, 10 µl de cèl·lules en acetona són escapades sobre d'un portaobjectes recobert de poli-lisina i 5 µl de DAPI (0,1 µg/ml DAPI, 50 % (v/v) glicerol, 0.5xPBS) són afegits sobre les cèl·lules escampades. Finalment, el cobreobjectes s'encarregarà de distribuir el DAPI per tota la mostra.

Per la visualització de les mostres s'ha utilitzat un microscopi d'epifluorescència Nikon Eclipse 90i, amb objectiu Plan Apo 100x/1.4 d'immersió. El microscopi està acoblat a una càmera digital que permet l'adquisició d'imatges a diferents temps d'exposició.

7.2 Microscòpia amb cèl·lules vives

Per tal de visualitzar proteïnes etiquetades amb una proteïna fluorescent no s'han fixat les cèl·lules, en el moment que es realitzava l'experiment es visualitzaven al microscopi.

S'han utilitzat dos etiquetes fluorescents diferents:

- GFP (*Green Fluorescent Protein*): proteïna d'origen bacterià que presenta el seu pic d'absorció màxima a 390 nm i emet a 509 nm.
- mCherry: proteïna fluorescent d'origen bacterià que presenta el seu pic d'absorció màxima a 587 nm i emet a 610 nm.

Previ a dipositar les mostres sobre el portaobjectes recobert de poli-lisina es soniquen les mostres durant 10 segons a 50W (sonicador *Sonic Dismembrator (Dynatech)*), en cas que es vulguin aconseguir cèl·lules individualitzades.

Per la visualització de les mostres s'ha utilitzat un microscopi d'epifluorescència Nikon Eclipse 90i, amb objectiu Plan Apo 100x/1.4 d'immersió. El microscopi està acoblat a una càmera digital que permet l'adquisició d'imatges a diferents temps d'exposició.

8 Taula de soques de *Saccharomyces cerevisiae* utilitzades

Nom	Genotip	Origen
W303-1a	MATa <i>ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	(1)
YGP020	W303-1a <i>bar1Δ::URA3</i>	(2)
YGP024	W303-1a <i>sml1Δ rad53Δ::LEU2 bar1Δ::URA3</i>	(2)
YGP038	W303-1a <i>rad53-21 bar1Δ::URA3</i>	(2)
YGP098	W303-1a <i>bar1Δ::URA3 swe1Δ::TRP1</i>	(3)
YGP108	W303-1a <i>sml1Δ mec1Δ::LEU2 bar1Δ::URA3 swe1Δ::HIS3</i>	(3)
YGP115	W303-1a <i>bar1Δ::URA3 SWE1-13myc (KanMX6)</i>	(3)
YGP117	W303-1a <i>sml1Δ rad53Δ::LEU2 bar1Δ::URA3 SWE1-13myc (KanMX6)</i>	(3)
YGP121	W303-1a <i>rad53-21 bar1Δ::URA3 swe1Δ::TRP1</i>	(3)
YGP123	W303-1a <i>sml1Δ mec1Δ::LEU2 bar1Δ::URA3</i>	(3)
YGP129	W303-1a <i>bar1Δ::URA3 SWE1-13myc (KanMX6) chk1Δ::HIS3</i>	(3)
YGP131	W303-1a <i>rad53-21 bar1Δ::URA3 chk1Δ::HIS3 SWE1-13myc (KanMX6)</i>	(3)
YGP133	W303-1a <i>bar1Δ::URA3 CLB2-3HA (KanMX6)</i>	(3)
YGP135	W303-1a <i>sml1Δ rad53Δ::LEU2 bar1Δ::URA3 CLB2-3HA (KanMX6)</i>	(3)
YGP136	W303-1a <i>sml1Δ rad53Δ::LEU2 bar1Δ::URA3 swe1Δ::TRP1 CLB2-3HA (KanMX6)</i>	(3)
YGP165	W303-1a <i>sml1Δ mec1Δ::LEU2 bar1Δ::URA3 pds1Δ::TRP1</i>	(3)

YGP201	W303-1a <i>rad53-21 bar1Δ::URA3 swe1Δ::TRP1</i> <i>pds1Δ::HIS3</i>	(3)
YGP208	W303-1a <i>rad53-21 bar1Δ::URA3 pds1Δ::HIS3</i>	(3)
YGP209	W303-1a <i>sml1Δ mec1Δ::LEU2 bar1Δ::URA3</i> <i>swe1Δ::HIS3 pds1Δ::TRP1</i>	(3)
YRP11	W303-1a <i>sml1Δ rad53Δ::LEU2 bar1Δ::URA3</i> <i>swe1Δ::TRP1</i>	(3)
YRP16	W303-1a <i>sml1Δ mec1Δ::LEU2 SWE1-13myc (KanMX6)</i> <i>bar1Δ::URA3</i>	(3)
YRP22	W303-1a <i>bar1Δ::URA3 CDC5-13myc (KanMX6)</i>	(3)
YRP24	W303-1a <i>bar1Δ::URA3 SWI5-3HA (KanMX6)</i>	(3)
YRP33	W303-1a <i>bar1Δ::URA3 CLB2-3HA (KanMX6) swe1Δ::TRP1</i>	(3)
YRP34	W303-1a <i>bar1Δ::URA3 pds1Δ::TRP1</i>	(3)
YRP38	W303-1a <i>clb1Δ::URA3 clb2-VI MOB1-3HA (KanMX6)</i>	(3)
YRP48	W303-1a <i>sml1Δ rad53Δ::LEU2 bar1Δ::URA3</i> <i>cdc28Δ::TRP1 Cdk1-19A::URA3</i>	(3)
YRP70	W303-1a <i>bar1Δ cdc28Δ::TRP1 Cdk1-19A::URA3</i> <i>CLB2-3HA (KanMX6)</i>	(3)
YRP99	W303-1a <i>bar1Δ swe1Δ::TRP1 SWE1-AQ-13myc::URA3</i>	(3)
YRP100	W303-1a <i>sml1Δ rad53Δ::LEU2 bar1Δ swe1Δ::TRP1</i> <i>SWE1-AQ-13myc::URA3</i>	(3)
YRP101	W303-1a <i>rad53-21 bar1Δ::URA3 swe1Δ::TRP1</i> <i>pds1Δ::HIS3 MCD1-13myc (KanMX6)</i>	(3)
YRP102	W303-1a <i>rad53-21 bar1Δ::URA3 pds1Δ::HIS3</i> <i>MCD1-13myc (KanMX6)</i>	(3)
YRP107	W303-1a <i>rad53-21 bar1Δ swe1Δ::TRP1 pds1Δ::HIS3</i> <i>SWE1-AQ-13myc::URA3 MCD1-13myc (KanMX6)</i>	(3)
YRP111	W303-1a <i>bar1Δ::URA3 CDC14-GFP (KanMX6)</i>	(3)

Materials i mètodes

YRP114	W303-1a <i>rad53-21 bar1Δ::URA3 swe1Δ::TRP1</i>	(3)
	<i>pds1Δ::HIS3 CDC14-GFP (KanMX6)</i>	
YRP115	W303-1a <i>rad53-21 bar1Δ::URA3 pds1Δ::HIS3</i>	(3)
	<i>CDC14-GFP (KanMX6)</i>	
YRP117	W303-1a <i>bar1Δ GFP-TUB1::URA3 HTB2-mcherry::HIS</i>	(3)
YRP119	W303-1a <i>sml1Δ rad53Δ::LEU2 bar1Δ swe1Δ::TRP1 GFP-</i>	(3)
	<i>TUB1::URA3 HTB2-mcherry::HIS</i>	
YRP143	W303-1a <i>clb1Δ::URA3 clb2-VI 3HA-MMS4 (Nat)</i>	(3)
YRP144	W303-1a <i>rad53-21 bar1Δ swe1Δ::TRP1 pds1Δ::HIS3</i>	(3)
	<i>GFP-TUB1::URA3 HTB2-mcherry::HIS</i>	
YRP149	W303-1a <i>rad53-21 bar1Δ::URA3 pds1Δ::HIS3</i>	(3)
	<i>ASK1-13myc (KanMX6)</i>	
YRP151	W303-1a <i>rad53-21 bar1Δ::URA3 swe1Δ::TRP1</i>	(3)
	<i>pds1Δ::HIS3 ASK1-13myc (KanMX6)</i>	
YRP158	W303-1a <i>rad53-21 bar1Δ::URA3 swe1Δ::TRP1</i>	(3)
	<i>ASK1-13myc (KanMX6)</i>	
YRP160	W303-1a <i>bar1Δ pds1Δ::TRP1 GFP-TUB1::URA3</i>	(3)
	<i>HTB2-mcherry::HIS</i>	
YRP163	W303-1a <i>bar1Δ::URA3 CDC14-GFP(KanMX)</i>	(3)
	<i>HTB2-mCherry(HIS)</i>	
YRP168	W303-1a <i>sml1Δ mec1Δ::LEU2 bar1Δ::URA3</i>	(3)
	<i>CLB2-3HA (KanMX6)</i>	
YRP170	W303-1a <i>rad53-21 bar1Δ swe1Δ::TRP1 mcd1Δ::HIS3</i>	(3)
	<i>scc1-73::URA3</i>	
YRP171	W303-1a <i>bar1Δ::URA3 MCD1-13myc (KanMX6)</i>	(3)
YRP172	W303-1a <i>bar1Δ::URA3 pds1Δ::TRP1</i>	(3)
	<i>MCD1-13myc (KanMX6)</i>	
YRP174	W303-1a <i>sml1Δ mec1Δ::LEU2 bar1Δ::URA3</i>	(3)

	<i>PDS1-13myc::HIS3 tel1Δ::TRP1</i>	
YRP175	W303-1a <i>bar1Δ mcd1Δ::HIS3 scc1-73::URA3</i>	(3)
YRP190	W303-1a <i>sml1Δ mec1Δ::LEU2 bar1Δ::URA3</i>	(3)
	<i>PDS1-13myc::HIS3 tel1Δ::TRP1 mad2Δ (KanMX6)</i>	
YRP196	W303-1a <i>bar1Δ::URA3 PDS1-13myc::HIS3</i>	(3)
	<i>mad2Δ (KanMX6)</i>	
<i>rad53-21</i>	W303-1a <i>rad53-21</i>	(4)
BY4741	MATa <i>his3del1 leu2del0 met15del0 ura3del0</i>	(4)
<i>mad2Δ</i>	BY4741 <i>mad2Δ::KanMX4</i>	(4)
K6800	W303-1a <i>scc1-73</i>	(5)
Y3000	W303-1a <i>clb1Δ::URA3 clb2-VI</i>	(6)

Taula 4. Soques de *S. cerevisiae* utilitzades en aquest treball. L'origen de les soques és (1) (Thomas & Rothstein 1989), (2) (Palou et al. 2010), (3) aquest treball, (4) laboratori de Joaquín Ariño , (5) (Michaelis et al. 1997), (6) (Amon et al. 1993).

9 Taula d'oligonucleòtids utilitzats en aquest treball

Nom	Seqüència	Soca / Construcció
Swe1del F	TGATTGCGTAGTGCTGGGGAAAAGTAAACAC ACACAGGCGGCGGTATTTTCTCCTTACGC	YGP98, 108, 121, 201 i YRP11, 33, 99,100, 101, 114, 119, 144, 170
Swe1del R	TCTACATACAGGCATTCTCAGTTTGTAAGAT TTGATTTGAGATTGTACTGAGAGTGCAC	YGP98, 108, 121, 201 i YRP11, 33, 99,100, 101, 114, 119, 144, 170
Swe1 del Chk F	GGATTACTACTGAACAGGTCT	YGP98, 108, 121, 201 i YRP11, 33, 99,100, 101, 114, 119, 144, 170
Swe1 del Chk F	GTCGTCTTCTGGATAATAGC	YGP98, 108, 121, 201 i YRP11, 33, 99,100, 101, 114, 119, 144, 170
Swe1- pFa6a F	CGCAATGCAGGTGCTATTATCCAGGAAGACG ACTTTGGACCTAAGCCAAAATTTTATACGG ATCCCCGGGTTAATTA	YGP115, 117, 129, 131 i YRP16
Swe1-	CTACCGGACTGCAATTACACTCTTTTCGTTA	YGP115, 117,

pFa6a R	TTGGATTATTTATAACAATGCGGCCCATAGAAT TCGAGCTCGTTTAAAC	129, 131 i YRP16
Chk1del F	CTACAGCTTCAAACATAAGAGTATATCATAA GTTGCTGTATATGGGCAGCACGTATTACTGC GGTATTTTCTCCTTACGC	YGP129, 130, 131
Chk1del R	AAAGAATTTTTTTTTTTTTTTTGGATCAGTGCATC TTAACCCCTTCTTTGTCTCCATTTTTTAGATTG TACTGAGAGTGCAC	YGP129, 130, 131
Chk1del Chk F	TTACGGCTGTTTGGTTTAGC	YGP129, 130, 131
Chk1del Chk R	GATTTTATGATGAGGCTCGA	YGP129, 130, 131
Clb2-pFa6a F	TCCGTCCAATGGGCTTTAAAGGTTAGAAAAA ACGGCTATGATATAATGACCTTGCATGAACG GATCCCCGGGTTAATTAA	YGP133, 135, 136 i YRP33, 70
Clb2-pFa6a R	GGTGTGAAATTTGTAAGAATAAATGGAAATG TGAAAAGAAATGATTAATAAAGCAGCCATAGA ATTCGAGCTCGTTTAAAC	YGP133, 135, 136 i YRP33, 70
Pds1del F	TCACATACTATTACACTTCTGCGGTACCAAGC TAGATTAAGTGCTAGATAATAAACCTTTGCG GTATTTTCTCCTTACGC	YGP201, 208 i YRP34, 101, 107, 114, 115, 155 i 160
Pds1del R	ATGTTATAAAGTATCTGTATATACGTGTATAT ATGTTGTGTGTATGTGAATGAGCAGTGGAGA TTGTAAGTGTGATGAGTGCAC	YGP201, 208 i YRP34, 101, 107, 114, 115, 155 i 160
Pds1del Chk F	GTCAAAAACTCGTGTAAGAGGTC	YGP201, 208 i YRP34, 101, 107, 114, 115,

Materials i mètodes

		155 i 160
Pds1del Chk R	GTACGAACAATGGCGGTAGTTGAG	YGP201, 208 i YRP34, 101, 107, 114, 115, 155 i 160
Cdc5-pFa6a F	GAGAACTAACTTTGATAAAGGAAGGTTTGA AGCAGAAGTCCACAATTGTTACCGTAGATCG GATCCCCGGGTTAATTAA	YRP20
Cdc5-pFa6a R	CTAACATGAAAGATGTTTGTTCATTTTGTACC TTTAGAAAAAGGGTATTAATGCTAGGGGGAA TTCGAGCTCGTTTAAAC	YRP20
Swi5-pFa6a F	CGTAGTTATGATGGGAATGGAACGGGGATT ATGGTTTCGCCAATGAAAATAATCAAAGGC GGATCCCCGGGTTAATTAA	YRP24
Swi5-pFa6a R	ACATTCTCCACTCTCCACAGAAAAAATTCCT AAAGTTATAGTTCACATTGTTATATATGGAAT TCGAGCTCGTTTAAAC	YRP24
Mob1- pFa6a F	CTACTAAGACCGGCTGATTTTGGTCCGCTGTT AGAATTAGTGATGGAGTTGAGGGATAGGCG GATCCCCGGGTTAATTAA	YRP38
Mob1- pFa6a R	TATATTCAAACCTCAATAAACGATTTCAAATC ATAAATACAAGTATAGTAACTAGAATGGAA TTCGAGCTCGTTTAAAC	YRP38
Cdc28del F	GTGGAAAATAGCCCAGATCAAATAGAACTAT CCTTCGAACCATCTGTGCGGTATTTTACA	YRP48 i 70
Cdc28del R	GCGAAATAGATTATAATGCTTATGATTCTTGG AAGTAGGGAGATTGTACTGAGAGTGAC	YRP48 i 70
Cdc28del	GCCAGCACATCAGCTACAGTG	YRP48 i 70

Chk F		
Cdc28del Chk R	GACAGTGCAGTAGCATTGTA	YRP48 i 70
Mcd1- pFa6a F	GCATTTCGGAAATATTAATAAGACGCCAAAC CTGCACTATTTGAAAGGTTTATCAATGCTCGG ATCCCCGGGTTAATTAA	YRP101, 107 i 171
Mcd1- pFa6a R	TGTAGAGTTGCCAAGATCATTCTGCCTTGCG GCCAGTAGTGGCTCTACCGCATTAGTTTGGA ATTCGAGCTCGTTTAAAC	YRP101, 107 i 171
Cdc14- pFA6a F	GGGAGAAGGACTACAAGCGCCGCCGGTGGT ATAAGAAAAATAAGTGGCTCCATCAAGAAAC GGATCCCCGGGTTAATTAA	YRP111, 114 i 115
Cdc14- pFA6a R	TATGACTCTTTGAAAAGACAGCGAGAAGGG ACACTGGAAAAATGGCATAAACTTTTCAGA ATTCGAGCTCGTTTAAAC	YRP111, 114 i 115
Htb2del chk F	GCAACAGTGAGACACTTGCC	YRP117, 119, 144 i 160
Htb2del chk R	GGAGGCTGATAGACTAGACC	YRP117, 119, 144 i 160
Ask1- pFA6a F	GAAGAGAGTACGAAAGAAGTACCAAAGCCT GGGACCATCATTCAATTTTCTACGAATAGACG GATCCCCGGGTTAATTAA	YRP149, 151, 158
Ask1- pFA6a R	GAAGAGAGTACGAAAGAAGTACCAAAGCCT GGGACCATCATTCAATTTTCTACGAATAGACG GATCCCCGGGTTAATTAA	YRP149, 151, 158
Mcd1del F	AAAGGACTGGTCAAAGAAAAGACAACTCAAT TGCACAATTACTTTACAAGAAACACGACAGC GGTATTTTCTCCTTACGC	YRP170 i 175

Materials i mètodes

Mcd1del R	GATCTATATATGCATCAGCTTATTGGGTCCAC CAAGAAATCCCCTCGGCGTAACTAGGTTAGA TTGTACTGAGAGTGCAC	YRP170 i 175
Mcd1del Chk F	CCTGTAGACTGGATGTGAGA	YRP170 i 175
Mcd1del Chk R	TGGCTTTATTACCAGGGTTG	YRP170 i 175
GST-Clb2 F	CGGATCCATGTCCAACCCAATAGAAAACAC	pGP25
GST-Clb2 R	CCGGTCGACTCATTTCATGCAAGGTCATTAT	pGP25
Swe1-AQ- 13myc F- SacII	GCGATCCCGCGTTGTAACCTGAACTATTAG TATATCCTCTTG	pGP48
Swe1-AQ- 13myc R- SacI	CGAGCTCATGCTTGAAGCGGCTGTACT	pGP48
SWE1-AQ-F	TGGGGCAACAGCTCAAACACA	pGP48
SWE-AQ-R	TGTGTTTGAGCTGTTGCCCC	pGP48
Mcd1-F BamHI	CGGATCCTAGACTGGATGTGAGATGAT	pRP10
Mcd1-R BamHI	CGGATCCTTAAGCATTGATAAACCTTTCAA	pRP10

Taula 5. Oligonucleòtids utilitzats en aquest treball.

RESULTATS

1 El mecanisme de vigilància de la fase S estabilitza Swe1 en resposta a estrès genotòxic

Malgrat el paper central que juga Wee1 a *Schizosaccharomyces Pombe* en inhibir l'activitat Cdk1 de fase M i la mitosi en resposta a estrès genotòxic (Enoch & Nurse 1990; Gould & Nurse 1989; Rhind et al. 1997; Rhind & Russell 1998), és integrament dispensable al llevat de gemmació *Saccharomyces cerevisiae* (Sorger & Murray 1992; Amon et al. 1992; Booher et al. 1993) (Introducció 1.2.3.1).

Aquests resultats han estat interpretats generalment com manca de conservació del mecanisme de control a *Saccharomyces cerevisiae*. Tanmateix Swe1 podria ser dispensable també en cas d'existir dues o més vies de control redundants. Partint d'aquesta idea vàrem decidir explorar si Swe1 està implicat, malgrat tot, en la resposta a estrès genotòxic.

1.1 Els nivells de Swe1 s'estabilitzen en resposta a estrès replicatiu

Els nivells de Swe1 fluctuen al llarg del cicle cel·lular. Una predicció inicial és que si Swe1 està implicat en la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès genotòxic, els seus nivells s'haurien d'estabilitzar en aquestes condicions.

Cultius en creixement exponencial a 30°C es van sincronitzar a G1 amb la feromona α -factor i després es van alliberar de manera sincrònica a fase S en presència de 200 mM HU o de 15µg/ml nocodazol (Materials i Mètodes 2.1, 5.4 i 5.5). A continuació es recullen alíquotes cada quinze minuts durant 180 minuts. Aquestes mostres es van analitzar mitjançant electroforesi desnaturalitzant i immunoblot (Materials i Mètodes 6.1, 6.2, 6.4). La progressió del cicle cel·lular es va monitoritzar a partir de la densitat cel·lular, l'índex de gemmació (BI) i el contingut de DNA mesurat mitjançant citometria de flux (Materials i Mètodes 5.1, 5.6).

Pel que fa referència a Swe1, l'immunoblot dels corresponents extractes cel·lulars totals mostra la seva aparició 30 minuts després d'alliberar les

Resultats

cèl·lules. En una fase S no pertorbada (alliberament en presència de nocodazol) Swe1 desapareix a G2/M (90 minuts després d'alliberar-les de G1). En canvi, en presència d'estrès replicatiu els nivells de Swe1 s'estabilitzen, mantenint-se constants al llarg de l'experiment, confirmant el descrit anteriorment a la bibliografia (Figura 17)(Liu & Wang 2006).

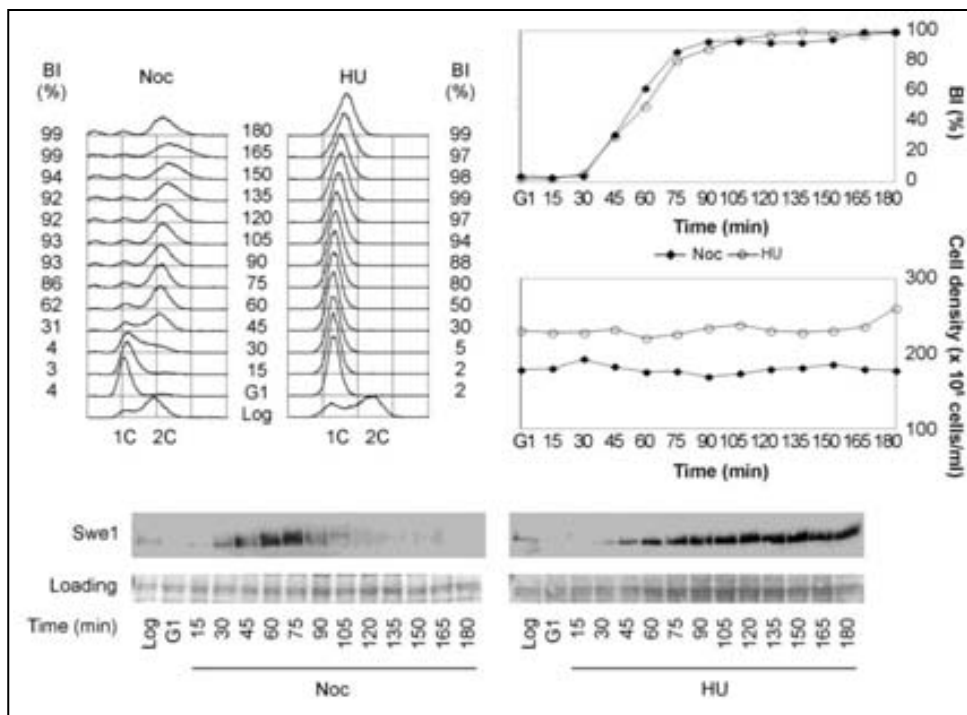


Figura 17. Els nivells de Swe1 s'estabilitzen en presència d'estrès replicatiu. Un cultiu de la soca YGP115 (*SWE1*-13myc) va ser sincronitzat a G1 pre-Start a 30°C i alliberat sincrònicament a una fase S en presència de nocodazol (15 µg/ml Noc) o en presència d'estrès replicatiu (200 mM HU). La citometria de flux, els índex de gemmació (BI) i densitats cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start, d'acord al contingut 1C de DNA i el baix índex de gemmació, i sincrònicament alliberades tal i com determina l'evolució de l'índex de gemmació. En les cèl·lules alliberades a una fase S en presència de nocodazol s'observa la progressió del contingut de DNA des d'1C a 2C. En canvi, les cèl·lules alliberades en presència d'HU no presenten progressió de la replicació, restant amb 1C de DNA. Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, es van analitzar per immunoblot anti-myc (Swe1). Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

1.2 L'estabilització dels nivells de Swe1 en resposta estrès replicatiu és dependent de Mec1

Per determinar si l'estabilització de Swe1 en presència d'estrès replicatiu és dependent del *checkpoint* de fase S s'analitzaren els nivells de Swe1 en una soca mutant nul·la per Mec1, la quinasa transductora del *checkpoint*, exposada a estrès replicatiu.

Les cèl·lules es sincronitzen en G1 i s'alliberen a una fase S en presència de nocodazol o estrès replicatiu (Materials i Mètodes 2.1, 5.4 i 5.5). A continuació es recullen mostres cada 15 minuts durant 180 minuts. Aquestes mostres es van analitzar mitjançant electroforesi desnaturalitzant i immunoblot (Materials i Mètodes 6.1, 6.2, 6.4). La progressió del cicle cel·lular es va monitoritzar a partir de la densitat cel·lular, l'índex de gemmació (BI) i el contingut de DNA mesurat mitjançant citometria de flux (Materials i Mètodes 5.1, 5.6).

En la Figura 18 s'observa que en absència de Mec1 les cèl·lules són incapaces d'estabilitzar els nivells de Swe1 en resposta a estrès replicatiu, en comparació amb el que succeeix en una soca salvatge (Figura 17). Per tant, l'estabilització dels nivells de Swe1 en aquestes condicions és dependent del *checkpoint de fase S*.

Resultats

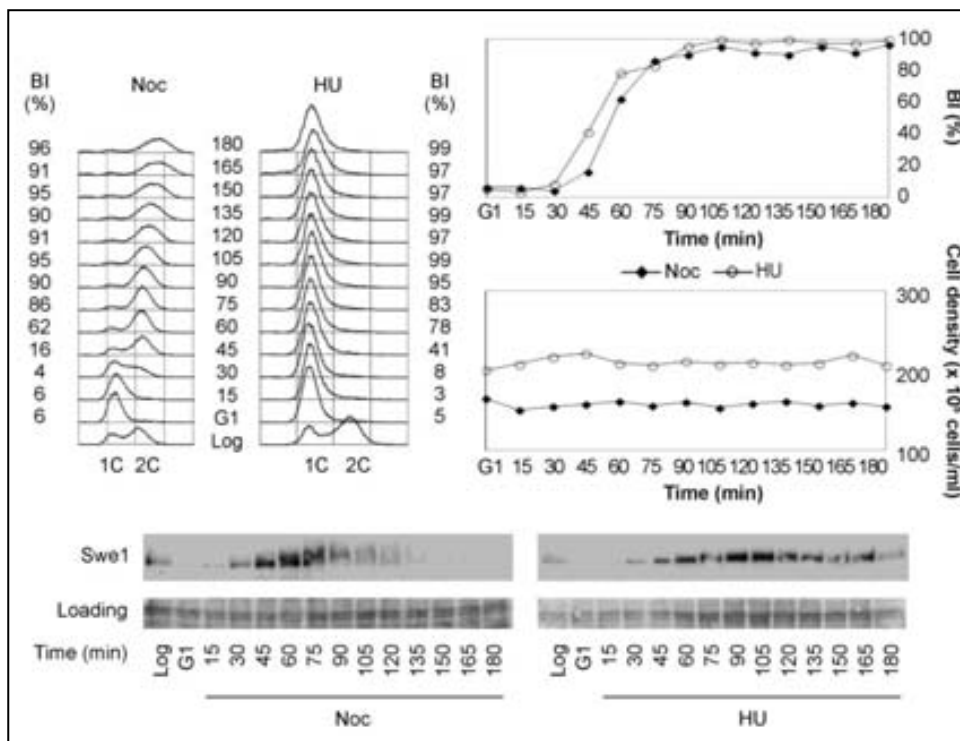


Figura 18. L'estabilització dels nivells de Swe1 en resposta a estrès replicatiu és dependent de Mec1. Un cultiu de la soca YRP16 (*mec1* Δ *SWE1*-13myc) va ser sincronitzat a G1 pre-Start a 30°C i alliberat sincrònicament a una fase S en presència de nocodazol (15 μ g/ml Noc) o en presència d'estrès replicatiu (200 mM HU). La citometria de flux, els índex de gemmació (BI) i densitats cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament tal i com mostra la citometria de flux, la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI). Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, es van analitzar per immunoblot anti-myc (Swe1). Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

1.2.1 L'estabilització dels nivells de Swe1 en resposta a estrès replicatiu depèn de les dues quinases efectores del *checkpoint* Rad53 i Chk1

Els nostres resultats mostren que l'estabilització dels nivells de Swe1 en resposta a estrès replicatiu depèn de Mec1, la quinasa transductora central del *checkpoint* de fase S. Donat que Mec1 pot actuar a través de dues quinases efectores, Rad53 i Chk1 (Sun et al. 1996; Sanchez et al. 1999), vàrem analitzar el comportament de Swe1 en resposta a estrès replicatiu en mutants simples i doble d'aquestes quinases.

Primerament, vàrem estudiar el comportament dels nivells de Swe1 en la soca de la deleció de Rad53. Cèl·lules *rad53Δ* es van sincronitzar en G1 pre-Start i s'alliberen de forma sincrònica en presència o absència d'estrès replicatiu (Materials i Mètodes 2.1, 5.4). A continuació és recullen alíquotes cada quinze minuts durant 180 minuts. Aquestes mostres es van analitzar mitjançant electroforesi desnaturalitzant i immunoblot (Materials i Mètodes 6.1, 6.2, 6.4). La progressió del cicle cel·lular es va monitoritzar a partir de la densitat cel·lular, l'índex de gemmació (BI) i el contingut de DNA mesurat mitjançant citometria de flux (Materials i Mètodes 5.1, 5.6).

En la Figura 19 es pot observar que, inesperadament, en absència de Rad53, la principal quinasa efectora del *checkpoint de fase S*, els nivells de Swe1 romanen estables en presència d'estrès replicatiu al llarg de l'experiment.

Resultats

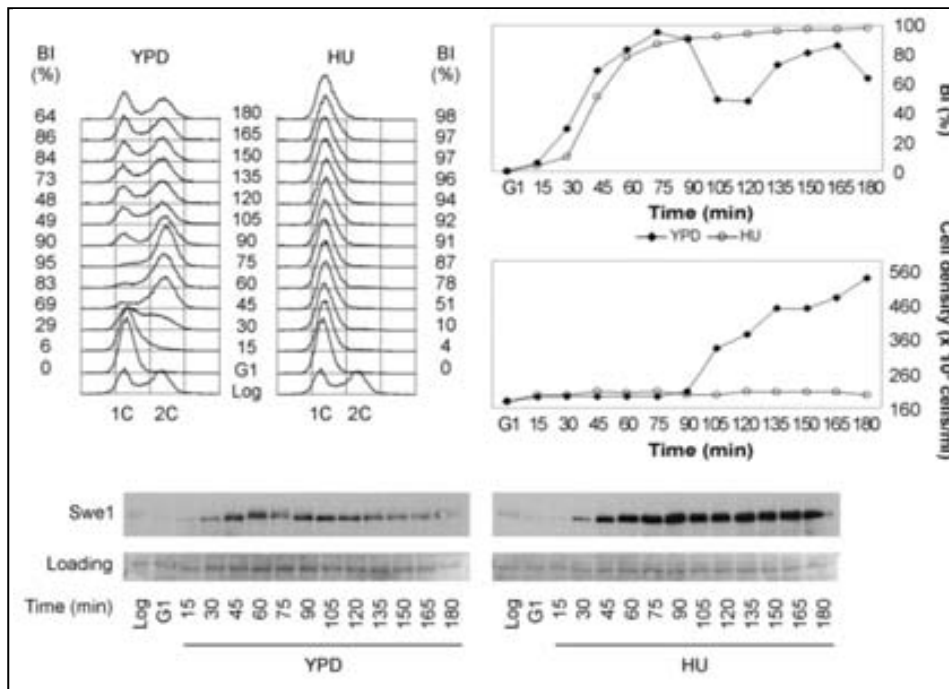


Figura 19. Els nivells de Swe1 romanen estables en una soca *rad53Δ*. Un cultiu de la soca YGP117 (*rad53Δ SWE1-13myc*) va ser sincronitzat a G1 pre-Start a 30°C i alliberat sincrònicament a una fase S no compromesa (YPD) o en presència d'estrès replicatiu (200 mM HU). La citometria de flux, els índex de gemmació (BI) i densitats cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament tal i com mostra la citometria de flux, la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI). Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, es van analitzar per immunoblot anti-myc (Swe1). Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

El *checkpoint* de fase S actua a través de Mec1 i Rad53 quan l'estrès és detectat en estadis inicials de la replicació. Ara bé, el *checkpoint* presenta una altra quinasa efectora, Chk1, la qual actua primordialment a la transició G2/M (Introducció 3). Malgrat treballar amb estrès detectat al inici de la fase S, es va explorar l'estabilització de Swe1 en un mutant nul per Chk1.

Cèl·lules *chk1Δ* es sincronitzaren a G1 pre-Start i s'alliberaren en presència o absència d'estrès replicatiu (Materials i Mètodes 5.4). A continuació, es recolliren alíquotes cada quinze minuts durant 180

minuts. Aquestes mostres es van analitzar mitjançant electroforesi desnaturalitzant i immunoblot (Materials i Mètodes 6.1, 6.2, 6.4). La progressió del cicle cel·lular es va monitoritzar a partir de la densitat cel·lular, l'índex de gemmació (BI) i el contingut de DNA mesurat mitjançant citometria de flux (Materials i Mètodes 5.1, 5.6).

S'observa que en absència de la quinasa Chk1 les cèl·lules mantenen la capacitat d'estabilitzar Swe1 en presència d'estrès replicatiu. Aquest resultat suggereix que l'estabilització de Swe1 en presència de HU no depèn, individualment, de cap de les dues quinases efectores del *checkpoint* de fase S (Figura 20).

Resultats

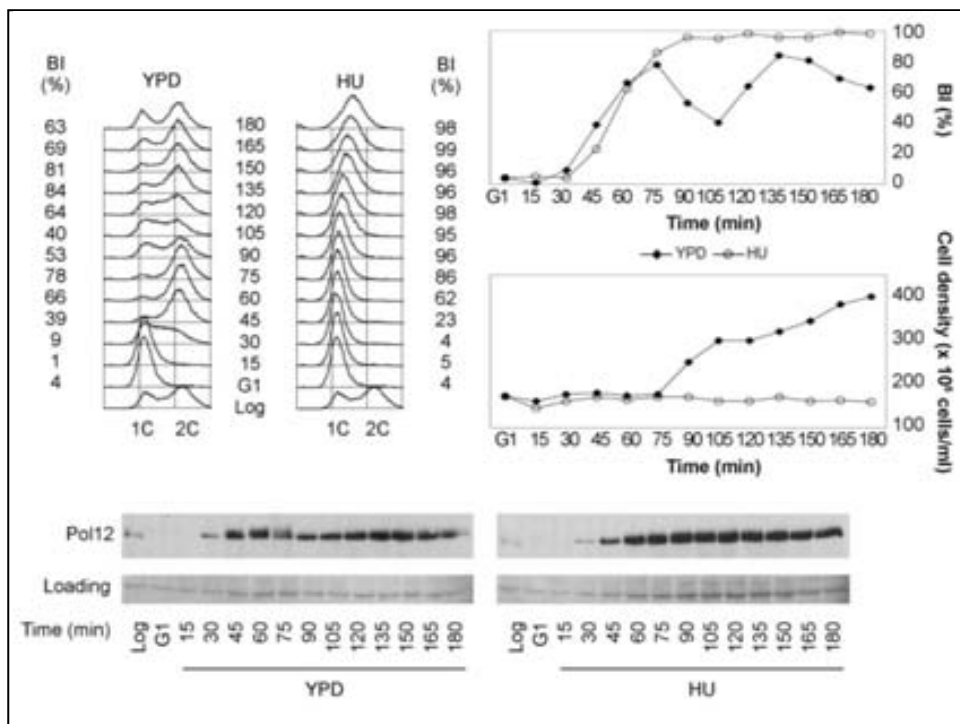


Figura 20. Els nivells de Swe1 romanen estables en una soca *chk1Δ*. Un cultiu de la soca YGP129 (*chk1Δ SWE1-13myc*) va ser sincronitzat a G1 pre-Start a 30°C i alliberat sincrònicament a una fase S en presència (200 mM HU) o absència (YPD) d'estrès replicatiu. La citometria de flux, els índex de gemmació (BI) i densitats cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament tal i com mostra la citometria de flux, la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI). Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, es van analitzar per immunoblot anti-myc (Swe1). Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

Malgrat que l'estabilització dels nivells de Swe1 en presència d'estrès replicatiu és dependent de Mec1, la deleció de Chk1 o Rad53 no es suficient per observar degradació de Swe1 en presència d'hidroxiurea. A la vista d'aquests resultats, l'estabilització de Swe1 podria ser directa, a través de Mec1, o indirecta, a través d'ambdues quinases efectores del *checkpoint*. Per tal d'explorar aquesta última opció, es van analitzar els nivells de Swe1 en la soca doble nul·la *rad53Δ chk1Δ*. Per això, es varen sincronitzar cèl·lules *rad53Δ chk1Δ* a G1 pre-Start i es varen alliberar en presència d'estrès replicatiu (Materials i Mètodes 5.4). A continuació es

recolliren alíquotes cada quinze minuts durant 180 minuts. Aquestes mostres es van analitzar mitjançant electroforesi desnaturalitzant i immunoblot (Materials i Mètodes 6.1, 6.2, 6.4). La progressió del cicle cel·lular es va monitoritzar a partir de la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI) (Materials i Mètodes 5.1).

En absència de les dues quinases efectores del *checkpoint de fase S*, Rad53 i Chk1, els nivells de Swe1 no s'estabilitzen en presència d'estrès replicatiu (Figura 21), en comparació amb el que succeeix en una soca salvatge en les mateixes condicions (Resultats 1.1, Figura 17). Per tant, en absència de Rad53, Mec1 sembla operar a través de Chk1 en l'estabilització de Swe1 en resposta a estrès replicatiu.

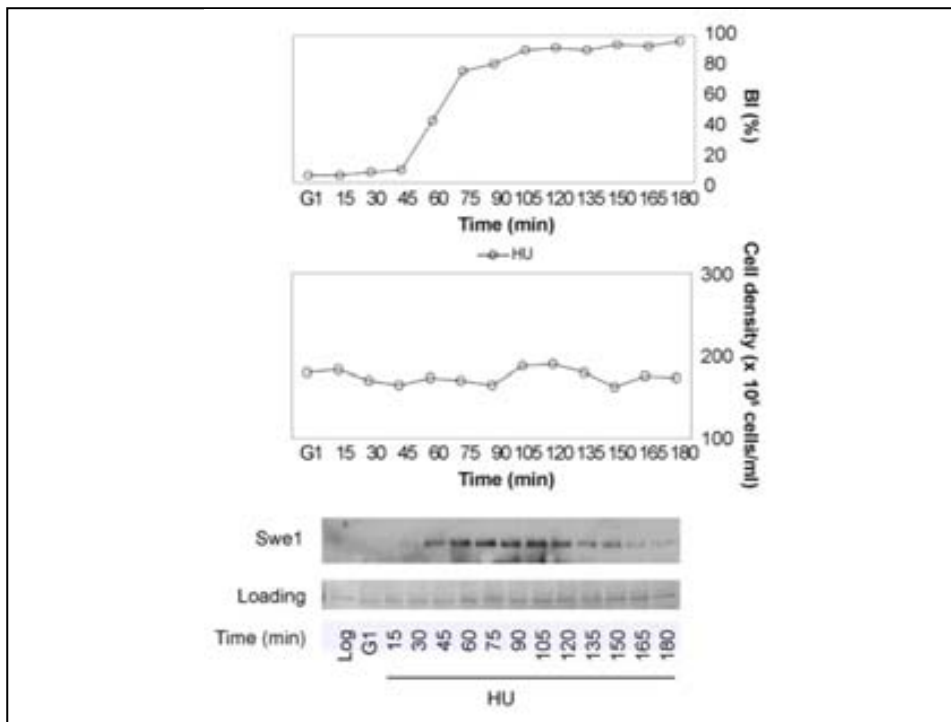


Figura 21. Els nivells de Swe1 no s'estabilitzen en absència de les dues quinases efectores del *checkpoint* de fase S en resposta a estrès replicatiu. Un cultiu de la soca YGP131 (*rad53-21 chk1Δ SWE1-13myc*) va ser sincronitzat a G1 pre-Start a 30°C i alliberat sincrònicament a una fase S en presència d'estrès replicatiu (200 mM HU). Els índex de gemmació (BI) i densitats cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament tal i com mostra la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI). Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, es van analitzar per immunoblot anti-myc (Swe1). Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

1.2.2 Mec1 intervé directament en l'estabilització dels nivells de Swe1 en resposta a estrès replicatiu

En paral·lel a l'estudi de l'estabilització dels nivells de Swe1 per Rad53 i Chk1, vàrem estudiar si Mec1 que està per sobre d'elles, participava directament en l'estabilització dels nivells de Swe1. Swe1 presenta un possible lloc consens de fosforilació per Mec1, una fosfoinositol-3-quinasa que fosforila els motius SQ (serina-glutamina) o TQ (treonina-glutamina), la Serina 385. La mutació d'aquest residu per alanina genera

l'al·lel no fosforilable de Swe1 per Mec1 que anomenem Swe1-AQ. A continuació es va analitzar l'estabilitat d'aquest al·lel no fosforilable en un cicle normal i en una fase S pertorbada.

L'al·lel Swe1-AQ és funcional, com demostra la fosforilació de la tirosina 19 de Cdk1 (Figura 37). La quinasa Swe1 és l'única capaç de fosforilar aquest residu (Fanli Zeng 2014, Tesi Doctoral).

Cèl·lules que contenen únicament la forma no fosforilable de Swe1 es van sincronitzar en G1 pre-Start i es varen alliberar en presència o absència d'estrès replicatiu (Materials i Mètodes 5.4). Es van recollir alíquotes cada quinze minuts durant 180 minuts i aquestes es van analitzar mitjançant immunoblot contra Swe1 (Materials i Mètodes 6.1, 6.2, 6.4). La progressió del cicle cel·lular es va monitoritzar a partir de la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI) (Materials i Mètodes 5.1).

Com s'observa en la Figura 22, els nivells de l'al·lel Swe1-AQ decauen malgrat la presència d'estrès replicatiu, a diferència del que succeeix amb Swe1 silvestre (Figura 17). Els nivells de la proteïna decauen a partir dels 120 minuts d'alliberar les cèl·lules de G1, de manera sembla al que succeeix amb el mutant nul *mec1Δ* (Figura 18). Aquest resultat és compatible amb l'estabilització dels nivells de Swe1 en resposta a estrès replicatiu per acció directa de Mec1.

Resultats

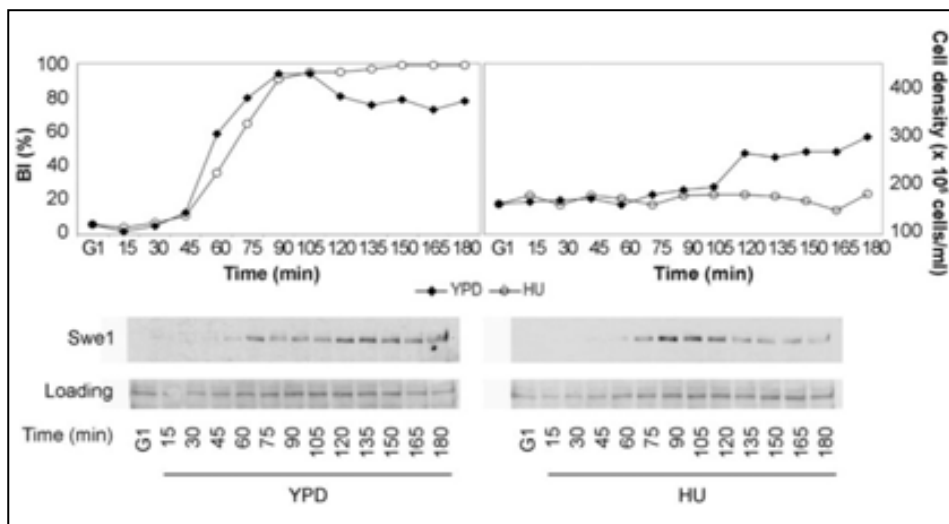


Figura 22. Mec1 intervé directament en l'estabilització dels nivells de Swe1 en resposta a estrès replicatiu. Un cultiu de la soca YRP99 (*swe1 Δ SWE1-AQ-13myc*) va ser sincronitzat a G1 pre-Start a 30°C i alliberat sincrònicament a una fase S en presència (200 mM HU) o absència (YPD) d'estrès replicatiu. Els índexs de gemmació (BI) i densitats cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament tal i com mostra la citometria de flux, la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI). Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, es van analitzar per immunoblot anti-myc (Swe1). Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

1.3 El *checkpoint de fase S* estabilitza els nivells de Swe1 en resposta a dany al DNA

Per tal d'explorar si l'estabilització de Swe1 de manera dependent del *checkpoint* de fase S és generalitzable a altres tipus d'estrès genotòxic, es va analitzar el comportament dels nivells de Swe1 en resposta a dany al DNA generat per metilació amb metanosulfonat de metil (MMS).

Amb aquest objectiu es varen sincronitzar cultius en creixement exponencials de cèl·lules salvatges, cèl·lules nul·les per Chk1 (*chk1Δ*), Rad53 (*rad53Δ*) i Mec1 (*mec1Δ*) en G1 pre-Start i es van alliberar de forma sincrònica en presència de dany al DNA generat per MMS (Materials i Mètodes 2.2 i 5.4). A continuació es recolliren alíquotes cada 30 minuts durant 180 minuts. Aquestes mostres es van analitzar mitjançant electroforesi desnaturalitzant i immunoblot (Materials i Mètodes 6.1, 6.2, 6.4). La progressió del cicle cel·lular es va monitoritzar a partir de la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI) (Materials i Mètodes 5.1).

Tal i com es pot observar en la Figura 23, els resultats són equivalents als obtinguts en presència d'estrès replicatiu. Una soca salvatge en presència de dany al DNA presenta nivells estables de Swe1 al llarg de l'experiment, suggerint que l'estabilització de Swe1 és una resposta comuna a la presència d'estrès genotòxic.

Versement a l'estrès replicatiu, la deleció de les quinases efectores, Rad53 o Chk1, no alteren l'estabilització dels nivells de Swe1 en resposta a dany al DNA. En canvi, els nivells de Swe1 decauen en cèl·lules *mec1Δ*, malgrat la presència de dany al DNA. Aquests resultats indiquen que els nivells de Swe1 són estabilitzats pel *checkpoint de fase S*, també en presència de dany al DNA i, per tant, es tracta d'una resposta general a l'estrès genotòxic.

