

Aproximacions genètiques per l'estudi de les funcions de la proteïna fosfatasa Ptc1 en *S. cerevisiae*

Tesi Doctoral

Laura Tatjer Recordà

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Institut de Biotecnologia i Biomedicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Aproximacions genètiques per l'estudi de les funcions de la proteïna fosfatasa Ptc1 en *S. cerevisiae*

Memòria elaborada per

LAURA TATJER RECORDÀ,

Llicenciada en Biotecnologia,

per optar al Grau de Doctora en Bioquímica, Biologia Molecular i
Biomedicina.

Aquesta tesi s'ha realitzat al Departament de Bioquímica i Biologia
Molecular i a l'Institut de Biotecnologia i de Biomedicina de la Universitat
Autònoma de Barcelona sota la direcció del Doctor

Joaquín Ariño Carmona

Laura Tatjer Recordà

Joaquín Ariño Carmona

Cerdanyola del Vallès, Desembre del 2014

M'ho van explicar i ho vaig oblidar. Ho vaig veure i ho vaig entendre.

Ho vaig fer i ho he après.

Confucio

A la meva família ...

Ara sí, sembla ser que aquesta etapa comença a veure el seu final. Ha estat un període ple d'aprenentatges, no només de caire científic, sinó a tots nivells en el qual heu participat molta gent. Per aquest motiu i perquè sense vosaltres no hagués sigut possible, intentaré dedicar unes paraules a cada un intentant no deixar-me a ningú.

En primer lloc, m'agradaria agrair al Dr. Joaquín Ariño Carmona l'oportunitat que m'ha donat al acceptar-me al seu grup. A part d'aprendre com funciona la investigació bàsica, ha sigut una peça clau en aquest projecte i, encara que no s'ho cregui, ha influenciat molt positivament en la meva formació científica. Gràcies per tot el temps dedicat en la meva formació.

A tota la gent "habida y por haber" en el laboratori dels levadurins, com ens diuen els de immunologia. A la Maria Platara, la meva primera mentora en el camp de la ciència. M'has ensenyat tantes coses...mai havia conegut una persona com tu, lluitadora al 100% i objectiva respecte la vida en general. Ets una de les persones que més il·lusió m'ha fet conèixer durant aquest temps. A l'Asier, un gran líder científic que m'ha ensenyat moltes coses importants del dia a dia al laboratori. Gràcies a nosaltres l'esperit de Ptc1 mai morirà!!! A la Lina, una bona companya del laboratori amb qui hem compartit moltes confidències i que m'ha donat algun cop de mà en moments difícils. Al Jofre, una de les persones amb qui més he rigut al laboratori. Saps que el meu vocabulari sobre certes temàtiques ha millorat gràcies a tu? Jajaja Tot i així, no crec que sigui la única que ho hagi après. Al David, un company indescrutable amb el que he tingut la sort de compartir tota aquesta etapa. Saps que arribaràs allà fins on vulguis anar però, si-us-plau, mantingues sempre la teva forma de ser. Crec que en aquest món fan falta més científics amb la teva personalitat. Espero que no tornis a perdre el cotxe eh...jajaja. A l'Albert, un sol amb mala llet...jajaja m'encanta la samarreta i no ho podia deixar passar. Vals molt i m'has ajudat en moltes ocasions. Ha sigut un plaer compartir amb tu part d'aquesta etapa. A l'Anna, una companya genial que en moments baixos sempre ha estat allà. Ets la peraaaa!!! A la Sílvia, lo siento pero no escribiré tu apellido, ya sabes que eres tu! Ha sido un placer conocerte y compartir muchísimos momentos junto a ti. Espero que tu erika se porte bien y no te haga pasar malos momentos. Al Boris, per tota l'ajuda que ha suposat i pels mojitos tan bons que fa! A la Cris, una persona plena d'aventures noves i inimaginables per explicar! M'encanta la seva capacitat per treure importància a certes coses. Vigila amb les fotocopiadores, les dutxes i altres possibles distraccions! jajaja... A la Marieta, la valenciana més divertida i bona persona que he conegut fins ara. Una companya immillorable de congressos! Visca Granada, la SEBBM i nosaltres!!! Va ser un viatge genial!!! Al Diego, la nova incorporació del lab. És una persona divertida, bastant boja... que sempre aconsegueix robar-

te un somriure. Et desitjo molta sort i ànims en l'etapa que comences! Com diria ell acuestate y suda! A l'Ana, la primera incorporació asiàtica del grup. Malgrat que no hem parlat molt, és llesta i riallera, i hem tingut alguna que altra conversa sobre el seu país molt interessant. Queda pendent el viatge a Xina eh? A la Montse, una de les grans companyes d'aquesta etapa. La mama del laboratori que sempre vetlla perquè tots estiguem bé en tot moment. Et mereixes que la vida et somrigui cada dia! Vull agrair a l'Antonio tota l'ajuda que m'ha ofert i el temps que m'ha dedicat. Has sigut un company pepino! A l'Anna Vilalta, una de les grans figures d'aquesta universitat! Finalment, a tots els nois i noies que han passat per pràctiques, màsters, etc.: Repi, Lino, Pablo, Maria, Ivan, Sara, Laura i Carlos. Junts aporteuen moltes anècdotes divertides i moments que recordarem tots.

Als membres del Servei de Genòmica. A l'Anna Barceló per les xocolates a la tassa amb nata, al Xavi per tots els seus minuts de glòria, al Ministre me n'alegro d'haver vist el teu futur i que ara siguis tant feliç i, al MiniMinis pels moments tan casuals!

A les secretàries Rosa i Lourdes per tota l'ajuda que ofereixen amb la maleïda paperassa. Sou d'un gran suport!

A la resta de companys de la Unitat de Veterinària, la Laia i el Dani una parella d'amics que van ser molt importants a l'inici d'aquesta etapa. A la Maria José per tots els moments de complicitat. A l'Anna Marco pel temps dedicat amb les 2D!! Ets una crack! A la Jenny, a la Laura i al Dani per tots els últims cafès compartits! Al Néstor i al Gerard per l'extranya parella que formaven i per les converses boges que compartien!

A tot l'entorn del volei. A tots els papis i no papis de l'equip màster amb els quals he tingut el gran plaer de compartir victòries i derrotes. M'heu ensenyat a relativitzar les situacions! I a les nenes de l'equip de tota la vida i les seves parelles. Formeu part de la meua vida des dels 12 anys i només puc dir que sou unes grans amigues. Heu tingut una paciència enorme amb mi aquests últims mesos i us estic molt agraïda.

A les meves germanes de la carrera, la Marta i l'Alba, dues noies indescriptibles de les quals des del dia que les vaig conèixer no me n'he pogut separar. Heu sigut un dels meus pilars més forts en aquests últims anys. Estic orgullosa de dir Marta que ja ets tota una pedazo DOCTORA!!!

A l'Albert Madaula, un dels meus millors amics i l'artista número 1 d'aquesta terra, la Clara que fa pocs dies va ser mare i l'Aleidis per tots els cafès i les converses compartides. I a

tota la colla Santers, pels bons moments viscuts, que en aquests cinc anys han sigut moltíssims! I els que ens queden...jajajaja

Al Carlos, la persona clau en tota aquesta etapa. Gràcies a tu he après que la vida es pot enfocar de moltes formes i que les coses s'han de relativitzar per poder gaudir dels moments. A més, junts hem après i compartit moltes experiències. Aquest últim any ha sigut un dels més que recordi haver viscut i sóc conscient que per tu tampoc ha sigut fàcil. A partir d'ara la situació només pot que millorar. Gràcies de tot cor pel teu suport!

Especialment, vull agrair a la meva família tota la paciència dipositada sobretot al final d'aquest període. A la meva mare, una dona increïble que, malgrat no entendre molt bé el què he estat fent aquests últims anys, m'ha recolzat en tot moment. Al meu pare, una persona amb un potencial enorme. Gràcies als dos per ensenyar-me que, passi el què passi, sempre em recolzareu. A la Mariona, el regal més gran que m'han fet els meus pares. Una de les meves millors amigues que ha sigut, és i espero que sigui un dels pilars més forts de la meva vida. Gràcies per tot. Als meus avis, als tiets i els peques de la família. M'heu ajudat a distreure'm en aquells moments que més ho he necessitat. En especial al meu avi Claudi, una de les persones que més il·lusió li hagués fet poder compartir aquesta etapa amb mi.

