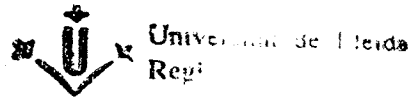


Dept. Ciències Mèdiques Bàsiques
UNIVERSITAT DE LLEIDA



16 JUNY 1998

E: 2687

S:

Control del Cicle Cel·lular de *Saccharomyces cerevisiae* per Nutrients

Neus Colomina i Gabarrella



TESI DOCTORAL
Lleida, 1998

**DISCUSSIÓ
i CONCLUSIONS**

L'estudi realitzat en aquests treballs tracta de la resposta de les cèl·lules del llevat *Saccharomyces cerevisiae* a les condicions nutricionals, relacionada amb el control del cicle cel·lular, concretament en la fase G1 i en el control de les ciclines d'aquesta fase com a objectius últims d'aquesta regulació.

El treball ha estat dividit en dos apartats principals on hem diferenciat les cèl·lules haploides de les diploides doncs presenten respostes diferents a una mateixa condició de limitació nutricional. Mentre que els haploides aturen el seu cicle i passen a l'anomenat estat G0 o quiescent, els diploides poden iniciar un nou cicle diferenciat després d'aturar-se en la fase G1 per limitació nutricional, anomenat meiosi i produir espores com a estat de resistència a les condicions adverses (Mitchell, 1994).

No es coneixia cap mecanisme de control de cicle en condicions de limitació de font de nitrogen. Altres estudis han relacionat la glucosa i cAMP amb la regulació de les ciclines *CLN1* i *CLN2* durant la fase G1 del cicle, però han obtingut resultats oposats respecte el seu paper activador o repressor (Huble et al., 1993; Baroni et al., 1994; Tokiwa et al., 1994).

En el primer treball hem demostrat que la limitació de font de nitrogen provoca l'aturada en fase G1 del cicle per la repressió de les ciclines G1, sobretot per un control traduccional sobre el mRNA de *CLN3*.

Les condicions emprades per l' esporulació són de limitació extrema de nutrients i per tant els nivells de ciclines G1 haurien de disminuir. Sabent que per l'inici de la meiosi cal la replicació del DNA ens preguntàvem si en aquelles condicions l'inici de la replicació dependria de les ciclines G1 tal com passa durant la mitosi. Les úniques ciclines relacionades amb meiosi fins ara són Clb1-4, implicades en les divisions meiòtiques com també *Cdc28* (Grandin and Reed 1993, Shuster and Byers, 1989). Els gens bàsics de cicle podrien ser els mateixos i per tant la replicació dependria de Clb5 i Clb6, i si fos així, la inducció d'aquests gens podria dependre de *Cln3* com en el cicle mitòtic. Amb aquesta premissa es va estudiar l'efecte de les ciclines sobre meiosi, arribant a la conclusió oposada: les ciclines de fase G1 inhibeixen l'inici de la meiosi.

En l'apartat de discussió de cada article es comenten els resultats obtinguts i en aquesta secció tractarem resultats obtinguts per altres autors, que han aparegut a *posteriori* i resultats obtinguts pel nostre grup que no han estat publicats i que aporten noves dades.

1. CONTROL DEL CICLE CEL·LULAR HAPLOIDE PER LIMITACIÓ DE NITRÒGEN

La regulació de la traduccionalitat del mRNA de *CLN3*, junt amb una inestabilitat addicional de la proteïna en el medi limitat de nitrogen, causa la desaparició de *Cln3*, disminuint així fortament l'expressió de les ciclines *CLN1*, *CLN2*, *CLB5* i *CLB6*. La presència de *Sic1* durant tot el procés assegura l'aturada en la fase G1 del cicle. El mecanisme que provoca la inhibició de la traducció del mRNA de *CLN3* encara no és conegut, però hi ha altres mecanismes de control de traducció que han estat identificats per altres proteïnes i que hem analitzat en el cas de *CLN3*.

1.1. Inhibició específica de la síntesi de ciclines en condicions de limitació de nitrogen

La inhibició de la síntesi proteica és un dels primers efectes d'una limitació nutricional. La cicloheximida i la rapamicina inhibeixen la traducció en les fases

d'elongació i iniciació, respectivament, però les quantitats necessàries d'aquests inhibidors per a aturar el cycle en la fase G1 causen una disminució de la síntesi proteica més ràpida que en el model de limitació de nitrogen. En experiments fets amb aquests inhibidors la disminució de Cln3 va seguir el mateix patró que la síntesi proteica general, mentre que en la limitació de nitrogen la disminució de Cln3 va ser més ràpida que la de síntesi proteica general, el que indica una regulació específica sobre aquesta proteïna de cycle (Gallego *et al.*, 1997).

1.2. Estudi del 5'UTR del mRNA de CLN3

En la discussió de l'article es fa esment dels estudis realitzats amb el 5'UTR del mRNA de *CLN3* per tal d'identificar seqüències implicades en regulació traduccional de les quals es tenen varies referències en altres gens i en condicions de limitació nutricional.

En primer lloc, l'estructura secundària dels 5'UTR dels mRNAs pot ser un motiu de regulació traduccional, sobretot els que poden formar estructures amb la regió codificant. Això és comú als mRNAs que requereixen el complex helicasa eIF4 per a la seva traducció, i la regulació de l'activitat eIF4 per fosforilació ha estat demostrada en mamífers en resposta a determinats senyals tròfics (Sonenberg *and* Gingras, 1998)

En la figura III-1, que mostra l'estructura secundària prevista pels 5'UTR de *CLN1,2,3* i *GCN4*, podem veure que el de *CLN3* inclou bona part del marc de lectura, el que podria dificultar la seva traducció. La deleció o la mutació de diferents seqüències de forma que destorbin la formació d'aquesta estructura secundària podrien suprimir l'efecte inhibidor en condicions limitants.

La síntesi de Gcn4 està regulada per petits ORFs que es troben en el 5'UTR del mRNA. En condicions nutricionals normals els ribosomes llegeixen els uORF anteriors al marc de lectura de *GCN4* i es dissocien del mRNA de manera que només un 4% inicia la traducció de l'ORF de *GCN4*. En condicions limitants baixa la taxa de formació del complex ternari i de tot el ribosoma, i augmenta la probabilitat de formar-se després d'haver sobrepassat els uORFs. Llavors un 65% dels ribosomes inicien la traducció de Gcn4 que és un factor transcripcional regulat positivament també a nivell d'expressió del seu mRNA en situacions de limitació per algun aminoàcid. Gcn4 activa l'expressió d'una sèrie de gens que activen vies de síntesi d'aminoàcids. Per tant, quan en la cèl·lula es donen senyals de limitació d'aminoàcids i baixa la síntesi general de proteïnes es potencia la traducció de Gcn4 (García *et al.*, 1995). Si la síntesi de Cln3 fos regulada per un mecanisme d'aquest tipus l'efecte seria el contrari del que observem durant la limitació de nitrogen, on Cln3 desapareix ràpidament. Per tant no es tracta d'aquest mecanisme de regulació.

D'altra banda, durant les 2-3 primeres hores de la limitació de font de nitrogen, quan s'observa la desaparició de Cln3, no s'activa la traducció del mRNA de *GCN4*, el que significa que no hi ha deficiència en un o més aminoàcids sinó que és una resposta independent, que senyalitza una aturada específica de la falta de font de nitrogen general.

En el 5'UTR del mRNA de *CLN3* es van fer diferents delecions solapades per a eliminar la regulació traduccional. L'estudi es va dur a terme amb la mateixa estratègia que està descrita en l'article amb el mutant *cdc28* termosensible, on la impossibilitat de degradar les ciclines en el mutant facilita observar l'acumulació de Cln3 en cas de ser traduïda.