Resultats

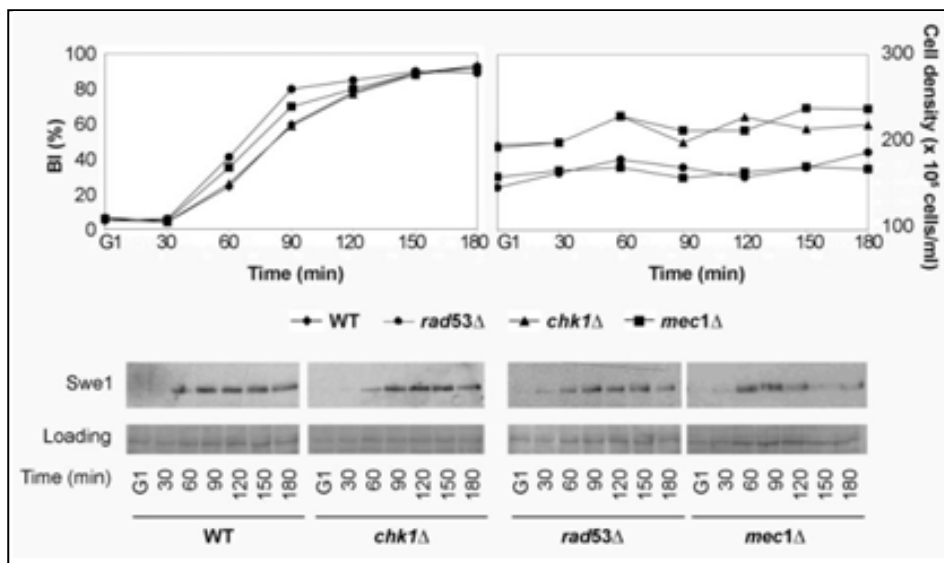


Figura 23. El checkpoint de fase S estabiliza els nivells de Swe1 en resposta a dany al DNA. Cultius de les soques YGP115 (*SWE1*-13myc), YGP129 (*chk1Δ SWE1*-13myc), YGP117 (*rad53Δ SWE1*-13myc) i YRP16 (*mec1Δ SWE1*-13myc) van ser sincronitzats a G1 pre-Start a 30°C i alliberats sincrònicament a fase S en presència de dany al DNA (0,033% MMS). Els índexs de gemmació (BI) i densitats cel·lulars es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament tal i com mostra la citometria de flux, la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI). Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, es van analitzar per immunoblot anti-myc (Swe1). Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

2 El *checkpoint* de fase S inhibeix l'activitat Cdk1 mitòtica es resposta a estrès genotòxic

L'activitat CDK mitòtica està formada per les ciclins mitòtiques Clb1 i Clb2 associades a Cdk1 (Introducció 1.2.2). En presència d'estrès genotòxic les cèl·lules inhibeixen la progressió del cicle cel·lular fins que l'estrès s'ha superat (Introducció 3). La implicació de la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica per fosforilació de la tirosina 19 per la quinasa Swe1 ha estat descartada al llevat de gemmació *Saccharomyces cerevisiae* (Introducció 1.2.3.1.). Tanmateix, hem mostrat que en resposta a estrès genotòxic els nivells de Swe1 són estabilitzats pel *checkpoint* de fase S. Per aquest motiu, varem decidir revisar si l'activitat Cdk1 de fase M està, de fet, regulada en resposta a estrès genotòxic.

2.1 Cerca de marcadors de l'activitat Cdk1 mitòtica *in vivo*

Per tal de poder estudiar *in vivo* la regulació de l'activitat Cdk1 mitòtica en una fase S compromesa calen marcadors fefaents que permetin la seva correcta monitorització. Un bon marcador ha de ser fosforilat únicament per l'activitat Cdk1 de fase M i no per Cdk1 associada a les ciclins de fase S o G2 o per altres quinases que puguin respondre a estrès genotòxic: la seva fosforilació ha de ser, dependent de l'activitat Cdk1 mitòtica, si bé no és imprescindible que en sigui substrat directe.

2.1.1 Validació de Pol12 com a marcador de l'activitat Cdk1 mitòtica *in vivo*

Pol12, la subunitat B de la DNA polimerasa α primasa, ha estat proposada com a substrat de l'activitat Cdk1 mitòtica sobre la base del moment aproximat en el cicle cel·lular en que és fosforilada (Foiani et al. 1995). Per tal de determinar si Pol12 és un substrat específic Cdk1 de fase M, varem analitzar la fosforilació de Pol12 en una soca *clb1 Δ clb2ts*. En aquesta soca l'única ciclina mitòtica present és un al·lel termosensible de Clb2, funcional a temperatura permissiva (24°C) però no a temperatura restrictiva (38°C), en que les cèl·lules són incapaces d'entrar a anafase (Amon et al. 1993; Rahal & Amon 2008).

Resultats

Un cultiu exponencial de *clb1Δ clb2ts* creixent a 24°C es va sincronitzar en G1 pre-Start. Un cop sincronitzat, el cultiu es va dividir en dos. Un es va mantenir a temperatura permissiva i l'altre es va transferir a temperatura restrictiva (les cèl·lules es van transferir a 38°C i van ser incubades 30 minuts abans de ser alliberades, per tal de permetre la superació del xoc de calor). A continuació, les cèl·lules es varen alliberar sincrònicament a fase S a la temperatura corresponent, prenent mostres cada 30 minuts durant dues hores. Aquestes mostres es van analitzar mitjançant electroforesi desnaturalitzant i immunoblot anti-Pol12 (Materials i Mètodes 6.1, 6.2, 6.4). La progressió del cicle cel·lular es va monitoritzar a partir de la densitat cel·lular, l'índex de gemmació (BI) i el contingut de DNA mesurat mitjançant citometria de flux (Materials i Mètodes 5.1, 5.6).

En la Figura 24 s'observa que pel que fa referència a Pol12, la seva fosforilació a temperatura permissiva (24°C) té lloc 90 minuts després d'alliberar les cèl·lules, un cop el DNA s'ha replicat i abans de la divisió cel·lular. En canvi, a temperatura restrictiva (38°C), Pol12 no es fosforila en el temps que dura l'experiment, malgrat la presència de les ciclines de fase S, Clb5 i Clb6, i les de G2, Clb3 i Clb4. Aquest resultat confirma la fosforilació de Pol12 com un marcador específic de l'activitat Cdk1 mitòtica *in vivo*. Al llarg d'aquests treballs s'usarà Pol12 com a marcador de l'activitat Cdk1 de fase M *in vivo* en l'estudi de la regulació d'aquesta activitat en presència d'estrès genotòxic.

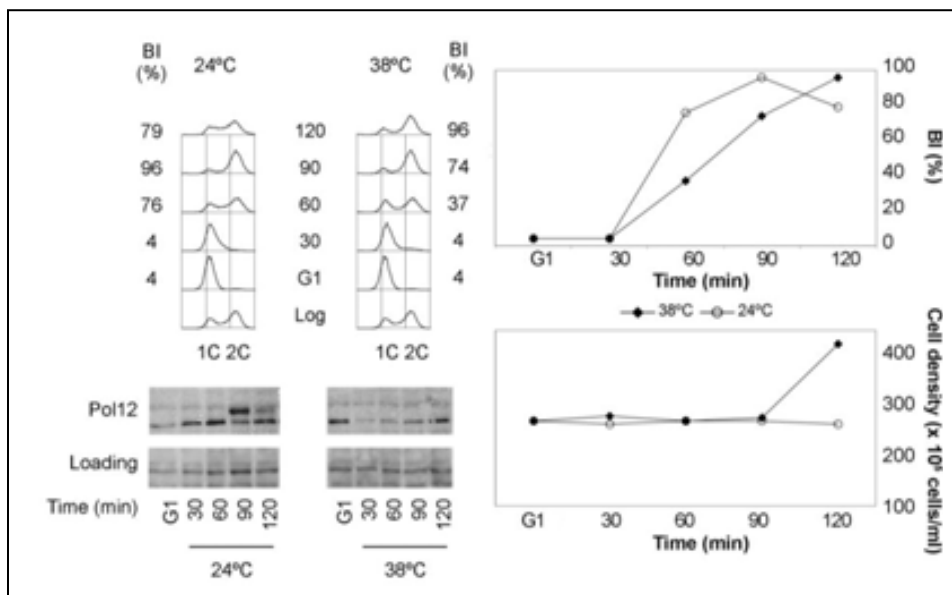


Figura 24. Validació de Pol12 com a substrat de l'activitat Cdk1 mitòtica *in vivo*. Un cultiu de la soca Y3000 (*clb1Δ clb2ts*) va ser sincronitzat a G1 pre-Start a 24°C i alliberat sincrònicament a una fase S no pertorbada a 24°C o 38°C. La citometria de flux, els índex de gemmació (BI) i densitats cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament. A temperatura permissiva les cèl·lules progressen en el cicle correctament, repliquen el DNA i es divideixen, mentre que a temperatura restrictiva les cèl·lules queden aturades amb un contingut replicat de DNA, com mostren el FACS, l'índex de gemmació (BI) i la densitat cel·lular del cultiu. Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, es van analitzar per immunoblot anti-Pol12. Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

2.1.2 Anàlisi d'altres marcadors de l'activitat Cdk1 mitòtica *in vivo*

Tot i haver confirmat la fosforilació de la polimerasa Pol12 com un marcador de l'activitat Cdk1 de fase M, es varen buscar altres marcadors complementaris, d'utilitat per descartar que un resultat determinat pugui ser fruit de la regulació específica de Pol12 i no l'activitat Cdk1 mitòtica.

Es varen analitzar diferents proteïnes que en la bibliografia s'havien postulat com a substrats de Cdk1 de fase M: Cdc27, Mms4, Mob1, Net1 i Smc4. Cdc27 es va descartar en un primer assaig ja que no es va poder

Resultats

resoldre de forma adequada en un gel SDS-PAGE. Smc4 i Net1 es van descartar ja que eren fosforilats per altres quinases que responen a estrès genotòxic. Mob1 i Mms4 es varen explorar com a marcadors d'activitat Cdk1 mitòtica ja que la fosforilació era clarament detectable en un gel SDS-PAGE i es produïa en un temps efectivament coincident amb la transició G2/M.

2.1.2.1 Mob1 com a marcador de l'activitat Cdk1 mitòtica in vivo

Mob1 ha estat descrita com a substrat de Cdk1 de fase M ja que aquesta fosforila Mob1 *in vitro* i la seva fosforilació té lloc concomitantment a l'aparició de la ciclina Clb2 (König et al. 2010; Holt et al. 2007). Per tal d'analitzar si Mob1 és un substrat específic de Cdk1 mitòtica vàrem analitzar la seva fosforilació en una soca *clb1Δ clb2ts*, de manera idèntica a la descrita a l'apartat 2.1.1 de Resultats (a dalt).

Com s'observa en la Figura 25, la fosforilació de Mob1 a temperatura permissiva té lloc 90 minuts després d'alliberar les cèl·lules de G1, seguint el mateix comportament que Pol12. A temperatura restrictiva, en absència d'activitat Cdk1 mitòtica, Mob1 es continua fosforilant tot i que amb un cert retràs (minut 120 enlloc del 90), mentre que Pol12 no es fosforila. A la vista d'aquest resultat, no podem distingir si Mob1 és fosforilat per altre quinases durant la mitosis, o si l'activitat Cdk1 mitòtica residual és suficient per fosforilar Mob1 però no Pol12. En qualsevol cas, no és un marcador útil de l'activitat Cdk1 de fase M per al present estudi.

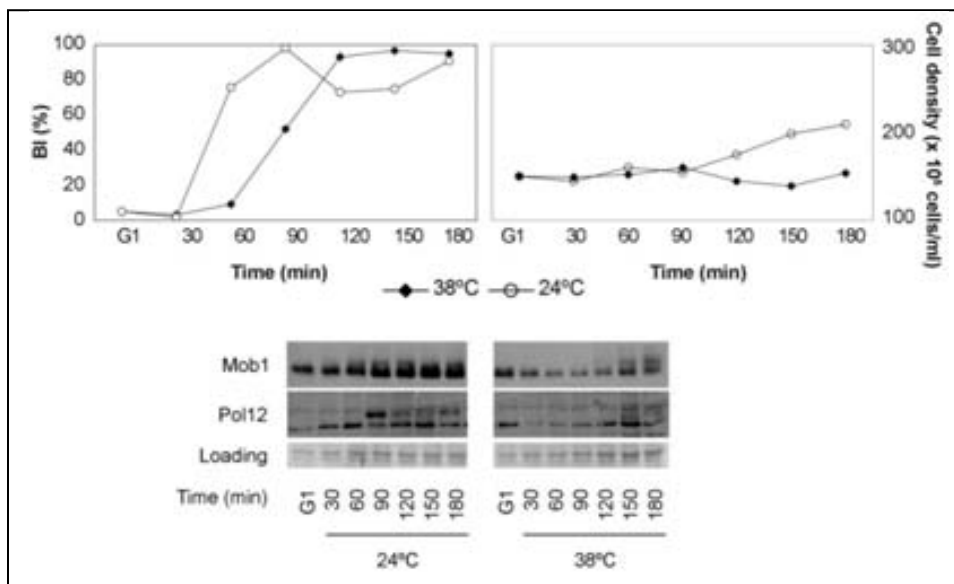


Figura 25. Mob1 no és útil com a marcador de l'activitat Cdk1 mitòtica *in vivo*. Un cultiu de la soca YRP38 (*clb1Δ clb2ts MOB1-3HA*) va ser sincronitzat a G1 pre-Start a 24°C i alliberat sincrònicament a una fase S no perturbada a 24°C o 38°C. Els índex de gemmació (BI) i densitats cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, es van analitzar per immunoblot anti-Pol12 i anti-HA (Mob1). Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

2.1.2.2 *Mms4* com a marcador d'activitat CDK mitòtica *in vivo*

Mms4 és fosforilada per Cdk1 (Gallo-Fernández et al. 2012). D'acord amb el moment en que *Mms4* és fosforilada existeix la possibilitat que sigui substrat de Cdk1 mitòtica. Per tal d'analitzar si *Mms4* és un substrat específic de Cdk1 mitòtica vàrem analitzar la seva fosforilació en una soca *clb1Δ clb2ts*, de manera idèntica a la descrita a l'apartat 2.1.1 de Resultats (a dalt).

Com es mostra en la Figura 26, a temperatura permissiva *Mms4* es fosforila 90 minuts després d'alliberar les cèl·lules a fase S, seguint el mateix patró que Pol12 i Mob1 a les mateixes condicions (Figura 25). A temperatura restrictiva però, *Mms4* es fosforila, fins i tot avançant-se 30 minuts respecte la temperatura permissiva, de manera que, no és marcador d'utilitat de l'activitat Cdk1 mitòtica *in vivo* per aquest estudi.

Resultats

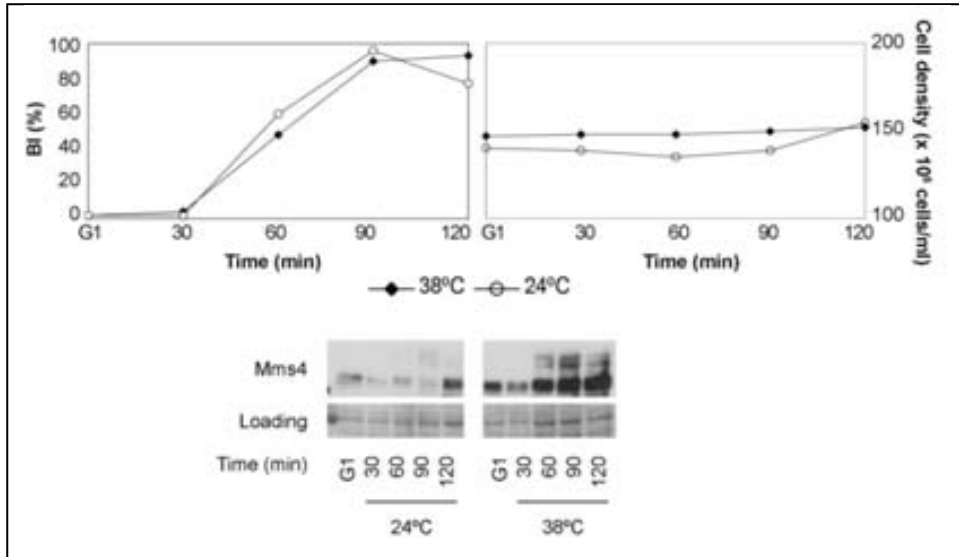


Figura 26. Mms4 no és útil com a marcador de l'activitat Cdk1 mitòtica *in vivo*. Un cultiu de la soca YRP143 (*clb1 Δ clb2ts MMS4-3HA*) va ser sincronitzat a G1 pre-Start a 24°C i alliberat sincrònicament a una fase S no pertorbada a 24°C o 38°C. Els índex de gemmació (BI) i densitats cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, es van analitzar per immunoblot i anti-HA (Mms4). Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

2.2 L'activitat Cdk1 mitòtica és inhibida en presència d'estrès replicatiu

En resposta a estrès genotòxic les cèl·lules impedeixen la mitosi (Weinert 1992). Hem mostrat que els nivells de Swe1 són estabilitzats en resposta a estressos genotòxics (Resultats 1). A més, Swe1 intervé en la inhibició de l'activitat mitòtica en resposta a estrès del citoesquel·let (Lew & Reed 1995; Keaton et al. 2007) i en resposta a estrès osmòtic (Clotet et al. 2006).

Pel tal de determinar si l'activitat CDK mitòtica està regulada en presència d'estrès replicatiu vàrem analitzar la fosforilació de Pol12 en una soca salvatge.

Un cultiu salvatge en creixement exponencial a 30°C es va sincronitzar a G1 pre-Start i després es va alliberar de manera sincrònica a fase S no pertorbada o en presència de 200 mM HU (Materials i Mètodes 2.1 i 5.4).

A continuació es recullen alíquotes cada 10 minuts durant 120 minuts. Aquestes mostres es van analitzar mitjançant electroforesi desnaturalitzant i immunoblot (Materials i Mètodes 6.1, 6.2, 6.4). La progressió del cicle cel·lular es va monitoritzar a partir de la densitat cel·lular, l'índex de gemmació (BI) i el contingut de DNA mesurat mitjançant citometria de flux (Materials i Mètodes 5.1, 5.6).

Pel que fa referència a Pol12, en una fase S no pertorbada (Figura 27, YPD) la fosforilació apareix al final de fase S, 60 minuts després d'alliberar les cèl·lules de G1 pre-Start. La fosforilació desapareix al minut 90, correlacionant amb el final de mitosi d'acord a l'aparició de cèl·lules amb un contingut de DNA, el increment de la densitat cel·lular i la disminució de l'índex de gemmació (BI).

En presència d'estrès replicatiu (Figura 27, HU), Pol12 no es fosforila en cap moment, observació compatible amb la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica en aquestes condicions.

Resultats

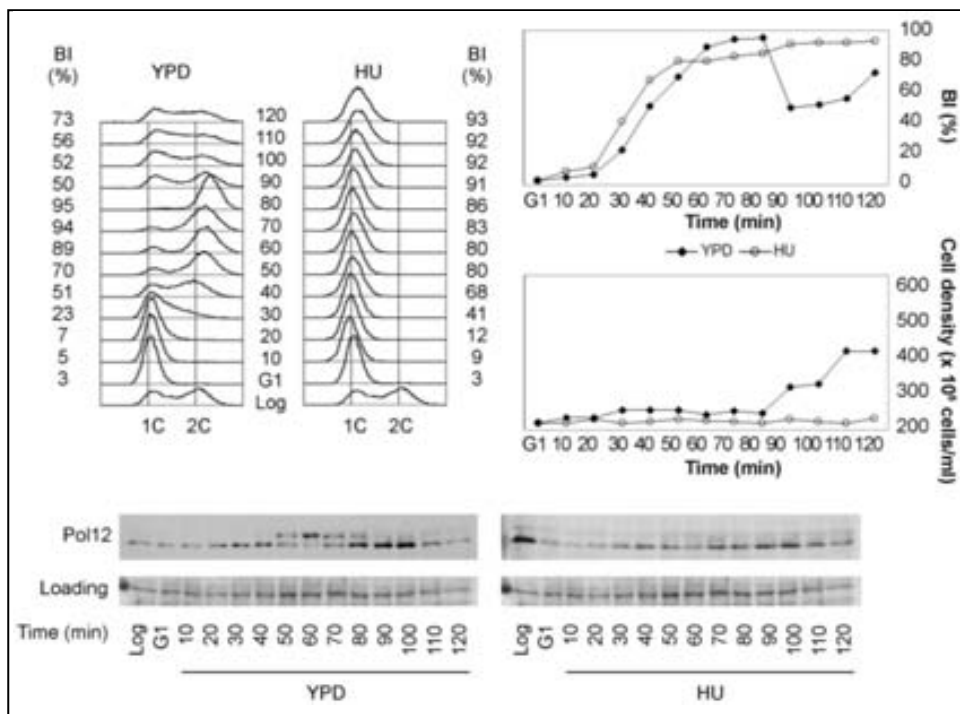


Figura 27. L'activitat Cdk1 mitòtica és inhibida en presència d'estrès replicatiu. Un cultiu de la soca YGP20 (salvatge) va ser sincronitzat a G1 pre-Start a 30°C i alliberat sincrònicament a una fase S no pertorbada (YPD) i a una fase S en presència d'estrès replicatiu (200 mM HU). La citometria de flux, els índexs de gemmació (BI) i densitats cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament tal i com mostra la citometria de flux, la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI). Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, es van analitzar per immunoblot anti-Pol12. Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

2.2.1 La ciclina mitòtica Clb2 s'expressa en presència d'estrès replicatiu.

Vàrem estudiar la possibilitat que l'activitat Cdk1 mitòtica es responda a estrès genotòxic fos inhibida redundàntment per regulació de l'expressió de la subunitat ciclina CLB2 com és el cas en resposta a pertorbacions del citoesquel·let (Lew & Reed 1995) o estrès osmòtic (Clotet et al. 2006). De fet, quan aquest treball de tesi ja estava conclòs, s'ha publicat que, en presència d'estrès genotòxic, Rad53 inhibeix l'expressió dels gens sota control del factor de transcripció SFF, entre els quals hi ha CLB2, que no

es mostra (Yelamanchi et al. 2014; Edenberg et al. 2014). Per explorar aquesta possibilitat es va analitzar el comportament de CLB2 i d'altres gens sota SFF en resposta a estrès genotòxic.

Cultius de la soca salvatge en creixement exponencial a 30°C es sincronitzen a G1 pre-Start amb la feromona α -factor i després s'alliberen sincrònicament a una fase S no pertorbada o presència de 200 mM HU (Materials i Mètodes 2.1 i 5.4). A continuació és recullen alíquotes cada deu minuts durant aproximadament un temps de duplicació. Aquestes mostres varen ser analitzades mitjançant electroforesi desnaturalitzant i immunoblots (Materials i Mètodes 6.1, 6.2, 6.4). La progressió del cycle cel·lular va ser analitzada per la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (Materials i Mètodes 5.1).

En la Figura 28 s'analitzen mitjançant immunoblot els nivells de les proteïnes Clb2, Cdc5 i Swi5, els gens de les quals són expressats pel factor de transcripció SFF (Spellman et al. 1998). Es pot observar que en un cycle no pertorbat les tres proteïnes apareixen a mitja fase S i són degradades al final de mitosi, d'acord amb la disminució de l'índex de gemmació (BI). En canvi, en una fase S compromesa per estrès replicatiu, Clb2 i Cdc5 apareixen a mitja fase S en els mateixos nivells que en una fase S no pertorbada i no són degradades en el temps que dura l'experiment. L'aparició de la ciclina mitòtica en presència d'estrès replicatiu, a nivells equivalents a un cycle no pertorbat, descarta que el *checkpoint de fase S* controli l'activitat Cdk1 mitòtica impedit l'expressió d'aquesta ciclina.

En les mateixes condicions, Swi5 presenta nivells molt menors que en absència d'estrès (YPD), tal i com caldria esperar per la inhibició de SFF descrita recentment (Yelamanchi et al. 2014; Edenberg et al. 2014). Tanmateix els nostres resultats indiquen que aquesta inhibició no es generalitzable a tot els gens regulats per SFF, qüestió a la que no fan esment els citats treballs.

Resultats

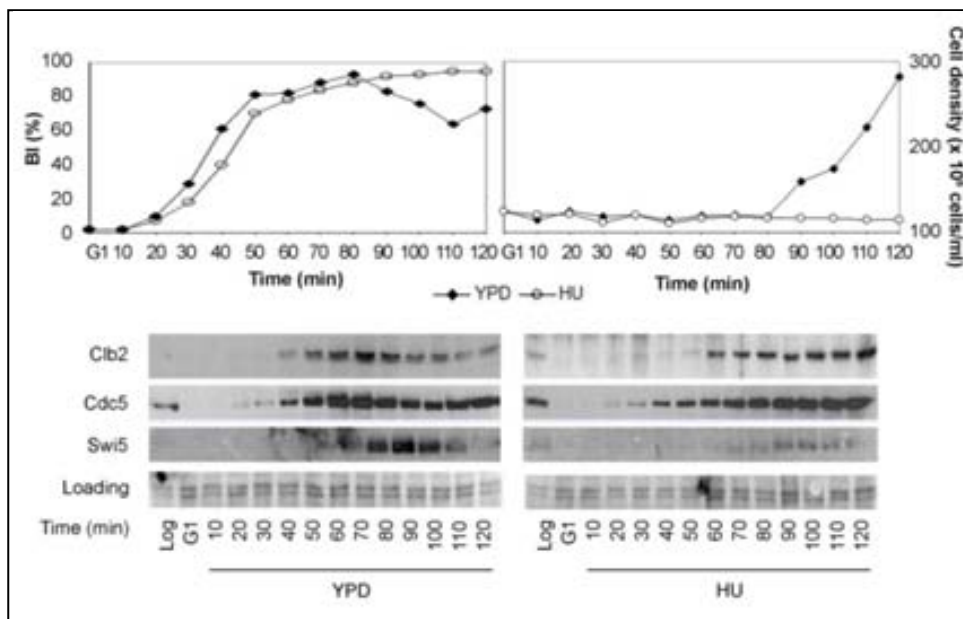


Figura 28. La ciclina mitòtica Clb2 s'expressa en presència d'estrès replicatiu. Cultius de les soques YGP20 (WT), YRP22 (*CDC5-13myc*) i YRP24 (*SWI5-3HA*) van ser sincronitzats a G1 pre-Start a 30°C i alliberats sincrònicament a fase S no pertorbada (YPD) i a una fase S compromesa en presència d'estrès replicatiu (200 mM HU). Els índexs de gemmació (BI) i densitats cel·lulars es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament tal i com mostra la citometria de flux, la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI). Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, es van analitzar per immunoblot anti-Clb2, anti-myc (*Cdc5*) i anti-HA (*Swi5*). Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

2.3 Swe1 és dispensable en la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès replicatiu

En llevat de fissió Wee1 inhibeix l'activitat Cdk1 de fase M a través de la fosforilació de la tirosina 15 de Cdk1 (Introducció 1.2.3.1). Per explorar la possible implicació de Swe1 en la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès replicatiu vàrem analitzar la fosforilació de Pol12 en mutants nuls de *swe1Δ*.

Un cultiu de la soca *swe1Δ* en creixement exponencial a 30°C es va sincronitzar a G1 pre-Start i després es va alliberar de manera sincrònica a fase S no pertorbada o en presència de 200 mM HU (Materials i Mètodes 2.1 i 5.4). A continuació es recullen alíquotes cada 10 minuts durant 120 minuts. Aquestes mostres es van analitzar mitjançant electroforesi desnaturalitzant i immunoblot (Materials i Mètodes 6.1, 6.2, 6.4). La progressió del cicle cel·lular es va monitoritzar a partir de la densitat cel·lular, l'índex de gemmació (BI) i el contingut de DNA mesurat mitjançant citometria de flux (Materials i Mètodes 5.1, 5.6).

Pel que fa referència a Pol12, en una fase S no pertorbada (Figura 29, YPD), el patró de fosforilació a la soca mutant és el mateix que en una soca salvatge.

En presència d'estrès replicatiu (Figura 29, HU) Pol12 no és fosforilada, tal i com succeeix en la soca salvatge (Figura 27, HU), compatible amb la inhibició de l'activitat Cdk1, malgrat la deleció de Swe1. Per sí sol, aquest resultat pot tenir múltiples interpretacions, i requereix d'experiments addicionals per distingir quin és el cas. Per una banda Swe1 pot efectivament ser irrellevant en la inhibició de Cdk1 mitòtica al llevat de gemmació. Alternativament pot existir una via redundat a la de Swe1 en la inhibició de l'activitat Cdk1 de fase M a *S. cerevisiae*. Finalment no és descartable tampoc que el *checkpoint de fase S* actuï sobre Pol12, implicant la seva fosforilació per l'activitat Cdk1 mitòtica (com és el cas de la fosforilació d'Sld3 per Rad53, que aboleix la seva fosforilació per Cdk1 de fase S (Zegerman & Diffley 2007))

Resultats

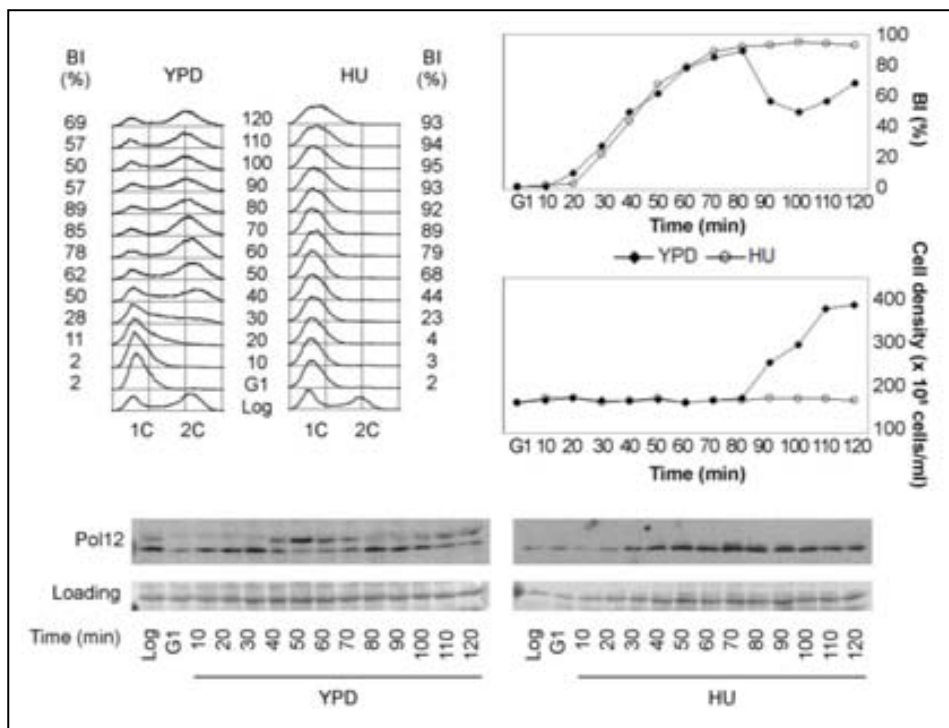


Figura 29. Swe1 és dispensable en la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica es resposta a estrès replicatiu. Un cultiu de la soca YGP98 (*swe1* Δ) va ser sincronitzat a G1 pre-Start a 30°C i alliberat sincrònicament a una fase S no pertorbada (YPD) i a una fase S en presència d'estrès replicatiu (200 mM HU). La citometria de flux, els índex de gemmació (BI) i densitats cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament tal i com mostra la citometria de flux, la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI). Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, es van analitzar per immunoblot anti-Pol12. Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

2.4 La inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès replicatiu és dependent de Mec1

Swe1 és dispensable per a la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès replicatiu, monitoritzada a través de Pol12 (Resultats 2.3.). Aquestes condicions activen el *checkpoint de fase S*. Per tal d'explorar si la inhibició de l'activitat Cdk1 de fase M està mediada pel *checkpoint de fase S*, es va analitzar la fosforilació de Pol12 en mutants del delecí per la quinasa transductora central i la seva efectora principal Rad53.

2.4.1 Rad53 és dispensable en la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès replicatiu

Un cultiu de la soca *rad53Δ* en creixement exponencial a 30°C es va sincronitzar a G1 pre-Start i després es va alliberar de manera sincrònica a fase S no pertorbada o en presència de 200 mM HU (Materials i Mètodes 2.1 i 5.4). A continuació es recullen alíquotes cada 10 minuts durant 120 minuts. Aquestes mostres es van analitzar mitjançant electroforesi desnaturalitzant i immunoblot (Materials i Mètodes 6.1, 6.2, 6.4). La progressió del cicle cel·lular es va monitoritzar a partir de la densitat cel·lular, l'índex de gemmació (BI) i el contingut de DNA mesurat mitjançant citometria de flux (Materials i Mètodes 5.1, 5.6).

En la Figura 30 s'observa que en una fase S no pertorbada (YPD), el patró de fosforilació de Pol12 és el mateix que en una soca salvatge (Figura 27, YPD) tot i la delecí de la quinasa del *checkpoint de fase S* Rad53. En presència d'estrès replicatiu (Figura 30, HU) l'activitat Cdk1 de fase M, monitoritzada a través de la fosforilació de Pol12, roman inhibida malgrat la delecí de Rad53. Aquest resultat indica que malgrat que Rad53 és la quinasa efectora principal del *checkpoint de fase S* (la seva delecí és tan letal que la resposta a estrès genotòxic com la quinasa efectora central Mec1, que actua per sobre (Introducció 3.1.)), és dispensable per a la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica en aquestes condicions.

Resultats

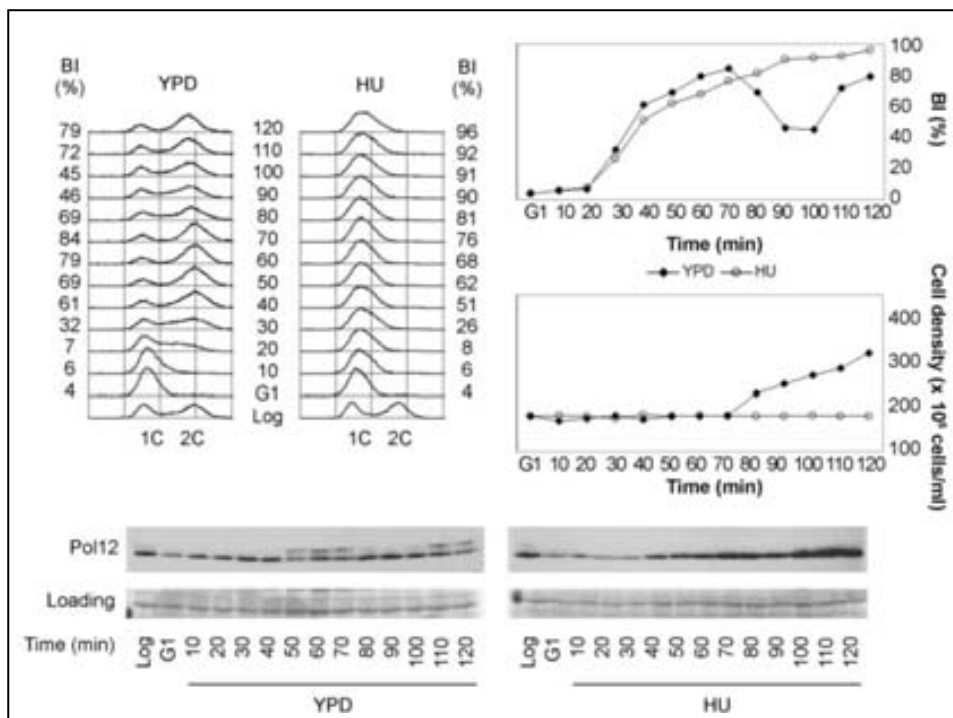


Figura 30. Rad53 és dispensable en la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès replicatiu. Un cultiu de la soca YGP24 (*rad53Δ*) va ser sincronitzat a G1 pre-Start a 30°C i alliberat sincrònicament a una fase S no pertorbada (YPD) i a una fase S en presència d'estrès replicatiu (200 mM HU). La citometria de flux, els índexs de gemmació (BI) i densitats cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament tal i com mostra la citometria de flux, la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI). Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, es van analitzar per immunoblot anti-Pol12. Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

2.4.2 La inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica és dependent de Mec1

Un cultiu de la soca *mec1* Δ en creixement exponencial a 30°C es va sincronitzar a G1 pre-Start i després es va alliberar de manera sincrònica a fase S no pertorbada o en presència de 200 mM HU (Materials i Mètodes 2.1 i 5.4). A continuació es recullen alíquotes cada 10 minuts durant 120 minuts. Aquestes mostres es van analitzar mitjançant electroforesi desnaturalitzant i immunoblot (Materials i Mètodes 6.1, 6.2, 6.4). La progressió del cicle cel·lular es va monitoritzar a partir de la densitat cel·lular, l'índex de gemmació (BI) i el contingut de DNA mesurat mitjançant citometria de flux (Materials i Mètodes 5.1, 5.6).

En la Figura 31 s'observa que, en una fase S no pertorbada (YPD), l'activitat Cdk1 mitòtica monitoritzada a través de la fosforilació de Pol12 és equivalent al d'una soca salvatge (Figura 27, YPD) tot i la deleció de la quinasa transductora central del *checkpoint de fase S* Mec1. En presència d'estrès replicatiu (Figura 31, HU), però, a diferència del que succeeix en una soca salvatge, on Pol12 roman no-fosforilat, s'observa fosforilació de Pol12, indicant que Mec1 pot ser necessària per a la inhibició de l'activitat Cdk1 de fase M.

Resultats

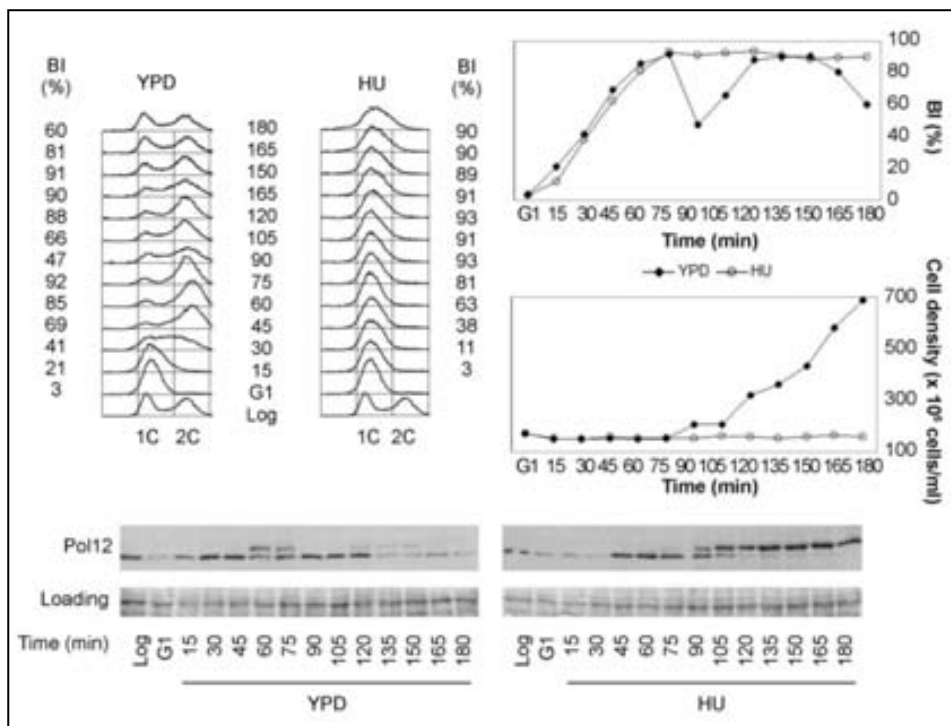


Figura 31. La inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica és dependent de Mec1. Un cultiu de la soca YGP123 (*mec1Δ*) va ser sincronitzat a G1 pre-Start a 30°C i alliberat sincrònicament a una fase S no pertorbada (YPD) i a una fase S en presència d'estrès replicatiu (200 mM HU). La citometria de flux, els índex de gemmació (BI) i densitats cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament tal i com mostra la citometria de flux, la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI). Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, van ser analitzats per immunoblot anti-Pol12 (Pol12). Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

2.5 Swe1 i Rad53 inhibeixen de manera redundent l'activitat Cdk1 mitòtica

Hem vist fins ara que Mec1 és necessària per inhibir l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès replicatiu (Resultats 2.4.2). Aquesta inhibició podria ser directa o indirecta. Donat que Mec1 és limitant a la cèl·lula i principalment localitzat a les forquilles de replicació (Osborn & Elledge 2003), és poc raonable que sigui la quinasa responsable de difondre el senyal a Cdk1 mitòtica. Rad53, sota Mec1, juga en general aquest paper (Sun et al. 1996). Per altre banda, hem mostrat que els nivells de Swe1 són estabilitzats en resposta a estrès genotòxic en forma Mec1 dependent (Resultat 1.2.). Swe1 certament participa en la inhibició de l'activitat Cdk1 de fase M en resposta a perturbacions del citoesquel·let (Lew & Reed 1995) i d'estrès osmòtic (Clotet et al. 2006). A la vista de totes aquestes consideracions vàrem explorar la possibilitat que les dues quinases actuïn en paral·lel sobre l'activitat Cdk1 mitòtica.

Un cultiu de la soca *rad53Δ swe1Δ* en creixement exponencial a 30°C es va sincronitzar a G1 pre-Start i després es va alliberar de manera sincrònica a fase S no perturbada o en presència de 200 mM HU (Materials i Mètodes 2.1 i 5.4). A continuació es recullen alíquotes cada 10 minuts durant 120 minuts. Aquestes mostres es van analitzar mitjançant electroforesi desnaturalitzant i immunoblot (Materials i Mètodes 6.1, 6.2, 6.4). La progressió del cicle cel·lular es va monitoritzar a partir de la densitat cel·lular, l'índex de gemmació (BI) i el contingut de DNA mesurat mitjançant citometria de flux (Materials i Mètodes 5.1, 5.6).

En la Figura 32 es mostra que en presència d'estrès replicatiu (HU) la soca *rad53Δ swe1Δ* és incapaç d'inhibir l'activitat Cdk1 mitòtica sobre Pol12, tal i com reflexa la fosforilació 60 minuts després d'alliberar les cèl·lules de G1. Aquest resultat dona suport a una regulació redundent de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès replicatiu, mediada per Rad53 i Swe1, i dependent del *checkpoint de fase S*.

Resultats

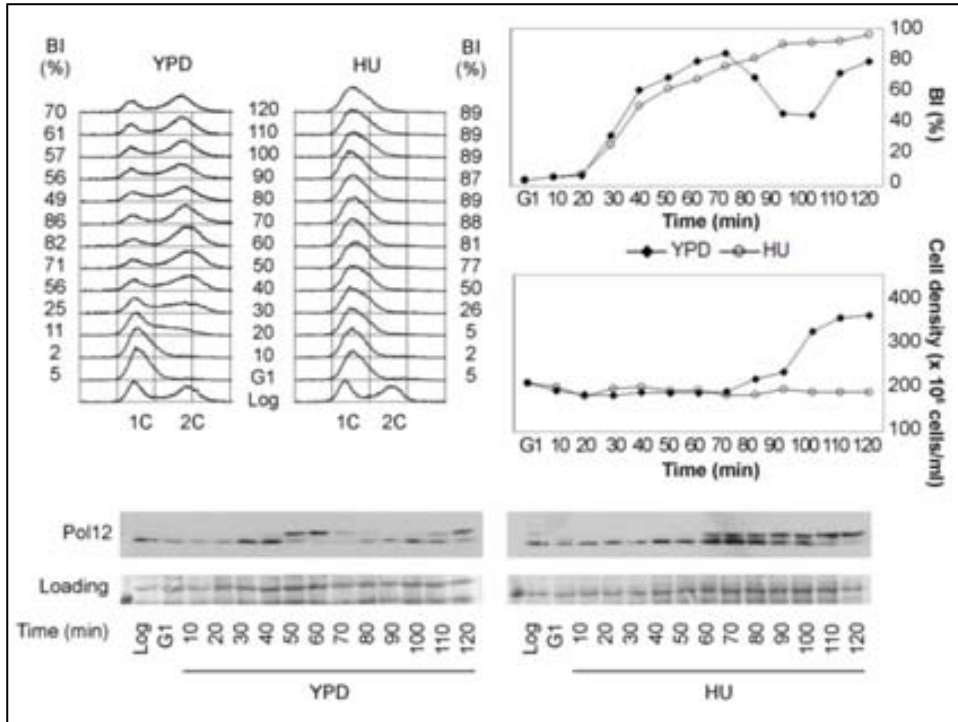


Figura 32. Swe1 i Rad53 inhibeixen de manera redundent l'activitat Cdk1 mitòtica. Un cultiu de la soca YRP11 (*rad53Δ swe1Δ*) va ser sincronitzat a G1 pre-Start a 30°C i alliberat sincrònicament a una fase S no pertorbada (YPD) i a una fase S en presència d'estrès replicatiu (200 mM HU). La citometria de flux, els índex de gemmació (BI) i densitats cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament tal i com mostra la citometria de flux, la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI). Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, es van analitzar per immunoblot anti-Pol12. Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

A més de la funció com a quinasa efectora del *checkpoint*, Rad53 és essencial en la regulació de l'activitat de Sml1, un inhibidor de l'activitat ribonucleòtid reductasa essencial en la síntesi de dNTPs (Zhao et al. 1998). Precisament pel seu rol regulant l'activitat de Sml1, la deleció de Rad53 és letal. Aquest fet comporta que la deleció de Rad53 o de Mec1 sempre hagin d'anar acompanyades de la deleció de Sml1 per tal que siguin viables (Zhao et al. 2000). Per tant, amb mutants *rad53Δ* no es pot distingir si els efectes observats són resultat de la deleció *sml1Δ*. Per aquest motiu vàrem analitzar la regulació de l'activitat Cdk1 mitòtica en

el mutant hipomòrfic *rad53-21*. Aquest mutant és deficient en la resposta a estrès genotòxic com les soques nul·les *rad53Δ*, però manté la capacitat de regular Sml1, fet que permet treballar en un fons SML1 (Allen et al. 1994b).

L'experiment descrit a dalt es va reproduir amb una soca *rad53-21 swe1Δ*. En la Figura 33 es pot observar que en la soca *rad53-21 swe1Δ*, Pol12 es fosforila en presència d'estrès replicatiu de manera comparable a l'observat amb la soca *rad53Δ swe1Δ*, descartant que la presència d'activitat Cdk1 de fase M en condicions d'estrès replicatiu depengui de la deleció de SML1.