I. ABREVIATURES	1
II. RESUMS	8
III. INTRODUCCIÓ	13
1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com a model a la investigació	15
2. Fosforilació de proteïnes com a mecanisme de regulació	15
2.1 Aspectes generals de la fosforilació	15
2.2 Propietats de les Ser / Thr fosfatases	16
2.3 La família de proteïnes fosfatases del tipus 2C	17
3 La família de proteïnes fosfatases del tipus 2C en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
3.1 La fosfatasa Ptc1	20
3.1.1 Relació entre Ptc1 i la via HOG	20
3.1.2 Ptc1 i l'herència de diferents orgànuls	24
3.1.3 Altres fenotips del mutant <i>ptc1</i>	26
3.2 Altres membres de la família de PP2C en <i>S. cerevisiae</i>	27
4 El cicle cel·lular del llevat <i>S. cerevisiae</i>	30
4.1 Mecanismes de regulació del cicle cel·lular	30
4.2 Regulació de Cdc28 per fosforilació	31
5 Resposta a estrès en el llevat <i>S. cerevisiae</i>	33
5.1 Homeòstasi d'ions monovalents	34
5.2 Homeòstasi del calci	35
5.3 Via de senyalització de la integritat de la paret cel·lular	38
5.4 Estrès per pH alcalí	43
5.5 La via TOR i la senyalització per manca de nutrients	46
IV. MATERIALS I MÈTODES	53
1. Soques i medis de cultiu	55
2. Tècniques de DNA recombinant	55
3. Cassets d'interrupció i delecions gèniques	56
4. Cerca de supressors en multicòpia dels fenotips de sensibilitat a CFW, pH alcalí o rapamicina característics d'un mutant <i>ptc1</i>	57
5. Plasmidis	58
6. Obtenció de soques diploides, esporulació i selecció d'haploides	61
6.1 Esporulació de cèl·lules diploides	62
6.2 Selecció d'haploides	62
7. Assaigs de creixement	62
7.1 Assaig de creixement en medi líquid	62

ÍNDIX

7.2 Assaig de creixement en medi sòlid	63
8. Assajos d'activitat β-galactosidasa	63
9. Extracció de proteïnes i immunodetecció de les proteïnes transferides a membrana	64
9.1 Anàlisi d'interaccions proteiques per la purificació de proteïnes fusionades a GST	64
9.2 Determinació de l'estat de fosforilació de Slt2	66
10. Purificació de la proteïna Slt2 fusionada a GST i anàlisi de fosfopèptids per MALDI-TOF	67
11. Tècniques de microscopia	68
11.1 Determinació de l'estat vacuolar	68
11.2 Determinació del patró de gemmació per tinció amb CFW	68
VI OBJECTIUS	71
VII RESULTATS I DISCUSSIÓ	75
1. Cerca de supressors en multicòpia dels fenotips de sensibilitat d'un mutant <i>ptc1</i>	77
1.1 Identificació de gens supressors en multicòpia dels fenotips de sensibilitat a CFW, pH alcalí i rapamicina d'un mutant <i>ptc1</i> .	79
1.2 Anàlisis dels diversos fenotips dels supressors identificats en el mutant <i>ptc1</i> .	82
1.3 Els efectes positius dels supressors CTR1 i CIN5 no semblen estar relacionats amb funcions específiques de Ptc1.	84
1.4 Els efectes positius del supressor VPS73 en un mutant <i>ptc1</i> podrien estar relacionats amb la seva possible activitat com a transportador.	88
1.5 Els supressors de la cerca suggereixen una relació funcional entre Ptc1, la integritat de la paret cel·lular i la regulació del cicle cel·lular.	89
1.6 La sobreexpressió de les PP2Ac suprimeix el fenotip de sensibilitat a rapamicina augmentant el nivell del complex PP2Ac-Tap42 el qual es troba reduït del mutant <i>ptc1</i> .	96
1.7 La supressió del fenotip de sensibilitat a CaCl_2 del mutant <i>ptc1</i> degut a la sobreexpressió de les PP2Ac podria estar relacionat amb una millora de l'estat vacuolar.	101

1.8 La sobreexpressió de les PP2Ac disminueix la hiperactivació de la via Slt2 induïda per rapamicina en un mutant <i>ptc1</i> .	102
1.9 Es necessiten diferents complexos de les PP2A per suprimir diversos fenotips associats a la pèrdua de Ptc1.	105
2. Estudi de les interaccions genètiques entre Ptc1 i les subunitats catalítiques o reguladores de proteïna quinases no essencials.	113
2.1 Cerca de mutants de gens de proteïna quinases capaces de suprimir els fenotips del mutant <i>ptc1</i>	115
2.2 Anàlisi de l'efecte de les mutacions de MKK1 i MKK2 en diversos readouts relacionats amb els fenotips de sensibilitat del mutant <i>ptc1</i>	119
2.3 La supressió de MKK1, però no de MKK2, contraresta els defectes vacuolars i morfogènics associats a la pèrdua de la funció de Ptc1	122
2.4 <i>Mkk1</i> és la principal MAPKK responsable de l'increment de la senyalització de la via de CWI observat en el mutant <i>ptc1</i>	125
3. Bases moleculars del model que relaciona la fosfatasa Ptc1, la via CWI i la regulació del cicle cel·lular	129
VII. CONCLUSIONS	135
VIII. BIBLIOGRAFIA	137
IX. ANNEXOS	157

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Classificació de les Ser / Thr fosfatases.	17
Figura 2. Estructura de la isoforma humana PP2C α .	18
Figura 3. La família de les proteïnes fosfatases de tipus 2C en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	20
Figura 4. La via HOG i els seus components.	22
Figura 5. Esquema de la fosfatasa Ptc1 i l'herència de diferents orgànuls.	26
Figura 6. Fases del cicle cel·lular del llevat <i>S. cerevisiae</i> .	31
Figura 7. Regulació de l'entrada a Mitosis pel complex fosfatasa PP2A ^{Cdc55} .	33
Figura 8. Principals transportadors catiònics de la membrana plasmàtica i intracel·lulars en el llevat <i>S. cerevisiae</i> .	35
Figura 9. Esquema de la via de la calcineurina.	37
Figura 10. Mecanisme de la via de la integritat de la paret cel·lular enfront un dany a la paret cel·lular.	39
Figura 11: Vies de senyalització implicades en la resposta alcalina.	44
Figura 12. Esquema representatiu del funcionament de la via TOR.	48
Figura 13. Esquema de les principals modificacions post-traduccionals de Pph21.	51
Figura 14. Esquema del procediment realitzat per la cerca de supressors en multicòpia dels fenotips de sensibilitat a CFW, pH alcalí o rapamicina característics del mutant <i>ptc1</i> .	58
Figura 15. Categories funcionals dels supressors identificats.	82
Figura 16. Matriu representativa del comportament dels supressors en un mutant <i>ptc1</i> en les diferents condicions analitzades	83
Figura 17. Matriu representativa del comportament dels supressors en una soca BY4741 en les diferents condicions estudiades.	85
Figura 18. Anàlisi de l'especificitat de millora del creixement del mutant <i>ptc1</i> en condicions alcalines degut a la sobreexpressió dels supressors <i>CTR1</i> i <i>FET4</i> .	86
Figura 19. Efecte dels ions de coure i ferro en el creixement del mutant <i>ptc1</i> en condicions alcalines.	87
Figura 20. Anàlisi de similitud de <i>VPS73</i> .	88

ÍNDEX

Figura 21. Efecte de la mutació del residu Glu169 de <i>VPS73</i> i de la sobreexpressió del gen <i>YBR241c</i> en l'alleujament dels fenotips de sensibilitat a pH alcalí i a CaCl_2 en un mutant <i>ptc1</i> .	89
Figura 22. Esquema dels truncaments detectats al domini C-terminal dels supressors <i>Bck1</i> .	91
Figura 23. Fenotips de les diferents versions dels supressors <i>BCK1</i> .	91
Figura 24. Efecte de la deleció dels gens <i>BCK1</i> i <i>SLT2</i> en un mutant <i>ptc1</i> .	92
Figura 25. Regulació de la fosforilació del complex <i>Cdc28-Clb2</i> que afecten l'entrada a Mitosis de la cèl·lula.	93
Figura 26. Efecte de la deleció de <i>MIH1</i> en un mutant <i>ptc1</i> .	93
Figura 27. Efecte de la deleció de <i>SWE1</i> en un mutant <i>ptc1</i> .	94
Figura 28. Efecte de la mutació del residu Ser14 de <i>Cdc37</i> en un mutant <i>ptc1</i> .	95
Figura 29. Efecte de la mutació <i>RIM15</i> en un mutant <i>ptc1</i> .	96
Figura 30. Relació entre la sobreexpressió de les PP2Ac en un mutant <i>ptc1</i> i els defectes fenotípics relacionats amb la via TOR.	98
Figura 31. La sobreexpressió de les PP2Ac en un mutant <i>ptc1</i> augmenta els nivells del complex Tap42-Pph21.	100
Figura 32. Efecte de la sobreexpressió de les PP2Ac en la millora dels defectes del mutant <i>ptc1</i> associats a l'estrès per CaCl_2 .	101
Figura 33. Efecte de la sobreexpressió de les PP2Ac en el mutant <i>ptc1</i> en fenotips relacionats amb la via CWI.	103
Figura 34. Esquema de les principals modificacions post-traduccionals de Pph21.	106
Figura 35. La metilació de Pph21 en la millora del creixement en condicions on el mutant <i>ptc1</i> presenta sensibilitat.	107
Figura 36. Rellevància de l'estat de fosforilació de Pph21 en la millora del creixement d'una soca <i>ptc1</i> en diverses condicions	108
Figura 37. Determinació de la rellevància de les PTPAs en la millora dels diferents fenotips de sensibilitat del mutant <i>ptc1</i> .	110
Figura 38. Anàlisi fenotípics dels dobles mutants <i>quinasa-ptc1</i> .	117
Figura 39. Anàlisi comparatiu dels efectes de les mutacions de <i>MKK1</i> o <i>MKK2</i> en una soca <i>ptc1Δ</i> .	118
Figura 40. Anàlisi comparatiu dels efectes de les mutacions dels elements del mòdul MAPK de la via CWI en una soca <i>ptc1Δ</i> .	119

