

TREBALL DIRIGIT DE

Paper de Srk1 en la formació i estabilitat del citoesquelet d'actina en *Schizosaccharomyces pombe*

Departament de Biomedicina

Unitat de Biologia Cel·lular

David Sun

Gener de 2019

Coordinadora i tutora: Dra. Rosa Aligué Alemany

Index

Introducció	pàg. 1
1. Schizosaccharomyces pombe com a model cel·lular	pàg. 1
2. Cicle cel·lular en S. pombe	pàg. 1
2.1 Mitosis	pàg. 2
2.2 Organització del citoesquelet	pàg. 4
3. MAPK	pàg. 5
4. Lsk1	pàg. 8
Antecedents	pàg. 9
Objectius	pàg. 11
Materials i mètodes	pàg. 12
1. Stocks cel·lulars	pàg. 12
2. Medis de cultiu	pàg. 12
2.1 Medis de cultiu llevat	pàg. 12
2.2 Medis de cultiu de bacteris	pàg. 12
3. Assaig de sensibilitat per dilució, dilució seriada o spots	pàg. 13
4. Creuament en massa	pàg. 13
5. Electroforesis en gel d'agar	pàg. 14
6. Transformació de soques	pàg. 14
6.1 Transformació de soques de S. pombe	pàg. 14
6.2 Transformació de soques de E. Coli	pàg. 14
7. Extracció i purificació del plasmidi amplificat d'E. coli	pàg. 14
8. Extracció de proteïnes	pàg. 15
8.1 Extracció de proteïnes de E. coli amb Stop Buffer	pàg. 15
8.2 Extracció de proteïnes de S. pombe per sonicació	pàg. 15
9. Quantificació de proteïnes: mètode Lowry	pàg. 15
10. Electroforesis de Proteïnes	pàg. 16
11. Tinció de proteïnes	pàg. 16
11.1 Tinció Coomassie Blue	pàg. 16
11.2 Tinció Ponceau	pàg. 16
12. Electrotransferència/inmunodetecció/western blot	pàg. 17
13. Purificació de proteïnes	pàg. 17

13.1 Purificació de proteïnes per immunoprecipitació	pàg. 17
13.2 Purificació de proteïnes per GST (glutatió S transferasa)	pàg. 18
14. Assaig quinasa in vitro	pàg. 18
 Resultats	 pàg. 19
1. Anàlisi de la relació funcional entre Srk1 i Lsk1	pàg. 19
2. Comprovació de la unió in vivo entre Srk1 i Lsk1	pàg. 19
3. Es Lsk1 substrat de Srk1?	pàg. 20
Discussió	pàg. 22
 Conclusions	 pàg. 22
 Bibliografia	 pàg. 23

INTRODUCCIÓ

1. *Schizosaccharomyces pombe* com a model cel·lular

Schizosaccharomyces pombe és un llevat unicel·lular utilitzat com a organisme model en biologia molecular i cel·lular juntament amb *Saccharomyces cerevisiae* per a l'estudi dels processos de control de cicle cel·lular, translació, traducció, replicació del DNA, etc. Té una mida d'uns 3-4 µm de diàmetre i entre 10 i 14 µm de longitud, i té un creixement polar.

S. pombe prové d'una rama ancestral dels ascomicets, propera en la separació dels fongs i animals, amb una distància potser la mateixa entre *S. cerevisiae*-*S. Pombe* i mamífers-*S. Pombe* (Sipiczki, M 2000), aquesta característica li confereix certa homologia gènica i conservació dels processos amb els mamífers, donant-li moltes similituts, per exemple: *S. cerevisiae* ha perdut molts gens (338) que es conserven entre *S. pombe* i mamífers (Aravind, L. *et al* 2000).

El nostre llevat pot ser haploid en el cicle vegetatiu i diploid quan hi ha algun estrès. Els haploids són útils per fer un cribatge dels al·lels estudiats, mentrestant els diploids serveixen per a fer creuaments de les diferents soques per adquirir els al·lels desitjats en l'experiment.

S. pombe té una alta tasa de recombinació gènica, un avantatge molt útil per a fer seleccions, integracions de etiquetes, promotors controlats exogenament i mutacions puntuals. Juntament amb el curt cicle cel·lular (unes 3 hores) es pot donar modificacions desitjades fàcil i ràpidament (Gómez, A. 2012). Una altre avantatge de *S. pombe* es que pot mantenir plasmidis reversibles per a donar resistència, revertir seleccions o sobreexpressar gens. Tots aquests trets confereixen a *S.pombe* unes característiques idònies com a model d'estudi dels processos cel·lulars, en aquest cas per a l'estudi dels processos del control del cicle cel·lular (Hoffman C. S. *et al* 2015).

2. Cicle cel·lular en *S. pombe*

El cicle cel·lular està compost de 4 fases principals: G1 (Growth), S (Síntesis) , G2 y M (Mitosis). En la **fase G1** la cèl·lula sintetiza proteïnes necessàries per a les següents fases, es la fase on es decideix passar a Síntesis o quedar-se en fase G0, o estat quiescent. En la **fase S** s'hi dona la rèplica del material genètic. En la **fase G2** les cèl·lules creixen fins a tenir el tamany necessari per a poder fer la mitosis. **Mitosis**, com a última fase, el material genètic es repartida entre dues cèl·lules filles i es crea dues cèl·lules noves.

Regulació del cicle cel·lular

La transició entre fases del cicle cel·lular està finament regulada per les Cdc2, una serina-treonina quinasa homòloga a CdK dels mamífers, la seva quantitat es constant durant tot el cicle

cel·lular i l'activitat varia segons a la unió de les ciclines o subunitats reguladores (Cdc13, Puc1, Cig1 i Cig2), fosforilacions/desfosforilacions, unió a proteïnes inhibidores, inputs de l'estat nutricional, mida cel·lular o resposta a checkpoints. De les 4 ciclines només la Cdc13 es essencial per a la viabilitat cel·lular (Fisher and Nurse 1996) i regula la transició G2-M, Cdc13 comença a acumular-se en G1 i arribar al màxim en G2 i es degrada al final de la mitosis.

2.1 Mitosis

La mitosis està dividida en 6 fases: **1: Profase:** activació de les Cdk (Cyclin-dependent kinase) i inici de l'assemblatge del CAR (anell contràctil d'actomiosina). **2: Prometafase:** els cromosomes s'ancoren als microtúbuls, en *S. pombe* no es trenca el nucli com ho fan els mamífers. **3: Metafase:** els cromosomes es col·loquen en la part medial unides pel fus mitòtic i dos SPB (spindle pole body), que són anàlogues dels centrosomes, als dos costats de la cèl·lula. Es troba en aquest fase un checkpoint de metafase: SAC (spindle attachment checkpoint), s'assegura que els cromosomes estiguin en el fus mitòtic, en cas contrari no s'inicia la següent fase. **4: Anafase:** durant la transició de metafase a anafase s'activa l'APC (Anaphase promoting complex), que ubiquitinitza proteïnes que seran degradades pel proteasoma, com per exemple la ciclina Cdc13, on la degradació permet la finalització de mitosis i inici de citocinesis. La cohesina Rad21 que manté unida els dues cromàtides germanes es degradada per la separasa Cut1, la securina Cut2 inhibeix la separasa Cut1 per a que no s'activi prematurament. **5: Telofase:** es forma els dos nuclis, desapareix les fibres del fus mitòtic, i es contrau l'anell contràctil per formar el septe i separar les dues cèl·lules. **6: Citocinesis:** s'inicia juntament amb la telofase on es dona la separació espacial i física de les cèl·lules filles després de la contracció del CAR per formar el septe.

Regulació de la mitosis:

- **Quinases Wee1 i Mik1**

La Cdc2 ha de tenir defosforilat els residus 14 i 15 de treonina i tirosina per a que es pugui entrar en mitosis (Gould and Nurse 1989). Wee1 i Mik1 manté la Cdc2 fosforilada per a que no es doni la mitosis (Featherstone and Russell 1991), a la vegada Mik1 i Wee1 pot rebre inputs en resposta al dany en DNA per mitjà de la quinasa Chk1 i retardar així la entrada a la mitosis per a que doni temps per a que la maquinaria de reparació es doni lloc (O'Connell *et al* 1997). Cdr1/Nim1, una altra quinasa *upstream* de Wee1, fosforila Wee1 al domini catalític i disminueix la seva activitat (Dunphy 1994) (Fig. 1). La quinasa Cdr2 amb homologia amb Cdr1, també pot fosforilar i disminuir l'activitat de Wee1, la Cdr2 juntament amb la quinasa Pom1 regula la entrada de

mitosis mitjançant el tamany i el gradient de Pom1: quan la cèl·lula no creix hi ha una concentració similar en tota la cèl·lula, així Pom1 inhibeix la Cdr2, on es troba a la part medial, quan la cèl·lula creix disminueix el gradient de Pom1 al centre de la cèl·lula i Cdr2 pot inhibir Wee1 i progressar en el cycle cel·lular (Huang *et al* 2007) (Fig. 2).