Resultats

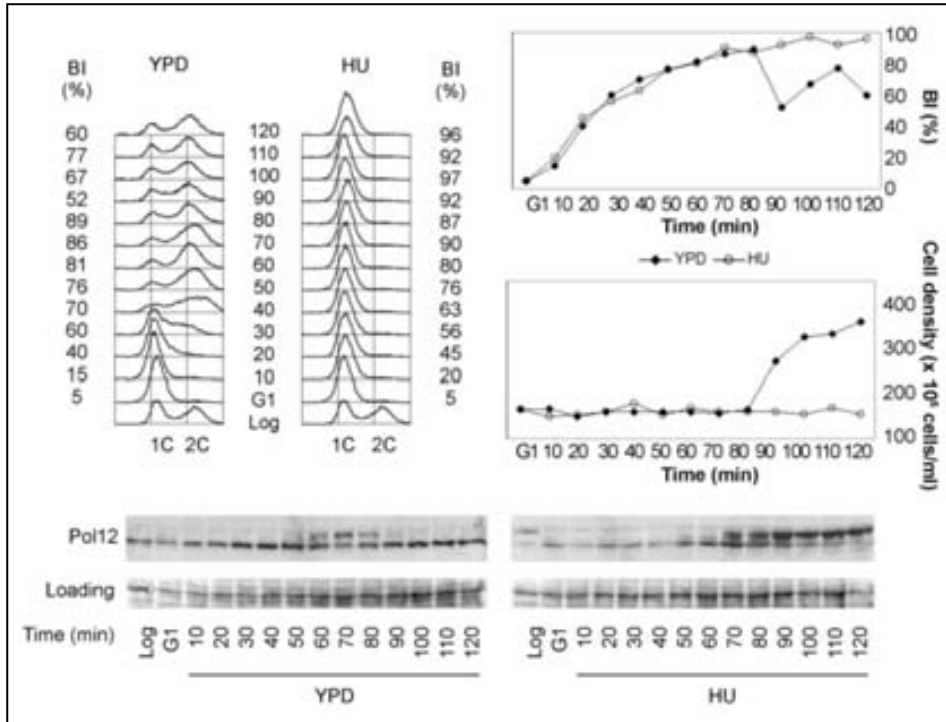


Figura 33. Swe1 i Rad53 inhibeixen de manera redundent l'activitat Cdk1 mitòtica. Mutant *rad53-21*. Un cultiu de la soca YGP121 (*rad53-21 swe1Δ*) va ser sincronitzat a G1 pre-Start a 30°C i alliberat sincrònicament a una fase S no pertorbada (YPD) i a una fase S en presència d'estrès replicatiu (200 mM HU). La citometria de flux, els índex de gemmació (BI) i densitats cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament tal i com mostra la citometria de flux, la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI). Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, van ser analitzats per immunoblot anti-Pol12. Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

Donat que tant Rad53 com Swe1 es troben sota control de Mec1 en presència d'estrès replicatiu, una predicció és que els mutants *rad53 swe1Δ* i *mec1Δ* haurien de ser equivalents pel que fa a la desregulació de l'activitat Cdk1 mitòtica en aquestes condicions. Tanmateix, en comparar l'activitat Cdk1 de fase M en aquestes dues soques s'observa que la fosforilació de Pol12 apareix 30 minuts més tard en el mutant *mec1Δ* (Figura 31 i 32). Una possible interpretació d'aquest resultat és que en aquesta soca Swe1 és expressat a G1 i pot participar fins a la seva

desaparició en la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica (Resultats 1.2). Per tal de confirmar aquesta hipòtesi vàrem generar un doble mutant *mec1Δ swe1Δ*.

L'experiment descrit a dalt es va reproduir amb una soca *mec1Δ swe1Δ*. La Figura 34 mostra que la deleció de Swe1 en un fons *mec1Δ* permet recuperar el temps de fosforilació de Pol12 observats en els dobles mutants *rad53 swe1Δ* (Figura 32 i 33).

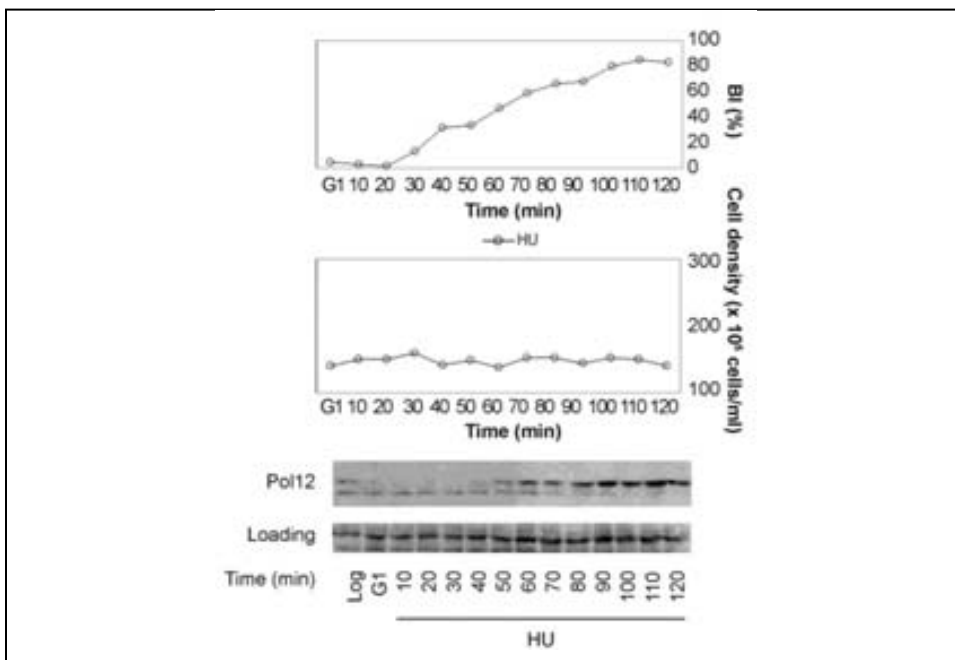


Figura 34. La deleció *swe1Δ* en un fons *mec1Δ* recupera els temps de fosforilació observats en els dobles mutants *rad53 swe1Δ*. Un cultiu de la soca YGP108 (*mec1Δ swe1Δ*) va ser sincronitzat a G1 pre-Start a 30°C i alliberat sincrònicament a una fase S en presència d'estrès replicatiu (200 mM HU). Els índex de gemmació (BI) i densitats cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament tal i com mostra la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI). Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, van ser analitzats per immunoblot anti-Pol12. Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

2.5.1 La deleció de les dues quinases efectores del *checkpoint de fase S* no és suficient per permetre l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès replicatiu

Hem mostrat que l'estabilització dels nivells de Swe1 en resposta a estrès replicatiu requereix o bé Mec1 (Resultats 1.2), la quinasa transductora central del *checkpoint de fase S*, o bé de les seves dues quinases efectores Rad53 i Chk1 (Figura 21). Per altra banda, els mutants *mec1Δ* (Resultats 2.4.2) i *rad53Δ swe1Δ* (Resultats 2.5) són incapaços d'inhibir l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès replicatiu, la qual cosa indica el requeriment de nivells suficients de Swe1. Una predicció resultat d'aquestes observacions és que el doble mutant nul de les quinases efectores del *checkpoint*, *rad53Δ chk1Δ*, que és incapaç d'estabilitzar els nivells de Swe1, hauria de permetre per sí sol l'activitat Cdk1 de fase M en presència d'estrès replicatiu (en presència de Mec1 i Swe1).

Un cultiu de la soca *rad53Δ chk1Δ* en creixement exponencial a 30°C es va sincronitzar a G1 pre-Start i després es va alliberar de manera sincrònica a fase S no pertorbada o en presència de 200 mM HU (Materials i Mètodes 2.1 i 5.4). A continuació es recullen alíquotes cada 10 minuts durant 120 minuts. Aquestes mostres es van analitzar mitjançant electroforesi desnaturalitzant i immunoblot (Materials i Mètodes 6.1, 6.2, 6.4). La progressió del cycle cel·lular es va monitoritzar a partir de la densitat cel·lular, l'índex de gemmació (BI) i el contingut de DNA mesurat mitjançant citometria de flux (Materials i Mètodes 5.1, 5.6).

En la Figura 35 s'observa que a la soca *rad53Δ chk1Δ* l'activitat Cdk1 mitòtica sobre Pol12 roman paradoxalment inhibida. En aquest mutant Swe1 decau de manera equivalent al que succeeix en el mutant *mec1Δ* (Figura 18). En canvi l'absència de Rad53 no permet la fosforilació de Pol12, al contrari del que ocorre en el mutant *rad53Δ swe1Δ* (Figura 32).

Una interpretació simple a aquesta aparent paradoxa és que Swe1 fosforilada per Mec1 pugui inhibir l'activitat Cdk1 de fase M a nivells baixos. Això no pot ocórrer a l'altre cas plantejat.

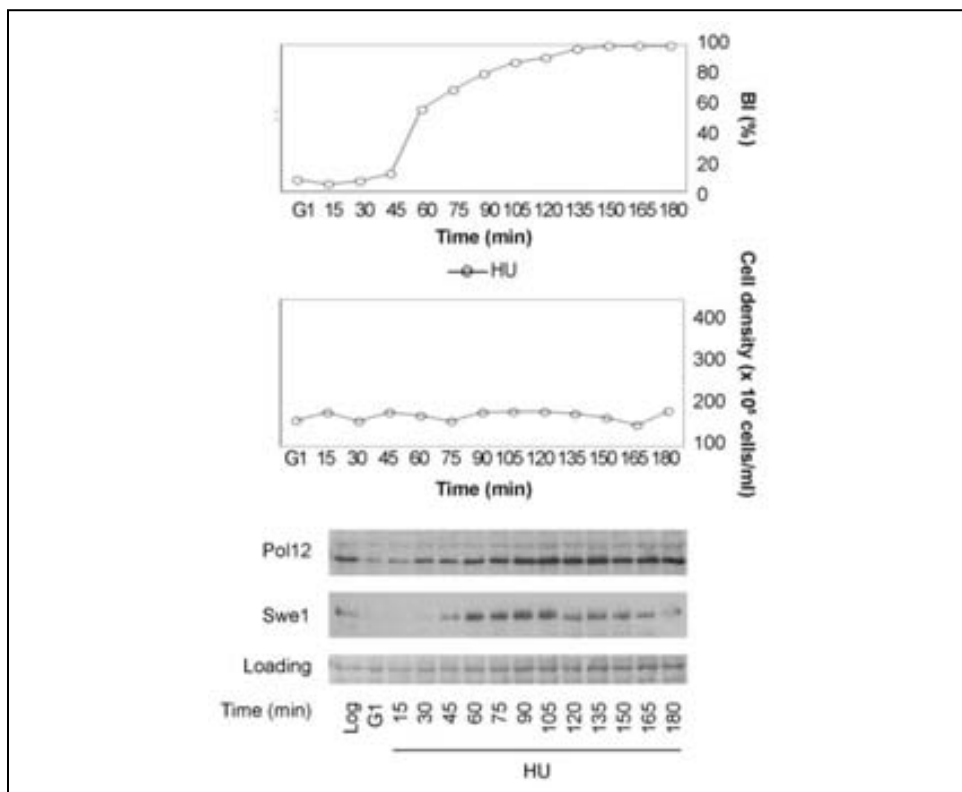


Figura 35. La deleció de les dues quinases efectores del *checkpoint de fase S* no és suficient per permetre l'activitat Cdk1 mitòtic en resposta a estrès replicatiu. Un cultiu de la soca YGP131 (*rad53-21 chk1Δ SWE1-13myc*) va ser sincronitzat a G1 pre-Start a 30°C i alliberat sincrònicament a fase S en presència d'estrès replicatiu (200 mM HU). L'índex de gemmació (BI) i la densitat cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament tal i com mostra la citometria de flux, la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI). Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, es van analitzar per immunoblot anti-Pol12 i anti-myc (*Swe1*). Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

2.5.2 L'al·lel no fosforilable Cdk1-19F reemplaça la deleció de Swe1 en el control de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès replicatiu

En *S. pombe* un al·lel no fosforilable per Wee1 (Cdk1-15A) impedeix la inhibició de l'activitat Cdk1 de fase M i permet la mitosi en presència d'estrès replicatiu (Rhind & Russell 1998).

Resultats

En el present treball s'ha mostrat que a *S. cerevisiae* Swe1 conjuntament amb Rad53 regula l'activitat Cdk1 mitòtica en condicions d'estrès replicatiu. Swe1 inhibeix l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a pertorbacions del citoesquelet a través de la fosforilació de la tirosina 19 de Cdk1 (Sia et al. 1996). A la vista d'aquestes dades, vàrem decidir estudiar si la fosforilació de la tirosina 19 de Cdk1 també és rellevant en la regulació de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès replicatiu. Per aquest motiu es va analitzar la fosforilació de Pol12 en una soca *rad53Δ* on la única copia de Cdk1 és un al·lel no fosforilable per Swe1 (Cdk1-19F).

Un cultiu de la soca *rad53Δ* Cdk1-19F en creixement exponencial a 30°C es va sincronitzar a G1 pre-Start i després es va alliberar de manera sincrònica a fase S no pertorbada o en presència de 200 mM HU (Materials i Mètodes 2.1 i 5.4). A continuació es recullen alíquotes cada 10 minuts durant 120 minuts. Aquestes mostres es van analitzar mitjançant electroforesi desnaturalitzant i immunoblot (Materials i Mètodes 6.1, 6.2, 6.4). La progressió del cicle cel·lular es va monitoritzar a partir de la densitat cel·lular, l'índex de gemmació (BI) i el contingut de DNA mesurat mitjançant citometria de flux (Materials i Mètodes 5.1, 5.6).

La Figura 36 mostra que les cèl·lules *rad53Δ* Cdk1-19F són incapaces d'inhibir l'activitat de Cdk1 de fase M sobre Pol12 en presència d'estrès replicatiu. Aquest resultat mostra que Swe1 regula l'activitat de Cdk1 mitòtica a través de la fosforilació de la tirosina 19 de també en resposta a estrès replicatiu.

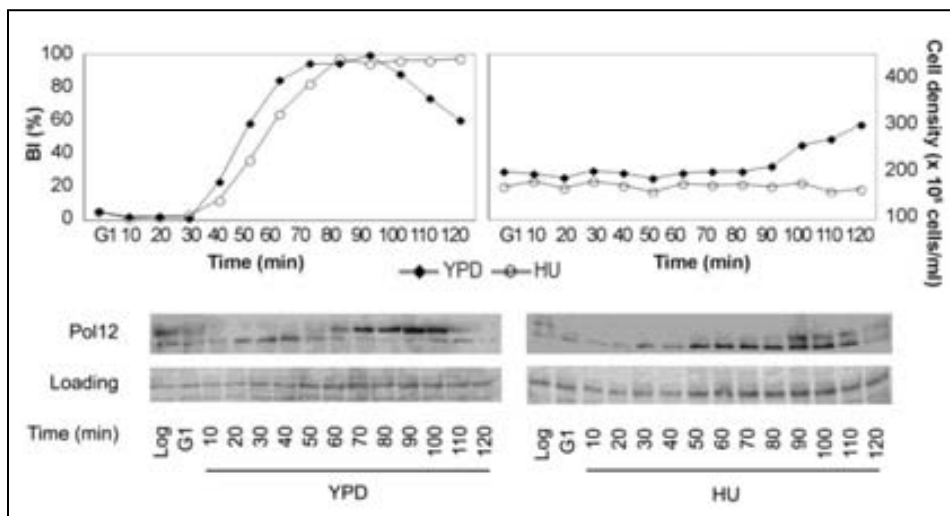


Figura 36. L'al·lel no fosforilable Cdk1-19F reemplaça la funció de Swe1 en el control de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès replicatiu. Un cultiu de la soca YRP48 (*rad53Δ Cdk1-19F*) va ser sincronitzat a G1 pre-Start a 30°C i alliberat sincrònicament a fase S no perturbada (YPD) i a fase S en presència d'estrès replicatiu (200 mM HU). Els índex de gemmació (BI) i densitats cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament tal i com mostra la citometria de flux, la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI). Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, van ser analitzats per immunoblot anti-Pol12. Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

2.6 L'al·lel Swe1-AQ reemplaça la deleció de Swe1 en el control de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès replicatiu

Hem mostrat que el *checkpoint de fase S* estabilitza els nivells de Swe1 en presència d'estrès genotòxic (Resultats 1.2 i 1.3), i a més, el lloc S³⁸⁵Q de Swe1 és necessari per a aquesta estabilització (Figura 22).

Si l'estabilització de Swe1 és una de les peces necessàries per la regulació de l'activitat Cdk1 mitòtica (Resultats 2.5), les cèl·lules que presentin l'al·lel Swe1-AQ junt a la deleció de Rad53 haurien de ser incapaces d'inhibir l'activitat Cdk1 de fase M en resposta a estrès replicatiu. Per tal d'explorar aquesta possibilitat vàrem analitzar la fosforilació de Pol12 en una soca mutant *rad53Δ* Swe1-AQ.

Un cultiu de la soca *rad53Δ* Swe1-AQ en creixement exponencial a 30°C es va sincronitzar a G1 pre-Start i després es va alliberar de manera sincrònica a fase S no pertorbada o en presència de 200 mM HU (Materials i Mètodes 2.1 i 5.4). A continuació es recullen alíquotes cada 10 minuts durant 120 minuts. Aquestes mostres es van analitzar mitjançant electroforesi desnaturalitzant i immunoblot (Materials i Mètodes 6.1, 6.2, 6.4). La progressió del cicle cel·lular es va monitoritzar a partir de la densitat cel·lular, l'índex de gemmació (BI) i el contingut de DNA mesurat mitjançant citometria de flux (Materials i Mètodes 5.1, 5.6).

En la Figura 37 podem observar que el doble mutant Swe1-AQ *rad53Δ* és incapaç d'inhibir l'activitat de Cdk1 mitòtica sobre Pol12 en presència d'estrès replicatiu. Per tant l'al·lel Swe1-AQ reemplaça la deleció de Swe1 en el control de l'activitat Cdk1 de fase M.

L'al·lel Swe1-AQ és funcional com demostra la fosforilació de la tirosina 19 de Cdk1 (Figura 37). La quinasa Swe1 és l'única capaç de fosforilar aquest residu (Fanli Zeng 2014, Tesi Doctoral).

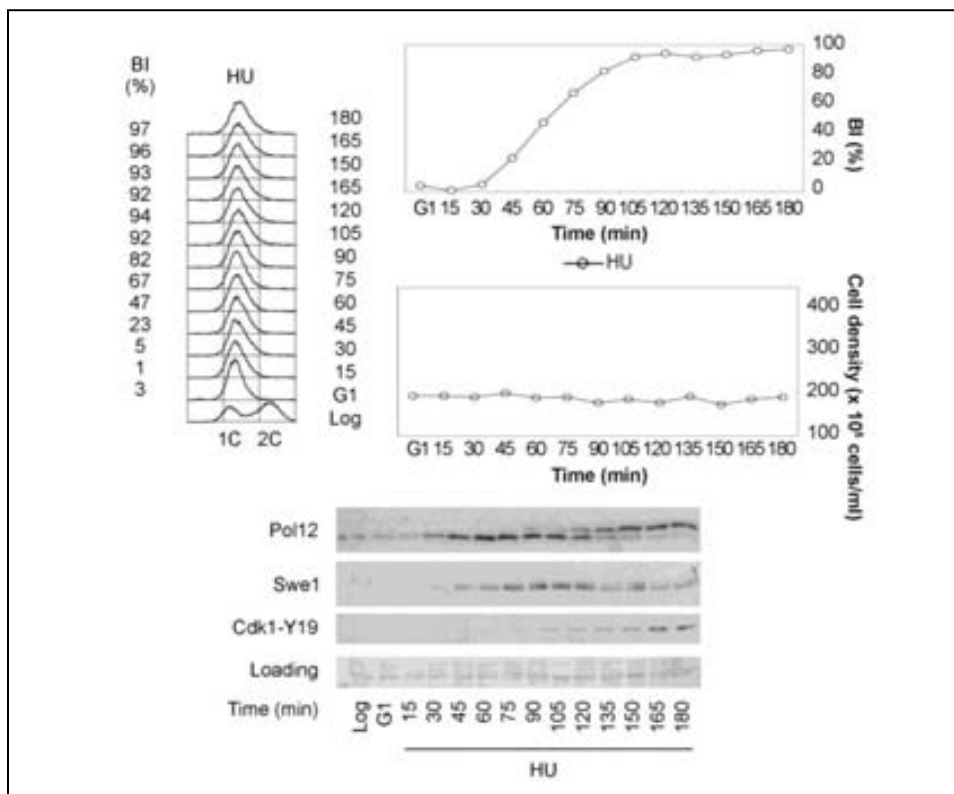


Figura 37. L'al·lel Swe1-AQ reemplaça la deleció de Swe1 en el control de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès replicatiu. Un cultiu de la soca YRP100 (*rad53Δ SWE1-AQ-13myc*) va ser sincronitzat a G1 a 30°C i alliberat sincrònicament a fase S en presència d'estrès replicatiu (200 mM HU). La citometria de flux, l'índex de gemmació (BI) i densitat cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament tal i com mostra la citometria de flux, la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI). Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, van ser analitzats per immunoblot anti-Pol12, anti-myc (Swe1) i anti-Y15 (Cdk1-Y19). Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

2.7 El *checkpoint de fase S* inhibeix l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a dany al DNA

Per tal de determinar si la regulació de l'activitat Cdk1 mitòtica pel *checkpoint de fase S* és un mecanisme exclusiu de la resposta a estrès replicatiu o, pel contrari, és generalitzable a estrès genotòxic, es va explorar aquest control en resposta a dany al DNA generat amb MMS (Materials i Mètodes 2.2).

En primer lloc, s'analitzà l'activitat Cdk1 mitòtica en una soca salvatge i en una soca *swe1Δ*. Cultius de la soca salvatges i la soca *swe1Δ* en creixement exponencial a 30°C es van sincronitzar a G1 pre-Start i després es van alliberar de manera sincrònica a fase S en presència de dany al DNA generat amb 0.033% MMS (Materials i Mètodes 2.1 i 5.4). A continuació es recullen alíquotes cada 10 minuts durant 120 minuts. Aquestes mostres es van analitzar mitjançant electroforesi desnaturalitzant i immunoblot (Materials i Mètodes 6.1, 6.2, 6.4). La progressió del cicle cel·lular es va monitoritzar a partir de la densitat cel·lular, l'índex de gemmació (BI) i el contingut de DNA mesurat mitjançant citometria de flux (Materials i Mètodes 5.1, 5.6).

La Figura 38 mostra que en una soca salvatge l'activitat Cdk1 mitòtica sobre Pol12 està inhibida en presència de dany al DNA, tal i com indica l'absència de fosforilació. El mateix resultat es va obtenir en repetir l'experiment en una soca *swe1Δ*.

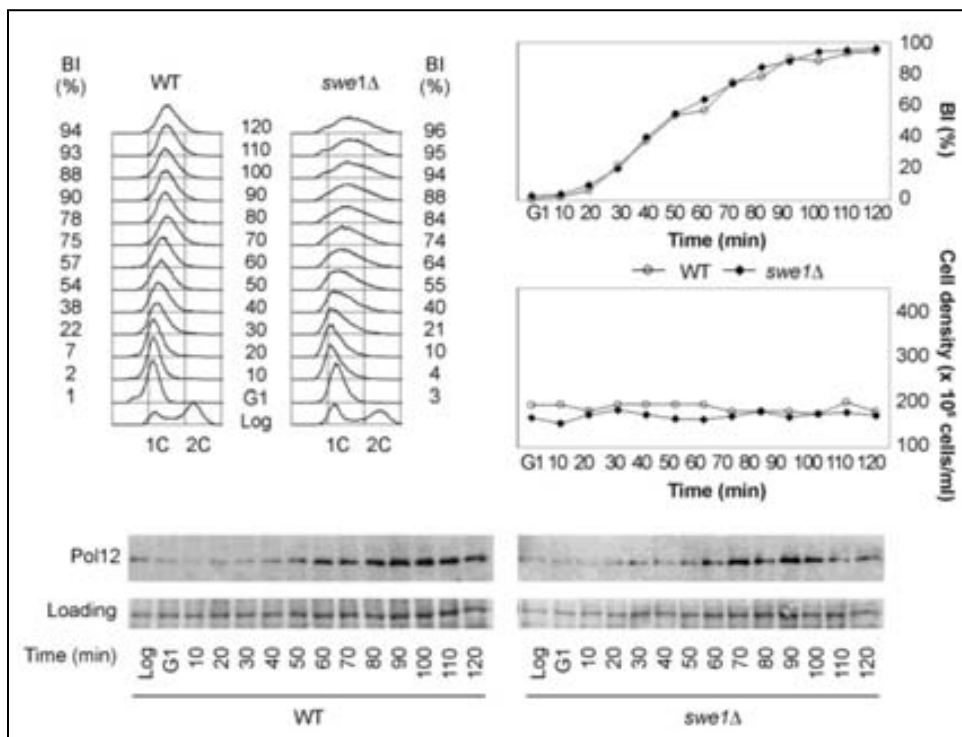


Figura 38. Swe1 és dispensable en la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica es resposta a dany al DNA. Cultius de les soques YGP20 (WT, salvatge) i YGP98 (*swe1Δ*) van ser sincronitzats a G1 pre-Start a 30°C i alliberats sincrònicament a fase S en presència de dany al DNA (0,033% MMS). La citometria de flux, els índex de gemmació (BI) i densitats cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament tal i com mostra la citometria de flux, la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI). La presència de MMS provoca un alentiment de la replicació del DNA com a conseqüència de l'activació del *checkpoint de fase S*, tal i com s'observa per citometria de flux. Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, es van analitzar per immunoblot anti-Pol12. Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

Resultats

Per tal d'explorar si la inhibició de l'activitat Cdk1 de fase M en resposta a dany al DNA també està mediada pel *checkpoint* de fase S, es va analitzar la fosforilació de Pol12 en mutants del delecio per la quinasa transductora central Mec1.

Un cultiu de la soca *mec1Δ* en creixement exponencial a 30°C es van sincronitzar a G1 pre-Start i després es van alliberar de manera sincrònica a fase S en presència de dany al DNA generat amb 0.033% MMS (Materials i Mètodes 2.1 i 5.4). A continuació es recullen alíquotes cada 15 minuts durant 180 minuts. Aquestes mostres es van analitzar mitjançant electroforesi desnaturalitzant i immunoblot (Materials i Mètodes 6.1, 6.2, 6.4). La progressió del cicle cel·lular es va monitoritzar a partir de la densitat cel·lular, l'índex de gemmació (BI) i el contingut de DNA mesurat mitjançant citometria de flux (Materials i Mètodes 5.1, 5.6).

En presència de dany al DNA, a diferència del que succeeix en una soca salvatge (Figura 38), on Pol12 roman no-fosforilat, s'observa la fosforilació de Pol12 (Figura 39), indicant que Mec1 és necessària per a la inhibició de l'activitat Cdk1 de fase M en aquestes condicions.

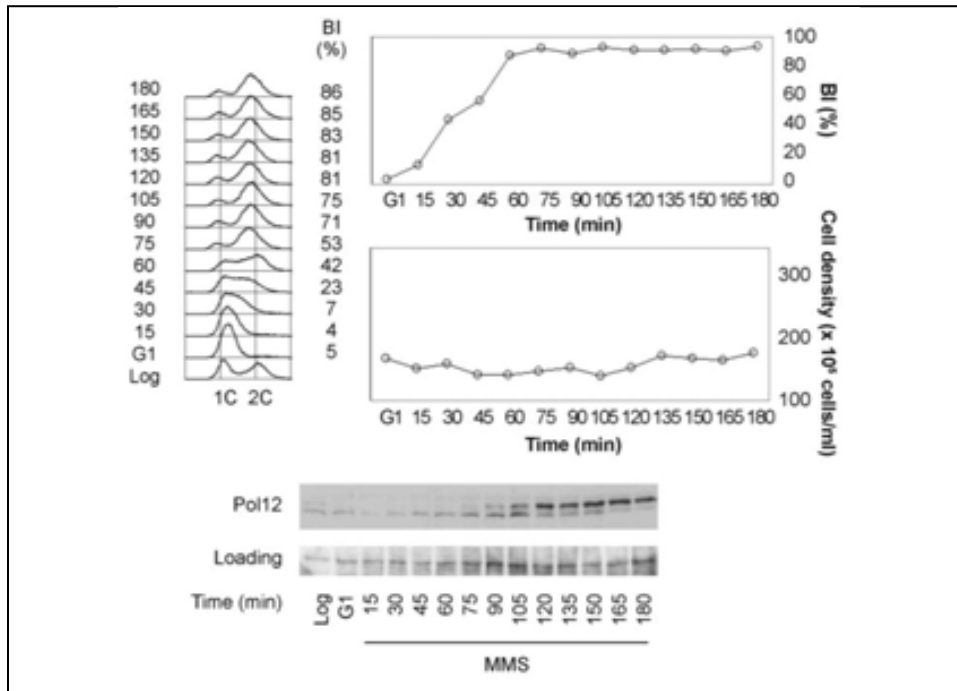


Figura 39. La inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a dany al DNA és dependent de Mec1. Un cultiu de la soca YGP123 (*mec1Δ*) va ser sincronitzat a G1 pre-Start a 30°C i alliberat sincrònicament a fase S en presència de dany al DNA (0,033% MMS). La citometria de flux, els índex de gemmació (BI) i densitats cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament tal i com mostra la citometria de flux, la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI). En absència de Mec1 no té lloc activació del *checkpoint de fase S* i en conseqüència no s'observa alentiment de la replicació (Paulovich & Hartwell 1995; Tercero & Diffley 2001). Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, es van analitzar per immunoblot anti-Pol12. Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

Si el control de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès replicatiu és generalitzable a estrès genotòxic, Swe1 i Rad53 han d'estar implicats en aquest control.

Un cultiu de la soca *rad53-21* i de *rad53-21 swe1Δ* en creixement exponencial a 30°C es van sincronitzar a G1 pre-Start i després es van alliberar de manera sincrònica a fase S en presència de dany al DNA generat amb 0.033% MMS (Materials i Mètodes 2.1 i 5.4). A continuació

Resultats

es recullen alíquotes cada 10 minuts durant 120 minuts. Aquestes mostres es van analitzar mitjançant electroforesi desnaturalitzant i immunoblot (Materials i Mètodes 6.1, 6.2, 6.4). La progressió del cicle cel·lular es va monitoritzar a partir de la densitat cel·lular, l'índex de gemmació (BI) i el contingut de DNA mesurat mitjançant citometria de flux (Materials i Mètodes 5.1, 5.6).

En la Figura 40 s'observa que en presència de dany al DNA l'activitat Cdk1 de fase M, monitoritzada a través de la fosforilació de Pol12, roman inhibida malgrat Rad53 no és actiu. Per altra banda, la soca *rad53-21 swe1Δ* és incapaç d'inhibir l'activitat Cdk1 mitòtica sobre Pol12 en les mateixes condicions, tal i com reflexa la fosforilació 60 minuts després d'alliberar les cèl·lules de G1. Aquest resultat, juntament amb els obtinguts en presència d'estrès replicatiu (Figura 32), dona suport a una regulació de l'activitat Cdk1 mitòtica generalitzable en resposta a estrès genotòxic, mediada per Rad53 i Swe1, i dependent del *checkpoint de fase S*.

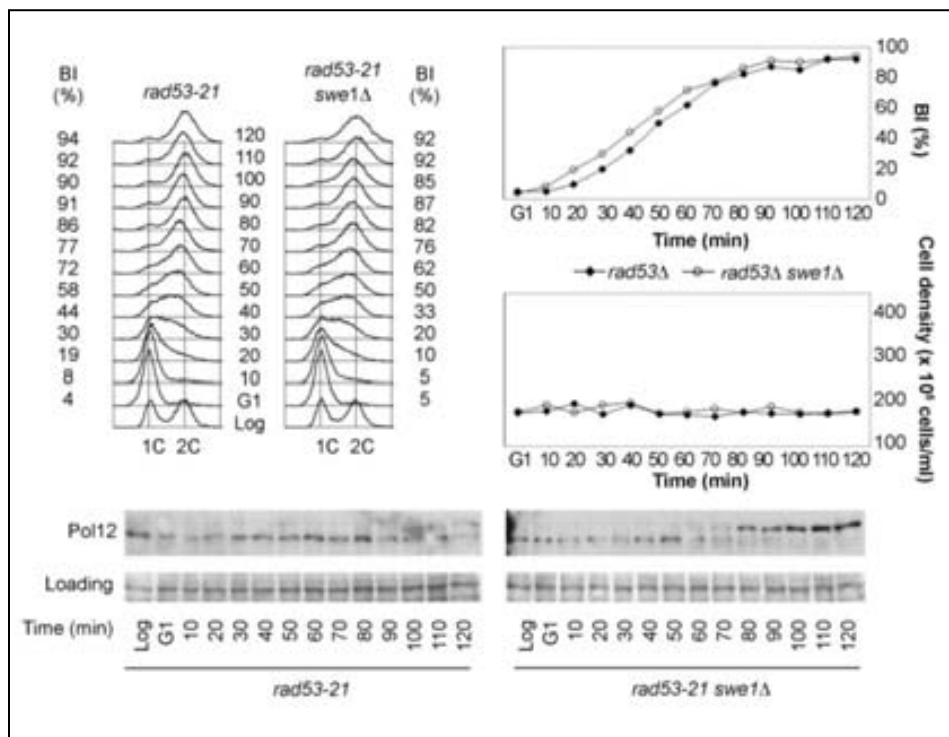


Figura 40. Swe1 i Rad53 inhibeixen de manera redundant l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a dany al DNA. Cultius de les soques YGP38 (*rad53-21*) i YGP121 (*rad53-21 swe1Δ*) van ser sincronitzats a G1 pre-Start a 30°C i alliberats sincrònicament a fase S en presència de dany al DNA (0,033% MMS). La citometria de flux, els índex de gemmació (BI) i densitats cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament tal i com mostra la citometria de flux, la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI). En absència de Rad53, la quinasa efectora principal del *checkpoint de fase S* no s'observa alentiment de la replicació en presència de dany al DNA. Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, es van analitzar per immunoblot anti-Pol12. Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

3 L'activitat Cdk1 mitòtica de cèl·lules exposades a estrès replicatiu està inhibida en un assaig *in vitro*

El model prevalent de bloqueig de la progressió a mitosi en resposta a estrès genotòxic a *S. cerevisiae* exclou la inhibició de l'activitat Cdk1 de fase M basat en assajos quinasa *in vitro* (Amon et al. 1992; Booher et al. 1993). Aquests resultats estan en contracció amb els nostres resultats mesurant activitat Cdk1 mitòtica *in vivo* sobre Pol12.

Per tal de reconciliar la inhibició de l'activitat Cdk1 de fase M *in vivo* amb la bibliografia prèvia s'ha analitzat l'activitat del complex Clb2-Cdk1 exposat a estrès replicatiu en un assaig quinasa *in vitro*.

3.1 L'assaig de l'activitat Cdk1 mitòtica és fàcilment saturat

En primer lloc, vàrem analitzar l'activitat Cdk1 de fase M *in vitro* en una soca salvatge en presència d'estrès replicatiu. Un cultiu en creixement exponencial es va sincronitzar a G1 pre-Start i es va alliberar sincrònicament a una fase S en presència de nocodazol (sincronització cel·lular a metafase, on l'activitat Cdk1 mitòtica és màxima) o en presència d'estrès replicatiu (Materials i Mètodes 5.4 i 5.5). L'assaig quinasa *in vitro* es va realitzar immunoprecipitant Clb2 a partir de $1.8 \cdot 10^8$ cèl·lules; seguint les condicions usades en estudis previs (Amon et al. 1992; Booher et al. 1993).

Els resultats de la Figura 41 efectivament indicarien que l'activitat Cdk1 de fase M no és regulada a la baixa en resposta a estrès replicatiu, tal i com estava prèviament descrit (Amon et al. 1992; Booher et al. 1993). Tanmateix, la nostra experiència amb assaig quinasa *in vitro* mostrava una alta activitat dels immunoprecipitats de Clb2 comparat amb altres quinases. En els assaigs amb Clb2-Cdk1 seguint els protocols estàndard s'obtenia senyal positiu a l'autoradiografia en exposicions de pocs minuts. Per tant, l'assaig podria estar saturat i, en conseqüència, ser insensible a canvis d'activitat catalítica de Cdk1 de fase M. Vàrem decidir explorar aquesta possibilitat revisant les condicions d'assaig.

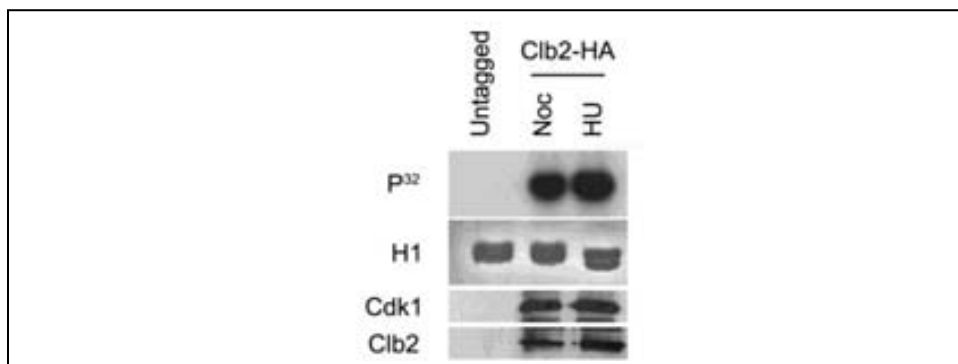


Figura 41. L'assaig de l'activitat Cdk1 mitòtica *in vitro* és fàcilment saturat. Cultius de les soques YGP20 (Untagged, salvatge) i YGP133 (*CLB2-3HA*) van ser sincronitzats a G1 pre-Start a 30°C. La soca YGP20 va ser alliberada sincrònicament a una fase S en presència de nocodazol (15 µg/ml Noc). En el cas de YGP133 la meitat del cultiu s'allibera a fase S compromesa en presència d'estrès replicatiu (200 mM HU) i l'altre meitat en presència de nocodazol (15 µg/ml Noc). En cada cas $1.8 \cdot 10^8$ cèl·lules es van extreure en condicions natives i la Clb2-3HA present es va immunoprecipitar amb anticossos monoclonals anti-HA. Els immunoprecipitats es van emprar en un assaig quinasa *in vitro* amb 20 µg de histona H1 com a substrat, 200 µM d'ATP total i un temps de reacció de 30 minuts a 30°C. **Panell superior**, autoradiografia de P^{32} usant histona H1 com a substrat. **Segon panell**, tinció Comassie Blue del gel SDS-PAGE radioactiu que mostra que la mateixa quantitat de histona H1 va ser usada en totes les reaccions. **Tercer i quart panell**, la meitat de l'immunoprecipitat es va analitzar per immunoblot anti-Clb2 i anti-Cdk1 i s'usa com control que la mateixa quantitat de Cdk1 de fase M es va emprar en els dos assaigs positius.

3.2 L'activitat Cdk1 de fase M de les cèl·lules exposades a estrès replicatiu mesurada *in vitro* està inhibida de manera dependent Swe1 a través de la fosforilació de la tirosina 19

Els resultats mostrats a l'apartat anterior suggereixen que l'assaig podria estar saturat en les condicions usades i, per tant, ser insensible a canvis d'activitat catalítica de Cdk1 mitòtica. Per aquest motiu vàrem decidir revisar les condicions d'assaig (Materials i Mètodes 6.7).

Per tal de rebaixar la velocitat de reacció de la fosforilació es va limitar la immunoprecipitació de Clb2 a la present a extractes cel·lular natis corresponents a 300 µg de proteïna total (front als 10 mg emprats en les condicions *clàssiques*). Igualment, la quantitat d'histona H1 substrat es va

Resultats

rebaixar a 6 μg (front els a 20 μg en les condicions *clàssiques*) i el temps de reacció de 30 a 15 minuts. En aquest cas no es van modificar ni la temperatura de reacció, 30°C, ni la concentració d'ATP, que es va mantenir a 200 μM , tot i que concentracions limitants d'entre 1-50 μM d'ATP també van ser explorades, amb una rebaixa de la velocitat de reacció.

Cultius de la soca salvatges i *swe1* Δ en creixement exponencial es van sincronitzar a G1 pre-Start i es van alliberar sincrònicament a fase S en presència d'estrès replicatiu o en presència de nocodazol (Materials i Mètodes 5.4 i 5.5). A continuació, per cada condició i soca es va immunoprecipitar Clb2-3HA a partir de 300 μg de proteïna total i es va procedir amb l'assaig quinasa *in vitro* (Materials i Mètodes 6.7).

En la Figura 42A s'observa que en aquestes condicions és ara apreciable una inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica en presència d'estrès replicatiu (HU) respecte cèl·lules sincronitzades a metafase (Noc). Aquest resultat, plenament reproduïble, contradiu els resultats prèviament publicats (Amon et al. 1992; Booher et al. 1993; Stueland et al. 1993) i són compatibles amb la nostra observació d'inhibició de l'activitat Cdk1 de fase M sobre pol12 *in vivo* (Resultats 2.2).

Un cop vàrem obtenir unes condicions d'assaig *in vitro* sensibles a canvis en l'activitat Cdk1 mitòtica i reproduïbles, vàrem passar a estudiar el possible paper de Swe1 en aquesta inhibició. La Figura 42B explora l'activitat Cdk1 de fase M en condicions d'estrès replicatiu en una soca nul·la *swe1* Δ . En absència de Swe1 (*swe1* Δ) l'activitat Cdk1 de fase M *in vitro* és major que en una soca salvatge en les mateixes condicions (Figura 42 A i B, HU). Les mostres d'ambdós panells corresponen a experiments realitzats i analitzats en paral·lel i en el mateix gel. Tanmateix, els nivells d'activitat de Clb2-Cdk1 *in vitro* en la soca *swe1* Δ són reproduïblement inferiors en HU que en metafase (Noc), la qual cosa seria compatible amb un segon nivell de control per Rad53.

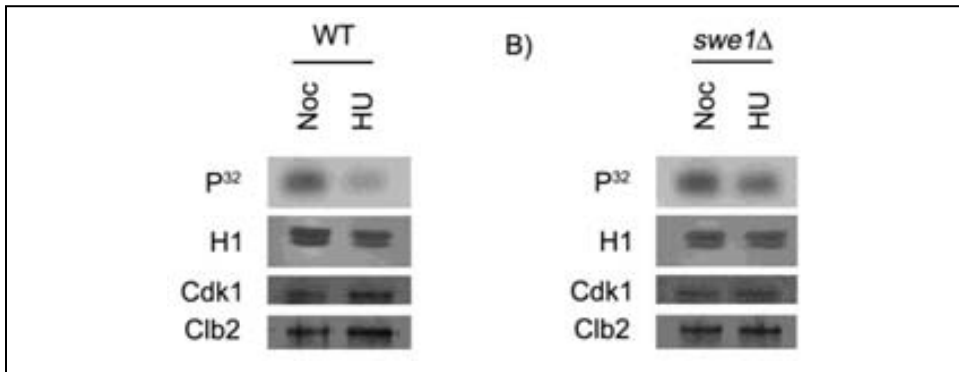


Figura 42. L'activitat Cdk1 mitòtica de cèl·lules exposades a estrès replicatiu mesurada *in vitro* està inhibida de manera dependent de Swe1. Cultius de les soques YGP133 (*CLB2-3HA*, panell A) i YRP33 (*CLB2-3HA swe1Δ*, panell B) van ser sincronitzats a G1 pre-Start a 30°C i alliberats sincrònicament a fase S en presència de nocodazol (15 µg/ml Noc) o estrès replicatiu (200 mM HU). En cada cas, la *Clb2-3HA* present es va immunoprecipitar amb anticossos monoclonals anti-HA a partir de 300 µg de proteïna extreta en condicions natives. Els immunoprecipitats es van emprar en un assaig quinasa *in vitro* amb 6 µg de histona H1 com a substrat, 200 µM d'ATP total i un temps de reacció de 15 minuts a 30°C. **Panell superior**, autoradiografia de P³² usant histona H1 com a substrat. **Segon panell**, tinció Comassie Blue del gel SDS-PAGE radioactiu que mostra que la mateixa quantitat de histona H1 va ser usada en totes les reaccions. **Tercer i quart panell**, la meitat de l'immunoprecipitat es va analitzar per immunoblot anti-*Clb2* i anti-*Cdk1* i s'usa com control que la mateixa quantitat de *Cdk1* de fase M es va emprar en els assaigs.

Swe1 fosforila la tirosina 19 de *Cdk1* (Introducció 1.2.3.1). Per tal de determinar si la inhibició de l'activitat *Cdk1* de fase M està mediada per aquesta fosforilació a continuació vàrem analitzar l'activitat *in vitro* de l'al·lel *Cdk1-19F* associat a *Clb2*.

Cultius en creixement exponencial de cèl·lules salvatges, *swe1Δ* i *Cdk1-19F* es van sincronitzar a G1 pre-Start i es van alliberar sincrònicament a fase S en presència d'estrès replicatiu (Materials i Mètodes 5.4). Els extractes es van immunoprecipitar i els immunoprecipitats es van assajar *in vitro* tal i com s'ha descrit a dalt.

En la Figura 43 s'observa que mentre una soca salvatge inhibeix l'activitat *Cdk1* mitòtica en presència d'estrès replicatiu; els mutants *swe1Δ* i *Cdk1-19F* són incapaços d'inhibir-la.

Resultats

L'absència de senyal pY19 al carril corresponent a cèl·lules *swe1Δ* confirma que Swe1 és l'única quinasa capaç de fosforilar la tirosina 19 en aquestes condicions, a diferència del que ocorre a *S. pombe* i a cèl·lules animals, que contenen quinases paràlogues (Introducció 1.2.3.1).

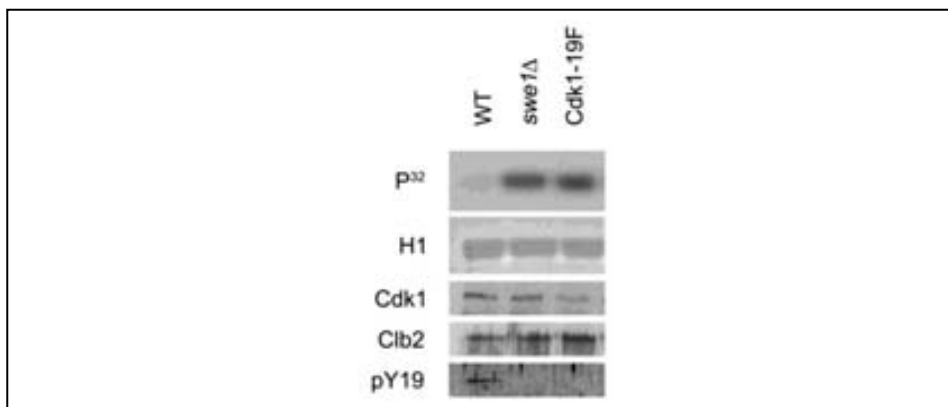


Figura 43. L'activitat Cdk1 mitòtica de cèl·lules exposades a estrès replicatiu mesurada *in vitro* està inhibida a través de la fosforilació de la Y19. Cultius de les soques YGP133 (*CLB2-3HA*), YRP33 (*CLB2-3HA swe1Δ*) i YRP70 (*CLB2-3HA Cdk1-19F*) van ser sincronitzats a G1 pre-Start a 30°C i alliberats sincrònicament a fase S en presència d'estrès replicatiu (200 mM HU). En cada cas, la Clb2-3HA present es va immunoprecipitar amb anticossos monoclonals anti-HA a partir de 300 µg de proteïna extreta en condicions natives. Els immunoprecipitats es van emprar en un assaig quinasa *in vitro* amb 6 µg de histona H1 com a substrat, 200 µM d'ATP total i un temps de reacció de 15 minuts a 30°C. **Panell superior**, autoradiografia de P³² usant histona H1 com a substrat. **Segon panell**, tinció Comassie Blue del gel SDS-PAGE radioactiu que mostra que la mateixa quantitat de histona H1 va ser usada en totes les reaccions. **Tercer i quart panell**, la meitat de l'immunoprecipitat es va analitzar per immunoblot anti-Clb2, anti-Cdk1 i anti-pY19 i s'usa com control que la mateixa quantitat de Cdk1 de fase M es va emprar en els assaigs.

Analitzats conjuntament, els resultats mostrats a les Figures 42 i 43 indiquen que la fosforilació de Cdk1 a la tirosina 19 per Swe1 està implicat en la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica.