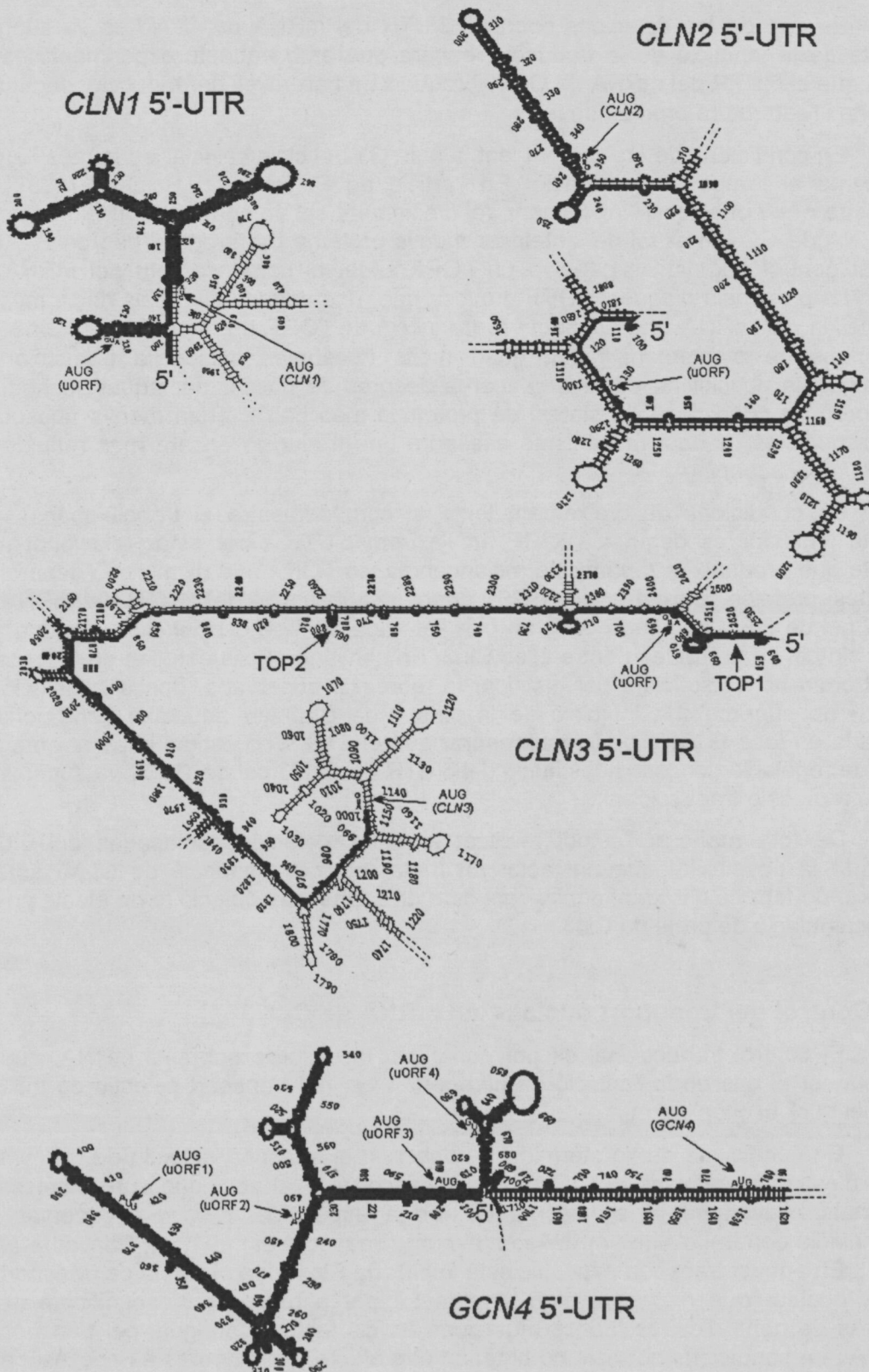


Figura III.1. Estructures secundàries dels 5'UTR dels mRNA de *CLNs* i *GCN4*.

Aquestes estructures han estat simulades amb l'algoritme FOLD. En *CLN3* es troben dues regions TOP (regions riques en pirimidines) que podrien ser importants en la regulació mitjançant eIF4.

En cap de les deleccions sobre el 5'UTR del mRNA de *CLN3* es va suprimir l'efecte de la inhibició de la traducció, encara que amb aquests experiments es va veure que el 5'UTR del mRNA de *CLN3* produeix un baix nivell de traducció, degut a la llargària i l'estructura pròpia que té.

En condicions de creixement lent la fase G1 del cicle cel·lular es fa més llarga i augmenta el temps de generació. En l'article de Polymenis i Schimdt (1997) es demostra que per aquest enlentiment del creixement cal un control traduccional sobre el mRNA de *CLN3* per tal de sintetitzar menys proteïna i retardar el pas de START. Aquest control negatiu és degut a un uORF situat al començament del mRNA de *CLN3*. La presència d'aquest uORF provoca que, una vegada llegit, els ribosomes es desuneixin del mRNA i no continuïn la traducció de l'ORF que codifica per Cln3. En condicions de creixement ràpid, quan molts ribosomes inicien la traducció del missatge, la possibilitat de recomençar-la després de passar per aquest control és alta, però en condicions de síntesi de proteïnes més baixa, quan menys ribosomes són disponibles, aquest mecanisme assegura una traducció encara més reduïda de *CLN3* (*leaky scanning*).

En condicions de creixement lent, tal com demostra el treball abans citat, l'efecte inhibitor és degut a l'uORF en l'extrem 5'UTR i pot estar relacionat amb l'efecte que produeix la rapamicina mitjançant la via TOR en la disminució general de la síntesi proteica (Barbet *et al.*, 1996), doncs la substitució del 5'UTR del mRNA de *CLN3* pel de *UBI4* suprimeix en gran part l'aturada en fase G1 del cicle, deguda a la baixa síntesi de proteïnes i entre elles Cln3. En canvi en el cas estudiat de la limitació de nitrogen no és suficient per justificar la repressió observada, doncs la deleció de l'uORF no suprimeix la inhibició de la síntesi de Cln3 en aquestes condicions ni l'aturada en fase G1. No podem assegurar que el 5'UTR no estigui implicat en algun tipus de regulació doncs la substitució del 5'UTR de *CLN3* pel de *CYC1* va suprimir en part la repressió traduccional.

De tota manera, l'estudi realitzat amb les deleccions solapades del 5'UTR descarta la possibilitat que un factor en *trans* reguli la traducció de *CLN3* sota la limitació de font de nitrogen, doncs com hem dit abans, cap deleció té un efecte positiu en l'acumulació de proteïna Cln3.

1.3. Control del transport nuclear del mRNA de *CLN3*

El control traduccional es pot donar per la inhibició sobre el mRNA, que no sembla ser el cas en la limitació de nitrogen, o bé, pel transport selectiu de mRNAs des del nucli al citoplasma.

En condicions de xoc tèrmic s'ha observat el transport selectiu de mRNAs de gens d'estrés necessaris per a una resposta correcta al xoc, que són expressats i exportats activament al citoplasma de forma específica, i es pot observar una acumulació general d'altres mRNAs en el nucli (Saavedra *et al.*, 1996; Saavedra *et al.*, 1997). En aquest transport específic està implicada Rip1, una proteïna de transport del porus nuclear que necessita d'un altre factor per a reconèixer específicament els mRNAs de gens d'estrés, doncs mutacions en els factors coneguts pel transport de mRNAs en condicions normals no hi tenen cap efecte. Rip1 només és necessària pel transport de mRNAs de gens d'estrés en condicions de xoc tèrmic, no en condicions normals si aquests gens són expressats artificialment.

Hem realitzat estudis de localització cel·lular de mRNAs en condicions de limitació de nitrogen, ja que la limitació nutricional es pot considerar com un tipus d'estrés, i també es dona una acumulació de mRNAs en el nucli, encara que potser no tan acusada com en el cas del xoc tèrmic (figura III-2). Sota limitació nutricional podria haver-hi un mecanisme selectiu de transport al citoplasma per a mRNAs de proteïnes

necessàries per a l'adaptació a les noves condicions, i/o una inhibició selectiva del transport d'altres missatgers que inereixen en la resposta a les noves condicions, en aquest cas l'aturada en fase G1 del cicle. Determinar si el transport del mRNA de *CLN3* és inhibit en condicions de limitació de nitrogen explicaria la repressió traduccional observada.

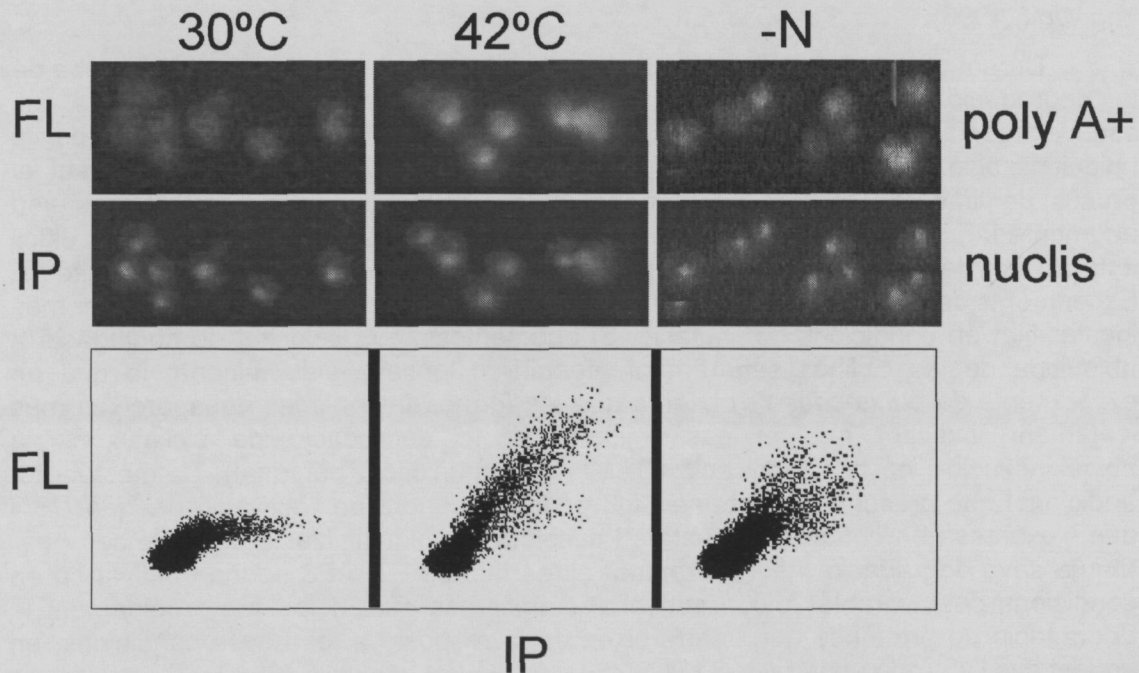


Figura III.2. Acumulació de mRNAs en el nucli per limitació nutricional.

