

Regulación de la expresión del represor de Start *Whi7* por ciclo celular

Cristina Ros-Carrero; Juan Carlos Igual; Mercè Gomar-Alba

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular y Institut Universitari de Biotecnologia i Biomedicina (BIOTECMED),

Universitat de València, Burjassot, ES

INTRODUCCIÓN

La transición de la fase G1 a S (Start) es un punto crítico en el que las células se comprometen irreversiblemente a una nueva ronda de división celular. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la activación de la expresión de los genes de Start requiere los factores de transcripción SBF (Swi4-Swi6) y MBF (Mbp1-Swi6). A principios de G1, SBF se asocia con sus promotores diana, pero la actividad de SBF está bloqueada debido a la unión de los represores transcripcionales *Whi5* y *Whi7*. La activación inicial de Start está controlada por la CDK Cdc28 asociada con las ciclinas G1 que fosforilan y disocian *Whi5* y *Whi7* de los promotores de Start.

RESUMEN

En estudios previos del grupo se describió una periodicidad en los niveles del represor de Start *Whi7* durante el ciclo celular¹. El **objetivo** de este trabajo es estudiar si la expresión del gen *WHI7* contribuye al comportamiento oscilante de la proteína a lo largo del ciclo celular. El análisis del promotor de *WHI7* mostró dos sitios de regulación por ciclo (Tabla 1): un sitio de unión del factor transcripcional Mbp1 (actúa en G1/S) y otro para el factor *Swi5* (actúa en G1). Aquí describimos una regulación transcripcional de la expresión periódica de *WHI7* durante la fase G1 que depende tanto de Mbp1 como *Swi5* demostrando la funcionalidad de estas secuencias.

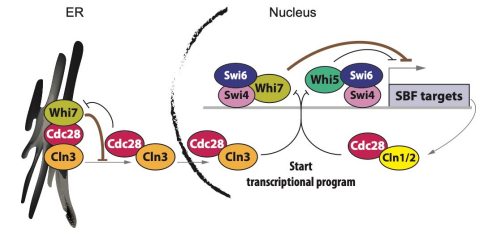


Tabla 1. Sitios de regulación por ciclo en el promotor de *WHI7*

Sitio	Factor de transcripción	Secuencia	Posición (pb desde ATG)
MCB	Mbp1	ACGCGT	-216 a -210
Swi5	Swi5	GCTGGC	-381 a -387

RESULTADOS

La expresión de *WHI7* depende de Mbp1

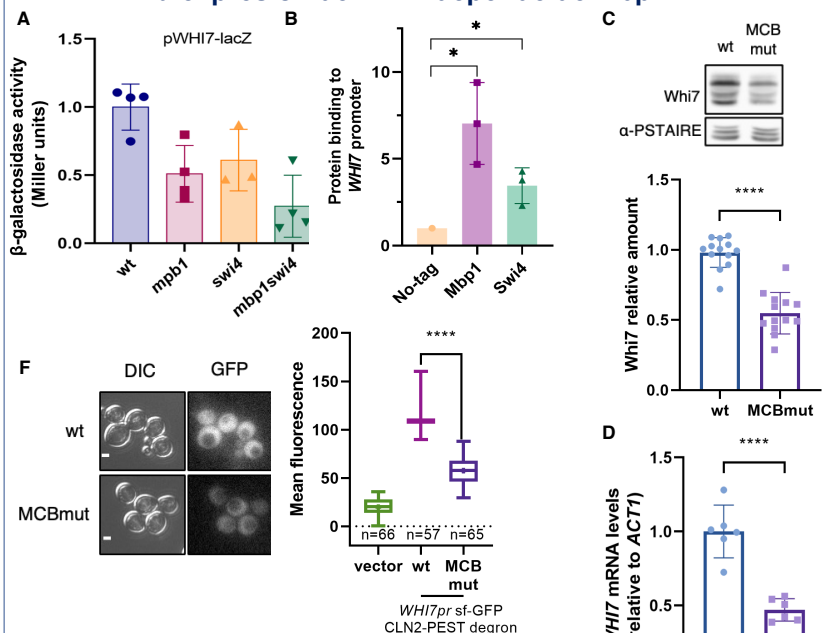
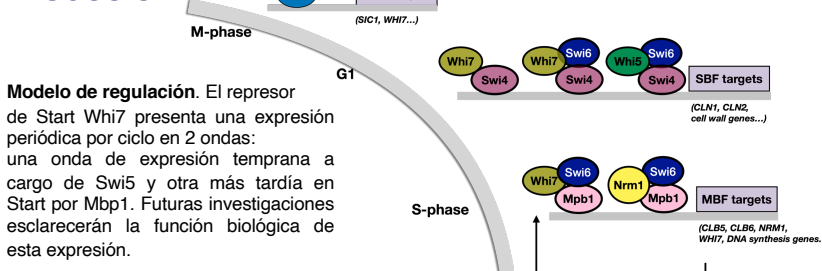