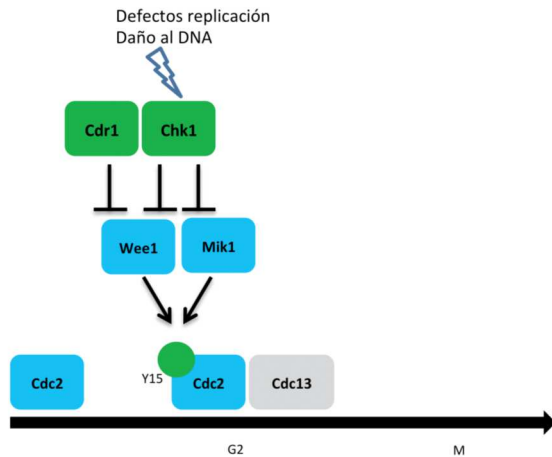


Figura 1. Regulació entrada a mitosis per quinases. Gómez A. (2012)

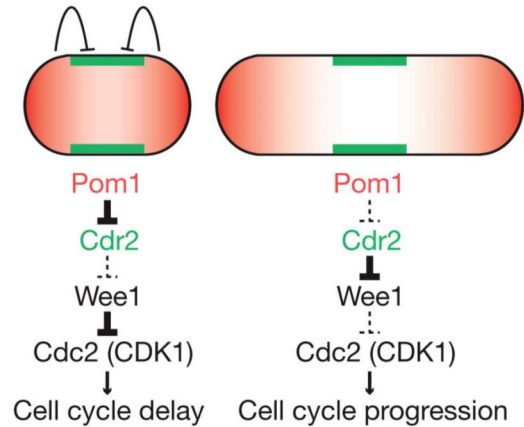


Figura 2. Regulació entrada a mitosis per longitud cel·lular. Martín SG *et al*, 2009.

- **Fosfatasa Cdc25**

La tirosina-fosfatasa Cdc25 desfosforila el residu Y15 de Cdc2 per a que pugui progressar el cycle cel·lular. Tot i que la fosfatasa Pyp3 també pot fer la mateixa funció, sembla ser que el paper principal la exerceix la Cdc25 (Kovelman and Russell 1996).

Regulació de Cdc25

La Cdc25 té una retroalimentació positiva amb la Cdc2: la Cdc2 la fosforila i activa i aquesta la desforila i activa. Per a trencar aquesta retroalimentació i finalitzar la mitosis es necessita la fosfatasa Clp1, que desactiva la Cdc25 i redueix l'activació de Cdc2 que permet la sortida de la mitosis (Kovelman and Russell 1996) (fig. 3). La Cdc25 també té unes quinases que la inhibeixen

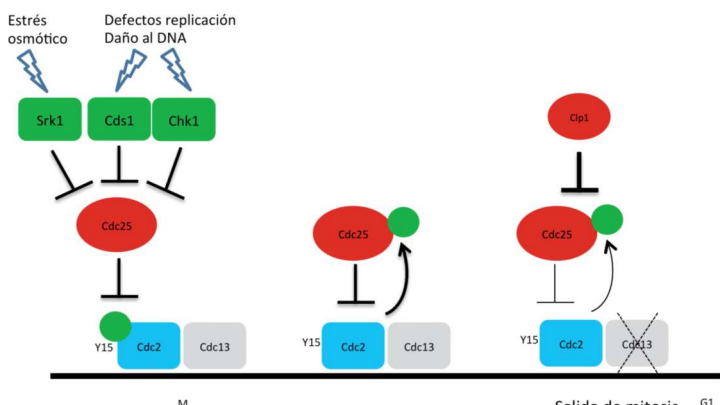


Figura 3. Sortida de mitosis per Cdc25 i complex Cdc2-Cdc13. Gómez A. (2012)

i paren el cycle cel·lular: Cds1, Chk1 i Srk1. Cds1 i Chk1 són quinases checkpoint que s'activen al haver defectes de replicació o danys al DNA, mentre que la Srk1 s'activa per un estrès osmòtic. El lloc de fosforilació de Cds1, Chk1 i Srk1 en Cdc25 és la

mateixa, i provoca una inhibició de l'activitat, mentre que el lloc de fosforilació de la Cdc2 activa la Cdc25 (Lopez-Aviles *et al* 2008, Lopez-Aviles *et al* 2005).

2.2 Organització del citoesquelet

El citoesquelet d'actina i tubulina depèn de l'activitat de Cdc2. Alts nivells de Cdc2 a inici de la mitosis restringeix la citocinesis (Dischinger *et al* 2008). Quan es desactiva la CdK, s'inicia la citocinesis amb l'activació del SIN (Septation Initiation Network), una cascada de proteïnes quinasa encarregada de la iniciació de la septació del CAR. La forma de creixement és un fenomen conegut com a NETO (New End Take Off), caracteritzada primer per un creixement monopolar d'un dels extrems (old end) després de la septació, un cop acabat en un punt de G2 la cèl·lula torna a créixer per l'altre extrem (new end) així passant al creixement bipolar. La distribució espacial i temporal de l'actina canvia segons en el moment del cicle cel·lular, en interfase la actina F té dues formes: els patches i cables. Les patches són agregacions d'actina que es troben en els extrems de creixement, els cables són estructures lineal que serveixen per al creixement polaritzat, tot i no ser imprescindible.

Posicionament de CAR (anell contràctil d'actomiosina)

La proteïna Mid1, en el seu domini PH és la principal responsable del posicionament de CAR a la part medial i cortical de la cèl·lula, la seva funció és la d'ancoratge de totes les proteïnes involucrades en la formació i contracció del CAR (Daga and Chang 2005). En interfase Mid1 està en el nucli, tot i que també en petita part en el còrtex formant nodes amb la Cdr2 (fig. 4), el

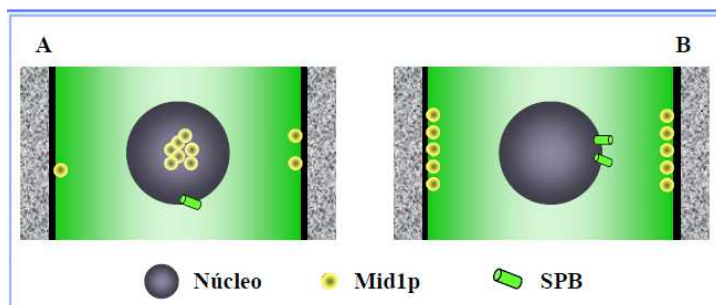


Figura 4. Posicionament de Mid1a a la zona del còrtex proximal del nucli.

Pilar Sala, Mario. 2009

posicionament al còrtex es deguda per la proteïna Pom1, que forma un gradient i sempre hi ha més concentració als pols. Mid1 es situa en còrtex proximal del nucli per la fosforilació de Plo1 (Almonacid *et al* 2011).

Contracció del CAR

La contracció del l'anell es deguda per la polimerització i despolimerització constant dels filaments d'actina que es van contraent, s'ha vist que la densitat i l'amplada de l'anell sempre és la mateixa, per això s'ha de produir un desembalatja net d'actina (Schroeder 1972). La proteïna Rng3 ajuda en el plegament de la miosina II i l'activitat motora sobre els filaments

d'actina. (Lord *et al.*, 2008). La ruta SIN, es la que coordina la final del mitosis amb la contracció de l'anell i la formació posterior del septe.

Ruta SIN

La ruta SIN està formada per proteïnes adaptadores, un mòdul de GTPasa i una cascada quinasa. Localitzada en SPB i en la regió de divisió. Cdc11 i Sid4 són les proteïnes adaptadores que permeten l'ancoratge de la ruta al SPB (Morrell JL *et al.*, 2004). L'entrada en mitosis depèn de que es desfosforili Cdc2 del complex CDK-ciclina Cdc2-Cdc13 i aquesta estigui desactivada, un estat també necessària per a l'activació del SIN.

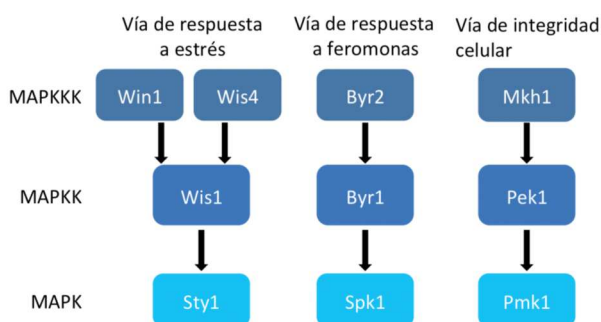
Síntesis i formació del septe

La formació del septe es dona quan es comença a contraure l'anell, tot i que la relació està poc clara. El septe primari està formada de cadenes lineals de 1-3- β -glucà i necessita de la seva formació Bgs1 i 1-3- β -glucà sintasa. Ambdós costat del septe primari se sintetitza el septe secundari. Al final es degrada el septe primari per glucanases com la 1-3- β -glucanasa Eng1, i una endo-1-3- α -glucosidasa, Agn1 (Dekker *et al* 2004).

3. MAPK

Les MAPK (mitogen-activated protein kinase) són mecanismes de transducció de senyals mitjançant quinases seqüencial, de la MAPKKK, que fosforila la MAPKK fins a la MAPK, aquesta última activa factors de transcripció, quinases, proteïnes d'unió a RNA, etc. En *S. pombe* existeix 3 vies de les MAPK (fig. 5):

1. Via de resposta a l'estrès o via de la SAPK (stress-activated protein kinase) (Millar *et al* 1995). MAPKKK: Win1 i Wis4; MAPKK: Wis1; MAPK: Sty1.
2. Via d'integritat cel·lular (Toda *et al* 1996). MAPKKK: Mkh1; MAPKK: Pek1; MAPK: Pmk1.
3. Via resposta de les feromones (Toda *et al* 1991) MAPKKK: Bry2; MAPKK: Byr1; MAPK: Spk1.



Nosaltres ens centrarem en la primera via, i la senyalització per sota de la MAPK Sty1.