Inmunolocalització de mRNAs (poly A+) per FISH (FL), en cèl·lules a 30°C, 42°C i en limitació de nitrogen. Es mostra la tinció de nuclis amb iodur de propidi (IP) i un diagrama de la colocalització dels poly A+ (FL) respecte dels nuclis (IP).

Encara que no sigui tan evident com en el cas de *CLN3*, on els nivells del mRNA són constants durant la limitació de nitrogen i la proteïna desapareix totalment, les ciclines de fase G1, *Cln1* i *Cln2*, també semblen estar regulades post-transcripcionalment, ja que els nivells de proteïna disminueixen més ràpidament que els del mRNA, suggerint que també podria existir un control de transport dels mRNAs de *CLN1* i *CLN2* en condicions de limitació nutricional.

1.4. Control per degradació de les ciclines de fase G1

La via de la ubiquitina senyalitza la degradació de les proteïnes a les que ha estat conjugada mitjançant un complex proteic que les reconeix específicament (Townsend and Ruderman, 1998). El complex consta d'una proteïna que conjuga la ubiquitina, anomenada subunitat E2. Una subunitat E3 s'encarrega de la unió del substrat i de transferir la molècula d'ubiquitina al substrat, que varia en el factor d'unió per a donar diferent especificitat al complex. En el cas de la degradació d'algunes proteïnes de cicle s'han identificat les proteïnes que formen el complex. *Cdc34* participa com una subunitat E2 i *Skp1* junt amb *Cdc53* i una proteïna d'unió del substrat (*F-box protein*) formen el complex E3. Sembla que *Cdc53* serveix per a

mantenir el complex unit (Patton *et al.*, 1998). Estudis fets amb la ciclina Cln2 i Sic1, l'inhibidor de complexos Clb/Cdc28, han descrit dues proteïnes diferents d'unió al complex: la unió de Cln2 és fa mitjançant el factor Grr1 i la unió de Sic1 és deguda a Cdc4. Segurament hi ha altres components i més factors d'unió dependent dels substrats que s'han de senyalitzar per degradació. Per exemple, en la degradació de Clb1-4 participen altres proteïnes que formen el complex APC, però es tracta de la mateixa via (Townsend *and* Ruderman, 1998). Un cop ubiquitinitzades, les proteïnes són degradades pel complex 26S proteosoma en una reacció dependent d'ATP (Hilt *and* Wolf, 1996).

Durant el cycle la regulació de les ciclins depèn de la seva activació i també de la degradació en el moment correcte per a ordenar temporalment tots els esdeveniments. La inestabilitat depèn primer de la fosforilació i després de la ubiquitinització. Cln3 és una proteïna molt inestable durant tot el cycle i durant el procés de limitació de font de nitrogen la inestabilitat de la ciclina Cln3 es veu augmentada i, segurament, també la de les ciclins Cln1,2 encara que és més difícil estudiar-ho degut a la repressió que pateixen els transcrits durant la limitació. Experiments de *pulse-chase* amb Cln2 sota un promotor constitutiu varen mostrar més inestabilitat en condicions de limitació. Si augmentéssim la velocitat de conjugació a ubiquitina de les ciclins segurament afectariem la seva vida mitjana, ja que en experiments de *pulse-chase* s'observa que les formes fosforilades desapareixen més lentament, indicant que el pas limitant per la degradació de ciclins és la ubiquitinització i no la fosforilació (C. Mann, comunicació personal). La inestabilitat addicional que presenta la proteïna Cln3 podria dependre de l'activació del gen *UBI4* que s'expressa en condicions d'estrés i accelera la ubiquitinització de proteïnes i per tant la seva degradació. Alternativament altres factors E2 o E3 podrien activar-se en condicions desfavorables per a senyalitzar amb més eficiència i més ràpidament la degradació de proteïnes que interfereixen en la resposta a les noves condicions, en aquest cas l'aturada en la fase G1.

1.5. Altres factors importants de l'aturada en la fase G1 del cycle en condicions de limitació nutricional

Estudis realitzats amb mutants de gens de cycle han descrit un paper redundant de les tres ciclins Cln. Encara que la falta de Cln1 i Cln2 produeixi un retard en la formació de la gema i el pas a la fase S, l'acció de la ciclina Cln3 pot portar a terme la transició G1-S. Per a impedir-ho cal la mutació de tots tres gens *CLN* però la deleció de *SIC1* suprimeix en bona part aquest fenotip, permetent el pas a la fase S, el que indica que els baixos nivells dels complexos Clb5,6/Cdc28 poden substituir les funcions de les Cln si no estan inhibits per Sic1 (Schneider *et al.*, 1996).

El control tan estricte sobre les ciclins G1 en la limitació de nitrogen indica la importància de la desaparició de les Cln per a aconseguir l'aturada en la fase G1 del cycle, però la sobreexpressió del gens *CLN* en la limitació de nitrogen no evita totalment l'aturada en la fase G1, encara que la pugui retardar unes hores. Només la sobreexpressió en la soca *sic1* suprimeix totalment l'aturada en G1 (figura III-3), el que indica un paper important per a Sic1 en aquest procés, durant el cycle i en condicions limitants (figura III.3).

Els resultats addicionals tractats en aquesta discussió han reforçat els que s'han publicat i indiquen possibles mecanismes de regulació de Cln3 en condicions de limitació de nitrogen, i possiblement en altres condicions desfavorables que presenten una resposta d'aturada del cycle en la fase G1.

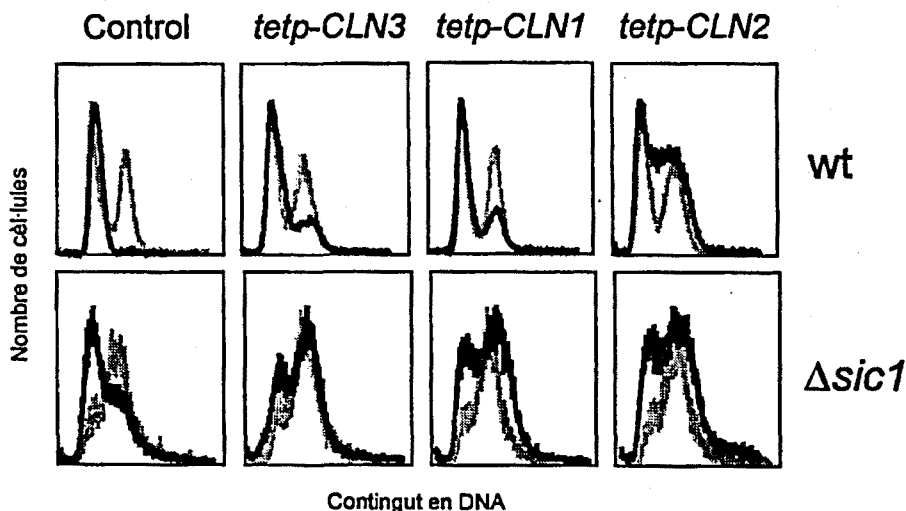


Figura III.3. Importància de Sic1 en l'aturada en G1 per limitació nutricional.

Efecte de la sobreproducció de ciclines G1 sobre les distribucions del contingut de DNA en soques salvatge i *sic1*, en condicions de limitació de la font de nitrogen. Es mostren les distribucions de cèl·lules ciclant (en gris) i de cèl·lules aturades per la limitació (en negre).

2. CONTROL DEL CICLE CEL·LULAR DIPLOIDE PER LIMITACIÓ DE NUTRIENTS

En l'estudi de la regulació de l'entrada en el cicle meiótic hem relacionat les ciclines de fase G1 amb l'inductor de meiosi *Ime1*, inhibint la seva acció i la seva transcripció. Aquesta interacció ha estat manifesta quan s'han deletat o sobreexpressat els gens de les ciclines.

L'expressió d'*IME1* es dona només en cèl·lules diploides i en condicions de limitació nutricional degut al control pel repressor $\alpha 1-\alpha 2$ que assegura l'inici de la meiosi només en diploides reprimint l'expressió de *RME1* i permetent l'expressió d'*IME4*, que s'activa en condicions de limitació nutricional de forma que *IME4* relaciona tots dos controls. *RIM1* i *MCK1* també participen en l'activació transcripcional d'*IME1* en condicions nutricionals limitants.

La pregunta és si el control tant estricte de la transcripció d'*IME1* fa necessari un control post-transcripcional per part de les ciclines G1, donada la improbable coincidència de les *Cln* amb *Ime1* durant la limitació nutricional, ja que els nivells de ciclines G1 disminueixen ràpidament en aquesta condició. Quan es dona la necessitat d'iniciar meiosi en condicions naturals, ens podem trobar dues situacions ben diferents, un canvi bruscat de medi de creixement cap a condicions molt desfavorables o bé un canvi continuat, des de fermentació a respiració i meiosi. El segon cas podria ser l'esgotament del medi ric amb acetat. En aquestes condicions se solapa la presència d'*Ime1* i de ciclines G1, sobretot *Cln3* i hem vist que la seva presència interfereix en la funció d'*Ime1*, però no en la seva expressió i síntesi.

