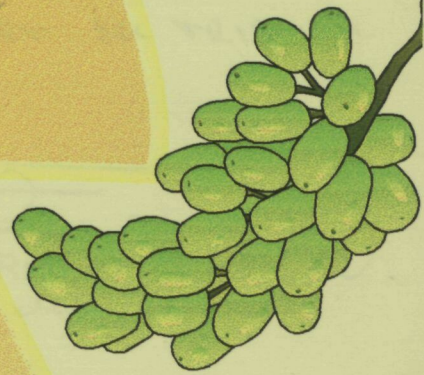
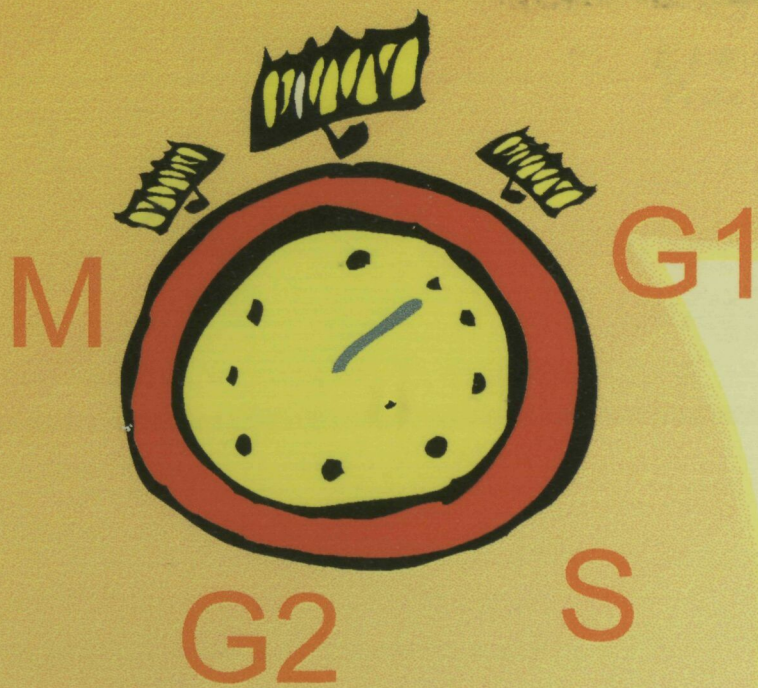
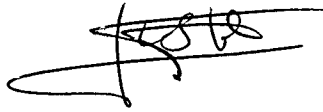


Control del Cicle Cel·lular de *Saccharomyces cerevisiae* per Nutrients



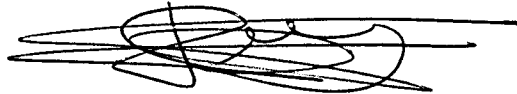
(043)
"1998"
COL

Lleida, 1998



JUAN CARLOS IGUAL GARCIA

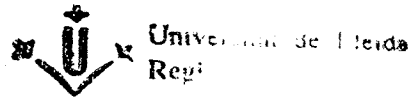
SECRETARIO DEL TRIBUNAL



ENRIQUE HERRERO PERPIÑAN
President del Tribunal



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

RESUM

Els nutrients són els factors tròfics més importants per al llevat, i la seva limitació provoca una aturada del cicle en la fase G1. Aquesta resposta d'adaptació als canvis nutricionals del medi assegura la màxima viabilitat de la cèl·lula, i permet l'inici de diferents processos de diferenciació segons les condicions nutricionals.

El cicle cel·lular de *Saccharomyces cerevisiae* està regulat en diferents punts per mecanismes de control intern que assegurin la proliferació sense cap anomalia en els diferents processos cel·lulars. Al final de la fase G1, si les condicions nutricionals són òptimes, es dona el compromís de continuar el cicle fins a la propera fase G1. La via de senyalització de la limitació de nutrients essencials com la font de nitrogen encara no havia estat determinada. Hem estudiat la regulació de les ciclines de fase G1 en el model de limitació de font de nitrogen, i hem demostrat que la proteïna Cln3 està regulada post-transcripcionalment de dues formes diferents: una major inestabilitat que depèn de la via de la ubiquitina, i una inhibició traduccional que provoca la total desaparició de Cln3, causant així la repressió de gens dependents de SBF i MBF en la següent fase G1. La presència de Sic1, l'inhibidor de complexos Clb/Cdc28, permet explicar en termes moleculars l'aturada en G1.

En condicions de limitació nutricional les cèl·lules diploides també s'aturen en G1, però inicien un procés diferenciador anomenat meiosi, que implica la replicació del DNA, dues divisions meiótiques i la formació d'espores com a unitats de resistència a condicions adverses. La proteïna Ime1 és la principal inductora de tots els processos de meiosi i activa l'expressió del primer grup de gens que participen en la replicació premeiótica del DNA. En aquest treball mostrem que, en les condicions nutricionals en que es dona la meiosi, les ciclines G1 desapareixen ràpidament, però d'altra banda es produeix una alta expressió de *CLB5* que depèn d'Ime1. Els nivells de Sic1 disminueixen, de manera també dependent d'Ime1, el que indica un mecanisme de regulació d'entrada en la fase S premeiótica molt semblant al cicle mitòtic, però induït per Ime1 enlloc de Cdc28/Cln3. En mutants *cln* la meiosi pot iniciar-se en medi ric, el que implica a les ciclines G1 com a mediadores d'un senyal nutricional sobre l'inici de la meiosi. Les ciclines G1 inhibeixen la via Ime1 mitjançant dos controls negatius: repressió transcripcional d'*IME1*, i inhibició de l'acumulació en el nucli d'Ime1, reprimint així l'expressió del gens meiótics. Aquests resultats demostren l'existència d'un control negatiu dels activadors clau de la mitosi sobre els de la meiosi, fent que aquestes dues opcions del cicle cel·lular siguin incompatibles.

AGRAÏMENTS

Voldria donar les gràcies a tothom per l'interès que han tingut i l'ànim que sempre m'han donat, i especialment:

Als directors d'aquesta tesi, la Carme i el Martí, per fer-la possible, per la meva formació, el seu exemple i ajut en tot.

A l'Enric per donar-me l'oportunitat de començar en aquesta feina, per la meva formació, el seu exemple i interès, no només en la feina.

A la Carme pel seu exemple com a científica i com a persona, que sempre procuraré seguir i el seu ajut infinit.

Al Martí per donar-me l'oportunitat de començar, pel seu ajut infinit i el seu exemple, que em fa desitjar millorar cada dia.

A l'Eloi pel seu exemple i ajut en la feina, i per ser tan bon company, sempre disposat a escoltar.

A la M^a Angeles pel seu ajut, aquí i des de Londres, pel seu interès, els seus consells i amistat.

A la Gemma pel seu ajut i consells en la feina i en moltes altres coses, en fi, per ser tan bona amiga.

A la Lúdia pel seu gran treball, el seu ajut i tants favors.

A la Maite pel seu ajut en la feina i el seu interès.

A la Cèlia pel seu ajut, sobretot quan vaig començar, i el seu interès i ànim.

A la Carme Espinet pel seu ajut durant el meu primer any i el seu interès i ànim.

A les famílies de la Carme i del Martí per disculpar les sessions nocturnes de tesi on els tenia segrestats.

Als meus amics i companys, que sempre m'han animat a seguir, pel seu interès i amistat total i per acompanyar-me en el dia que passaré més nervis.

Als meus pares, al meu germà i al Xavi per la seva companyia, pel seu ajut, interès i per entendre com d'important és aquesta feina per a mi. I també al Xavi, per les seves esperes a la facultat.

Moltes gràcies a tothom del departament.

Als amics que han marxat.

ÍNDEX

I. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

1. INTERACCIONS AMB EL MEDI EXTERN I-1
 - 1.1. Canvis i adaptació
 - 1.2. L'adaptació suposa normalment una aturada transitòria en la fase G1
2. EL CICLE CEL·LULAR DE *Saccharomyces cerevisiae* I-1
 - 2.1. Fases del cicle cel·lular i *Checkpoints* (punts de control intern)
 - 2.2. Transició G1-S
3. REGULACIÓ DE LA PROLIFERACIÓ I DEL CICLE CEL·LULAR PER SENYALS EXTERNES I-7
 - 3.1. Control per feromones
 - 3.2. Senyals nutricionals
 - 3.3. Aturada en fase G1 per limitació nutricional
4. MEIOSI I-11
 - 4.1. Requeriments per la meiosi
 - 4.2. Fases de la meiosi i gens implicats
 - 4.3. Control de l'inici de meiosi
5. OBJECTIUS I-19

II. RESULTATS

1. *The Cln3 cyclin is down-regulated by translational repression and degradation during the G₁ arrest caused by nitrogen deprivation in budding yeast*
2. *Lumi-imagine! Direct quantification of chemiluminescent signals*
Quantificació directa de *westerns* per quimioluminiscència
3. *G₁ cyclins block the Ime1 pathway to make mitosis and meiosis incompatible in budding yeast.*

III. DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

1. CONTROL DEL CICLE CEL·LULAR HAPLOIDE PER LIMITACIÓ DE NITRÒGEN III-1
 - 1.1. Inhibició específica de les ciclines en condicions de limitació de nitrogen
 - 1.2. Estudi del 5'UTR del mRNA de *CLN3*
 - 1.3. Control de transport nuclear del mRNA de *CLN3*
 - 1.4. Control per degradació de les ciclines de fase G1
 - 1.5. Altres factors importants de l'aturada en la fase G1 del cicle en condicions de limitació nutricional
2. CONTROL DEL CICLE CEL·LULAR DIPLOIDE PER LIMITACIÓ DE NUTRIENTS III-7
 - 2.1. Control transcripcional d'*IME1*
 - 2.2. Control post-transcripcional d'*IME1*
 - 2.3. Entrada en la fase S premeiòtica
3. CONCLUSIONS III-13

IV. BIBLIOGRAFIA

**INTRODUCCIÓ
i OBJECTIUS**

1. INTERACCIONS AMB EL MEDI EXTERN

1.1. Canvis i adaptació

Els organismes unicel·lulars depenen exclusivament de les condicions del medi on creixen. Han de percebre els canvis que es produeixen i respondre per tal d'adaptar-se a les noves condicions. Una resposta inadequada podria suposar la pèrdua de viabilitat. En els organismes multicel·lulars l'organització en teixits ha fet desenvolupar una sèrie de mecanismes per enviar i distribuir senyals tròfics que també controlen canvis interns. La resposta als canvis pot ser a més llarg termini que en un organisme unicel·lular (o bé en els organismes multicel·lulars més senzills), però igual d'important per a la supervivència. Un organisme unicel·lular ha de respondre immediatament a qualsevol canvi, sobretot si és pernicios pel seu creixement.

1.2. L'adaptació suposa normalment una aturada transitòria en la fase G1

En *Saccharomyces cerevisiae* la resposta d'adaptació a canvis forts en les condicions ambientals provoca una aturada en la fase G1 del cicle. Això ha estat descrit per respostes a diferents estresos, com poden ser altes concentracions de sal en el medi (xoc osmòtic) i altes temperatures (xoc tèrmic). Per a tractaments lesius del DNA s'han descrit alguns intermediaris de les vies de senyalització i que l'aturada en fase G1 és conseqüència de la inhibició transitòria del cicle cel·lular (Sidorova and Breden, 1997).

Es coneix la via que regula l'aturada transitòria en fase G1 de cèl·lules haploides deguda a la detecció de feromones sexuals en el medi, que indiquen la presència de cèl·lules amb el tipus sexual oposat (Herskowitz, 1995). Aquesta aturada és necessària per a que es doni la conjugació entre ambdós tipus de cèl·lules.

La limitació nutricional també provoca l'aturada en fase G1, però si aquesta limitació és manté ja no es torna a recomençar el cicle mitòtic. Se sap molt poc de la senyalització de la falta de nutrients i del mecanisme que provoca l'aturada en fase G1, encara que es pot suposar que es regulen d'alguna forma els gens de cicle cel·lular, tal com passa en els casos descrits abans.

Tots aquests exemples acoblen la proliferació i el cicle cel·lular, de forma que s'assegura la viabilitat amb la continuació del cicle només en condicions aptes pel creixement.

2. EL CICLE CEL·LULAR DE *Saccharomyces cerevisiae*

2.1. Fases del cicle cel·lular i *Checkpoints* (punts de control intern)

En la figura I-1 podem veure les diferents fases del cicle cel·lular eucariota. Durant la fase G1 es dona el creixement de la cèl·lula fins arribar a una grandària apropiada per a la divisió. En la fase S (síntesi) es dona la replicació del DNA i simultàniament l'inici de la gemació. La gema s'origina per un punt de creixement polaritzat, predeterminat. Aquest creixement passa a ser isotròpic, fent créixer la gema en totes direccions, al final de fase S i durant mitosi, quan es divideix la dotació cromosòmica ja replicada en dues fraccions idèntiques entre la cèl·lula mare i la cèl·lula en formació. Al final de mitosi se separen, originant una cèl·lula filla de grandària més petita que la mare.

En cada fase la única quinasa dependent de ciclins (Cdk) implicada en el cicle cel·lular que té *S. cerevisiae* ha d'acomplexar-se amb les diferents subunitats reguladores que són les ciclins. Els esdeveniments de cada fase són regulats pels complexos ciclina/Cdk, que activen la transcripció de gens de cicle i la realització de

molts processos que fan avançar el cycle. La síntesi seqüencial de diferents ciclins i la seva destrucció en determinats moments del cycle regula l'especificitat de substrat de la quinasa i les seves funcions (Lew *et al.*, 1997) (veure figura I-2).

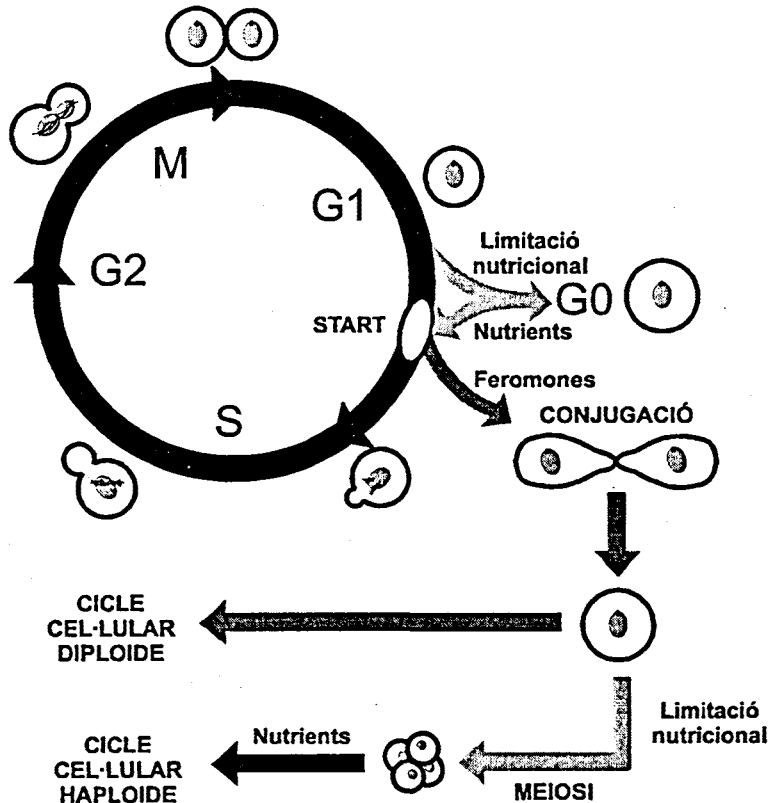


Figura I.1. Cicle cel·lular de *S. cerevisiae*.

En resposta a senyals externs les cèl·lules aturen el cycle en START. En condicions de limitació nutricional les cèl·lules haploides entren en l'estat G0 i les cèl·lules diploides inicien la meiosi.

S'ha descrit com alguns esdeveniments del cycle depenen pel seu inici d'haver finalitzat els anteriors, per exemple no hi pot haver mitosi si no s'ha finalitzat la replicació. Això que pot semblar molt obvi ha de ser coordinat en la cèl·lula per a no caure en un cycle defectuós. El concepte de *checkpoint* (punt de comprovació) indica un control intern del cycle i la senyalització necessària per a retardar el següent esdeveniment del cycle fins que no s'ha corregit el defecte. En *S. cerevisiae* s'han descrit quatre *checkpoints*, però fa molt poc temps que es treballa en aquesta qüestió i falten més estudis per saber quants n'hi ha en realitat. Es poden conèixer els gens implicats en cadascun mitjançant mutacions, però se sap molt poc dels mecanismes que provoquen el retard o parada temporal. Tal com se sospita per altres senyals externs, el control de la proliferació podria estar dirigit en últim terme a la maquinària del cycle cel·lular.

A. *Checkpoint* de replicació del DNA: si no s'ha finalitzat la replicació del DNA no s'iniciarà l'anafase. Aquest control atura les cèl·lules a l'inici de la mitosi. Sembla que el senyal que indica defectes en la replicació del DNA es troba en la forca de replicació, doncs mutacions en alguns gens que componen la maquinària replicativa, com *POL2* (Navas *et al.*, 1995) i d'altres, provoquen l'inici de la mitosi amb conseqüències fatals per a la cèl·lula.

B. *Checkpoint* de dany en el DNA: quan el material genètic ha sofert danys greus la viabilitat de les cèl·lules està molt compromesa si no els reparen. Segons el punt quan s'hagi donat el dany les cèl·lules s'aturaran temporalment, abans de la replicació i de la formació de la gema (dany durant G1), hi haurà un retard en la replicació (dany durant G1 tardana o durant fase S) o bé s'aturaran abans de l'anafase (dany després de la fase S), i poden aturar-se un cop començada l'anafase (Paulovich *and* Hartwell, 1995; Yang *et al.*, 1997). S'ha descrit com el dany en DNA durant la fase G1 causat per un agent alquilant provoca la fosforilació d'un dels factors transcripcionals dels gens de ciclines G1 per part de Rad53 (quinasa necessària pel retard del creixement durant el *checkpoint*) el que causa el retard en l'acumulació dels mRNAs de ciclines G1 i, per tant, un retard en la transició G1-S (Sidorova *and* Breeden, 1997).

C. *Checkpoint* de morfogènesi cel·lular: quan les cèl·lules són sotmeses a estrès ambiental hi ha una despolarització temporal del citoesquelet d'actina que provoca un retard en la formació de la gema. En aquest cas també es coneix el mecanisme molecular responsable del control; per a evitar la formació de cèl·lules binucleades es retarda l'inici d'anafase amb la inhibició dels complexos de ciclines Clb (ciclines de fases G2 i M) amb Cdc28, per fosforilació de la quinasa (Lew *and* Reed, 1995).

D. *Checkpoint* de la formació del fus acromàtic: s'ha vist que l'inici d'anafase depèn de l'adhesió dels cromosomes al fus acromàtic doncs hi ha un retardament fins que tots els cromosomes estan biorientats. Si es dificulta la formació del fus també hi ha un retard en l'elongació del fus i la posterior citoquinesi. Per a evitar la segregació aberrant dels cromosomes es produeix un retard en l'inici d'anafase (Wells, 1996).