Figura 5. Les 3 vies MAPK. Gómez A. (2012)

Ruta de la MAPK d'estrès

La MAPK Sty1 és la via principal en resposta a l'estrès, té homologia amb la p38 en mamífers i Hog1 en *S. cerevisiae*. En *S. pombe* les MAPKKK són Win1 i Wis4, les dues amb capacitat de fosforilar la MAPKK Wis1 en els residus ser 469 i tre 473, una vegada la Wis1 es activa fosforila a la MAPK Sty1 en els residus treonina 171 y tirosina 173. La Sty1 s'activa per un ampli de condicions d'estrès com ara: KCl, sorbitol, cations tòxics, metalls tòxics: arsenit o cadmi, H₂O₂, xoc tèrmic, estrès per fred, radiació UV, centrifugació, manca de nutrients com la glucosa, nitrogen. També s'ha descrit una activació independent de Wis1 en resposta a Cadmi i baixes concentracions a glucosa, i es regulada per la fosfatasa Pyp1. L'activació de Sty1 es transitòria i depèn de la intensitat i tipus d'estímul rebuda. En condicions normals Sty1 està en citoplasma, al ser fosforilada per Wis1 entra al nucli per una via depent de Pim1, una Ran intercanviadora de GDP/GTP. Després la exposina Crm1 s'encarrega de que torni al citoplasma una vegada s'acabi la seva funció (Gaits and Russell 1999).

Sty1 juntament amb el factor de transcripció Atf1 activen la CESN (core environmental stress response), que es una varietat de gens molt amplis que serveixen per adaptar-se a l'estrès. Els gens del CESR es poden classificar en quatre grups segons la seva transcripció depengui de Sty1, Atf1, els dos o cap.

Efectors de la MAPK Sty1

Els efectors de Sty1 poden ser factors de transcripció com Atf1 i Pcr1, proteïnes quinases com la Srk1, Cmk2 i Plo1; proteïnes d'unió a mRNA com Csx1 i factors de traducció (fig. 6).

- **Factores de transcripció**

Els 4 principals factors de transcripció que poden regular l'estrès ambiental en *S. pombe* solen ser Atf1, Pcr1, Pap1 i Prr1. Pap1, gen amb homologia amb el gen c-Jun humà, regula la transcripció de gens per fer front a l'estrès oxidatiu de H₂O₂.

Prr1 també està involucrada en la resposta a l'estrès oxidatiu de H₂O₂ (Ohmiya et al 1999).

Atf1, un gen amb homologia amb els ATF2 dels mamífers, és fosforilat per Sty1 tant *in vivo* com *in vitro*, també pot ser fosforilada per la MAPK Pmk1 de la via de la integritat cel·lular si hi ha un estrès osmòtic. Atf1 té uns dominis tipus b-Zip i permet la interacció amb el DNA en les

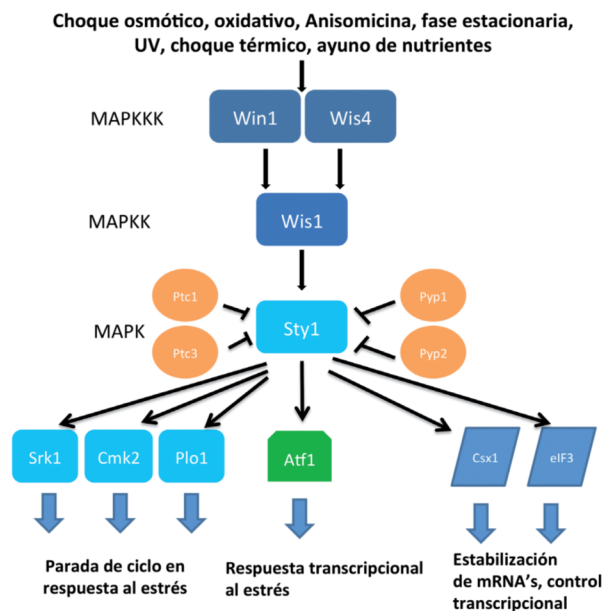


Figura 6. Efectors de la MAPK Sty1. Gómez A. (2012)

seqüències CRE (elements de resposta a AMP cíclic). En situacions normals Atf1 forma heterodímers amb Pcr1, tot i que Atf1 pot actuar com a homodímer en resposta a l'estrès osmòtic. En condicions basals Atf1 està unida a la proteïna Fbh1, que forma part del sistema de ubiquitinització del proteasoma, i resulta en un *turnover* continu de Atf1. En situació d'estrès la Sty1 fosforila la Atf1 i aquesta es desenganxa de Fbh1, i comença a acumular-se (Lawrence et al 2007).

- **Proteïnes quinases**

Cmk2:

Cmk2 és una quinasa homòloga a Rck2 de *S. cerevisiae* i a CaMK de mamífers que es fosforilada per Sty1 en resposta a l'estrès, en particular a l'arsenit i cadmi (Sanchez-Marin et al 2018).

No és essencial per a la supervivència cel·lular en condicions normals, els nivells de proteïna són màxims després de l'anafase i mínims al principi de G2. Una sobreexpressió de la quinasa bloqueja el cicle en G2, es pensa que amb aquesta parada en G2 permet reparar errors en la replicació, però no del dany del DNA (Alemany et al 2002).

Srk1:

Srk1 (*Sty1-regulated kinase*) és una MAPKAPs quinasa (mitogen activated protein kinase activated protein) té aquest nom perquè és fosforilada y activada per la MAPK Sty1, té homologia seqüencial amb CaMK de mamífers i homologia funcional amb MK2 de mamífers.

Srk1 en el cicle vegetatiu

Srk1 és activa en fase G2 i disminueix quan entren en mitosis. Una sobreexpressió de Srk1 fa que el cicle cel·lular es pari al final del G2. La transició de G2/M es mediada per la fosfatasa Cdc25, que defosforila la Cdc2. La Srk1 fosforila la Cdc25 i crea llocs d'unió per a la Rad24, la qual reté Cdc25 al citoplasma, i Cdc25 no pot entrar al nucli, on està el complex Cdc2-Cdc13, per tant si no es defosforila la Cdc2 no pot entrar a mitosis. Durant el cicle vegetatiu es necessita poca activació de la Srk1, actualment es desconeix quina quinasa fosforila la Srk1 en aquest estat.

Srk1 en la resposta a l'estrès

En condicions basals la Srk1 està unida a la Sty1 i aquesta manté inactiva la Srk1. Quan hi ha una senyal d'estrès Sty1 fosforila Srk1 i el complex Sty1-Srk1 es trasloca al nucli, Sty1 activa Atf1 i la transcripció de CESR, mentre que Srk1 es activa quan es separa de Sty1 i fosforila Cdc25 per crea llocs

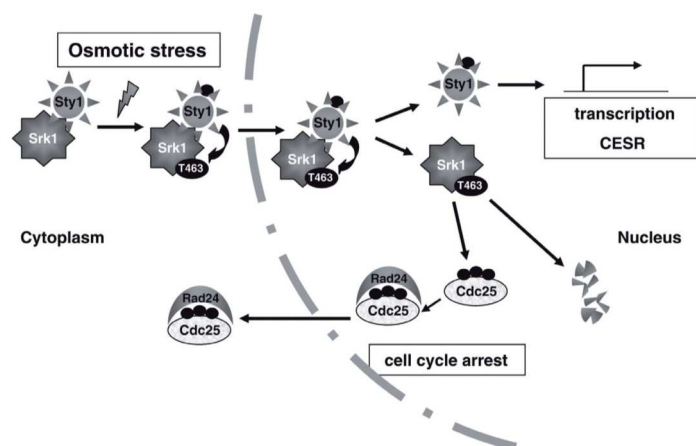


Figura 7. Resposta de Srk1 davant l'estrès. Lopez-Avilés et al 2008

d'unió de Rad24 que segresta la Cdc25 al citoplasma (fig 7). *Srk1* es inestable, un cop s'ha separat es degrada.

4. *Lsk1*

Lsk1 (*latrunculin sensitive kinase*) és una quinasa relacionada amb la senyalització del SIN i en el programa meiòtic.

Lsk1 i anell d'actomiosina

$\Delta lsk1$ és sensible a latrunculina (Lat) i aquests mutants no poden mantenir l'anell d'actomiosina quan que se li aplica Lat A o B (a partir d'ara s'utilitzarà A o B indistintament) (fig. 9), tot i que podem formar-la en condicions normals com una wt (*wild type*), en el cas d'estar en situació normal no hi ha cap defecte important en la citocinesis (fig. 8).

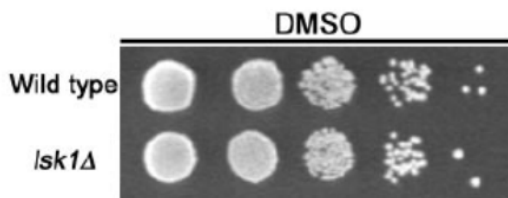


Figura 8. Wild type vs $\Delta lsk1$ en DMSO. (karagiannis et al 2005).

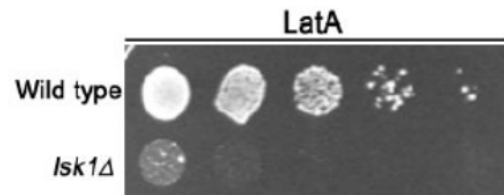


Figura 9. Wild type vs $\Delta lsk1$ en LatA. (karagiannis et al 2005).

La *Lsk1* és un regulador positiu del SIN, ja que un $\Delta lsk1$ pot suprimir un fenotip letal per la cèl·lula com la *cdc16-116*, (un factor *downstream* de la senyalització SIN) que hiperactiva la senyalització del SIN i provoca multiseptes. Se sap de que actualment només les mutacions que poden anular la letalitat de *cdc16-116* són les que estan *downstream* de *cdc16*. Actualment encara no se sap exactament com *Lsk1* modula SIN (Karagiannis et al 2005). *Lsk1*, a contrari de *Clp1*, no està implicada en l'activació del checkpoint per retardar el cicle cel·lular, però és imprescindible per al manteniment de l'anell després de la iniciació del checkpoint.