2.1. Control transcripcional d'*IME1*

S'ha proposat una activació transcripcional d'*IME1* sobre el seu propi promotor ja que les mutacions d'*ume6*, *rim11* o *rim15* afecten la seva transcripció (Vidan and Mitchell, 1997), encara que no s'han trobat caixes URS1 en el promotor d'*IME1*. En el

nostre fons genètic la deleció *rim11* provocava una disminució del nivell màxim del mRNA d'*IME1* (resultats no mostrats), però la sobreexpressió de *CLN3* encara afecta negativament els nivells del mRNA d'*IME1* en el mutant *rim11*, pel que vàrem concloure que els efectes de la sobreexpressió de *CLN3* eren independents de l'acció de Rim11 i de la presència del propi *lme1* ja que la transcripció del mRNA d'*IME1* amb una mutació puntual que impedia la traducció d'*lme1*, continuava inhibida per *Cln3*.

Un treball molt recent en l'anàlisi del promotor d'*IME1* ha delimitat diferents regions de control transcripcional segons el seu efecte positiu o negatiu i les condicions nutricionals de les que depenen (Sagee *et al.*, 1998) (figura III-4).

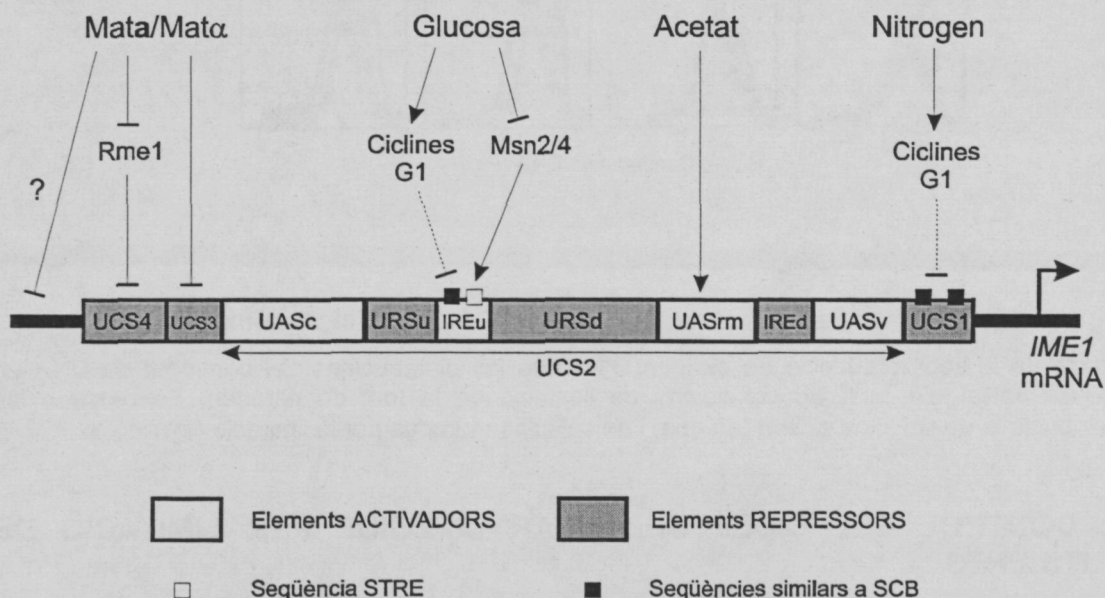


Figura III.4. Esquema del promotor del gen *IME1*.

Es mostren les regions controlades per diferents senyals reguladors de meiosi. Les línies discontinües indiquen el paper repressor de les ciclines G1, mitjançant caixes SCB, proposat en aquest treball (figura basada en Sagee *et al.*, 1998).

Els dominis UCS3 i 4 estan controlats pel tipus cel·lular i només permeten l'expressió en diploides. La regió UCS1 té un efecte repressor en presència de nitrogen. La regió UCS2 està subdividida en diferents dominis amb efectes positius i negatius. El domini IREu està controlat per la font de carboni, amb un efecte positiu en acetat i negatiu en glucosa, que depèn dels factors transcripcionals *Msn2* i *Msn4*, proteïnes d'estrés que són inhibides per l'acció de la *Pka* (Gorner *et al.*, 1997). La disminució dels nivells de glucosa suposa una disminució de l'activitat de la *Pka* a través de la via *Ras/cAMP* i per tant permet l'acció dels factors *Msn2,4* que activen la transcripció d'*IME1*. En aquesta seqüència també hi ha una caixa que, excepte en un nucleòtid, és igual que les SCB regulades pels factors *Swi6/Swi4*, dependent de l'acció de *Cln3/Cdc28*. Les delecions *swi4* o *swi6* provoquen un augment del nivell de transcripció d'*IME1* sota el control de la seqüència IREu exclusivament o bé sota el control de tot el promotor sencer. Encara que durant el cicle mitòtic el paper del complex *Swi6/Swi4* sigui activador, en el promotor d'*IME1* podria realitzar el paper contrari. Hi ha més exemples de factors transcripcionals que segons el context fan funcions oposades, com és el cas de *Rme1*, que reprimeix l'expressió d'*IME1* i també activa la transcripció de *CLN2* (Toone *et al.*, 1995). Aquests resultats indiquen una possible via d'acció de la ciclina *Cln3* sobre el control de l'expressió d'*IME1*.

Hem analitzat tota la seqüència del promotor d'*IME1* i hem trobat que hi ha més caixes SCB i dues estan en la regió UCS1, controlada per nitrogen. Hi ha la possibilitat que el control de nitrogen sigui a través de les Cln ja que, segons els resultats del primer treball de la regulació de Cln3, en condicions de limitació de nitrogen es dona una ràpida desaparició de les Cln, i segons els experiments del control de l'inici de la meiosi, la manca de ciclins provoca l'augment d'expressió d'*IME1* fins i tot en presència de nitrogen. Cal fer més estudis per a delimitar realment la interacció entre ciclins G1, l'expressió d'*IME1* i la regió UCS1, però hi ha suficients resultats que ho suggereixen. Mutacions puntuals de les seqüències SCB podrien determinar la importància que tenen en la repressió transcripcional segons les condicions nutricionals o bé segons la presència de Clns.

2.2. Control post-transcripcional d'*IME1*

L'activitat d'*Ime1* depèn de la interacció amb *Ume6* que és el factor d'unió a DNA en els promotors dels gens primerencs de meiosi i que té un paper repressor durant el creixement vegetatiu, abans de la unió d'*Ime1*. Aquesta interacció es veu reprimida en presència de glucosa, i la quinasa *Rim15* està implicada en aquesta regulació. *Rim15* és necessària per a la interacció *Ime1-Ume6* però la seva síntesi es veu molt inhibida en presència de glucosa (Vidan *and* Mitchell, 1997). L'altra quinasa necessària per a la interacció és *Rim11*, que és expressada de forma constitutiva independentment de les condicions nutricionals. *Rim11* fosforila *Ime1* i *Ume6*, i les pot modificar per separat, però no es coneix si forma part del complex activador de gens de meiosi (Malathi *et al.*, 1997). El paper fisiològic de *Rim11* no està clar, doncs sempre pot modificar *Ime1*. Potser la presència de *Rim11* indicaria un medi amb un mínim de nutrients (font de carboni no fermentable), necessari per l'acabament del procés de meiosi, mentre que *Rim15* indicaria la no presència de glucosa. En experiments per *two-hybrid* hem observat que els nivells d'interacció d'*Ime1* amb *Ume6* no augmenten quan es canvia el medi ric basat en acetat pel medi d' esporulació, indicant que la limitació de nitrogen no incrementa la interacció. És a dir, cèl·lules ciclant tenen gairebé els mateixos nivells d'interacció que durant la meiosi, on les ciclins G1 desapareixen ràpidament, el que indica que aquestes ciclins no afecten la via *Ime1* en la interacció amb *Ume6*, que és el punt on sembla que regulen les quinases *Rim11* i *Rim15*. El mateix experiment ha estat fet amb els mutants *cln* i hem obtingut el mateix resultat.

En els experiments fets en medi ric basat en acetat, deixant esgotar la font de carboni i en els estudis dels mutants *cln* sense esgotar el medi, hem observat que les Cln tenen un paper repressor d'*Ime1* a nivell post-transcripcional i que aquesta regulació està relacionada amb el transport nuclear d'*Ime1* per a poder realitzar la seva funció. D'altra banda es va comprovar que *Ime1* podia ser un substrat de Cln/Cdc28 i es van fer assaigs *in vitro* d'activitat quinasa sobre *Ime1*. Es van immunoprecipitar Cln3-HA i Cln2-HA per provar l'activitat quinasa dependent d'elles sobre histona H1 i *Ime1* com a substrats. Es va veure que *Ime1* és un bon substrat de fosforilació per ambdós complexos ciclina/Cdc28, però sobretot per l'activitat quinasa dependent de Cln3. Aquest fet, encara que no es pot considerar definitiu doncs no s'ha comprovat *in vivo*, demostra una possible relació directa entre ciclins G1 i *Ime1*.