En *S. cerevisiae* el temps de duplicació depèn de l'extensió de la fase G1 i segons el medi de cultiu serà més o menys llarga de forma inversament proporcional a l'abundància de nutrients. Les altres fases no varien massa la seva durada. Aquesta dependència de fase G1 ha estat atribuïda a la necessitat d'aconseguir una grandària suficient per a la divisió cel·lular. Com en tots els eucariotes, el punt més important de control de la proliferació en llevats es troba al final de la fase G1. Aquí s'han d'integrar diferents informacions relacionades amb l'estat cel·lular i les condicions ambientals per a decidir el pas a la fase S, que significa comprometre's a acabar tot el cicle fins a la propera fase G1 (Küntzel *et al.*, 1994).

2.2. Transició G1-S

2.2.1. El concepte de START

Al final de la fase G1 es troba el punt de control més important en el cicle de les cèl·lules eucariotes (Pringle *and* Hartwell, 1981) anomenat START en llevats. Més aviat es tracta d'un marge de temps en la fase G1 tardana, on les cèl·lules es preparen per a seguir el cicle amb la replicació del DNA. Durant molt temps es van definir diferents mutants pel seu efecte de parada del cicle, abans o després de START (Reed, 1980). En certa manera es podria qualificar el punt START com un *checkpoint*, doncs les cèl·lules no avancen més enllà del cicle si no es compleixen els requisits de nutrients, amb la diferència que, si no es sobrepassa aquest punt, l'aturada pot ser molt més llarga que en altres *checkpoints* on s'ha d'acabar el cicle fins a la propera G1.

2.2.2. Factors transcripcionals

Al final de fase G1 s'activa la transcripció de gens que provoquen el pas a la fase S (figura I-2). Els complexos responsables d'aquesta activació són Swi6/Swi4 i Swi6/Mbp1. *SWI6* codifica per un factor regulador de la transcripció de determinats gens, entre els que es troben els gens de ciclines, essencials per a la transició G1-S.

SWI4 i *MBP1* codifiquen per a proteïnes d'unió al DNA que especifiquen la seqüència diana en els promotors dels gens que han de ser activats pel complex. *Swi4* s'uneix al motiu anomenat SCB (*SWI4* Cycle Box) que es troba en el promotor del gen *HO* (endonucleasa que participa en els canvis de tipus sexual) i de gens de ciclines G1, *CLN1* i *CLN2*. El complex *Swi6*/*Swi4* s'anomena SBF (*SCB* Binding Factor). *Mbp1* s'uneix al motiu MCB (*Mlu* Cycle Box) que regula l'activació dels gens de ciclines de fase S, *CLB5* i *CLB6*, del gen *SWI4* i de diversos gens relacionats amb la replicació del DNA com *POL1* (DNA polimerasa α) i *TMP1* (Timidilat sintetasa). El complex *Swi6*/*Mbp1* s'anomena MBF (*MCB* Binding Factor) (Koch and Nasmyth, 1994).

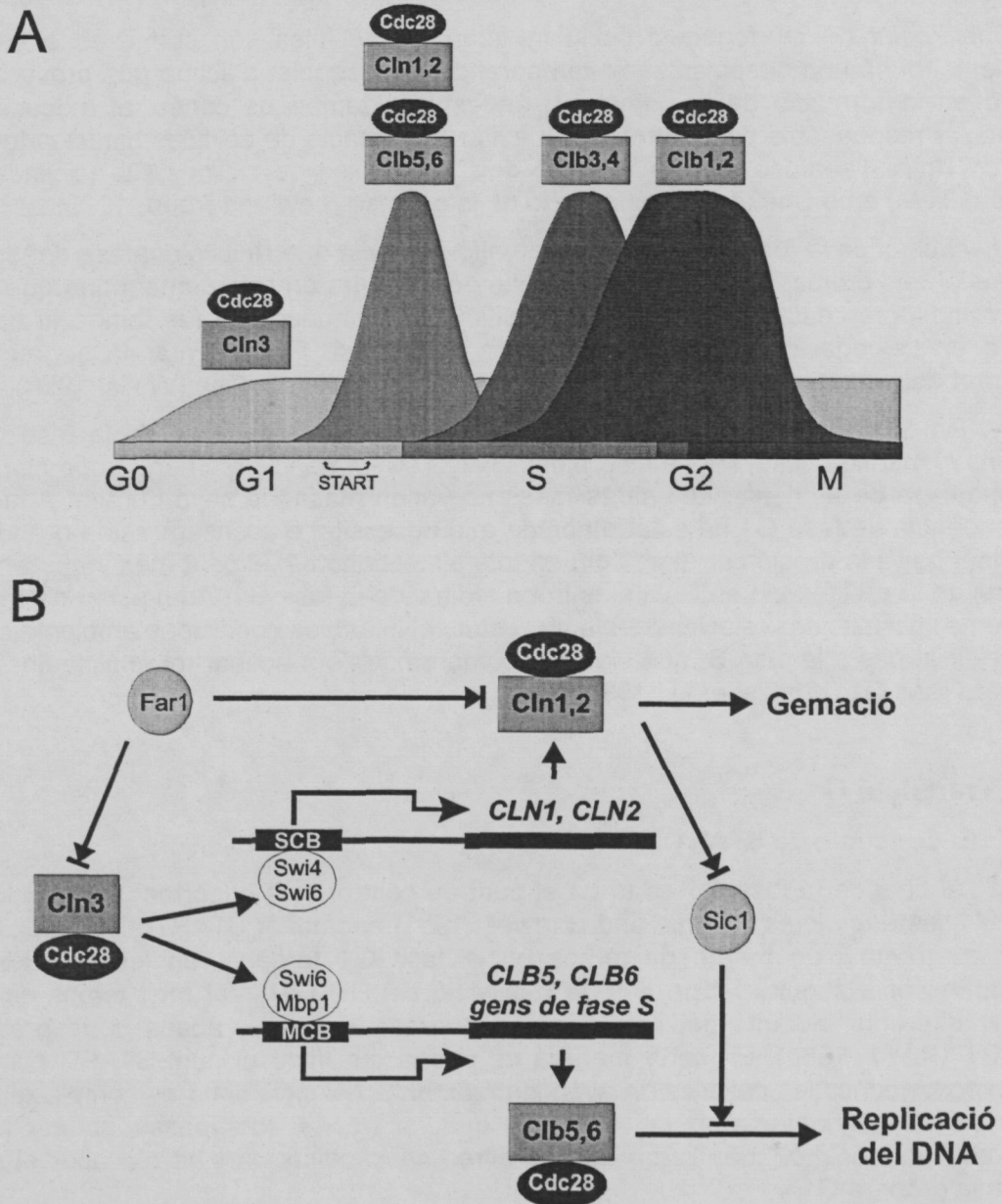


Figura 1.2. Expressió de ciclines durant el cycle cel·lular i control de la transició G1-S.

(A) L'activitat dels complexos ciclina/Cdc28 regulen les diferents fases del cycle. (B) *Cln3* associada a *Cdc28* és el principal activador de la transició G1-S, activant els complexos SBF i MBF. La degradació de *Sic1* dependent de l'activitat *Cln1,2*/*Cdc28* permet l'entrada en la fase S.

Aquests complexos estan units al DNA durant tota la fase G1, però al final d'aquesta fase són activats i transcriuen els gens que permetran el pas a fase S (Kock *et al.*, 1996). Se suposa que l'activació de SBF i MBF és *in situ*, deguda a l'acció del complex Cln3/Cdc28 (Stuart *and* Wittenberg, 1995). El gen *SWI6* és transcrit constantment en el cicle, però la proteïna és regulada per localització subcel·lular, sent nuclear des del final de mitosi fins al final de fase G1 i citoplasmàtica la resta de cicle (Sidorova *et al.*, 1995).

2.2.3. Cdk: Quinasa dependent de ciclines

En *S. cerevisiae* hi ha una sola quinasa de cicle, Cdc28 (homòloga a Cdc2 en *Schizosaccharomyces pombe* i a Cdk1 en humans). Aquesta proteïna és essencial per a la viabilitat de les cèl·lules. Hi ha altres quinases del tipus Cdk en *S. cerevisiae*, per exemple Ume5 i Pho85, no implicades en el cicle (Hunter *and* Plowman, 1997).

El gen *CDC28* és expressat constitutivament durant tot el cicle. La quinasa és regulada per fosforilació de certs residus tirosina i treonina que l'activen o la inactiven:

- Fosforilació de la treonina 169: es dona per la quinasa Cak1 i és necessària per l'activitat de Cdc28 (Espinoza *et al.*, 1996). Aquesta fosforilació no sembla regular el cicle cel·lular.
- Fosforilació de la tirosina 19: la quinasa responsable d'aquesta modificació és Swe1. Tal com hem dit abans, sembla que el *checkpoint* de morfogènesi cel·lular utilitza aquesta modificació per a aturar el cicle i donar temps a la formació de la gema. Per tant aquesta modificació atura les cèl·lules abans de la mitosi, no en un altre punt del cicle. Per a recuperar l'activitat Cdc28 cal la defosforilació de la tirosina 19, que porta a terme la fosfatasa Mih1. Durant un cicle normal no sembla ser massa important l'acció de Swe1, i la quantitat de Mih1 present és suficient per a recuperar l'activitat Cdc28 (Russell *et al.*, 1989; Booher *et al.*, 1993).

L'activitat de Cdc28 també ve regulada per la unió de diferents proteïnes que modulen la seva activitat:

- Inhibidors: *SIC1* i *FAR1*. Tots dos són expressats al principi de fase G1. Mentre que Sic1 és activa durant G1, inhibint l'acció dels complexos Clb/Cdc28 per a evitar l'entrada en fase S (Schwob *et al.*, 1994), Far1 no és activa fins que no és fosforilada per la via de transducció de senyal de feromones, inactivant els complexos Cln/Cdc28 durant la fase G1 (Peter *and* Herskowitz, 1994).
- *CKS1*. És un gen essencial pel cicle i la seva mutació produeix defectes en processos on participen els complexos ciclina/Cdc28, per això sembla ser necessari per llur activitat (Tang *and* Reed, 1993), encara que no se sap de quina forma els regula. Potser la regulació estaria en guiar els complexos ciclina/Cdc28 als substrats que han de modificar en cada fase.
- *CDC37*. Codifica per un tipus de proteïnes anomenades xaperones, n'hi ha moltes d'homòlogues i actuen en la facilitació de molts processos en la cèl·lula. En aquest cas és necessària per formar els complexos ciclina i Cdc28 i, pel que es pot deduir del seu mutant, també actua en altres quinases (Gerber *et al.*, 1995; Schutz *et al.*, 1997).

2.2.4. Ciclines

Les Cdk no són funcionals com a monòmers, cal la unió de la subunitat reguladora anomenada ciclina a cada molècula de Cdk (Morgan, 1995). Totes les ciclines comparteixen un domini d'homologia anomenat *cyclin box* que uneix la Cdk.

Els complexos ciclina/Cdk són els inductors de les transicions del cycle cel·lular, que regulen per fosforilació dels seus substrats.

Com que en *S. cerevisiae* només hi ha una quinasa que participi en el cycle, es creu que les ciclins són les encarregades d'aportar l'especificitat de substrat (Peeper *et al.*, 1993), encara que algunes poden suplir la manca d'altres ciclins. Les diferents ciclins són sintetitzades i degradades en diferents fases del cycle, el que dona especificitat d'acció de Cdc28 en cada fase.

A. Ciclins de fase G1

Durant la fase G1 la cèl·lula creix i es prepara per l'entrada en fase S. El compromís per seguir amb el cycle s'adquireix després del pas de START al final de fase G1, que coincideix amb un pic d'expressió de ciclins *CLN1* i *CLN2* que activen la formació de la gema, promouen el pas a la fase S i participen en la duplicació del centriol i la inactivació del complex APC (*Anafase Promoter Complex*), que consta de varies proteïnes implicades en promoure anafase i en la degradació per ubiquitinització de les ciclins de fases G2 i M (King *et al.*, 1995). *CLN1,2* són expressades en G1 tardana depenent de caixes SCB que són regulades pel complex Swi6/Swi4. L'activació d'aquest complex, així com de Swi6/Mbp1, és deguda a Cln3/Cdc28, el complex iniciador de START.

CLN3 codifica per una ciclina molt inestable i d'expressió constant durant el cycle (Tyers *et al.*, 1993). La inestabilitat de Cln3, Cln1 i Cln2 ve determinada per les seqüències PEST les quals senyalitzen per fosforilació la degradació de les ciclins via ubiquitina. La pròpia activitat Cdc28 fosforila les regions PEST de les ciclins i provoca llur ubiquitinització (Lanker *et al.*, 1996). Estudis amb Cln2 han reconegut varies proteïnes (Cdc34, Cdc53, Grr1, Skp1) necessàries per a la seva degradació un cop fosforilada (Barral *et al.*, 1995; Deshaies *et al.*, 1995). Aquestes molècules formen un complex que conjuga la ubiquitina a les ciclins, induint així la seva degradació (Townsend and Ruderman, 1998).

CLN1 i 2 tenen funcions redundants, doncs el mutant en una d'elles no mostra cap defecte en la transició G1-S, i el doble mutant *cln1,2* és viable. Cln3 és suficient per a activar els promotors dels gens G1-S en el moment correcte (Stuart and Wittenberg, 1995), encara que sí que hi ha un retard en la formació de la gema i la replicació, el que provoca que les cèl·lules comencin la divisió a major grandària.

Tot i que Cln3 és present durant tot el cycle, els complexos Cln3/Cdc28 només activen SBF i MBF al final de fase G1. Encara no es coneix a nivell molecular com s'activen aquests complexos en aquell precís moment.

B. Ciclins de fase S i Sic1

CLB5 i *CLB6* són les ciclins de fase S. Els complexos Clb5,6/Cdc28 són encarregats d'iniciar la replicació del DNA (Schwob and Nasmyth, 1993). La transcripció de *CLB5,6* també depèn dels complexos Cln3/Cdc28 que activen Swi6/Mbp1, el factor activador de la transcripció dependent de caixes MCB (Dirick *et al.*, 1995). Per tant les ciclins Cln1, 2 i les ciclins Clb5, 6 s'expressen en el mateix període de G1 tardana. Estudis amb la ciclina Clb5 l'han mostrada com una proteïna més estable que les Clns i estabilitzada en mutants *ubc9*, una proteïna de conjugació a ubiquitina (Seufert *et al.*, 1995).

La transcripció de les ciclins de fase G1 i les de fase S és simultània però actuen seqüencialment. Els complexos Clb/Cdc28 són inhibits per la presència de Sic1, abans descrit. L'inhibidor assegura l'inici de la fase S fins que no estan formats

els complexes prereplicatius (Schwob *et al.*, 1994) i la seva deleció provoca la pèrdua de cromosomes. Els complexos Cln/Cdc28 fosforilen Sic1 i el senyalitzen per degradació via ubiquitina (Schneider *et al.*, 1996). El complex encarregat de ubiquitinitzar Sic1 consta d'al menys aquestes proteïnes: Cdc4, Cdc34, Cdc53 i Skp1. Quan Sic1 ha estat degradat els complexos Clb/Cdc28 poden ser actius.

Sic1 també podria tenir un paper en inactivar complexos Clb/Cdc28 després d'anafase (Toyn *et al.*, 1997).

C. Ciclines de fases G2 i M

Aquestes ciclines s'expressen en dos pics diferenciats en el temps: *CLB3* i *CLB4* s'expressen primer, durant les fases S i G2. La seva deleció no té fenotip. *CLB1* i *CLB2* són expressades més tard, durant G2 i M. Clb1 i sobretot Clb2 són ciclines indispensables pel cicle. Les cèl·lules mutants *clb2* tenen un fort retard en l'inici d'anafase (creixement del fus acromàtic) i en la despolarització del creixement de la gema mentre que el doble mutant *clb1,2* no pot continuar el cicle (Fitch *et al.*, 1992).

No se sap com s'activa l'expressió de *CLB3* i *CLB4*, però la inducció de les ciclines *CLB1,2* està retardada en mutants *clb1-4* (Amon *et al.*, 1993), suggerint l'activació per part de Clb3, 4.

Les ciclines Clb1-4 tenen el motiu de destrucció anomenat *cyclin destruction box*, que les senyalitza per a ser degradades via ubiquitina. El complex APC que efectua la conjugació a ubiquitina és present durant tot el cicle però només és actiu des de l'anafase a la transició G1-S (King *et al.*, 1995).

El paper de les ciclines de fases G2 i M és també el d'inactivar la transcripció de gens dependents de caixes SCB durant aquestes fases del cicle. Els complexos Clb1-4/Cdc28, sobretot Clb2/Cdc28, poden interaccionar amb Swi4, segrestant-lo del promotor (Koch *et al.*, 1996) i reprimint la transcripció. També fan despolaritzar el creixement de la gema, iniciat per l'acció de Cln1,2/Cdc28 (Fitch *et al.*, 1992).

3. REGULACIÓ DE LA PROLIFERACIÓ I DEL CICLE CEL·LULAR PER SENYALS EXTERNES

3.1. Control per feromones

La via de transducció de senyal induïda per les feromones sexuals ha estat molt ben caracteritzada (Herskowitz, 1995). Les cèl·lules haploides secreten les feromones sexuals que indiquen llur tipus cel·lular (*MATa* = factor a; *MAT α* = factor α). Les feromones són reconegudes per un receptor de membrana (STE2 pel factor α , STE3 pel factor a), que està acoblat a una proteïna G que, mitjançant STE20 (una quinasa), transmet el senyal a una cadena de MAP quinases, fins als substrats Ste12 i Far1. Ste12 és un factor transcripcional que quan és fosforilat per la MAP quinasa Fus3 de la via de feromones, activa la transcripció del gen *FAR1* (inhibidor dels complexos Cln/Cdc28).

FAR1 és expressat al principi de fase G1 en cada cicle depenent dels factors transcripcionals Swi5/Ace2. Quan s'activa la via de les feromones, és activat transcripcionalment per Ste12, junt amb altres gens que responen a la via (Herskowitz, 1995). La proteïna Far1, a més a més, és fosforilada per Fus3 i en aquest estat és funcional per a la inhibició de Cln/Cdc28, el que provoca una aturada temporal en el cicle al final de fase G1. No es coneix cap altra funció per Far1 i el fet que sigui sintetitzat durant un cicle normal pot tractar-se d'una estratègia per a inhibir més ràpidament el cicle en presència de feromones. S'havia proposat que aquesta aturada

resultava amb alts nivells de mRNAs de ciclins, doncs es creia que només s'inactivaven els complexos Cln1, 2/Cdc28, però ja s'ha vist que durant l'aturada baixen els nivells dels mRNAs de ciclins doncs Cln3/Cdc28 també és inactivat (Jeoung *et al.*, 1998). Durant el cycle la proteïna Far1 és fosforilada pels complexos ciclina/Cdc28 de finals de fase G1 i degradada després (McKinney *and* Cross, 1995). En mutants *cdc34* (enzim conjugatiu de la ubiquitina) és estabilitzada, el que suggereix una via de degradació similar a les ciclins Cln i a Sic1.

3.2. Senyals nutricionals

3.2.1. Font de Carboni

El llevat *S. cerevisiae* té la capacitat de poder utilitzar fonts de carboni molt variables, fermentables o no fermentables (Entian *and* Barnett, 1992). Creix molt bé en medis rics amb sucres fermentant-los en condicions aeròbiques. Sobretot sembla especialitzat en la glucosa. En el laboratori es fa créixer en medis molt rics en tots els nutrients i es poden observar diferents fases de creixement, segons les condicions nutricionals.