Figura 41. La mutació de <i>MKK1</i> o <i>MKK2</i> no rescata la deficient expressió dels gens regulats per NCR del mutant <i>ptc1</i> .	120
Figura 42. La deleció de <i>MKK1</i> en el mutant <i>ptc1</i> normalitza tant l'expressió del promotor <i>ENA1</i> com la d'un promotor regulat per calcineurina.	121
Figura 43. Restauració de la morfologia vacuolar normal degut a la supressió de <i>MKK1</i> en mutant <i>ptc1</i> .	122
Figura 44. La inactivació del mòdul MAPK de la via Slt2 en mutant <i>ptc1</i> normalitza tant el patró de gemmació com els defectes en la separació de les gemmes.	124
Figura 45. La supressió de <i>MKK1</i> però no la de <i>MKK2</i> normalitza l'expressió del promotor <i>MLP1</i> en mutant <i>ptc1</i> .	125
Figura 46. La mutació de <i>MKK1</i> però no la de <i>MKK2</i> normalitza la hiperfosforilació de Slt2 en el mutant <i>ptc1</i> .	126
Figura 47. Model de la regulació de la transició G2/M degut a la hiperactivació del mòdul MAPK Slt2 en un mutant <i>ptc1</i> .	129

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. Regions cromosòmiques obtingudes a partir de la cerca de supressors en multicòpia del mutant <i>ptc1</i> en presència de blanc de calcoflúor.	79
Taula 2. Regions cromosòmiques obtingudes a partir de la cerca de supressors en multicòpia del mutant <i>ptc1</i> en condicions de pH alcalí.	80
Taula 3. Regions cromosòmiques obtingudes a partir de la cerca de supressors en multicòpia del mutant <i>ptc1</i> en presència de rapamicina.	80
Taula 4. Resum dels supressors identificats a les tres cerques.	81
Taula 5. Diferents requisits de Pph21 per la millora dels creixements del mutant <i>ptc1</i> enfront diversos estressos.	110
Taula 6. Resum del nombre i tipus d'interaccions genètiques detectades entre els gens de les quinases no essencials i <i>PTC1</i> .	116

I. ABREVIATURES

AMP	Adenosina 5' monofosfat
AMPC	AMP cíclic
BSA	Albúmina de sèrum boví
CAF	Cafeïna
CDRE	<i>Calmoduline Dependent Response Element</i>
CFW	<i>Calcofluor White</i>
CR	<i>Congo Red</i>
CWI	<i>Cell Wall Integrity</i>
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DMSO	Dimetil sulfòxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
EGTA	Àcid etilenglicoltetraacètic
EUROFAN	<i>European Functional Analysis Network</i>
GAPs	<i>GTPase Activating Proteins</i>
GDP	Guanosina difosfat
GEFs	<i>Guanoside nucleotide Exchange Factors</i>
GTP	Guanosina 5'-trifosfat
h	hores
HOG	<i>High Osmolarity Glycerol</i>
IgG	Immunoglobulina G
kpb	Kilo parells de bases

ABREVIATURES

kDa	Kilo Dalton
LiCl	Clorur de Liti
M	Molar
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MAPKK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase Kinase</i>
min	Minut
mRNA	Àcid ribonucleic missatger
TOR	<i>Target of Rapamycin</i>
OD	Densitat òptica
ONPG	o-nitrofenil- β -D-galactopiranòsid
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PKA	Proteïna quinasa dependent de AMPc
p/v	Pes/volum
RNA	Àcid ribonucleic
ROS	Espècies reactives d'oxigen
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Dodecil Sulfat de Sodi
STRE	<i>STress Response Element</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometà
v/v	Volum/Volum

II. RESUMS

Les proteïnes fosfatases de tipus 2C (PP2C) conformen una família d'enzims monomèrics conservats al llarg de l'evolució. En *Saccharomyces cerevisiae* hi ha 7 gens estructuralment relacionats que codifiquen set isoformes de les PP2C (*PTC1-7*). La isoforma més estudiada en llevats és Ptc1 ja que aquesta fosfatasa pot dur a terme múltiples funcions específiques que no comparteix amb les altres PP2C. Com a resultat, el mutant *ptc1* presenta defectes de creixement enfront diverses formes d'estrès com els que activen la via de senyalització de la integritat de la paret cel·lular (ex. pH alcalí, blanc de calcoflúor i cafeïna), en presència de cations (LiCl, CaCl₂, ZnCl₂...), enfront rapamicina (un inhibidor de la via TOR que senyalitza la manca de nutrients) o en presència d'etanol com a única font de carboni. A més, presenta problemes en l'herència de diferents orgànuls com són els mitocondris, el reticle endoplasmàtic o les vacuoles, entre molts altres defectes. Malgrat totes aquestes alteracions només es coneixen dos substrats de Ptc1: la quinasa Hog1 implicada en la via d'estrès osmòtic, i Ste5, una proteïna adaptadora de la MAPK que respon a les feromones.

L'objectiu d'aquest treball consisteix en identificar possibles dianes d'acció de Ptc1 que permetin entendre millor els mecanismes funcionals d'aquesta fosfatasa. Degut a dificultats metodològiques inherents al treball amb fosfatases, vam dissenyar dues aproximacions genètiques que ens permetessin assolir el nostre objectiu. La primera estratègia consistia en rastrejar biblioteques genòmiques de llevat per trobar gens que sobreexpressats alleugerin la sensibilitat a pH alcalí, blanc de calcoflúor i rapamicina d'una soca *ptc1Δ*. Com a resultat de la cerca s'han identificat un total de 25 gens que alleugerien un o varis fenotips característics d'un mutant *ptc1*. La majoria dels gens s'han classificat en tres grups funcionals: cicle cel·lular, funció vacuolar i tràfic de proteïnes, i manteniment de la integritat de la paret cel·lular. En aquest treball es presenta un model que apunta que la hiperactivació del mòdul MAPK de la via Slt2 influiria en l'activitat de Cdc28 la qual seria limitant en un mutant Ptc1. D'aquesta forma es relaciona per primera vegada Ptc1 amb el cicle cel·lular.

Degut que *PPH21* i *PPH22* (que codifiquen dues subunitats catalítiques redundants de la proteïna fosfatasa de tipus 2A) són els supressors que han presentat major potència de recuperació fenotípica en un mutant *ptc1*, hem aprofundit l'estudi de la interacció entre Ptc1 i aquests dos supressors. Els resultats obtinguts indiquen que la pèrdua de Ptc1 alteraria els diferents complexos de les PP2A que actuen com efectors de la via TOR quan aquesta es troba inhibida.

La segona aproximació genètica es va basar en la hipòtesis que els defectes observats en un mutant *ptc1* probablement es deuen a un estat hiperfosforilat d'un o més possibles

RESUMS

substrats de Ptc1. Per això, vam generar una col·lecció de 115 mutants on es van combinar la supressió dels gens no essencials que codifiquen proteïnes quinases o subunitats reguladores d'alguna d'elles amb la mutació *ptc1* i es va analitzar el seu creixement en vuit condicions on el mutant *ptc1* és sensible. A partir de la integració dels resultats s'han detectat una àmplia varietat d'interaccions genètiques entre Ptc1 i diferents quinases, en consonància amb una àmplia extensió funcional de Ptc1. Tot i així, només la mutació de Mkk1 (una de les dues MAPKK de la via de la integritat de la paret cel·lular) és capaç de suprimir o alleugerir tots els defectes fenotípics estudiats de la soca *ptc1Δ*. Les dades obtingudes mostren que part dels defectes de *ptc1* estan relacionats amb la hiperactivació de la quinasa Slr2 que actua *downstream* de Mkk1, reforcen la idea que Mkk1 és la principal MAPKK que actua sobre Slr2 i permeten postular que Mkk1 podria ser una diana important de Ptc1.

Type 2C protein phosphatases (PP2Cs) form a family of monomeric enzymes conserved throughout evolution. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, there are seven structurally related genes that encode different isoforms of PP2Cs (*PTC1-7*). Ptc1 is the most studied PP2C isoform in yeast because this phosphatase can perform multiple specific functions not shared by the other PP2Cs. As a result, a *ptc1* mutant fails to grow against various forms of stress such as those that activate the cell wall signaling pathway (eg. alkaline pH, Calcofluor white and caffeine), in the presence of cations (LiCl, CaCl₂, ZnCl₂, ...), rapamycin (an inhibitor of the TOR pathway that mediates the lack of nutrients response) or in plates with ethanol as the sole carbon source. A *ptc1* mutant also presents defects in organelle inheritance such as mitochondria, endoplasmic reticulum or vacuoles, among many other defects. Despite all of these alterations only two substrates of this isoform are known: the Hog1 kinase involved in osmoregulation, and the pheromone-responsive MAPK scaffold protein Ste5.

The aim of this study is to identify possible functional mechanisms of Ptc1. Due to methodological difficulties inherent in working with phosphatases, we designed two genetic approaches to achieve our goal. The first strategy was based on the screen of yeast genomic library to find genes that, when overexpressed in a *ptc1* mutant, abolish or alleviate the sensitivity of this strain to alkaline pH, Calcofluor white or rapamycin. As a result we identified a total of 25 genes that alleviate one or several characteristic phenotypes of the *ptc1* mutant. Most of these genes were classified into three functional groups: cell cycle regulation, vacuolar function and protein sorting, and cell wall integrity. We present a model where the hyperactivation of the Slr2 MAPK module would decrease the activity of Cdc28, which could become limiting in a *ptc1* mutant. This would represent the first evidence of a possible role of Ptc1 on cell cycle regulation.