Lsk1 en meiosis

Lsk1 codifica per la subunitat α catalítica de la CTDK-I (C-terminal domain kinase I) que juntament amb *Lsc1* (subunitat β) i *Lsg1* (subunitat γ) conforma la CTDK-I, una quinasa que fosforila les Ser2 del domini CTD de la RNA Pol II (domini C-terminal de RNA polimerasa II) (fig. 10). Sukegawa Y. et al., (2011) van descriure que la *Lsk1* tenia relació amb la via d'estrès mediada per la MAPK *Sty1*, ja que in vitro sembla ser que fosforila la *Lsk1* en la part N-

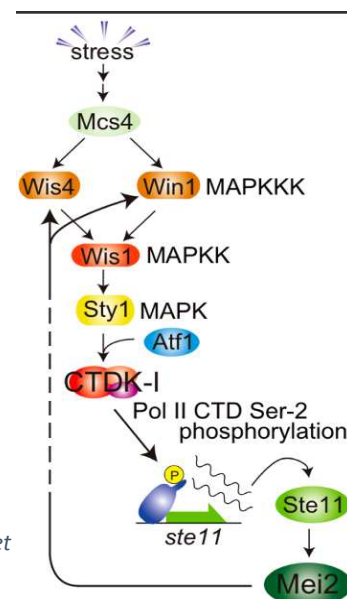


Figura 10. Ruta MAPK de l'estrès i una possible retroalimentació. Sukegawa Y. et al., (2011).

terminal. La Mcs4 és una proteïna reguladora de la resposta a l'estrès que modula les MAPKKK. La Sty1 fosforila la Lsk1 i activa la CTDK-1 per fosforilar les serines 2 del Pol II CTD, aquesta fosforilació és necessària en la activació del sistema meiòtic (prescindible en mitosis), i s'activa la transcripció del gen *ste11*, un factor de transcripció de la família de les HMG que és necessària per l'activació de Mei2 (fig 15). Mei2 és una proteïna coneguda com a: *Master Regulator of Meiosis*, s'enganxa i estabilitza els mRNA relacionades amb la meiosis, una activació artificial de Mei2 pot desencadenar tot el procés meiòtic.

Quan es posava en marxa un experiment amb suficient nitrogen i nutrients es fosforilava la Ser-2 de CTD de Pol II en un mutant amb la Mei2 sempre activa: Mei2-SATA. Això podria explicar que hi hagués una retroalimentació sobre aquesta via.

Es va veure que la fosforilació de Ser-2 de CTD va ser abolida totalment en els mutants $\Delta lsk1$, demostrant que Lsk1 era necessària per a la seva fosforilació, també es va veure molt reduïda la fosforilació en Ser2 de CTD en mutants $\Delta sty1$ i doble mutant $\Delta wis4 \Delta win1$, com que no es fa veure abolida totalment la fosforilació en $\Delta lsk1$, suggereix que la Lsk1 pot ser regulada per una altra via en comptes de la fosforilació de la Ser-2 de CTD (Sukegawa Y. *et al*, 2011).

Antecedents

Treballs anterior d'aquest grup d'investigació com el de la Gómez A. (2012), que la soca $\Delta srk1$ era sensible a Lat B comparada amb una *wt* mitjançant una dilució seriada o *spots* en una concentració de 2 μ M de Lat B (fig. 11).

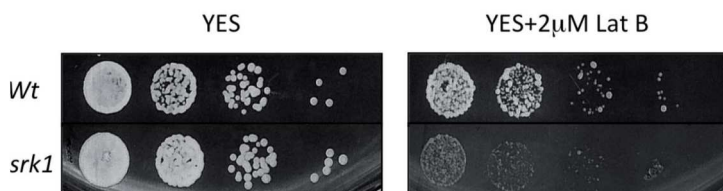


Figura 11. Spots de Wt i *srk1* en YES i en Lat B. Gómez A. (2012)

La sensibilitat la soca per Lat B ve determinada per la fosforilació de treonina 463 de *Srk1*, ja que en una soca en que s'ha canviat la treonina per una alanina no es pot fosforilar i la dilució seriada dona un creixement menor que la *wt* (fig. 12). Es necessària la fosforilació de la *Srk1* per la resposta a l'estrès induïda per Lat B.

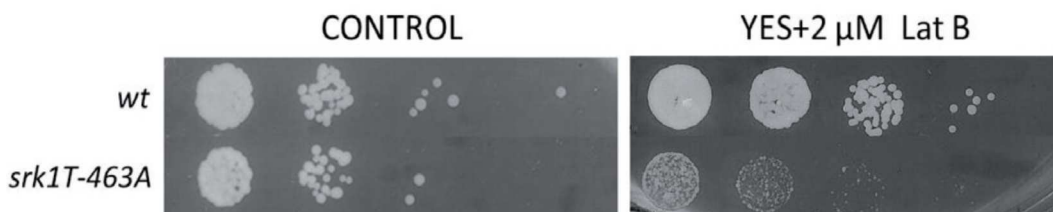


Figura 12. Spots de Wt i *Srk1T-463A*. Gómez A. (2012)

Se sap que *Srk1* exerceix una funció inhibidora de la *Cdc25* quan la fosforila i el cicle es para. En aquest cas es compara les soques $\Delta srk1$, *wt* i *cdc25-9A* (soca amb 9 residus de fosforilació per la *Srk1*, canviats a alanina). Es veu que la $\Delta srk1$ és molt més sensible en resposta a Lat B que la soca *cdc25-9A* (Fig. 13), i això ens podria indicar que *Srk1* té una altra via de resposta a Lat B.

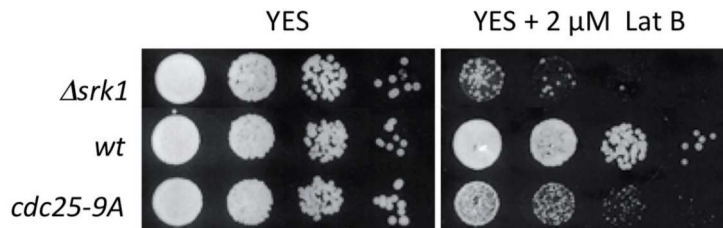


Figura 13. Comparació de soques $\Delta srk1$, *Wt* i *cdc25-9A* en YES i en Lat B. Gómez A. (2012)

La *Srk1* regula la formació de l'anell d'actomiosina, en la figura 14a s'observa la formació del CAR, on la cadena lleugera de reguladora de miosina II (*Rlc1*) es va fusionar amb la proteïna fluorescent GFP. Les soques *Rlc1:GFP* (en vermell) i *Rlc1:GFP $\Delta srk1$* (en blau) van ser sotmesos a la Lat B i es va veure el desenvolupament del CAR, i realment la soca *Rlc1:GFP $\Delta srk1$* va contraure's menys que la *Rlc1:GFP*, per tant la *Srk1* té un paper en l'estabilitat del CAR.

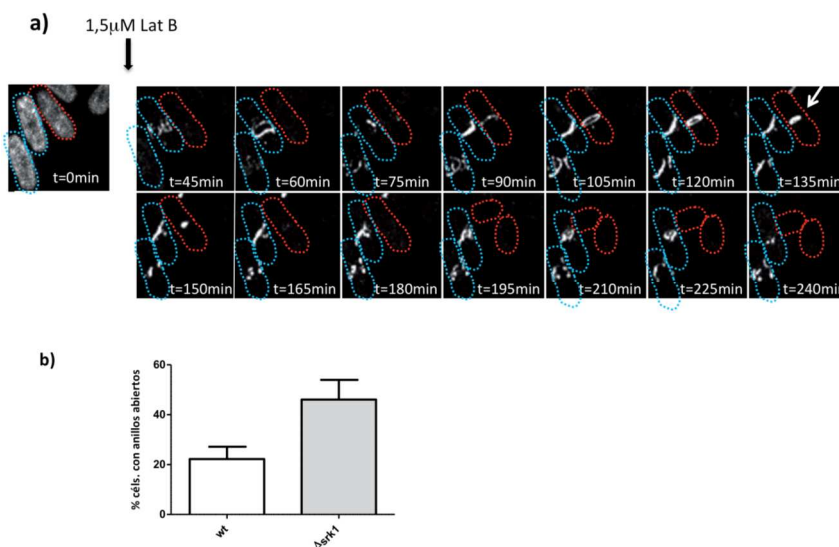


Figura 14. A: *Rlc1:GFP* (en vermell) i *Rlc1:GFP $\Delta srk1$* (en blau), fletxa blanca: inici contracció de l'anell en *wt*. B: el percentatge de cèl·lules que no poden contraure l'anell.

OBJECTIUS

Els resultats de la Srk1 mostrats en els antecedents ens indiquen que, la Srk1 té una funció en la regulació del citoesquelet d'actina, estabilitzant l'anell contràctil durant la citocinesi. Per tal de saber a través de quin mecanisme molecular actua la Srk1 es van identificar proteïnes d'unió a Srk1 a través d'anàlisi proteòmic. Un de les proteïnes d'unió a Srk1 identificades va ser la Lsk1. Donada la seva implicació en la regulació de l'anell contràctil (veure introducció) ens vàrem centrar en la relació de Srk1 i Lsk1. Els objectius concrets d'aquest estudi són:

1. Analitzar la relació funcional entre Srk1 i Lsk1.
2. Comprovar la unió entre Srk1 i Lsk1.
3. Analitzar si Srk1 fosforila la quinasa Lsk1.

MATERIALS I MÈTODES

1. Stocks cel·lulars

Guardar les diferents soques de llevat i bacteris a -80 °C, amb un criopreservador com la glicerina. En bacteri: 1,5 ml cultiu + 0,1 ml glicerol i en llevat: 1 ml cultiu + 1 ml glicerol.