Una primera fase de creixement exponencial i fermentatiu del sucre present en el medi. Quan el sucre s'està esgotant, la velocitat de creixement disminueix i s'atura el cycle en la fase G1. Hi ha un període d'adaptació fins que es pot canviar el metabolisme cel·lular, iniciant un creixement més lent, respirant l'alcohol produït durant la fermentació. Quan la font de carboni respirable i segurament molts altres nutrients, s'estan esgotant del medi, la proliferació s'atura en la fase G1 del cycle. L'entrada en la fase estacionària del creixement per la limitació de nutrients essencials porta a l'estat G0 que implica una sèrie de canvis fisiològics, bioquímics i morfològics: l'acumulació de carbohidrats de reserva com glicogen i trealosa, i de vesícules de lípids en el citoplasma, l'augment de la síntesi de triacilglicerol, la repressió de gens que codifiquen per proteïnes ribosomals i la inducció de gens d'estrés, sobretot de xoc tèrmic que donen termotolerància a la cèl·lula. La paret cel·lular es fa més doble, i és menys porosa i més resistent a degradació, els cromosomes es condensen i disminueix la transcripció general (Werner-Washburne *et al.*, 1993).

L'addició de glucosa al medi senyalitza diferents respostes relacionades en llevat: la repressió per glucosa, la inducció del creixement fermentatiu, i l'activació de la via Ras/cAMP.

El llevat utilitza la glucosa sempre que és present al medi. Hi ha un sistema de repressió per presència de glucosa de les vies catabòliques d'altres fonts de carboni, sobretot de la galactosa, el que és conegut com la repressió per glucosa (Gancedo *and* Gancedo, 1986; Lohr *et al.*, 1995). Si hi ha alguna font de carboni fermentable, sempre serà dominant sobre una de respirable (Thevelein *and* Hohmann, 1995).

L'addició de glucosa provoca un increment transitori dels nivells d'AMP cíclic (cAMP). Els nivells de cAMP estan controlats per la via de senyalització anomenada Ras/cAMP a través de la qual la glucosa afecta els nivells de cAMP (Thevelein, 1991) (figura I-3). No es coneix quina molècula pot ser la senyalitzadora de glucosa cap a la via Ras. Quan la via és activada la proteïna Cdc25 promou l'intercanvi de GDP per GTP en Ras1 i Ras2 (proteïnes G) i activa la seva acció sobre Cyr1 (Cdc35), l'adenilat ciclase. L'activitat GTPasa de les proteïnes Ras és estimulada per Ira1 i Ira2. Cyr1 és l'encarregada de produir cAMP a partir d'ATP. Aquest cAMP s'unirà a Bcy1, la subunitat reguladora de la Pka (quinasa dependent de cAMP) que llavors allibera la subunitat catalítica que passa a ser activa i a fosforilar tota una sèrie de substrats que originen adaptacions metabòliques i una activació de la proliferació cel·lular (Thevelein, 1994). La subunitat catalítica és codificada per tres gens redundants *TPK1,2,3*.

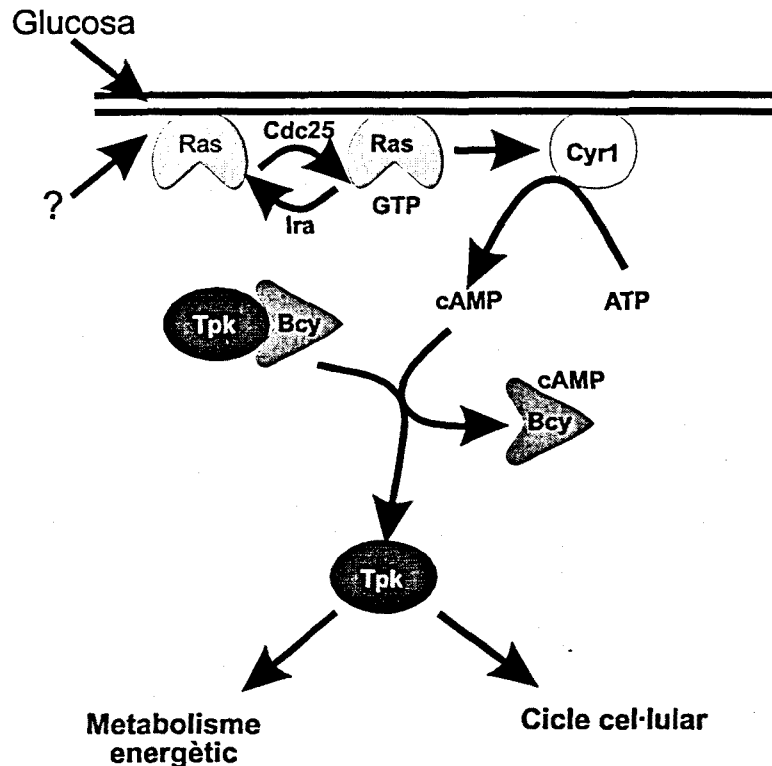


Figura I.3. La via Ras/cAMP.

La glucosa activa, de forma encara desconeguda, la proteïna-G Ras mitjançant Cdc25. Cyr1, activada per Ras, produeix un augment dels nivells de cAMP i aquest desplaça la subunitat inhibidora Bcy de la subunitat catalítica Tpk, la qual modula el metabolisme energètic i induïx la proliferació cel·lular.

Cdc25, pel seu paper activador de Ras, és un activador de la via i, consegüentment, les proteïnes Ira són repressores. Sobre cAMP poden actuar les fosfodiesterases Pde1 i Pde2, transformant-lo en AMP i per tant inactivant la seva acció sobre Bcy1.

L'activitat de la via Ras/cAMP està controlada estrictament, doncs regula molts i diversos processos en la cèl·lula. Mutacions que causen alta activitat impedeixen respondre correctament a la cèl·lula en condicions de limitació nutricional i estrès: no es poden aturar correctament en fase G1, no es poden induir gens d'estrès ni respostes per l'entrada a G0 com acumular trealosa o glicogen, no poden créixer correctament en fonts de carboni no fermentables o en galactosa, i en diploides interfereixen en l' esporulació.

Mutacions que causen baixa activitat Ras/cAMP provoquen l'efecte contrari: les cèl·lules expressen gens d'estrès i de fase estacionària de forma constitutiva, tenen alts nivells de glicogen i trealosa, i les cèl·lules diploides poden esporular en medi ric. Una activitat massa baixa és letal i causa una aturada en G1 (Thevelein, 1994).

Els efectes sobre la capacitat d'aturar-se en G1 segons l'activitat de la via han portat a estudiar la relació amb el cicle cel·lular. Diversos treballs han donat resultats contradictoris respecte l'efecte positiu o negatiu de cAMP en l'expressió de gens de ciclins en G1. En un primer treball es diu que quan s'afegeixen nutrients a cèl·lules aturades per limitació nutricional, la transcripció de *CLN1,2* depèn de cAMP (Huble et al., 1993). Posteriorment dos treballs més van veure el paper contrari de cAMP: en

condicions de creixement en rafinosa, l'addició de glucosa provocava un retard en el pas de START per inhibició de la transcripció de *CLN1,2*, però no de *CLN3* (Baroni *et al.*, 1994, Tokiwa *et al.*, 1994). Ja fa temps que està descrit que la presència de glucosa i més concretament la hiperactivitat de la via Ras/cAMP provoquen una major durada de la fase G1 (Baroni *et al.*, 1989).

No està clar l'efecte de la via Ras/cAMP en la regulació del cycle cel·lular, només que estaria dirigit a les ciclines de fase G1 *CLN1* i *CLN2*, ja sigui de forma negativa o positiva, o ambdues, i que *CLN3* podria ser un intermediari entre nutrients i ciclines (Huble *et al.*, 1993).

3.2.2. Nitrogen i altres nutrients essencials

La limitació de qualsevol nutrient essencial provoca l'aturada de proliferació en la fase G1 del cycle. Són molts els diferents senyals que acaben afectant un mateix procés, necessari per l'aturada. En aquests casos encara no es coneixen efectes específics sobre gens de cycle, només se suposa que haurien de ser reprimits per a poder aturar el cycle. El mecanisme molecular que provoca aquesta aturada és desconegut.

El nitrogen és, d'aquests altres nutrients, el que afecta més ràpidament el creixement i la proliferació ja que està implicat en la síntesi de proteïnes de forma molt directa.

La disminució de la síntesi proteica ha estat relacionada amb l'impediment de la transició G1-S en medis limitats de nutrients (Reed, 1991). La via sensible a rapamicina mediada per Tor1 i Tor2, quinases de fosfatidilinositol, ha estat implicada en la regulació de la progressió en G1 per limitació nutricional (Barbet *et al.*, 1996, Di Como *and* Arndt, 1996). La rapamicina inhibeix l'acció de les proteïnes Tor necessària per l'inici de la traducció i provoca una aturada en fase G1. Les cèl·lules presenten característiques de fase estacionària o G0, amb la síntesi de proteïnes reduïda. La sobreexpressió de la ciclina *CLN3* reverteix aquest efecte d'aturada en G1, el que suggereix que el mecanisme de control passa per la possibilitat de sintetitzar ciclines a través d'aquesta via. El problema és que la síntesi proteica general està molt afectada i això podria implicar efectes indirectes en l'aturada en G1.

La senyalització de font de nitrogen va ser relacionada amb la proteïna Cdc25 de la via Ras/cAMP. Quan s'afegeix nitrogen a cèl·lules privades de nutrients hi ha un augment dels missatgers IP3 (inositol 1,4,5-trifosfat) i DAG (diacilglicerol), durant aproximadament una hora. Provenen del trencament de la molècula PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat) catalitzat per l'enzim PLC1 (fosfoinositidasa). La glucosa indueix la formació de cAMP i el nitrogen la de IP3, i encara que mai no es creuen aquests efectes, tots dos requereixen Cdc25 intacta (Schomerus *and* Küntzel, 1992). La via de la Plc1 controla respostes a osmoregulació i nutricionals (Flick *and* Thomer, 1993), tot i que es desconeixen els efectes directes sobre gens de cycle cel·lular.

3.3. Aturada en fase G1 per limitació nutricional

Estudis realitzats en limitació nutricional i en l'aturada en fase G1 del cycle han intentat determinar si hi ha mecanismes específics que regulin el cycle cel·lular fins a provocar aquesta aturada (Küntzel, 1994). Encara que s'han relacionat diferents vies de transducció de senyals amb la regulació de cycle mai no s'ha trobat una dada concreta. L'aturada en G1 es va atribuir a la necessitat de síntesi proteica i de creixement durant aquesta fase, el que la feia més sensible a la falta de nutrients i a la

subsegüent baixa taxa de síntesi de proteïnes, concretament de les ciclins, per la seva inestabilitat (Reed, 1991).

L'aturada pre-START en la limitació nutricional permet l'inici de diferents estats de diferenciació, segons les condicions nutricionals del medi. S'ha de distingir la font de carboni, fermentable o respirable, i la disponibilitat d'altres nutrients, el nitrogen sobretot.

3.3.1. Limitació nutricional en cèl·lules haploides

Entrada en l'estat quiescent G0: limitació de font de nitrogen i altres nutrients essencials, limitació de font de carboni o limitació d'ambdós nutrients. L'aturada en fase G1 per limitació nutricional condueix al que s'anomena l'estat de quiescència o G0, quan el temps de limitació és perllongat (Werner-Washburne *et al.*, 1993).

Entrada en creixement invasiu: limitació parcial de font de nitrogen en presència de glucosa. Les cèl·lules haploides del llevat poden iniciar un cicle diferenciador que permet continuar la proliferació però formant files de cèl·lules sobre un suport sòlid, amb un creixement molt polaritzat. Es creu que un gradient en la disponibilitat de nutrients provoca aquest creixement, per tal d'obtenir-los (Roberts *and* Fink, 1994). La via de transducció de senyal que activa aquest cicle comparteix alguns elements amb la via de feromones, encara que sigui activat per un senyal molt diferent. No es coneixen els efectes sobre la regulació del cicle cel·lular en aquestes condicions.

3.3.2. Limitació nutricional en cèl·lules diploides

Entrada en l'estat quiescent G0: limitació de font de carboni. La limitació de la font de carboni en un medi ric provoca l'aturada en G1 de les cèl·lules i la posterior entrada en G0 (Werner-Washburne, 1993).

Entrada en cicle meiòtic: limitació de font de nitrogen o d'altres nutrients essencials, en presència d'una font de carboni respirable. La limitació nutricional més extrema provoca l'entrada en el cicle meiòtic i la formació d'espores com estat de resistència (Mitchell, 1994). La presència d'una font fermentable de carboni, sobretot la glucosa, inhibeix el procés meiòtic.

Entrada en creixement pseudohifal: limitació parcial de font de nitrogen en presència de glucosa. Igual que en cèl·lules haploides, en diploides es dona el creixement polaritzat formant files de cèl·lules i és activat per la mateixa via (Gimeno *et al.*, 1992). Els haploides presenten més tendència a fer creixement invasiu que els diploides a fer pseudohifes.

4. MEIOSI

4.1. Requeriments per la meiosi

4.1.1. Limitació nutricional

L'inici del procés meiòtic requereix limitació nutricional forta. Tot i que es pot donar meiosi quan es limita de qualsevol nutrient essencial (Freese *et al.*, 1982), cal una font de carboni no fermentable per a iniciar la meiosi. En el laboratori s'utilitzen l'acetat com a font de carboni i la limitació de nitrogen, doncs són les condicions més eficients.

La presència de glucosa inhibeix totalment el procés i mutacions en la via de senyalització Ras/cAMP que causen activitat constitutiva de la Pka, com pot ser *bcy1*,

també disminueixen l'eficiència de meiosi en condicions de limitació nutricional. Conseqüentment, mutacions que causen una activitat baixa de la Pka, com *cyr1*, *cdc25* i *ras2*, augmenten l'eficiència de meiosi i inclús la fan possible quan no hi ha limitació de nitrogen (Matsuura *et al.*, 1990). De fet mutants *cyr1* i *ras2* esporulen també en presència de glucosa (Tatchell *et al.*, 1985). Per aquests resultats s'han relacionat glucosa i cAMP en una mateixa via per a inhibir la meiosi. Estudis recents han tornat a relacionar glucosa i meiosi però de forma més directa, explicant com la seva presència pot inhibir l'inici de meiosi (Vidan and Mitchell, 1997) i que a través de l'activitat Pka inhibeix l'expressió d'*IME1*, el principal inductor de meiosi (Sagee *et al.*, 1998).

No es coneix quina via segueix el senyal de presència o manca de nitrogen, encara que també se l'ha relacionat, per aquests resultats, amb la mateixa via Ras/cAMP. Altres estudis amb mutants de baixa i constitutiva activitat Pka, sense adenilat ciclasa (*cyr1*), que poden créixer en presència de nitrogen i que esporulen en limitació de nitrogen (Cameron *et al.*, 1988), han posat en dubte aquesta hipòtesi, doncs hi ha d'haver un mecanisme independent de cAMP que indueix esporulació en condicions de limitació de nitrogen.

4.1.2. Diploïdia

Només les cèl·lules diploides poden acabar amb èxit la meiosi. El llevat ha limitat la possibilitat d'iniciar meiosi només en diploides utilitzant el repressor $a1-\alpha2$, un complex que es forma per la unió de dues subunitats; $a1$ és el producte que codifica el locus *MATa1* i $\alpha2$ és el producte de *MAT α 2*. Aquest repressor és necessari per a totes les propietats conegudes de les cèl·lules diploides a/α (Herskowitz *et al.*, 1992), i possibilita la transcripció d'*IME1* a través de dos mecanismes diferents:

1. Reprimeix l'expressió del gen *RME1*, que és inhibidor transcripcional d'*IME1*. $a1-\alpha2$ s'uneix al promotor de *RME1* per reprimir-lo (Covitz *et al.*, 1991).

2. Permet l'expressió de l'activador transcripcional *IME4*, que es dona en condicions de limitació nutricional (Shah and Clancy, 1992). Al ser un repressor, $a1-\alpha2$ ha d'activar l'expressió d'*IME4* de forma indirecta. Recentment s'ha proposat un mecanisme per a permetre l'expressió d'*IME4* en cèl·lules diploides degut a la repressió per part del complex $a1-\alpha2$ del transcrit *antisense* adjacent a *IME4*. Aquest transcrit és només present en cèl·lules haploides i en diploides no a/α , quan el complex repressor no es pot formar (Kupiec *et al.*, 1997). Per a tenir expressió alta del gen *IME4* cal, endemés, limitació nutricional. Per tant *IME4* respon a tots dos requeriments: privació nutricional i control per diploïdia.

4.2. Fases de la meiosi i gens implicats

Encara que la meiosi i la formació d'espores són en realitat un mateix procés, es poden distingir diferents fases en el temps que resulten de l'ordenació d'una sèrie d'esdeveniments ben diferenciats (figura I-4).

IME1 activa la transcripció dels gens primerencs durant l'inici de la meiosi. *IME1* codifica per una proteïna àcida molt rica en tirosines (Smith *et al.*, 1993). Diversos experiments amb el sistema *two hybrid* han demostrat que es tracta d'un activador transcripcional (Mandel *et al.*, 1994; Rubin-Bejerano *et al.*, 1996). Els mutants *ime1* no expressen cap gen primerenc ni inicien cap esdeveniment meiòtic, per això *Ime1* és considerada la principal proteïna inductora de meiosi (Kassir *et al.*, 1988; Smith and Mitchell, 1989).

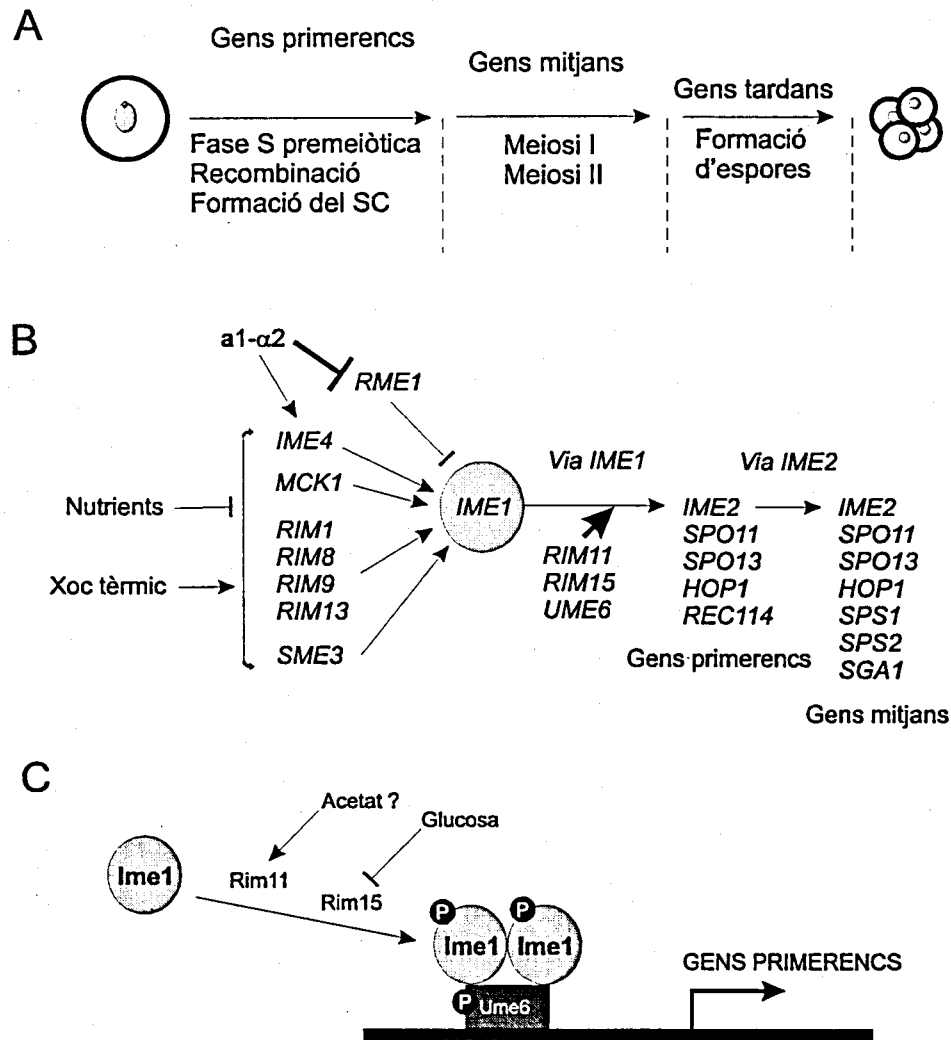


Figura I.4. Fases i grups d'expressió de la meiosi.