3.3 Control de l'activitat Cdk1 mitòtica pel *checkpoint de fase S*

3.3.1 Control de l'activitat Cdk1 mitòtica per Rad53

Tot i que bona part de la inhibició en resposta a estrès replicatiu de l'activitat Cdk1 mitòtica assajada *in vitro* es perd en absència de Swe1, el nivell d'activitat no assoleix el de l'activitat Cdk1 de fase M en metafase (Figura 42). Per tal d'explorar la possible participació de Rad53 en la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica, tal i com s'ha identificat *in vivo*, vàrem analitzar-la en assaig *in vitro* a partir de soques *swe1Δ*, *rad53Δ* i *rad53Δ swe1Δ*.

Els assajos *in vitro* es van portar a terme a partir de cultius en creixement exponencial de cèl·lules *swe1Δ*, *rad53Δ* i *rad53Δ swe1Δ* tal i com s'ha descrit a l'apartat 3.2 (a dalt).

Tal i com es pot observar en la Figura 44A, en una soca *rad53Δ* l'activitat Cdk1 de fase M roman inhibida en hidroxidreurea en comparació amb l'activitat de la soca *swe1Δ* en les mateixes condicions, confirmant que la major part de la inhibició catalítica observada a la Figura 42 és responsabilitat de Swe1.

No obstant, la soca *rad53Δ swe1Δ* presenta menys activitat que el control *swe1Δ*. Donat el menor rendiment que presenta la immunoprecipitació de Clb2 en la doble deleció i que s'ha observat en totes les repeticions d'aquest experiment realitzades, vàrem optar per corregir el baix rendiment de la immunoprecipitació partint del doble d'extracte cel·lular total natiu (600 µg de proteïna total). En aquest cas (Figura 44B), es pot descartar que la inhibició de l'activitat Cdk1 de fase M en el doble mutant sigui fruit del menor rendiment de la immunoprecipitació ja que malgrat immunoprecipitar la mateixa quantitat del complex Cdk1-Clb2 en absència de Rad53 i de Swe1 no s'assoleix la mateixa activitat que en la soca *swe1Δ*. Una possible explicació d'aquest resultat sorprenent és que algun element accessori que contribueix a l'activitat Cdk1 mitòtica (com per exemple Cks1) es perdi específicament en els immunoprecipitats dels mutants *rad53Δ*. A aquest respecte, Cks1

Resultats

ha estat identificat al nostre laboratori com a substrat de Rad53 (Fanli Zeng 2014, Tesi Doctoral).

En qualsevol cas, la menor activitat Cdk1 mitòtica present en els mutants *swe1Δ rad53Δ* és suficient per fosforilar Pol12 (Resultat 2.5) *in vivo* i promoure la segregació dels cromosomes (Resultat 4.3) mentre que la major activitat de les cèl·lules *swe1Δ* no. De nou, una explicació és que Rad53 no actuï sobre la Kcat de Clb2-Cdk1 sinó en l'afinitat per proteïnes substrat.

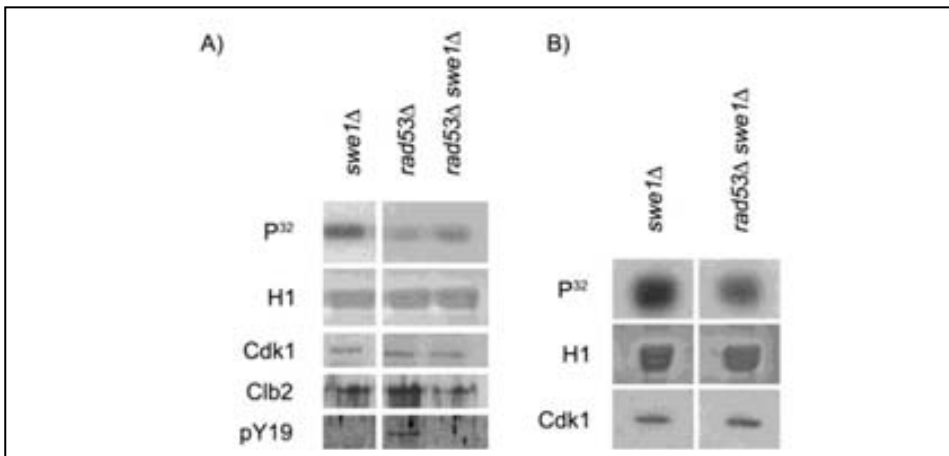


Figura 44. Control de l'activitat Cdk1 mitòtica per Rad53. A) Cultius de les soques YRP33 (*CLB2-3HA swe1Δ*) YGP135 (*CLB2-3HA rad53Δ*) i YGP136 (*CLB2-3HA rad53Δ swe1Δ*) van ser sincronitzats a G1 pre-Start a 30°C i alliberats sincrònicament a fase S en presència d'estrès replicatiu (200 mM HU). En cada cas, la Clb2-3HA present es va immunoprecipitar amb anticossos monoclonals anti-HA a partir de 300 µg de proteïna extreta en condicions natives. Els immunoprecipitats es van emprar en un assaig quinasa *in vitro* amb 6 µg de histona H1 com a substrat, 200 µM d'ATP total i un temps de reacció de 15 minuts a 30°C. **Panell superior**, autoradiografia de P^{32} usant histona H1 com a substrat. **Segon panell**, tinció Comassie Blue del gel SDS-PAGE radioactiu que mostra que la mateixa quantitat de histona H1 va ser usada en totes les reaccions. **Tercer i quart panell**, la meitat de l'immunoprecipitat es va analitzar per immunoblot anti-Clb2, anti-Cdk1 i anti-pY19 i s'usa com control que la mateixa quantitat de Cdk1 de fase M es va emprar en els assaigs. B) Cultius de les soques YRP33 (*CLB2-3HA swe1Δ*) i YGP136 (*CLB2-3HA rad53Δ swe1Δ*) varen ser tractats com en el panell A). **Tercer panell**, la meitat de l'immunoprecipitat es va analitzar per immunoblot anti-Cdk1 s'usa com control que la mateixa quantitat de Cdk1 de fase M es va emprar en els assaigs.

3.3.2 Control de l'activitat Cdk1 mitòtica per Mec1 *in vitro*

Hem mostrat a dalt (1.2, 2.4.2 i 2.5 de Resultats) que tant Swe1 com Rad53 estan per sota de Mec1 i que les cèl·lules mutants nul·les *mec1Δ* són incapaces d'inhibir en resposta a estrès replicatiu l'activitat Cdk1 mitòtica *in vivo*, mesurada a partir de la fosforilació de Pol12. Per tal de comprovar si Mec1 és central en la inhibició de l'activitat Cdk1 de fase M mesurada *in vitro*, vàrem portar a terme assajos quinasa *in vitro* a partir de cèl·lules salvatges i *mec1Δ*, tal i com s'ha descrit en l'apartat 3.2.

Com s'observa en la Figura 45, en presència d'estrès replicatiu l'activitat Cdk1 mitòtica *in vitro* en presència d'estrès replicatiu és major en els mutants *mec1Δ* que en la soca salvatge. Aquest resultat confirma la implicació del *checkpoint de fase S* en la regulació de l'activitat Cdk1 de fase M en presència d'estrès replicatiu *in vivo*.

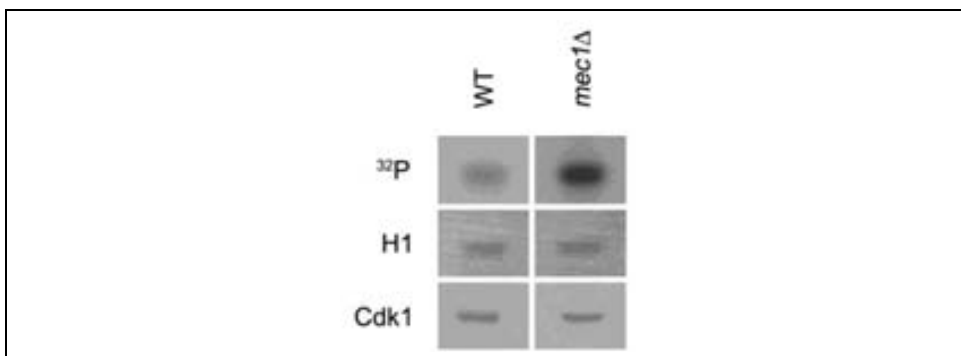


Figura 45. Control de l'activitat Cdk1 mitòtica per Mec1 *in vitro*. Cultius de les soques YGP133 (*CLB2-3HA*) i YRP168 (*CLB2-3HA mec1Δ*) van ser sincronitzats a G1 pre-Start a 30°C i alliberats sincrònicament a fase S en presència d'estrès replicatiu (200 mM HU). En cada cas, la Clb2-3HA present es va immunoprecipitar amb anticossos monoclonals anti-HA a partir de 300 µg de proteïna extreta en condicions natives. Els immunoprecipitats es van emprar en un assaig quinasa *in vitro* amb 6 µg de histona H1 com a substrat, 200 µM d'ATP total i un temps de reacció de 15 minuts a 30°C. **Panell superior**, autoradiografia de P³² usant histona H1 com a substrat. **Segon panell**, tinció Coomassie Blue del gel SDS-PAGE radioactiu que mostra que la mateixa quantitat de histona H1 va ser usada en totes les reaccions. **Tercer panell**, la meitat de l'immunoprecipitat es va analitzar per immunoblot anti-Cdk1 i s'usa com control que la mateixa quantitat de Cdk1 de fase M es va emprar en els assaigs

3.3.3 Rad53 recombinant inhibeix l'activitat Cdk1 mitòtica *in vitro*

Els resultats mostrats a dalt amb assaigs quinasa *in vitro* a partir de soques *rad53*Δ no permeten extreure conclusions clares sobre el paper de Rad53 en la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica, degut a la menor activitat Cdk1 de fase M reproduïblement detectada a aquestes soques. Per aquest motiu vam portar a terme una aproximació alternativa: estudiar si Rad53 afegit a la reacció *in vitro* inhibeix l'activitat Cdk1 mitòtica purificada d'extractes de cèl·lules salvatges en metafase.

Amb aquest objectiu cèl·lules salvatges en creixement exponencial es van sincronitzar a G1 i s'alliberaren a fase S en presència de nocodazol (Materials i Mètodes 5.5). En aquestes condicions les cèl·lules s'aturen a metafase, situació en que l'activitat CDK mitòtica és màxima. A continuació es va immunoprecipitar el complex Cdk1-Clb2 i va dividir en dos: una part es va exposar a Rad53 recombinant i l'altra part es va incubar amb una forma no activa de la quinasa (*rad53* kd) (Materials i Mètodes 6.5). Un cop eliminats els Rad53 recombinants es van realitzar els assaigs quinasa *in vitro* de l'activitat Cdk1 mitòtica, usant histona H1 com a substrat (Materials i Mètodes 6.7).

En la Figura 46 s'observa que el complex Cdk1-Clb2 prèviament incubat amb Rad53 presenta menys activitat Cdk1 mitòtica *in vitro* que el pre-incubat amb la forma no activa de Rad53. Per tant, Rad53 té la capacitat d'inhibir l'activitat Cdk1 de fase M.

Aquest resultat no permet distingir si Rad53 inhibeix l'activitat catalítica de la Cdk1 mitòtica o si redueix la seva afinitat pels substrats. Ni tampoc aporta informació sobre la diana concreta de Rad53 sobre l'activitat Cdk1 de fase M.

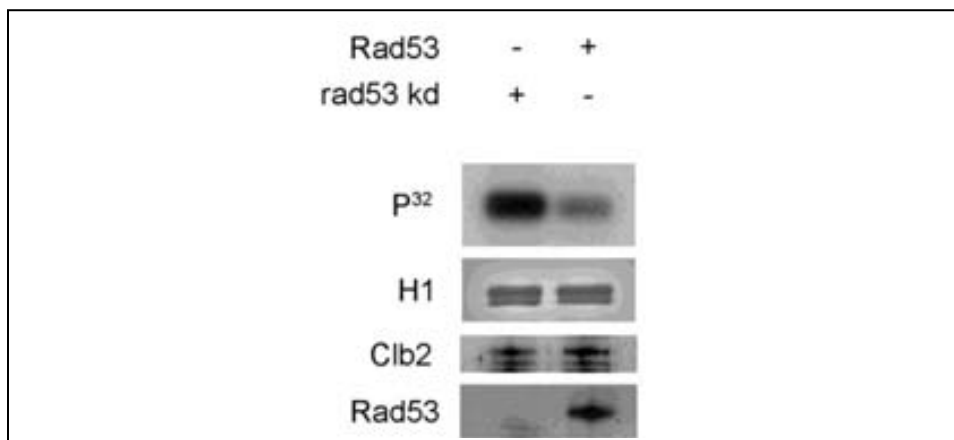


Figura 46. Rad53 recombinant inhibeix l'activitat Cdk1 mitòtica *in vitro*. Un cultiu de la soca YGP133 (*CLB2-3HA*) van ser sincronitzats a G1 pre-Start a 30°C i alliberat sincrònicament a fase S en presència de nocodazol. La Clb2-3HA present es va immunoprecipitar amb anticossos monoclonals anti-HA a partir de 300 µg de proteïna extreta en condicions natives. L'immunoprecipitat es va emprar en un assaig quinasa *in vitro* amb 6 µg de histona H1 com a substrat, 200 µM d'ATP total i un temps de reacció de 15 minuts a 30°C. **Panell superior**, autoradiografia de P^{32} usant histona H1 com a substrat. **Segon panell**, tinció Comassie Blue del gel SDS-PAGE radioactiu que mostra que la mateixa quantitat de histona H1 va ser usada en totes les reaccions. **Tercer i quart panell**, la meitat de cada immunoprecipitat es va analitzar per immunoblot anti-Clb2 i anti-Rad53 i s'usa com control que la mateixa quantitat de complex Clb2-Cdk1 de fase M es va emprar en els assaigs.

4 Tres vies diferents impedeixen la segregació dels cromosomes en resposta a la presència d'estrès genotòxic

En els apartats anteriors s'ha mostrat que l'activitat Cdk1 mitòtica està inhibida pel *checkpoint* de fase S, a través de Rad53 i Swe1, en presència d'estrès genotòxic. Donat que l'activitat Cdk1 mitòtica és imprescindible per la segregació de les cromàtides germanes (per l'activació d'APC^{Cdc20} i per a l'elongació dels fusos mitòtics (Introducció 2.1.1.3). A continuació vàrem decidir explorar la rellevància d'aquest control en la regulació de la segregació cromosòmica en resposta a estrès genotòxic.

4.1 La deleció de Pds1/secarina no permet la segregació cromosòmica en presència de dany al DNA

S'ha descrit que en presència de dany al DNA generat per *cdc13-1* (dany en telòmers, detectat i respost en G2-M) el *checkpoint de fase S* estabilitza Pds1/secarina, evitant així la segregació de les cromàtides germanes (Introducció 3.1.2). Aquesta observació, junt amb la dispensabilitat de Swe1 en la resposta a estrès genotòxic (Introducció 1.2.3.1), ha portat a assumir que *S. cerevisiae* controla la transició metafase-anafase a través de Pds1 si bé no existeix cap evidència experimental que sustenti aquest model.

Predictiblement, els mutants *cdc13 pds1* són incapaços d'impedir l'entrada a anafase a temperatura restrictiva (Wang et al. 2001). Vàrem explorar si Pds1 també és essencial per impedir la mitosi en resposta a dany detectat i resposta en fase S. Amb aquest objectiu cèl·lules *pds1Δ* es van sincronitzar a G1 pre-Start i aleshores es van alliberar sincrònicament a fase S en presència de MMS per generar dany al DNA (Materials i Mètodes 5.4). Es van recollir mostres cada 20 minuts durant 240 minuts i es van analitzar per microscòpia amb tinció DAPI el nombre de cèl·lules amb cromosomes segregats (Materials i Mètodes 7.1).

Contràriament al descrit usant *cdc13-1* per generar dany al DNA (Wang et al. 2001), 240 minuts després d'alliberar les cèl·lules de G1 a una fase S en presència de MMS no s'observa segregació cromosòmica. El mutant

de deleció de Pds1 (*pds1Δ*) mostra el mateix comportament que les cèl·lules salvatges (WT) (Figura 47). Una explicació pel diferent comportament observat entre el dany al DNA generat per *cdc13-1* o MMS és que a temperatura restrictiva, les cèl·lules *cdc13-1* presenten dany a les regions proximals dels telòmers. Aquest dany és detectat per *checkpoint* de dany al DNA només a fase G2, un cop el DNA ja ha estat replicat (Garvik et al. 1995). En canvi, al dany al DNA generat amb MMS és detectat a la fase S pel *checkpoint* de fase S, que compareix elements, però no és idèntic, amb el *checkpoint* de dany.

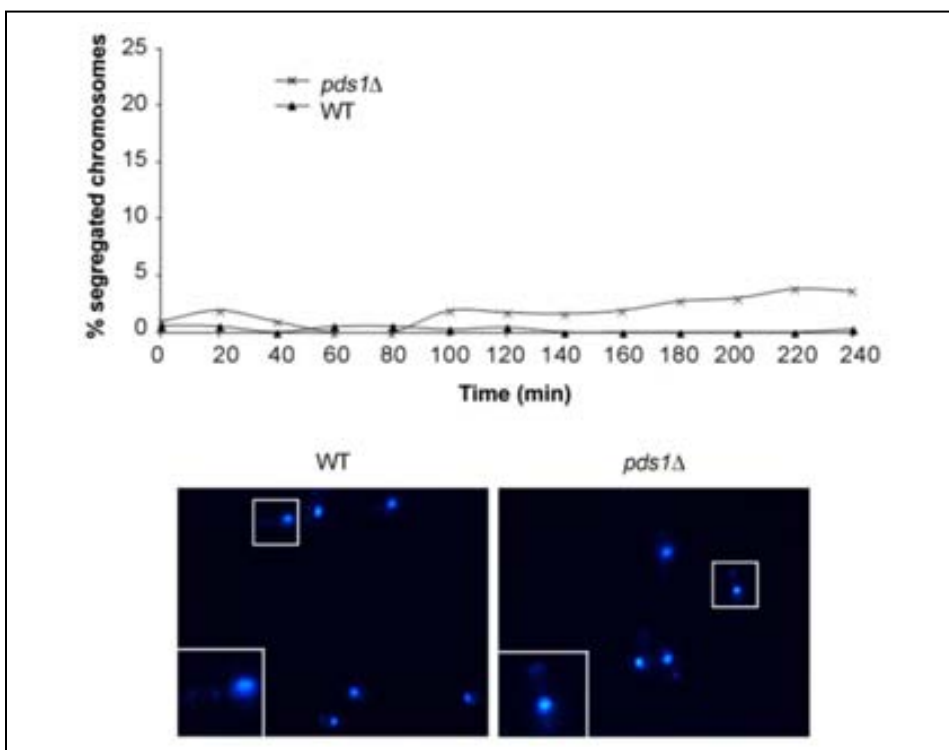


Figura 47. La deleció de Pds1 no és suficient per entrar en mitosi en presència de dany al DNA generat per MMS. **Panell superior,** percentatge de cèl·lules que mostren segregació del DNA. Cultius de les soques YGP20 (WT, salvatge) i YRP34 (*pds1Δ*) es varen sincronitzar a G1 pre-Start i varen alliberar a fase S en presència de dany al DNA (0,033% MMS) a 24°C. Es varen contar 120 cèl·lules en cadascun dels dos experiments independents. Les dades es representen com mitjana dels dos experiments, sense càlcul de desviació estàndard. **Panell inferior,** nuclis visualitzats per microscòpia de fluorescència (DAPI). Es mostren camps representatius de les soques indicades 240 minuts després d'alliberar les cèl·lules de G1.

4.1.1 La progressió del cicle cel·lular a temperatura permissiva no està alterada en el mutant *pds1Δ*

PDS1 no és essencial, però el mutant nul és termosensible: a temperatura restrictiva (37°C) les cèl·lules són inviables i presenten problemes d'elongació dels fusos mitòtics durant l'anafase. Els defectes en els fusos mitòtics són deguts a problemes en l'assemblatge de la maquinària d'aquests a la transició G1/S (Yamamoto et al. 1996a). Degut a la termosensibilitat dels mutants *pds1* i als defectes d'elongació dels fusos mitòtics associats a aquests mutants, s'ha treballat a temperatura restrictiva amb els mutants *pds1Δ*.

Malgrat que a temperatura permissiva (24°C) no mostra defectes de viabilitat, està descrit que presenta un cicle cel·lular més llarg que la soca salvatge. Per descartar que defectes associats a la deleció de *Pds1* afectin la progressió del cicle cel·lular, vàrem estudiar el comportament d'una soca *pds1Δ* en un cicle cel·lular no pertorbat a temperatura permissiva (24°C).

Cultius exponencials de la soca salvatge (WT) i de la deleció de *Pds1* (*pds1Δ*) es van sincronitzar a G1 pre-Start i aleshores es van alliberar a una fase S no compromesa (Materials i Mètodes 5.3). A continuació es van recollir alíquotes cada 10 minuts durant aproximadament un temps de generació. Aquestes alíquotes es van emprar per comparar la progressió del cicle cel·lular mitjançant (1) immunoblots contra Pol12 i contra Clb2, com a marcadors de G2/M (Materials i Mètodes 6.1, 6.2 i 6.4) (2) índex de gemmació (BI) (3) contingut de DNA per citometria de flux (Materials i Mètodes 5.1 i 5.6) i (4) percentatge de cèl·lules post-anafase per microscòpia de fluorescència DAPI (Materials i Mètodes 7.1).

En la Figura 48 s'observa que les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1, d'acord al contingut 1C de DNA que s'observa per citometria de flux i l'índex de gemmació (BI). Tant les cèl·lules salvatges (WT) com les *pds1Δ* varen ser sincrònicament alliberades tal i com mostra la progressió de l'índex de gemmació (BI). A més, ambdues soques repliquen passant de 1C a 2C de DNA sense diferències. Per altra banda, en la Figura 48, s'observa que la ciclina mitòtica Clb2 apareix

simultàniament en les dues soques i no s'observen diferències significatives en el temps de fosforilació de Pol12. Aquests resultats suggereixen que l'activitat CDK mitòtica no està alterada en absència de Pds1. Finalment, les cèl·lules *pds1Δ* entren en anafase amb només un lleuger retard respecte les cèl·lules silvestres.

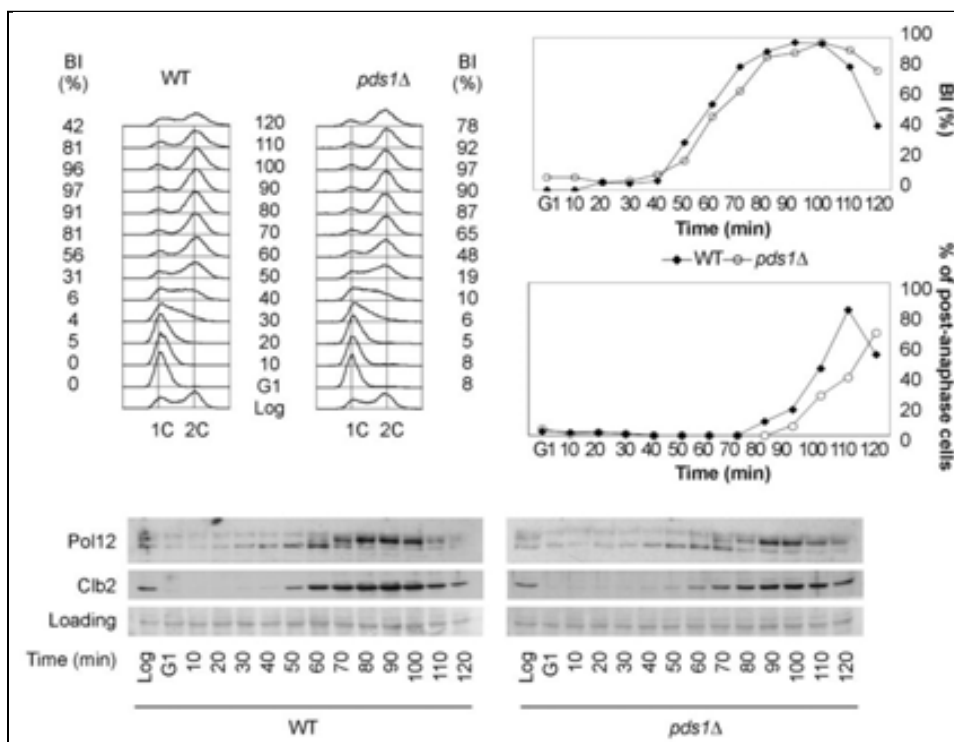


Figura 48. L'absència de Pds1 no afecta la replicació, la divisió o l'activitat Cdk1 mitòtica. Les soques YGP20(WT, salvatge) i YRP34 (*pds1Δ*) van ser sincronitzades a G1 pre-Start a 24°C i alliberades sincrònicament a una fase S no pertorbada. La citometria de flux, els índex de gemmació (BI) i percentantges de cèl·lules post-anafàsiques es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament tal i com mostra la citometria de flux, la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI). Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, s'han analitzat per immunoblot anti-Clb2 i anti-Pol12. Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

4.2 La presència d'activitat Cdk1 mitòtica en mutants *rad53 swe1* no és suficient per permetre la segregació cromosòmica en presència de dany al DNA

En llevat de fissió el *checkpoint* de fase S impedeix la mitosi estabilitzant Wee1 i la fosforilació de la tirosina 15 de Cdk1 (Nurse 1997; Peng et al. 1997; Furnari et al. 1997; Rhind et al. 1997; Rhind & Russell 1998; Walworth et al. 1993; O'Connell et al. 1997). Com ja hem descrit a dalt (Resultats 2.7), al llevat de gemmació la deleció de Swe1 no és suficient per observar activitat Cdk1 mitòtica en presència de dany al DNA, però sí la doble deleció de Swe1 i Rad53.

Per explorar si la presència d'activitat Cdk1 de fase M és suficient per permetre segregació indeguda de cromosomes danyats, vàrem analitzar el comportament de les cèl·lules *rad53-21 swe1Δ*, així com els mutants individuals *rad53-21* i *swe1Δ*.

Les cèl·lules es van sincronitzar a G1 pre-Start i aleshores es van alliberar a fase S en presència de dany al DNA (Materials i Mètodes 5.4). Es van recollir mostres cada 20 minuts durant 240 minuts. Es va analitzar per microscòpia de fluorescència DAPI el nombre de cèl·lules que segreguen el seu DNA (Materials i Mètodes 7.1).

Tal i com es pot observar en la Figura 49, tant les cèl·lules *swe1Δ* i *rad53-21* com el doble mutant es comporten com la soca salvatge (WT) en presència de dany al DNA. 240 minuts després d'alliberar les cèl·lules *rad53-21 swe1Δ* de G1, aquestes no segreguen el DNA (5% de segregació cromosòmica) tot i no poder inhibir l'activitat Cdk1 mitòtica (Resultats Figura 32). Aquest resultat suggereix que l'activitat Cdk1 mitòtica no és suficient per promoure la segregació dels cromosomes en presència de dany a DNA.

Per tant aquest control és dispensable, bé per irrellevant, bé per redundant.

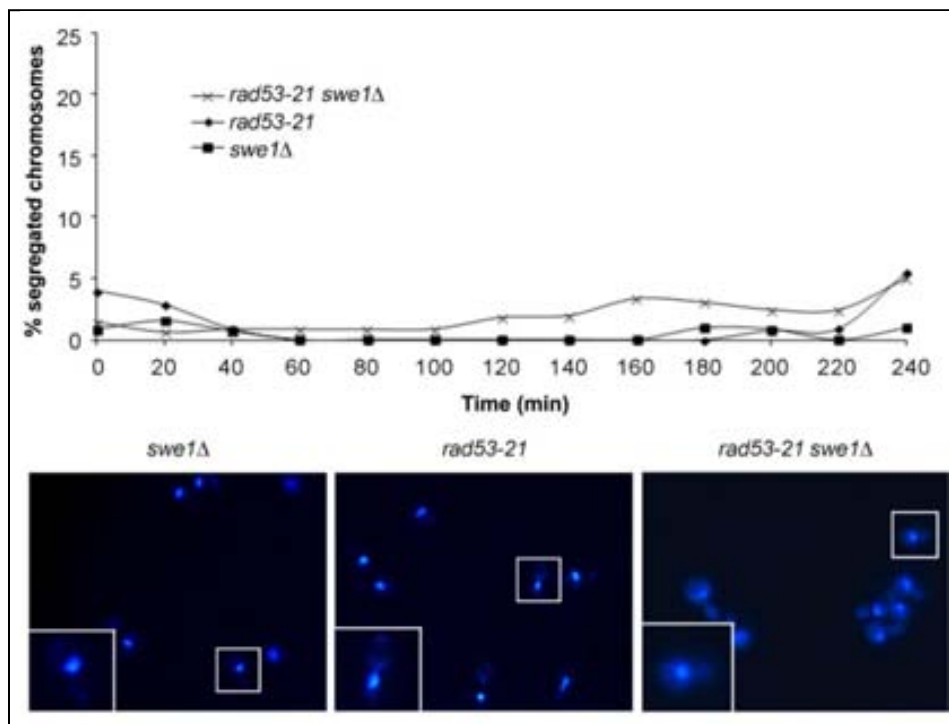


Figura 49. La presència d'activitat Cdk1 mitòtica en mutants *rad53 swe1* no és suficient per permetre la segregació cromosòmica en presència de dany al DNA. **Panell superior**, percentatge de cèl·lules que mostren segregació del DNA. Cultius de les soques YGP98 (*swe1Δ*), YGP38 (*rad53-21*) i YGP121 (*rad53-21 swe1Δ*) es varen sincronitzar a G1 pre-Start i aleshores es varen alliberar a fase S en presència de dany al DNA (0,033% MMS) a 24°C. Es varen contar 120 cèl·lules en cadascun dels dos experiments independents. Les dades es representen com mitjana dels dos experiments, sense càlcul de desviació estàndard. **Panell inferior**, nuclis visualitzats per microscòpia de fluorescència (DAPI). Es mostren camps representatius de les soques indicades 240 minuts després d'alliberar les cèl·lules de G1.

4.3 Les cèl·lules *rad53 swe1 pds1* entren en mitosi en presència de dany al DNA

Hem demostrat a dalt que ni la presència de l'activitat Cdk1 mitòtica ni la deleció de Pds1/secarina són suficients per permetre segregació dels cromosomes en presència de dany al DNA generat per MMS (Resultats 4.1).

A la vista d'aquests resultats vàrem contemplar la possibilitat que tant la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica com l'estabilització de Pds1 en

Resultats

resposta a dany al DNA siguin individualment suficients per impedir l'anafase. Per examinar aquesta hipòtesi es va analitzar el comportament de la soca triple mutant *rad53-21 swe1Δ pds1Δ* en presència de dany al DNA.

Cèl·lules *rad53-21 swe1Δ pds1Δ* sincronitzades a G1 pre-Start i es van alliberar a fase S en presència de dany al DNA generat per MMS (Materials i Mètodes 5.4). Es van recollir mostres cada 20 minuts durant 240 minuts i es va analitzar per microscòpia de fluorescència DAPI el nombre de cèl·lules que segreguen el seu DNA (Materials i Mètodes 7.1).

En la Figura 50 s'observa que 240 minuts després d'alliberar les cèl·lules *rad53-21 swe1Δ pds1Δ* de G1, aproximadament el 50% d'aquestes mostren dues masses de DNA separades en presència de MMS. En aquest recompte únicament es van incloure cèl·lules que presenten dues masses separades (Figura 50, fletxa blanca); aquells casos en que dues masses ben definides (anafase) romanen connectades no es van incloure al recompte (Figura 50, fletxa grisa).

Per tant, únicament el triple mutant *rad53-21 swe1Δ pds1Δ*, incapaç tant d'inhibir l'activitat Cdk1 mitòtica com d'estabilitzar Pds1/securina, presenta segregació dels cromosomes en presència de dany al DNA.

Com a control de la rellevància del paper de Swe1 en aquest control, es va repetir el mateix experiment en una soca *rad53-21 pds1Δ*. Com s'observa en la Figura 50, la soca *rad53-21 pds1Δ* manté la capacitat d'evitar la segregació cromosòmica en presència de dany al DNA; malgrat la quinasa efectora del *checkpoint* (Rad53) no és funcional i Pds1 ha estat deletat. Aquest resultat, sumat als anteriors confirmen que Swe1 té, per sí sol, el poder d'inhibir la segregació cromosòmica en resposta a estrès genotòxic en *S. cerevisiae*.

Conjuntament amb els resultats amb el doble mutant *rad53-21 swe1Δ* mostrats a dalt (Figura 49), on Pds1 sol també té la capacitat de bloquejar la segregació dels cromosomes danyats per metilació amb MMS, els nostres resultats mostren que cadascuna de les branques implicades és suficient per impedir l'anafase prematura en resposta a estrès genotòxic.

Aquesta redundància explica la dispensabilitat tant de Swe1 com de Pds1 en el control de la segregació dels cromosomes en resposta a dany al DNA en fase S.

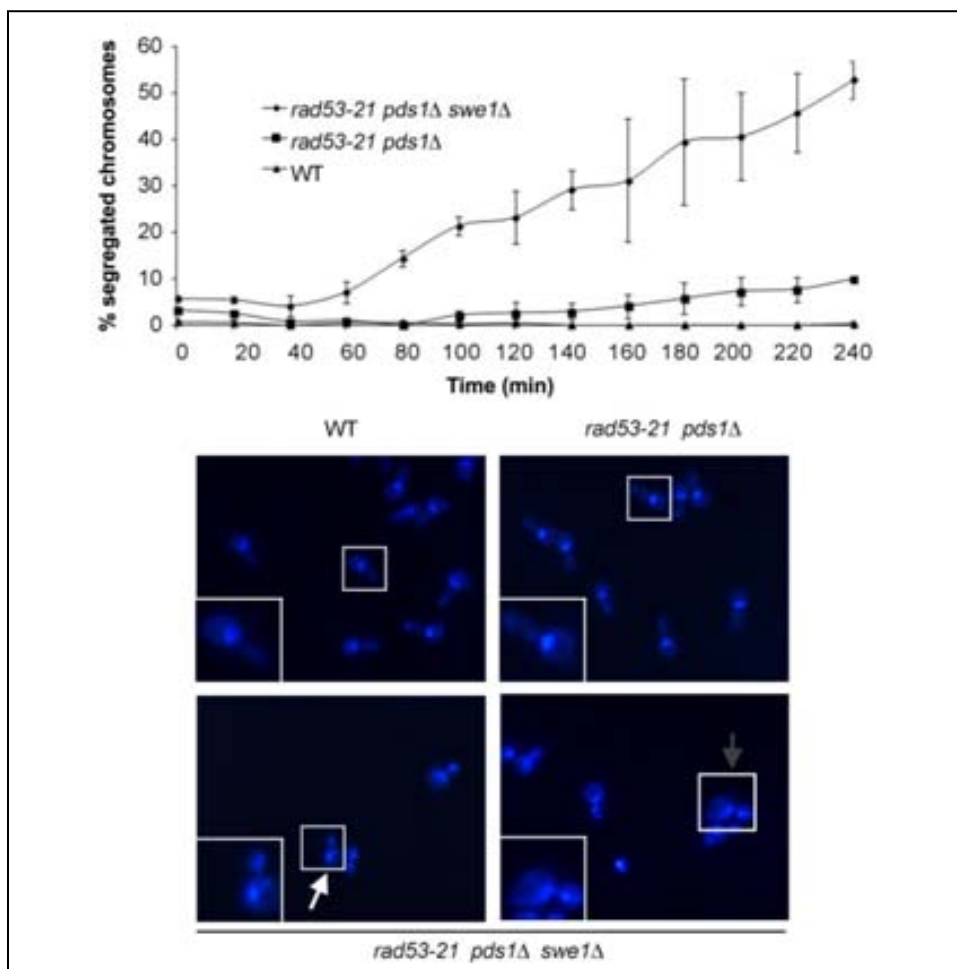


Figura 50. Rad53, Swe1 i Pds1/secarina constitueixen el mecanisme efector del control de la segregació cromosòmica en resposta a dany al DNA. Panell superior, percentatge de cèl·lules que mostren segregació del DNA. Cultius de les soques YGP20 (WT, salvatge), YGP208 (*rad53-21 pds1Δ*) i YGP201 (*rad53-21 swe1Δ pds1Δ*) es van sincronitzar a G1 pre-Start i es van alliberar a fase S en presència de dany al DNA (0,033% MMS) a 24°C. Es varen contar 120 cèl·lules en tres experiments independents. Les dades es representen com mitjana dels experiments ± Desviació Estàndard (barres d'error). **Panell inferior,** nuclis visualitzats per microscòpia de fluorescència (DAPI). Es mostren camps representatius de les soques indicades 240 minuts després d'alliberar les cèl·lules de G1. Les fletxes blanques representen cèl·lules comptades com casos en que té lloc segregació del DNA mentre que les grises són casos exclusos del recompte.

4.3.1 La soca *rad53-21 swe1Δ pds1 Δ* segrega cromosomes en presència de dany al DNA sense haver completat la replicació

A diferència de l'efecte de l'estrès replicatiu agut, en que la replicació s'atura amb un contingut de DNA aproximadament de 1C, la presència de dany per metilació del DNA alenteix però no impedeix la replicatiu (Paulovich & Hartwell 1995). A més, l'absència de resposta *checkpoint* permet una replicació ràpida, semblant a la que es produeix en absència de dany al DNA (Paulovich & Hartwell 1995).

A la Figura 51. Es pot observar que en la soca salvatge (WT) la presència de dany al DNA dóna lloc a l'alentiment de la progressió de la replicació del DNA degut a la inhibició dels orígens de replicació tardans pel *checkpoint* de fase S (Santocanale & Diffley 1998; Tercero & Diffley 2001). Transcorreguts 240 minuts després d'alliberar de G1 pre-Start, les cèl·lules salvatges no han acabat la replicació. En canvi, les soques amb l'al·lel *rad53-21*, incapaces d'inhibir l'activació dels orígens tardans, presenten una replicació que progressa a un ritme semblant al de la replicació en absència de dany al DNA (Paulovich & Hartwell 1995; Santocanale & Diffley 1998).

A la vista que els mutants del *checkpoint* assoleixen un contingut de DNA 2C al final de l'experiment (Figura 51), existia la possibilitat que en el cas del triple mutant (*rad53-21 swe1Δ pds1Δ*) la segregació cromosòmica observada tingués lloc un cop les cèl·lules ja han acabat la replicació i per tant no durant la crisi replicativa. Dos arguments van en contra d'aquesta possibilitat. En primer lloc, cap de les soques control mutants *rad53* segreguen cromosomes malgrat també assolir un contingut de DNA aparent de 2C (Figura 51). En segon lloc, els mutants deficients del *checkpoint* no poden completar la replicació en presència de dany al DNA donat que les forquilles de replicació és col·lapsen irreversiblement en trobar una lesió, deixant zones no replicades malgrat que per citometria de flux les cèl·lules semblen completar la replicació a l'engròs (Tercero & Diffley 2001; Lopes et al. 2001).

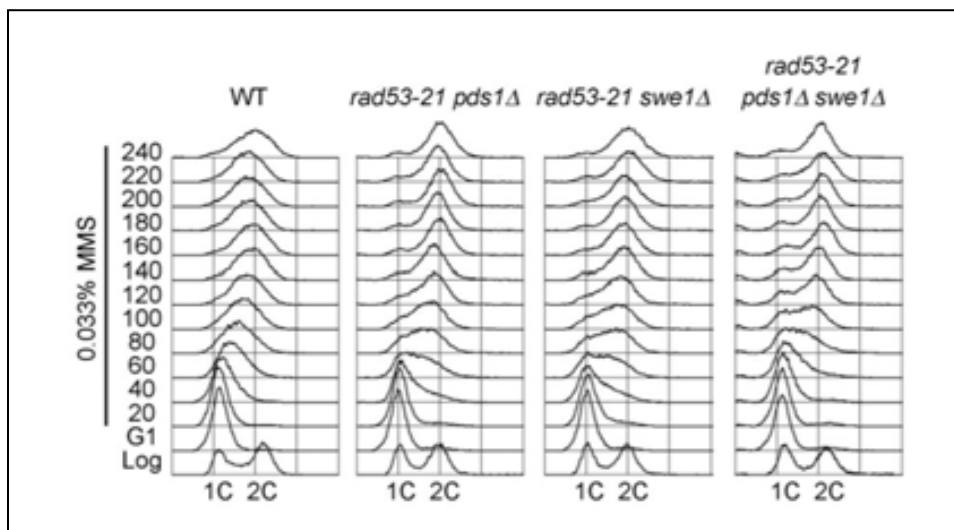


Figura 51. Els mutants deficients del *checkpoint* assoleixen un contingut de DNA en presència de dany al DNA proper a 2C. El contingut de DNA de les soques YGP20(WT, salvatge), YRP11 (*rad53-21 swe1Δ*), YGP208 (*rad53-21 pds1Δ*) i YGP201 (*rad53-21 pds1Δ swe1Δ*) corresponents a l'experiment mostrat a les Figura 50, va ser analitzat mitjançant citometria de flux amb iodur de propidi (Materials i Mètodes 5.6).

Tanmateix per comprovar si la replicació és completa o incompleta en el sistema experimental s'han analitzat els cromosomes per CHEF-PFGE (Materials i Mètodes 6.9).

Cèl·lules salvatges (WT), *pds1Δ*, *rad53-21 pds1Δ* i *rad53-21 pds1Δ swe1Δ* es van sincronitzar a G1 pre-Start. Com a control de cromosomes sense replicons actius es va agafar una mostra de cèl·lules aturades en α -factor. A continuació les cèl·lules es van alliberar a fase S en presència de 0.033% MMS per tal de generar dany de metilació al DNA. Passats 240 minuts (últim punt analitzat en els experiments anteriors) es va prendre una mostra per determinar si els cromosomes han acabat de replicació (Materials i Mètodes 5.4).

Com s'observa en la Figura 52, 240 minuts després d'alliberar les cèl·lules de G1 cap s'ha completat la replicació: en tots els casos els cromosomes tenen regions en replicació que impedeixen la seva entrada al gel (Desany et al. 1998). Per tant, es pot descartar que la segregació

Resultats

observada en triple mutant *rad53-21 pds1Δ swe1Δ* sigui fruit de la normal finalització de la replicació.

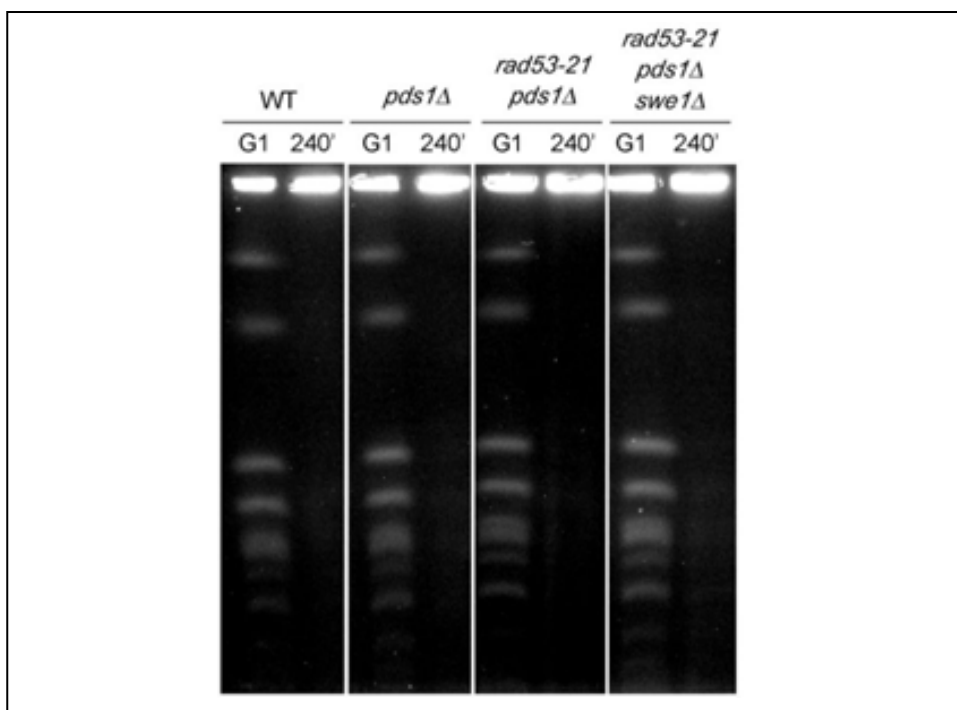


Figura 52. Els mutants deficients del *checkpoint* no completen la replicació en presència de dany al DNA. Les soques YGP20 (WT, salvatge), YRP34 (*pds1Δ*), YGP208 (*rad53-21 pds1Δ*) i YGP201 (*rad53-21 pds1Δ swe1Δ*) van ser sincronitzades a G1 pre-Start a 24°C i alliberades sincrònicament a una fase S en presència de dany al DNA (0.033% MMS). Mostres sincronitzades a G1 pre-Start i 240 minuts després d'alliberar de G1 es van analitzar per CHEF-PFGE.

4.4 L'al·lel Swe1-AQ reemplaça el mutant nul *swe1Δ* pel que fa a la pèrdua de control de la segregació del DNA

Prèviament hem descrit que l'al·lel no fosforilable per Mec1 (Swe1-AQ) es equiparable a la deleció *swe1Δ* en la regulació de l'activitat Cdk1 mitòtica en una fase S compromesa (Resultats 2.6). Per tal d'explorar si l'al·lel Swe1-AQ pot reemplaçar la deleció de Swe1 també en el control de la mitosi s'ha analitzat la segregació del DNA en el mutant *rad53-21 swe1-AQ pds1Δ* en presència de MMS.

Un cultiu de la soca triple mutant (*rad53-21 swe1-AQ pds1Δ*) en creixement exponencial a 24°C es va sincronitzar a G1 pre-Start i es va alliberar a fase S en presència de dany al DNA generat per MMS (Materials i Mètodes 5.4). Es van recollir mostres cada 20 minuts durant 240 minuts i es va analitzar per microscòpia de fluorescència DAPI el nombre de cèl·lules que segreguen el seu DNA (Materials i Mètodes 7.1).

En la Figura 53 es pot observar que 240 minuts després d'alliberar de G1 pre-Start el 40% de les cèl·lules estan segregant el DNA en presència de MMS. A la vista d'aquest resultat, l'al·lel Swe1-AQ, no fosforilable per Mec1, reemplaça la deleció de Swe1 en el control de la segregació cromosòmica en presència de dany al DNA, tot i que la proteïna s'expressa i és funcional (Figura 37).