We have focused on the relationship between Ptc1 and the two suppressors that exhibited the strongest ability to recover different phenotypes: *PPH21* and *PPH22*, which encode two redundant catalytic subunits of protein phosphatase type 2A. The results indicate that loss of Ptc1 alters different PP2A complexes that act as effectors of the TOR pathway when it is inhibited.

The second genetic approach was based on the hypothesis that the *ptc1* mutant defects are probably due to an hyperphosphorylated state of one or more Ptc1 substrates. Therefore, we generate a collection of 115 mutants in which we combined the deletion of nonessential genes encoding catalytic subunits of protein kinases or their regulatory proteins with the *ptc1* mutation, and analyzed their growth in eight different conditions in which the *ptc1* mutant is sensitive. Integration of the results allowed detecting a wide variety of genetic interactions between Ptc1 and different kinases, in agreement with the wide functional spread

RESUMS

of the Ptc1 phosphatase. However, only the Mkk1 mutation (one of the two MAPKK of the cell wall integrity pathway) can lighten or eliminate all phenotypic defects studied in the *ptc1Δ* strain. The data obtained show that at least part of *ptc1* defects are related to the hyperactivation of the Slt2 kinase downstream Mkk1, reinforces the idea that Mkk1 is the main MAPKK acting on Slt2 signaling, and points to Mkk1 as a likely target for the Ptc1 phosphatase.

III. INTRODUCCIÓ

1. *Saccharomyces cerevisiae* com a model a la investigació

Des de les primeres civilitzacions, el llevat *Saccharomyces cerevisiae* és conegut per les seves aplicacions en la indústria alimentària (pa, vi, cervesa, ...) i, actualment, és un dels organismes amb major interès biotecnològic a fi de produir diferents compostos amb afany comercial. En el context de recerca científica, és un organisme adequat per utilitzar-lo com a model per l'estudi de mecanismes moleculars de les cèl·lules eucariotes gràcies a que es tracta d'un organisme relativament fàcil de créixer i manipular i presenta una genètica accessible en comparació amb altres eucariotes. L'any 1996 es va assolir un gran èxit amb la seqüenciació del primer genoma eucariota de *S. cerevisiae* (Goffeau et al. 1996). Aquest fet, juntament amb el interès industrial que hi ha per aquest organisme, han permès que es disposi d'un gran fons de coneixement bioquímic i genètic d'aquest llevat. Per altra banda, malgrat la seva simplicitat, manté molts processos cel·lulars bàsics d'organismes més complexos (com per exemple: transcripció, regulació del cicle cel·lular, etc.), fet que permet transferir la informació obtinguda en el llevat a organismes més complexos, fins i tot l'ésser humà.

2. La fosforilació de proteïnes com a mecanisme de regulació

2.1. Aspectes generals de la fosforilació

La fosforilació reversible de proteïnes és considerat el principal mecanisme de modificació post-traducciona degut a la seva implicació en la regulació d'una àmplia varietat de processos biològics com són el metabolisme, la transcripció gènica i el cicle cel·lular. A més a més, actua com a mecanisme de resposta enfront a un extens ventall d'estímuls. L'estat de fosforilació de qualsevol proteïna depèn específicament del balanç de l'activitat de les proteïnes quinases (PK) i fosfatases (PP). Aquesta modificació pot comportar diverses alteracions funcionals de la molècula com, per exemple: i) incrementar o disminuir la seva activitat biològica; ii) induir l'estabilització o desestabilització d'algunes proteïnes o iii) promoure o impedir la interacció amb altres proteïnes (Cohen 2002).

La rellevància d'aquest mecanisme de regulació no es manifesta només per la importància de les funcions que desenvolupa en l'entorn cel·lular, on aproximadament el 30% del proteoma de *S. cerevisiae* es veu afectat (Ptacek et al. 2005), sinó que també s'evidencia a l'hora d'analitzar un genoma típic eucariota en el qual s'observa que els gens que codifiquen per PP i PK representen entre el 2-4% del nombre total de gens (Manning et al. 2002). Malgrat que es podria suposar que el nombre de PK i PP codificat al genoma d'organismes eucariotes

INTRODUCCIÓ

és similar, la realitat és que hi ha molts més gens codificants de PK que de PP. Un exemple és el genoma humà el qual es creu que pot codificar 518 possibles quinases (Johnson & Hunter 2005) mentre que només disposa de 150 gens que codifiquin proteïnes fosfatases (Shi 2009).

Les proteïnes es poden fosforilar en nou residus diferents: tirosina, serina, treonina, cisteïna, arginina, lisina, aspàrtic, glutamat i histidina, sent la fosforilació en serina, treonina i tirosina les predominants en les cèl·lules eucariotes i les principals implicades en funcions de regulació (Moorhead et al. 2009). En concret, un estudi del proteoma humà mostra que la fosforilació en els residus de serina, treonina i tirosina representen aproximadament el 86.4, 11.8 i el 1.4 %, respectivament, del nombre total d'aminoàcids fosforilats (Olsen et al. 2006).

Històricament s'han classificat les fosfatases en funció del residu que defosforilen agrupant-les principalment en tres famílies: el grup de les Ser / Thr fosfatases, la superfamília de les tirosina fosfatases (PTP, *protein tyrosine phosphatase*) i un tercer grup on s'engloben aquelles fosfatases duals capaces de defosforilar tant els residus de Ser/Thr com els de Tyr.

2.2. Propietats de les Ser/Thr fosfatases

Les Ser / Thr fosfatases conformen el grup més abundant de fosfatases. Inicialment, seguint criteris bioquímics van ser classificades en fosfatases de tipus 1 (PP1) i de tipus 2 (PP2). Posteriorment, aquestes últimes es varen dividir en subgrups en funció de la necessitat d'ions metàl·lics per desenvolupar la seva activitat: 2A (no en requereixen), 2B (són estimulables per Ca^{2+}) i 2C (dependents de Mg^{2+}) (Ingebritsen & Cohen 1983; Cohen 1989). Tot i així, gràcies a l'aplicació de tècniques de seqüenciament es va millorar aquesta classificació (Figura 1).

Basant-se en la seqüència, l'estructura i les seves activitats enzimàtiques, les Ser / Thr fosfatases són classificades en tres famílies principals (Cohen 1997): la família PPP (*phosphoprotein phosphatase*) que inclou, entre d'altres, les fosfatases de tipus 1, 2A i 2B (coneguda també com a calcineurina o fosfatases regulades per Ca^{2+} / calmodulina); la família PPM (*metallo-dependent protein phosphatases*) que comprèn les fosfatases de tipus 2C (PP2C) les quals es tractaran àmpliament en aquest treball i les piruvat deshidrogenasa fosfatases. Finalment, hi ha un últim grup de proteïnes el mecanisme catalític de les quals depèn de l'activitat basada en un residu d'aspàrtic. En aquest s'integren les subfamílies HAD i FCP / SCP (per una revisió consultar (Shi 2009)).

Família	Subfamília	Subunitat catalítica (<i>S. cerevisiae</i>)
PPP	PP1	Glc7
	PP2A	Pph21, Pph22
	PP4	Pph3
	PP5	Ppt1
	PP6	Sit4
	PP2B (Calcineurina)	Cna1, Cna2
	PP7	-
	Similar a PP1 Similar a PP2A	Ppz1, Ppz2, Ppq1 Ppg1
PPM	PP2C	Ptc1-4, Ptc7
	Piruvat deshidrogenasa fosfatasa	Ptc5, Ptc6
Catàlisi basada en Asp	HAD	Psr1, Psr2, Nem1
	FCP/SCP	Fcp1, Ssu72, Rtr1

Figura 1. Classificació de les Ser / Thr fosfatases. Es mostren les 3 famílies principals de fosfatases, així com les subfamílies que inclouen cada una. A la columna de la dreta es detallen les subunitats catalítiques de *S. cerevisiae* per a cada subfamília. El símbol (-) indica que no hi ha homòleg descrit de PP7 en *S. cerevisiae*. Figura adaptada i actualitzada de (Shi 2009).

A diferència de les proteïnes quinases, les fosfatases conformen un grup molt més heterogeni i divers. A més a més, l'estudi de l'activitat de les fosfatases s'ha vist dificultat degut a la manca de seqüències consens de defosforilació i per la problemàtica de no disposar de substrats específics de funció fosforilables en els residus adequats. Per aquests motius, les proteïnes fosfatases es coneixen en menys detall.

2.3 La família de proteïnes fosfatases de tipus 2C

Les proteïnes fosfatases de tipus 2C conformen un grup d'enzims àmpliament representat en fongs, plantes, insectes i mamífers (Schweighofer et al. 2004). S'ha proposat que les PP2C es van originar en estadis primaris del llinatge eucariota i que van ser transmesos cap a organismes procariotes per transferència horitzontal (Zhang et al. 2003). El fet que les PP2C es trobin conservades al llarg de l'evolució suggereix que aquests enzims desenvolupen funcions importants a la cèl·lula com són la regulació de la proliferació, del metabolisme i de la supervivència cel·lular (Lammers & Lavi 2007).