(A) La meiosi implica una sèrie d'esdeveniments ordenats en el temps mitjançant l'expressió seqüencial dels grups de gens implicats. (B) L'inici de la meiosi depèn d'IME1 que està regulat transcripcionalment per senyals dependents del tipus cel·lular i estressants com són la limitació de nutrients i el xoc tèrmic. (C) La quinasa Rim11 fosforila Ime1 i Ume6, induint la formació del complex transcripcional que activa l'expressió dels gens primerencs. Rim15 permet la interacció de les dues proteïnes en absència de glucosa.

Entre els gens primerencs es troba *IME2*, que codifica per una serina-treonina quinasa que participa també en l'activació sostinguda de la majoria dels gens primerencs i la inducció de tots els gens mitjans (Smith and Mitchell, 1989).

Ime2 reprimeix l'expressió d'*IME1* i manté l'expressió dels gens primerencs. Aquesta repressió és molt evident en el fons genètic SK-1 (Mitchell *et al.*, 1990), però no en altres fons genètics com W303 (Lee and Honigberg, 1996) i l'utilitzat en el nostre grup, 1788.

Durant les divisions meiòtiques s'expressen els gens mitjans. Un estudi realitzat amb el mutant *ids2* indicava un possible mecanisme de canvi temporal en l'activació de gens primerencs i de gens mitjans, podent separar aquestes funcions en el mutant *ids2* on Ime2 era incapaç d'expressar gens mitjans però sí gens primerencs (Sia and Mitchell, 1995).

Tot el procés meiótic està basat en l'ordenació temporal de les diferents fases que depenen de l'acció de diferents gens i això s'aconsegueix amb la transcripció seqüencial de cada grup de gens. En cada grup hi ha uns gens reguladors d'aquesta ordenació: *IME2* entre primerencs i mitjans (fase S premeiótica i divisions), i *SPS1* i *SMK1* entre mitjans i tardans (divisions i formació d'espores).

4.2.1. Replicació premeiótica del DNA

La replicació premeiótica depèn d'*Ime1*, que activa l'expressió dels gens primerencs que participen en la replicació i la profase meiótica. S'ha descrit que els gens estructurals bàsics que participen en la replicació mitòtica també són necessaris per la meiótica, per exemple *POL1* i *PR11* que codifiquen per la DNA polimerasa I i per la primasa, respectivament (Johnston *et al.*, 1990).

4.2.2. Profase meiótica

Gens implicats en reparació de dany en el DNA també són expressats durant la profase, doncs abans de la recombinació meiótica es produeixen dobles tallis en la cadena de DNA. Molts altres gens són específics de meiosi, tant en expressió com en funció, com és el cas dels gens que participen en la recombinació.

La formació del complex sinaptonèmic (SC) és un indicatiu de la recombinació entre cromosomes homòlegs. Es poden distingir diferents requeriments per al processament dels tallis en el DNA (recombinació) i l'alineament dels cromosomes utilitzant diferents mutants, però la formació del SC necessita molts dels gens que participen en la recombinació (Kupiec *et al.*, 1997).

4.2.3. Divisions meiótiques

La dotació 4N cromosòmica ha de ser distribuïda en quatre dotacions haploides (N) perfectes. Durant aquests processos s'expressen els gens mitjans, que hi participen junt amb alguns gens primerencs.

La primera divisió meiótica (divisió I o reduccional) és específica de meiosi, doncs es reparteixen en dues dotacions 2N els cromosomes homòlegs, quan en mitosi sempre es reparteixen cromàtides germanes. Un altre fet diferencial és l'inici d'una segona divisió (divisió II o equacional) sense que es doni una fase S entremig. En la segona divisió es reparteixen les cromàtides germanes en quatre dotacions N.

Les ciclines de tipus B (*Clb1-4*) o ciclines de fases G2 i M també participen en les divisions meiótiques. En mitosi la principal ciclina és *Clb2* i en meiosi són *Clb1* i *Clb4* les principals. *CLB2* s'expressa a nivells molt baixos i la seva delecció no produeix cap defecte en les divisions meiótiques (Grandin *and* Reed, 1993; Dahmann *and* Futcher, 1995). L'acció d'aquestes ciclines és igual que en mitosi, per associació amb *Cdc28* i essent l'activitat quinasa la que promou les divisions meiótiques. S'han fet estudis amb al·lèls termosensibles *cdc28* que s'aturen abans de la primera divisió meiótica. Quan aquests assajos es fan a temperatures més baixes es pot portar a terme la primera divisió meiótica, però no la segona, formant espores diploides (Shuster *and* Byers, 1989). Si en aquest cas se sobreexpressa el gen *SPO13*, implicat en la regulació de les divisions meiótiques, s'augmenta en un 50% el nombre de tétrades o d'espores haploides. Per aquest resultat i d'altres realitzats per sobreexpressió de *SPO13* durant meiosi (provoca un allargament de la primera divisió) i durant mitosi (provoca l'aturada en fase G2 o M dependent de l'activitat *Cdc28*) s'ha suggerit que *SPO13* pot tenir la seva funció en modular el pas a la primera divisió meiótica fins que els cromosomes han estat preparats per la divisió reduccional i per a

evitar una fase S entre les dues divisions, probablement potenciant l'acció de la Cdk (McCarroll *and* Esposito, 1994).

4.2.4. Formació d'espores

Quan les quatre dotacions haploides han estat separades comença l'embolcallament de cadascuna en una membrana citoplasmàtica que creix al voltant del pol del fus acromàtic amb la fusió de vesícules citoplasmàtiques i la incorporació de materials de la paret cel·lular al seu voltant. El nucli de l'espore prové de l'antic embolcall nuclear que es troba més apropat al pol.

Els gens tardans participen en la formació de les espores. Només dos gens han estat descrits com a mitjans-tardans, *DIT1* i *DIT2*, que s'expressen abans de tots els altres gens tardans. Tots aquests gens comencen a expressar-se al final de les divisions meiòtiques i durant la formació de la paret. Els gens *SPS1* i *SMK1* han estat implicats en la regulació de l'expressió d'aquests gens. *Sps1* és similar a serina/treonina quinases (*Ste20p*) i *Smk1* a MAP quinases (*Fus3p*). Mentre *Smk1* permet l'expressió de gens mitjans-tardans, *Sps1* la inhibeix i activa la dels gens tardans, on també hi participa *Smk1* (Friesen *et al.*, 1994; Krisack *et al.*, 1994).

4.3. Control de l'inici de meiosi

La meiosi només es pot donar en cèl·lules diploides a/α i en condicions de limitació nutricional amb una font de carboni no fermentable, ja que és en aquestes condicions quan es pot expressar el gen *IME1*, que activa l'expressió dels gens primerencs i d'*IME2*, necessaris per a realitzar la replicació premeiòtica i continuar el procés. Sense *IME1* no s'expressa cap gen meiòtic i s'atura completament el procés. Tot i que sobreexpressant *IME2* en mutants *ime1* es poden expressar la majoria de gens primerencs i es pot donar la meiosi, mai no hi ha la mateixa eficiència d'esporeulació com en la soca *IME1*.

4.3.1. Control transcripcional sobre *IME1*

El control transcripcional del gen *IME1* ve regulat per senyals dependents del tipus cel·lular ($a1/\alpha2$) i per senyals de limitació nutricional. En aquest últim aspecte es coneixen alguns gens que modulen l'expressió d'*IME1* però no el mecanisme molecular que segueixen.

Com ja hem exposat abans, el control per la diploïdia ve donat pel complex repressor $a1/\alpha2$ mitjançant el control de dos gens, *RME1* i *IME4*. D'altra banda, altres gens han estat implicats en l'activació transcripcional d'*IME1*, com són *MCK1* i *RIM1*.

RME1. És reprimat pel complex $a1/\alpha2$, per tant la seva expressió sempre està inhibida en cèl·lules diploides. L'expressió de *RME1* en cèl·lules haploides és activada pels factors *Swi5/Ace2*, amb un màxim en la transició M-G1. És un inhibidor transcripcional d'*IME1* i es coneix el motiu al que s'uneix en el promotor. El context on es troben aquestes caixes determina la funció de *RME1*, ja que és també un activador de l'expressió de *CLN2* durant G1 en haploides (Toone *et al.*, 1995). Quan es donen condicions de limitació nutricional *RME1* també és activat. En haploides això és de molta importància per a evitar l'expressió d'*IME1* en condicions de limitació nutricional (Covitz *and* Mitchell, 1993; Sagee *et al.*, 1998).

IME4. És expressat en cèl·lules a/α quan hi ha limitació nutricional. *IME4* sembla unir tots dos tipus de senyal per a activar la transcripció d'*IME1*. No se sap si és de forma directa o indirecta doncs no s'han trobat homologies amb altres proteïnes.

Segons el fons genètic, la manca d'*IME4* suposa més o menys efectes en la transcripció final d'*IME1* i per tant en la meiosi. Quan s'expressa *IME1* en un mutant *ime4* se suprimeixen els defectes fins la profase, però no hi ha una bona esporulació, el que indica un paper addicional d'*IME4* en el procés meiótic (Shah and Clancy, 1992).

MCK1. Codifica per una serina-treonina quinasa que participa en l'expressió del gen *IME1* i en la maduració de les espores (formació de la paret). És produïda a nivells constants independentment del tipus cel·lular i de nutrients (Neigeborn and Mitchell, 1991; Su and Mitchell, 1993). No es coneix el mecanisme d'activació sobre *IME1*.

RIM1. Codifica per una proteïna amb un domini de dit de zinc el que suggereix que podria tractar-se d'un factor transcripcional, però es desconeix la forma d'activar *IME1*. Rim1p existeix en dues formes que difereixen en 8kD. En mutants *rim8*, *rim9* i *rim13* s'ha vist que Rim1 no és modificada per proteolisi i només hi ha la forma més gran de la proteïna (Su and Mitchell, 1993; Li and Mitchell, 1997). El fenotip en meiosi de qualsevol dels mutants *rim8/9/13* o de *rim1* és el mateix: hi ha una baixa expressió del gen *IME1* i poca esporulació. Sobreexpressant *IME1* en aquests mutants es restableixen totes les funcions de meiosi, per tant sembla que la via *RIM1/8/9/13* només participa en l'expressió d'*IME1*.

RIM1 i *MCK1* estan sempre presents en el medi i donen una expressió basal del gen *IME1*, que es pot apreciar en medi ric amb acetat com a font de carboni. En glucosa aquest nivell és molt menor. Aquest any s'ha publicat un treball molt exhaustiu d'anàlisi dels diferents motius del promotor d'*IME1*, localitzant les zones susceptibles de regulació segons la font de carboni i la limitació de nitrogen que clarifica els diferents nivells basals que es poden tenir d'aquest gen segons el medi (Sagee *et al.*, 1998). En glucosa l'expressió d'*IME1* està molt reduïda però en acetat hi ha nivells basals constants del transcrit d'*IME1* que són activats en condicions limitants. Els nivells basals en acetat són deguts a l'acció dels factors Msn2 i Msn4 i l'expressió encara més forta en limitació de nitrogen a la regió UCS1 del promotor d'*IME1*, que està controlada per nitrogen, per factors encara desconeguts.

4.3.2. Control post-transcripcional sobre *IME1*

Quan parlem de control post-transcripcional ens referim als gens necessaris per l'activitat de la proteïna Ime1 en l'expressió dels gens primerencs.

El gen *UME6* és necessari per la repressió dels gens de meiosi en creixement vegetatiu i per la seva expressió durant la meiosi. Aquesta doble funció també la presenta en la regulació dels gens del catabolisme de l'arginina (Strich *et al.*, 1994). Ume6 és una proteïna d'unió a DNA que reconeix el motiu URS1 que es troba en els promotors de tots els gens primerencs. Molts gens primerencs també tenen altres seqüències que ajuden a l'activació transcripcional durant la meiosi. Aquestes són UASh i el motiu T4C. Poden estar presents totes dues o només una. Abf1p uneix la seqüència UASh per l'activació transcripcional (Gailus-Durner *et al.*, 1996). La funció repressora d'Ume6 requereix l'acció d'altres complexos de proteïnes, no específiques de meiosi. Ssn8(Ume3) i Ssn3(Ume5) formen part del complex holoenzim de la RNA polimerasa II inactivant-la. Ssn3 també participa en l'instabilitat dels transcrits de gens primerencs en medi amb glucosa (Surosky *et al.*, 1994). Sin3(Ume4) i Rpd3 interaccionen amb Ume6 durant el creixement vegetatiu. Aquest complex correspon a un co-repressor i a una histona-deacetilasa respectivament. També són necessàries per la repressió de molts altres gens no meiótics (Kadosh and Struhl, 1997). La relació entre acetilació/deacetilació de les histones amb la regulació transcripcional cada cop està més ben delimitada (Kadosh and Struhl, 1998).

La funció activadora d'Ume6 requereix la interacció amb Ime1. Llavors es necessita Ume6 com a subunitat d'unió al DNA i Ime1 com a activador de la transcripció dels gens primerencs (Rubin-Bejerano *et al.*, 1996). No hi ha referències de l'ordre exacte en que succeeix però és necessària la interacció amb Ime1p i que les altres proteïnes repressores es desuneixin del promotor on es troba Ume6. Un estudi recent descriu com la proteïna Ume3 és degradada ràpidament a l'inici de meiosi per permetre l'activació de gens primerencs (Cooper *et al.*, 1997), mentre que Sin3 i Rpd3 es desuneixen d'Ume6. Totes aquestes dades i altres amb retardaments sobre el motiu URS1 (Strich *et al.*, 1994), indiquen que els complexos presents en els promotors de gens primerencs i els mecanismes de control poden ser molt més complicats que els coneguts fins ara.

Recentment s'ha descrit com l'activitat de la proteïna Ume6 requereix la interacció amb Rim11, que també interacciona amb Ime1. Rim11, així com Rim15, són necessàries per a la interacció entre Ime1 i Ume6 (Bowdish *et al.*, 1994, Rubin-Bejerano *et al.*, 1996, Malathi *et al.*, 1997).

RIM11 codifica per una tirosina quinasa similar a Mck1 expressada constitutivament en qualsevol medi (Bowdish *et al.*, 1994). Rim11 pot interaccionar amb Ime1 i Ume6 per separat i les fosforila. No se sap si una vegada format el complex de totes dues proteïnes sobre els promotors meiòtics, encara hi és present (Malathi *et al.*, 1997). Com hem dit abans, el fenotip de la seva deleció és igual al de la deleció *ime1*, no hi ha expressió de gens primerencs ni cap esdeveniment meiòtic.

RIM15 codifica per una serina/treonina quinasa que participa en la interacció entre Ime1 i Ume6, disminuïda en la deleció *rim15* (Vidan and Mitchell 1997). *RIM15* és constitutivament expressat en medi ric amb acetat i disminueix durant les primeres hores de l'inici de meiosi. En glucosa la transcripció de *RIM15* és molt menor. Aquesta dada relaciona la incapacitat d'interacció entre Ime1 i Ume6 en presència d'aquesta font de carboni amb la falta d'una proteïna que ho permet. El fenotip de la deleció *rim15* és una expressió de gens primerencs molt baixa.

La interacció Ime1-Ume6 es pot donar en medi ric amb acetat i la limitació de nitrogen no augmenta l'eficiència de la interacció, el que indica que el major control d'aquesta interacció el té la font de carboni, permetent la formació del complex en una font de carboni respirable i inhibint la interacció en presència de glucosa, segurament reprimint *RIM15*.

Un efecte comú de les delecions *ume6*, *rim11* i *rim15* és una disminució de la transcripció d'*IME1* i quan és sobreexpressat no es pot recuperar el fenotip de baixa transcripció de gens primerencs, el que demostra que *UME6*, *RIM11* i *RIM15* són necessaris per l'activitat de la proteïna Ime1. De fet en mutants *ume6* la transcripció d'*IME1* en creixement vegetatiu també està desreprimida com els gens primerencs. Aquests experiments han suggerit una autoactivació d'*IME1*, però no s'ha trobat cap caixa URS1 en el seu promotor que relacionés la necessitat de totes aquestes proteïnes per a la màxima expressió d'*IME1* (Bowdish *et al.*, 1994; Bowdish *et al.*, 1995; Vidan and Mitchell, 1997). Sembla que el pic d'expressió d'*IME1* durant la meiosi podria dependre d'aquesta autoactivació (Shefer-Vaida *et al.*, 1995) que també es donaria en condicions de medi ric amb acetat. Altres estudis suggereixen endemés una regulació traduccional on la síntesi d'Ime1 estaria potenciada en condicions de limitació de nitrogen (Sherman *et al.*, 1993).

En resum, l'inici de la transcripció d'*IME1* està regulada molt estrictament en condicions de limitació nutricional. Un cop s'ha sintetitzat Ime1 es dona l'activació dels gens primerencs meiòtics a través del motiu URS1 dels promotors, on la seva interacció amb Ume6, depenent de les quinases Rim11 i Rim15, és essencial. La síntesi d'Ime1 podria ser molt més eficient en el medi limitat de nutrients i la proteïna

Ime1 podria activar la seva pròpia expressió provocant un pic d'*IME1* durant l'inici de meiosi.

Com ja hem dit la meiosi s'inicia des d'una aturada del cicle en la fase G1. Aquesta aturada és un requisit indispensable però mai no s'ha estudiat quina interrelació poden tenir els cicles mitòtic i meiòtic. Quan es torna a afegir nutrients al medi, les cèl·lules que ja han iniciat la meiosi però que es troben abans de la primera divisió meiòtica, poden tornar al cicle mitòtic i quan es sobrepassa aquest punt ja no és possible tornar, pel que s'anomena el punt de compromís de meiosi. Els mutants que no poden formar espores retornen al cicle mitòtic en presència de nutrients quan ja s'han donat les divisions meiòtiques (Honigberg *and* Esposito, 1994). La presència de nutrients sembla induir un canvi de cicle, activant l'inici de la mitosi i inhibint la meiosi, però no s'ha estudiat a nivell molecular quin efecte hi ha sobre els gens meiòtics i mitòtics en l'inici de la meiosi, quan sembla haver-hi una exclusió entre tots dos cicles.