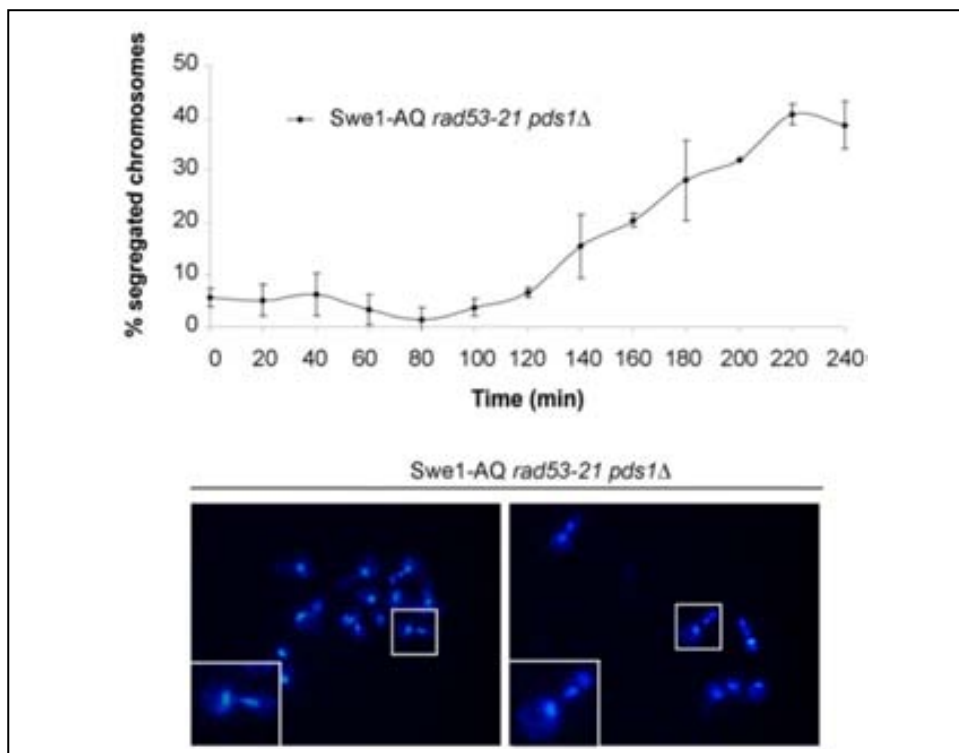


Figura 53. L'al·lel Swe1-AQ reemplaça el mutant nul *swe1Δ* pel que fa a la pèrdua de control de la segregació del DNA. Panell superior, percentatge de cèl·lules que mostren segregació del DNA. Un cultiu de la soca YRP107 (*Swe1-AQ rad53-21 pds1Δ*) es va sincronitzar a G1 pre-Start i es va alliberar a fase S en presència de dany al DNA (0,033% MMS) a 24°C. Es varen comptar 120 cèl·lules en cadascun dels tres experiments independents. Les dades es representen com mitjana dels experiments ± desviació estàndard (barres d'error). Panell inferior, nuclis tenyits amb DAPI i visualitzats per microscòpia de fluorescència. Es mostren caps representatius de les soques indicades 240 minuts després d'alliberar les cèl·lules de G1.

4.5 En absència de Pds1/securina, Rad53 impedeix el tall de la cohesina, contribuint a evitar la segregació cromosòmica

En un cicle de divisió cel·lular no pertorbat Pds1/securina inhibeix l'activitat Esp1/Separasa fins a la transició metafase-anafase quan l'activitat Cdk1 mitòtica fosforila APC i promou la unió de Cdc20 (Rudner & Murray 2000). APC^{Cdc20} actiu poli-ubiquitina i marca per degradació Pds1, fet que comporta l'alliberació de l'activitat Esp1. La Separasa talla la

subunitat Mcd1 del complex cohesina en els residus R268 i R180, permetent així la segregació de les cromàtides germanes, l'anafase (Uhlmann et al. 1999) (Introducció 2.3.2).

El triple mutant *rad53-21 pds1Δ swe1Δ* és incapaç de bloquejar la segregació cromosòmica en resposta a la presència de dany al DNA (Figura 50). És per tant raonable esperar que, en aquestes condicions, el triple mutant presenti tall de la cohesina. Per explorar aquesta possibilitat, vàrem analitzar el tall de la cohesina en presència de MMS en la soca *rad53-21 pds1Δ swe1Δ*.

Cèl·lules salvatges (WT), *pds1Δ*, *rad53-21 pds1Δ* i triple mutant (*rad53-21 pds1Δ swe1Δ*) es van sincronitzar a G1 pre-Start i es van alliberar a fase S en presència de dany al DNA (Materials i Mètodes 5.4). Es varen recollir mostres als temps indicats i es van analitzar per immunoblot contra Mcd1. La progressió del cicle cel·lular es va monitoritzar a través de la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI) (Materials i Mètodes 5.1).

Respecte a la cohesina, en la Figura 54 s'observa que la soca salvatge (WT) i, sorprenentment, *pds1Δ* no presenten tall de la cohesina en presència de MMS. Únicament s'observa una banda a l'alçada de 125 kDa corresponent a la proteïna sencera (Uhlmann et al. 1999).

En canvi la soca *rad53-21 pds1Δ swe1Δ*, que presenta segregació del DNA en presència de MMS (Figura 50) i la *rad53-21 pds1Δ* mostren dues bandes. Una banda superior (125 KDa), corresponent a la proteïna sencera, i una segona banda de aproximadament 75 KDa corresponent al fragment C-terminal de Mcd1 generat pel tall de Esp1 al residu R268.

Aquest resultat suggereix que en presència de dany al DNA l'activitat Esp1/separasa no està regulada únicament per Pds1/secarina. Un segon nivell de control, aparentment dependent de Rad53, la quinasa efectora del *checkpoint* de la fase S, impedeix el tall de la subunitat Mcd1 de la cohesina en aquestes condicions.

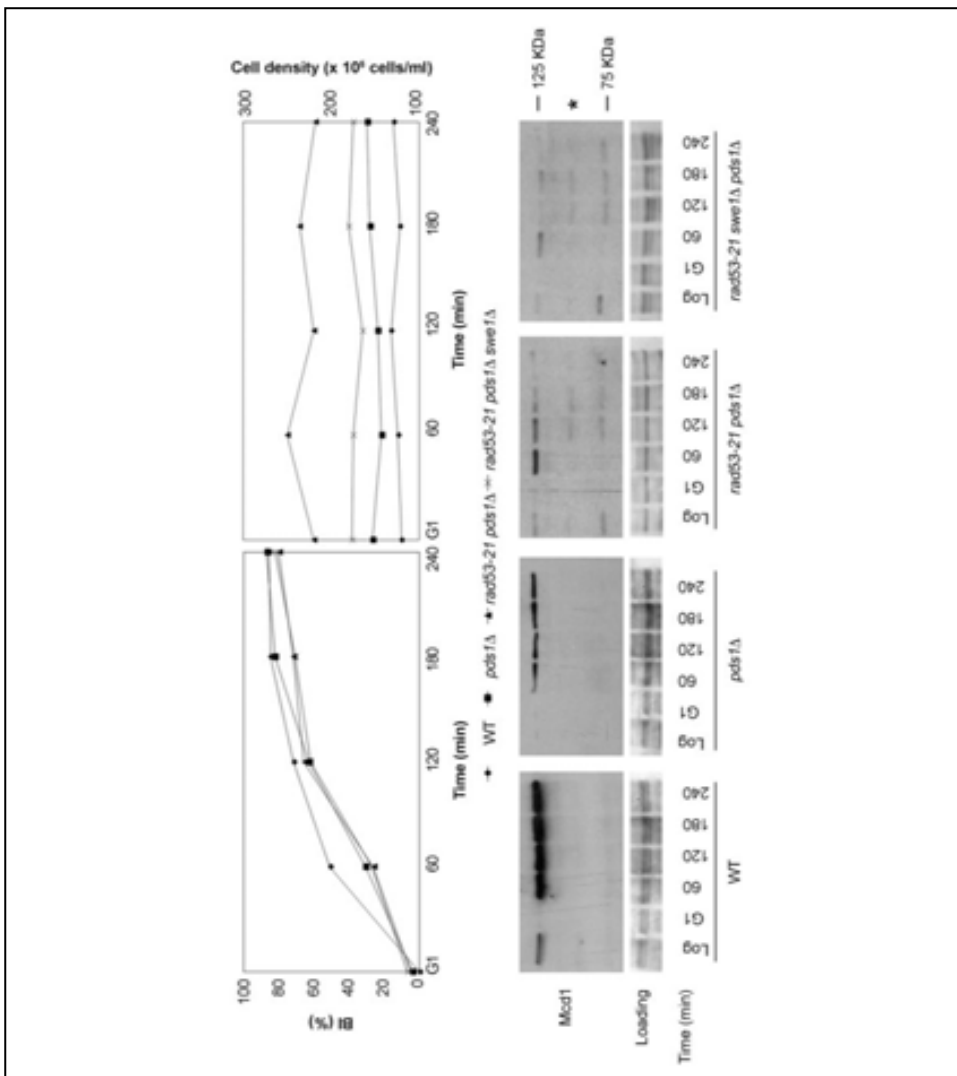


Figura 54. Absència de tall de la cohesina en mutants nuls *pds1Δ* en presència de dany al DNA: existència d'un control dependent de Rad53. Les soca YRP171 (WT, *MCD1-13myc*), YRP172 (*pds1Δ MCD1-13myc*), YRP102 (*rad53-21 pds1Δ MCD1-13myc*) i YRP101 (*rad53-21 swe1Δ pds1Δ MCD1-13myc*) van ser sincronitzades a G1 pre-Start i alliberades sincrònicament a fase S en presència de dany al DNA (0.033% MMS) a 24°C. Els índex de gemmació (BI) i densitats cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament tal i com mostren els índexs de gemmació (BI) i densitats cel·lular. Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, s'han analitzat per immunoblot anti-Myc (*Mcd1*). Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading). (*) Banda no analitzada.

4.6 El mutant de cohesió *scc1-73* també permet la segregació cromosòmica en presència de dany al DNA en cèl·lules incapaces d'inhibir l'activitat Cdk1 mitòtica

Un estudi realitzat amb un mutant condicional termosensible de *pds1*, va revelar problemes durant la segregació cromosòmica quan es passava a temperatura restrictiva en cèl·lules sincronitzades amb α -factor (Yamamoto et al. 1996a). Aquesta observació, sense més detall molecular, ha estat generalment interpretada com que l'absència de funció Pds1 a G1 pre-Start podria afectar l'establiment de la cohesió. A més, Pds1/securina sembla ser necessari per mantenir Esp1/separasa inactiva en presència de baixos nivells d'estrès replicatiu (però no en presència d'estrès replicatiu agut com l'emprat en aquest treball de tesi) (Hsu et al. 2011).

A la vista d'aquestes consideracions, podria objectar-se que la segregació cromosòmica observada en el mutant *rad53-21 swe1 Δ pds1 Δ* és un artefacte de la manca de Pds1. Tanmateix, no observem segregació cromosòmica en presència de dany al DNA a la soca *rad53-21 pds1 Δ* , ni a altres combinacions amb *pds1 Δ* no inclosos en aquesta tesi. No obstant vàrem voler comprovar la predicció que en un fons *rad53-21 swe1 Δ PDS1⁺*, el mutant *scc1-73*, un al·lel condicional termosensible de Mcd1 (Michaelis et al. 1997), hauria de permetre la segregació dels cromosomes en presència de dany al DNA.

Una limitació experimental ve imposada pel fet que el dany al DNA generat pel MMS varia amb la temperatura. És sabut que la dosi habitual de l'agent metilant, 0,033% (v/v) a 24°C, produeix a 37°C un dany extensiu que impedeix la progressió del cicle cel·lular en cèl·lules silvestres. Per aquest motiu, a 37°C la dosi emprada per tal d'activar el checkpoint de fase S tot i mantenint la viabilitat és de 0,022% (v/v).

La Figura 55 compara la progressió de la replicació en cèl·lules salvatges exposades a 0,033% (v/v) MMS a 24°C i a 0,022% (v/v) a 37°C. En ambdues condicions les cèl·lules entren en cicle (cosa que no succeeix amb 0,033% MMS a 37°C, no es mostra), tal i com indica l'índex de gemmació (BI). Així mateix, mitjançant citometria de flux podem observar

Resultats

que la menor concentració de MMS a 37°C aconseguí un alentiment de la replicació equivalent a les condicions habituals de 0,033% MMS. Aquest alentiment indica l'activació del *checkpoint* de fase S (Paulovich & Hartwell 1995; Santocanale & Diffley 1998). Per tant, per analitzar la segregació cromosòmica a 37°C emprarem la concentració de 0,022% MMS.

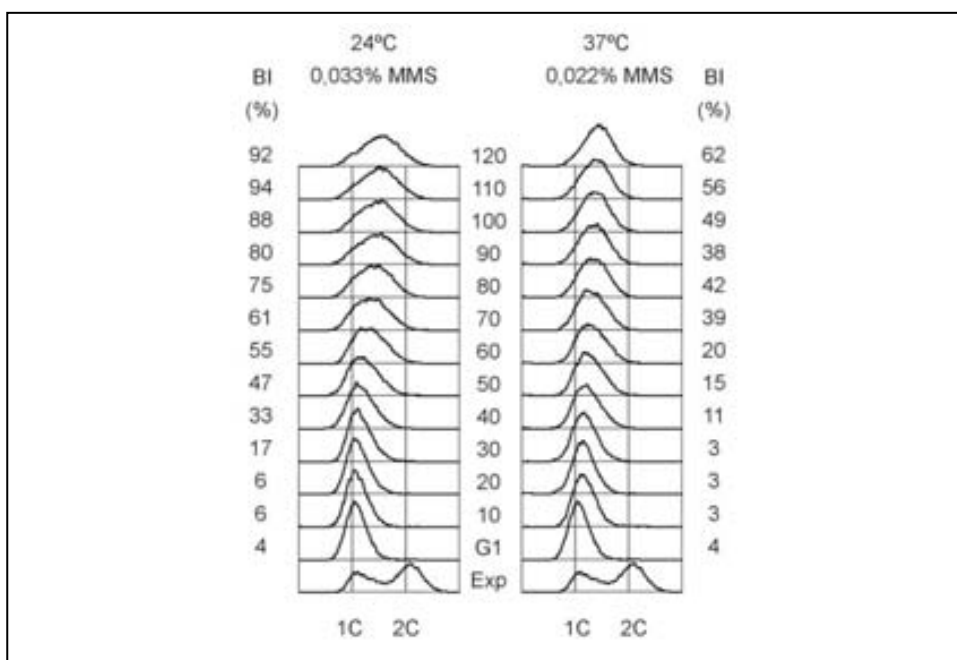


Figura 55. Comparació de la progressió de la replicació a cèl·lules exposades a 0,033% MMS a 24°C i 0,022% MMS a 37°C. Cèl·lules salvatges van ser sincronitzades a G1 pre-Start a 24°C. Aleshores el cultiu es va dividir en dos, una meitat es va mantenir a la mateixa temperatura i l'altra meitat es va transferir a 37°C. Els cultius es van mantenir 1h en aquestes condicions per assegurar la superació del xoc de calor. Les cèl·lules varen ser aleshores alliberades sincrònicament a fase S en presència de 0,033% MMS (cultiu a 24°C) o de 0,022% MMS (cultiu a 37°C). La progressió de la replicació es va seguir per citometria de flux després de tenyir les cèl·lules amb iodur de propidi (Materials i Mètodes 5.6). Els índex de gemmació (BI) es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle.

A continuació, doncs es va analitzar la segregació cromosòmica en presència de dany al DNA en el mutant triple *rad53-21 swe1Δ scc1-73*. Cultius de cèl·lules salvatges (WT), *scc1-73*, *rad53-21 swe1Δ* i triple mutant *rad53-21 swe1Δ scc1-73* en creixement exponencial es

sincronitzen a G1 pre-Start a 24°C. Aleshores es van transferir durant una hora a 37°C per tal de superar el xoc tèrmic. A continuació es van alliberar a fase S en presència de 0,022% MMS a temperatura restrictiva.

En la Figura 56 podem observar per citometria de flux que en presència de dany al DNA, les cèl·lules salvatges i les *scc1-73* presenten la replicació alentida (activació del *checkpoint* de fase S (Paulovich & Hartwell 1995; Santocanale & Diffley 1998)) i al final de l'experiment encara no han completat la replicació del DNA. En canvi, tal i com és d'esperar en els mutants del *checkpoint* de fase S, als mutants *rad53* la replicació progressa ràpidament com si no hi hagués dany al DNA (Paulovich & Hartwell 1995; Santocanale & Diffley 1998) i després de 240 minuts mostren un contingut de DNA pròxim a 2C (malgrat que romanen regions sense replicar (Tercero & Diffley 2001)). Els índex de gemmació (BI) indiquen que les quatre soques analitzades han estat alliberades correctament de G1 a fase S malgrat el xoc tèrmic i la presència de dany al DNA. Es treballa únicament a la temperatura restrictiva, comparant el comportament de l'al·lel salvatge de Mcd1 amb l'al·lel termosensible de Mcd1 *scc1-73*, per evitar treballar amb dues concentracions diferents de MMS.

Resultats

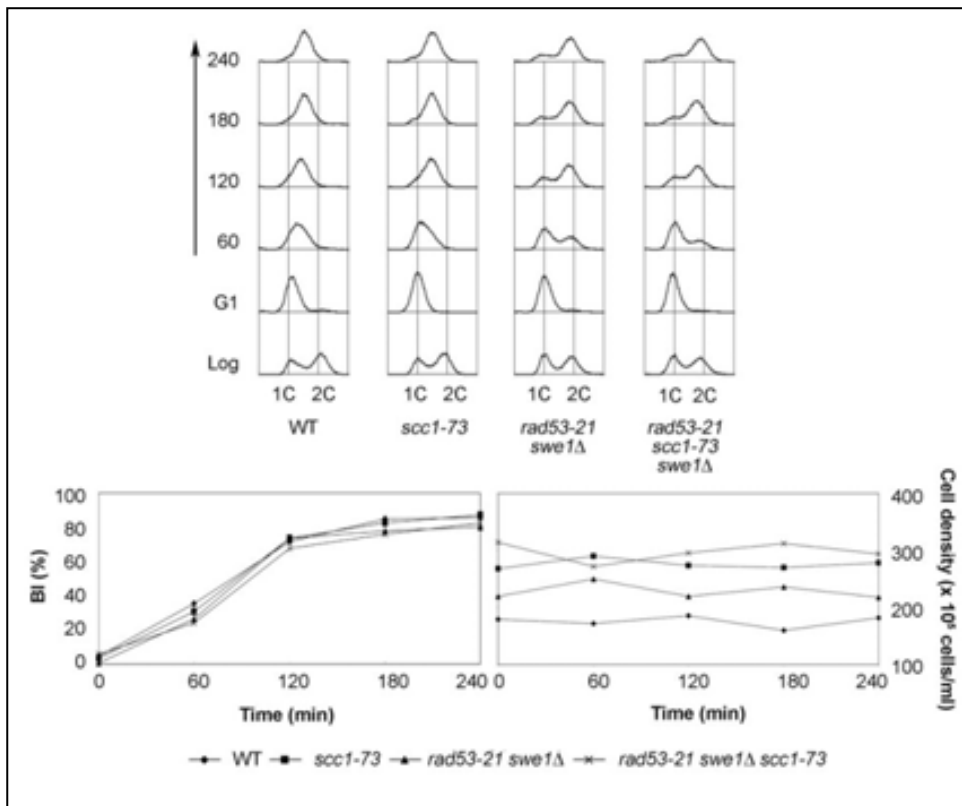


Figura 56. El mutant de cohesina *scc1-73* entra en cicle i replica amb normalitat en presència de dany al DNA a temperatura restrictiva. Cultius de les soques YGP20 (salvatge, WT), YRP175 (*scc1-73*), YGP121 (*rad53-21 swe1Δ*) i YRP170 (*rad53-21 swe1Δ scc1-73*) es varen sincronitzar a G1 pre-Start a 24°C. Aleshores el cultiu es va transferir a 37°C. Els cultius es van mantenir 1h en aquestes condicions per assegurar la superació del xoc de calor. Les cèl·lules varen ser aleshores alliberades sincrònicament a fase S en presència de 0,022% MMS a 37°C. La citometria de flux, els índex de gemmació (BI) i densitat cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle.

A continuació es va analitzar el percentatge de cèl·lules que segreguen el DNA en les soques salvatge, *scc1-73*, *rad53-21 swe1Δ* i *rad53-21 swe1Δ scc1-73* 240 minuts després de ser alliberades a 37°C de G1 a fase S en presència de dany al DNA.

En la Figura 57 s'observa que el mutant *scc1-73* no segrega els cromosomes en presència de MMS malgrat el defecte de cohesió a 37°C (Michaelis et al. 1997). A aquest nivell, el mutant *scc1-73* es comporta

com la soca salvatge en aquestes condicions. Per tant, la pèrdua de cohesió no és suficient per permetre la segregació dels cromosomes en presència de dany al DNA en fase S.

En contrast, el triple mutant (*rad53-21 swe1Δ scc1-73*), incapaç d'inhibir l'activitat Cdk1 mitòtica i de mantenir la cohesió de les cromàtides germanes a 37°C, assoleix el mateix nivell de segregació observada en el mutant *rad53-21 swe1Δ pds1Δ* a 24°C i 0.033% MMS (Figura 50). Aquest resultat és significativament major que el de la presència d'imatges post-anafàsiques a la soca *rad53-21 swe1Δ*, presents a aquestes condicions al contrari del que ocorre a 24°C i 0,033% MMS (Figura 49).

Per tant, aquests resultats complementen els obtinguts amb el mutant *rad53-21 swe1Δ pds1Δ*, descartant que el fenotip de segregació cromosòmica observat (Figura 50 i 53) sigui degut a que no s'hagi produït una adequada càrrega de la cohesina a G1 en absència de Pds1 (Yamamoto et al. 1996a). Els resultats confirmen, per tant, que per evitar la segregació cromosòmica en presència de dany al DNA en fase S intervenen tres vies: Rad53, Swe1 i el tall de cohesina.

Resultats

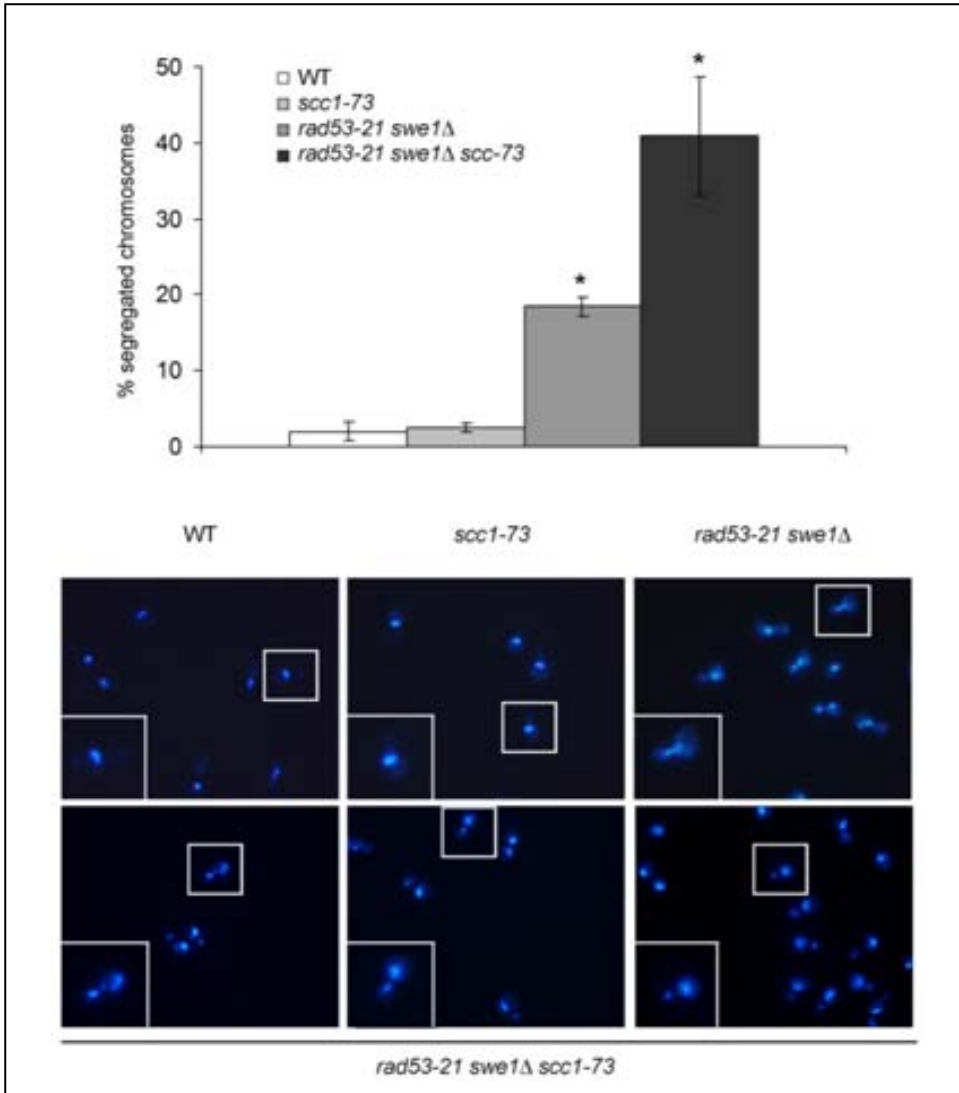


Figura 57. L'al·lel *scc1-73* permet segregació indeguda de cromosomes en presència de dany al DNA en un fons genètic incapaç d'inhibir l'activitat Cdk1 mitòtica. Panell superior, percentatge de cèl·lules que mostren segregació del DNA. Cultius de les soques YGP20 (salvatge, WT), YRP175 (*scc1-73*), YGP121 (*rad53-21 swe1Δ*) i YRP170 (*rad53-21 scc1-73 swe1Δ*) es varen sincronitzar a G1 pre-Start a 24°C. Aleshores el cultiu es va transferir a 37°C. Els cultius es van mantenir 1h en aquestes condicions per assegurar la superació del xoc de calor. Les cèl·lules varen ser aleshores alliberades sincrònicament a fase S en presència de 0,022% MMS a 37°C. Es varen comptar 120 cèl·lules en cadascun dels tres experiments independents. Les dades es representen com mitjana dels experiments \pm desviació estàndard (els asteriscs indiquen diferències significatives entre grups, $P < 0.1$). **Panell inferior**, nuclis tenyits amb DAPI visualitzats per

microscòpia de fluorescència. Es mostren caps representatius de les soques indicades 240 minuts després d'alliberar les cèl·lules de G1.

4.7 El triple *rad53 swe1 pds1* és incapaç d'evitar l'entrada a mitosi també en presència d'estrès replicatiu

Anteriorment hem descrit que el *checkpoint* de fase S inhibeix l'activitat Cdk1 mitòtica en presència de dany al DNA i d'estrès replicatiu (Resultat 2). A diferència del que succeeix en presència de dany al DNA generat per MMS, en una fase S compromesa per estrès replicatiu agut (que és detectat i respost a fase S), la replicació pràcticament no avança. Per tant, la quantitat de DNA no replicat és molt major que en presència de dany al DNA, de manera que la oposició a la segregació és molt major.

Tanmateix, per analitzar si el control de la mitosi descrit per dany al DNA és un mecanisme generalitzable a l'estrès replicatiu s'han repetit els experiments anteriors d'anàlisi de segregació cromosòmica en presència d'hidroxiurea. Amb aquest objectiu cèl·lules salvatges, *rad53-21 pds1Δ* i *rad53-21 pds1Δ swe1Δ* es van sincronitzar a G1 pre-Start i es van alliberar a fase S en presència de 200 mM hidroxiurea, per tal de generar estrès replicatiu agut, detectat i respost en fase S (Materials i Mètodes 5.4).

Malgrat que el senyal nuclear és aproximadament la meitat d'intens que als experiments fets en presència de dany al DNA, i malgrat la dificultat de segregar cromosomes majoritàriament no-replicats. En la Figura 58 podem observar que les cèl·lules triple mutants *rad53-21 pds1Δ swe1Δ* presenten segregació cromosòmica en presència de HU. En contrast, soques control salvatge (WT) i la soca *rad53-21 pds1Δ* mantenen la capacitat d'impedir l'anafase en aquestes condicions.

De nou, la presència de Swe1 a la soca *rad53-21 pds1Δ* és suficient per impedir la segregació indeguda dels cromosomes en presència d'estrès genotòxic.

Aquest resultat mostra que la regulació de l'entrada en mitosi en resposta a dany al DNA i estrès replicatiu està regulada per un mecanisme comú; tal i com també succeeix amb la regulació de l'activitat Cdk1 mitòtica (Figura 32).

Resultats

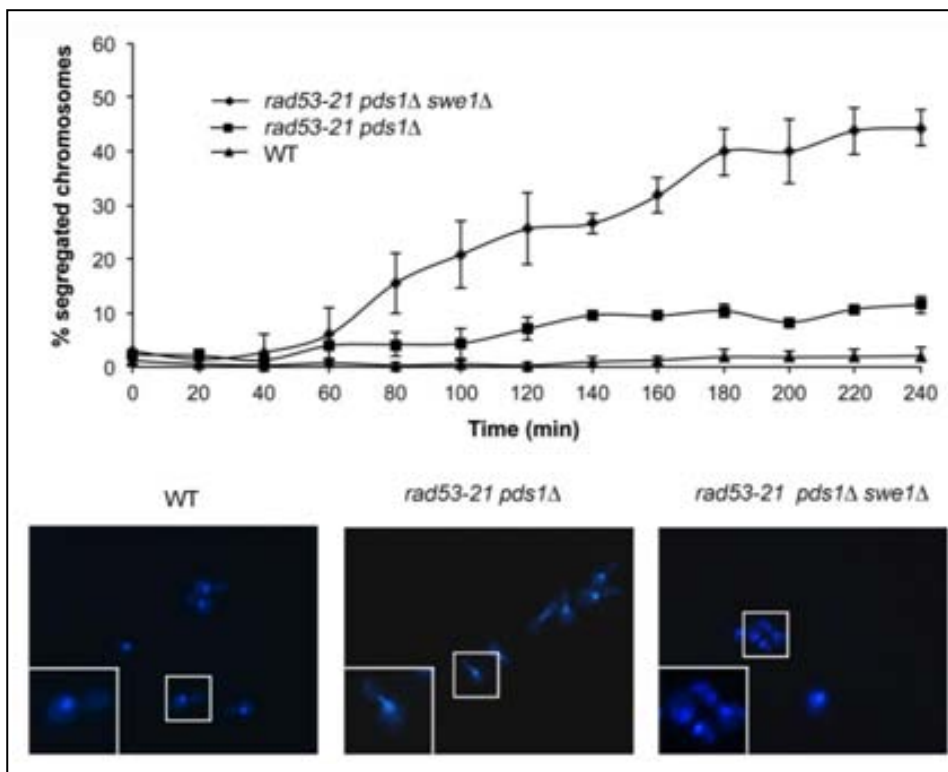


Figura 58. Rad53, Swe1 i Pds1/secarina inhibeixen conjuntament la segregació cromosòmica en resposta a estrès replicatiu. Panell superior. Percentatge de cèl·lules que mostren segregació del DNA. Les soques YGP20 (salvatge, WT), YGP208 (*rad53-21 swe1Δ*) i YGP201 (*rad53-21 swe1Δ pds1Δ*) es sincronitzen a G1 a 24°C i s'alliberen a una fase S en presència d'estrès replicatiu (200 mM HU). Es varen contar 120 cèl·lules en tres experiments independents. Les dades es representen com mitjana dels experiments \pm Desviació Estàndard (barres d'error). **Panell inferior,** nuclis tenyits amb DAPI visualitzats per microscòpia de fluorescència. Es mostren caps representatius de les soques indicades 240 minuts després d'alliberar les cèl·lules de G1.

4.8 La segregació cromosòmica en el triple mutant *rad53-21 pds1Δ swe1Δ* correlaciona amb fusos mitòtics anafàsics

Per tal de distingir si la segregació observada en els triples mutants en presència d'estrès genotòxic és deguda a anafase o bé a un artefacte de disgregació nuclear s'ha analitzat la longitud dels fusos mitòtics en experiments en presència de dany al DNA.

Cultius de cèl·lules salvatges en creixement exponencial es van sincronitzar a G1 pre-Start a 24°C i es van alliberar a fase S en presència de dany al DNA (Materials i Mètodes 5.4). 240 minuts després d'alliberar de G1 es recullen mostres i s'analitzen per microscòpia de fluorescència de cèl·lules vives (Materials i Mètodes 7.2). El marcatge nuclear correspon a histona H2B (gen *HTB2*) fusionada a la proteïna fluorescent mCherry mentre que els fusos mitòtics es visualitzen amb una còpia ectòpica de *TUB1* fusionada a la proteïna fluorescent GFP.

En la Figura 59 s'observa que les cèl·lules salvatges (WT) 240 minuts després de ser alliberades de G1 a una fase en presència de dany al DNA mostren una única massa de DNA i fusos mitòtics transnuclears curts. El mateix s'observa en la soca *pds1Δ* i en el doble mutant *rad53-21 swe1Δ*. Significativament, aquest darrer mutant, malgrat no poder inhibir l'activitat Cdk1 mitòtica i mancar de resposta *checkpoint* de fase S funcional, no allarga els fusos mitòtics en presència de dany al DNA. Únicament s'observa allargament dels fusos mitòtics en el triple mutant *rad53-21 swe1Δ pds1Δ*. Així doncs la segregació cromosòmica observada en aquest mutant es correlaciona amb fusos mitòtics allargats.

Resultats

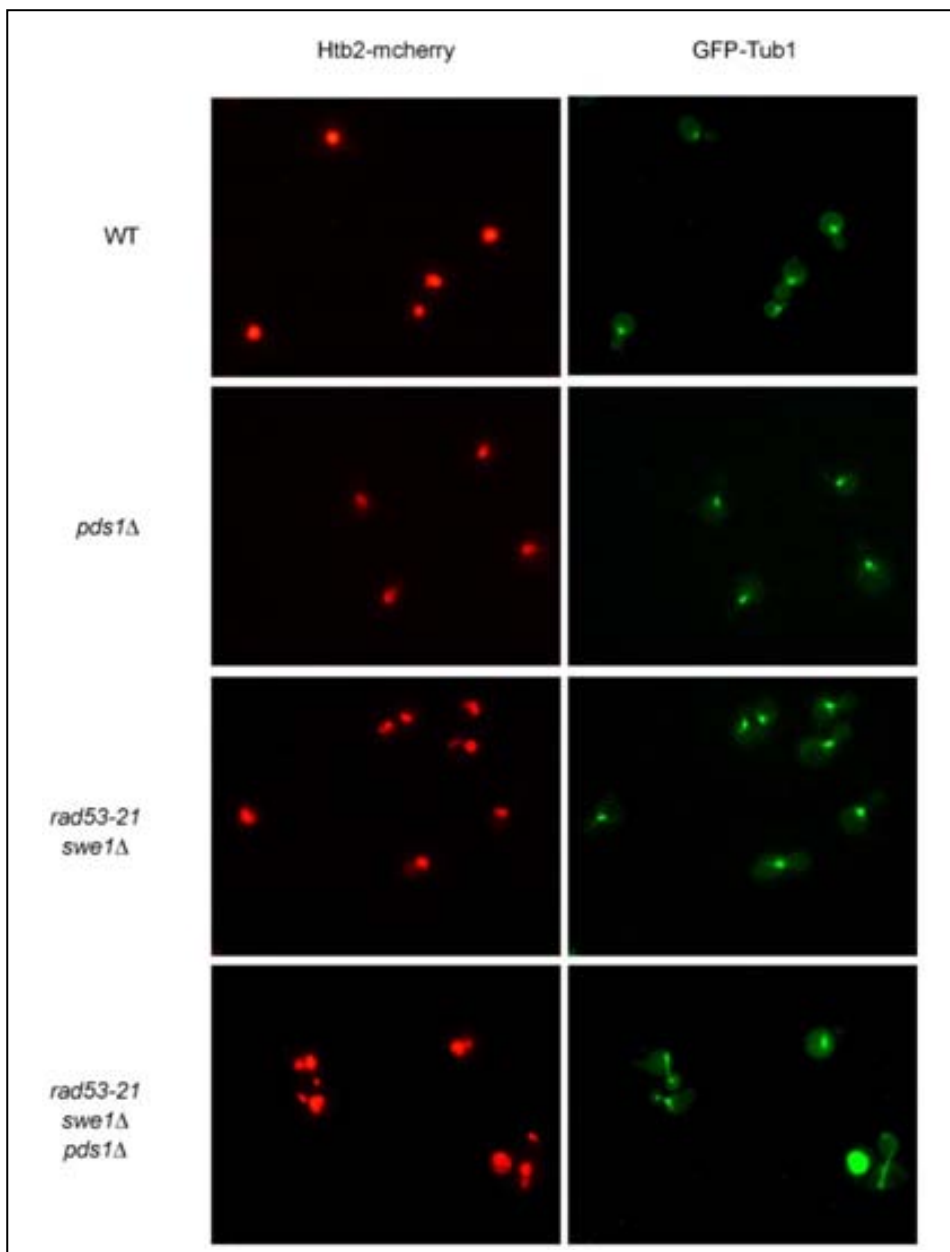


Figura 59. La segregació cromosòmica correlaciona amb fusos mitòtics allargats únicament en el triple mutant *rad53-21 pds1Δ swe1Δ*. Cultius de les soques YRP117 (WT, GFP-TUB1 HTB2-mCherry), YRP160 (*pds1Δ* GFP-TUB1 HTB2-mCherry), YRP119 (*rad53-21 swe1Δ* GFP-TUB1 HTB2-mCherry) i YRP144 (*rad53-21 swe1Δ pds1Δ* GFP-TUB1 HTB2-mCherry) van ser sincronitzats a G1 pre-Start a 24°C i alliberats a fase S en presència de dany al DNA (0.033% MMS). Nuclis visualitzats amb Htb2-mCherry i fusos mitòtics amb GFP-Tub1. Imatges representatives 240 minuts després d'alliberar de G1.

La longitud dels fusos mitòtics indica si són o no anafàsics: longituds entre 5-7 μm de longitud es consideren fusos mitòtics anafàsics primarencs, mentre que longituds superiors als 7 μm es consideren fusos mitòtics d'anafase tardana (Higuchi & Uhlmann 2005).

En el Figura 60 es resumeixen els valors mitjans de la longituds dels fusos mitòtics a partir de 100 cèl·lules, 240 minuts després d'alliberar de G1 pre-Start a fase S en presència de dany al DNA, amb cadascun dels fenotips. Els fusos mitòtics de la soca salvatge presenten una longitud mitjana pròxima als 2 μm , no anafàsics. Aquesta longitud correlaciona amb l'absència de segregació cromosòmica mostrada a la Figura 47 a dalt. Un resultat similar s'obté per les soques *pds1 Δ* i *rad53-21 swe1 Δ* (Figura 60), mentre que la soca de doble mutant *rad53-21 pds1 Δ* presenta fusos mitòtics més llargs, la mitjana dels quals és de 3,3 μm . Aquest increment és degut a la contribució del 10% de cèl·lules *rad53.21 pds1 Δ* que presenten nuclis segregats en aquest punt.

Tanmateix aquest valor és substancialment menor al que obtenim en triple mutant *rad53-21 swe1 Δ pds1 Δ* , on la segregació arriba al 45% de les cèl·lules i la longitud mitjana dels fusos mitòtics és de 5.1 μm . De fet, el valor mig de la longitud dels fusos mitòtics comptant només les cèl·lules de la població que mostren dues masses de DNA segregades és superior. Per tant, podem considerar que una part significativa de les cèl·lules del triple mutant es troben en anafase, d'acord amb la longitud dels seus fusos mitòtics (Higuchi & Uhlmann 2005).

Per altra banda la longitud dels fusos mitòtics pot ser usada com a marcador de l'activitat Cdk1 de fase M. Els fusos mitòtics passen per dues fases d'elongació: una de ràpida en que els fusos mitòtics depassa els 3-4 μm de longitud i una segona fase, en que els fusos mitòtics creixen més lentament fins a la seva longitud màxima, 10 μm (Yeh et al. 1995; Straight et al. 1998; Straight et al. 1997; Pearson et al. 2001). La primera fase d'elongació no requereix activitat Cdk1 mitòtica, mentre que la segon fase sí (Rahal & Amon 2008). Per tant, les longituds assolides a les cèl·lules *rad53-21 pds1 Δ swe1 Δ* , superiors als 4 μm , confirmarien la presència d'activitat Cdk1 mitòtica no reprimida (Figura 32), i indica que

Resultats

aquesta activitat està desregulada a nivell de promoció de l'elongació indeguda dels fusos mitòtics en presència de dany al DNA.

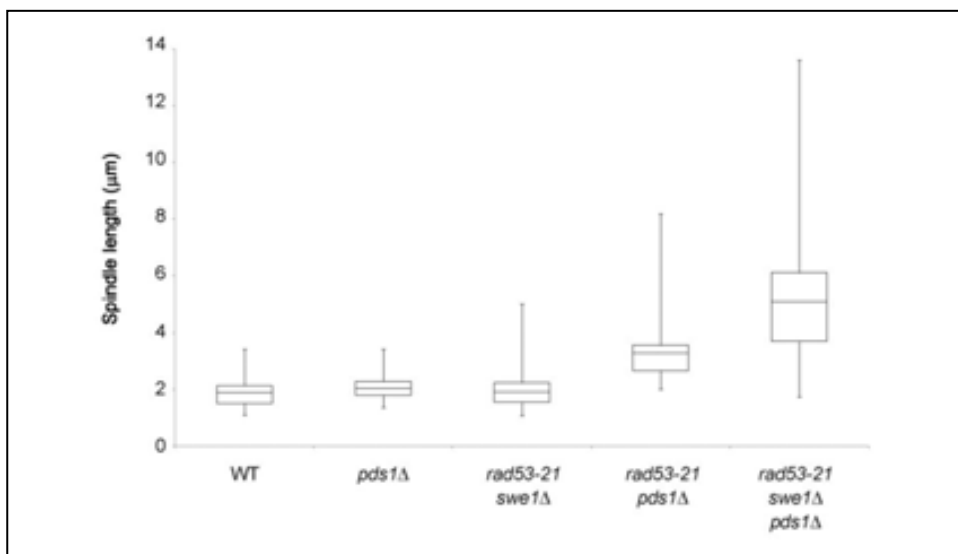


Figura 60. La longitud dels fusos mitòtics del triple mutant *rad53-21 swe1Δ pds1Δ* és anafàsica. Es va mesurar la longitud dels fusos mitòtics 240 minuts després d'alliberar de G1 pre-Start a fase S en presència de 0,033% MMS a 24°C. Els fusos mitòtics de 100 cèl·lules de cadascun dels genotips indicats es van mesurar amb el software *ImageJ* i els resultats es mostren mitjançant un diagrama de caixes i bigotis de gat. Les dues caixes centrals representen el quartil inferior i el superior i estan separats per la mediana de les longituds. Els bigotis representen els valors extrems de la població.

4.9 La segregació cromosòmica en presència d'estrès genotòxic no va acompanyada d'alliberació de Cdc14 del nuclèol

A continuació vàrem caracteritzar en més detall la fase en que es troben les cèl·lules mutants que segreguen el seu materials genètic en presència de dany al DNA. Amb aquest objectiu vàrem analitzar la localització subcel·lular de Cdc14 (Introducció 2.1.2). L'alliberació del nuclèol d'aquesta fosfatasa té lloc en l'anafase i és clau per mantenir els microtúbuls estables i completar aquesta etapa satisfactòriament (Higuchi & Uhlmann 2005).

Per tal d'explorar la localització de Cdc14 vàrem fusionar-la amb la proteïna fluorescent GFP i es van analitzar cèl·lules vives mitjançant microscòpia de fluorescència (Materials i Mètodes 7.2).

Cultius de cèl·lules salvatges, *rad53-21 pds1Δ* i *rad53-21 swe1Δ pds1Δ* en creixement exponencial es van sincronitzar a G1 pre-Start i es van alliberar a fase S en presència de dany al DNA (Materials i Mètodes 5.4). 240 minuts després d'alliberar es va agafar una mostra de cada soca i es va analitzar la localització subcel·lular de Cdc14.

En el panell superior de la Figura 61 es mostren cèl·lules salvatges asincròniques. S'observen cèl·lules amb Cdc14 nucleolar (la localització de la fosfatasa no coincideix amb el marcatge nuclear (Htb2-mCherry)) o alliberada del nuclèol.

es mostren cèl·lules salvatges sincronitzades a G1 pre-Start com a control de Cdc14 localitzat en el nuclèol mentre que en el panel B es mostren les tres soques esmentades anteriorment 240 minuts després d'alliberar-les de G1 a una fase S en presència de dany al DNA. Es pot observar que tant les cèl·lules salvatges, que no segreguen el DNA, com les dues soques amb fusos mitòtics allargats mostren Cdc14 reclòs en el nuclèol.

Resultats

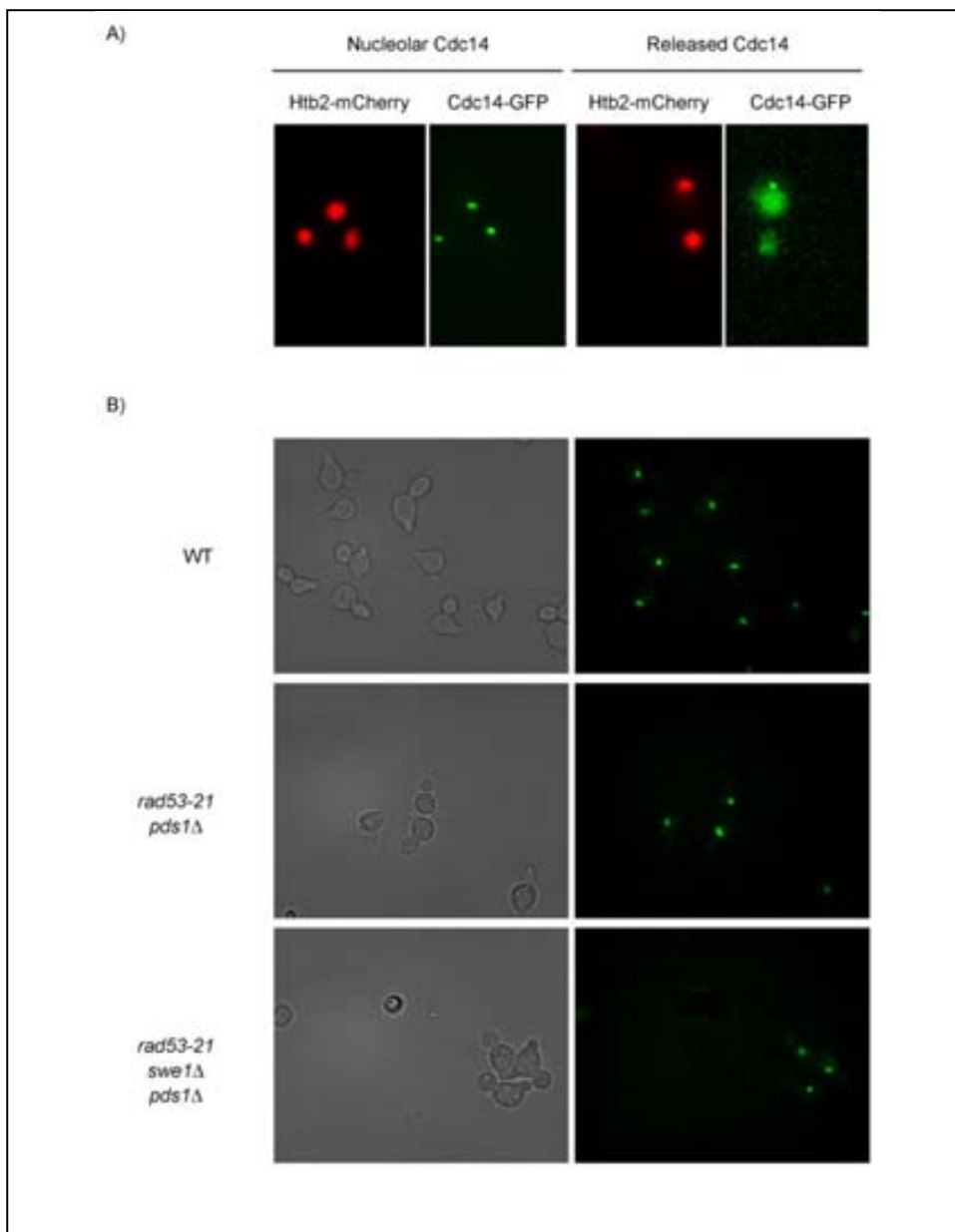


Figura 61. Absència d'alliberació de Cdc14 del nuclèol al mutant que segrega els cromosomes i allarga els fusos mitòtics en presència de dany al DNA. Panell A. Imatges d'un cultiu asincrònic de la soca YRP163 (*CDC14-GFP HTB2-mCherry*). Les cèl·lules es visualitzen amb Htb2-mCherry (esquerra) i Cdc14-GFP (dreta) mitjançant microscòpia de fluorescència. **Panell B.** Cultius de les soques YRP111 (WT, *CDC14-GFP*), YRP115 (*rad53-21 pds1Δ CDC14-GFP*) i YRP114 (*rad53-21 swe1Δ pds1Δ CDC14-GFP*) van ser sincronitzats a G1 pre-Start a 24°C i van ser alliberats a fase S en presència de dany al DNA (0,033% MMS). Les cèl·lules es visualitzen mitjançant microscòpia de camp clar

(columna esquerra) i Cdc14-GFP mitjançant microscòpia de fluorescència (columna dreta). Es mostren imatges representatives 240 minuts després d'alliberar de G1 a fase S en presència de dany al DNA.