Malgrat que la família PP2C està formada per un grup de proteïnes amb una seqüència primària poc relacionada amb la de les PPPs, presenten certa similitud amb l'estructura tridimensional i el mecanisme catalític de les PPPs. Pel que fa a l'activitat catalítica de les PP2Cs, a diferència del que passa a la família de fosfatases PPPs, no es veu inhibida per l'àcid ocaidaic ni per la microcistina, però requereixen la presència de cations divalents com Mg^{2+} o Mn^{2+} per ser catalíticament actives. El coneixement del procés catalític de les PP2Cs prové de

INTRODUCCIÓ

la determinació de l'estructura per cristal·lografia de la isoforma humana PP2C α (Das et al. 1996). El domini catalític conservat de les PP2Cs es basa en un sandwix central creat per dues làmines β envoltades per dues hèlixs α cada una (veure Figura 2). Aquesta estructura forma un espai entre les dues làmines β que permet acomodar dos ions metàl·lics. Cada ió està hexacoordinat amb aminoàcids (generalment amb els grups carboxils de residus d'aspàrtic) i molècules d'aigua. Així doncs, per eliminar o reduir l'activitat catalítica de les PP2Cs és necessari mutar algun d'aquests residus d'aspàrtic.

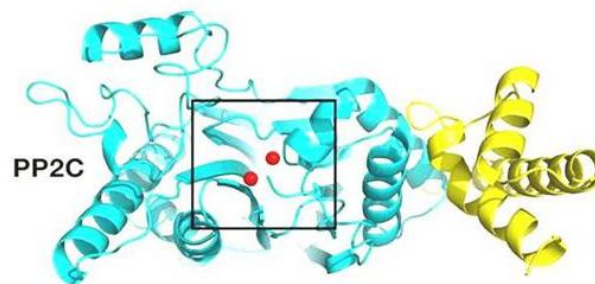


Figura 2. Estructura de la isoforma humana PP2C α . En blau es mostra el domini catalític mentre que es representen els ions metàl·lics en vermell. A més a més, aquesta proteïna conté tres hèlixs α addicionals (destacades en groc), situades a un dels costats del domini catalític (a l'extrem C-terminal de la proteïna). Esquema adaptat de (Shi 2009).

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, generalment en els organismes eucariotes existeixen més proteïnes Ser / Thr quinases que Ser / Thr fosfatases. Per tant, existeix a priori un cert desavantatge numèric respecte les quinases per dur a terme reaccions de defosforilació. Per aquest motiu, algunes famílies de Ser / Thr fosfatases (principalment les que formen part de la família PPP) han desenvolupat un mecanisme evolutiu basat en la seva associació amb diferents subunitats reguladores. Tot i així, no sembla que aquesta sigui l'estratègia emprada per les PP2C ja que són monomèriques i, malgrat existeixen excepcions, generalment careixen de subunitats reguladores.

Actualment, existeixen diverses interpretacions que permeten explicar l'elevada diversitat funcional de les PP2Cs. Una d'elles podria ser el fet que s'expressen un nombre elevat d'isoformes catalítiques. Així doncs, s'han identificat com a mínim 14 gens en humans i, probablement, es poden obtenir més de 20 polipèptids per mecanismes de *splicing*. Sorprenentment, en el model de plantes *Arabidopsis thaliana* s'han identificat o predit a prop de 80 proteïnes fosfatases de tipus 2C (Kerk et al. 2002; Xue et al. 2008). En molts casos, les diferents isoformes de PP2Cs presenten una peculiaritat estructural que les caracteritza.

Aquesta distinció es deu a la presència d'una ampla varietat d'extensions tant en el domini amino com en el carboxi terminal del mòdul catalític que, suposadament, podrien conferir especificitat funcional (com a exemple, a la Figura 2, es mostra en groc l'extensió de la isoforma humana PP2C α en el seu extrem C-terminal). Altres estratègies de modulació de l'activitat de les PP2Cs que han sigut proposades, són l'expressió diferencial en teixits o tipus cel·lulars, modificacions post-traduccionals, compartimentalització subcel·lular o diferents processos de degradació. Sense dubte, degut a la importància d'aquesta família de fosfatases, és un gran repte el fet d'aprofundir els coneixements d'aquestes proteïnes determinant els mecanisme de regulació, nous substrats o assignant noves funcions. Tot i així, i a diferència del que succeeix amb altres fosfatases, la falta d'inhibidors específics de la seva activitat ha complicat notablement aquestes fites.

3. La família de proteïnes fosfatases del tipus 2C en *Saccharomyces cerevisiae*

Així com succeeix en organismes eucariotes més complexes, en el llevat *Saccharomyces cerevisiae* també existeixen diversos gens que codifiquen les PP2C. Principalment, es van descriure cinc proteïnes que formaven part d'aquesta família de fosfatases i es van denominar Ptc1-5 (de *phosphatase two C*) (Cheng et al. 1999). Tanmateix, en els últims anys aquest nombre ha augmentat degut que s'han identificat dos nous membres: Ptc6 (Ruan et al. 2007) i Ptc7 (Jiang et al. 2002) (veure Figura 2).

INTRODUCCIÓ

ORF	Nom		Longitud (aa)	Simil./Ident. vs. Ptc1
YDL006w	Ptc1		281	100 / 100
YER089c	Ptc2		464	56,8 / 30,2
YBL056w	Ptc3		468	61,2 / 32,2
YBR125c	Ptc4		393	56,8 / 26,5
YOR090c	Ptc5		572	52,3 / 22,7
YCR079w	Ptc6		442	53,7 / 23,2
YHR076w	Ptc7u		374	56,5 / 25,2
	Ptc7s		343	

Figura 3. La família de les proteïnes fosfatases de tipus 2C en *Saccharomyces cerevisiae*. Representació esquemàtica de l'estructura primària de les 7 isoformes on la línia negra simbolitza cada proteïna i les caixes blaves representen el domini catalític de cada fosfatasa (domini PP2C, SM00332, segons la base de dades SMART (Schultz et al. 1998)). Els nombres situats dins dels dominis catalítics indiquen les posicions (en funció del residu aminoacídic) que abasten aquests dominis. La columna "ORF" fa menció al nom sistemàtic del gen. La longitud indica el número d'aminoàcids de la proteïna. Degut a mecanismes de *splicing*, el gen *YHR076W* pot donar lloc a dues proteïnes: Ptc7_u (*unspliced*) i Ptc7_s (*spliced*) amb diferents funcions cel·lulars (Juneau et al. 2009). El rectangle taronja destaca la presència d'un domini transmembrana que s'estén des del residu 17 al 39 de la proteïna Ptc7_u. Finalment, es mostren els percentatges de similitud i identitat de les regions solapants de les diferents PP2Cs respecte la isoforma 1 (determinades mitjançant el programa informàtic FASTA emprant la matriu BLOSUM50). Esquema de (Arino et al. 2011).

Les funcions cel·lulars que desenvolupen les PP2C de llevat estan implicades, generalment, en la regulació del creixement cel·lular i la senyalització de l'estrès. Concretament, el principal paper conegut d'aquestes proteïnes es basa en regular negativament la via de senyalització induïble per estrès osmòtic, coneguda com la via HOG (*high osmolarity glycerol*), defosforilant i inactivant la MAPK Hog1. Diverses isoformes de les PP2C s'han relacionat amb aquesta funció malgrat que compleixen papers lleugerament diferents. A continuació, es detallaran les funcions cel·lulars amb les que s'han relacionat cada una de les PP2C de *S. cerevisiae*.

3.1 La fosfatasa Ptc1

De les 7 isoformes existents al llevat, de la que es disposa més informació és de la primera. Degut que la proteïna Ptc1 és el centre d'aquest treball, es dedicarà un apartat exclusiu per explicar detingudament la informació disponible d'aquesta fosfatasa.

3.1.1 Relació entre Ptc1 i la via HOG

L'any 1993 es va identificar per primera vegada el gen *PTC1* en una cerca de mutacions que empitjoressin el creixement de soques que els mancaven les tirosina fosfatases Ptp1 o

Ptp2 (Maeda et al. 1993). Així doncs, la manca de Ptc1 agreuja dràsticament el creixement d'un mutant *ptp2* en condicions basals. Aquest fet permetia especular sobre la possibilitat que tant Ptp2 com Ptc1 estiguessin actuant sobre diferents substrats de funció redundant o sobre un únic substrat fosforilable en residus de serina/treonina i tirosina. Les dades convidaven a pensar que un dels candidats a ser regulat per aquestes fosfatases podria ser una MAPK. A la mateixa publicació, es demostrà que el producte del gen *PTC1* presenta activitat fosfatasa *in vitro* i que aquesta requereix ions Mn^{2+} o Mg^{2+} , malgrat que és molt més eficient amb el Mn^{2+} (Maeda et al. 1993).

Un any després, es determinà que la sobreexpressió de *PTC1* és capaç de rescatar el fenotip de letalitat d'un mutant *sln1* (un osmosensor la deleció del qual és letal degut a la hiperactivació de la via de senyalització HOG regulable per estrès osmòtic) (veure la Figura 4 per un diagrama de la via) (Maeda et al. 1994). En el mateix treball es proposava que Ptc1 afecta negativament a la funció de Pbs2, una MAPKK que desenvolupa un paper essencial a la via HOG (Maeda et al. 1994).