5. OBJECTIUS

1. **Analitzar l'aturada del cicle en fase G1 per limitació nutricional.** Utilitzarem com a model la limitació de font de nitrogen. Se sap molt poc de la regulació del cicle cel·lular per part dels nutrients, tot i que s'han fet estudis amb la via Ras/cAMP i la via mediada per les proteïnes Tor que la relacionen amb la síntesi proteica. Hem escollit el model de limitació de nitrogen per la importància que té com a nutrient, doncs causa els efectes més ràpids en limitació per la seva relació directa amb la síntesi proteica, i perquè no es coneix quin mecanisme pot estar determinant l'aturada en la fase G1 del cicle. Estudiarem la possible regulació dels gens de cicle de la fase G1 en el model descrit, a nivell transcripcional mitjançant *northern* i post-transcripcional amb *western* i comprovant la vida mitjana de les proteïnes amb experiments de *pulse-chase*, sobretot per a les ciclines ja que la degradació és un mecanisme important de regulació durant el cicle.

2. **Avaluar la resposta quantitativa de mètodes quimioluminiscent.** En mètodes no radioactius de *northern* es compararan l'exposició en film de fotografia i l'exposició en el Lumi-Imager, i es compararan dos substrats quimioluminiscent diferents en la quantificació per *western*.

3. **Estudiar la resposta de diferenciació de meiosi en condicions de limitació nutricional en cèl·lules diploides.** Descriurem el model d'entrada en meiosi des d'una aturada del cicle en la fase G1. Les cèl·lules diploides per a iniciar aquest cicle han d'induir tota una sèrie de gens específics i molts d'ells únics de meiosi, però l'aturada en la fase G1 del cicle també és un requisit per aquest inici. Estudiarem la regulació transcripcional i post-transcripcional de les ciclines de fase G1 en l'inici de la meiosi, que depèn d'Ime1, i la possible relació d'aquest activador amb les ciclines G1 mitjançant la utilització de mutants *ime1* i *cln*, ja que tots depenen de senyals nutricionals per a la seva expressió i/o activitat, encara que són afectats de forma contrària pel mateix senyal. Finalment intentarem determinar els possibles mecanismes que sotmetin l'activitat d'Ime1 a les ciclines G1, bé a nivell transcripcional o post-transcripcional, i si aquests mecanismes impliquen que la meiosi i la mitosi siguin dues opcions excloents per a *S. cerevisiae*.

RESULTATS

The Cln3 cyclin is down-regulated by translational repression and degradation during the G₁ arrest caused by nitrogen deprivation in budding yeast

Carme Gallego, Eloi Garí, Neus Colomina, Enrique Herrero and Martí Aldea¹

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de Lleida, Rovira Roure 44, 25198 Lleida, Catalunya, Spain

¹Corresponding author
e-mail: marti.aldea@cmb.udl.es

Nutrients are among the most important trophic factors in all organisms. When deprived of essential nutrients, yeast cells use accumulated reserves to complete the current cycle and arrest in the following G₁ phase. We show here that the Cln3 cyclin, which has a key role in the timely activation of SBF (Swi4–Swi6)- and MBF (Mbp1–Swi6)-dependent promoters in late G₁, is down-regulated rapidly at a post-transcriptional level in cells deprived of the nitrogen source. In addition to the fact that Cln3 is degraded faster by ubiquitin-dependent mechanisms, we have found that translation of the CLN3 mRNA is repressed ~8-fold under nitrogen deprivation conditions. As a consequence, both SBF- and MBF-dependent expression is strongly down-regulated. Mainly because of their transcriptional dependence on SBF, and perhaps with the contribution of similar post-transcriptional mechanisms to those found for Cln3, the G₁ cyclins Cln1 and 2 become undetectable in starved cells. The complete loss of Cln cyclins and the sustained presence of the Clb-cyclin kinase inhibitor Sic1 in starved cells may provide the molecular basis for the G₁ arrest caused by nitrogen deprivation.

Keywords: cell cycle regulation/G₁ cyclins/nutrients/yeast

Introduction

The budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a model system to study the regulatory networks that link cell cycle progression to cell growth. Like most other eukaryotes, budding yeast cells take developmental decisions during the G₁ phase of the cycle (Pringle and Hartwell, 1981). Haploid cells arrest temporarily in G₁ in response to sexual pheromones and, after conjugation, enter a diploid cell cycle. Both haploid and diploid cells also arrest in G₁ under nutrient starvation conditions. While diploid cells proceed into a meiotic cycle and finally sporulate, haploid cells suffer multiple metabolic adaptations for survival and become quiescent by entering a G₀ state. The molecular pathway by which sexual pheromones cause a G₁ arrest has been characterized in great detail (reviewed by Herskowitz, 1995). In contrast, little is known about the mechanisms that arrest yeast cells in G₁ when they are deprived of nutrients.

Commitment to divide takes place in late G₁, at a point called Start, where three essential processes of the cell cycle are initiated: budding, spindle-pole body duplication and DNA replication. The budding yeast cyclin-dependent kinase, Cdc28, associated with the Cln3 cyclin seems to be the most upstream activator of Start, and acts as a potent inducer of two distinct transcriptional complexes, SBF (Swi4–Swi6) and MBF (Mbp1–Swi6) (Tyers *et al.*, 1993; Dirick *et al.*, 1995; Stuart and Wittenberg, 1995; Levine *et al.*, 1996). While Swi6 plays a regulatory role in both complexes, Swi4 and Mbp1 constitute the DNA-binding proteins of SBF and MBF, respectively (Andrews and Herskowitz, 1989; Lowndes *et al.*, 1991, 1992; Primig *et al.*, 1992; Koch *et al.*, 1993). Transcription of four G₁ cyclin genes, *CLN1* and 2 and *PCL1* and 2, and the *HO* endonuclease, which is required for mating-type interconversion, is activated by SBF while, on the other hand, two B-type cyclins, *CLB5* and 6, the *SWI4* gene and several genes involved in DNA synthesis such as *POL1*, *RNR1* and *TMP1* are under the transcriptional control of MBF (reviewed by Koch and Nasmyth, 1994; Cross, 1995). While Cln1 and 2 are involved mainly in initiating budding (Benton *et al.*, 1993; Cvrcková and Nasmyth, 1993), the Clb5 and 6 cyclins are specially required for initiation of DNA replication (Epstein and Cross, 1992; Schwob and Nasmyth, 1993). Clb5,6–Cdc28 active complexes appear during the G₁–S transition as a result of Cln cyclin accumulation by two different mechanisms, thus providing a way to coordinate S-phase entry and budding initiation. First, Clb degradation initiated during exit from the previous mitosis is inhibited by Cln cyclins (Amon *et al.*, 1994). Second, degradation of Sic1, which inhibits Clb5,6–Cdc28 complexes, is triggered by Cln–Cdc28 kinase activity (Schwob *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1996).

The Ras-cAMP pathway has been implicated in coordinating cell cycle progression and cell growth, although with apparently conflicting roles. When starved cells are re-fed, transcriptional activation of *CLN1* and 2 during the first Start event depends on cAMP, which suggests that the Ras-cAMP pathway has a positive role in cell cycle progression (Huble *et al.*, 1993). On the contrary, cAMP exerts a repressor effect on *CLN1* and 2 transcription, implicating this pathway in regulating cell size under different growth conditions (Baroni *et al.*, 1994; Tokiwa *et al.*, 1994). Perhaps cAMP-dependent mechanisms operate with opposite effects at distinct molecular steps of transcriptional activation of *CLN1* and 2, i.e. attainment of a threshold Cln3 level and, on the other hand, SBF activation. Nevertheless, these reports do not address the question as to whether the Ras-cAMP pathway is involved in arresting cells in G₁ under starvation conditions. Although cells deficient in Ras-cAMP activity arrest in G₁, they also stop growing, thus making it difficult to

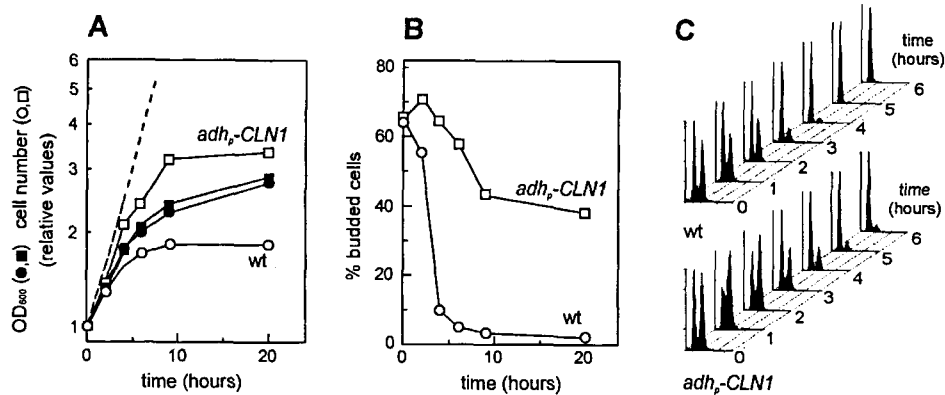


Fig. 1. Unregulated *CLN1* expression perturbs the G_1 arrest caused by nitrogen deprivation. CML128 [YCplac22] (wt, circles) and CML128 [pCM64] (*adh₁-CLN1*, squares) cells were deprived of nitrogen at time 0. (A) Cell growth (closed symbols) and cell number (open symbols) kinetics. The broken line indicates the growth rate in the presence of the nitrogen source. (B) Budding indexes. (C) DNA content distributions.

establish a direct role for this pathway in cell cycle arrest. Moreover, activation of the Ras-cAMP pathway does not prevent repression of *CLN2* and *HO* transcription in cells deprived of nitrogen (Markwardt *et al.*, 1995). A rapamycin-sensitive pathway mediated by the Tor1 and 2 phosphatidylinositol kinases has been involved in regulating early G_1 progression by nutrient limitation through control of translation initiation (Barbet *et al.*, 1996; Di Como and Arndt, 1996). Inhibition of Tor function by rapamycin causes a strong reduction in translation initiation and a G_1 arrest that can be suppressed by *CLN3* overexpression (Barbet *et al.*, 1996). However, as cell growth is seriously impaired, it is again difficult to establish a direct relationship between Tor activity and cell cycle progression.

Here we show that the G_1 arrest caused by nitrogen deprivation is mediated by down-regulation of *CLN3* at a post-transcriptional level. In addition to the fact that the Cln3 protein becomes more unstable, we have found that translation of the *CLN3* mRNA is repressed rapidly upon nitrogen deprivation and, as a consequence, SBF- and MBF-dependent transcription is also down-regulated.

Results

The G_1 arrest caused by nitrogen deprivation may involve active mechanisms to down-regulate Cln activity

When exponentially growing yeast cells were transferred to minimal media without the nitrogen source, both growth and division rates slowly declined, while cells arrested in G_1 as determined by DNA contents and budding index (Figure 1). We have obtained totally comparable results in three different strain backgrounds (EG123, W303 and S288C), being also independent of the presence of amino acid auxotrophic markers (data not shown). The relative increase in cell mass was always higher than that corresponding to the cell number, suggesting that the cell cycle arrest was not merely a consequence of an inability to meet the growth requirements of the G_1 -S transition.

As Cln cyclins play a fundamental role in the G_1 -S transition, we first asked whether the G_1 arrest caused by nitrogen deprivation requires a down-regulation of the activity of these G_1 cyclins. Figure 1 shows the cell cycle arrest kinetics of cells expressing *CLN1* from a mild

constitutive promoter. While the relative increase in cell mass was unaffected, the cell number increase was much higher compared with the wild-type, indicating that most cells were able to complete one additional cell cycle under these conditions. Moreover, the high final budding index and the clear delay observed in the accumulation of cells with 1N DNA content indicate that *CLN1* transcriptional down-regulation may be essential in order to achieve a proper G_1 arrest under nitrogen deprivation conditions.

To characterize further the apparent uncoupling of cell growth and cell cycle kinetics observed in starved cultures, small early G_1 cells were released into minimal media with or without the nitrogen source, and cell volume, budding indexes and DNA content distributions were monitored (Figure 2). Under starvation conditions, these cells showed a first cycle G_1 arrest while cell volume increased clearly above 51 fl, the average budding cell volume (i.e. the small-budded mother cell volume) in the non-starved culture. Taken together, these results strongly suggest that the G_1 arrest caused by nitrogen deprivation is mediated by specific mechanisms, some of them involving the down-regulation of Cln proteins, and cannot simply be explained as a passive consequence of a growth arrest that would prevent cells from reaching the critical cell volume to bud and initiate S phase.

SBF- and MBF-driven expression is repressed owing to intrinsic cell cycle mechanisms

Since constitutive expression of *CLN1* prevented a proper G_1 arrest, we asked whether nitrogen deprivation causes a transcriptional down-regulation of those genes known to be induced during the G_1 -S transition. Figure 3A shows that transcript levels of SBF- and MBF-driven genes decreased between 2 and 4 h after nitrogen deprivation, at a time when most cells accumulated in G_1 . In contrast, transcript levels of *CLN3*, *SWI6* and *MBP1*, which do not oscillate much through the cell cycle, remained constant. Finally, *SIC1* mRNA levels slightly increased during the first hours after nitrogen deprivation. Comparable results were obtained in W303-1A, an independent background strain (data not shown).

The observed repression of SBF- and MBF-driven genes initially could be explained by two different mechanisms: (i) a specific repression of SBF- and MBF-dependent promoters by a *trans*-acting factor modulated by a nutrient

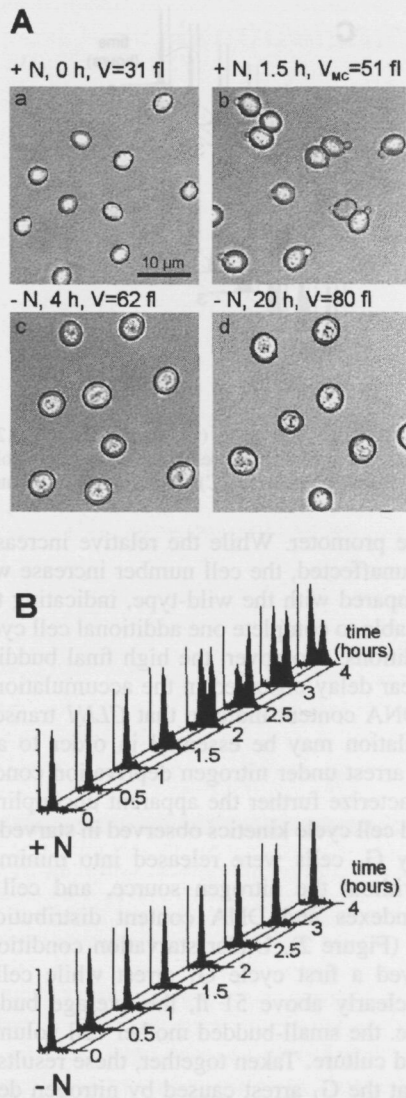


Fig. 2. G_1 cells arrested by nitrogen deprivation are able to grow past the critical volume for budding. (A) Small early G_1 CML128 (wt) cells were inoculated into minimal medium with (+N) or without (-N) the nitrogen source and samples were taken at the indicated time points to obtain the average total cell volume (V) or the small-budded mother cell volume (V_{MC}). (B) DNA content distributions.

signaling pathway; or (ii) as a direct consequence of a G_1 arrest prior to the induction of those promoters. In preliminary experiments with strains lacking Swi6, where *CLB5* is constitutively expressed during the cell cycle (Schwob and Nasmyth, 1993), we observed that this gene was not repressed at all during nitrogen deprivation (data not shown), thus favoring the latter hypothesis. However, this result does not rule out the possibility of a specific repressor linked to a nutrient signaling pathway, since it still could require or involve the Swi6 protein in order to exert its repressor function. To test these two different possibilities further, we used cells arrested with moderate or high *CLN1*, *CLN2* and *CLB5* transcript levels and asked whether nitrogen deprivation could still repress their expression. Figure 3B shows that *cdc28-13* cells arrested at the restrictive temperature for 2 h prior to starvation were not able to down-regulate *CLN1*, *CLN2* and *CLB5* transcription further when deprived of nitrogen. Very

similar results were obtained with a thermosensitive mutation in the *CDC34* gene (data not shown), which is not involved in the transcriptional activation of those genes during the cell cycle. To avoid the heat shock produced when testing thermosensitive strains, we used hydroxyurea-arrested cells and obtained comparable results (Figure 3C). These data strongly argue against the existence of a specific repressor mechanism and favor the idea that SBF- and MBF-dependent promoters are repressed in starved cells by the mechanisms that operate during G_2 and M phases, as these cells complete their cycle and accumulate in the next G_1 before they can activate SBF- and MBF-dependent promoters again.

The *Cln3* protein is lost rapidly in starved cells

Cln3 plays a key role in transcriptional activation of SBF- and MBF-driven genes in late G_1 (Tyers *et al.*, 1993; Dirick *et al.*, 1995; Stuart and Wittenberg, 1995). To test the possibility that nitrogen deprivation might prevent activation of SBF- and MBF-dependent promoters by down-regulating this protein, we used a triple hemagglutinin (HA)-tagged construct to determine *Cln3* levels by immunoblotting techniques in extracts obtained from starved cells. Figure 4B shows that *Cln3* protein levels decreased sharply during the first 2 h after nitrogen deprivation. As cells maintained invariable levels of the *CLN3* transcript for a much longer period of time (Figure 3A), this result suggested that *CLN3* is down-regulated by post-transcriptional mechanisms when cells are deprived of nitrogen.

None of the components of SBF and MBF was clearly down-regulated at the protein level during the first 6 h after nitrogen deprivation (Figure 4C). In addition, the amount of Cdc28 also did not change significantly. These results support the idea that nitrogen deprivation down-regulates SBF and MBF activity as a result of the loss of *Cln3*, which would prevent their activation in late G_1 . Accordingly, expression of *CLN3* from a tetracycline-regulatable promoter (see below) was able to suppress *CLN1* repression in starved cells (data not shown).

Levels of other G_1 cyclins, *Cln1*, *Cln2* and *Clb5*, decreased as expected from their transcript kinetics (Figure 4B). Although the respective mRNAs always showed easily detectable residual levels at 4 h after nitrogen deprivation, these proteins could not be detected even in highly exposed films. Those results suggest that these G_1 cyclins are also down-regulated by post-transcriptional mechanisms in starved cells. Sic1 protein levels did not change significantly during the starvation period analyzed. As a triple *cln* mutant is not able to traverse the G_1 -S transition unless Sic1 is removed (Schneider *et al.*, 1996), the absence of *Cln* proteins and the sustained presence of Sic1 could explain the G_1 arrest produced by nitrogen deprivation in terms of molecular requirements.