Davant d'aquest resultat de difícil reconciliació amb la literatura disponible (Higuchi & Uhlmann 2005; Queralt & Uhlmann 2008a), varem explorar a continuació si en presència d'estrès replicatiu la segregació del triple mutant *rad53-21 swe1Δ pds1Δ* també té lloc en absència d'alliberació de Cdc14 del nuclèol.

Cultius en creixement exponencial de cèl·lules salvatges, *rad53-21 pds1Δ* i *rad53-21 swe1Δ pds1Δ* es van sincronitzar a G1 pre-Start i es van alliberar a fase S en presència de 200 mM HU (Materials i Mètodes 5.4). 240 minuts després d'alliberar de G1 es van prendre mostres de cada soca per analitzar la localització subcel·lular de Cdc14.

Tal i com succeïa en presència de dany al DNA, cap de les tres soques mostra alliberació de Cdc14 (Figura 62A). Per tant, la segregació cromosòmica que s'observa tant en presència de MMS com HU té lloc sense que la fosfatasa Cdc14 sigui alliberada del nuclèol si més no de la manera descrita en un cicle no pertorbat (Higuchi & Uhlmann 2005; Queralt & Uhlmann 2008a).

Aquests resultats poden tenir dues possibles lectures. Una possibilitat és que en presència de dany al DNA l'anafase s'estigui donant sense alliberació de Cdc14. Cal tenir present que en absència de la fosfatasa, la segregació del DNA comença però la progressió de l'anafase es veu compromesa ja que l'elevada activitat CDK afecta a la dinàmica dels microtúbuls (Higuchi & Uhlmann 2005; Uhlmann et al. 2000). En aquest sentit, l'eficient localització d'Esp1/separasa, necessària per la primera sortida de Cdc14 del nuclèol (FEAR, vegeu Introducció 2.1.2), està afectada als mutants *pds1* (Jensen et al. 2001). Esp1/separasa nuclear és necessària per reduir els nivells de PP2A^{Cdc55}, esdeveniment necessari per a l'eficient alliberament de Cdc14 del nuclèol (Queralt et al. 2006). Si bé l'anafase pot ocórrer en absència de Cdc14 (en aquest cas en absència d'alliberament nucleolar), els fusos no depassen els 7 μm (Uhlmann et al. 2000; Higuchi & Uhlmann 2005), compatible amb les longituds

Resultats

observades en el nostre cas amb la soca *rad53-21 swe1Δ pds1Δ* (vegeu Figura 60). En aquest escenari és possible que no arribem a visualitzar Cdc14 nuclear en contrast amb la intensitat del senyal nucleolar.

Una segona possibilitat és que tingui lloc una alliberació parcial de Cdc14 que no puguem visualitzar al quedar emmascarada per la senyal nucleolar.

Per explorar en més detall la situació vàrem analitzar l'estat de fosforilació de la proteïna Ask1. Ask1 és un substrat de l'activitat Cdk1 de fase S, que la fosforila, i de la fosfatasa Cdc14, que la desfosforila a l'anafase primària (FEAR) i roman desfosforilada donat que les ciclins de fase S ja han estat eliminades per APC^{Cdc20} (Bouchoux & Uhlmann 2011). A més, Ask1 està implicada en l'estabilitat dels microtúbuls que formen el fus mitòtic. La seva desfosforilació en els estadis inicials de l'anafase és important per estabilitzar els microtúbuls, allargar els fusos mitòtics i així permetre la progressió de les cèl·lules a anafase tardana (Bouchoux & Uhlmann 2011; Higuchi & Uhlmann 2005).

Cultius en creixement exponencial de cèl·lules *rad53-21 swe1Δ* i *rad53-21 pds1Δ*, que no segreguen en presència d'estrès genotòxic, i de cèl·lules *rad53-21 swe1Δ pds1Δ*, que sí ho fan, van ser sincronitzats a G1 pre-Start i després alliberats a fase S en presència d'estrès replicatiu (200 mM HU) o de dany al DNA (0,033% MMS). Es van recollir mostres cada 60 minuts per analitzar la fosforilació d'Ask1 mitjançant immunoblot.

Tal i com es pot observar en la Figura 62B, les cèl·lules *rad53-21 swe1Δ* presenten Ask1 totalment fosforilat 60 minuts després d'alliberar de G1 i roman en aquest estat al llarg de tot l'experiment. Per altra banda, les cèl·lules *rad53-21 pds1Δ* presenten Ask1 totalment fosforilat al llarg tot l'experiment únicament quan les cèl·lules són alliberades a una fase S en presència d'estrès replicatiu. En canvi, quan són alliberades a fase S en presència de dany al DNA, Ask1 comença a desfosforilar-se al cap de 180 minuts de l'alliberament de G1, si bé en aquesta soca no s'observa ni segregació de cromosomes ni alliberament de fusos mitòtics en aquestes condicions (Figures 50 i 60).

Finalment, en el triple mutant *rad53-21 swe1Δ pds1Δ*, l'únic que presenta segregació cromosòmica en presència d'estrès genotòxic, Ask1 mostra desfosforilació als temps finals de l'experiment, quan les cèl·lules comencen a segregar cromosomes sota estrès genotòxic i a allargar fusos mitòtics (compareu 180 front 240 minuts en HU, o 120 front 240 minuts en MMS). Per tant, els nostres resultats son compatibles amb un alliberament deficient o parcial de Cdc14.

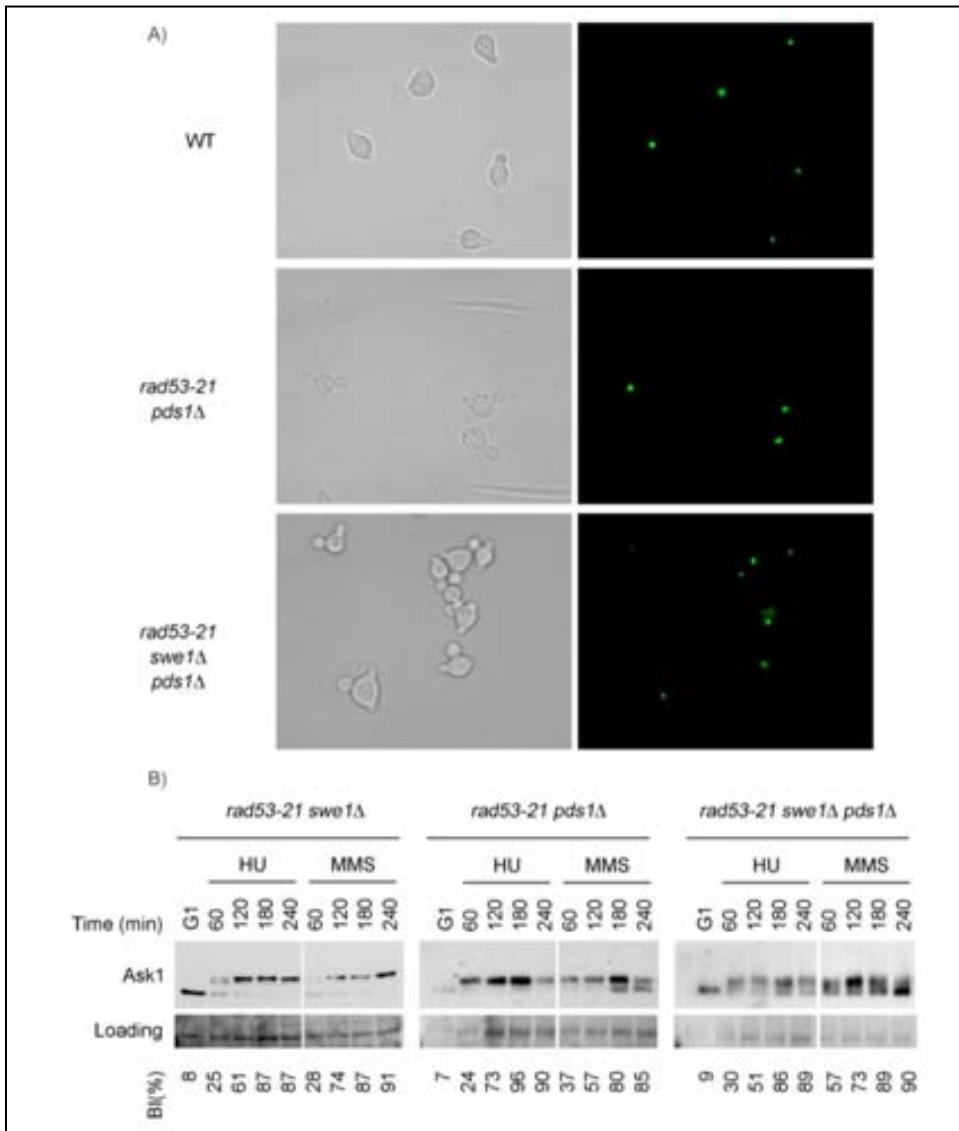


Figura 62. Absència d'alliberació de Cdc14 del nuclèol al mutant que segrega els cromosomes en presència d'estrès replicatiu. Panell A. Cultius de les soques YRP111

Resultats

(WT, *CDC14-GFP*), YRP115 (*rad53-21 pds1Δ CDC14-GFP*) i YRP114 (*rad53-21 swe1Δ pds1Δ CDC14-GFP*) van ser sincronitzats a G1 pre-Start a 24°C i alliberats a fase S en presència d'estrès replicatiu (200 mM HU). Les cèl·lules es visualitzen mitjançant microscòpia de camp clar (columna esquerra) i Cdc14-GFP mitjançant microscòpia de fluorescència (columna dreta). Es mostren imatges representatives 240 minuts després d'alliberar les cèl·lules de G1 pre-Start. **Panell B.** Cultius de les soques YRP158 (*rad53-21 swe1Δ ASK1-13myc*) YRP149 (*rad53-21 pds1Δ ASK1-13myc*) i YRP151 (*rad53-21 swe1Δ pds1Δ ASK1-13myc*) van ser sincronitzats a G1 pre-Start a 24°C i alliberats sincrònicament a fase S en presència d'estrès replicatiu (200 mM HU) o de dany al DNA (0,033% MMS). Els índex de gemmació (BI) es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, s'han analitzat per immunoblot anti-Myc (Ask1). Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

4.10 El *checkpoint* de fase S conjuntament amb el SAC inhibeixen l'entrada a mitosi en resposta d'estrès genotòxic

Hem mostrat que el *checkpoint* de fase S inhibeix l'activitat Cdk1 mitòtica en presència d'estrès genotòxic. Aquesta inhibició, juntament amb l'estabilització de Pds1/secarina impediria la segregació dels cromosomes incompletament replicats o danyats. Donat que s'ha descrit que el *checkpoint* de fase S estabilitza Pds1/secarina en resposta a dany al DNA (Wang et al. 2001), una predicció és que en absència de *checkpoint* de fase S les cèl·lules entraran en anafase malgrat la presència de dany al DNA.

Per tal d'explorar aquesta possibilitat cultius de cèl·lules *mec1Δ* es van sincronitzar a G1 pre-Start a 24°C i es van alliberar a fase S en presència de dany al DNA (Materials i Mètodes 5.4). Es recolliren mostres cada 30 minuts durant 240 minuts i es va analitzar la segregació cromosòmica mitjançant tinció del DNA per DAPI (Materials i Mètodes 7.1).

Contràriament a la predicció, en absència de la quinasa transductora central del *checkpoint* Mec1 no s'observa segregació cromosòmica. Únicament el 10 % de cèl·lules *mec1Δ* segreguen el DNA 240 minuts després d'alliberar les cèl·lules de G1 a una fase S en presència de MMS (Figura 63).

Prèviament hem descrit que l'estabilització dels nivells Swe1 en presència d'estrès genotòxic és dependent de Mec1, la quinasa transductora central del *checkpoint* de fase S (Resultats 1.1 i 1.3). No obstant, l'aparició d'activitat Cdk1 mitòtica en mutants *mec1Δ* en aquestes condicions té lloc més tard que en els mutants *rad53 swe1* o *mec1 swe1* (Resultats 2), possiblement perquè les cèl·lules *mec1Δ* posseeixen Swe1 d'entrada. Una possibilitat és que la lenta desestabilització de Swe1 als mutants *mec1Δ* retardi la segregació cromosòmica més enllà de les 240 minuts de l'experiment.

Per explorar aquesta possibilitat vàrem repetir l'experiment amb cèl·lules *mec1Δ swe1Δ*. De nou, però, tal i com es mostra en la Figura 63, la soca *mec1Δ swe1Δ* presenta el mateix comportament que les cèl·lules *mec1Δ*: únicament un 12% de cèl·lules segreguen el material genètic en presència de dany al DNA malgrat la presència d'activitat Cdk1 mitòtica (Figura 34).

Fins al moment, per tant, únicament hem observat segregació cromosòmica en presència de dany al DNA en soques que inclouen les mutacions *pds1Δ* o *scc1-73*, en que l'estabilització de la securina no és possible o irrellevant. Una possible explicació és que malgrat la literatura indica que Mec1 estabilitza Pds1 en resposta a dany al DNA (Sanchez et al. 1999), això sigui així en dany generat amb l'al·lel *cdc13-1*, però no amb dany que afecta la fase S.

Per explorar aquesta possibilitat, vàrem estudiar el comportament de cèl·lules *mec1Δ pds1Δ* i *mec1Δ swe1Δ pds1Δ*. Tal i com s'observa en la Figura 63, en absència de Mec1 i Pds1 obtenim el mateix fenotip que en la soca triple mutant *rad53-21 swe1Δ pds1Δ*; aproximadament un 50% de les cèl·lules segreguen el DNA en presència de dany al DNA 240 minuts després d'alliberar les cèl·lules de G1.

Resultats

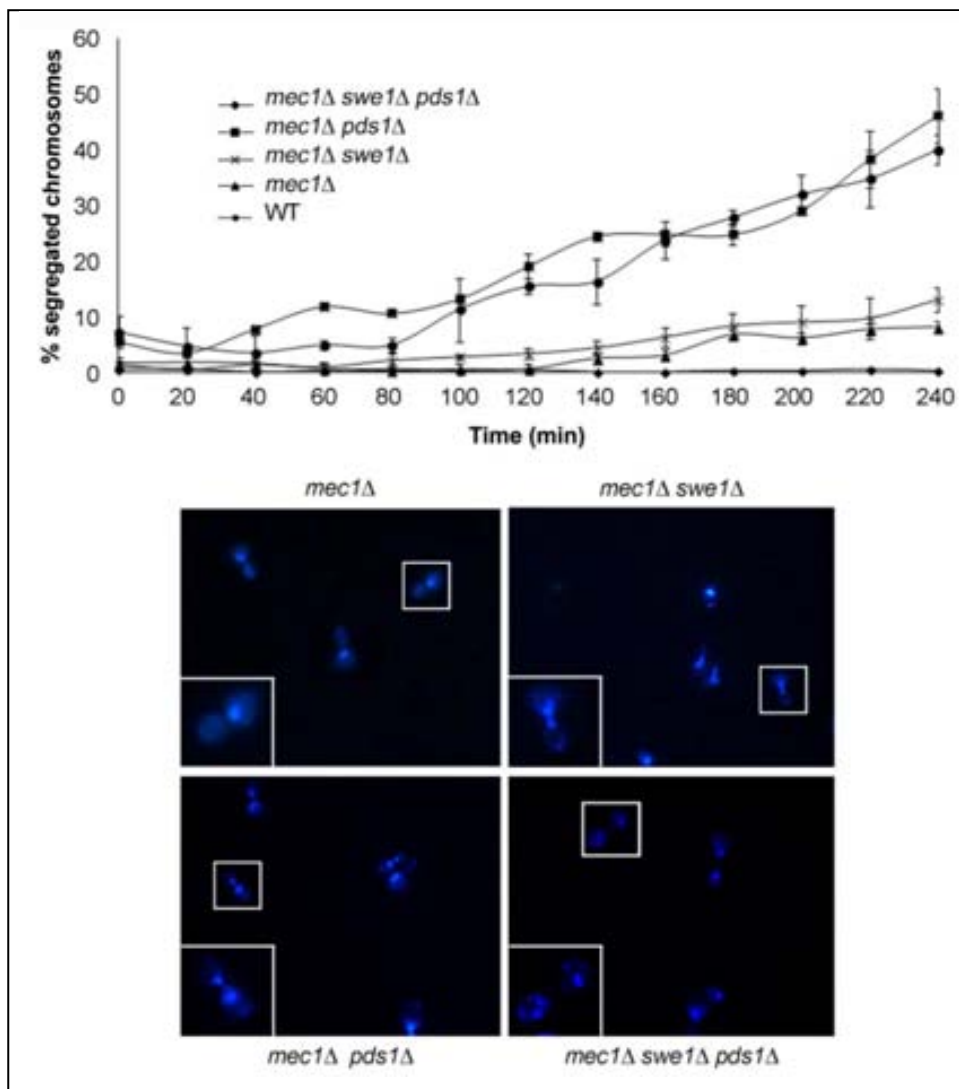


Figura 63. La deleció de Mec1, la quinasa transductora central del *checkpoint* de fase S, no és suficient per permetre segregació cromosòmica indeguda en presència de dany al DNA. **Panell superior**, percentatge de cèl·lules que mostren segregació del DNA. Cultius de les soques YGP123 (*mec1Δ*), YGP108 (*mec1Δ swe1Δ*), YGP165 (*mec1Δ pds1Δ*) i YGP209 (*mec1Δ swe1Δ pds1Δ*) es van sincronitzar a G1 pre-Start i es van alliberar a una fase S en presència de dany al DNA (0,033% MMS) a 24°C. Es varen contar 120 cèl·lules en tres experiments independents. Les dades es representen com mitjana dels experiments \pm desviació estàndard (barres d'error). **Panell inferior**, nuclis tenyits amb DAPI visualitzats per microscòpia de fluorescència. Es mostren caps representatius de les soques indicades 240 minuts després d'alliberar les cèl·lules de G1.

Aquest resultat suggereix que un mecanisme alternatiu a Mec1 pot estar estabilitzant Pds1 en resposta a estrès genotòxic.

Per tal d'identificar aquest mecanisme vàrem explorar en primer lloc la possible implicació de Tel1. Tel1 és un paràleg de Mec1 que juga un paper menor en la resposta a dany al DNA. Tot i això, en algunes condicions, Tel1 supleix algunes funcions de Mec1 en la seva absència (Clerici et al. 2004). Per tant, vàrem hipotetitzar que Tel1 podria compensar Mec1 en mutants *mec1Δ*, estabilitzant Pds1 i impedingint segregació cromosòmica en presència de dany al DNA.

Per tal de determinar si l'absència de les dues quinases transductores del *checkpoint* de fase S permet escapar del control de la segregació dels cromosomes en presència de dany al DNA, cèl·lules *mec1Δ tel1Δ* es van sotmetre al mateix experiment. En analitzar la segregació cromosòmica, el resultat és equivalent al de la soca *mec1Δ*, la major part de les cèl·lules mostren una única massa DNA 240 minuts després d'alliberar les cèl·lules de G1 a una fase S en presència de dany al DNA (MMS) o d'estrès replicatiu (HU) (vegeu Figura 67).

Aquests resultats podrien suggerir que existeix un mecanisme de control independent de Mec1 i Tel1 que impedeix la segregació cromosòmica en presència d'estrès genotòxic. A la vista dels resultats mostrats a la Figura 63, aquest mecanisme podria actuar estabilitzant Pds1/secarina.

4.10.1 Pds1 és redundantment estabilitzat pel *checkpoint* de fase S i pel *checkpoint* d'assemblatge del fus mitòtic (SAC) en resposta a estrès genotòxic

L'explicació més simple dels resultats que és mostren en la Figura 63 és que el *checkpoint* de fase S no sigui l'únic mecanisme de vigilància que estabilitza Pds1.

Per tal d'explorar aquesta possibilitat vàrem analitzar la capacitat dels mutants *mec1Δ tel1Δ* per mantenir estables els nivells de Pds1 presència de dany al DNA generat per metilació amb MMS o en presència d'estrès replicatiu generat amb HU. La soca *mec1Δ tel1Δ* es va sincronitzar a G1 pre-Start a 24°C i aleshores es va alliberar a una fase S no pertorbada, en

Resultats

presència de dany al DNA (MMS) o en presència d'estrès replicatiu (HU) (Materials i Mètodes 5.3 i 5.4). Seguidament es van recollir mostres cada 20 minuts durant 240 minuts i es van usar per analitzar els nivells de Pds1 per immunoblot i monitoritzar la progressió del cicle cel·lular a través de la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI) (Materials i Mètodes 5.1).

En quant a Pds1, en la Figura 64 es pot observar que els nivells de Pds1/secarina al mutant *mec1Δ tel1Δ* romanen estables al llarg de l'experiment, tant en presència de dany al DNA com d'estrès replicatiu. Aquests resultats suggereixen que un altre mecanisme de vigilància estabilitza Pds1 en presència d'estrès genotòxic; conjuntament o no, amb el *checkpoint* de fase S.

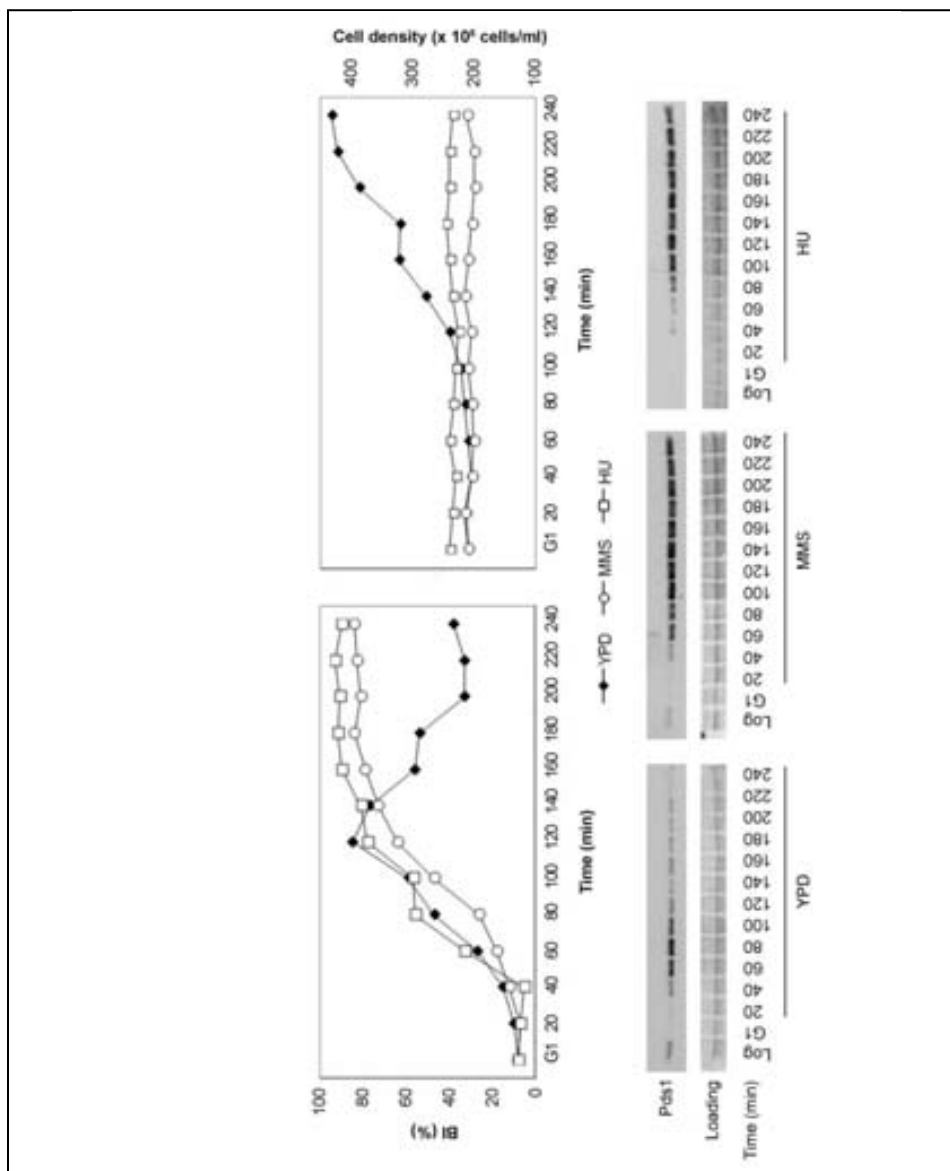


Figura 64. Els nivells de Pds1/secarina romanen estables en presència d'estrès genotòxic en una soca *mec1Δ tel1Δ*. Un cultiu de la soca YRP174 (*mec1Δ tel1Δ PDS1-13myc*) es va sincronitzar a G1 pre-Start a 24°C i es va alliberar a una fase S no pertorbada (YPD), en presència de dany al DNA (0,03% MMS) o d'estrès replicatiu (200 mM HU). Els índex de gemmació (BI) i densitats cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament tal i com mostra la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI). Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, s'han analitzat per immunoblot anti-Myc (Pds1). Una regió de la membrana

Resultats

utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

Un mecanisme candidat és el *checkpoint* d'assemblatge del fus mitòtic (SAC), que en un cicle no pertorbat estableix de Pds1/secarina a través de la inhibició d'APC^{Cdc20} (Hardwick & Murray 1995), fins que els cromosomes estan units al fus mitòtic i sota tensió bipolar (Vanoosthuyse & Hardwick 2009). Per tal de determinar si el SAC és necessari també per l'estabilització de Pds1/secarina en resposta a estrès genotòxic, vàrem estudiar el paper de Mad2; una de les quinases centrals del SAC (Introducció 3.2).

Un cultiu de cèl·lules *mec1Δ tel1Δ mad2Δ* es va sincronitzar a G1 a 24°C i es van alliberar a una fase S no pertorbada, en presència d'estrès replicatiu o en presència de dany al DNA (Materials i Mètodes 5.3 i 5.4). Les mostres que es van recollir cada 20 minuts durant 240 minuts es van usar per analitzar els nivells de Pds1 per immunoblot i monitoritzar la progressió del cicle cel·lular a través de la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI) (Materials i Mètodes 5.1).

La Figura 65 mostra que les cèl·lules triple mutants *mec1Δ tel1Δ mad2Δ* són incapaces de mantenir estable la presència de Pds1/secarina en presència de dany al DNA o d'estrès replicatiu, mentre que el mutant *mad2Δ* sí que en manté la capacitat (Figura 66). Per tant, en absència de senyalització del *checkpoint de fase S* i del SAC, Pds1/secarina és degradat amb la mateixa dinàmica que en absència d'estrès genotòxic.

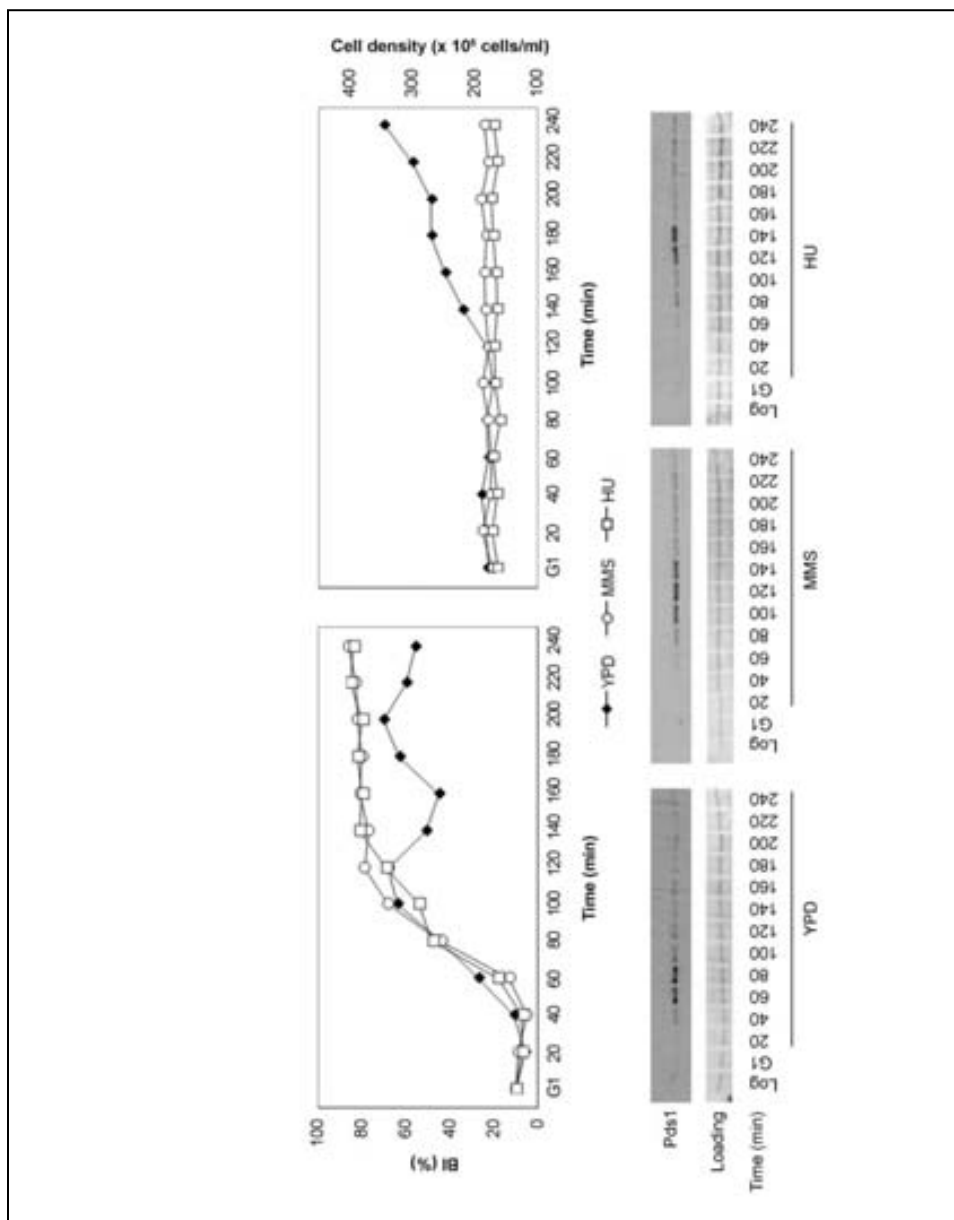


Figura 65. El mutant *mec1Δ tel1Δ mad2Δ* és incapaç d'estabilitzar Pds1/secarina presència d'estrès genotòxic. Un cultiu de la soca YRP190 (*mec1Δ tel1Δ mad2Δ PDS1-13myc*) es va sincronitzar a G1 pre-Start a 24°C i es va alliberar a una fase S no pertorbada (YPD), en presència de dany al DNA (0,033% MMS) o d'estrès replicatiu (200 mM HU). Els índex de gemmació (BI) i densitats cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament tal i com mostra la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI). Extractes proteics totals, corresponents als temps

Resultats

indicats, s'han analitzat per immunoblot anti-Myc (Pds1). Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

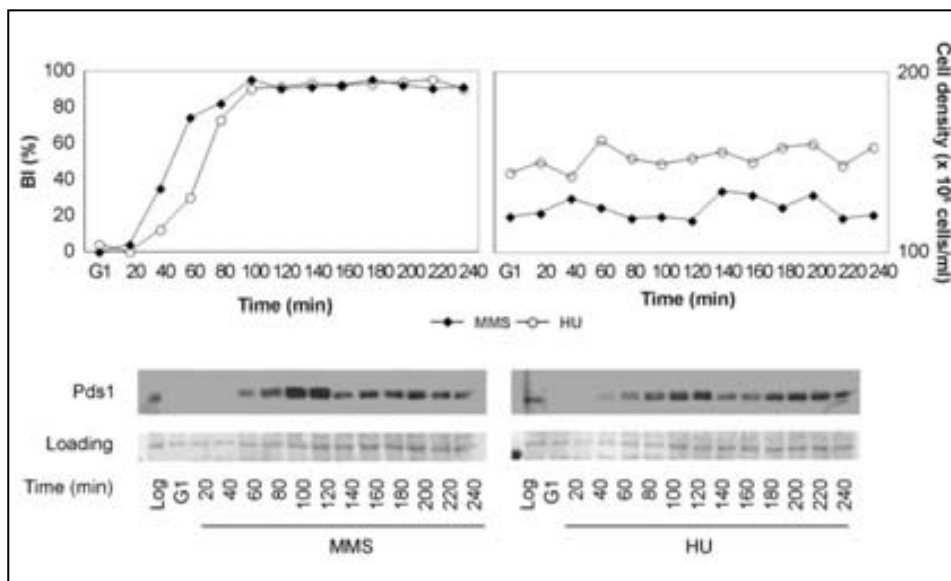


Figura 66. Estabilitat de Pds1/secarina en el mutant *mad2Δ*. Un cultiu de la soca YRP196 (*mad2Δ PDS1-13myc*) es va sincronitzar a G1 pre-Start a 24°C i es va alliberar a una fase S pertorbada en presència de dany al DNA (0,033% MMS) o d'estrès replicatiu (200 mM HU). Els índex de gemmació (BI) i densitats cel·lular es mostren com a mesura de la sincronització i progressió del cicle. Les cèl·lules varen ser correctament sincronitzades a G1 pre-Start i posteriorment alliberades sincrònicament tal i com mostra la densitat cel·lular i l'índex de gemmació (BI). Extractes proteics totals, corresponents als temps indicats, s'han analitzat per immunoblot anti-Myc (Pds1). Una regió de la membrana utilitzada per l'immunoblot, tenyida amb Ponceau S, es mostra com a control de càrrega (Loading).

A la vista dels resultats anteriors respecte l'estabilització de Pds1/secarina en resposta a estrès genotòxic, vàrem explorar si, com seria previsible a la vista de tots els nostres resultats, interrompent els elements *upstream* del *checkpoint* de fase S i del SAC fa les cèl·lules permissives a segregar cromosomes lesionats.

Per això vàrem estudiar cèl·lules *mec1Δ tel1Δ*, en que s'han deletat les dues quinases transductores centrals del *checkpoint* de fase S; *mad2Δ*, en que s'ha eliminat l'element central del SAC; i *mec1Δ tel1Δ mad2Δ*, en que

tots dos mecanisme de vigilància es troben interromputs. Les cèl·lules es varen sincronitzar a G1 pre-Start a 24°C i van alliberar a fase S en presència de dany al DNA o estrès replicatiu (Materials i Mètodes 5.4).

En la Figura 67 s'observa que al cap de 240 minuts d'alliberar les cèl·lules de G1 a una fase S compromesa, únicament les cèl·lules triple mutant (*mec1Δ tel1Δ mad2Δ*) presenten un nombre significatiu de cèl·lules que segreguen els cromosomes en presència de dany al DNA o estrès replicatiu (aproximadament el 50% de les cèl·lules). Significativament, l'absència només del *checkpoint* de fase S o del SAC, no és suficient per assolir aquesta penetrància fenotípica.

Aquest resultats suggereixen que el *checkpoint de fase S* i el SAC actuen redundantment per impedir l'entrada en presència d'estrès genotòxic.

Resultats

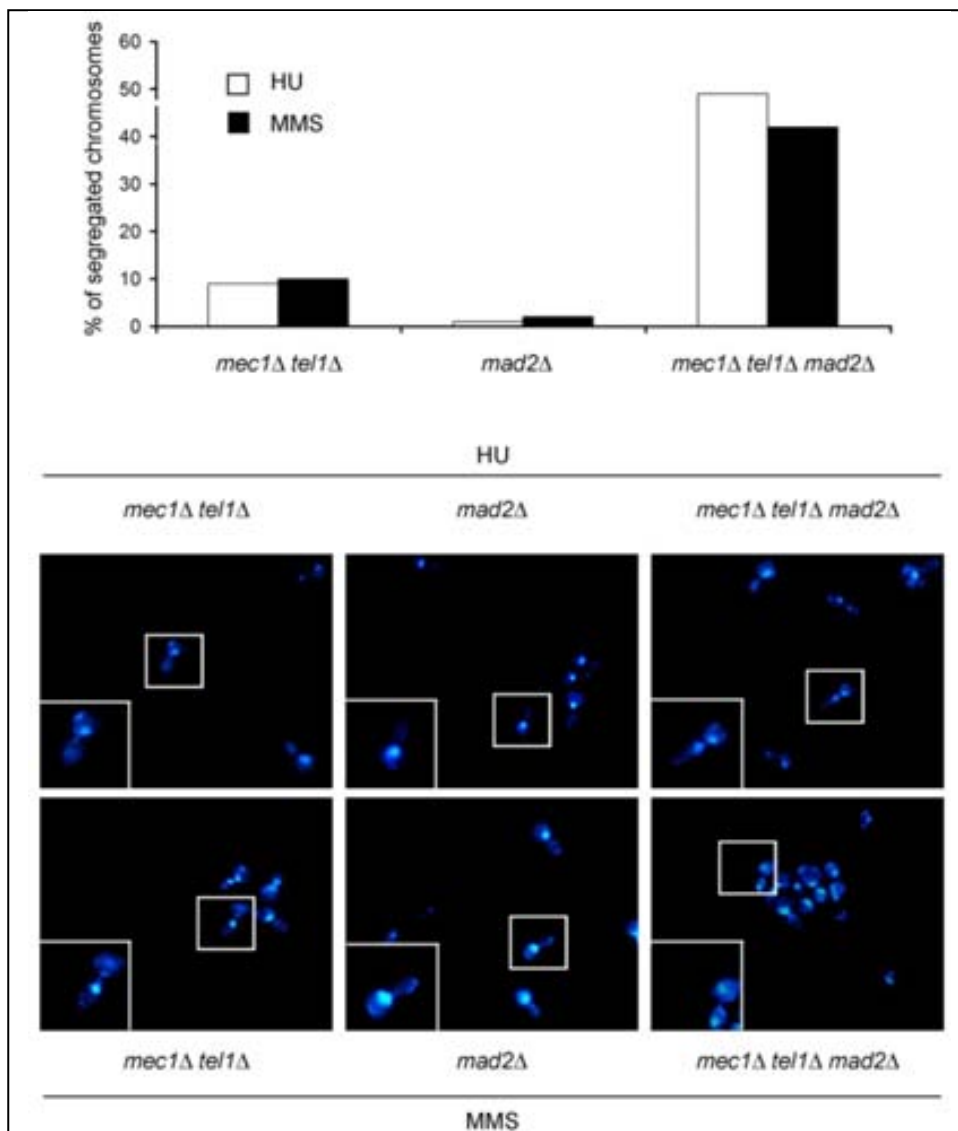


Figura 67. El *checkpoint* de fase S i el SAC actuen redundantment per impedir la segregació cromosòmica en presència d'estrès genotòxic. **Panell superior**, percentatge de cèl·lules que mostren segregació del DNA. Les soques YRP174 (*mec1Δ tel1Δ PDS1-13myc*), YRP196 (*mad2Δ pds1-13myc*) i YRP190 (*mec1Δ tel1Δ mad2Δ PDS1-13myc*) es van sincronitzar a G1 pre-Start a 24°C i es van alliberar a fase S en presència de dany al DNA (0,033% MMS) o d'estrès replicatiu (200 mM HU). Es varen contar 120 cèl·lules en cadascun dels dos experiments independents. Les dades es representen com mitjana dels dos experiments, sense càlcul de desviació estàndard. **Panell inferior**, nuclis tenyits amb DAPI visualitzats per microscòpia de fluorescència. Es mostren caps representatius de les soques indicades 240 minuts després d'alliberar les cèl·lules de G1.

DISCUSSIÓ

1 El *checkpoint* de fase S inhibeix l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès genotòxic

La implicació de Wee1 i els seus homòlegs en la regulació de l'activitat Cdk1 mitòtica, i el seu paper en la regulació de l'entrada en mitosi, ha estat àmpliament estudiada. En *S. pombe*, *Xenopus laevis* i humans Wee1 controla la mitosi a través de la fosforilació inhibidora de la tirosina 15 de Cdk1 (Gould & Nurse 1989; Pines & Hunter 1991; Dunphy & Newport 1989; Gautier et al. 1989; Draetta & Beach 1988; Morla et al. 1989). En resposta a estrès genotòxic els nivells de Wee1 són estabilitzats i, en conseqüència, la fosforilació de la tirosina 15 de Cdk1, la qual cosa manté l'activitat Cdk1 mitòtica inhibida i impedeix la mitosi (O'Connell et al. 1997; Michael & Newport 1998; Raleigh & O'Connell 2000).

Malgrat que Wee1 i la fosforilació de Cdk1 en una tirosina conservada N-terminal s'ha conservat al llarg de l'evolució, el seu paper en la resposta a dany al DNA a algunes espècies no ha estat demostrat. De fet, a l'organisme eucariota model *Saccharomyces cerevisiae* l'ortòleg de Wee1 (Swe1) està implicat en la regulació de l'activitat Cdk1 de fase M i la mitosi en un cicle no pertorbat (Harvey & Kellogg 2003; Crasta et al. 2006; Lim et al. 1996; Hu & Aparicio 2005; Lianga et al. 2013), però és totalment dispensable en la inhibició de l'entrada en mitosi i el manteniment de la viabilitat en presència d'estrès replicatiu. Si bé la fosforilació de Cdk1 a la Y19 s'estabilitza en presència d'estrès replicatiu, ni l'al·lel no fosforilable de Cdk1-19F ni la deleció *swe1Δ* entren prematurament a mitosi, ni en una fase S pertorbada ni en un cicle no pertorbat (Sorger & Murray 1992; Amon et al. 1992). Sovint, a partir dels assajos quinasa amb Cdk1 mostrats en aquests treballs, es conclou que l'activitat Cdk1 mitòtica no està inhibida en resposta a estrès genotòxic. Tanmateix, aquesta afirmació té una base poc sòlida (vegeu apartat 1.2 Discussió a baix).

1.1 L'estabilització dels nivells de Swe1 en una fase S compromesa depèn del *checkpoint* de fase S

Prèviament s'havia descrit l'estabilització de les nivells de Swe1 en presència d'estrès replicatiu però sense determinar-ne la dependència del mecanisme de vigilància de fase S (Liu & Wang 2006). Mitjançant l'anàlisi per immunoblot de Swe1 hem mostrat per primer cop que l'estabilització dels nivells Swe1 pel *checkpoint* de fase S depèn directament de la quinasa efectora Mec1: el mutant nul *mec1*Δ és incapaç d'estabilitzar l'abundància de Swe1.

En el mateix sentit, segons les nostres dades Mec1 podria actuar a través de la serina 385. Mec1 és una quinasa que fosforila en SQ/TQ. La serina 385 és l'única que satisfà aquest motiu a Swe1. El mutant no fosforilable de Swe1 en aquesta posició (Swe1-AQ) és incapaç de mantenir estables els nivells de Swe1 malgrat la presència de Mec1 i d'estrès replicatiu.

Per altra banda, la soca mutant *rad53*Δ *chk1*Δ, en que les dues quinases efectores sota Mec1 estan delecionades, també és incapaç d'estabilitzar Swe1 en les mateixes condicions malgrat la presència de Mec1. Però no els mutants individuals *rad53*Δ o *chk1*Δ, suggerint l'existència d'un control redundat per part de Rad53 i Chk1, necessari a més del control per part de Mec1.

En conjunt, aquestes observacions condueixen al següent model. Mec1 fosforila Swe1 a ³⁸⁵SQ. Aquesta fosforilació és necessària per a l'estabilització dels nivells de la proteïna (el mutant Swe1-AQ no s'estabilitza) però no suficient. Una de les dues quinases efectores sota Mec1, Rad53 i Chk1, són necessàries per estabilitzar els nivells de Swe1 en resposta a estrès genotòxic. En el futur caldrà determinar si actuen (1) per fosforilació de Swe1 (a aquest respecte, la serina 385 no compleix el consens de fosforilació per Chk1; Rad53 no té cap preferència de seqüència), (2) indirectament regulant el sistema de degradació de Swe1, i (3) si això ho fan directament Rad53 i Chk1 o alguna quinasa sota elles.

Per altra banda, a les diferents soques mutants analitzades on Swe1 no és estable malgrat la presència d'estrès genotòxic (*rad53Δ chk1Δ*, *mec1Δ* o Swe1-AQ) els nivells d'aquesta proteïna no decauen totalment. Malgrat tot, en dos d'aquests mutants, l'activitat Cdk1 mitòtica està desinhibida en aquestes condicions, tot i la presència de nivells residuals de Swe1: *mec1Δ* i Swe1-AQ (en aquest darrer cas en combinació amb mutants *rad53*)¹. Una explicació possible és l'existència de diferents subpoblacions de Swe1 a la cèl·lula, com posa en relleu l'existència de múltiples formes de fosforilació (Sia et al. 1998; Clotet et al. 2006), en sintonia amb l'elevat nombre d'*inputs* que modulen l'activitat i la degradació d'aquesta quinasa (Sia et al. 1998; McMillan et al. 1999; Goes & Martin 2001; Asano et al. 2005). Un model raonable contempla l'existència d'una sub-població específica de Swe1 responsable de la regulació de l'activitat Cdk1 mitòtica. L'estabilització d'aquest *pool* dependria de Mec1 i de Rad53 i Chk1, mentre que l'estabilitat de la resta de Swe1 dependria d'altres controls i no afectaria la segregació dels cromosomes. Alternativament, caldrien uns nivells mínims de Swe1 per mantenir Cdk1 mitòtica estequiòmicament inhibida. En qualsevol cas, les soques mutants *mec1Δ pds1Δ* o *rad53-21 Swe1-AQ pds1Δ*, on els nivells de Swe1 decauen (però no desapareixen completament) en presència d'estrès genotòxic, són incapaces d'impedir la segregació dels cromosomes danyats o incompletament replicats.

1.2 Model de regulació de l'activitat Cdk1 mitòtica pel *checkpoint* de fase S

Els nostres resultats indiquen que l'activitat Cdk1 mitòtica és inhibida en resposta a estrès genotòxic en forma dependent del *checkpoint* de fase S. Aquests resultats contradiuen l'assumpció, basada en tres treballs històrics (Sorger & Murray 1992; Amon et al. 1992; Stueland et al. 1993). Aquests treballs, basats en assaigs quinasa *in vitro* amb Cdk1, reporten una elevada activitat Cdk1 en aquestes condicions, de manera que

¹ No és el cas, però, del doble mutant *rad53Δ chk1Δ*, on Cdk1 està inhibida malgrat l'absència de Rad53 i la manca d'estabilització dels nivells de Swe1 (vegeu discussió a l'apartat 1.2, a baix).