Quan s'observa la proteïna *Ime1* per *western* presenta dues bandes i no se sap si la banda superior correspon a un estat de major fosforilació, però *in vivo* hem vist que la proteïna *Ime1* presenta diferents patrons de bandes en mutants *cdc28* i *cdc34* termosensibles. En el primer cas, quan la quinasa no és activa, la proteïna *Ime1* presenta majoritàriament la banda de major mobilitat, mentre que en el mutant *cdc34*, on s'acumula activitat Cln/Cdc28, la banda majoritària és la de menor mobilitat.

Aquests dos resultats suggereixen que *Ime1* mostra diferents estats de fosforilació depenent de *Cdc28*, el que ho relaciona directament amb l'assaig quinasa *in vitro*.

2.3. Entrada en la fase S premeiòtica

La replicació del DNA premeiòtica depèn d'*IME1* i s'ha demostrat també la necessitat d'alguns dels enzims que formen la maquinària replicativa durant el cycle mitòtic (Johnston *et al.*, 1990). Encara que s'ha estudiat la necessitat de les ciclines *Clb1-4* en les divisions meiótiques, on s'ha vist que *Clb2* era dispensable per meiosi i *Clb1,4* eren necessàries, sobretot *Clb1*, per les divisions meiótiques (Grandin *and* Reed, 1993, Dahmann *and* Fitcher, 1995), no s'ha publicat cap treball que relacionés les ciclines de fase S *Clb5,6* amb la replicació premeiòtica. Pot ser una de les raons és el fet que *Cdc28* no ha estat implicat en la replicació ja que estudis realitzats en mutants termosensibles l'han relacionat amb les divisions meiótiques però no han trobat cap defecte en la replicació (Shuster *and* Byers, 1989). En el nostre treball hem observat que durant la meiosi l'expressió de *CLB5* depèn d'*Ime1* durant els mateixos temps que els gens primerencs, igual que un altre gen controlat per caixes MCB durant el cycle mitòtic com és *TMP1*. Els gens que depenen d'aquestes caixes són expressats al final de la fase G1 i tenen la seva funció en la replicació del DNA, i per tant es pot suposar que si són expressats en meiosi també són requerits per a la replicació premeiòtica. No sabem si les caixes MCB participen en l'expressió d'aquests gens durant la meiosi, tal com passa en *Schizosaccharomyces pombe* on canvia la composició del complex transcripcional però no el motiu reconegut en el promotor que continua sent MCB (Ayté *et al.*, 1997). El fet que depengui d'*Ime1* ens ha portat a buscar motius URS1 en el promotor de *CLB5* i encara que hi ha algunes seqüències molt homòlogues, la única caixa perfecta URS1 es troba dins de la zona codificant, igual que en el gen *TMP1*. Alguns gens primerencs també presenten aquest motiu dins la zona codificant (Mitchell, 1994) i no seria doncs estrany que fos funcional. Per l'estudi de la regulació transcripcional de *CLB5* durant la meiosi hem d'analitzar el seu promotor mitjançant mutacions puntuals o delecions de les seqüències importants per la seva expressió durant la mitosi i les possibles caixes URS1, així com interaccions entre ambdós motius.

No hem comprovat la necessitat de *Clb5,6* per a la replicació premeiòtica, però els nivells d'expressió observats indiquen que *Clb5* pot molt bé realitzar alguna funció durant el procés. Hem d'afegir que la desaparició de *Sic1* també depèn de la presència d'*IME1* segons hem observat en els nostres resultats, i aquests dos fets suggereixen fortament un mecanisme semblant al cycle mitòtic per a controlar el pas a la fase S premeiòtica, on caldria l'acció de les ciclines de fase S i la disminució de l'inhibidor de *Clb/Cdc28*.

La degradació de *Sic1* depèn de l'acció dels complexos *Cln1,2/Cdc28* durant el cycle mitòtic, però en l'inici de la meiosi la disminució de *Sic1* es dona quan les ciclines G1 ja han desaparegut. Tal com hem dit, la desaparició de *Sic1* depèn de la presència d'*IME1*, que és un factor transcripcional, el qual podria estar activant l'expressió d'un altre gen que s'encarregués de la degradació de *Sic1*. Entre els gens primerencs està *IME2* que codifica per una serina-treonina quinasa. Estudis realitzats amb el mutant *ime2* han mostrat que no hi ha expressió de gens mitjans ni retroinhibició del mRNA d'*IME1* (Mitchell *et al.*, 1990). En aquest mutant s'observen altres defectes com un retard en l'entrada en la fase S premeiòtica i la re-replicació del DNA (Foiani *et al.*, 1996), indicant un impediment en inhibir la reiniciació de la replicació un cop entrada la fase S premeiòtica. Aquest fenotip recorda el que s'observa en *Schizosaccharomyces pombe* quan se sobreproduïx l'inhibidor *Rum1* (Labib *and* Moreno, 1996; Benito *et al.*, 1998), homòleg de *Sic1*. El retard en l'entrada en la fase S premeiòtica observat en el mutant *ime2* podria ser degut a l'acumulació més lenta de *Clb5*, però també a la

presència de Sic1 al no poder ser degradat, simulant un efecte semblant a la sobreproducció de Rum1 en *Schiz. pombe* i provocant finalment la re-replicació del DNA, doncs cal molt poca activitat Clb/Cdc28 per a iniciar la replicació. Així durant la meiosi, la fosforilació per part d'Ime2 podria senyalitzar la degradació de Sic1, possiblement via ubiquitina com en el cicle mitòtic.

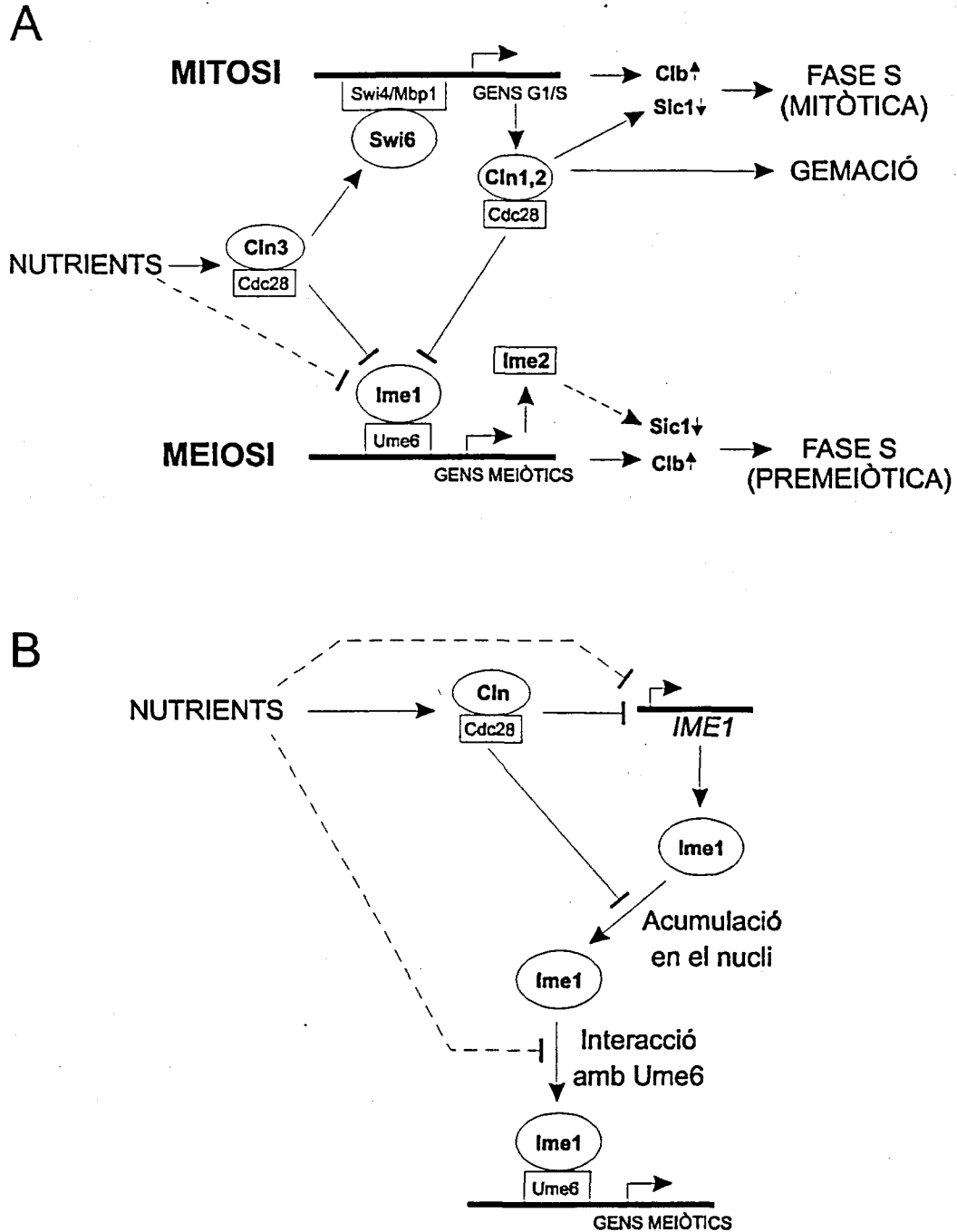


Figura III.5. Model proposat de regulació per nutrients de la mitosi i de la meiosi.