***CLN3* is down-regulated at a post-transcriptional level**

Cln3 is a very unstable protein (Cross and Blake, 1993; Yaglom *et al.*, 1995) and, for this reason, its cellular contents should be extremely sensitive to the overall protein synthesis rate, as opposed to very stable proteins that adjust their levels very slowly to new steady-state conditions. To determine whether the observed decrease

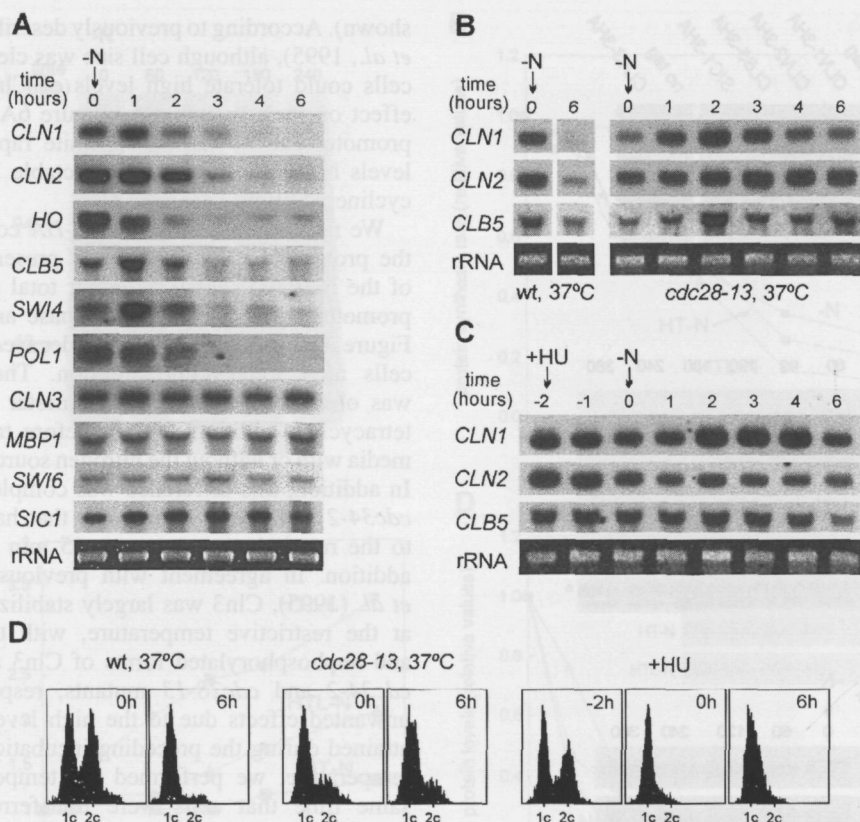


Fig. 3. SBF- and MBF-driven gene expression is down-regulated by nitrogen deprivation by regular cell cycle mechanisms as cells arrest in G_1 . (A) CML128 (wt) cells were deprived of the nitrogen source at time 0 and samples were taken at different time points to analyze transcript levels by Northern blot with the indicated probes. (B) CML128 (wt) and CML198 (*cdc28-13*) cells previously transferred at 37°C during 2 h were deprived of nitrogen at time 0 and kept at 37°C during the course of the experiment. (C) CML128 (wt) cells were arrested in early S-phase with hydroxyurea for 2 h and then deprived of the nitrogen source in the continued presence of hydroxyurea. (D) DNA content distributions of samples corresponding to (B) and (C) for the indicated time points.

in Cln3 protein levels in starved cells could be explained by an equivalent decrease in the translational efficiency of the cell, we measured the overall protein synthesis rate by pulse-labeling analysis during nitrogen deprivation conditions. Figure 5A shows the protein synthesis patterns on SDS-PAGE from cells pulse-labeled under semi-quantitative conditions during nitrogen deprivation. Although the overall protein synthesis rate decreased during the first 2 h of starvation, this decrease could not explain the complete loss of Cln3 protein observed under these conditions (Figure 4B). On the other hand, the synthesis of some proteins was clearly induced 2 h after nitrogen deprivation, indicating that yeast cells sense starvation and adjust their expression requirements well before cell growth becomes seriously impaired.

As a very careful measurement of the overall translation rate by pulse-labeling was required, we first determined the minimal total extracellular concentration of sulfur-containing amino acids required to override the effects produced by changes in amino acid intracellular pools and uptake rates during the starvation period (see Materials and methods). Independently of the amino acid requirements of the strain used, the overall protein synthesis rate decayed slowly during the first 4 h after nitrogen deprivation (Figure 5B), which agrees with the slow decrease in growth rate observed under these conditions (Figure 1A). In contrast, Cln3 levels decreased much faster, becoming almost undetectable 2 h after nitrogen deprivation (Figure

5D), when translation efficiency had only decreased ~2-fold under the three conditions analyzed. In addition, while the decay in protein synthesis rate did not change much, the rate of Cln3 loss was faster when the strain used had no amino acid requirements. Totally comparable results were obtained in CML213 cells, a S288C-related strain (data not shown). These observations rule out the possibility that Cln3 down-regulation could be influenced by the presence of amino acid auxotrophic markers in some of the strains used. Moreover, amino acid depletion as measured by translational induction of *GCN4* was not detectable until 3 h after nitrogen starvation (Figure 5C), while Cln3 levels had dropped to undetectable levels much earlier. Thus, the observed loss of Cln3 in starved cells cannot be explained simply as a result of the decay in the overall protein synthesis rate, implying the existence of post-transcriptional mechanisms that down-regulate Cln3 levels when cells are deprived of the nitrogen source.

Cln3 becomes more unstable under nitrogen deprivation conditions

Programmed cyclin destruction occurs in both the G_1 -S transition (Blondel and Mann, 1996) and exit from mitosis (Surana *et al.*, 1993). In addition, turnover of both Cln1 and Cln2 depends on *GRR1*, a gene that is involved in nutrient uptake pathways (Barral *et al.*, 1995). Thus, we decided to test whether the post-transcriptional down-

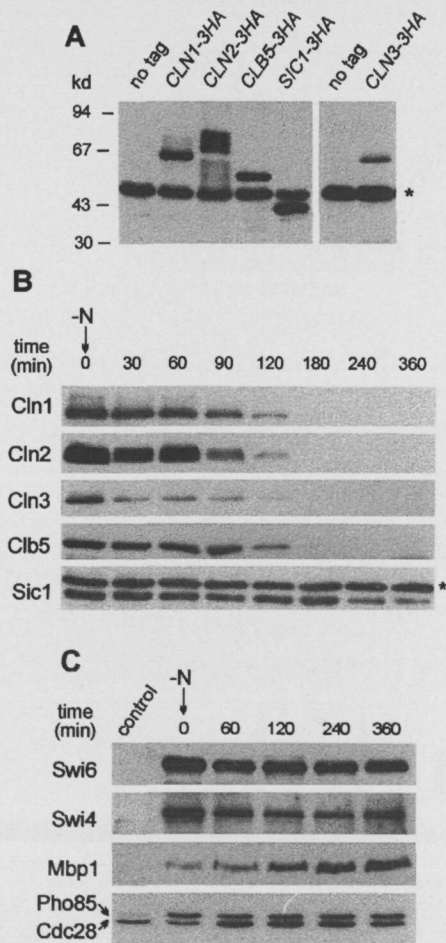


Fig. 4. G₁ cyclin proteins are lost rapidly in starved cells. (A) Western blot of HA-tagged proteins in cell extracts from CML128 (no tag), CML210 (*CLN1-3HA*), CML204 (*CLN2-3HA*), CML203 (*CLN3-3HA*), CML206 (*CLB5-3HA*) and CML208 (*SIC1-3HA*). A non-specific band that cross-reacts with the 12CA5 antibody is indicated with an asterisk. (B) Cells carrying the different HA-tagged proteins were deprived of nitrogen at time 0 and samples were taken at the indicated time points for Western blot analysis with the α -HA 12CA5 monoclonal antibody. (C) Cell extracts of CML128 [pMBP1-HA] during nitrogen deprivation conditions were analyzed by Western blot to detect Swi6, Swi4, Mbp1 and Cdc28 with α -Swi6, α -Swi4, α -HA and α -PSTAIRES antibodies, respectively. CML141 (Δ *swi6::TRP1*), K1939 (Δ *swi4::LEU2*; K.Nasmyth), CML128 (wt) and CML225 (Δ *pho85::kan^r*) cell extracts were used as controls.

regulation of Cln3 levels during nitrogen deprivation could be due to an increased turnover of the protein.

We recently have adapted to yeast cells (Garí et al., 1997) a regulatable promoter system, initially developed for higher eukaryotic cells, that is mediated by a tetracycline-repressible transactivator protein (Gossen and Bujard, 1992). Repression of this promoter system by tetracycline does not involve any metabolic changes to yeast cells and does not affect their growth rate, making it especially suitable for manipulating gene expression to study nutrient-dependent regulatory mechanisms. After fusing the HA-tagged Cln3 to the *tet* promoter, we first determined that Cln3 levels responded perfectly to the tetracycline concentration under steady-state conditions, which resulted in ~20-fold the wild-type levels with no tetracycline added to the medium, and almost undetectable levels in the presence of 2 μ g/ml tetracycline (data not

shown). According to previously described results (Yaglom et al., 1995), although cell size was clearly reduced, yeast cells could tolerate high levels of Cln3 protein with no effect on their growth rate. Figure 6A shows that the *tet* promoter can be turned off quite rapidly, the transcript levels becoming almost undetectable 30 min after tetracycline addition.

We next used the *tetp-CLN3-HA* construct to estimate the protein turnover rate in the presence or the absence of the nitrogen source by either total protein decay after promoter repression or pulse-chase analysis. As seen in Figure 6, Cln3 protein levels decayed faster in starved cells after tetracycline addition. The same difference was observed when the *tet* promoter was turned off by tetracycline addition 15 min before transferring cells to media with or without the nitrogen source (data not shown). In addition, this difference was completely suppressed in *cdc34-2* and *cdc28-13* mutants that had been transferred to the restrictive temperature 45 min before tetracycline addition. In agreement with previous work by Yaglom et al. (1995), Cln3 was largely stabilized in both mutants at the restrictive temperature, with the phosphorylated and unphosphorylated forms of Cln3 accumulated in the *cdc34-2* and *cdc28-13* mutants, respectively. To avoid unwanted effects due to the high levels of Cln3 protein attained during the preceding incubation at the restrictive temperature, we performed the temperature shift at the same time that cells were transferred to media with tetracycline in the presence or absence of the nitrogen source, and comparable results were obtained (data not shown). Thus, the faster turnover of Cln3 observed under nitrogen deprivation would be mediated by the same ubiquitin-dependent mechanisms that operate under regular growth conditions. However, assuming that Cln3 turnover follows either first- or second-order reaction kinetics, the moderate differences in protein stability could not explain the total loss of Cln3 observed in starved cells as *CLN3* is constantly expressed from its natural promoter sequences, suggesting the existence of additional post-transcriptional mechanisms.

***CLN3* mRNA translation is repressed by nitrogen deprivation**

Due to the differences observed in protein turnover and to the fact that Cln3 protein levels decrease very rapidly under nitrogen deprivation conditions, an unequivocal assessment of translational repression mechanisms by pulse-labeling and immunoprecipitation would not be possible in wild-type cells. For this reason, we decided to take advantage of (i) the high Cln3 stability that we had observed in both starved and non-starved *cdc28-11* cells at the restrictive temperature; and (ii) the prediction that these cells should accumulate high Cln3 protein levels very rapidly after transfer to the restrictive temperature under otherwise normal growth conditions.

As expected, *cdc28-13* cells accumulated very high levels of Cln3 protein over a period of 3 h after the transfer to the restrictive temperature in the presence of the nitrogen source (Figure 7A), and this accumulation was not due to a concomitant increase in the mRNA levels. On the contrary, while *CLN3* mRNA levels behaved similarly, these cells were not able to accumulate Cln3 at all under nitrogen deprivation conditions. Comparable

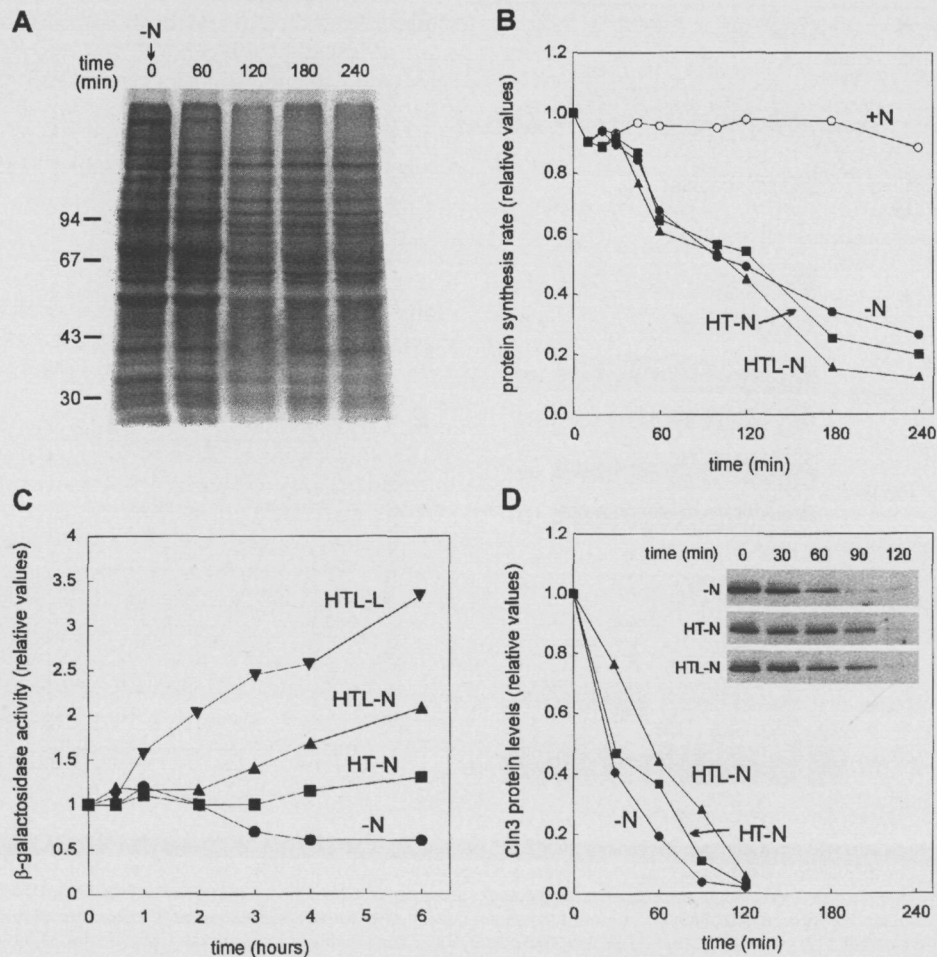


Fig. 5. Down-regulation of *CLN3* occurs at a post-transcriptional level. *CLN3-3HA* cells having different amino acid requirements, CML203 (histidine, tryptophan and leucine, HTL, triangles), CML133 [pCM194] (histidine and tryptophan, HT, squares) and CML232 [pCM194] (none, circles), were transferred to media with (+N, open symbols) or without the nitrogen source (-N, closed symbols) at time 0. (A) Autoradiography of an SDS gel loaded with total protein extracts of pulse-labeled CML203 cells. (B) Overall protein synthesis rate measured by pulse labeling. (C) *GCN4* induction kinetics. Strains mentioned above were transformed with p180 (*GCN4::lacZ*), and β -galactosidase units were determined. CML203 [p180] cells were deprived of leucine at time 0 as a control (-L, \blacktriangledown). (D) Cln3 protein levels obtained by Western blot analysis (insert) were quantified as values relative to time 0.

results were obtained in our prototrophic strain CML234 (data not shown). Protein stability was determined in *cdc28-13* cells at the restrictive temperature for a period of 3 h and, in agreement with the results shown in Figure 6, we found no differences in the protein half-life obtained in the presence or absence of the nitrogen source (data not shown). Moreover, the relative overall protein synthesis rate decreased slowly during nitrogen deprivation (Figure 7C), in a way very similar to that shown in Figure 5B for wild-type cells at 30°C. Thus, the inability of starved *cdc28-13* cells to accumulate Cln3 could only be explained as a result of a translational repression of the *CLN3* mRNA. Comparable relative differences in Cln3 accumulation were also obtained in a *cdc34-2* mutant derived from W303 (data not shown), excluding the unlikely possibility that the observed translational repression effect could be exerted in an indirect way by the *cdc28-13* mutation. To evaluate the extent of this translational repression, we measured Cln3 protein synthesis rate by pulse-labeling analysis 2 h after transfer of *cdc28-13* cells to the restrictive temperature, in the presence or absence of the nitrogen source. As shown in Figure 7D, nitrogen

deprivation caused a net 8-fold reduction in the Cln3 protein synthesis rate. Thus, although nitrogen deprivation causes a moderate increase in its turnover rate, Cln3 loss in starved cells is due mainly to a specific translational repression mechanism.

Discussion

Cell cycle control by trophic factors has a key role in regulation of cell proliferation in all organisms. Nutrients are among the most important trophic factors for yeast cells and, hence, mechanisms must exist that couple nutrient availability to cell cycle crucial transitions. When deprived of essential nutrients, *Saccharomyces cerevisiae* haploid cells use nutritional stores to complete the current cycle and arrest in the following G₁ phase. We have found that nitrogen-deprived G₁-arrested cells are able to grow, reaching a volume much larger than the average budding volume of non-starved cells. This observation suggests the existence of specific mechanisms causing a G₁ arrest when cells are nutritionally deprived, even under condi-

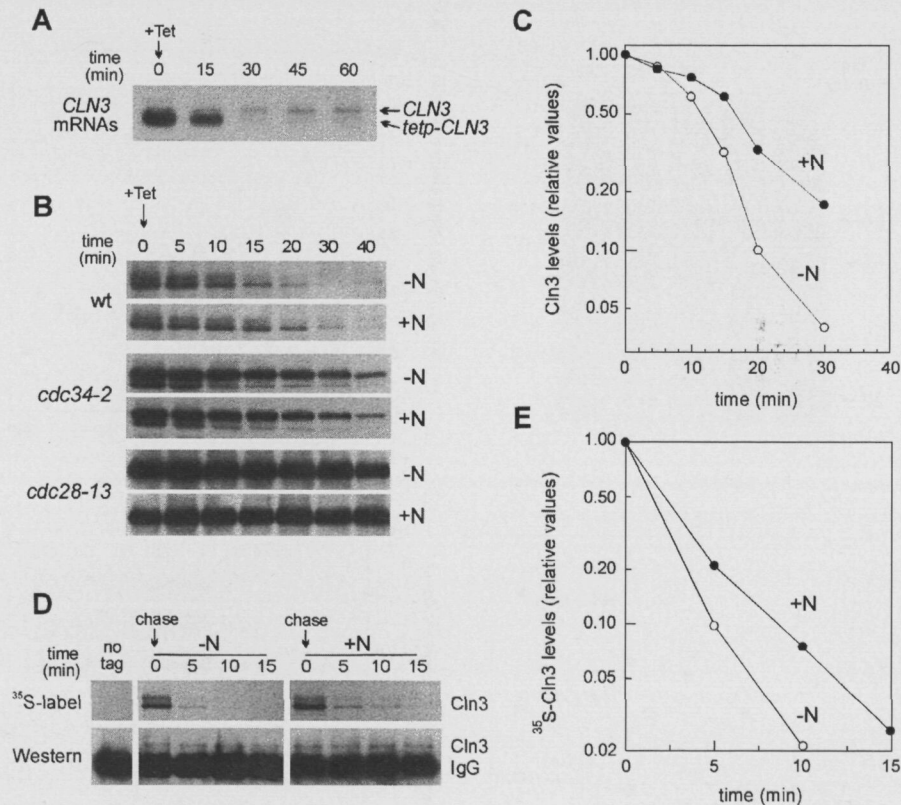


Fig. 6. Cln3 becomes more unstable upon nitrogen deprivation. CML133 (wild-type), CML200 (*cdc28-13*) and HTY600 (*cdc34-2*) cells carrying the *CLN3-3HA* construct under the control of the tetracycline-repressible *tetO₂* promoter (pCM166), were transferred to media with (+N, ●) or without (-N, ○) the nitrogen source at time 0. (A) Repression kinetics of the *tetO₂* promoter in CML133 [pCM166] after tetracycline (Tet) addition as determined by Northern blot. (B) Western blot analysis of Cln3 total protein decay after tetracycline addition. (C) Quantification of Cln3 bands shown in (B) for wild-type CML133 [pCM166] cells. (D) Pulse-chase analysis of Cln3 stability in wild-type CML133 [pCM166] cells as described in Materials and methods. CML133 [YCplac33] cells were labeled and used as the negative control for immunoprecipitation (no tag). (E) Quantification of radioactivity in Cln3 bands shown in (D).

tions where the critical cell mass for budding seems to be largely surpassed.