Discussió

difícilment podria constituir el control que impedeix l'entrada indeguda a mitosi quan les cèl·lules estan en una fase S amenaçada. Tanmateix, en un dels treballs (Sorger & Murray 1992) es mesura només l'activitat Cdk1 total (no específicament mitòtica) en HU. Hem mostrat més amunt (Figura 41) que aquest assaig és fàcilment saturable i, per tant, l'activitat Cdk1 mitòtica pot estar emmascarada per un excés d'activitat Cdk1 de fase S. En el segon dels treballs (Amon et al. 1992), on sí que es mesura específicament l'activitat Cdk1 mitòtica amb diferents mutants condicionals termosensibles que generen diferents tipus de problemes al cicle cel·lular; un d'ells, el mutant *cdc8-1*, corresponent a la timidilat i uridilat quinasa, responsable de convertir dTMP a dTDP, produeix estrès replicatiu a temperatura restrictiva. Tanmateix, el treball compara cèl·lules d'un cultiu asincrònic a temperatura permissiva, amb cèl·lules sincronitzades per l'estrès replicatiu a fase S, a temperatura restrictiva, la qual cosa fa de difícil interpretació els resultats, on no es detecten diferències significatives en l'activitat Clb2-Cdk1 entre les dues condicions. En qualsevol cas, arran d'aquests treballs el control de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès genotòxic en *S. cerevisiae* ha estat considerat durant dècades irrellevant. Finalment, el treball de Stueland et al. (Stueland et al. 1993) treballa realment amb l'activitat Clb3-Cdk1, que no és una veritable Cdk1 mitòtica: les ciclins de fase G2, Clb3 i Clb4, són incapaces de disparar la mitosi/anafase en absència de Clb1 i Clb2 (Rahal & Amon 2008) i que Swe1 només afecta parcialment la seva activitat (Hu & Aparicio 2005).

Front la visió imperant, diferents indicis ens suggerien un paper de la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica per fosforilació de Cdk1 per Swe1 en la resposta a estrès genotòxic:

- Swe1 i la fosforilació de la tirosina 19 de Cdk1 estan implicats en inhibir la mitosi en cèl·lules exposades a agents que afecten el citoesquelet (Keaton et al. 2007; Lianga et al. 2013) o en la resposta a osmoestrès (Clotet et al. 2006).
- En absència de les ciclins de fase S, l'expressió de ciclins mitòtiques sota el promotor de *CLB5* pot disparar la replicació

puntualment únicament en soques *swe1Δ* (Hu & Aparicio 2005; Jacobson et al. 2000), la qual cosa subratlla el potencial inhibidor de l'activitat Cdk1 mitòtica també al llevat de gemmació.

- En el nostre laboratori observàvem l'estabilització dels nivells de Swe1 en presència d'estrès replicatiu i de dany per metilació del DNA. Malgrat que Swe1 és dispensable per mantenir la viabilitat front aquests estressos, el comportament en aquestes condicions suggeria més un paper redundant amb un segon control que no pas manca de paper.

A la vista de totes aquestes consideracions, vàrem decidir monitoritzar l'activitat Cdk1 mitòtica en presència d'estrès genotòxic.

Es va validar la subunitat B de la DNA polimerasa α , Pol12, com un marcador específic de l'activitat Cdk1 mitòtica, i s'ha utilitzat per monitoritzar l'activitat Cdk1 mitòtica *in vivo* en condicions d'estrès genotòxic. Això ens va permetre la següent seqüència experimental:

1. Comprovar la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica en condicions d'estrès genotòxic *in vivo* (posteriorment confirmat amb un segon substrat independent, Mob1).
2. Confirmar la dispensabilitat de Swe1 en aquesta inhibició, malgrat l'estabilització dels nivells de Swe1 i de la fosforilació de la tirosina 19 de Cdk1 en aquestes condicions.
3. L'estabilització de l'abundància de Swe1 en resposta a estrès genotòxic és dependent de Mec1, la quinasa central del *checkpoint* de fase S que detecta i respon a estrès genotòxic.
4. Descartar que la inhibició fos deguda a la repressió transcripcional de les ciclins mitòtiques, com ocorre per exemple en resposta a estrès osmòtic (Clotet et al. 2006): Clb2 s'expressa i acumula a nivells normals en condicions d'estrès replicatiu i de dany al DNA en que la fosforilació de Pol12 i de Mob1 no es dona.
5. Identificar que la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica està sota el *checkpoint* de la fase S: els mutants *mec1Δ* són incapaços de

Discussió

mantenir l'activitat Cdk1 mitòtica inhibida en presència d'estrès replicatiu i de dany per metilació al DNA.

6. En canvi, Rad53, la quinasa efectora del *checkpoint* de la fase S és dispensable en aquest control.
7. Donat que el control de l'activitat Cdk1 mitòtica està sota Mec1, i que tant l'activació de Rad53 com l'estabilització dels nivells de Swe1 estan sota Mec1, vàrem explorar si Rad53 i Swe1 constitueixen dues vies paral·leles que redundamment contribueixen a la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica. Efectivament, tant la soca mutant *rad53 swe1*, com la soca mutant complementària *rad53 Cdk1-19F* són incapaces de mantenir l'activitat Cdk1 mitòtica inhibida en resposta d'estrès genotòxic.

En resum, el *checkpoint de fase S* actuaria a través de dos nivells sota la quinasa transductora central Mec1 (Figura 68): activant Rad53 i estabilitzant Swe1, que conjuntament inhibeixen l'activitat Cdk1 mitòtica. Cadascuna de les dues vies és suficient, de manera que són individualment dispensables. D'aquesta manera, els nostres resultats reconcilien les observacions prèvies en que Swe1 i la fosforilació de la tirosina 19 de Cdk1 eren considerats dispensables en aquest control (Amon et al. 1992; Sorger & Murray 1992). A més, descobrim un nou nivell de control de l'activitat Cdk1 mitòtica, sota la quinasa efectora del *checkpoint* de fase S Rad53.

És possible que aquest doble control estigui conservat en altres organismes eucariotes, singularment en cèl·lules animals, que per analogia amb altres controls, tendeixen a presentar capes addicionals de regulació comparat amb organismes model més simples. De fet, fins i tot en el llevat de fissió, on el control de la mitosi per Wee1 i fosforilació de Cdk1 a la tirosina 15 va ser descobert (Nurse & Thuriaux 1980), podrien existir nivells addicionals de control, tot i haver-se assumit una dependència exclusiva d'aquest mecanisme, tant en un cicle no pertorbat (Gould & Nurse 1989) com en resposta a estrès replicatiu (Lundgren et al. 1991; Enoch & Nurse 1990; Rhind et al. 1997; Furnari et al. 1997; Furnari

et al. 1999; Rhind & Russell 2001; Lopez-Girona et al. 2001). Així, evidència experimental recent amb una CDK sintètica mancada de regulació per fosforilació, que malgrat tot manté un elevat grau d'homeòstasis, obre la porta a l'existència de nivells de control addicionals en la regulació de l'activitat Cdk1 mitòtica i l'entrada a mitosi també a *S. pombe* (Coudreuse & Nurse 2010).

Els nostres resultats no ens permeten, però, concloure si Rad53 actua, com Swe1, sobre l'activitat Cdk1 o bé sobre l'afinitat de Cdk1 mitòtica sobre els seus substrats essencials. A partir d'assaigs quinasa *in vitro* mostrem que l'activitat Clb2-Cdk1 està inhibida en cèl·lules silvestres exposades a estrès replicatiu. I que aquesta inhibició és dependent de la fosforilació de la tirosina 19 per Swe1 (activitat de Clb2-Cdk1 immunopurificada de cèl·lules *swe1Δ* exposades a estrès replicatiu). Per altra banda, *in vivo*, emprant dos substrats diferents de l'activitat Cdk1 mitòtica, mostrem que romanen no-fosforilats en presència d'estrès genotòxic. Aquesta inhibició, però, a diferència de l'observat en els assaigs *in vitro*, depèn de Swe1 i de Rad53, la quinasa efectora del *checkpoint* de fase S. La presència de qualsevol dels dos és suficient per mantenir inhibida la fosforilació de Pol12, un substrat específic de Cdk1 mitòtica. Dos models simples permeten explicar l'aparent divergència entre les observacions *in vitro* i *in vivo*, al marge de les limitacions d'interpretació dels assaigs quinasa amb un substrat no-natural de Clb2-Cdk1.

Un model consideraria que només la fosforilació de la tirosina 19 de Cdk1 afectaria la seva activitat catalítica, mentre que Rad53 podria actuar modificant l'afinitat de Clb2-Cdk1 pels seus substrats essencials. No sabem si Rad53 actuaria sobre Clb2-Cdk1 o sobre els seus substrats. A aquest respecte, a tall d'exemple, la fosforilació de Sld3 per Rad53 impedeix l'activació de Sld3 per Cdk1 de fase S, essencial per al inici de la replicació (Zegerman & Diffley 2007). Treballs paral·lels al nostre laboratori descarten que la subunitat catalítica Cdk1 sigui fosforilada per Rad53 en resposta a estrès genotòxic (Fanli Zeng 2014, Tesi Doctoral) però en aquest moment no podem descartar que les ciclines mitòtiques

Discussió

puguin ser diana de Rad53. A favor d'aquest model, mentre que els complexos Clb2-Cdk1 immunopurificats de cèl·lules silvestres exposades a estrès replicatiu no mostren activitat sobre el substrat histona H1 en assaigs *in vitro*, els complexos purificats de cèl·lules *swe1Δ* mostren activitat. La interpretació directa d'aquestes observacions argumenta contra el model de doble-interruptor redundants que es podria deduir dels resultats *in vivo* amb Pol12 com a marcador de l'activitat Cdk1 mitòtica.

Un segon model contempla Swe1 i Rad53 com a interruptors redundants de l'activitat Cdk1 mitòtica. Aquest model, també compatible amb les observacions *in vivo* amb Pol12, es basa fonamentalment en l'observació que la pre-incubació de Clb2-Cdk1 (procedent de cèl·lules silvestres en G2/M) amb Rad53 recombinant redueix significativament la seva activitat Cdk1 mitòtica *in vitro*. Tanmateix, la lectura directa dels resultats dels assaigs quinasa *in vitro* amb Clb2-Cdk1 purificada de soques *rad53Δ* no donaria suport a aquest model, ja que l'activitat de la quinasa mitòtica obtinguda de cèl·lules exposades a estrès replicatiu no està desinhibida respecte cèl·lules silvestres a les mateixes condicions. Una possibilitat, però, és que l'absència de Rad53 comporti la pèrdua d'una proteïna accessòria del complex Clb2-Cdk1 durant el procés d'extracció i purificació, afectant la seva activitat en els assaigs *in vitro*. A aquest respecte cal fer dues consideracions: (1) l'activitat *in vitro* de la quinasa purificada a partir de cèl·lules *swe1Δ rad53Δ* és consistentment i sorprenentment inferior a la de la quinasa purificada a partir de cèl·lules *swe1Δ*; (2) al nostre laboratori hem identificat Cks1, una subunitat essencial associada a Cdk1, com a potencial diana de Rad53.

A la dècada dels noranta es considerava que la regulació de la mitosi per part del *checkpoint* de fase S es restringia a l'estabilització directa de Pds1/securina (Sanchez et al. 1999; Agarwal et al. 2003). Donat que l'activitat Cdk1 mitòtica és essencial per l'entrada en anafase (l'absència combinada de Clb1 i Clb2 atura les cèl·lules amb un nucli no-dividit i fusos mitòtics curts (Surana et al. 1991; Fitch et al. 1992; Richardson et al. 1992; Rahal & Amon 2008) a la vista dels nostres resultats és raonable reconsiderar aquest model.

Els nostres resultats es plasmen en el model presentat a la Figura 68.

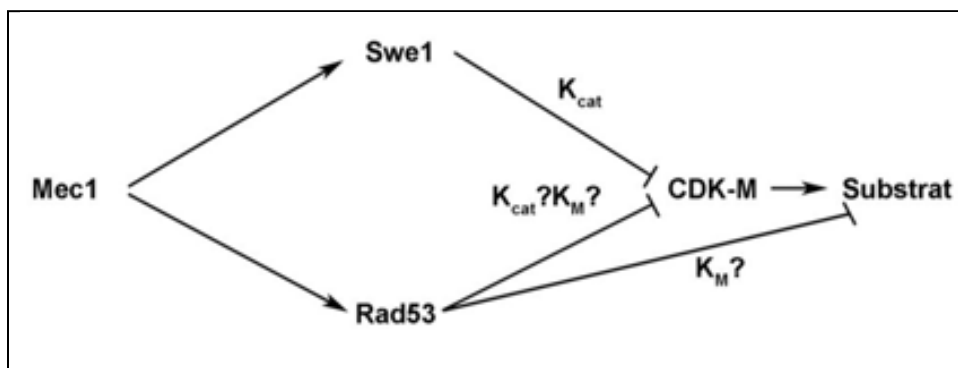


Figura 68. Model proposat de regulació de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès genotòxic a *S. cerevisiae*. Vegeu text per detalls

1.3 La presència desregulada de l'activitat Cdk1 mitòtica no és suficient per permetre la segregació cromosòmica en presència d'estrès genotòxic en fase S

Donat que l'activitat Cdk1 mitòtica és essencial per l'entrada en anafase (l'absència combinada de Clb1 i Clb2 atura les cèl·lules amb un nucli no-dividit i fusos mitòtics curts (Surana et al. 1991; Fitch et al. 1992; Richardson et al. 1992; Rahal & Amon 2008), vàrem analitzar la rellevància del control de l'activitat Cdk1 mitòtica pel *checkpoint* de fase S en la regulació de la mitosi en presència d'estrès genotòxic.

Tanmateix, cap dels mutants incapaços de reprimir l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès genotòxic en fase S (*mec1* Δ , *rad53-21 swe1* Δ , *rad53-21 Swe1-AQ*, *rad53 Cdk1-19F*) mostren segregació cromosòmica en aquestes condicions.

2 Estabilització de la cohesió en resposta a estrès genotòxic en fase S

2.1 Estabilització de Pds1/securina en presència d'estrès genotòxic en fase S

A la dècada dels noranta es considerava que la regulació de la mitosi per part del *checkpoint* de dany al DNA es restringia a l'estabilització directa de Pds1/Securina, mantenint Esp1/Separasa inactiva (Agarwal et al. 2003; Cohen-Fix & Koshland 1997; Gardner et al. 1999; Sanchez et al. 1999; Wang et al. 2001; Yamamoto et al. 1996b). Ara bé, aquests treballs es centren en dany telomèric generat a través d'un al·lel termosensible de Cdc13. Aquest tipus de dany és detectat a G2/M i atura les cèl·lules en aquest punt del cicle cel·lular (Weinert & Hartwell 1993). La resposta del *checkpoint* de fase S a situacions que aturen les forquilles de replicació podria igualment basar-se en l'estabilització de Pds1 o no.

Els nostres resultats mostren que l'abundància de Pds1 es manté estable en presència d'estrès genotòxic en fase S.

2.2 El *checkpoint* de fase S i el *checkpoint* d'assemblatge del fus mitòtic (SAC) redundamment participen en l'estabilització de Pds1/securina en resposta a estrès genotòxic en fase S

Donat que tant el *checkpoint* de dany al DNA com el *checkpoint* de fase S estan mediat per la quinasa Mec1 i, en menor grau, el seu paràleg Tel1, Pds1 hauria de desaparèixer en mutants *mec1Δ tel1Δ*; però aquest no és el cas.

Els nostres resultats suggereixen que en presència d'estrès genotòxic en fase S el *checkpoint* de fase S i el SAC redundamment estabilitzen Pds1/Securina.

L'acció coordinada del *checkpoint de fase S* i el SAC s'ha descrit recentment també en el control de la segregació cromosòmica en una fase S no exposada a estrès genotòxic però que s'inicia anormalment

tard per deleció de les ciclines de fase S (Magiera et al. 2014). Per tant, la col·laboració d'aquests dos mecanismes de vigilància podria ser un fet comú per evitar la segregació prematura de cromosomes incompletament replicats.

Si bé aquest no era el nostre objectiu inicial, l'observació que Pds1/Securina és estabilitzada en resposta a estrès genotòxic en fase S pel SAC (a part del *checkpoint* de fase S) obre una sèrie d'interrogants:

1. De quina manera l'estrès genotòxic en fase S condueix a l'activació del SAC? S'han descrit múltiples situacions cel·lulars que poden comportar l'activació del SAC, però totes elles es caracteritzen per defectes en l'assemblatge del fus mitòtic o en la unió d'aquest als cromosomes (Tan et al. 2005). L'activació del SAC en presència d'estrès replicatiu podria ser causada per la no duplicació dels centròmers, dificultant l'assemblatge dels quinetocors, ja que en aquestes condicions les forquilles de replicació avancen molt poc respecte l'origen de replicació (Krishnan et al. 2004) més proper. En aquest sentit, s'ha observat que en mutants deficient pel *checkpoint* de fase S els centròmers no es repliquen malgrat ser pròxims als orígens de replicació primerencs; fet que comporta l'activació del SAC (Feng et al. 2009). Quan les cèl·lules entren en mitosi sense passar per una ronda de replicació prèvia, per tant sense duplicació dels centròmers, el SAC s'activa (Stern & Murray 2001).
2. En canvi en presència de dany al DNA generat per MMS, és probable que els centròmers estiguin replicats, ja que 240 minuts després d'alliberar de G1 les cèl·lules *rad53 swe1 pds1* han assolit un contingut de DNA pròxim a 2C. S'ha suggerit que l'activació del SAC en presència de dany al DNA generat amb MMS, mediada a través de Mec1 i Tel1, de forma independent de la senyalització procedent del quinetocor (Kim & Burke 2008). Ara bé, el fet que únicament s'observi segregació en un mutant de deleció de Mec1 en combinació amb *mad2Δ* suggereix un model en el que el SAC no és activat pel *checkpoint* de fase S. Seria interessant determinar si a 0.033% MMS l'activació del SAC requereix senyalització des del quinetocor. En cas que aquesta

Discussió

sigui així, caldria estudiar quin és el senyal activador del SAC en aquestes condicions. S'han postulat múltiples factors que podrien donar lloc a defectes d'unió entre el quinetocor i els microtúbuls del spindle; per exemple una elevada inestabilitat dels microtúbuls (Tan et al. 2005). En aquest sentit, la segregació cromosòmica en presència de MMS sense alliberació de Cdc14 podria explicar l'activació del SAC. La defosforilació per part de Cdc14 de múltiples proteïnes durant l'anafase és important per revertir l'elevada inestabilitat dels microtúbuls metafàsics (Discussió 2.2.2).

Una altra qüestió derivada de l'estabilització de Pds1 és quin mecanisme l'articula en presència d'estrès replicatiu i dany al DNA; ja que el SAC i el *checkpoint de fase S* semblen actuar a diferents nivells. En resposta a dany al DNA sensat a G2/M (*cdc13-1* i radiació γ), Pds1 és estabilitzat a través de Chk1 i Rad53, les quals eviten la seva degradació al impedir-ne la ubiquitinació. Mentre que Chk1 fosforila directament Pds1, Rad53 sembla impedir la interacció entre APC^{Cdc20} i Pds1 (Agarwal et al. 2003; Sanchez et al. 1999). En canvi, en resposta a estressos que activen el SAC (com per exemple nocodazole), la degradació de Pds1 no té lloc ja que el *checkpoint* inhibeix directament el complex d'ubiquitinació APC^{Cdc20}. Seria interessant determinar quin rol juga cadascun d'aquests dos mecanismes de vigilància en l'estabilització de Pds1 en presència d'estrès genotòxic. En aquest sentit, un possible punt de convergència dels dos mecanismes de vigilància és la regulació que el *checkpoint* de fase S exerceix sobre la subunitat Cdc20 d'APC. S'ha descrit que en una fase S en presència d'estrès replicatiu Mec1 a través de Rad53 eviten l'acumulació de Cdc20 abans que acabi la replicació. D'aquesta manera el mecanisme de vigilància de la fase S impediria l'acció prematura de Cdc20, la qual a part de mediar la degradació de Pds1 també dificulta la replicació (Clarke et al. 2003).

Per últim, el paper de Pds1 com a substrat de múltiples mecanismes de vigilància queda palès en la interacció genètica entre Mec1 i Pds1. La soca de doble deleció presenta una elevada tendència a generar arranjaments cromosòmics (*Gross Chromosomal Rearrangement*, GCR); el mutant *mec1*

pds1 presenta 5 vegades més GCR que la soca *mec1* o *pds1* (Myung et al. 2001). Aquest fet reforça la idea que Pds1 no es troba únicament sota control de Mec1 en condicions que activen el *checkpoint* de fase S (Clarke et al. 1999). Si aquest fos el cas, la soca *mec1 pds1* presentaria una tendència a generar arrenjament cromosòmic pròxim a la suma dels GCR que presenten els mutants individuals. Els nostres resultats posicionen Pds1 com a diana de múltiples *checkpoints* activats en presència d'estrès genotòxic. Per tant podrien explicar, en part, l'elevada tendència a presentar GCR del doble mutant *mec1 pds1*, incapaç d'evitar la segregació cromosòmica de cromosomes que no han acabat d'estar replicats.

Resultats publicats recentment reforcen l'acció coordinada de múltiples mecanismes de vigilància. Així, en una fase S anormalment llarg (*clb5Δ clb6Δ*) el *checkpoint* de fase S i el SAC actuen conjuntament per evitar la segregació cromosòmica abans que acabi la replicació (Magiera et al. 2014).

2.3 Tanmateix, la deleció de Pds1/securina no és suficient per permetre la segregació cromosòmica en presència d'estrès genotòxic en fase S

Els nostres resultats mostren que l'abundància de Pds1 es manté estable en presència d'estrès genotòxic en fase S. Tanmateix, tant les cèl·lules *pds1Δ* com el mutant termosensible de la subunitat cohesina *scc1-73* són competents per impedir la segregació cromosòmica front a estrès genotòxic en fase S. En aquestes condicions les cèl·lules mostren una única massa compacte de DNA i fusos mitòtics curts. Aquest resultat suggereix un o més nivells addicional de regulació en resposta a estrès genotòxic.

L'exploració del tall de cohesina en mutants *pds1Δ* exposats a estrès genotòxic en fase S mostra absència de tall de la cohesina, tot i l'absència l'inhibidor d'Esp1/Separasa. Aquest resultat suggereix que com a mínim un nivell addicional de control actua protegint la cohesina de la proteasa, sigui a nivell d'inhibició de l'activitat Esp1/separasa, sigui a nivell de

Discussió

protegir la cohesina de l'activitat Esp1/Separasa activa. Els nostres resultats indiquen que aquest nou nivell de control depèn de Rad53.

Per tant, el mecanisme mitjançant el qual el *checkpoint* de fase S impedeix la mitosi inclou nivells addicionals de control que l'estabilització de Pds1/secarina els descrits en la resposta a dany telomèric a G2/M.

Una possibilitat per reconciliar els nostres resultats amb els publicats anteriorment és que en el punt del cicle cel·lular en que es detecta i respon al dany telomèric generat amb el mutant *cdc13-1* la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica ja no és possible. A G2/M l'activitat Cdk1 mitòtica és màxima i Swe1 ja és inestable i els seus nivells estan en caiguda.

Tanmateix, la predicció que un mutant *scc1-73* (o un mutant *pds1 rad53*) hauria d'esquivar aquests dos controls i permetre l'anafase en presència d'estrès genotòxic en fase S no s'acompleix, la qual cosa suggereix la presència de més nivells de control.

3 La inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica i del tall de cohesina impedeixen la segregació cromosòmica en presència d'estrès genotòxic en fase S

El tall de la cohesina i l'allargament dels fusos mitòtics són necessaris per l'anafase (Uhlmann et al. 1999)(Rahal & Amon 2008). Ambdós esdeveniments requereixen activitat Cdk1 mitòtica (Rudner & Murray 2000; Rudner et al. 2000)(Rahal & Amon 2008).

Els nostres resultats mostren que en resposta a estrès genotòxic en fase S es produeix inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica i estabilització de la cohesió. La disrupció individual d'aquests controls no elimina el control que evita la segregació de cromosomes danyats i/o incompletament replicats.

A la vista d'aquests resultats es decideix combinar l'absència de control sobre l'activitat Cdk1 mitòtica amb la deleció de Pds1. Així, el triple mutant *rad53Δ swe1Δ pds1Δ* mostra segregació cromosòmica en

presència d'estrès genotòxic. En aquest mutant s'observa tall de la cohesina demostrant que Esp1/Separasa és activa. Els mateixos resultats es van obtenir amb el mutant *rad53Δ swe1Δ scc1-73*. La substitució de la deleció de Pds1 per un al·lel condicions de Mcd1 (*scc1-73*) va permetre confirmar que l'efecte de la deleció de la Securina és l'activació de la Separasa.

El triple mutant *rad53Δ swe1Δ pds1Δ*, el qual mostra segregació cromosòmica, presenta spindles llargs. L'allargament dels spindles és degut a l'activitat Cdk1 mitòtica (Rahal & Amon 2008). Per tant, això ens confirma que per tal que tingui lloc la segregació cromosòmica en presència d'estrès genotòxic s'han de complir les mateixes condicions que en un cycle no pertorbat: tall de la cohesina per permetre la separació de les cromàtides germanes i l'activitat CDK mitòtica, necessària per generar la força que estiri els cromosomes cap a pols oposats de la cèl·lula. Per altre banda, la longitud d'entre 5 i 7µm dels spindles en el triple mutant suggereix que les cèl·lules inicien la segregació i romanen a anafase primària (Higuchi & Uhlmann 2005). El fet que la major part de les cèl·lules de triple mutant no progressin a etapes tardanes de l'anafase suggereix defectes associats a l'alliberació de Cdc14.

Per altra banda, el fet que en condicions d'estrès genotòxic el mutant *pds1Δ* no presenti tall de la cohesina però si el triple mutant *rad53Δ swe1Δ pds1Δ* suggereix que el *checkpoint* de fase S d'alguna manera podria estar regulant l'activitat de la Separasa en aquestes condicions. Aquesta és una possibilitat que caldrà explorar en el futur.

3.1.1 Conservació d'una regulació redundat en el control de la mitosi en presència d'estrès genotòxic

El control de la segregació cromosòmica en presència d'estrès genotòxic difereix entre el llevat de gemmació, llevat de fissió i humans. Mentre que en *S. pombe* l'al·lel no fosforilable Cdk1-15A permet la segregació cromosòmica malgrat els cromosomes no estiguin completament replicats (Gould & Nurse 1989); en humans la fosforilació de la tirosina 15

de Cdk1 juga un paper molt limitat en la regulació de l'anafase en presència de dany al DNA (Jin et al. 1996). Per tant, el tant en *S. cerevisiae* com en *Humans* la fosforilació inhibidora de Cdk1 per Wee1 semblen estar integrades en una regulació redundat amb altre vies.

Això suggereix l'existència d'un control dual de l'anafase també en humans, on l'activitat Cdk1 mitòtica i el tall de la cohesina estiguin regulats. No obstant, mentre en llevat de gemació Pds1 juga un rol crucial, en *Humans* la regulació la regulació sembla estar centrada no en la Securina sinó en l'activitat Separasa. En primer lloc, perquè aquesta activitat sembla estar altament regulada en *Humans*. En un cicle no pertorbat s'ha descrit una regulació dual de la Separasa; per una banda és inhibida per la Securina i per altre per la fosforilació inhibidora de Cdk1-Ciclina B (Stemmann et al. 2001). En segon lloc, s'ha observat que la Separasa està sobre-expressada en múltiples tumors i s'ha plantejat que aquest fet pot ser una força directora de l'aneuploidia (N. Zhang et al. 2008; Meyer et al. 2009). Per contra, en absència de Securina les cèl·lules humanes són capaces de mantenir la seva dotació cromosòmica; en canvi en llevat de gemmació l'absència de Pds1 presenta una elevada taxa d'arranjament cromosòmics, especialment en combinació amb mutants del *checkpoint* de fase S b.

3.1.2 El triple mutant *rad53 swe1 pds1* presenta segregació cromosòmica en presència d'estrès genotòxic sense alliberació de Cdc14

En resposta a estrès genotòxic la segregació cromosòmica que té lloc en el triple mutant *rad53 swe1 pds1* no presenta alliberació aparent de Cdc14. Una possibilitat és que les cèl·lules entrin en anafase en absència de Cdc14. Tanmateix, no es pot descartar que aquesta sigui parcial i no l'haguem detectat.

El mutant *rad53-21 swe1Δ pds1Δ* en presència d'estrès genotòxic mostra tall de Mcd1/Cohesina. Donat que la primera alliberació de Cdc14 és dependent de FEAR i de l'activació de Esp1/Separasa i que hem descrit

que en el triple mutant hi ha activitat de la Separasa és possible que l'alliberació de Cdc14 aquesta tingui lloc (Sullivan & Uhlmann 2003).

L'altre possibilitat seria que el mutant *rad53-21 swe1Δ pds1Δ* presentés segregació cromosòmica sense alliberació de Cdc14. S'ha descrit que en absència de Cdc14 les cèl·lules poden entrar a anafase però veuen compromesa completar la segregació del DNA (Higuchi & Uhlmann 2005). Els microtúbuls metafàsics són altament inestables, fet que es pensa que ajuda a corregir unions errònies dels microtúbuls del fus mitòtic amb els cromosomes. Quan les cèl·lules entren en l'anafase el microtúbuls s'estabilitzen ràpidament quan aquests comencen a allargar-se (Maddox et al. 2000). La reducció de la inestabilitat dels spindles és deguda a l'alliberació de Cdc14, no a la separació de les cromàtides germanes. Així doncs quan la segregació cromosòmica és induïda pel tall de la cohesina per un sistema heteròleg sense alliberació de Cdc14 les cèl·lules entren en anafase però moltes no la completen, presentant spindles curts o fins i tot trencats b.

Ask1 és substrat de Cdc14, la defosforilació del qual és essencial per l'estabilització dels microtúbuls anafàsics (Higuchi & Uhlmann 2005). L'anàlisi del grau de fosforilació de Ask1 ens hauria d'ajudar a determinar si està tenint lloc alliberació de Cdc14. L'estudi de la fosforilació de Ask1 en el triple mutant mostra un patró de fosforilació alterat al llarg de tot l'experiment. Aquesta alteració podria comportar un dinàmica anòmala dels spindles i podria explicar la no progressió a etapes tardanes de l'anafase. En resum, l'anàlisi de la fosforilació de Ask1 no ens permet concloure si Cdc14 està essent alliberat i en conseqüència és actiu. Caldria analitzar altres substrats de Cdc14 defosforilats en anafase primària per descartar aquesta opció.

Si finalment no està tenint lloc alliberació de Cdc14, això podria explicar algun dels fenotips que observem, com per exemple cèl·lules en que s'observen dues masses de DNA amb el fus mitòtic col·lapsat. Per altre banda, quan la segregació cromosòmica en un cicle no pertorbat té lloc sense alliberació de Cdc14 el percentatge de cèl·lules binucleades és pròxim a 60% (Uhlmann et al. 2000); valor similar al que obtenim en el

triple mutant *rad53 swe1 pds1* en presència d'estrès genotòxic. Per tant, un possible explicació a que en presència d'estrès genotòxic no tota la població segregui el DNA fins a generar cèl·lules amb dues masses distingibles és la no alliberació nucleolar de Cdc14.

3.1.3 Implicació de Rad53 en la regulació de la mitosi de manera independent de l'activitat CDK mitòtica

Estudis publicats al llarg de les darreres dues dècades no ens permeten descartar que el *checkpoint de fase S*, a través de Rad53, actuï també sobre altres processos importants per la mitosi, a part de l'activitat CDK de fase M. Mentre que l'activitat Cdk1 mitòtica en un cicle no pertorbat regula les proteïnes motores dels microtúbuls, en un cicle en presència d'estrès replicatiu sembla ser Rad53 qui, directament, regularia la dinàmica dels spindles (Chee & Haase 2010; Krishnan et al. 2004). S'ha suggerit que en presència d'estrès replicatiu el *checkpoint de fase S* podria estar inhibint la mitosi a través de regular les proteïnes associades als microtúbuls Cin8, Stu1 i Kip3. Per altre banda també s'ha apuntat que el *checkpoint de fase S* podria regular la mitosi en una fase S compromesa regulant l'expressió de la subunitat Cdc20 d'APC.

Tots aquests estudis previs plantegen la possibilitat que amb la deleció de Rad53 no només estiguem afectant l'activitat Cdk1 mitòtica, sinó també altres processos inhibits pel *checkpoint* de fase S. Això obra la porta a que en identificar el substrat essencial de Rad53 per inhibir l'activitat Cdk1 de fase M no es pugui *bypassar* el requeriment de Rad53 en el control de l'entrada a mitosi.

A partir d'aquests resultats plantegem un model de regulació de l'anafase en presència d'estrès genotòxic en que Mec1 inhibeix l'activitat Cdk1 mitòtica, a través de Swe1 i Rad53, i estabilitza Pds1/Securina, conjuntament amb el *Spindle Assembly Checkpoint*. Així, cada una de les vies de senyalització és suficient per evitar la segregació cromosòmica quan la replicació està compromesa.

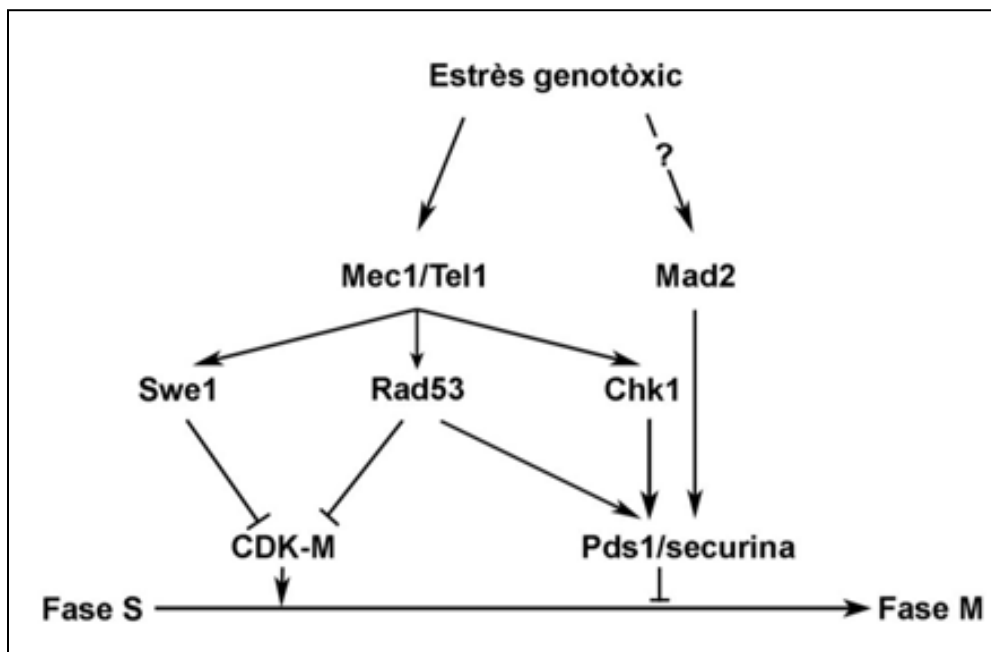


Figura 69. Model proposat de regulació de la mitosi en resposta a estrès genotòxic a *S. cerevisiae*. Vegeu text per detalls

Discussió

CONCLUSIONS

1. L'activitat de la quinasa dependent de ciclina associada a ciclins mitòtiques està inhibida en resposta a estrès genotòxic al llevat de gemmació *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Aquesta inhibició depèn del mecanisme de vigilància (*checkpoint*) de la fase S, i no implica control transcripcional de les ciclins mitòtiques.
3. L'absència de Mec1, la quinasa transductora central del *checkpoint*, és suficient per deslliurar l'activitat Cdk1 mitòtica d'aquesta inhibició en presència d'estrès genotòxic. En canvi la deleció de Rad53 no elimina el control.
4. En resposta a estrès genotòxic, Mec1 estabilitza els nivells de Swe1.
5. Aquesta estabilització necessita la serina 385, l'única a Swe1 en la seqüència SQ de fosforilació per Mec1.
6. L'estabilització dels nivells de Swe1 requereix també qualsevol de les dues quinases efectores del *checkpoint* de fase S, Rad53 o Chk1.
7. Hem identificat Pol12 com a substrat específic de l'activitat Cdk1 associada a les ciclins mitòtiques Clb1 o Clb2. Això ens ha permès estudiar l'activitat Cdk1 mitòtica *in vivo*.
8. Swe1 i la tirosina 19 de Cdk1 són dispensables per a la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica sobre Pol12 en resposta a estrès genotòxic.
9. El motiu de la dispensabilitat de Swe1 i la tirosina 19 en el control de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès genotòxic és l'existència d'una via paral·lela dependent de Rad53 no identificada anteriorment. Cadascuna de les dues vies és individualment suficient per inhibir l'acció de la Cdk1 mitòtica *in vivo*.
10. La presència d'activitat Cdk1 mitòtica no és suficient per permetre l'anafase en presència d'estrès genotòxic en fase S.

Conclusions

11. Pds1/secarina és establitzada en resposta a estrès genotòxic en fase S.
12. Tanmateix, Pds1/secarina és dispensable en el control de l'anafase en la resposta del *checkpoint* de la fase S a estrès genotòxic.
13. En absència de Pds1/secarina, Rad53 impedeix el tall de la cohesina, contribuint a evitar la segregació cromosòmica.
14. Per tant, En presència d'estrès genotòxic en fase S dues vies independents, el *checkpoint* de fase S i el *checkpoint* d'ensamblatge del fus mitòtic, contribueixen a l'establització de la cohesió.
15. És només quan hi ha pèrdua de control de la cohesió i presència d'activitat Cdk1 mitòtics que es fa possible la segregació indeguda de cromosomes danyats i/o incompletament replicats.
16. Els nostres resultats reconcilien la universalitat del control de la mitosi per Swe1, justificant la seva dispensabilitat en la resposta a estrès genotòxic a *S. cerevisiae*. De fet, en absència dels altres controls (*rad53 pds1*) Swe1 sola té la capacitat d'impedir la segregació cromosòmica.

BIBLIOGRAFIA

- Admire, A. et al., 2006. Cycles of chromosome instability are associated with a fragile site and are increased by defects in DNA replication and checkpoint controls in yeast. *Genes Dev*, 20(2), pp.159–173.
- Agarwal, R. et al., 2003. Two distinct pathways for inhibiting pds1 ubiquitination in response to DNA damage. *The Journal of biological chemistry*, 278(45), pp.45027–33.
- Alcasabas, A.A. et al., 2001. Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53. *Nat Cell Biol*, 3(11), pp.958–965.
- Alexandru, G. et al., 2001. Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast. *Cell*, 105(4), pp.459–472.
- Allen, J.B. et al., 1994a. The SAD1/RAD53 protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast. *Genes Dev*, 8(20), pp.2401–2415.
- Allen, J.B. et al., 1994b. The SAD1/RAD53 protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast. *Genes & development*, 8(20), pp.2401–15.
- Amon, A. et al., 1993. Mechanisms that help the yeast cell cycle clock tick: G2 cyclins transcriptionally activate G2 cyclins and repress G1 cyclins. *Cell*, 74(6), pp.993–1007.
- Amon, A. et al., 1992. Regulation of p34CDC28 tyrosine phosphorylation is not required for entry into mitosis in *S. cerevisiae*. *Nature*, 355(6358), pp.368–371.
- Anastasia, S.D. et al., 2012. A link between mitotic entry and membrane growth suggests a novel model for cell size control. *The Journal of cell biology*, 197(1), pp.89–104.
- Asano, S. et al., 2005. Concerted mechanism of Swe1/Wee1 regulation by multiple kinases in budding yeast. *The EMBO journal*, 24(12), pp.2194–204.
- Bähler, J. et al., 1998. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast (Chichester, England)*, 14(10), pp.943–51.
- Bardin, A.J., Visintin, R. & Amon, A., 2000. A mechanism for coupling exit from mitosis to partitioning of the nucleus. *Cell*, 102(1), pp.21–31.
- Bartel, P. et al., 1993. Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *BioTechniques*, 14(6), pp.920–4.

Bibliografia

- Bartkova, J. et al., 2005. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, 434(7035), pp.864–70.
- Bartkova, J. et al., 2006. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*, 444(7119), pp.633–7.
- Bean, J.M., Siggia, E.D. & Cross, F.R., 2005. High functional overlap between Mlul cell-cycle box binding factor and Swi4/6 cell-cycle box binding factor in the G1/S transcriptional program in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 171(1), pp.49–61.
- Bell, D.W. et al., 1999. Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5449), pp.2528–31.
- De Bont, R. & van Larebeke, N., 2004. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*, 19(3), pp.169–85.
- Booher, R.N., Deshaies, R.J. & Kirschner, M.W., 1993. Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. *The EMBO journal*, 12(9), pp.3417–26.
- Bouchoux, C. & Uhlmann, F., 2011. A quantitative model for ordered Cdk substrate dephosphorylation during mitotic exit. *Cell*, 147(4), pp.803–14.
- De Bruin, R.A.M. et al., 2004. Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5. *Cell*, 117(7), pp.887–98.
- Byun, T.S. et al., 2005. Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes & development*, 19(9), pp.1040–52.
- Cahill, D.P. et al., 1999. Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends in cell biology*, 9(12), pp.M57–60.
- Caydasi, A.K. & Pereira, G., 2012. SPOC alert--when chromosomes get the wrong direction. *Experimental cell research*, 318(12), pp.1421–7.
- Chee, M.K. & Haase, S.B., 2010. B-cyclin/CDKs regulate mitotic spindle assembly by phosphorylating kinesins-5 in budding yeast. *PLoS genetics*, 6(5), p.e1000935.
- Chen, M.S. et al., 2001. Absence of apparent phenotype in mice lacking Cdc25C protein phosphatase. *Molecular and cellular biology*, 21(12), pp.3853–61.
- Cho, R.J. et al., 1998. A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Molecular cell*, 2(1), pp.65–73.

- Ciosk, R. et al., 1998. An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell*, 93(6), pp.1067–76.
- Clarke, D.J. et al., 2001. Mec1p regulates Pds1p levels in S phase: complex coordination of DNA replication and mitosis. *Nature cell biology*, 3(7), pp.619–27.
- Clarke, D.J. et al., 2003. S-phase checkpoint controls mitosis via an APC-independent Cdc20p function. *Nature cell biology*, 5(10), pp.928–35.
- Clarke, D.J. et al., 1999. The Pds1 anaphase inhibitor and Mec1 kinase define distinct checkpoints coupling S phase with mitosis in budding yeast. *Current biology : CB*, 9(7), pp.365–8.
- Clerici, M. et al., 2004. A Tel1/MRX-dependent checkpoint inhibits the metaphase-to-anaphase transition after UV irradiation in the absence of Mec1. *Molecular and cellular biology*, 24(23), pp.10126–44.
- Clotet, J. et al., 2006. Phosphorylation of Hsl1 by Hog1 leads to a G2 arrest essential for cell survival at high osmolarity. *The EMBO journal*, 25(11), pp.2338–46.
- Cohen-Fix, O. et al., 1996. Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev*, 10(24), pp.3081–3093.
- Cohen-Fix, O. & Koshland, D., 1997. The anaphase inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* Pds1p is a target of the DNA damage checkpoint pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(26), pp.14361–14366.
- Cooper, K., 2006. Rb, whi it's not just for metazoans anymore. *Oncogene*, 25(38), pp.5228–32.
- Copeland, C.S. & Snyder, M., 1993. Nuclear pore complex antigens delineate nuclear envelope dynamics in vegetative and conjugating *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 9(3), pp.235–49.
- Costanzo, M. et al., 2004. CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast. *Cell*, 117(7), pp.899–913.
- Coudreuse, D. & Nurse, P., 2010. Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. *Nature*, 468(7327), pp.1074–9.
- Crasta, K. et al., 2006. Cdk1 regulates centrosome separation by restraining proteolysis of microtubule-associated proteins. *The EMBO journal*, 25(11), pp.2551–63.

Bibliografia

- D'Amours, D., Stegmeier, F. & Amon, A., 2004. Cdc14 and condensin control the dissolution of cohesin-independent chromosome linkages at repeated DNA. *Cell*, 117(4), pp.455–69.
- Dahmann, C., Diffley, J.F. & Nasmyth, K.A., 1995. S-phase-promoting cyclin-dependent kinases prevent re-replication by inhibiting the transition of replication origins to a pre-replicative state. *Current biology : CB*, 5(11), pp.1257–69.
- Desany, B.A. et al., 1998. Recovery from DNA replicational stress is the essential function of the S-phase checkpoint pathway. *Genes & development*, 12(18), pp.2956–70.
- Deshaies, R.J. & Kirschner, M., 1995. G1 cyclin-dependent activation of p34^{CDC28} (Cdc28p) in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(4), pp.1182–6.
- Donaldson, A.D. et al., 1998. CLB5-dependent activation of late replication origins in *S. cerevisiae*. *Molecular cell*, 2(2), pp.173–82.
- Donovan, J.D. et al., 1994. P40^{SDB25}, a putative CDK inhibitor, has a role in the M/G1 transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development*, 8(14), pp.1640–53.
- Draetta, G. & Beach, D., 1988. Activation of cdc2 protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement. *Cell*, 54(1), pp.17–26.
- Drury, L.S., Perkins, G. & Diffley, J.F., 1997. The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast. *The EMBO journal*, 16(19), pp.5966–76.
- Duch, A. et al., 2011. A Dbf4 mutant contributes to bypassing the Rad53-mediated block of origins of replication in response to genotoxic stress. *The Journal of biological chemistry*, 286(4), pp.2486–2491.
- Dunphy, W.G. & Newport, J.W., 1989. Fission yeast p13 blocks mitotic activation and tyrosine dephosphorylation of the *Xenopus* cdc2 protein kinase. *Cell*, 58(1), pp.181–91.
- Edelheit, O., Hanukoglu, A. & Hanukoglu, I., 2009. Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. *BMC biotechnology*, 9, p.61.
- Edenberg, E.R. et al., 2014. Rad53 downregulates mitotic gene transcription by inhibiting the transcriptional activator Ndd1. *Molecular and cellular biology*, 34(4), pp.725–38.

- Enoch, T. & Nurse, P., 1990. Mutation of fission yeast cell cycle control genes abolishes dependence of mitosis on DNA replication. *Cell*, 60(4), pp.665–73.
- Espinoza, F.H. et al., 1996. A cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) in budding yeast unrelated to vertebrate CAK. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5282), pp.1714–7.
- Evans, T. et al., 1983. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, 33(2), pp.389–96.
- Fang, F. & Newport, J.W., 1991. Evidence that the G1-S and G2-M transitions are controlled by different cdc2 proteins in higher eukaryotes. *Cell*, 66(4), pp.731–42.
- Feldman, R.M. et al., 1997. A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell*, 91(2), pp.221–30.
- Feng, W. et al., 2009. Centromere replication timing determines different forms of genomic instability in *Saccharomyces cerevisiae* checkpoint mutants during replication stress. *Genetics*, 183(4), pp.1249–60.
- Fitch, I. et al., 1992. Characterization of four B-type cyclin genes of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 3(7), pp.805–18.
- Foiani, M. et al., 1995. Cell cycle-dependent phosphorylation and dephosphorylation of the yeast DNA polymerase alpha-primase B subunit. *Molecular and cellular biology*, 15(2), pp.883–91.
- Furnari, B. et al., 1999. Cdc25 inhibited in vivo and in vitro by checkpoint kinases Cds1 and Chk1. *Molecular biology of the cell*, 10(4), pp.833–45.
- Furnari, B., Rhind, N. & Russell, P., 1997. Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5331), pp.1495–7.
- Gale, J.M., Nissen, K.A. & Smerdon, M.J., 1987. UV-induced formation of pyrimidine dimers in nucleosome core DNA is strongly modulated with a period of 10.3 bases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(19), pp.6644–8.
- Gallo-Fernández, M. et al., 2012. Cell cycle-dependent regulation of the nuclease activity of Mus81-Eme1/Mms4. *Nucleic acids research*, 40(17), pp.8325–35.
- Gardner, R., Putnam, C.W. & Weinert, T., 1999. RAD53, DUN1 and PDS1 define two parallel G2/M checkpoint pathways in budding yeast. *The EMBO journal*, 18(11), pp.3173–85.