2. Medis de cultiu

2.1 Medis de cultiu llevat

YES: medi ric per a créixer els llevats, formada de: -0,5% (p / v) extracte de llevat; 3,0% (p / v) glucosa; 225 mg/l dels aminoàcids L-adenina, L-histidina, L-leucina, L-lisina i uracil en forma de hidrocloreur. Les plaques de cultiu s'afegien 15g/l d'agar.

Les plaques de YES + Lat B es van obtenir afegint després de autoclavar el medi, la quantitat necessària de Lat B (L5288 Sigma o Cat.428020 Calbiochem) estocs a -20 °C a DMSO.

Les plaques de YES + G418 es van obtenir afegint després de autoclavar el medi, 100 mg/ml d'G418 (Cat. 345.810 Calbiochem), estoc a -20 °C, de 100 mg/ml en H₂O miliq.

Medis Auxòtrofs: Medis mínims (MM) per a seleccionar soques amb les mutacions i/o deleccions necessàries formada per: -3 g/l hidrogen-ftalat de potassi; 2,2 g/l Na₂HPO₄; 5 g/l NH₄Cl; 2% glucosa; 20 ml/l sals (52,5 g/l MgCl₂·6H₂O, 0,735 g/l CaCl₂·2H₂O, 50 g/l KCl, 2 g/l Na₂SO₄); 1 ml/l vitamines (1 g/l àcid pantotènic, 10 g/l àcid nicotínic, 10 g/l inositol, 10 mg/l biotina); 0,1 ml/l minerals (5 g/l àcid bòric, 4 g/l MnSO₄, 4 g/l ZnSO₄·7H₂O, 2 g/l FeCl₂·6H₂O, 0,4 g/l àcid molíbdic, 1 g/l KI, 0,4 g / l CuSO₄·5H₂O, 10 g/l àcid cítric).

El MM es suplementa amb 225 mg/l dels aminoàcids essencials L-adenina, L-histidina, L-leucina o uracil segons el auxotròfia de la soca desitjada.

Medi mínim SSA: s'utilitza per fer esporulació i està formada per: -Glucosa 10 g/l; Àcid aspàrtic 0,5g/l; KH₂PO₄ 2 g/l; MgSO₄ · 7 H₂O 0,5 g/l; CaCl₂ · 2 H₂O 0,1 g/l; (NH₄)₂SO₄ 2g/l; 1 ml/l vitamines (1 g/l àcid pantotènic, 10 g/l àcid nicotínic, 10 g/l inositol, 10 mg/l biotina); 0,1 ml/l minerals (5 g/l àcid bòric, 4 g/l MnSO₄, 4 g/l ZnSO₄·7H₂O, 2 g/l FeCl₂·6H₂O, 0,4 g/l àcid molíbdic, 1 g/l KI, 0,4 g / l CuSO₄·5H₂O, 10 g/l àcid cítric); Aminoàcids: es suplementa amb aminoàcids essencials L-adenina, L-histidina, L-leucina o uracil segons el auxotròfia de la soca desitjada de 0,075 g per fer UHA, LAU, UAH, LUH, o LUAH.

2.2 Medis de cultiu de bacteris

LB (Lurian-Bertan): medi ric per al creixement de soques de bacteris, en aquest cas de les soques *E. coli* DH5α i BL21 per la sobreexpressió de proteïnes. Formada per: -10 g/l triptona; 5 g/l extracte de llevat; 10 g/l NaCl.

Les plaques es va obtenir per addició de 20 g/l d'agar. Quan va ser necessari, aquest mitjà va ser suplementat amb antibiòtics. En aquest treball s'ha utilitzat els antibiòtics ampicil·lina (Sigma A9518) (50 mg/l) i cloramfenicol (Sigma C0378) (20 mg/l).

3. Assaig de sensibilitat per dilució seriada o spots

Per fer spots primer es necessita la soca que es vol, i s'aconsegueix a través de creuaments i mutacions varies. Normalment les soques es guarden a -80 °C i es cultiva en 5 ml del medi YES en un erlenmeyer s'espera durant unes 18 hores es mesura la densitat òptica (OD), la qual marca l'estat en la corba del creixement bacterià, es fa una dilució d'aquestes per a que dintre de 7 hores estigui en estat exponencial 0,4 aproximadament, iguala un altre vegada les ODs de les diferents soques i es fa un banc de dilucions en unes plaques amb pouets, i s'inserta la *replica plater* (sigma R2508-1EA) als pouets per introduir un punt en les plaques de YES amb diferents concentracions de Lat B per a veure la sensibilitat de les diferents soques amb diferents concentracions de Lat B.

4. Creuament en massa

S'utilitza per a obtenir i seleccionar soques bacterianes, es necessari que sigui d'un tipus d'aparellament diferent, soques heterotàliques h+ o h-, i que el marcador per a la selecció també sigui diferent, pot ser una auxotròfia o una resistència a un antibiòtic. Per a saber si es h+ o h- es pot utilitzar PCR amb dos oligonucleòtids, una *forward* i altre *reverse*, o fer creuaments amb soques que ja saben el sexe. Normalment les soques s'agafen de l'*stock* de -80 °C i es descongelen en YES a 32 °C per a que tornin a créixer, després s'ajunta les dues soques en un SSA (un medi mínim) a 25 °C i entre 24-48 hores es forma espores del creuament. S'ajunta amb glusulasa i es posa en una noria unes 12-16 hores o *overnight* a 25 °C per a que digereixi la paret i alliberi les espores, una vegada acabada s'afegeix etanol per a matar totes les cèl·lules vives que no siguin espores, es fan dilucions varies, s'agafa 1ml i es sembra amb una nansa de vidre en una placa de YES a 32 °C per a que les espores creixin de nou.

Per a comprovar si són les soques que volem, simplement agafen les soques de les plaques de YES i es fa una sembra des de les colònies de nou en YES en taques separades, al final fem rèpliques amb en diferents plaques amb auxotròfia i/o antibiòtic per a seleccionar la soca desitjada.

5. Electroforesis en gel d'agar

La electroforesis per a separar i distingir DNA o RNA normalment s'usen els gels amb un percentatge de 1% d'agarosa en tampó TAE (Tris-acetat 40 mM, EDTA 1 mM), es calenta i s'aboca a la cubeta amb GelRed, una intercaladora dels àcids nucleics, com és fluorófor es pot veure en UV quan s'ha intercalat entre el DNA o RNA. El percentatge d'agarosa modula la velocitat del desplaçament, i seleccionar el percentatge depèn de la mida de l'àcid nucleic, quant més gran és s'utilitza un percentatge menor d'agarosa, i al contrari si la mida del DNA és petita seria més convenient utilitzar un gel amb una concentració major d'agarosa.

Les mostres es carreguen amb un tampó de mostra o de carga en els pouets i al posar el gel en una solució de TAE i voltatge de 100 V, com que el DNA té càrrega negativa es arrastrada cap al pol positiu (ànode) segons la mida.

6. Transformació de soques

6.1 Transformació de soques de *S. pombe*

S'utilitza la incorporació del plasmidi pREP1 de forma episomal al llevat per electroporació, pREP1 és un plasmidi utilitzat per a la sobreexpressió de proteïnes, i que té la vitamina B1 com a repressor de la transcripció.

6.2 Transformació de soques de *E. Coli*

El plasmidi que s'utilitza per a expressar la proteïna desitjada és el pGEX, té gens de selecció com la resistència a cloramfenicol i ampicil·lina.

S'incorpora el pGEX a la soca *E. coli DH5α*, la qual s'encarrega d'amplificar o multiplicar els plasmidis incorporats, aquesta soca no té gens de resistència pels antibiòtics, per això s'utilitza un medi LB amb ampicil·lina i cloramfenicol per a seleccionar les soques que han sigut transformades i hagin incorporat el plasmidi. El pGEX es treu de la soca per una tècnica de purificació de plasmidi del punt 7, un altre cop es transforma per electroporació i s'incorpora a la soca *d'E. coli BL21* especialitzada en la traducció de proteïnes, s'incorpora IPTG (isopropil β-D-tiogalactòsid) per induir la expressió dels gens per a que fabriqui la proteïna desitjada, quan en tenim de suficient es lisa la cèl·lula amb boles de cristall i *stop buffer*.

7. Extracció i purificació del plasmidi amplificat d'*E. coli*

Des de DH5α de *E. coli* es fa una purificació per a quedar-se només amb el plasmidi desitjat mitjançant el protocol de *NucleoSpin® Plasmid protocol, Isolation of high-copy plasmid DNA from E. coli* de l'empresa Macherey-Nagel. Primer es fa una centrífuga, es tira el medi i ens

quedem amb el pellet on està les cèl·lules, es redissol en un medi amb RNAsa per a que només es quedi el DNA, es trenca la cèl·lula amb una lisis buffer i el SDS desplega les proteïnes, tot seguit es neutralitza els enzims i SDS, es dona una centrifuga on el plasmidi es queda en el líquid. El líquid s'elueix en una columna, on el DNA s'hi uneix, s'afegeix alcohol per a que precipiti el DNA i rentar la columna, es seca amb una centrifuga i al final s'elueix el DNA de la membrana amb aigua amb una última centrifuga.

8. Extracció de proteïnes

8.1 Extracció de proteïnes de *E. coli* amb *Stop Buffer*

Es centrifuga i es tira el medi, el pellet es redissol en 1 ml de STOP buffer (150 mM NaCl, 50 mM NaF, 10 mM EDTA, 1 mM Na₃N), es centrifuga i el pel·let es pot conservar a -80 °C. Es resuspèn el pellet en 200 µl de tampó de lisi (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 0,1% Triton X-100, 10% Glicerol, 50 mM NaF) amb inhibidors de proteases i de fosfatases (1 mM PMSF, 1mg/ml Aprotinina, 1 mg/ml Leupeptina, 1 mM Na₂VO₃) i s'afegeixen boles de vidre i es deixa 30 segons en una agitadora amb 90 segons de descans unes 10 vegades, es mira al microscopi si estan trencades i es separa de les boles de cristall, es fa una centrifuga i se separa les proteïnes, que es queda a l'extracte líquid per una futura purificació en el punt 13.