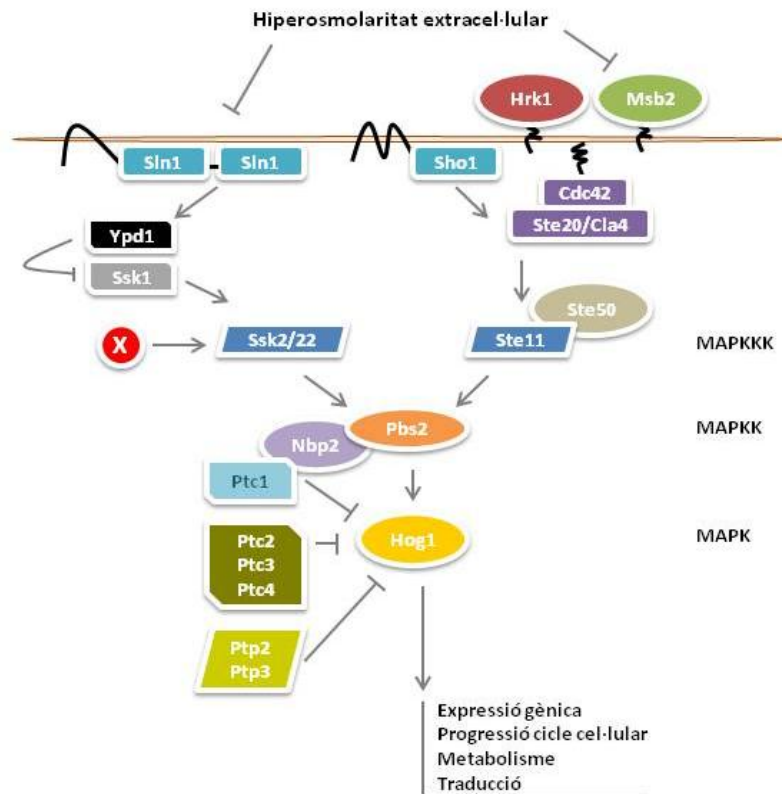


Figura 4. La via HOG i els seus components. La ruta HOG és el sistema osmoregulador més ben caracteritzat en eucariotes. Respon específicament a un increment de la osmolaritat permetent créixer a la cèl·lula sota aquestes condicions. Aquesta via es pot activar, principalment, a través de dos mecanismes independents. Un d'ells es compon de Sln1, Ypd1 i Ssk1. Sln1 és una histidina quinasa que en condicions basals està fosforilada. En presència d'estrès osmòtic, Sln1 es desfosforila, fet que provoca la que les quinases Ypd1 i Ssk1 també ho facin. En l'estat desfosforilat, Ssk1 activa les MAPKK Ssk2 i Ssk22 les quals fosforilen i activen a Pbs2. Recentment s'ha demostrat que Ssk2 es pot activar també independentment de Ssk1, tot i així, no se'n coneix el mecanisme (X) (Zhi et al. 2013). L'activació de Pbs2 també es pot donar a través d'un altre mecanisme que implica la proteïna Sho1 (la qual s'uneix a Pbs2 i la segresta a la superfície cel·lular) i a la proteïna Cdc42, les quinases Ste20 i Cla4, i el complex Ste11-Ste50. Ste20 fosforila i activa la MAPKKK Ste11, que activa a Pbs2. La forma fosforilada de Pbs2 activa Hog1 fosforilant-la als residus Thr174 i Tyr176. Un cop Hog1 és fosforilada, aquesta proteïna migra ràpidament al nucli permetent iniciar un conjunt de respostes osmoadaptatives que inclouen la regulació metabòlica (acumulació de glicerol a la cèl·lula), la regulació de la síntesis de proteïnes, l'adaptació del cicle cel·lular i la regulació de l'expressió gènica. Figura adaptada de (Saito & Posas 2012).

Paral·lelament a aquesta publicació n'apareixia una altra on, a partir de fenotips relacionats amb el dany a la paret cel·lular, es va establir que hi ha una relació d'epistasis entre *PTC1* i *PBS2* (Jiang et al. 1995). Mentre que el mutant *ptc1* és tolerant als efectes de la toxina *killer K1* el doble mutant *ptc1 pbs2* mostra un fenotip de sensibilitat similar al que s'observa quan s'elimina *PBS2* el qual és més sensible que una soca salvatge (Jiang et al. 1995).

Per altra banda, i a la mateixa publicació, es va demostrar que les cèl·lules que els mancava *Ptc1* tenen uns nivells intracel·lulars de glicerol superiors als de la soca salvatge. Aquest fenotip es veu suprimit quan s'elimina *PBS2*, fet que permetia especular amb la

possibilitat que en el mutant *ptc1* podria existir un augment en l'activitat de la via HOG (Jiang et al. 1995).

Així doncs, tota aquesta informació establia les primeres evidències genètiques que situaven la fosfatasa Ptc1 com un regulador negatiu de la ruta de senyalització HOG, malgrat que el mecanisme no es coneixia. Gracies a experiments genètics realitzats en el llevat *S. pombe* aquesta hipòtesis va agafar més consistència ja que el gen ortòleg de *PTC1* en *S. pombe* (*ptc1*) que codifica una proteïna que comparteix un 35 % d'identitat amb Ptc1 de *S. cerevisiae* i és essencial per la supervivència després d'un xoc tèrmic, té un paper clau en la osmoregulació ja que actua contrarestant l'efecte de la MAPKK Wis1, l'ortòleg de Pbs2 (Shiozaki et al. 1994; Shiozaki & Russell 1995).

Posteriorment, es va comprovar que el defecte sever de creixement d'un mutant *ptc1 ptp2* es deu a la hiperactivació de la via HOG (Jacoby et al. 1997) ja que aquest fenotip es perd quan s'elimina *HOG1* o *PBS2*. Tot i així, no va ser fins quatre anys després que, mitjançant assajos de fosforilació *in vitro*, es va demostrar que Ptc1 defosforila a Hog1 (concretament la Thr174, un residu que juntament amb la Tyr176 es troben situats al *loop* d'activació i són indispensables per l'activació de la MAPK) i que aquesta fosfatasa és necessària per regular *in vivo* l'estat de fosforilació de Hog1 tant a nivell basal com durant l'adaptació a l'estrès (Warmka et al. 2001). D'acord amb el seu paper com inhibidor directe de Hog1, el qual s'acumula al nucli després de ser activat (Ferrigno et al. 1998; Reiser et al. 1999), es va concretar que Ptc1 es localitza tant al nucli com en el citoplasma (Warmka et al. 2001).

Experiments a gran escala emprant la tècnica del doble híbrid van determinar que Ptc1 interacciona físicament amb Nbp2 (Ito et al. 2000; Uetz et al. 2000), una proteïna que conté un domini SH3 (*Scr homology 3*). Aquesta proteïna va ser identificada degut a la seva capacitat d'unió amb Nap1 (Shimizu et al. 2000), una proteïna que està implicada en la morfogènesis de la gemma i amb la progressió del cicle cel·lular (Kellogg & Murray 1995; Altman & Kellogg 1997). A part de la seva interacció amb Ptc1, hi havia altres evidències que apuntaven a una implicació de Nbp2 amb la via HOG: a) Pbs2 s'havia co-purificat amb Nbp2 i Ptc1, b) Pbs2 actua com a ancoratge per unir a diversos elements de la ruta HOG per exemple Hog1, Sho1, Ste11 i Ssk2/22 (Posas & Saito 1997; Tatebayashi et al. 2003) i, c) Ptc1 inactiva Hog1 per defosforilació. Així doncs, es va demostrar que Ptc1 actua sobre la via HOG a través de la proteïna adaptadora Nbp2 (veure Figura 3) el domini terminal del qual és necessari per la seva unió amb la fosfatasa mentre que el domini SH3 és responsable de la seva unió amb Pbs2

INTRODUCCIÓ

(Mapes & Ota 2004). En el llevat *S. cerevisiae*, aquest és el primer i únic exemple de l'existència d'una proteïna adaptadora que controli una PP2C.

Clarament el paper més estudiat i entès de Ptc1 és el de la regulació de la via HOG. Tot i així, hi ha diverses evidències a la literatura que apunten cap a una relació entre Ptc1 i la ruta de senyalització de la integritat cel·lular (CWI, *cell wall integrity*), també coneguda com la via de la Pkc1/Slt2 i que es tractarà amb més detall en un capítol posterior (veure apartat 4.3).

3.1.2 Ptc1 i l'herència de diferents orgànuls

En els últims anys, s'han publicat varis estudis que relacionen la fosfatasa Ptc1 amb l'herència de diferents orgànuls com són el reticle endoplasmàtic (RE), els mitocondris i les vacuoles.