One of the landmarks of the G_1 -S transition is the transcriptional activation of a set of genes regulated by two transcriptional factors with distinct DNA-binding moieties, SBF and MBF (Nasmyth, 1996). As expected from a G_1 arrest, we show here that SBF- and MBF-dependent gene expression is repressed under nitrogen deprivation conditions. Cells expressing hyperstable alleles of *CLN2* do not arrest properly in G_1 when deprived of the nitrogen source, with many cells remaining in a budded state (Hadwiger et al., 1989; Lanker et al., 1996). Consistent with these results, we have found that constitutive expression of *CLN1* causes very similar effects, implying that proper regulation of *CLN* activity is required to arrest cells in G_1 by nutrient deprivation.

Repression of SBF- and MBF-dependent transcription occurs during G_2 and M phases in actively growing cells (Amon et al., 1993; Koch et al., 1996). Starved cells use their nutrient stores to complete the current cycle and arrest in the next G_1 . If the G_1 arrest takes place before activation of SBF and MBF, cells should accumulate in G_1 , with very low levels of transcripts expressed by these transcriptional factors. Alternatively, nitrogen deprivation could cause a direct repression of SBF and MBF, thus blocking cells before entering S-phase. We have shown that cells blocked at the G_1 -S transition (*cdc28-13* and

cdc34-2 mutants at the restrictive temperature) or in early S-phase (after hydroxyurea addition) with moderate or high levels of *CLN1*, *CLN2* and *CLB5* transcripts are not able to down-regulate these transcripts when deprived of nitrogen, implying that nitrogen deprivation does not cause a direct repression of SBF and MBF. Rather, nitrogen-deprived cells arrest in G_1 before SBF and MBF activation takes place in late G_1 .

Cln3 is a potent G_1 cyclin regarding the timely activation of SBF- and MBF-dependent promoters in late G_1 (Tyers et al., 1993; Dirick et al., 1995; Stuart and Wittenberg, 1995), and raising its cellular contents by either increased transcription or altered protein turnover has profound effects on cell size (Nash et al., 1988; Yaglom et al., 1995). Although neither mRNA nor protein levels oscillate much during the G_1 -S transition (Wittenberg et al., 1990; Cross and Blake, 1993; Tyers et al., 1993; McInerney et al., 1997), those properties suggest that subtle differences in the Cln3 accumulation rate during G_1 could be the intracellular parameter by which cells assess growth conditions before traversing the G_1 -S transition. Consistent with this role, Cln3 is an extremely short-lived protein (Cross and Blake, 1993; Yaglom et al., 1995) and, hence, its levels may respond rapidly to changes in the overall protein synthesis rate. Thus, a simple model to explain the G_1 arrest caused by nutrient deprivation would imply that, due to the reduction in protein synthesis rate, starved

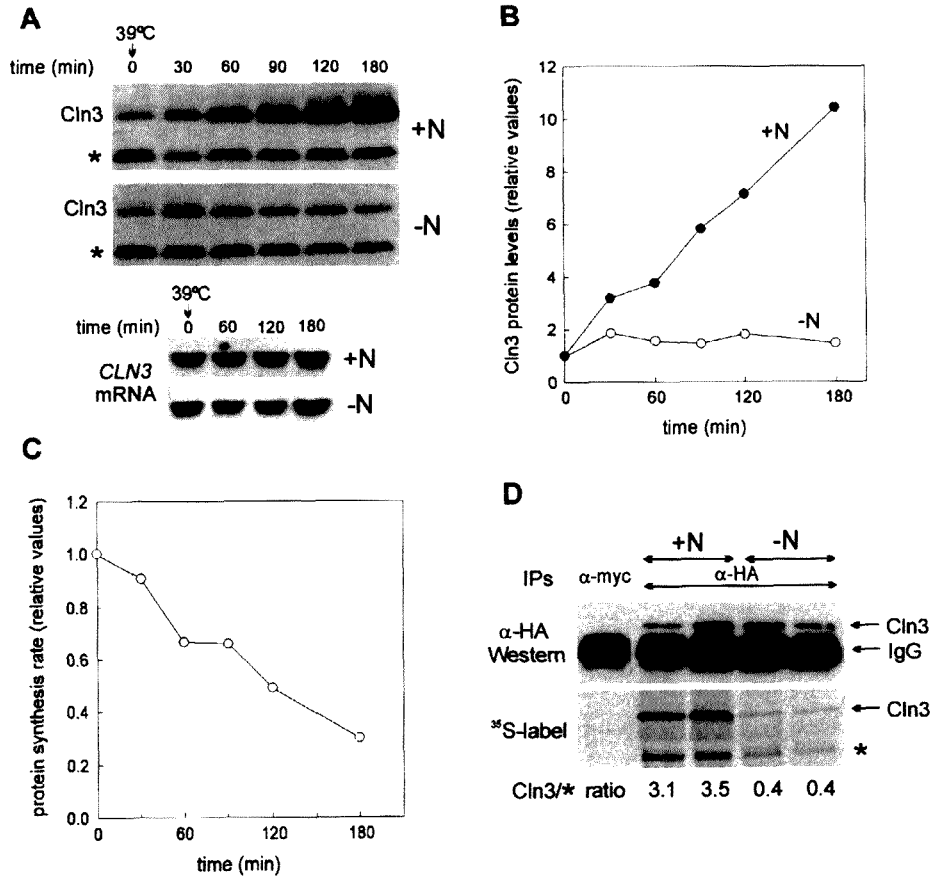


Fig. 7. Cln3 is subject to translational repression in cells deprived of nitrogen. CML200 (*cdc28-13*) cells carrying the *CLN3-3HA* gene under its own promoter sequences in pCM194 were grown at 25°C and transferred to 39°C in media with (+N, ●) or without (-N, ○) the nitrogen source at time 0. (A) Cln3 protein and *CLN3* mRNA levels at the indicated time points as measured by Western and Northern blot analysis. A non-specific band that cross-reacts with the 12CA5 antibody is marked with an asterisk. (B) Quantification of Cln3 protein levels shown in (A). (C) Overall protein synthesis rate as measured by pulse labeling analysis during nitrogen deprivation. (D) Pulse analysis of Cln3 was performed for 10 min as described in Materials and methods in duplicate samples 2 h after transferring the cells to media with (+N) or without (-N) the nitrogen source. In order to have similar total Cln3 protein levels in all immunoprecipitations (IPs), unlabeled extracts were used as described in Materials and methods. An additional labeled extract from cells grown with the nitrogen source was immunoprecipitated with an α -myc monoclonal antibody as negative control. Relative Cln3 synthesis rates (Cln3/* ratios) were evaluated by using the 45 kDa band (indicated with an asterisk) that cross-reacts with the 12CA5 antibody as an internal control for incorporation and immunoprecipitation efficiencies.

cells could not reach the Cln3 threshold level required to execute the G_1 -S transition (Richardson *et al.*, 1989). However, cells carrying a hyperstable *CLN3* allele, which show a reduced critical mass for budding in exponentially growing cultures, still arrest mainly in an unbudded state under starvation conditions (Sudbery *et al.*, 1980), albeit at later times than wild-type cells (our unpublished results), suggesting the existence of specific mechanisms that could overcome the higher stability of Cln3. We have shown that Cln3 is down-regulated mainly at the translation level by nitrogen deprivation, while the faster turnover observed under these conditions would help to decrease the Cln3 levels more quickly. Thus, our findings would explain why an altered turnover of Cln3 does not *per se* cause a major effect in the G_1 arrest kinetics.

The precise mechanism that causes an 8-fold reduction in *CLN3* mRNA translation efficiency under nitrogen deprivation conditions remains to be elucidated. Preliminary work using the *tep-CLN3* construct, where the *CLN3* open reading frame (ORF) is fused to the 5'-untranslated region (UTR) from *CYC1*, suggested that the observed translational repression requires the 5'-UTR of *CLN3*.

However, we have not been able to suppress this repression by analyzing overlapping deletions of the *CLN3* 5'-UTR as described in Figures 5 and 7 (our unpublished results), indicating that translational repression does not seem to be mediated by binding of a specific *trans*-acting factor to the *CLN3* 5'-UTR. A rapamycin-sensitive pathway mediated by the Tor1 and 2 phosphatidylinositol kinases has been involved recently in linking nutrient availability (Di Como and Arndt, 1996) and early G_1 progression (Barbet *et al.*, 1996) to regulation of translation initiation. Although rapamycin causes a G_1 arrest similar to nitrogen deprivation, there are some important differences: (i) rapamycin causes a strong down-regulation of *CLN3* transcript levels at times where they are kept essentially invariable by nitrogen deprivation (Barbet *et al.*, 1996; our unpublished results); (ii) rapamycin addition over a wide range of concentrations causes a 10-fold reduction in the overall protein synthesis rate (Barbet *et al.*, 1996), indicating that rapamycin effectively blocks most of translation initiation events in yeast cells, while nitrogen deprivation imposes a specific translational control on the *CLN3* mRNA when the overall protein synthesis rate is

only reduced by 2-fold; and (iii) both Cln3 protein levels and the overall protein synthesis rate decrease with the same kinetics after rapamycin addition, even at the minimal concentrations able to cause a G₁ arrest (our unpublished results), indicating that, in contrast to nitrogen deprivation, translational repression mediated by rapamycin does not act in a specific manner on the *CLN3* mRNA. Overall protein synthesis requirements have been established in multiple points of the cell cycle (Burke and Church, 1991). However, as low concentrations of cycloheximide cause a G₁ arrest (Johnston *et al.*, 1977; our unpublished observations), progression through G₁ seems to be the phase of the cell cycle most sensitive to unspecific protein synthesis inhibition. Thus, the rapamycin-mediated G₁ arrest could be explained in very similar terms. Taken together, these observations suggest that translational repression of the *CLN3* mRNA very early during nitrogen deprivation does not involve the Tor pathway. Perhaps the Tor pathway plays its essential role in repressing translation initiation of most mRNAs at later times during starvation, when nutrients are almost exhausted, thus preventing accumulation of truncated proteins in the cell. Alternatively, yeast cells could have redundant mechanisms to ensure a G₁ arrest under nutrient deprivation conditions.

Although loss of Cln3 in starved cells may be an important mechanism to achieve a G₁ arrest, the fact that strains lacking *CLN3* are still able to perform the G₁-S transition indicates that some other mechanisms must exist to explain the G₁ arrest caused by nitrogen deprivation. Cln1, Cln2 and Clb5 residual levels are down-regulated much more severely than those corresponding to their respective transcripts in starved cells, suggesting that these proteins may also be subject to post-transcriptional mechanisms. Similarly to the faster decay of Cln3 observed in starved cells, we have found that Cln1 and Cln2 show an increased turnover under these conditions (E.Garí, N.Colomina, C.Gallego, E.Herrero and M.Aldea, in preparation). This additional mechanism could reduce their residual levels down to a level such that no sufficient Cln activity would be present in the cell to execute the G₁-S transition. Moreover, since Cln protein levels remain very low, the activated Clb degradation during exit from the previous mitosis would still be active as cells accumulate in G₁, thus lowering Clb5 levels by degradation. Finally, the sustained presence of Sic1 in starved cells could explain in molecular terms why cells arrest in G₁ when deprived of the nitrogen source.

The G₁ arrest caused by trophic factors in higher eukaryotes seems to involve mechanisms similar to those operating in yeast cells. Thus, translational control has been demonstrated in transforming growth factor (TGF) β -dependent down-regulation of Cdk4 (Ewen *et al.*, 1993). In addition, up-regulation of the cdk-cyclin inhibitor p27 in G₁-arrested cells occurs by both translational regulation and decreased degradation (Hengst and Reed, 1996). Translation and stability of other key regulators of the G₁-S transition such as D-type cyclins may also contribute to link trophic signals to G₁ arrest and differentiation in higher eukaryotic cells.

Materials and methods

Strains, plasmids and growth conditions

Our parental strain CML128 (*MATa*, *leu2-3,112*, *ura3-52*, *trp1-1*, *his4*, *can-1'*) is a spore of 1788 (Lee *et al.*, 1993), a homogeneous diploid

strain obtained from EG123 (I.Herskowitz). The following CML128 derivatives were obtained: CML133 (*LEU2::tTA*), CML232 (*LEU2::tTA*, *TRP1*, *HIS4*), CML198 (*cdc28-13*), CML200 (*LEU2::tTA*, *cdc28-13*), CML234 (*LEU2::tTA*, *TRP1*, *HIS4*, *cdc28-13*), CML141 (Δ *swi6::TRP1*), CML210 (*CLN1-3HA*), CML204 (*CLN2-3HA*), CML203 (*CLN3-3HA*), CML206 (*CLB5-3HA*) and CML208 (*SIC1-3HA*). Strain CML213 (*MATa*, *ura3-52*) is a spore of FY1679 (B.Dujon), a S288C derivative. Strain HTY600 (*cdc34-2*; L.Johnston) is a derivative of W303-1A (*MATa*, *leu2-3,112*, *ura3-52*, *trp1-1*, *his3-11,75*, *ade2-1*, *can1-100*; L.Johnston). The tetracycline-repressible transactivator (tTA) was introduced into yeast cells by integration of pCM87 (Garí *et al.*, 1997) at the *LEU2* locus. Chromosomal C-terminal fusions to the HA epitope were performed by gene transplacement with *Pfu*-PCR products obtained from pCM133 (see below) essentially as described (Wach *et al.*, 1994). Transformation procedures and gene transplacement methods were done as described (Ausubel *et al.*, 1987).

Plasmid pCM133 was built from pFA6a-kanMX3 (Wach *et al.*, 1994) by replacing the β -galactosidase gene by three copies of the HA epitope (Tyers *et al.*, 1993) between the *Bam*HI and *Ascl* sites. pCM194 is a YCplac33 (*URA3*; Gietz and Sugino, 1988) derivative that carries the HA-tagged *CLN3* gene (Tyers *et al.*, 1993) under its own transcriptional regulatory sequences. Plasmid pCM166 was built by placing the HA-tagged *CLN3* ORF under the control of the *tetO₂* promoter (Garí *et al.*, 1997) in YCplac33. pMBP1-HA (N.Lowndes) contains the 3HA-tagged *MBP1* gene in YCplac33. The *CLN1* ORF was placed under the control of the *Schizosaccharomyces pombe adh1* promoter (A.Bueno) in YCplac22 (*TRP1*; Gietz and Sugino, 1988), resulting in plasmid pCM64. Finally, p180 carries a translational fusion of the *GCN4* gene to the β -galactosidase coding sequences (Hinnebusch, 1985) in a centromeric *URA3* vector. DNA manipulations, either by regular subcloning or *Pfu*-PCR techniques, were done as described in Ausubel *et al.* (1987) and Weiner *et al.* (1994).

Yeast cells were grown in SD minimal media at 30°C unless stated otherwise, and supplements were added as required (Ausubel *et al.*, 1987). Tetracycline was added to 2 μ g/ml when repression of the tTA transactivator was needed. DNA replication was inhibited by addition of 20 mg/ml hydroxyurea. Yeast nitrogen base without ammonium sulfate was used as recommended by the manufacturer (Difco) to prepare SD media without the nitrogen source, and the required amino acids were added to the following final concentrations: 15 μ g/ml leucine, 5 μ g/ml histidine and 10 μ g/ml tryptophan. Nitrogen deprivation experiments were done with cells growing exponentially for 14–16 h until OD₆₀₀ = 0.3–0.4, which were then collected by filtration and, after a quick wash, resuspended at the same cellular concentration in pre-warmed medium lacking the nitrogen source. Small newly born cells were isolated from Ficoll gradients as described (Mitchison, 1988).

Northern blot analysis

Total RNA samples were obtained from yeast cell pellets, electrophoresed in formaldehyde-agarose gels and transferred to positively charged nylon membranes as described (Ausubel *et al.*, 1987). After UV cross-linking, membranes were washed twice in washing buffer (1% SDS, 20 mM Na₂HPO₄ pH 7.2, 1 mM EDTA) at 65°C, pre-hybridized for 1 h at 65°C in 20% SDS, 0.5% blocking reagent (Boehringer Mannheim), 250 mM Na₂HPO₄ pH 7.2, 1 mM EDTA, and hybridized overnight at 65°C with digoxigenin-labeled probes at 2 ng/ml. After three washes at 65°C in washing buffer, immunological detection steps were performed as described by the manufacturer (Boehringer Mannheim) using CDP* (Tropix) as the chemiluminescent substrate. Signal quantification was performed with a CCD camera-based system (*Lumi-Imager*) from Boehringer Mannheim. DNA fragments containing only ORF sequences, obtained by either PCR or restriction digestion, were used to synthesize probes by random-PCR with digoxigenin-dUTP labeling mixture as directed by Boehringer Mannheim.

Protein synthesis rate and β -galactosidase activity measurements

The overall protein synthesis rate was determined by pulse analysis, which was performed by incubating 100 μ l of culture for 5 min at the specified temperature with 10 μ l of a labeling mixture containing 1 μ Ci/ μ l Tran³⁵S-label (ICN), 0.1 mM unlabeled methionine and 0.1 mM unlabeled cysteine in growth medium. After addition of 1 ml of cold 10% trichloroacetic acid (TCA), samples were incubated at 0°C for at least 1 h and TCA-precipitable counts were recovered by filtration on GF/C filters with the help of a Bio-Dot (Bio-Rad), which were then washed four times with 5% cold TCA and twice with cold ethanol, and

finally air-dried. Quantification was performed with a BAS-1000 (Fuji). β -Galactosidase activity was measured as described (Garí *et al.*, 1997).

Western blot analysis, labeling conditions and immunoprecipitations

Samples for Western blot analysis were prepared from frozen cell pellets with 5 OD₆₀₀ equivalents, which were added to 15 μ l of 5 M urea and immediately boiled for 2 min. After addition of an equal volume of glass beads, cell suspensions were vortexed for 7 min at room temperature, supplemented with 50 μ l of 2% SDS, 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, vortexed for 1 min, boiled for 2 min and microfuged. The protein concentration in the supernatants was determined by a Micro DC protein assay (Bio-Rad). Equal amounts of total protein were resolved by SDS-PAGE (Ausubel *et al.*, 1987), and ECL immunoblot analysis was carried out as directed by the manufacturer (Amersham). HA-tagged proteins were detected with a 1:2500 dilution of the 12CA5 monoclonal antibody (ascites fluid). The α -Swi4 and α -Swi6 polyclonal antibodies (N.Lowndes), as well as the α -PSTAIRE antibody (Santa Cruz), were used at a 1:10 000 dilution. Chemiluminescent signal quantification was performed with a CCD camera-based system (Lumi-Imager) from Boehringer Mannheim.

The Cln3 degradation rate was measured by pulse-chase analysis as follows. CML133 (pCM166) cells growing exponentially in SD minimal medium were transferred to SD with or without the nitrogen source, and 120 ml of culture were added to 240 μ Ci of Tran³⁵S-label (ICN) and incubated for 10 min at 30°C. Samples of 30 ml were removed at 0, 5, 10 and 15 min after addition of unlabeled methionine and cysteine to a final concentration of 10 μ M. Cells were then rapidly filtered, washed with cold water, resuspended in 0.5 ml cold water and microfuged, and cell pellets were quickly frozen in liquid N₂.