8.2 Extracció de proteïnes de *S. pombe* per sonicació

Es centrifuga i es treu el medi, congelar a -80 °C per ajudar a lisar les cèl·lules, es resuspèn amb Buffer NETN (20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% NP-40 (o Igepal)), per trencar la membrana es sonica uns segons amb descansos curts per a no calentar-se. Es mira al microscopi per comprovar si estan trencades, es fa una centrifuga i se separa les proteïnes, que es queda a l'extracte líquid per a una futura purificació explicada en el punt 13.

9. Quantificació de proteïnes: mètode Lowry

El mètode lowry es basa en la quantificació de l'absorbància a 750nm de longitud d'ona dependent del canvi de color que sofreix la proteïna quan un reactiu químic reacciona amb els enllaços peptídics, i com a patró s'utilitza diferents concentracions d'una proteïna coneguda com la BSA (albúmina sèrica bovina).

La reacció de Biuret, que està formada de grups aminopeptídics, amb les qual el Cu (II) forma enllaços de coordinació originant complexos de color violeta.

La reacció de Folin-Ciocalteu: que té grups reductors -OH, juntament amb els complexos cuproteínics de la reacció de Biuret redueixen el reactiu de Folin, que vira a blau obscur. L'espectre d'absorció del reactiu Folin reduïda és proporcional a la de proteïnes en la mostra.

10. Electroforesis de Proteïnes

La electroforesis mitjançant gel de SDS-poliacrilamida serveix per a separar les proteïnes segons la mida d'aquesta on al incorporar SDS les càrregues negatives neutralitzen les positives de les proteïnes. La concentració de la poliacrilamida determina la porositat i la velocitat de separació, amb la mateixa idea que en el gel d'agarosa, per separar les proteïnes grans una petita concentració i separar proteïnes petites s'usa gels amb una alta concentració poliacrilamida. S'usa el PSA (persulfat amònic) i el TEMED com a catalitzadors de la iniciació de la polimerització de l'acrilamida.

El gel està formada per dues capes, la primera la que està dalt és el gel *stacking*/empaquetador, amb una concentració molt petita de poliacrilamida (3,6%), serveix per a que les mostres s'apilin en la mateixa franja horitzontal i després el gel *resolving*/resolutiu, amb una major concentració, entre 6-15 %, que s'encarrega de separar les proteïnes. Les mostres es carreguen al gel amb tampó de mostra 4x (40 mM fosfat sòdic pH 7,0, 0,40%, glicerol, 10% SDS, 0,2% DTT, blau de bromofenol). El gel ha d'estar submergit en tampó electròlit (25 mM Tris-HCl, 192 mM, glicina, 0,1% SDS, pH 8,3) i es corre el gel desde 80 a 120 V a temperatura ambient.

11. Tinció de proteïnes

11.1 Tinció Coomassie Blue

És una tinció de les bandes de proteïnes separades del gel de poliacrilamida, la solució de *Coomassie Blue* (2,5 mg/ml *Coomassie Blue* (G-250, Sigma B0770), 45% metanol, 10% àcid acètic) es deixa uns 5 minuts en agitació a temperatura ambient, més tard s'afegeix la solució destenyidora (de 87,5 % H₂O, 5% de metanol i 7,5 d'àcid acètic) durant 30 minuts per a eliminar l'excés del colorant. Més tard si es vol destenyir més l'excés es pot deixar en agitació constant amb destenyidor *overnight*.

11.2 Tinció Ponceau

És una tinció reversible de les bandes de proteïnes en les membranes de nitrocel·lulosa, es fàcilment rentat amb aigua, i serveix com a comprovació per la posterior immunodetecció. Tinció més feble que la de *Coomassie Blue*.

12. Electrotransferència/inmunodetecció/*western blot*

La electrotransferència es basa en la migració de les proteïnes del gel de poliacrilamida en una membrana de nitrocel·lulosa mitjançant un camp elèctric, on la membrana està en el costat positiu i rep les proteïnes del gel del costat negatiu. La membrana s'ha d'haver hidratat, s'usa el tampó de transferència (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM glicina, 0,02% SDS, 20% etanol) ja que després en la transferència s'utilitza aquest tampó. Es monta el sistema se li aplica un camp elèctric de 2 hores a 60 V, 1:30 hores a 70 V o *overnight* a 20 V, sempre a 4 °C.

La immunodetecció es basa en una detecció indirecta: un anticòs primari detecta i s'enganxa a la proteïna o un epítop d'aquesta, aleshores es fica un anticòs secundari que reconeix una regió constant de l'anticòs primari i allibera una senyal. La finalitat de l'anticòs secundari és la amplificació de la senyal, té un enzim que emet llum quan es posa en contacte amb un sistema de detecció EZ-ECL (Chemiluminescence Detection Kit for HRP, de Biological Industries).

Els passos a seguir són: **1:** Hidratar la membrana amb etanol, rentar amb aigua destil·lada i TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl). **2:** Bloquejar la membrana amb una solució del 5% de llet o BSA en TBST (TBS + 0,05 de Tween-20) durant 1 hora, el que s'aconsegueix és que les proteïnes de la llet o BSA s'enganxin a les *sticky proteins* i que la senyal de l'anticòs primari sigui més específica. **3:** Incubació de la membrana amb la solució de l'anticòs primari (2,5% de llet en pols dissolta en TBS-T) *overnight* a 4 °C a agitació constant. **4:** 3 cicles de rentat amb TBST de 8 minuts. **5:** Incubació de la membrana amb la solució de l'anticòs secundari (2,5% de llet en pols dissolta en TBS-T) durant 1 hora a temperatura ambient i agitació constant. **6:** 3 cicles de rentat amb TBST de 8 minuts. **7:** 1 rentat de TBS 5 minuts. **8:** Desplegar el líquid EZ-ECL a la membrana i captar l'quimioluminescència en una pel·lícula fotogràfica (Fuji Medical X-Ray filme, de Fujifilm).

13. Purificació de proteïnes

13.1 Purificació de proteïnes per immunoprecipitació

Quan s'extrau una proteïna d'una sòca volem i la volem purificar s'utilitza *beads* unides covalentment amb un anticòs que s'uneixi la proteïna que volem purificar. Els passos a seguir seran:

-En primer lloc s'agafa l'extracte de l'extracció de la cèl·lula i es barreja amb les *beads* enganxades amb l'anticòs *overnight* a 4 °C en agitació contínua. A continuació se separa el pellet, que són les *beads* unida a la proteïna desitjada i la part líquida anomenada *flowthrough*. S'afegeix SDS i redueix l'enllaç S=S per desplega la proteïna cosa que fa que perdi la conformació en 3D i probablement la unió anticòs-proteïna. Fer un *western blot* per detectar la proteïna.

13.2 Purificació de proteïnes per GST (glutatió S transferasa)

S'expressa proteïnes del plàmid pGEX-KG que permet fusionar l'epítot GST a la part N-terminal de la proteïna desitjada mitjançant la soca bacteriana *E. coli* BL21.

La proteïna es purifica de l'extracte lliat de la cèl·lula en una columna de resina de glutatió-sefarosa, se centrifuga i es neteja dues vegades amb NETN i una amb NET, s'elueix la proteïna de la columna afegint un tampó d'elució (50 mM Tris-HCl pH 8,5, 100 mM NaCl, 10 mM Glutatió, 2 mM DTT) i incubant 30 minuts en agitació constant a 4 °C, després guardar el sobrenedant, es pot repetir dues vegades per obtenir una segona alíquota de sobrenedant.

Les proteïnes es poden guardar a -80 °C o fer un *western blot*.

14. Assaig quinasa *in vitro*

La intenció de l'assaig quinasa *in vitro* és la de determinar si una proteïna és un substrat d'una determinada quinasa. Els extractes purificades de les proteïnes d'aquest treball s'han obtingut d'*E. coli*, tant el substrat com la quinasa per GST. El mix de la reacció està composta de:

- 2µg Substrat, 1µg quinasa, 3µl tampó quinasa 10x (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM MgCl₂, 5 mM β-mercaptoetanol), 3µl ATP (2,5 mM), 0,2 µl [γ³²-P] ATP i aigua qsp 30 µl.

La incorporació del ATP radioactiu es fa en una càmara especial, es cultiva 30 minuts a 30 °C de temperatura i es para amb l'adició de 10 ml de tampó de mostra 4x. Es corre en gel de poliacrilamida i es tenyeix amb *Coomassie Blue*. A continuació es deixa el gel sobre un paper *Whattman* i es detecta la radiació, es visualitza per *Thyphoon phospho-images* (BioRad).

RESULTATS

1. Anàlisi de la relació funcional entre *Srk1* i *Lsk1*.

Per tal d'estudiar la relació funcional entra les quinases *Srk1* i *Lsk1*, vérem realitzar una anàlisi genètic que consisteix en un assaig de sensibilitat.

Tal com, s'ha indicat a la introducció i antecedents, tant la delecció de la *Srk1* ($\Delta srk1$) com la *Lsk1* ($\Delta lsk1$) son sensibles a la latruculina (Lat B), amb l'assaig de sensibilitat volíem veure si la funció *Srk1* i *Lsk1* en la resposta a Lat B estava en la mateixa via o en vies independents.