(A) Control per ciclines G1 per a fer incompatibles mitosi i meiosi en resposta a nutrients. (B) Model de regulació transcripcional i post-transcripcional sobre Ime1. Les línies discontinües indiquen vies de regulació no descrites independents de ciclines.

No hi ha cap evidència per a defensar un paper de Cdc28 en la replicació. En mutants *cdc28* termosensibles s'ha vist l'heterogeneïtat d'un mateix al·lel mutant en diferents fons genètics en relació a l'aturada del cycle en fase G1 o bé en fase G2. Encara que cap dels al·lèles estudiats en meiosi pugui aturar el procés abans de la replicació, pot ser que altres circumstàncies durant la meiosi estiguin suavitzant l'efecte de la mutació. En la secció de resultats de l'article es comenta la diferent dependència que la replicació i la mitosi tenen de la quantitat d'activitat quinasa Cdc28, essent molt més alta per a la mitosi. Durant l'inici de la meiosi l'increment dels nivells de Clb5 depèn d'Ime1, no de l'acció dels complexos Cln3/Cdc28, i per tant el mutant termosensible *cdc28* tindrà alts nivells de Clb5, i possiblement Clb6. D'altra banda, i com hem dit abans, la degradació de Sic1 no depèn de l'acció de Cdc28, sinó que pot ser deguda a l'acció d'una altra quinasa com Ime2. Així, tot i la poca activitat dels complexos Clb-Cdc28 que es podria donar en el mutant termosensible *cdc28*, la degradació de Sic1 es continuaria donant i per tant el pas a fase S premeiòtica no es veuria gaire afectat. Tot són suposicions per ara i s'han de fer estudis en mutants *ime2*, *cdc28*, *sic1* i combinacions d'aquestes mutacions per a establir una relació directa, i determinar la necessitat de l'activitat quinasa Cdc28 en la replicació premeiòtica.

La regulació d'*IME1* depèn de les condicions nutricionals a nivell transcripcional i post-transcripcional. En el nostre treball hem vist que les ciclines G1 exerceixen un control negatiu sobre l'expressió d'*IME1* i en l'activitat de la proteïna. En experiments en medi ric, la falta de ciclines G1 permet l'expressió d'*IME1* i de gens primerencs, el que normalment només es pot donar en condicions de limitació nutricional i que suggereix un paper mediador del senyal nutricional per les ciclines G1. En experiments per *two-hybrid* hem comprovat que la interacció Ime1 i Ume6 està regulada per la font de carboni i la limitació de nitrogen no augmenta l'eficiència de la interacció que es dona en un medi ric basat en acetat, i les ciclines G1 no interfereixen en la interacció amb Ume6, però afecten la localització nuclear d'Ime1. Proposem un model de regulació negativa de l'inici de la meiosi per part de les ciclines G1 que actua sobre l'expressió d'*IME1* i sobre la localització d'Ime1 en el nucli (figura III-5). Aquesta regulació imposa una incompatibilitat entre els cycles mitòtic i meiòtic, i impedeix que es produeixin situacions intermitjtes d'activació d'ambdós cycles.

En aquests treballs hem estudiat, en primer lloc, el control de la limitació de nutrients sobre el cycle cel·lular haploide i podem concloure que es detura el cycle mitjançant la regulació negativa de les ciclines de fase G1 i que *CLN3*, al ser el principal inductor de la transició G1-S, és reprimit traduccionalment quan falta la font de nitrogen. L'aturada del cycle en la fase G1 és necessària per a mantenir el màxim de viabilitat en condicions desfavorables. En diploides, la limitació nutricional provoca una aturada del cycle en fase G1 com en haploides i activa l'inici de meiosi, un procés diferenciador que porta a la formació d'espores, unitats de resistència a condicions desfavorables. Les ciclines G1 inhibeixen l'inici de la meiosi mitjançant la repressió transcripcional d'*IME1* i impeding l'acumulació d'Ime1 en el nucli (figura III-5), així inhibint l'expressió de gens meiòtics. En ser activadores d'una banda del cycle mitòtic i, per l'altra inhibidores d'Ime1, les ciclines G1 fan que la mitosi i la meiosi esdevinguin incompatibles en llevat.

3. CONCLUSIONS

1. La limitació de font de nitrogen en cèl·lules haploides causa l'aturada en la fase G1 del cicle fent davallar els nivells de ciclines G1.
2. La pèrdua de Cln3 provoca la inhibició transcripcional de gens G1-S, entre els que es troben les ciclines *CLN1,2* i *CLB5,6*.
3. El control negatiu sobre Cln3 és en part per un increment de la inestabilitat dependent de la via de la ubiquitina, i sobre tot per la inhibició traduccional del seu mRNA.
4. La presència de l'inhibidor Sic1, i probablement una regulació semblant a la de Cln3 sobre les altres ciclines Cln1 i Cln2, expliquen l'aturada en la fase G1.
5. En la meiosi la inducció de *CLB5* i la pèrdua de Sic1 depenen d'Ime1, a diferència de la mitosi, on depenen de ciclines G1.
6. Les ciclines G1 inhibeixen l'entrada en meiosi per dos mecanismes diferents: (1) reprimint la transcripció d'*IME1* i (2) prevenint l'acumulació d'Ime1 en el nucli.
7. En absència de ciclines G1 les cèl·lules entren i completen la meiosi en medis rics, indicant que el paper essencial de la limitació nutricional és produir la pèrdua de ciclines G1.



BIBLIOGRAFIA

- Amon,A., Tyers,M., Futcher,B. and Nasmyth,K. (1993) Mechanisms that help the yeast cell cycle clock tick: G2 cyclins transcriptionally activate G2 cyclins and repress G1 cyclins. *Cell*, **74**, 993-1007.
- Ayté,J., Leis,J.F. and DeCaprio,J.A. (1997) The fission yeast protein p73^{res2} is an essential component of the mitotic MBF complex and a master regulator of meiosis. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 6246-6254.
- Barbet,N.C., Schneider,U., Helliwell,S.B., Stansfield,I., Tuite,M.F. and Hall,M.N. (1996) TOR controls translation initiation and early G₁ progression in yeast. *Mol. Biol. Cell*, **7**, 25-42.
- Baroni,M.D., Martegani,E., Monti,P. and Alberghinia,L. (1989) Cell size modulation by *CDC25* and *RAS2* genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 2715-2723.
- Baroni,M.D., Monti,P. and Alberghina,L. (1994) Repression of growth-regulated G₁ cyclin expression by cyclic AMP in budding yeast. *Nature*, **371**, 339-342.
- Barral,Y., Jentsch,S. and Mann,C. (1995) G₁ cyclin turnover and nutrient uptake are controlled by a common pathway in yeast. *Genes Dev.*, **9**, 399-409.
- Benito,J., Martín-Castellanos,C. and Moreno,S. (1998) Regulation of the G1 phase of the cell cycle by periodic stabilization and degradation of the p25^{rum1} CDK inhibitor. *EMBO J.*, **17**, 482-497.
- Booher,R.N., Deshaies,R.J. and Kirschner,M.W. (1993) Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34 cdc28 in response to G1 and G2 cyclins. *EMBO J.*, **12**, 3417-3426.
- Bowdish,K.S., Yuan,H.E. and Mitchell,A.P. (1994) Analysis of RIM11, a yeast protein kinase that phosphorylates the meiotic activator IME1. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 7909-7919.
- Bowdish,K.S., Yuan,H.E. and Mitchell,A.P. (1995) Positive control of yeast meiotic genes by the negative regulator *UME6*. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 2955-2961.
- Cameron,S., Levin, L., Zoller,M. and Wigler,M. (1988) cAMP-independent control of sporulation, glycogen metabolism, and heat shock resistance in *S. cerevisiae*. *Cell*, **53**, 555-566.
- Cooper,K.F., Mallory,M.J., Smith,J.B. and Strich,R. (1997) Stress and developmental regulation of the yeast C-type cyclin Ume3p (Srb11p/Ssn8p). *EMBO J.*, **16**, 4665-4675.
- Covitz,P.A. and Mitchell,A.P. (1993) Repression by the yeast meiotic inhibitor RME1. *Genes Dev.*, **7**, 1598-1608.
- Covitz,P.A., Herskowitz,I. and Mitchell,A.P. (1991) The yeast RME1 gene encodes a putative zinc finger protein that is directly repressed by a1- α 2. *Genes Dev.*, **5**, 1982-1989.
- Dahmann,C. and Futcher,B.F. (1995) Specialization of B-type cyclins for mitosis or meiosis in *S. cerevisiae*. *Genetics*, **140**, 957-963.
- Deshaies,R.J., Chau,V. and Kirschner,M. (1995) Ubiquitination of the G1 cyclin Cln2p by a Cdc34p-dependent pathway. *EMBO J.*, **14**, 303-312.
- Di Como,C.J. and Arndt,K.T. (1996) Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev.*, **10**, 1904-1916.
- Dirick,L., Böhm,T. and Nasmyth,K. (1995) Roles and regulation of Cln-Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **14**, 4803-4813.
- Entian,K.A. and Barnett,J.A. (1992) Regulation of sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Biochem. Sci.*, **17**, 506-510.