En soques salvatges l'herència del reticle endoplasmàtic i l'emergència de la gemma són processos simultanis. Du i col·laboradors van observar que el mutant *ptc1* presenta un marcat defecte en l'herència del RE cortical. La segregació d'aquest orgànul de la cèl·lula mare a la filla consta de diverses etapes. Inicialment, els túbuls s'alineen al llarg de l'eix entre la cèl·lula mare i la gemma i, tot seguit, són prolongats cap a la cèl·lula filla. A continuació, s'ancoren a la punta de la gemma i, finalment, aquests es distribueixen per la perifèria d'aquesta obtenint una estructura poligonal. Concretament en l'última fase és on el mutant *ptc1* presenta un marcat retràs. A l'estudi de Du i col·laboradors es va descriure que la fosfatasa Ptc1 controla l'herència del RE a través de la regulació de la quinasa Slt2 de la via CWI: la pèrdua de Ptc1 resulta en un increment de l'activació de Slt2, mentre que, la deleció de *SLT2* suprimeix el defecte de l'herència del RE del mutant *ptc1* (Du et al. 2006). Està demostrat que Slt2 té un pic d'activació alhora que els primers túbuls del RE s'ancoren a l'extrem de la gemma (Li et al. 2010). D'aquesta forma, Li i col·laboradors van proposar que la manca de Ptc1 provoca que Slt2 no es desfosforili, bloquejant l'herència del RE en aquesta fase. La localització de Slt2 a l'extrem de la gemma requereix la funció de la proteïna Spa2, un component del complex del polarisoma encarregat de l'organització dinàmica del citoesquelet d'actina durant el creixement polaritzat. Cal destacar que Spa2 no només recluta Slt2 al còrtex cel·lular sinó també les MAPKK *upstream* de Slt2, Mkk1/2, però no altres MAP quinases (van Drogen & Peter 2002). Tant la pèrdua de la funció de Spa2 com mutar la seqüència de Slt2 necessària per la seva localització a la punta de la gemma provoquen la supressió del defecte en l'herència del RE del mutant *ptc1* (Li et al. 2010).

Una altra alteració que presenten les cèl·lules que els manquen la fosfatasa Ptc1 és l'herència mitocondrial. La pèrdua de Ptc1 provoca un retràs en el traspàs dels mitocondris des de la cèl·lula mare cap a la gemma naixent (Roeder et al. 1998). Per aquest motiu, Ptc1 és coneguda també com a Mdm28, per *mitochondrial distribution and morphology*. Experiments genètics publicats en el mateix estudi, permeten descartar la implicació de la via HOG com a mecanisme regulador de l'herència d'aquest orgànu (Roeder et al. 1998). Anys més tard, es demostrà que en un mutant *ptc1* la deleció del gen *SLT2* suprimeix el defecte de l'herència mitocondrial, indicant que Ptc1 és necessari per la disminució de l'activitat d'aquesta MAPK (Li et al. 2010). En aquest cas, el defecte de l'herència mitocondrial degut a la hiperactivació de SlT2 és independent del polarisoma (Li et al. 2013). Aquests resultats són consistents amb el moment que s'observa el bloqueig de l'herència dels mitocondris, el qual té lloc durant una etapa anterior respecte a la fase de bloqueig de l'herència del RE.

Paral·lelament a aquest problema inicial en l'herència mitocondrial, s'ha descrit també que en cèl·lules que els manca la fosfatasa Ptc1 hi ha una altra alteració en fases més tardanes (Swayne et al. 2011). En concret, s'ha observat en un mutant *ptc1* una disminució del 50% dels nivells de la proteïna Mmr1 que forma part del complex DSL1 i que permet l'ancoratge dels mitocondris al RE cortical. La pèrdua de Ptc1 provoca que aquesta proteïna estigui hiperfosforilada i deslocalitzada, situant-se entre la cèl·lula mare i la cèl·lula filla. Alhora, s'observa un increment de l'associació de Mmr1 amb el RE i una disminució de la interacció de la mateixa proteïna amb els mitocondris. A més a més, la deleció de Ptc1, així com mutar Mmr1, causa una disminució de l'acumulació dels mitocondris a l'extrem de la gemma. Aquests resultats suggereixen que la fosfatasa Ptc1 regularia la fosforilació de Mmr1 afectant la seva localització a l'extrem de la gemma i la seva associació amb el reticle endoplasmàtic i els mitocondris, promovent la unió d'aquests dos orgànuls en l'extrem de la gemma i no en altres àrees de la cèl·lula (Swayne et al. 2011).

En un estudi publicat l'any 2009 (Jin et al. 2009) es va determinar que la fosfatasa Ptc1 complementa els defectes del mutant *vac10-1*, el qual va ser identificat en una cerca de soques defectives en l'herència vacuolar (Wang et al. 1996). Va resultar que aquest mutant contenia una mutació que elimina l'activitat catalítica de Ptc1, de tal forma que la funció de la fosfatasa Ptc1 sembla ser necessària per assegurar la correcta herència vacuolar (Du et al. 2006; Jin et al. 2009). En aquest cas i, en funció de la informació genètica de la qual es disposa, el mecanisme a través del qual Ptc1 controla el moviment de les vacuoles de la cèl·lula mare a la filla no implica ni la via HOG ni la ruta de la integritat de la paret cel·lular (Du et al. 2006) (Jin et al. 2009).

INTRODUCCIÓ

A part de les alteracions en l'herència del RE cortical, mitocondrial i vacuolar, la manca de Ptc1 presenta problemes en l'herència d'altres orgànuls: peroxisomes i vesícules secretores (Jin et al. 2009). Tots els orgànuls es caracteritzen per ser transportats per Myo2 o Myo4, els dos motors de miosina de classe V. La transferència dels diferents orgànuls a través d'aquestes proteïnes depèn d'uns receptors específics per cada orgànul. Així doncs, s'ha proposat que Ptc1 afecta l'estabilitat d'alguns d'aquests receptors com Vac17, Inp2 i Mmr1 que uneixen Myo2 a la vacuola, els peroxisomes i el mitocondri, respectivament (Jin et al. 2009) ja que els nivells d'aquestes proteïnes disminueixen en absència de Ptc1. Aquest fet situaria la fosfatasa Ptc1 com un element clau en el control de la distribució dels orgànuls (Fagarasanu & Rachubinski 2007; Jin et al. 2009). Tot i així, encara són necessaris més estudis per dilucidar noves dianes de Ptc1 i els mecanismes exactes de regulació d'aquests processos. A la Figura 5 es mostra un resum de les principals vies implicades en l'herència dels orgànuls descrits, els quals semblen estar controlats per Ptc1.

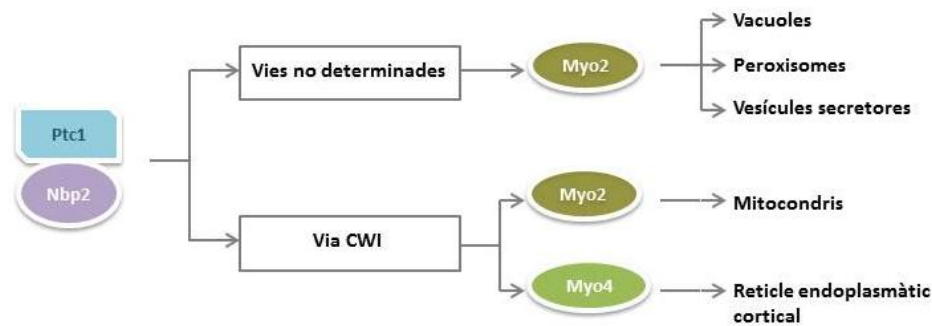


Figura 5. Esquema de la fosfatasa Ptc1 i l'herència de diferents orgànuls. Model adaptat de (Jin et al. 2009) que resumeix la regulació que dur a terme el tàndem Ptc1/Nbp2 sobre els motors de miosina per controlar l'herència dels diversos orgànuls.

3.1.3 Altres fenotips del mutant *ptc1*

A més dels fenotips ja esmentats, s'ha relacionat a la fosfatasa Ptc1 amb altres processos, tot i que, en molts dels casos no es té clar el mecanisme d'actuació. A partir d'una cerca de soques mutants que fossin incapaces de processar correctament els tRNAs, es va identificar el gen *TPD1* (de *tRNA processing defective*) (van Zyl et al. 1989). En un estudi del mateix grup publicat posteriorment, es va descobrir que *PTC1* és un al·lel de *TPD1*, implicant d'aquesta forma la fosfatasa Ptc1 en el *splicing* del tRNA (Robinson et al. 1994). Per altra banda, en aquest mateix treball, es va realitzar una caracterització fenotípica que va revelar un ampli ventall d'alteracions atribuïbles a la manca de la fosfatasa Ptc1 en cèl·lules diploides. Alguns d'aquests exemples són: una disminució en l'eficiència d' esporulació, importants defectes de separació cel·lular (sobretot després d'una incubació de les cèl·lules a 37 °C) i la

incapacitat de créixer en medis que tenen com a font de carboni compostos no fermentables com lactat, etanol o glicerol (Robinson et al. 1994).

Per altra banda, la pèrdua de la fosfatasa Ptc1 provoca a les cèl·lules un augment de la sensibilitat a una sèrie d'agents com el sorbat, un àcid orgànic dèbil emprat per preservar aliments (Mollapour et al. 2004) o l'oleat (Lockshon et al. 2007). La sensibilitat a oleat és pròpia, malgrat que no és exclusiva, de cèl·lules amb problemes en el funcionament peroxisomal. Així doncs, podria ser que aquest fenotip estigués relacionat amb la deficiència en l'herència dels peroxisomes associat al mutant *ptc1*. Tot i així, la toxicitat de l'oxalat augmenta en cèl·lules que els manca *PTC1*. S'ha postulat que la via HOG podria estar implicada en la transducció de senyals causades per l'estrès provocat per l'oxalat (Cheng et al. 2007).