Les soques *wt*, $\Delta lsk1$, $\Delta srk1$, i doble mutant $\Delta lsk1\text{-}\Delta srk1$ es varen diluir en *spots* (veure material i mètodes) en plaques de YES amb i sense Lat B (Fig. 1). S'observa que totes les soques tenen un creixement similar en YES, però en la placa amb Lat B es veu sensibilitat en $\Delta srk1$, de $\Delta lsk1$ i s'observa que el doble mutant presenta una sensibilitat igual que el mutant senzill $\Delta lsk1$. Per tant, es podria dir que la via de *Srk1* i *Lsk1* és la mateixa ja que el doble mutant té una sensibilitat igual $\Delta lsk1$. Si el doble mutant, hagués estat més sensible que els mutants simples hagués volgut dir que la *Srk1* i la *Lsk1* en vies paral·leles en quant a la estabilitat del CAR.

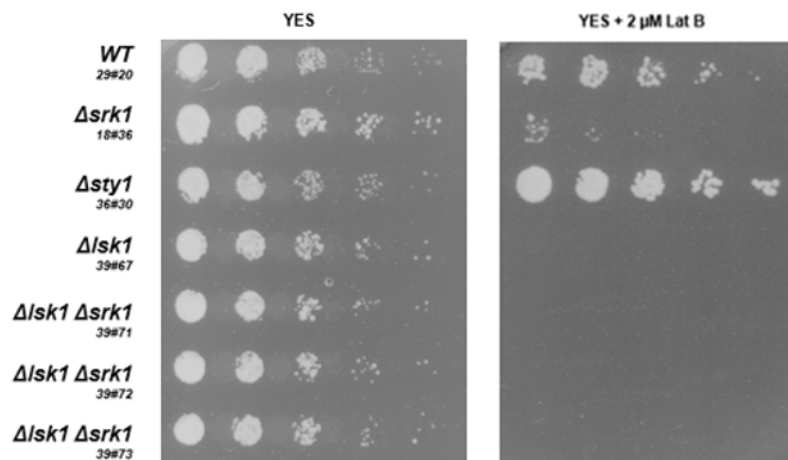


Figura 1. Dil·lució seriada de diferents soques en YES i en YES + 2 microM de Lat B cultivades a 32 °C.

2. Comprovació de la unió *in vivo* entre *Srk1* i *Lsk1*.

La quinasa *Lsk1* es va identificar en un anàlisi proteòmic de proteïnes d'unió a *Srk1* per tan, volíem comprovar aquesta unió *in vivo*. Per tal de poder analitzar la unió, vàrem fusionar al gen endogen de la *Lsk1* un epítoc myc (contra el qual hi han anticossos específics) en una soca que presentava el gen de la *srk1* fusionat a l'epítoc HA (contra el qual també hi ha anticossos comercials).

La figura 2 mostra com en la soca *Lsk1*-myc *srk1*-HA es detecten els nivells endògens de les dues proteïnes.

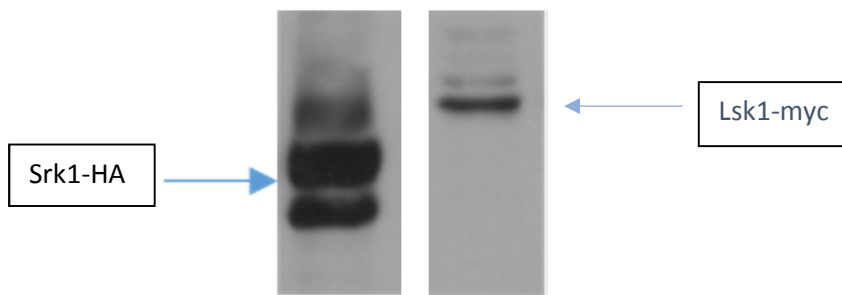


Figura 2. Nivells endògens de la Srk1-HA i la Lsk1-myc.

Seguidament es va prosseguir amb la immunoprecipitació de la Srk1-HA emprant anticossos anti-HA i detectant la unió de la Lsk1 a través de *Western blot* emprant anticossos anti-myc. Malauradament, no es mostren resultats d'aquest assaig doncs, hem tingut problemes amb la immunoprecipitació. Per tant, aquest assaig està pendent.

3. Es Lsk1 substrat de Srk1?

En aquest estudi es volia saber si Srk1 fosforilava la quinasa Lsk1. La Srk1 presenta el següent consensos de fosforilació: RXXS/T. El primer pas va ser analitzar si la quinasa Lsk1 presentava consensos de fosforilació per la Srk1. Tal com s'observa en la figura 3, la Lsk1 presenta molts llocs de fosforilació per Srk1, per tal de poder acotar el domini de fosforilació vàrem dividir la proteïna en dues parts que vàrem anomenar Lsk1-N (1-195 AA) i la Lsk1-C (271-593 AA). Es volia saber exactament on podria la Srk1 fosforilar la Lsk1 i es va dividir la proteïna en dues parts la N-terminal i C-terminal de la seqüència següent:

MSYSKSTIYRRQGT^{EPNSHFRR}TVEEKSQLSGTNEESLGGHTLSSNAFKNNSSSI^{SPSSSAKDPREQRKR}
^{TFPLNDTHSSRARQHERPFRSRKSRRRK}GKKAFSP^{RPGS}PPSPSFY^{RSQS}QKRARNLT^{TKDYFAKRSESS}
^{SSASVSPISPSANR}ND^{SKRQASSFRRSPPSSVHMKPSAFNGRKVS}RRPSS^{SPPPIPSIPHETTSSDTQKK}
^{SSVSSGF}PENKHGKFHFHIPNERRSRFDQPPSKRMALTSTARESVAPLPSPPSGPIYTYTPKPAYEKI
^{DQIGEGTYGKVYK}AINVTVTGDLVALKRIRLEQEKGDFPITTVREVKILQRLRHKNIVRLLEIMVEKSSVY
^{MVFEYMDHDLTG}VLLNSQLHFTPGNIKHL^{SKQIFEALAYLHHRGVLHRDIKGSNILLNNNGDLKFADFGL}
^{ARFNT}SSKSANYTN^{RVITL}WFRPPELLLGETAYDTAVDIWSAGCIVMELEFTGKPFQGRDEISQLEVIYD
^{MMGTPDVH}SWPEVKNL^{PWYELLKPVEEKSRFVET}FKEILSPAAILDLCQKLLALNPFCRPSAHETLMHEY
^{FTSESPPPEPAVILKNMQGSWHEWESKKR}SKR

Figura 3. Seqüència proteica de Lsk1. Els consensos de fosforilació per la quinasa Srk1 estan marcats en groc. La seqüència subratllada correspon a la Lsk1-N i la no subratllada en cursiva a la Lsk1-C.

Les dues seqüències, Lsk1-N i Lsk1-C es varen clonar i fusionar a la proteïna GST per tal de ser expressades i purificades en *E. coli* (veure material i mètodes).

També varem intentar expressar i purificar la proteïna sencera GST-LSk1 però l'expressió va ser molt baixa i no es va poder purificar.

Un cop tenim les proteïnes purificades, es va realitzar l'**assaig de fosforilació *in vitro*** amb les proteïnes Lsk1 i la Srk1. En la figura 4 s'observa que la Srk1 fosforila la GST-Lsk1-N però no la GST-Lsk1-C.

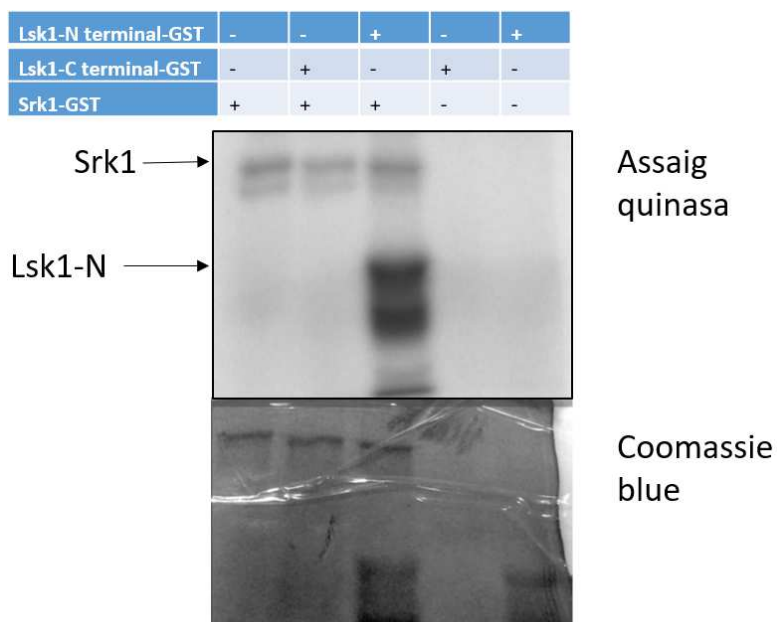


Figura 4.. Assaig de fosforilació *in vitro* entre Srk1 i Lsk1 .

DISCUSSIÓ

El propòsit general del projecte era analitzar la relació funcional entre la quinasa *Srk1* i *Lsk1*, identificada com a proteïna d'unió a *Srk1* en estudis proteòmics.

En l'**assaig de sensibilitat**, hem observat que les dues proteïnes *Lsk1* i *Srk1* estan en la mateixa via ja que, el doble mutant $\Delta lsk1-\Delta srk1$ té la mateixa sensibilitat que la $\Delta lsk1$, la soca més sensible dels dos en Lat B.

En l'**assaig quinasa *in vitro*** es pot veure que la *Srk1* fosforila la *Lsk1* en N-terminal, però s'hauria de fer una segona prova, ja que en aquest primer assaig sembla que hi ha menys proteïna GST-*Lsk1*-C que GST-*Lsk1*-N i per tant el resultat, encara que es satisfactori, s'ha de corroborar.