The Cln3 synthesis rate was evaluated by pulse analysis in duplicated samples with the same labeling conditions as described above. In order to achieve similar total Cln3 protein levels in all extracts and easily comparable immunoprecipitation efficiencies, labeled proteins from starved and unstarved cells were mixed with the same amount of unlabeled proteins from unstarved and starved cells, respectively.

Double immunoprecipitation of cell extracts with the 12CA5 mouse monoclonal antibody against the HA epitope was essentially as described (Blondel and Mann, 1996). One-fifth of the total immunoprecipitate was used to quantitate the total HA-tagged Cln3 protein by Western blot as described above. The remainder was used to detect the labeled HA-tagged Cln3 in SDS gels treated for fluorography with EN³HANCE (DuPont), and quantitated with a BAS-1000 (Fuji).

Flow cytometry and microscopy

DNA content distributions were obtained by propidium iodide staining as described (Nash *et al.*, 1988) with an Epics XL flow cytometer (Coulter), which was also used to quantitate relative cell concentrations from samples that had been fixed in 1% formaldehyde, 1 \times SSC, and sonicated for 5 s. Budding indexes were obtained by inspecting a minimum of 200 fixed cells under a phase-contrast microscope. Both long and short axes of a minimum of 100 cells were measured under a Zeiss LSM microscope, and average cell volumes were determined by considering yeast cells as regular ovoids.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Lidia Piedrafito for her excellent technical assistance, and Xavier Gómez for his skillful support in flow cytometry. We thank Avelino Bueno, Noel Lowndes, Bruce Futcher, Kim Nasmyth, Joaquim Ariño, Rafael Cuesta and Hermann Bujard for providing strains, plasmids and antibodies. We also thank Kim Nasmyth, Sergio Moreno, Noel Lowndes and Avelino Bueno for stimulating discussions. This work was funded by the Dirección General de Investigación Científica y Técnica (PB94-0511), the Generalitat de Catalunya and La Paeria (Ajuntament de Lleida). E.G. received a post-doctoral fellowship from the Generalitat de Catalunya. N.C. has a post-graduate fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia.

References

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.

- Amon, A., Irniger, S. and Nasmyth, K. (1994) Closing the cell cycle circle in yeast: G₂ cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G₁ cyclins in the next cycle. *Cell*, **77**, 1037–1050.
- Andrews, B.J. and Herskowitz, I. (1989) The yeast Swi4 protein contains a motif present in developmental regulators and is part of a complex involved in cell-cycle-dependent transcription. *Nature*, **342**, 830–833.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience, New York.
- 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., 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.
- Benton, B.K., Tinkelenberg, A.H., Jean, D., Plump, S.D. and Cross, F.R. (1993) Genetic analysis of Cln/Cdc28 regulation of cell morphogenesis in budding yeast. *EMBO J.*, **12**, 5267–5275.
- Blondel, M. and Mann, C. (1996) G₂ cyclins are required for the degradation of G₁ cyclins in yeast. *Nature*, **384**, 279–282.
- Burke, D.J. and Church, D. (1991) Protein synthesis requirements for nuclear division, cytokinesis, and cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 3691–3698.
- Cross, F.R. (1995) Starting the cell cycle: what's the point? *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **7**, 790–797.
- Cross, F.R. and Blake, C.M. (1993) The yeast Cln3 protein is an unstable activator of Cdc28. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 3266–3271.
- Cvrcková, F. and Nasmyth, K. (1993) Yeast G₁ cyclins CLN1 and CLN2 and a GAP-like protein have a role in bud formation. *EMBO J.*, **12**, 5277–5286.
- 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.
- Epstein, C.B. and Cross, F.R. (1992) CLB5: a novel B cyclin from budding yeast with a role in S phase. *Genes Dev.*, **6**, 1695–1706.
- Ewen, M.E., Sluss, H.K., Whitehouse, L.L. and Livingston, D.M. (1993) TGF β inhibition of Cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest. *Cell*, **74**, 1009–1020.
- Garí, E., Piedrafito, L., Aldea, M. and Herrero, E. (1997) A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**, 837–848.
- Gietz, R.D. and Sugino, A. (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, **74**, 3065–3073.
- Gossen, M. and Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **89**, 5547–5551.
- Hadwiger, J.A., Wittenberg, C., Richardson, H.E., De Barros Lopes, M. and Reed, S.I. (1989) A family of cyclin homologs that control the G₁ phase in yeast. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **86**, 6255–6259.
- Hengst, L. and Reed, S.I. (1996) Translational control of p27^{Kip1} accumulation during the cell cycle. *Science*, **271**, 1861–1864.
- Herskowitz, I. (1995) MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell*, **80**, 187–197.
- Hinnebusch, A.G. (1985) A hierarchy of *trans*-acting factors modulate translation of an activator of amino acid biosynthetic genes in yeast. *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 2349–2360.
- 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.
- Johnston, G.C., Pringle, J.R. and Hartwell, L.H. (1977) Coordination of growth and cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp. Cell Res.*, **205**, 79–98.
- Koch, C. and Nasmyth, K. (1994) Cell cycle regulated transcription in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **6**, 451–459.
- Koch, C., Moll, T., Neuberger, M., Ahorn, H. and Nasmyth, K. (1993) A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G₁ to S phase. *Science*, **261**, 1551–1557.

- 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.
- Lanker,S., Valdivieso,M.H. and Wittenberg,C. (1996) Rapid degradation of the G₂ cyclin Cln2 induced by CDK-dependent phosphorylation. *Science*, **271**, 1597–1601.
- Lee,K.S., Hines,L.K. and Levin,D.E. (1993) A pair of functionally redundant yeast genes (*PPZ1* and *PPZ2*) encoding type 1-related protein phosphatases function within the *PKC1*-mediated pathway. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 5843–5853.
- Levine,K., Huang,K. and Cross,F.R. (1996) *Saccharomyces cerevisiae* G₁ cyclins differ in their intrinsic functional properties. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 6794–6803.
- Lowndes,N.F., Johnson,A.L. and Johnston,L.H. (1991) Coordination of expression of DNA synthesis genes in budding yeast by a cell-cycle regulated trans-factor. *Nature*, **350**, 247–250.
- Lowndes,N.F., Johnson,A.L., Breeden,L. and Johnston,L.H. (1992) Swi6 protein is required for transcription of the periodically expressed DNA synthesis genes in budding yeast. *Nature*, **357**, 505–508.
- Markwardt,D.D., Garret,J.M., Eberhardy,S. and Heideman,W. (1995) Activation of the Ras/cyclic AMP pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* does not prevent G₁ arrest in response to nitrogen starvation. *J. Bacteriol.*, **177**, 6761–6765.
- McInerney,C.J., Partridge,J.F., Mikesell,G.E., Creemer,D.P. and Breeden,L.L. (1997) A novel Mcm1-dependent element in the *SWI4*, *CLN3*, *CDC6*, and *CDC47* promoters activates M/G₁-specific transcription. *Genes Dev.*, **11**, 1277–1288.
- Mitchison,J. (1988) Synchronous cultures and age fractionation. In Campbell,I. and Duffus,J.H. (eds), *Yeast: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, UK, pp. 51–64.
- Nash,R., Tokiwa,G., Anand,S., Erickson,K. and Futcher,B. (1988) The *WHI1*⁺ gene of *Saccharomyces cerevisiae* tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog. *EMBO J.*, **7**, 4335–4346.
- Nasmyth,K. (1996) At the heart of the budding yeast cell cycle. *Trends Genet.*, **12**, 405–412.
- Primig,M., Sockanathan,S., Auer,H. and Nasmyth,K. (1992) Anatomy of a transcription factor important for the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **358**, 593–597.
- Pringle,J.R. and Hartwell,L.H. (1981) The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. In Strathern,J.N., Jones,E.W. and Broach,J.R. (eds), *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae: Life Cycle and Inheritance*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, Vol. I, pp. 97–142.
- Richardson,H.E., Wittenberg,C., Cross,F.R. and Reed,S.I. (1989) An essential G₁ function for cyclin-like proteins in yeast. *Cell*, **56**, 1127–1133.
- Schneider,B.L., Yang,Q.-H. and Futcher,B. (1996) Linkage of replication to Start by the Cdk inhibitor Sic1. *Science*, **272**, 880–882.
- 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.
- Stuart,D. and Wittenberg,C. (1995) *CLN3*, not positive feedback, determines the timing of *CLN2* transcription in cycling cells. *Genes Dev.*, **9**, 2780–2794.
- Sudbery,P.E., Goodey,A.R. and Carter,B.L.A. (1980) Genes which control cell proliferation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **288**, 401–404.
- Surana,U., Amon,A., Dowzer,C., McGrew,J., Byers,B. and Nasmyth,K. (1993) Destruction of the Cdc28/Clb kinase is not required for metaphase/anaphase transition in yeast. *EMBO J.*, **12**, 1969–1978.
- 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.
- 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.
- Wach,A., Brachat,A., Pöhlmann,R. and Philippsen,P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10**, 1793–1808.
- Weiner,M.P., Costa,G.L., Shoettlin,W., Cline,J., Mathur,E. and Bauer,J.C. (1994) Site-directed mutagenesis of double strand DNA by the polymerase chain reaction. *Gene*, **151**, 119–123.
- Wittenberg,C., Sugimoto,K. and Reed,S.I. (1990) G₁-specific cyclins of *S.cerevisiae*: cell cycle periodicity, regulation by mating pheromone, and association with p34^{CDC28} protein kinase. *Cell*, **62**, 225–237.
- Yaglom,J., Linskens,M.H.K., Sadis,S., Rubin,D.M., Futcher,B. and Finley,D. (1995) p34^{Cdc28}-mediated control of Cln3 degradation. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 731–741.

Received on July 30, 1997; revised on September 17, 1997



Neus Colomina and Marti Aldea¹

¹Dept. Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de Lleida, Rovira Roure, 44.25198 Lleida, Catalunya, Spain. E-mail: marti.aldea@cmb.udf.es

Lumi-Imagine! Direct Quantification of Chemiluminescent Signals

Nucleic acid and protein quantification on membranes are essential methodologies in molecular biology. Due to the narrow range of linear response attained by films, the development of new methodologies for direct digitalization has been extremely important, and some instruments are already available that use methods of varying directness for quantifying radioactive signals on membranes.

Non-radioactive techniques are becoming more popular, and they are indeed the best choice for quantitative protein detection by Western blot analysis. Although some of the instruments developed for radioactive signals have been adapted to chemiluminescent samples, their sensitivity is still very low. Other instruments have been developed to quantify chemifluorescent signals, but the diffusion of the chemifluorescent product is a major drawback when compared to chemiluminescence-based methods.

The Lumi-Imager™ workstation developed by Boehringer Mannheim is the most recent breakthrough in chemiluminescence quantification. In very simple terms, the Lumi-Imager is based on a highly sensitive CCD camera that captures chemiluminescent images and transfers them to a computer to analyze and quantify them by using the Lumi-Analyst, a software especially designed by Boehringer Mannheim.

Here we compare the results obtained with the Lumi-Imager with conventional film-based quantification methods in non-radioactive Northern blot analysis. We have particularly focussed on aspects such as sensitivity, linear response, and image quality. Differing amounts of yeast total RNA were used to quantify mRNA levels of the G1-cyclin CLN2 gene (which is not a very-highly expressed gene in yeast) with a digoxigenin-labeled probe as described under Methods.

Figure 1 shows the results obtained by

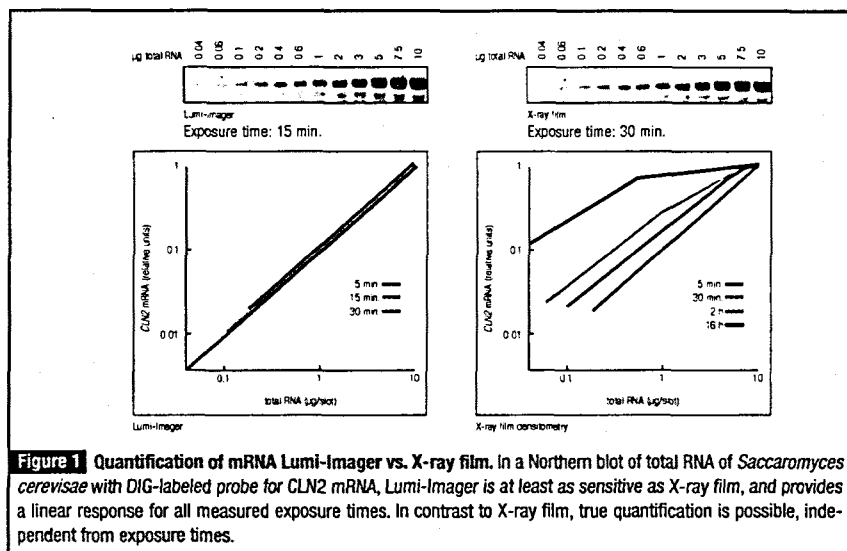


Figure 1 Quantification of mRNA. Lumi-Imager vs. X-ray film. In a Northern blot of total RNA of *Saccharomyces cerevisiae* with DIG-labeled probe for CLN2 mRNA, Lumi-Imager is at least as sensitive as X-ray film, and provides a linear response for all measured exposure times. In contrast to X-ray film, true quantification is possible, independent from exposure times.

direct capture with the Lumi-Imager and by scanning of the X-ray films exposed for different lengths of time.

Methods

Total RNA extraction from yeast cells and electrophoresis in formaldehyde-agarose gels were as described [1]. Transfer and cross-linking to Nylon⁺ membranes (Boehringer Mannheim) were carried out in a VacuBlot (Pharmacia) and a Stratalinker (Stratagene), respectively, in both cases following the instructions provided by the manufacturer. After two washes in WB (20 mM Na₂HPO₄, pH 7.2, 0.1% SDS) for 15 min at 65°C, membranes were prehybridized in MagicHyb solution (250 mM Na₂HPO₄, pH 7.2, 1 mM EDTA, 20% SDS, 0.5% Blocking Reagent, Boehringer Mannheim) for 1 h at 65°C. Hybridization in MagicHyb solution with 2 ng/ml of a random-primer digoxigenin-labeled CLN2 probe [2] was carried out for 14-16 h at 65°C. After three washes in WB for 20 min at 65°C, immunodetection steps and chemiluminescent reaction with CDP-Star™ were carried out as described [2].

Conclusions

1. The Lumi-Imager is at least as sensitive as conventional X-ray film in detecting chemiluminescent signals on membranes.
2. The Lumi-Imager produces a linear response over a much wider range of signal intensities compared to X-ray film.

References

1. Ausubel et al. (1991) *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley.
2. Boehringer Mannheim (1995) *The DIG System: User's Guide for Filter Hybridization*.

Product	Cat.No.	Pack Size
Lumi-Imager™	1 901 800	
Nylon membranes, positively charged	1 417 240	1 roll
	1 209 272	10 sheets
	1 209 299	20 sheets
Blocking Reagent	1 096 176	50 g
CDP-Star™	1 685 627	1 ml
DIG Easy Hyb	1 603 558	500 ml
DIG Wash and Block Buffer Set	1 585 762	30 blots
DIG DNA Labeling Kit	1 175 033	40 reactions

QUANTIFICACIÓ DIRECTA DE WESTERNS PER QUIMIOLUMINISCÈNCIA

L'estudi de la quantificació de *westerns* en el Lumi-Imager es va fer amb la comparació de dos substrats diferents per la reacció final de detecció: ECL (Amersham) i Super-Signal ULTRA (Pierce). Ambdós sistemes consten de dos reactius que han de ser mesclats just abans de la reacció final de detecció per part de la peroxidasa. Un reactiu és el substrat pròpiament i l'altre actua com un potenciador ja que proporciona les condicions més idònies per l'acció de l'enzim que ha de processar el substrat. El sistema Super-Signal ULTRA ha estat desenvolupat més recentment i se suposa més potent que el sistema ECL. En aquest treball estudiarem aquesta diferència, i també la sensibilitat dels dos sistemes, el marge de resposta lineal i la qualitat de les imatges, tal com hem fet en la detecció per *northern*.

La proteïna de llevat emprada és Cln2-3HA. S'han fet diverses dilucions de proteïna d'extret total des de 100 µg fins a 0.8 µg, i a partir de les mateixes mostres s'han fet dos *westerns* en paral·lel (Gallego *et al.*, 1997, veure treball adjunt). Es mostren les imatges obtingudes després de 5 minuts d'incubació amb els substrats i directament exposades en el Lumi-Imager durant 5 minuts també. S'ha quantificat la detecció de la proteïna Cln2 i de la banda inespecífica, reconeguda per l'anticòs antiHA, que dona també una resposta lineal.

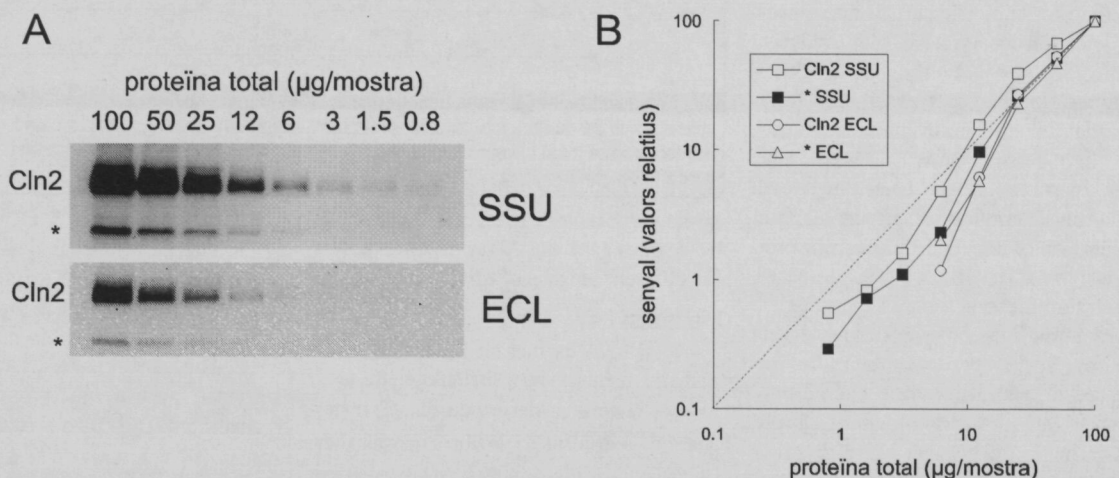


Figura 1. Quantificació de la proteïna Cln2 per medis no radioactius.

Es comparen els sistemes de detecció SuperSignal Ultra (SSU) i ECL. La imatge de la detecció per ECL ha estat amplificada electrònicament 50 vegades per tal d'obtenir imatges visuals (A) similars de tots dos sistemes. En la part B de la figura es representen els valors de quantificació obtinguts en la detecció de Cln2 i de la banda de senyal inespecífic.

Conclusions

1. Efectivament el sistema Super-Signal ULTRA dona més quantitat de senyal, unes 50 vegades major, que el sistema ECL, i és per tant més sensible.
2. La resposta lineal és adequada en ambdós sistemes.
3. La quantificació pot saturar-se pel sistema Super-Signal ULTRA, el que indica que per a la proteïnes mitjanament abundants el sistema ECL és molt apropiat. Per a la detecció de proteïnes escasses el sistema Super-Signal ULTRA és el més apropiat per la seva sensibilitat.