- Espinoza, F.H., Farrell, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Morgan, D.O. (1996) A cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) in budding yeast unrelated to vertebrate CAK. *Science*, **273**, 1714-1717.
- Fitch, I., Dahmann, C., Surana, U., Amon, A., Nasmyth, K., Goetsch, L., Byers, B. and Futcher, B. (1992) Characterization of four B-type cyclin genes of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.*, **3**, 805-818.
- Flick, J.S. and Thorner, J. (1993) Genetic and biochemical characterization of a phosphatidylinositol-specific phospholipase C in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 5861-5876.
- Foiani, M., Nadjar-Boger E., Capone, R., Sagee, S., Hashimshoni, T., and Kassir, Y. (1996) A meiosis-specific protein kinase, Ime2, is required for the correct timing of DNA replication and for spore formation in yeast meiosis. *Mol. Gen. Genet.*, **253**, 278-288.
- Freese, E.B., Chu, M.I. and Freese, E. (1982) Initiation of yeast sporulation by partial carbon, nitrogen, or phosphate deprivation. *J. Bacteriol.*, **149**, 840-851.
- Friesen, H., Doyle, L.R. and Segall, J. (1994) Mutation of the *SPS1*-encoded protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to defects in transcription and morphology during spore formation. *Genes Dev.*, **15**, 2162-2175.
- Gailus-Durner, V., Xie, J., Chintamaneni, C. and Vershon, A.K. (1996) Participation of the yeast activator Abf1 in meiosis-specific expression of the *HOP1* gene. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 2777-2786.
- Gallego, C., Garí, E., Colomina, N., Herrero, E. and Aldea, M. (1997) The Cln3 cyclin is down-regulated by translational repression and degradation during the G1 arrest caused by nitrogen deprivation in budding yeast. *EMBO J.*, **16**, 7196-7206.
- Gancedo, J.M. and Gancedo, C (1986) Catabolite repression mutants of yeast. *FEMS Microbiol. Lett.*, **32**, 179-187.
- García, M.T., Cuesta, R. and Tamame, M. (1995) El control general de la biosíntesis de aminoácidos en *Saccharomyces cerevisiae* como sistema modelo de regulación de la expresión génica en levaduras. In Casadesús, J. (ed.), *Microbiología y Genética Molecular*, Tomo I, Universidad de Huelva, 305-326.
- Gerber, M.R., Farrell, A., Deshaies, R.J., Herskowitz, I. and Morgan, D.O. (1995) Cdc37 is required for association of the protein kinase Cdc28 with G1 and mitotic cyclins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**, 4651-4655.
- Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A. and Fink, G.R. (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell*, **68**, 1077-1090.
- Gorner, W., Durchschlag, E., Martínez-Pastor, M.T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, D., Ruis, H. and Schuller, C. (1998) Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev.*, **12**, 586-597.
- Grandin, N. and Reed, S.I. (1993) Differential function and expression of *Saccharomyces cerevisiae* B-type cyclins in mitosis and meiosis. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 2113-2125.
- Herskowitz, I. (1995) MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell*, **80**, 187-197.
- Herskowitz, I., Rine, J. and Strathern, J.N. (1992) Mating-type determination and mating-type interconversion in *Saccharomyces cerevisiae*. In *The molecular and cellular*

- biology of the yeast Saccharomyces: Gene expression*. E.W. Jones et. al. eds. (Cold Spring Harbor, New York) pp 583-656.
- Hilt,W., and Wolf,D.H. (1996) Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biol. Sci.*, **21**, 96-102.
- Honigberg,S.M. and Esposito,R.E. (1994) Reversal of cell determination in yeast meiosis: postcommitment arrest allows return to mitotic growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 6559-6563.
- Huble,L., Bradshaw-Rouse,J. and Heideman,W. (1993) Connections between the Ras-cyclic AMP pathway and G₁ cyclin expression in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 6274-6282.
- Hunter,T., Plowman,G.D. (1997) The protein kinases of budding yeast:six score and more. *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 18-22.
- Jeoung,D.I., Oehlen,L.J. and Cross,F.R. (1998) Cln3-associated kinase activity in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by the mating factor pathway. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 433-441.
- Johnston,L.H., White,J.H., Johnson,A.L., Lucchini,G. and Plevani,P. (1990) Expression of the yeast DNA primase gene, *PR11*, is regulated within the mitotic cell cycle and in meiosis. *Mol. Gen. Genet.*, **221**, 44-48.
- Kadosh,D. and Struhl,K. (1997) Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell*, **89**, 365-371.
- Kadosh,D. and Struhl,K. (1998) Histone deacetylase activity of Rpd3 is important for transcriptional repression in vivo. *Genes Dev.*, **12**, 797-805.
- Kassir,Y., Granot,D. and Simchen,G. (1988) *IME1*, a positive regulator gene of meiosis in *S. cerevisiae*. *Cell*, **52**, 853-862.
- King,R.W., Peters,J.M., Tugendreich,S., Rolfe,M., Hieter,P. and Kirschner,M.W. (1995) A 20S complex containing *CDC27* and *CDC16* catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell*, **81**, 279-288
- Koch,C. and Nasmyth, K. (1994) Cell cycle regulated transcription in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **6**, 451-459.
- Koch,C., Schleiffer,A., Ammerer,G. and Nasmyth,K. (1996) Switching transcription on and off during the yeast cell cycle: Cln/Cdc28 kinases activate bound transcription factor SBF (Swi4/Swi6) at Start, whereas Clb/Cdc28 kinases displace it from the promoter in G₁. *Genes Dev.*, **10**, 129-141.
- Krisak,L., Strich,R., Winters,R.S., Hall J.P., Mallory,M.J., Kreitzer,D., Tuan,R.S. and Winter,E. (1994) *SMK1*, a developmentally regulated MAP kinase, is required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, **8**, 2151-2161.
- Küntzel,H., Rottjakob,W., Schwed,A., and Zwerschke,W. (1994) START control in cycling *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucl. Acid Res.*, **48**, 1-28.
- Kupiec,M., Byers,B., Esposito,R.E. and Mitchell,A.P. (1997) Meiosis and sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. In Pringle,J.R., Broach,J.R., and Jones,E.W. (eds), *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Cell Cycle and Cell Biology*. Cold Spring Harbor, New York, pp. 889-1036.
- Labib,K. and Moreno,S. (1996) rum1: a CDK inhibitor regulating G1 progression in fission yeast. *Trends Cell Biol.*, **6**, 62-66.

- Lanker,S., Valdivieso,M.H. and Wittenberg,C. (1996) Rapid degradation of the G₁ cyclin Cln2 induced by Cdk-dependent phosphorylation. *Science*, **271**, 1597-1601.
- Lee,R.H. and Honigberg,S.M. (1996) Nutritional regulation of late meiotic events in *Saccharomyces cerevisiae* through a pathway distinct from initiation. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 3222-3232.
- Lew,D.J. and Reed,S.I. (1995) A cell cycle checkpoint monitors cell morphogenesis in budding yeast. *J. Cell Biol.*, **129**, 739-749.
- Lew,D.J.,Weinert,T. and Pringle,J.R. (1997) Cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*. In Pringle,J.R., Broach,J.R., and Jones,E.W. (eds), *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Cell Cycle and Cell Biology*. Cold Spring Harbor, New York, pp. 607-695.
- Li,W. and Mitchell,A.P. (1997) Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics*, **145**, 63-73.
- Lohr,D.P., Venkov,P. Zlatanova,J. (1995). Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. *FASEB J.*,**9**, 777-787.
- Malathi,K., Xiao,Y. and Mitchell,A.P. (1997) Interaction of yeast repressor-activator Ume6p with glycogen synthase kinase 3 homolog Rim11p. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 7230-7236.
- Mandel,S., Robzyk,K. and Kassir,Y. (1994) IME1 gene encodes a transcription factor which is required to induce meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dev.Genet.*, **15**, 139-147.
- Matsuura,A.M., Treinin,M., Mitsuzawa,H., Kassir,Y., Uno,I. and Simchen,G. (1990) The adenylate cyclase/protein kinase cascade regulates entry into meiosis in *Saccharomyces cerevisiae* through the gene IME1. *EMBO J.*, **9**, 3225-3232.
- McCarroll,R.M. and Esposito,R.E. (1994) *SPO13* negatively regulates the progression of mitotic and meiotic nuclear division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **138**, 47-60.
- McKinney,J.D. and Cross,F.R. (1995). *FAR1* and the G₁ phase specificity of cell cycle arrest by mating factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 2509-2516.
- Mitchell,A.P. (1994) Control of meiotic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.*, **58**, 56-70.
- Mitchell,A.P., Driscoll,S.E. and Smith,H.E. (1990) Positive control of sporulation-specific genes by the *IME1* and *IME2* products in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 2104-2110.
- Morgan,D.O. (1995) Principles of CDK regulation. *Nature*, **374**, 131-134.
- Navas,T.A., Zhou,Z.,and Elledge,S.J. (1995) DNA polymerase ϵ links the DNA replication machinery to the S phase checkpoint. *Cell*, **80**, 29-39.
- Neigeborn,L. and Mitchell,A.P. (1991) The yeast *MCK1* gene encodes a protein kinase homolog that activates early meiotic gene expression. *Genes Dev.*, **5**, 533-548.
- Patton,E.E., Willems,A.R., Sa,D., Kuras,L., Thomas,D., Craig,K.L. and Tyers,M. (1998) Cdc53 is a scaffold protein for multiple Cdc34/Skp1/F-box protein complex that regulates cell division and methionine biosynthesis in yeast. *Genes Dev.*, **12**, 692-705.
- Paulovich,A.G. and Hartwell,H.L. (1995) A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. *Cell*, **82**, 841-847.