La *Lsk1*-N terminal es el domini de la *Lsk1* que presenta mes residus consensos de fosforilació per *Srk1* (8 residus). Per tant, un cop comprovat que la *Srk1* fosforila la *Lsk1*-N terminal, s'haurien de mutar els llocs de fosforilació de *Lsk1* a alanina (*Lsk1*-7A) i substituir el gen endogen *lsk1* pel mutat *lsk1*-7A. Un cop creada la soca *lsk1*-7A es podria analitzar l'efecte d'aquesta mutació en l'organització del citosquelet d'actina, en assajos de sensibilitat amb Lat B..

També s'han de repetir l'assaig d'immunoprecipitació per comprovar la unió *in vivo* entre *Srk1* i *Lsk1*.

Un altre dels estudis futurs, es l'anàlisi de fosforilació de *Lsk1* per *Srk1* *in vivo*. Per aquest estudi es compararia la proteïna *Lsk1* de cèl·lules normals i cèl·lules que sobreexpressen la *Srk1*, per analitzar modificacions de mobilitat proteica degudes a fosforilació i detectades per western blot. Un mètode alternatiu per identificar la fosforilació de *Lsk1* *in vivo* per *Srk1*, seria immunoprecipitar *Lsk1* de cèl·lules normals i cèl·lules $\Delta srk1$ i realitzar un *western blot* emprant un anticòs anti-P *Srk1* substrats (anticòs que detecta proteïnes que han sigut fosforilades per la *Srk1*).

CONCLUSIONS

- L'anàlisi genètic de sensibilitat a Lat B indiquen que les quinases *Srk1* i *Lsk1* estan en la mateixa via funcional, i sembla que *Lsk1* és dominant a la pèrdua de *Srk1*.
- *Srk1* fosforila al *Lsk1* en el domini N-terminal *in vitro*, tot i que no es pot afirmar totalment, és necessari repetir els experiments.
- No s'ha pogut comprovar si hi ha unió entre *Srk1* i *Lsk1* *in vivo*. S'han de repetir els experiments canviant les condicions.

BIBLIOGRAFIA

- Almonacid M, Moseley JB, Janvire J, Mayeux A, Fraissier V, Nurse P, Paoletti A. (2009). Spatial Control of Cytokinesis by Cdr2 Kinase and Mid1/Anillin Nuclear Export. *Curr Biol* 19, 961-6.
- Almonacid M, Celton-Morizur S, Jakubowski JL, Dingli F, Loew D, Mayeux A *et al* (2011). Temporal control of contractile ring assembly by Plo1 regulation of myosin II recruitment by Mid1/anillin. *Curr Biol* 21: 473-479.
- Aravind, L., Watanabe, H., Lipman, D. J., & Koonin, E. V. (2000). Lineage-specific loss and divergence of functionally linked genes in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(21), 11319-24.
- Chen C-T, Feoktistova A, Chen J-S, Shim Y-S, Clifford DM, Gould KL *et al* (2008). The SIN Kinase Sid2 Regulates Cytoplasmic Retention of the *S. pombe* Cdc14-like Phosphatase Clp1. *Current Biology* 18: 1594-1599.
- Daga RR, Chang F (2005). Dynamic positioning of the fission yeast cell division plane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8228-8232.
- Dekker N, Speijer D, Grun CH, van den Berg M, de Haan A, Hochstenbach F (2004). Role of the alpha-glucanase Agn1p in fission-yeast cell separation. *Mol Biol Cell* 15: 3903-3914.
- Dischinger S, Krapp A, Xie L, Paulson JR, Simanis V (2008). Chemical genetic analysis of the regulatory role of Cdc2p in the *S. pombe* septation initiation network. *J Cell Sci* 121: 843-853.
- Dunphy WG (1994). The decision to enter mitosis. *Trends in cell biology* 4: 202-207.
- Featherstone C, Russell P (1991). Fission yeast p107wee1 mitotic inhibitor is a tyrosine/serine kinase. *Nature* 349:808-811.
- Fisher DL, Nurse P (1996). A single fission yeast mitotic cyclin B p34cdc2 kinase promotes both S-phase and mitosis in the absence of G1 cyclins. *EMBO J* 15: 850-860.
- Gaits F, Russell P (1999). Active nucleocytoplasmic shuttling required for function and regulation of stress-activated kinase Spc1/Styl in fission yeast. *Mol Biol Cell* 10: 1395-1407.
- Gould KL, Nurse P (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* 342: 39-45.
- Gómez Hierro, Alba (2012). Caracterización funcional de la quinasa *Srk1* en la respuesta a Latrunculina B y de la quinasa *Ssp1* en el crecimiento bipolar en *Schizosaccharomyces pombe*. Tesis doctoral. Departamento de Biología Celular, Inmunología y Neurociencias de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona, Barcelona, España.
- Hoffman, C. S., Wood, V., & Fantes, P. A. (2015). An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System. *Genetics*, 201(2), 403-23.
- Huang Y, Chew TG, Ge W, Balasubramanian MK (2007). Polarity determinants Tea1p, Tea4p, and Pom1p inhibit division-septum assembly at cell ends in fission yeast. *Dev Cell* 12: 987-996.

- Huang Y, Yan H, Balasubramanian MK (2008). Assembly of normal actomyosin rings in the absence of Mid1p and cortical nodes in fission yeast. *J Cell Biol* 183: 979-988.
- Karagiannis, J., Bimbó, A., Rajagopalan, S., Liu, J., & Balasubramanian, M. K. (2005). The nuclear kinase Lsk1p positively regulates the septation initiation network and promotes the successful completion of cytokinesis in response to perturbation of the actomyosin ring in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular biology of the cell*, 16(1), 358-71.
- Kovelman R, Russell P (1996). Stockpiling of Cdc25 during a DNA replication checkpoint arrest in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 16: 86-93.
- Lopez-Aviles S, Grande M, Gonzalez M, Helgesen AL, Alemany V, Sanchez- Piris M *et al* (2005). Inactivation of the Cdc25 phosphatase by the stress-activated Srk1 kinase in fission yeast. *Molecular cell* 17: 49-59.
- Lopez-Aviles S & Lambea E., Moldon A, Grande M, Fajardo A, Rodriguez-Gabriel MA, Hidalgo E *et al* (2008). Activation of Srk1 by the mitogen-activated protein kinase Sty1/Spc1 precedes its dissociation from the kinase and signals its degradation. *Mol Biol Cell* 19: 1670-1679.
- Lord, M., Sladewski, T. E., & Pollard, T. D. (2008). Yeast UCS proteins promote actomyosin interactions and limit myosin turnover in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(23), 8014-9.
- Maribel Sánchez-Piris, Francesc Posas, Vicenç Alemany, Ingeborg Winge, Elena Hidalgo, Oriol Bachs, and Rosa Aligue (2002). The Serine/Threonine Kinase Cmk2 Is Required for Oxidative Stress Response in Fission Yeast. *J. Biol. Chem.* 277: 17722.
- Marta Sanchez-Marinás , David Gimenez-Zaragoza , Edgar Martin-Ramos , Julia Llanes , José Cansado , Maria Jesús Pujol , Oriol Bachs , Rosa Aligue (2018). Cmk2 kinase is essential for survival in arsenite by modulating translation together with RACK1 orthologue Cpc2 in *Schizosaccharomyces pombe*. *Free Radical Biology and Medicine* Vol 129, Dec 2018, 116-126.
- Martin SG, Berthelot-Grosjean M (2009). Polar gradients of the DYRK-family kinase Pom1 couple cell length with the cell cycle. *Nature* 459: 852-856.
- Morrell JL, Tomlin GC, Rajagopalan S, Venkatram S, Feoktistova AS, Tasto JJ, Mehta S, Jennings JL, Link A, Balasubramanian MK, Gould KL. (2004). Sid4p-Cdc11p assembles the septation initiation network and its regulators at the *S. pombe* SPB. *Curr Biol.* 14(7):579-84.
- O'Connell MJ, Raleigh JM, Verkade HM, Nurse P (1997). Chk1 is a Wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting Cdc2 by Y15 phosphorylation. *EMBO J* 16: 545-554.
- Ohmiya R, Kato C, Yamada H, Aiba H, Mizuno T (1999). A fission yeast gene *prp1+* that encodes a response regulator implicated in oxidative stress response. *Journal of biochemistry* 125: 1061-1066.

-Pilar Sala, Mario (2009). Estudio de la proteína Pxl1 como moduladora de las GTPasas de la familia Rho y su participación en el proceso de citocinesis en *Schizosaccharomyces pombe*. Tesis doctoral. Departamento de microbiología y genética de la Universidad de Salamanca. Salamanca, España.

-Roberts-Galbraith RH, Chen JS, Wang J, Gould KL (2009). The SH3 domains of two PCH family members cooperate in assembly of the *Schizosaccharomyces pombe* contractile ring. *J Cell Biol* 184: 113-127.

-Sipiczki M. (2000). Where does fission yeast sit on the tree of life?. *Genome biology*, 1(2), REVIEWS1011.

-Sukegawa Y., Yamashita A., Yamamoto M. (2011). The fission yeast Stress-Responsive MAPK pathway promotes meiosis via the phosphorylation of Pol II CTD in response to environmental and feedback cues. *PLoS Genetics*, 7 (12) , art. no. e1002387

-Trautmann S, McCollum D (2005). Distinct nuclear and cytoplasmic functions of the *S. pombe* Cdc14-like phosphatase Clp1p/Flp1p and a role for nuclear shuttling in its regulation. *Curr Biol* 15: 1384-1389.

-Wu JQ, Sirotkin V, Kovar DR, Lord M, Beltzner CC, Kuhn JR et al (2006). Assembly of the cytokinetic contractile ring from a broad band of nodes in fission yeast. *J Cell Biol* 174: 391-402.