Figura 1. A) Actividad β-galactosidasa en células salvajes y mutantes *mbp1*, *swi4* y *mbp1swi4* transformadas con *pWhi7-lacZ*. B) Asociación de Mbp1 y Swi4 al promotor *WHI7* mediante ChIP (ensayos de inmunoprecipitación de cromatina) en cultivos asincrónicos de células salvajes. Niveles de proteína Whi7 normalizados frente a Cdc28 (PSTAIR, como control de carga) (C) y niveles de *WHI7* mRNA relativo a *ACT1* mRNA como control por RT-PCR (D) en células mutantes *whi7* transformadas con el plásmido *pWhi7-HA* o *pMCBmut-HA*. E) Actividad β-galactosidasa en células silvestres transformadas con *pWhi7-lacZ* o *pMCBmut-lacZ*. F) Expresión del promotor Whi7 por microscopía de fluorescencia en células transformadas con el plásmido *Whi7promoter-sfGFP-CLN2* degen o la versión MCB mutada. Se muestra la media y la desviación estándar de al menos 3 réplicas biológicas. *, $p \leq 0.05$; ****, $p \leq 0.0001$, prueba T de dos colas para muestras independientes. n = número de células, seleccionadas a partir de al menos 3 experimentos biológicos.

DISCUSIÓN



- 1- *WHI7* presenta una expresión por ciclo a lo largo de G1.
- 2- *WHI7* presenta sitios de unión de Mbp1 y Swi5 en su promotor.
- 3- Mbp1 y Swi4 activan la expresión de *WHI7*.
- 4- El sitio MCB en el promotor de *WHI7* se requiere para la expresión de *WHI7*.
- 5- Swi5 activa la expresión de *WHI7*.
- 6- El sitio Swi5 en el promotor de *WHI7* se requiere para la expresión de *WHI7*.
- 7- La expresión periódica en G1 de *WHI7* se anula cuando los sitios MCB y Swi5 están mutados.

CONCLUSIONES

La expresión de *WHI7* depende de Swi5

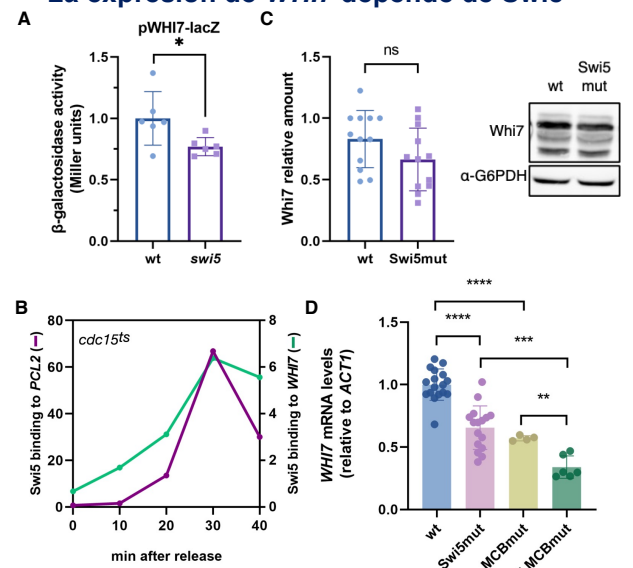


Figura 2. A) Actividad β-galactosidasa en células salvajes y mutantes *swi5* transformadas con el plásmido *pWhi7-lacZ*. B) Asociación de Swi5 al promotor de *WHI7* y *PCL2* (como control) mediante ChIP en cultivos sincronizados usando la cepa mutante *cdc15ts*. C) Nivel de proteína Whi7 normalizado a G6PDH (como control de carga) en células mutantes *whi7* transformadas con el plásmido *pWhi7-HA* o *pSwi5mut-HA*. D) Nivel de *WHI7* mRNA relativo a *ACT1* mRNA como control por RT-PCR en células mutantes *whi7* transformadas con el plásmido *pWhi7-HA* (pWt), *pSwi5mut*, *pMCBmut* o *pSwi5.MCBmut*. Se muestra la media y la desviación estándar de al menos 3 réplicas biológicas. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$; ****, $p \leq 0.0001$; ns, $p > 0.05$, prueba T de dos colas para muestras independientes.

WHI7 presenta una expresión periódica por ciclo en G1 que se anula cuando los sitios de unión MCB y Swi5 están mutados

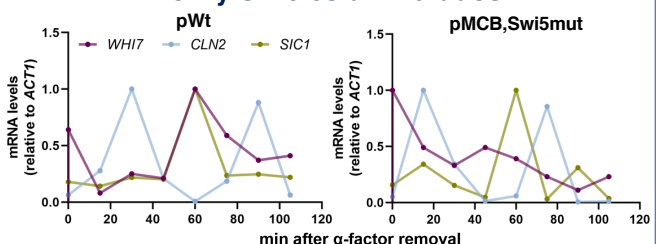


Figura 3. Células mutantes *whi7* transformadas con el plásmido *pWhi7-HA* (pWt) o *pMCB,Swi5mut* se sincronizaron utilizando la feromona α-factor que provoca una parada celular en G1. Tras la liberación del bloqueo, se analizaron los niveles de *WHI7* mRNA, *CLN2* mRNA (gen de Start) y *SIC1* mRNA (gen M/G1) por RT-PCR.

BIBLIOGRAFÍA

1-Gomar-Alba, M., Méndez, E., Quilis, I., Baró, M. C., & Igual, J. C. (2017). Whi7 is an unstable cell-cycle repressor of the Start transcriptional program. *Nature communications*, 8(1), 1-13.

AGRADECIMIENTOS