Bibliografia

- Garí, E. et al., 2001. Whi3 binds the mRNA of the G1 cyclin CLN3 to modulate cell fate in budding yeast. *Genes & development*, 15(21), pp.2803–8.
- Garvik, B., Carson, M. & Hartwell, L., 1995. Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Molecular and cellular biology*, 15(11), pp.6128–38.
- Gautier, J. et al., 1989. Dephosphorylation and activation of *Xenopus* p34cdc2 protein kinase during the cell cycle. *Nature*, 339(6226), pp.626–9.
- Ghiara, J.B. et al., 1991. A cyclin B homolog in *S. cerevisiae*: chronic activation of the Cdc28 protein kinase by cyclin prevents exit from mitosis. *Cell*, 65(1), pp.163–74.
- Gietz, D. et al., 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic acids research*, 20(6), p.1425.
- Gilbert, C.S., Green, C.M. & Lowndes, N.F., 2001. Budding yeast Rad9 is an ATP-dependent Rad53 activating machine. *Molecular cell*, 8(1), pp.129–36.
- Giordano, A. et al., 1989. A 60 kd *cdc2*-associated polypeptide complexes with the E1A proteins in adenovirus-infected cells. *Cell*, 58(5), pp.981–90.
- Goes, F.S. & Martin, J., 2001. Hsp90 chaperone complexes are required for the activity and stability of yeast protein kinases Mik1, Wee1 and Swe1. *European journal of biochemistry / FEBS*, 268(8), pp.2281–9.
- Goh, P.Y., Lim, H.H. & Surana, U., 2000. Cdc20 protein contains a destruction-box but, unlike Clb2, its proteolysis is not acutely dependent on the activity of anaphase-promoting complex. *European journal of biochemistry / FEBS*, 267(2), pp.434–49.
- Gorr, I.H., Boos, D. & Stemmann, O., 2005. Mutual inhibition of separase and Cdk1 by two-step complex formation. *Molecular cell*, 19(1), pp.135–41.
- Gould, K.L. & Nurse, P., 1989. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2+* protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature*, 342(6245), pp.39–45.
- Grandin, N. & Reed, S.I., 1993. Differential function and expression of *Saccharomyces cerevisiae* B-type cyclins in mitosis and meiosis. *Molecular and cellular biology*, 13(4), pp.2113–25.
- Griffiths, D.J. et al., 1995. Fission yeast *rad17*: a homologue of budding yeast RAD24 that shares regions of sequence similarity with DNA polymerase accessory proteins. *The EMBO journal*, 14(23), pp.5812–23.

- Hadwiger, J.A. et al., 1989. A family of cyclin homologs that control the G1 phase in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(16), pp.6255–9.
- Haering, C.H. et al., 2002. Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Molecular cell*, 9(4), pp.773–88.
- Den Haese, G.J. et al., 1995. The Wee1 protein kinase regulates T14 phosphorylation of fission yeast Cdc2. *Molecular biology of the cell*, 6(4), pp.371–85.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–74.
- Hardwick, K.G. & Murray, A.W., 1995. Mad1p, a phosphoprotein component of the spindle assembly checkpoint in budding yeast. *The Journal of cell biology*, 131(3), pp.709–20.
- Harper, J.W., Burton, J.L. & Solomon, M.J., 2002. The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes Dev*, 16(17), pp.2179–2206.
- Harrison, J.C. et al., 2001. A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint. *Nature cell biology*, 3(4), pp.417–20.
- Hartwell, L.H. et al., 1973. Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of cdc Mutants. *Genetics*, 74(2), pp.267–86.
- Hartwell, L.H. & Kastan, M.B., 1994. Cell cycle control and cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 266(5192), pp.1821–8.
- Hartwell, L.H. & Weinert, T.A., 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science (New York, N.Y.)*, 246(4930), pp.629–34.
- Harvey, S.L. & Kellogg, D.R., 2003. Conservation of mechanisms controlling entry into mitosis: budding yeast wee1 delays entry into mitosis and is required for cell size control. *Current biology : CB*, 13(4), pp.264–75.
- Higuchi, T. & Uhlmann, F., 2005. Stabilization of microtubule dynamics at anaphase onset promotes chromosome segregation. *Nature*, 433(7022), pp.171–6.
- Hilioti, Z. et al., 2001. The anaphase inhibitor Pds1 binds to the APC/C-associated protein Cdc20 in a destruction box-dependent manner. *Current biology : CB*, 11(17), pp.1347–52.
- Holt, L.J. et al., 2007. Evolution of Ime2 phosphorylation sites on Cdk1 substrates provides a mechanism to limit the effects of the phosphatase Cdc14 in meiosis. *Molecular cell*, 25(5), pp.689–702.

Bibliografia

- Holt, L.J., Krutchinsky, A.N. & Morgan, D.O., 2008. Positive feedback sharpens the anaphase switch. *Nature*, 454(7202), pp.353–7.
- Horak, C.E. et al., 2002. Complex transcriptional circuitry at the G1/S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development*, 16(23), pp.3017–33.
- Hsu, W.-S. et al., 2011. S-phase cyclin-dependent kinases promote sister chromatid cohesion in budding yeast. *Molecular and cellular biology*, 31(12), pp.2470–83.
- Hu, F. & Aparicio, O.M., 2005. Swe1 regulation and transcriptional control restrict the activity of mitotic cyclins toward replication proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(25), pp.8910–5.
- Huang, J.N. et al., 2001. Activity of the APC(Cdh1) form of the anaphase-promoting complex persists until S phase and prevents the premature expression of Cdc20p. *The Journal of cell biology*, 154(1), pp.85–94.
- Hwang, L.H. et al., 1998. Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5353), pp.1041–4.
- Irniger, S. & Nasmyth, K., 1997. The anaphase-promoting complex is required in G1 arrested yeast cells to inhibit B-type cyclin accumulation and to prevent uncontrolled entry into S-phase. *Journal of cell science*, 110 (Pt 1, pp.1523–31.
- Iyer, V.R. et al., 2001. Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. *Nature*, 409(6819), pp.533–8.
- Jackson, L.P., Reed, S.I. & Haase, S.B., 2006. Distinct mechanisms control the stability of the related S-phase cyclins Clb5 and Clb6. *Molecular and cellular biology*, 26(6), pp.2456–66.
- Jacobson, M.D. et al., 2000. Testing cyclin specificity in the exit from mitosis. *Molecular and cellular biology*, 20(13), pp.4483–93.
- Jallepalli, P. V & Kelly, T.J., 1997. Cyclin-dependent kinase and initiation at eukaryotic origins: a replication switch? *Current opinion in cell biology*, 9(3), pp.358–63.
- Jaspersen, S.L. et al., 1998. A late mitotic regulatory network controlling cyclin destruction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 9(10), pp.2803–17.
- Jaspersen, S.L. & Morgan, D.O., 2000. Cdc14 activates cdc15 to promote mitotic exit in budding yeast. *Current biology : CB*, 10(10), pp.615–8.

- Jaspersen, S.L. & Winey, M., 2004. The budding yeast spindle pole body: structure, duplication, and function. *Annual review of cell and developmental biology*, 20, pp.1–28.
- Jensen, S. et al., 2001. A novel role of the budding yeast separin Esp1 in anaphase spindle elongation: evidence that proper spindle association of Esp1 is regulated by Pds1. *The Journal of cell biology*, 152(1), pp.27–40.
- Jin, P., Gu, Y. & Morgan, D.O., 1996. Role of inhibitory CDC2 phosphorylation in radiation-induced G2 arrest in human cells. *The Journal of cell biology*, 134(4), pp.963–70.
- Johnston, G.C., Pringle, J.R. & Hartwell, L.H., 1977. Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Experimental cell research*, 105(1), pp.79–98.
- Kato, R. & Ogawa, H., 1994. An essential gene, ESR1, is required for mitotic cell growth, DNA repair and meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research*, 22(15), pp.3104–12.
- Keaton, M.A. et al., 2007. Differential susceptibility of yeast S and M phase CDK complexes to inhibitory tyrosine phosphorylation. *Current biology : CB*, 17(14), pp.1181–9.
- Keith, C.T. & Schreiber, S.L., 1995. PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5233), pp.50–1.
- Khmelinskii, A. et al., 2007. Cdc14-regulated midzone assembly controls anaphase B. *The Journal of cell biology*, 177(6), pp.981–93.
- Kim, E.M. & Burke, D.J., 2008. DNA damage activates the SAC in an ATM/ATR-dependent manner, independently of the kinetochore. *PLoS genetics*, 4(2), p.e1000015.
- Kim, S.H. et al., 1998. Fission yeast Slp1: an effector of the Mad2-dependent spindle checkpoint. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5353), pp.1045–7.
- Kleber-Janke, T. & Becker, W.M., 2000. Use of modified BL21(DE3) *Escherichia coli* cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage. *Protein expression and purification*, 19(3), pp.419–24.
- Knapp, D. et al., 1996. The transcription factor Swi5 regulates expression of the cyclin kinase inhibitor p40SIC1. *Molecular and cellular biology*, 16(10), pp.5701–7.
- Koch, C. et al., 1993. A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G1 to S phase. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5128), pp.1551–7.

Bibliografia

- Koch, C. & Nasmyth, K., 1994. Cell cycle regulated transcription in yeast. *Current opinion in cell biology*, 6(3), pp.451–9.
- Kõivomägi, M. et al., 2011. Cascades of multisite phosphorylation control Sic1 destruction at the onset of S phase. *Nature*, 480(7375), pp.128–31.
- Kondo, T. et al., 2001. Recruitment of Mec1 and Ddc1 checkpoint proteins to double-strand breaks through distinct mechanisms. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5543), pp.867–70.
- König, C., Maekawa, H. & Schiebel, E., 2010. Mutual regulation of cyclin-dependent kinase and the mitotic exit network. *The Journal of cell biology*, 188(3), pp.351–68.
- Koranda, M. et al., 2000. Forkhead-like transcription factors recruit Ndd1 to the chromatin of G2/M-specific promoters. *Nature*, 406(6791), pp.94–8.
- Krishnan, V. et al., 2004. DNA replication checkpoint prevents precocious chromosome segregation by regulating spindle behavior. *Molecular cell*, 16(5), pp.687–700.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–5.
- Lambert, S. et al., 2003. Schizosaccharomyces pombe checkpoint response to DNA interstrand cross-links. *Molecular and cellular biology*, 23(13), pp.4728–37.
- Lambert, S. & Carr, A.M., 2005. Checkpoint responses to replication fork barriers. *Biochimie*, 87(7), pp.591–602.
- Lee, S.-J. et al., 2003. Rad53 phosphorylation site clusters are important for Rad53 regulation and signaling. *Molecular and cellular biology*, 23(17), pp.6300–14.
- Lew, D.J., 2003. The morphogenesis checkpoint: how yeast cells watch their figures. *Current opinion in cell biology*, 15(6), pp.648–53.
- Lew, D.J. & Reed, S.I., 1995. A cell cycle checkpoint monitors cell morphogenesis in budding yeast. *The Journal of cell biology*, 129(3), pp.739–49.
- Lew, D.J. & Reed, S.I., 1993. Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *The Journal of cell biology*, 120(6), pp.1305–20.
- Liang, N. et al., 2013. A Wee1 checkpoint inhibits anaphase onset. *The Journal of cell biology*, 201(6), pp.843–62.
- De Lichtenberg, U. et al., 2005. Dynamic complex formation during the yeast cell cycle. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5710), pp.724–7.

- Lim, H.H., Goh, P.Y. & Surana, U., 1996. Spindle pole body separation in *Saccharomyces cerevisiae* requires dephosphorylation of the tyrosine 19 residue of Cdc28. *Molecular and cellular biology*, 16(11), pp.6385–97.
- Lisby, M. et al., 2004. Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell*, 118(6), pp.699–713.
- Liu, D. et al., 2009. Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of aurora B kinase from kinetochore substrates. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5919), pp.1350–3.
- Liu, H. & Wang, Y., 2006. The function and regulation of budding yeast Swe1 in response to interrupted DNA synthesis. *Molecular biology of the cell*, 17(6), pp.2746–56.
- Lopes, M. et al., 2001. The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature*, 412(6846), pp.557–61.
- Lopes, M., Foiani, M. & Sogo, J.M., 2006. Multiple mechanisms control chromosome integrity after replication fork uncoupling and restart at irreparable UV lesions. *Molecular cell*, 21(1), pp.15–27.
- Lopez-Girona, A., Kanoh, J. & Russell, P., 2001. Nuclear exclusion of Cdc25 is not required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Current biology : CB*, 11(1), pp.50–4.
- Lundgren, K. et al., 1991. mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell*, 64(6), pp.1111–22.
- Lyons, N.A. & Morgan, D.O., 2011. Cdk1-dependent destruction of Eco1 prevents cohesion establishment after S phase. *Molecular cell*, 42(3), pp.378–89.
- Ma, X.J., Lu, Q. & Grunstein, M., 1996. A search for proteins that interact genetically with histone H3 and H4 amino termini uncovers novel regulators of the Swe1 kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development*, 10(11), pp.1327–40.
- Maddox, P.S., Bloom, K.S. & Salmon, E.D., 2000. The polarity and dynamics of microtubule assembly in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature cell biology*, 2(1), pp.36–41.
- Magiera, M.M., Gueydon, E. & Schwob, E., 2014. DNA replication and spindle checkpoints cooperate during S phase to delay mitosis and preserve genome integrity. *The Journal of cell biology*, 204(2), pp.165–75.
- Maher, M. et al., 1995. Cell cycle-regulated transcription of the CLB2 gene is dependent on Mcm1 and a ternary complex factor. *Molecular and cellular biology*, 15(6), pp.3129–37.

Bibliografia

- Majka, J., Niedziela-Majka, A. & Burgers, P.M.J., 2006. The checkpoint clamp activates Mec1 kinase during initiation of the DNA damage checkpoint. *Molecular cell*, 24(6), pp.891–901.
- Mantiero, D. et al., 2007. Dual role for *Saccharomyces cerevisiae* Tel1 in the checkpoint response to double-strand breaks. *EMBO reports*, 8(4), pp.380–7.
- Maresca, T.J. & Salmon, E.D., 2009. Intrakinetochore stretch is associated with changes in kinetochore phosphorylation and spindle assembly checkpoint activity. *The Journal of cell biology*, 184(3), pp.373–81.
- Masumoto, H. et al., 2002. S-Cdk-dependent phosphorylation of Sld2 essential for chromosomal DNA replication in budding yeast. *Nature*, 415(6872), pp.651–5.
- McGowan, C.H. & Russell, P., 1993. Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *The EMBO journal*, 12(1), pp.75–85.
- McMillan, J.N. et al., 1999. The morphogenesis checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae*: cell cycle control of Swe1p degradation by Hsl1p and Hsl7p. *Molecular and cellular biology*, 19(10), pp.6929–39.
- Melo, J. & Toczyski, D., 2002. A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Current opinion in cell biology*, 14(2), pp.237–45.
- Melo, J.A., Cohen, J. & Toczyski, D.P., 2001. Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo. *Genes & development*, 15(21), pp.2809–21.
- Mendenhall, M.D., 1993. An inhibitor of p34CDC28 protein kinase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5092), pp.216–9.
- Mendenhall, M.D., Jones, C.A. & Reed, S.I., 1987. Dual regulation of the yeast CDC28-p40 protein kinase complex: cell cycle, pheromone, and nutrient limitation effects. *Cell*, 50(6), pp.927–35.
- Mendoza, M. et al., 2009. A mechanism for chromosome segregation sensing by the NoCut checkpoint. *Nature cell biology*, 11(4), pp.477–83.
- Mendoza, M. & Barral, Y., 2008. Co-ordination of cytokinesis with chromosome segregation. *Biochemical Society transactions*, 36(Pt 3), pp.387–90.
- Meyer, R. et al., 2009. Overexpression and mislocalization of the chromosomal segregation protein separase in multiple human cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(8), pp.2703–10.

- Michael, W.M. & Newport, J., 1998. Coupling of mitosis to the completion of S phase through Cdc34-mediated degradation of Wee1. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5395), pp.1886–9.
- Michaelis, C., Ciosk, R. & Nasmyth, K., 1997. Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell*, 91(1), pp.35–45.
- Morgan, D.O., 1995. Principles of CDK regulation. *Nature*, 374(6518), pp.131–4.
- Morla, A.O. et al., 1989. Reversible tyrosine phosphorylation of cdc2: dephosphorylation accompanies activation during entry into mitosis. *Cell*, 58(1), pp.193–203.
- Morrow, D.M. et al., 1995. TEL1, an *S. cerevisiae* homolog of the human gene mutated in ataxia telangiectasia, is functionally related to the yeast checkpoint gene MEC1. *Cell*, 82(5), pp.831–40.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*, 155, pp.335–50.
- Myung, K., Datta, A. & Kolodner, R.D., 2001. Suppression of spontaneous chromosomal rearrangements by S phase checkpoint functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 104(3), pp.397–408.
- Nash, P. et al., 2001. Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication. *Nature*, 414(6863), pp.514–21.
- Nash, R. et al., 1988. The WHI1+ gene of *Saccharomyces cerevisiae* tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog. *The EMBO journal*, 7(13), pp.4335–46.
- Nasmyth, K. & Dirick, L., 1991. The role of SWI4 and SWI6 in the activity of G1 cyclins in yeast. *Cell*, 66(5), pp.995–1013.
- Nasmyth, K. & Haering, C.H., 2005. The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annual review of biochemistry*, 74, pp.595–648.
- Nguyen, V.Q., Co, C. & Li, J.J., 2001. Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. *Nature*, 411(6841), pp.1068–73.
- Norden, C. et al., 2006. The NoCut pathway links completion of cytokinesis to spindle midzone function to prevent chromosome breakage. *Cell*, 125(1), pp.85–98.
- Nurse, P., 1997. Checkpoint pathways come of age. *Cell*, 91(7), pp.865–7.
- Nurse, P. & Thuriaux, P., 1980. Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 96(3), pp.627–37.

Bibliografia

- O'Connell, M.J. et al., 1997. Chk1 is a wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation. *The EMBO journal*, 16(3), pp.545–54.
- Oikonomou, C. & Cross, F.R., 2011. Rising cyclin-CDK levels order cell cycle events. *PloS one*, 6(6), p.e20788.
- Orlando, D.A. et al., 2008. Global control of cell-cycle transcription by coupled CDK and network oscillators. *Nature*, 453(7197), pp.944–947.
- Osborn, A.J. & Elledge, S.J., 2003. Mrc1 is a replication fork component whose phosphorylation in response to DNA replication stress activates Rad53. *Genes & development*, 17(14), pp.1755–67.
- Palou, G. et al., 2010. Cyclin regulation by the s phase checkpoint. *The Journal of biological chemistry*, 285(34), pp.26431–26440.
- Pardee, A.B., 1974. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(4), pp.1286–90.
- Parrilla-Castellar, E.R., Arlander, S.J.H. & Karnitz, L., Dial 9-1-1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex. *DNA repair*, 3(8-9), pp.1009–14.
- Paulovich, A.G. & Hartwell, L.H., 1995. A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. *Cell*, 82(5), pp.841–7.
- Pearson, C.G. et al., 2001. Budding yeast chromosome structure and dynamics during mitosis. *The Journal of cell biology*, 152(6), pp.1255–66.
- Pellicoli, A. et al., 1999. Activation of Rad53 kinase in response to DNA damage and its effect in modulating phosphorylation of the lagging strand DNA polymerase. *Embo J*, 18(22), pp.6561–6572.
- Peng, C.Y. et al., 1997. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5331), pp.1501–5.
- Pereira, G. et al., 2002. Regulation of the Bfa1p-Bub2p complex at spindle pole bodies by the cell cycle phosphatase Cdc14p. *The Journal of cell biology*, 157(3), pp.367–79.
- Pereira, G. et al., 2000. The Bub2p spindle checkpoint links nuclear migration with mitotic exit. *Molecular cell*, 6(1), pp.1–10.
- Pereira, G. & Schiebel, E., 2003. Separase regulates INCENP-Aurora B anaphase spindle function through Cdc14. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5653), pp.2120–4.

- Peter, M. & Herskowitz, I., 1994. Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5176), pp.1228–31.
- Piatti, S. et al., 2006. The spindle position checkpoint in budding yeast: the motherly care of MEN. *Cell division*, 1(1), p.2.
- Pines, J., 1995. Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *The Biochemical journal*, 308 (Pt 3, pp.697–711.
- Pines, J. & Hunter, T., 1991. Human cell division: the involvement of cyclins A and B1, and multiple cdc2s. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 56, pp.449–63.
- Pramila, T. et al., 2006. The Forkhead transcription factor Hcm1 regulates chromosome segregation genes and fills the S-phase gap in the transcriptional circuitry of the cell cycle. *Genes & development*, 20(16), pp.2266–78.
- Queralt, E. et al., 2006. Downregulation of PP2A(Cdc55) phosphatase by separase initiates mitotic exit in budding yeast. *Cell*, 125(4), pp.719–32.
- Queralt, E. & Uhlmann, F., 2008a. Cdk-counteracting phosphatases unlock mitotic exit. *Current opinion in cell biology*, 20(6), pp.661–8.
- Queralt, E. & Uhlmann, F., 2008b. Separase cooperates with Zds1 and Zds2 to activate Cdc14 phosphatase in early anaphase. *The Journal of cell biology*, 182(5), pp.873–83.
- Rahal, R. & Amon, A., 2008. Mitotic CDKs control the metaphase-anaphase transition and trigger spindle elongation. *Genes & development*, 22(11), pp.1534–48.
- Raleigh, J.M. & O'Connell, M.J., 2000. The G(2) DNA damage checkpoint targets both Wee1 and Cdc25. *Journal of cell science*, 113 (Pt 1, pp.1727–36.
- Reneke, J.E. et al., 1988. The carboxy-terminal segment of the yeast alpha-factor receptor is a regulatory domain. *Cell*, 55(2), pp.221–34.
- Rhind, N., Furnari, B. & Russell, P., 1997. Cdc2 tyrosine phosphorylation is required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Genes & development*, 11(4), pp.504–11.
- Rhind, N. & Russell, P., 2001. Roles of the mitotic inhibitors Wee1 and Mik1 in the G(2) DNA damage and replication checkpoints. *Molecular and cellular biology*, 21(5), pp.1499–508.

Bibliografia

- Rhind, N. & Russell, P., 1998. Tyrosine phosphorylation of cdc2 is required for the replication checkpoint in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and cellular biology*, 18(7), pp.3782–7.
- Richardson, H. et al., 1992. Cyclin-B homologs in *Saccharomyces cerevisiae* function in S phase and in G2. *Genes & development*, 6(11), pp.2021–34.
- Richardson, H.E. et al., 1989. An essential G1 function for cyclin-like proteins in yeast. *Cell*, 59(6), pp.1127–33.
- Rieder, C.L. et al., 1995. The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *The Journal of cell biology*, 130(4), pp.941–8.
- Ro, H.S., Song, S. & Lee, K.S., 2002. Bfa1 can regulate Tem1 function independently of Bub2 in the mitotic exit network of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(8), pp.5436–5441.
- Rowland, B.D. et al., 2009. Building sister chromatid cohesion: smc3 acetylation counteracts an antiestablishment activity. *Molecular cell*, 33(6), pp.763–74.
- Rudner, A.D., Hardwick, K.G. & Murray, A.W., 2000. Cdc28 activates exit from mitosis in budding yeast. *The Journal of cell biology*, 149(7), pp.1361–76.
- Rudner, A.D. & Murray, A.W., 2000. Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *The Journal of cell biology*, 149(7), pp.1377–90.
- Russell, P. & Nurse, P., 1986. cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell*, 45(1), pp.145–53.
- Russell, P. & Nurse, P., 1987. Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell*, 49(4), pp.559–67.
- Sanchez, Y. et al., 1999. Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5442), pp.1166–71.
- Santocanale, C. & Diffley, J.F., 1998. A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature*, 395(6702), pp.615–8.
- Savitsky, K. et al., 1995. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5218), pp.1749–53.

- Schiestl, R.H. & Gietz, R.D., 1989. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current genetics*, 16(5-6), pp.339–46.
- Schneider, B.L. et al., 2004. Growth rate and cell size modulate the synthesis of, and requirement for, G1-phase cyclins at start. *Molecular and cellular biology*, 24(24), pp.10802–13.
- Schrader, E.K., Harstad, K.G. & Matouschek, A., 2009. Targeting proteins for degradation. *Nature chemical biology*, 5(11), pp.815–22.
- Schwab, M., Lutum, A.S. & Seufert, W., 1997. Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis. *Cell*, 90(4), pp.683–93.
- Schwartz, D.C. & Cantor, C.R., 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37(1), pp.67–75.
- Schwob, E. et al., 1994. The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell*, 79(2), pp.233–244.
- Schwob, E. & Nasmyth, K., 1993. CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development*, 7(7A), pp.1160–75.
- Shirayama, M. et al., 1999. APC(Cdc20) promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5. *Nature*, 402(6758), pp.203–207.
- Shou, W. et al., 2002. Cdc5 influences phosphorylation of Net1 and disassembly of the RENT complex. *BMC molecular biology*, 3, p.3.
- Shou, W. et al., 1999. Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell*, 97(2), pp.233–44.
- Sia, R.A., Bardes, E.S. & Lew, D.J., 1998. Control of Swe1p degradation by the morphogenesis checkpoint. *The EMBO journal*, 17(22), pp.6678–88.
- Sia, R.A., Herald, H.A. & Lew, D.J., 1996. Cdc28 tyrosine phosphorylation and the morphogenesis checkpoint in budding yeast. *Molecular biology of the cell*, 7(11), pp.1657–66.
- Simmons Kovacs, L.A. et al., 2012. Cyclin-dependent kinases are regulators and effectors of oscillations driven by a transcription factor network. *Molecular cell*, 45(5), pp.669–79.
- Simon, I. et al., 2001. Serial regulation of transcriptional regulators in the yeast cell cycle. *Cell*, 106(6), pp.697–708.

Bibliografia

- Smolka, M.B. et al., 2005. Dynamic changes in protein-protein interaction and protein phosphorylation probed with amine-reactive isotope tag. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 4(9), pp.1358–69.
- Sorger, P.K. & Murray, A.W., 1992. S-phase feedback control in budding yeast independent of tyrosine phosphorylation of p34cdc28. *Nature*, 355(6358), pp.365–8.
- Spellman, P.T. et al., 1998. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Molecular biology of the cell*, 9(12), pp.3273–97.
- Stegmeier, F., Visintin, R. & Amon, A., 2002. Separase, polo kinase, the kinetochore protein Slk19, and Spo12 function in a network that controls Cdc14 localization during early anaphase. *Cell*, 108(2), pp.207–20.
- Stemmann, O. et al., 2001. Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell*, 107(6), pp.715–26.
- Stern, B.M. & Murray, A.W., 2001. Lack of tension at kinetochores activates the spindle checkpoint in budding yeast. *Current biology : CB*, 11(18), pp.1462–7.
- Straight, A.F. et al., 1997. Mitosis in living budding yeast: anaphase A but no metaphase plate. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5325), pp.574–8.
- Straight, A.F., Sedat, J.W. & Murray, A.W., 1998. Time-lapse microscopy reveals unique roles for kinesins during anaphase in budding yeast. *The Journal of cell biology*, 143(3), pp.687–94.
- Stueland, C.S. et al., 1993. Full activation of p34CDC28 histone H1 kinase activity is unable to promote entry into mitosis in checkpoint-arrested cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 13(6), pp.3744–55.
- Sullivan, M. & Uhlmann, F., 2003. A non-proteolytic function of separase links the onset of anaphase to mitotic exit. *Nature cell biology*, 5(3), pp.249–54.
- Sun, Z. et al., 1996. Spk1/Rad53 is regulated by Mec1-dependent protein phosphorylation in DNA replication and damage checkpoint pathways. *Genes & development*, 10(4), pp.395–406.
- Surana, U. et al., 1993. Destruction of the CDC28/CLB mitotic kinase is not required for the metaphase to anaphase transition in budding yeast. *The EMBO journal*, 12(5), pp.1969–78.
- Surana, U. et al., 1991. The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell*, 65(1), pp.145–61.

- Sutani, T. et al., 2009. Budding yeast Wpl1(Rad61)-Pds5 complex counteracts sister chromatid cohesion-establishing reaction. *Current biology : CB*, 19(6), pp.492–7.
- Sutton, A. & Freiman, R., 1997. The Cak1p protein kinase is required at G1/S and G2/M in the budding yeast cell cycle. *Genetics*, 147(1), pp.57–71.
- Sweeney, F.D. et al., 2005. *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 acts as a Mec1 adaptor to allow Rad53 activation. *Current biology : CB*, 15(15), pp.1364–75.
- Tan, A.L.C., Rida, P.C.G. & Surana, U., 2005. Essential tension and constructive destruction: the spindle checkpoint and its regulatory links with mitotic exit. *The Biochemical journal*, 386(Pt 1), pp.1–13.
- Tanaka, S. et al., 2007. CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature*, 445(7125), pp.328–32.
- Tercero, J.A. & Diffley, J.F., 2001. Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature*, 412(6846), pp.553–7.
- Thomas, B.J. & Rothstein, R., 1989. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*, 56(4), pp.619–30.
- Thornton, B.R. & Toczyski, D.P., 2003. Securin and B-cyclin/CDK are the only essential targets of the APC. *Nature cell biology*, 5(12), pp.1090–4.
- Thuret, J.Y. et al., 1996. Civ1 (CAK in vivo), a novel Cdk-activating kinase. *Cell*, 86(4), pp.565–76.
- Tinker-Kulberg, R.L. & Morgan, D.O., 1999. Pds1 and Esp1 control both anaphase and mitotic exit in normal cells and after DNA damage. *Genes & development*, 13(15), pp.1936–49.
- Tóth, A. et al., 1999. Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p(Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. *Genes & development*, 13(3), pp.320–33.
- Toyn, J.H. et al., 1997. The Swi5 transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae* has a role in exit from mitosis through induction of the cdk-inhibitor Sic1 in telophase. *Genetics*, 145(1), pp.85–96.
- Travesa, A. et al., 2012. DNA replication stress differentially regulates G1/S genes via Rad53-dependent inactivation of Nrm1. *The EMBO journal*, 31(7), pp.1811–22.
- Travesa, A., Duch, A. & Quintana, D.G., 2008. Distinct phosphatases mediate the deactivation of the DNA damage checkpoint kinase Rad53. *The Journal of biological chemistry*, 283(25), pp.17123–30.

Bibliografia

- Tyers, M. & Futcher, B., 1993. Far1 and Fus3 link the mating pheromone signal transduction pathway to three G1-phase Cdc28 kinase complexes. *Molecular and cellular biology*, 13(9), pp.5659–69.
- Tyers, M., Tokiwa, G. & Futcher, B., 1993. Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. *The EMBO journal*, 12(5), pp.1955–68.
- Uhlmann, F. et al., 2000. Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell*, 103(3), pp.375–86.
- Uhlmann, F., Lottspeich, F. & Nasmyth, K., 1999. Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature*, 400(6739), pp.37–42.
- Vader, G., Medema, R.H. & Lens, S.M.A., 2006. The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. *The Journal of cell biology*, 173(6), pp.833–7.
- Vanoosthuysse, V. & Hardwick, K.G., 2009. Overcoming inhibition in the spindle checkpoint. *Genes & development*, 23(24), pp.2799–805.
- Vergés, E. et al., 2007. Cyclin Cln3 is retained at the ER and released by the J chaperone Ydj1 in late G1 to trigger cell cycle entry. *Molecular cell*, 26(5), pp.649–62.
- Verma, R. et al., 1991. Identification and purification of a factor that binds to the Mlu I cell cycle box of yeast DNA replication genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(16), pp.7155–9.
- Verma, R. et al., 1997. Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase. *Science (New York, N.Y.)*, 278(5337), pp.455–60.
- Visintin, R. et al., 1998. The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Molecular cell*, 2(6), pp.709–18.
- Visintin, R., Hwang, E.S. & Amon, A., 1999. Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus. *Nature*, 398(6730), pp.818–23.
- Visintin, R., Prinz, S. & Amon, A., 1997. CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science (New York, N.Y.)*, 278(5337), pp.460–3.
- Visintin, R., Stegmeier, F. & Amon, A., 2003. The role of the polo kinase Cdc5 in controlling Cdc14 localization. *Molecular biology of the cell*, 14(11), pp.4486–98.
- Waizenegger, I. et al., 2002. Regulation of human separase by securin binding and autocleavage. *Current biology : CB*, 12(16), pp.1368–78.

- Waizenegger, I.C. et al., 2000. Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell*, 103(3), pp.399–410.
- Walworth, N., Davey, S. & Beach, D., 1993. Fission yeast chk1 protein kinase links the rad checkpoint pathway to cdc2. *Nature*, 363(6427), pp.368–71.
- Wang, H. et al., 2001. Pds1 phosphorylation in response to DNA damage is essential for its DNA damage checkpoint function. *Genes & development*, 15(11), pp.1361–72.
- Wang, H. et al., 2004. Recruitment of Cdc28 by Whi3 restricts nuclear accumulation of the G1 cyclin-Cdk complex to late G1. *The EMBO journal*, 23(1), pp.180–90.
- Wasch, R. & Cross, F.R., 2002. APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit. *Nature*, 418(6897), pp.556–562.
- Weinert, T.A., 1992. Dual cell cycle checkpoints sensitive to chromosome replication and DNA damage in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Radiation research*, 132(2), pp.141–3.
- Weinert, T.A. & Hartwell, L.H., 1993. Cell cycle arrest of cdc mutants and specificity of the RAD9 checkpoint. *Genetics*, 134(1), pp.63–80.
- Weinert, T.A. & Hartwell, L.H., 1988. The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science (New York, N.Y.)*, 241(4863), pp.317–22.
- Weinert, T.A., Kiser, G.L. & Hartwell, L.H., 1994. Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. *Genes & development*, 8(6), pp.652–65.
- Yamamoto, A., Guacci, V. & Koshland, D., 1996a. Pds1p is required for faithful execution of anaphase in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology*, 133(1), pp.85–97.
- Yamamoto, A., Guacci, V. & Koshland, D., 1996b. Pds1p, an inhibitor of anaphase in budding yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s). *The Journal of cell biology*, 133(1), pp.99–110.
- Yang, X.H. & Zou, L., 2006. Checkpoint and coordinated cellular responses to DNA damage. *Results and problems in cell differentiation*, 42, pp.65–92.
- Yeh, E. et al., 1995. Spindle dynamics and cell cycle regulation of dynein in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology*, 130(3), pp.687–700.

Bibliografia

- Yelamanchi, S.K. et al., 2014. Genotoxic stress prevents Ndd1-dependent transcriptional activation of G2/M-specific genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 34(4), pp.711–24.
- Yoshida, S., Asakawa, K. & Toh-e, A., 2002. Mitotic exit network controls the localization of Cdc14 to the spindle pole body in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current biology : CB*, 12(11), pp.944–50.
- Yu, H., 2007. Cdc20: a WD40 activator for a cell cycle degradation machine. *Molecular cell*, 27(1), pp.3–16.
- Zachariae, W. et al., 1998. Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5394), pp.1721–4.
- Zachariae, W. & Nasmyth, K., 1999. Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes & development*, 13(16), pp.2039–58.
- Zegerman, P. & Diffley, J.F.X., 2007. Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature*, 445(7125), pp.281–5.
- Zhang, J. et al., 2008. Acetylation of Smc3 by Eco1 is required for S phase sister chromatid cohesion in both human and yeast. *Molecular cell*, 31(1), pp.143–51.
- Zhang, N. et al., 2008. Overexpression of Separase induces aneuploidy and mammary tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(35), pp.13033–8.
- Zhao, X. et al., 2000. Mutational and structural analyses of the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 define its Rnr1 interaction domain whose inactivation allows suppression of mec1 and rad53 lethality. *Molecular and cellular biology*, 20(23), pp.9076–83.
- Zhao, X., Muller, E.G. & Rothstein, R., 1998. A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Molecular cell*, 2(3), pp.329–40.
- Zhou, B.-B.S. & Bartek, J., 2004. Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nature reviews. Cancer*, 4(3), pp.216–25.
- Zhou, Z. & Elledge, S.J., 1993. DUN1 encodes a protein kinase that controls the DNA damage response in yeast. *Cell*, 75(6), pp.1119–27.
- Zou, L. & Elledge, S.J., 2003. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5625), pp.1542–8.

ANNEXOS

Taula de figures

Figura 1. Cicle cel·lular mitòtic de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
Figura 2. Model de regulació de l'activitat Cdk1 mitòtica en <i>S. pombe</i> : Wee1 actua a la transició G2/M inhibint l'activitat CDK mitòtica	25
Figura 3. El <i>checkpoint de fase S</i> regula la transició G2/M inhibint l'activitat Cdk1 mitòtica, en <i>S. pombe</i>	26
Figura 4. L'oscil·lador transcripcional	27
Figura 5. APCCdc20 regula la transició metafase-anafase	30
Figura 6. Esquema de l'anafase en cèl·lules humanes i en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
Figura 7. L'alliberació de Cdc14 té lloc en dues onades	37
Figura 8. Checkpoint de fase S	40
Figura 9. Resposta del <i>checkpoint</i> de fase S	43
Figura 10. El SAC inhibeix la transició metafase-anafase en absència d'unió bipolar. El SPOC inhibeix la sortida de mitosi si el fus mitòtic no està alineat del pol de la cèl·lula mare a la cèl·lula filla	46
Figura 11. Estructura del producte de PCR usat per deleccionar gens	69
Figura 12. Esquema del procés de recombinació homòloga	70
Figura 13. Estructura del producte de PCR utilitzar per etiquetar proteïnes en l'extrem C-terminal	71
Figura 14. Experiment de cicle cel·lular en una fase S no pertorbada	73
Figura 15. Experiment d'activació del checkpoint de fase S	74
Figura 16. Experiment de sincronització en la transició G2/M	75
Figura 17. Els nivells de Swe1 s'estabilitzen en presència d'estrès replicatiu	102
Figura 18. L'estabilització dels nivells de Swe1 en resposta a estrès replicatiu és dependent de Mec1	104
Figura 19. Els nivells de Swe1 romanen estables en una soca <i>rad53Δ</i>	106
Figura 20. Els nivells de Swe1 romanen estables en una soca <i>chk1Δ</i> .	108
Figura 21. Els nivells de Swe1 no s'estabilitzen en absència de les dues quinases efectores del <i>checkpoint</i> de fase S en resposta a estrès replicatiu	110
Figura 22. Mec1 intervé directament en l'estabilització dels nivells de Swe1 en resposta a estrès replicatiu	112
Figura 23. El <i>checkpoint de fase S</i> estabilitza els nivells de Swe1 en resposta a dany al DNA	114
Figura 24. Validació de Pol12 com a substrat de l'activitat Cdk1 mitòtica <i>in vivo</i>	117
Figura 25. Mob1 no és útil com a marcador de l'activitat Cdk1 mitòtica <i>in vivo</i>	119

Annexos

Figura 26. Mms4 no és útil com a marcador de l'activitat Cdk1 mitòtica <i>in vivo</i>	120
Figura 27. L'activitat Cdk1 mitòtica és inhibida en presència d'estrès replicatiu	122
Figura 28. La ciclina mitòtica Clb2 s'expressa en presència d'estrès replicatiu	124
Figura 29. Swe1 és dispensable en la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica es resposta a estrès replicatiu	126
Figura 30. Rad53 és dispensable en la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès replicatiu	128
Figura 31. La inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica és dependent de Mec1	130
Figura 32. Swe1 i Rad53 inhibeixen de manera redundant l'activitat Cdk1 mitòtica	132
Figura 33. Swe1 i Rad53 inhibeixen de manera redundant l'activitat Cdk1 mitòtica. Mutant <i>rad53-21</i>	134
Figura 34. La deleció <i>swe1Δ</i> en un fons <i>mec1Δ</i> recupera els temps de fosforilació observats en els dobles mutants <i>rad53 swe1Δ</i>	135
Figura 35. La deleció de les dues quinases efectores del <i>checkpoint de fase S</i> no és suficient per permetre l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès replicatiu	137
Figura 36. L'al·lel no fosforilable Cdk1-19F reemplaça la deleció de Swe1 en el control de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès replicatiu	139
Figura 37. L'al·lel Swe1-AQ reemplaça la deleció de Swe1 en el control de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès replicatiu	141
Figura 38. Swe1 és dispensable en la inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica es resposta a dany al DNA	143
Figura 39. La inhibició de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a dany al DNA és dependent de Mec1	145
Figura 40. Swe1 i Rad53 inhibeixen de manera redundant l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a dany al DNA	147
Figura 41. L'assaig de l'activitat Cdk1 mitòtica <i>in vitro</i> és fàcilment saturat	149
Figura 42. L'activitat Cdk1 mitòtica de cèl·lules exposades a estrès replicatiu mesurada <i>in vitro</i> està inhibida de manera dependent de Swe1	151
Figura 43. L'activitat Cdk1 mitòtica de cèl·lules exposades a estrès replicatiu mesurada <i>in vitro</i> està inhibida a través de la fosforilació de la Y19	152
Figura 44. Control de l'activitat Cdk1 mitòtica per Rad53	154
Figura 45. Control de l'activitat Cdk1 mitòtica per Mec1 <i>in vitro</i>	155

Figura 46. Rad53 recombinant inhibeix l'activitat Cdk1 mitòtica <i>in vitro</i>	157
Figura 47. La deleció de Pds1 no és suficient per entrar en mitosi en presència de dany al DNA generat per MMS	159
Figura 48. L'absència de Pds1 no afecta la replicació, la divisió o l'activitat Cdk1 mitòtica	161
Figura 49. La presència d'activitat Cdk1 mitòtica en mutants <i>rad53 swe1</i> no és suficient per permetre la segregació cromosòmica en presència de dany al DNA	163
Figura 50. Rad53, Swe1 i Pds1/Securina constitueixen el mecanisme efector del control de la segregació cromosòmica en resposta a dany al DNA	165
Figura 51. Els mutants deficients del <i>checkpoint</i> assoleixen un contingut de DNA en presència de dany al DNA proper a 2C	167
Figura 52. Els mutants deficients del <i>checkpoint</i> no completen la replicació en presència de dany al DNA	168
Figura 53. L'al·lel Swe1-AQ reemplaça el mutant nul <i>swe1Δ</i> pel que fa a la pèrdua de control de la segregació del DNA	170
Figura 54. Absència de tall de la cohesina en mutants nuls <i>pds1Δ</i> en presència de dany al DNA: existència d'un control dependent de Rad53	172
Figura 55. Comparació de la progressió de la repliació a cèl·lules exposades a 0,033% MMS a 24°C i 0,022% MMS a 37°C	174
Figura 56. El mutant de cohesina <i>scc1-73</i> entra en cicle i replica amb normalitat en presència de dany al DNA a temperatura restrictiva	176
Figura 57. L'al·lel <i>scc1-73</i> permet segregació indeguda de cromosomes en presència de dany al DNA en un fons genètic incapaç d'inhibir l'activitat Cdk1 mitòtica	178
Figura 58. Rad53, Swe1 i Pds1/Securina inhibeixen conjuntament la segregació cromosòmica en resposta a estrès replicatiu	180
Figura 59. La segregació cromosòmica correlaciona amb fusos mitòtics allargats únicament en el triple mutant <i>rad53-21 pds1Δ swe1Δ</i>	182
Figura 60. La longitud dels fusos mitòtics del triple mutant <i>rad53-21 swe1Δ pds1Δ</i> és anafàsica	184
Figura 61. Absència d'alliberació de Cdc14 del nuclèol al mutant que segrega els cromosomes i allarga els fusos mitòtics en presència de dany al DNA	186
Figura 62. Absència d'alliberació de Cdc14 del nuclèol al mutant que segrega els cromosomes en presència d'estrès replicatiu	189
Figura 63. La deleció de Mec1, la quinasa transductora central del <i>checkpoint</i> de fase S, no és suficient per permetre segregació	192

Annexos

<hr/>	
cromosòmica indeguda en presència de dany al DNA	
<hr/>	
Figura 64. Els nivells de Pds1/securina romanen estables en presència d'estrès genotòxic en una soca <i>mec1Δ tel1Δ</i>	195
<hr/>	
Figura 65. El mutant <i>mec1Δ tel1Δ mad2Δ</i> és incapaç d'estabilitzar Pds1/Securina presència d'estrès genotòxic	197
<hr/>	
Figura 66. Estabilitat de Pds1/securina en el mutant <i>mad2Δ</i>	198
<hr/>	
Figura 67. El <i>checkpoint</i> de fase S i el SAC actuen redundantment per impedir la segregació cromosòmica en presència d'estrès genotòxic	200
<hr/>	
Figura 68. Model proposat de regulació de l'activitat Cdk1 mitòtica en resposta a estrès genotòxic a <i>S. cerevisiae</i> . Vegeu text per detalls	211
<hr/>	
Figura 69. Model proposat de regulació de la mitosi en resposta a estrès genotòxic a <i>S. cerevisiae</i> . Vegeu text per detalls	221
<hr/>	

Abreviatures

1C	1 contingut de DNA
2C	2 continguts de DNA
AESBF	4-(2-aminoetil)-benzenosulfonil fluorit·HCl
APC	<i>Anaphase Promoter Complex</i>
BSA	albúmina de sèrum boví
CDK	quinasa dependent de ciclina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DDK	quinasa dependent de Dbf4
DMSO	dimetilsulfòxid
dNTP	desoxiribunucleòtid trifosfat
DTT	ditiotreitòl
EDTA	àcid etilendiaminoteraacètic
EGTA	àcid etilenglicol-bis (b-aminoetileter-)-N,N,N',N'-tetraacètic
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FEAR	<i>CdcFourteen Early Anaphase Release</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferasa
HU	Hidroxiurea
IPTG	β -D-isopropil-tiogalactopiranòsid
Kb	Quilobase
LB	medi de cultiu <i>Lysogeny Broth</i>
LBA	medi de cultiu <i>Lysogeny Broth</i> amb ampicil·lina
MBF	Mlu I Cell-cycle Box Binding Factor
MCM	<i>MiniChromosome Maintenance</i>
mCherry	proteïna fluorescnet vermella monomèrica
MEN	<i>Mitotic Exit Network</i>
MMS	metanosulfonat de metil
Noc	Nocodazol
NP-40	Nonidet P-40
ORC	Complex de reconeixement dels orígens de replicació
PAGE	electroforesi en gel de poliacrilamida
PBS	tampó fosfat salí
PFGE	<i>Pulse Field Gel Electroforesi</i>

Annexos

RNR	ribonucleòtid reductasa
RPA	proteïna de replicació A
SAC	<i>Spindle Assembly Checkpoint</i>
SBF	Swi4/6 Cell-Cycle Box Binding Factor
SCF	Subunitat E3 del sistema ubiquitina: <i>Skp1, Cullin, F-box</i>
SDS	dodecilsulfat de sodi
ssDNA	DNA de cadena senzilla
TAE	tampó Tris/Acetat/EDTA
TBS	tampó Tris salí
TCA	àcid tricloroacètic
TE	tampó Tris/EDTA
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamina
YPD	medi ric amb glucosa (<i>Dextrose</i>)