- Peeper,D.S., Parker,L.L., Ewen,M.E., Toebes,M., Hall,F.L., Xu,M., Zantema,A., van der Eb,A.J. and Piwnica-Worms,H. (1993) A- and B-type cyclins differentially modulate substrate specificity of cyclin-cdk complexes. *EMBO J.*, **12**, 1947-1954.
- Peter,M. and Herskowitz,I. (1994) Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. *Science*, **265**, 1228-1231.
- Polymenis,M. and Schmidt,E.V. (1997) Coupling of cell division to cell growth by translational control of the G1 cyclin *CLN3* in yeast. *Genes Dev.*, **11**, 2522-2531.
- Pringle,J.R. and Hartwell,L.H. (1981) The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. In Strathern, J.N., Jones, E.W. and Broach, J.R. (ed.), *The molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae: life cycle and inheritance*. Cold Spring Harbor, New York, Vol. I, pp. 97-142.
- Reed,S.I. (1980) The selection of *S. cerevisiae* mutants defective in the Start event of cell division. *Genetics*, **95**, 561-577.
- Reed,S.I. (1991) G1-specific cyclins: in search of an S-phase-promoting factor. *Trends Genet.*, **7**, 95-99.
- Roberts,R.L. and Fink,G.R. (1994) Elements of a single MAP Kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev.*, **8**, 2974-2985.
- Rubin-Bejerano,I., Mandel,S., Robzyk,K. and Kassir,Y. (1996) Induction of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae* depends on conversion of the transcriptional repressor Ume6 to a positive regulator by its regulated association with the transcriptional activator Ime1. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 2518-2526.
- Russell,P., Moreno,S. and Reed,S.I. (1989) Conservation of mitotic controls in fission and budding yeast. *Cell*, **57**, 295-303.
- Saavedra,C., Hammell,C.M., Heath,C.V. and Cole,C.N. (1997) Yeast heat shock mRNAs are exported through a distinct pathway defined by Rip1p. *Genes Dev.*, **11**, 2845-2856.
- Saavedra,C., Tung,K.K., Amberg, D.C., Hopper,A.K. and Cole,C.N. (1996) Regulation of mRNA export in response to stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, **10**, 1608-1620.
- Sagee,S., Sherman,A., Shenhar,G., Robzyk,K., Ben-Doy,N., Simchen,G. and Kassir,Y. (1998) Multiple and distinct activation and repression sequences mediate the regulated transcription of *IME1*, a transcriptional activator of meiosis-specific genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 1985-1995.
- Schneider,B.L., Yang,Q.-H. and Futcher,B. (1996) Linkage of replication to Start by the Cdk inhibitor Sic1. *Science*, **272**, 880-882.
- Schomerus,C. and Kuntzel,H. (1992) CDC25-Dependent induction of inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol in *Saccharomyces cerevisiae* by nitrogen. *FEBS Lett.*, **307**, 249-252.
- Schutz,A.R., Giddings,T.H., Steiner,E.Jr. and Winey,M. (1997) The yeast *CDC37* gene interacts with *MPS1* and is required for proper execution of spindle pole body duplication. *J. Cell Biol.*, **136**, 969-982.
- Schwob,E. and Nasmyth,K. (1993) *CLB5* and *CLB6*, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, **7**, 1160-1175.

- Schwob,E., Böhm,T., Mendenhall,M.D. and Nasmyth,K. (1994) The B-type cyclin kinase inhibitor p40^{SIC1} controls the G₁ to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell*, **79**, 233-244.
- Seufert,W., Futcher,B. and Jentsch,S. (1995) Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature*, **373**, 78-83.
- Shah,J.C. and Clancy,M.J. (1992) *IME4*, a gene that mediates *MAT* and nutritional control of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 1078-1086.
- Shefer-Vaida,M., Sherman,A., Ashkenazi,T., Robzyk,K. and Kassir,Y. (1995) Positive and negative feedback loops affect the transcription of *IME1*, a positive regulator of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dev. Genet.*, **16**, 219-228.
- Sherman,A., Shefer,M., Sagee,S. and Kassir,Y. (1993) Post-transcriptional regulation of *IME1* determines initiation of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, **237**, 375-384.
- Shuster,E.O. and Byers,B. (1989) Pachytene arrest and other meiotic effects of the Start mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **123**, 29-43.
- Sia,R.A.L. and Mitchell,A.P. (1995) Stimulation of later functions of the yeast meiotic protein kinase Ime2p by the *IDS2* gene product. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 5279-5287.
- Sidorova,J.M. and Breeden,L.L. (1997) Rad53-dependent phosphorylation of Swi6 and down-regulation of *CLN1* and *CLN2* transcription occur in response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, **11**, 3032-3044.
- Sidorova,J.M., Mikesell,G.E., Breeden,L.L. (1995) Cell cycle-regulated phosphorylation of Swi6 controls its nuclear localization. *Mol. Biol. Cell.*, **6**, 1641-1658.
- Smith,H.E. and Mitchell,A.P. (1989) A transcriptional cascade governs entry into meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 2142-2152.
- Smith,H.E., Driscoll,S.E., Sia,R.A.L., Yuan,H.E. and Mitchell,A.P. (1993) Genetic evidence for transcriptional activation by the yeast *IME1* gene product. *Genetics*, **133**, 775-784.
- Sonenberg,N. and Gingras,A.C. (1998) The mRNA 5'cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 268-275.
- Strich,R., Surosky,R.T., Steber,C., Dubois,E., Messenguy,F. and Esposito,R.E. (1994) *UME6* is a key regulator of nitrogen repression and meiotic development. *Genes Dev.*, **8**, 796-810.
- Stuart,D. and Wittenberg,C. (1995) *CLN3*, not positive feedback, determines the timing of *CLN2* transcription in cycling cells. *Genes Dev.*, **9**, 2780-2794.
- Su,S.S.Y. and Mitchell,A.P. (1993) Identification of functionally related genes that stimulate early meiotic gene expression in yeast. *Genetics*, **133**, 67-77.
- Surosky,R.T., Strich,M. and Esposito,R.E. (1994) The yeast *UME5* gene regulates the stability of meiotic mRNAs in response to glucose. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 3446-3458.
- Tang,Y. and Reed,S.I. (1993) The Cdk-associated protein Cks1 functions both in G₁ and G₂ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, **7**, 822-832.
- Tatchell,K., Robinson,L.C. and Breitenbach,M. (1985) *RAS2* of *Saccharomyces cerevisiae* is required for gluconeogenic growth and proper response to nutrient limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**, 3785-3789.

- Thevelein, J.M. (1991) Fermentable sugars and intracellular acidification as specific activators of RAS-adenilate cyclase pathway in yeast: the relationship to nutrient-induced cell cycle control. *Mol. Microbiol.*, **5**, 1301-1307.
- Thevelein, J.M. (1994) Signal transduction in yeast. *Yeast*, **10**, 1753-1790.
- Thevelein, J.M. and Hohmann, S. (1995) Threulose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast?. *Trends. Biochem. Sci.* **20**, 3-10.
- Tokiwa, G., Tyers, M., Volpe, T. and Futcher, B. (1994) Inhibition of G₁ cyclin activity by the Ras/cAMP pathway in yeast. *Nature*, **371**, 342-345.
- Toone, W.M., Johnson, A.L., Banks, G.R., Toyn, J.H., Stuart, D., Wittenberg, C. and Johnston, L.H. (1995). Rme1, a negative regulator of meiosis, is also a positive regulator of G1 cyclin gene expression. *EMBO J.*, **14**, 5824-5832.
- Townsley, F.M. and Ruderman, J.V. (1998) Proteolytic ratchets that control progression through mitosis. *Trends Cell Biol.*, **8**, 238-244.
- Toyn, J.H., Johnson, A.L., Donovan, J.D., Toone, W.M. and Johnston, L.H. (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**, 85-96.
- Tyers, M., Tokiwa, G. and Futcher, B. (1993) Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G₁ cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. *EMBO J.*, **12**, 1955-1968.
- Vidan, S. and Mitchell, A.P. (1997) Stimulation of yeast meiotic gene expression by the glucose-repressible protein kinase Rim15p. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 2688-2697.
- Wells, W.A.E. (1996) The spindle-assembly checkpoint: Aiming for a perfect mitosis, every time. *Trends Cell Biol.*, **6**, 228-234.
- Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G.C., and Singer, R.A. (1993) Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.*, **57**, 383-401.
- Yang, S.S., Yeh, E., Salmon, E.D. and Bloom, K. (1997) Identification of a mid-anaphase checkpoint in budding yeast. *J. Cell Biol.*, **136**, 345-354.