El mutant *ptc1* presenta una lleugera sensibilitat també a l'àcid 13-hidroperoxilinoèic, un compost oxidant producte de la peroxidació lipídica que provoca un retràs en la fase G1 del cicle cel·lular. Un dels mecanismes que s'ha postulat que podria estar implicat en la sensibilitat a aquest agent involucraria la proteïna Mms22, implicada en la resistència a la radiació ionitzant. A més, tampoc es descarta que la via HOG hi tingut algun rol (Fong et al. 2008).

Finalment, cal esmentar que *PTC1* és un supressor en multicòpia del fenotip de letalitat del doble mutant *flc1 flc2*. Aquests dos gens codifiquen dos transportadors de flavines necessàries per importar FAD al reticle endoplasmàtic. El fet que la sobreexpressió de la fosfatasa Ptc1 millori el creixement d'aquest doble mutant podria dependre de la relació entre Ptc1 i la via de la integritat de la paret cel·lular (Protchenko et al. 2006).

3.2 Altres membres de la família de PP2C en *S. cerevisiae*

Les isoformes 2 i 3 de les PP2C són dues proteïnes que comparteixen un 62 % d'identitat i un 77 % de similitud entre elles (Maeda et al. 1993; Cheng et al. 1999), l'origen de les quals podria ser causat degut a una duplicació genòmica (Wolfe & Shields 1997). Ptc2 i Ptc3 es diferencien de Ptc1 estructuralment ja que presenten una extensió a l'extrem carboxil d'aproximadament 170 residus que, en el cas de Ptc2, es requereix per aconseguir la seva màxima activitat (Young 2002). En comparació amb la isoforma 1, l'activitat de les fosfatases Ptc2 i Ptc3 és major en presència de Mg^{2+} que de Mn^{2+} (cheng 1999). En un mutant *ptc1*, l'expressió de Ptc2 o Ptc3 no és capaç de complementar la falta de Ptc1, el què suggereix que no són funcionalment intercanviables (Maeda et al. 1993). Malgrat aquest fet, aquestes dues fosfatases també estan implicades en la regulació de la MAPK Hog1, tot i que desenvolupen funcions lleugerament diferents a la que dur a terme Ptc1 ja que limiten els nivells d'activació

INTRODUCCIÓ

màxima de la via HOG després d'una situació d'estrès (Young et al. 2002). A diferència del que passa amb Ptc1, aquestes dues proteïnes no són capaces d'interaccionar amb Nbp2 (Mapes & Ota 2004).

Cal destacar que la fosfatasa Ptc2 està involucrada en altres processos. En concret, regula de forma negativa la resposta a proteïnes mal plegades defosforilant la Ser/Thr quinasa Ire1 (Welihinda et al. 1998) la qual és necessària per induir transcripcionalment aquesta resposta al RE. A més a més, Ptc2 també és important per la preservació de la viabilitat cel·lular enfront agents que comprometen la integritat del DNA (Marsolier et al. 2000).

A part de la implicació de les isoformes 2 i 3 de les PP2Cs enfront al dany al DNA, també s'han associat amb la regulació de la progressió del cicle cel·lular (Cheng et al. 1999) degut a la seva capacitat de defosforilar de forma específica el residu Thr169 de Cdc28, la principal quinasa dependent de ciclins (CDK) que existeix en *S. cerevisiae*. És important destacar que la fosforilació en aquest residu és essencial per la seva activitat com a CDK. Aquest fet és extrapolable als eucariotes superiors ja que en un treball de l'any 2000 es demostra que una isoforma de les fosfatases de tipus 2C humana (PP2C β) és capaç de defosforilar a Cdk2 i a Cdk6 (Cheng et al. 2000).

Un altre membre d'aquest tipus de fosfatases és la proteïna Ptc4, de la qual se'n va demostrar la seva activitat fosfatasa per mitjà d'experiments *in vitro* emprant com a substrat la caseïna (Cheng et al. 1999). Aquesta proteïna es localitza al citoplasma i la seva sobreexpressió és capaç de disminuir tant el nivell de fosforilació com l'activitat de Hog1 així com, de suprimir la letalitat del doble mutant *cnb1 slt2*. Aquest últim fet també és característic de les isoformes 1, 2 i 3 (Shitamukai et al. 2004). Una de les possibles explicacions es podria deure a la capacitat d'aquestes fosfatases per inhibir la via HOG ja que la deleció d'aquesta quinasa també rescata la letalitat de la soca *cnb1 slt2* (Shitamukai et al. 2004).

Existeixen pocs treballs relacionats amb les possibles funcions de la fosfatasa Ptc5. L'any 1999 Cheng i col·laboradors demostraven que Ptc5 posseïa activitat fosfatasa en condicions *in vitro* (Cheng et al. 1999). Posteriorment, es va evidenciar que la aquesta proteïna es localitza a la matriu mitocondrial on, juntament amb la isoforma 6, defosforila el residu Ser133 de Pda1, la subunitat E1 α del complex piruvat deshidrogenasa (PDH) que catalitza la descarboxilació oxidativa del piruvat per obtenir acetil-CoA (Krause-Buchholz et al. 2006; Gey et al. 2008). Recentment s'ha demostrat que la fosfatasa Ptc5 es pot localitzar també a l'espai intermembranal després de tractar les cèl·lules amb Bax, una proteïna proapoptòtica (Vögtle et al. 2012).

Malgrat que des del 1996 es creia que *YCR079w* codificava una fosfatasa de tipus 2C (Stark 1996), no va ser fins el 2007 que Ruan i col·laboradors ho van demostrar, i la van nomenar Ptc6 (Ruan et al. 2007). S'ha vist que la proteïna Ptc6 es localitza tant a la matriu mitocondrial com a l'espai intermembranal (Tal et al. 2007; Gey et al. 2008). A més de participar en la regulació de l'estat de fosforilació de Pda1, com ja s'ha esmentat en el paràgraf anterior (Gey et al. 2008), també és necessària per la supervivència de les cèl·lules en fase estacionària i per realitzar la mitofàgia (Tal et al. 2007; Journo et al. 2009).

Al 2002 es van determinar les propietats bioquímiques de l'última isoforma de PP2C coneguda, la fosfatasa Ptc7 (Jiang et al. 2002). Així com les isoformes 5 i 6, aquesta proteïna es localitza al mitocondri (Ramos et al. 2000). Malgrat que la manca de *PTC7* no produeix cap anomalia cel·lular, la sobreexpressió d'aquest gen millora el creixement de cèl·lules en presència d'etanol o galactosa com a font de carboni en un entorn amb baix oxigen. Cal destacar que l'expressió de *PTC7* incrementa després d'un estrès osmòtic, efecte que depèn de Hog1 (Runner & Brewster 2003).

Més tard es va descobrir l'existència d'un intró funcional en el gen de *PTC7* de forma que a través de mecanismes de *splicing* es poden obtenir dos RNAm que codifiquen proteïnes diferents (Juneau et al. 2009). Cada una d'elles es localitza en compartiments cel·lulars diferenciats desenvolupant funcions diferents. Aquesta característica és molt important ja que és un dels pocs exemples de l'existència de *splicing* alternatiu en *S. cerevisiae* i el primer en el qual es generen dues proteïnes amb localització subcel·lular diferenciada. A partir de la traducció del mRNA curt s'obté una proteïna coneguda com Ptc7_s, la qual es localitza al mitocondri i la seva expressió depèn de la font de carboni que hi hagi a l'entorn. Per altra banda, la proteïna obtinguda del mRNA complet dóna lloc a la proteïna Ptc7_u que conté un domini transmembrana, el qual li permet localitzar-se a la membrana nuclear i intervenir en els efectes provocats per la toxina latrunculina A, un compost que afecta la polimerització de l'actina (Juneau et al. 2009).

Recentment s'ha demostrat que la fosfatasa Ptc7 és necessària per regular la biosíntesis del coenzim Q₆, el qual activa el metabolisme aeròbic i potencia la resistència enfront estrès oxidatiu (Martín-Montalvo et al. 2013). Concretament, Ptc7 activa la biosíntesis del coenzim Q₆ defosforilant Coq7, proteïna caracteritzada per ser una Q₆-demetoxi hidroxilasa. Aquests resultats revelen que Ptc7 és un regulador del metabolisme mitocondrial essencial per mantenir les funcions del mitocondri a través de la regulació del metabolisme energètic i la resistència a estrès oxidatiu (Martín-Montalvo et al. 2013).

4. El cicle cel·lular del llevat *S. cerevisiae*

En qualsevol procés de divisió cel·lular es troben dos fets conceptualment diferents: el cicle cromosòmic on el DNA es replica i es separa en dos genomes complets, i el cicle de creixement que es basa en la replicació de tots els altres components cel·lulars (proteïnes, membranes, orgànuls, etc.) i la seva separació cap a les cèl·lules filles (Tyson et al. 2002).

En les cèl·lules eucariotes, el cicle cromosòmic té lloc en dues fases diferents: la síntesis del DNA (fase S) i la mitosi (fase M). A la fase S, les molècules de DNA de doble cadena es dupliquen amb l'objectiu de generar cromàtides germanes unides per unes proteïnes anomenades cohesines. A la fase M, aquestes cromàtides es separen i cada una de les cèl·lules filles n'obté una. Ambdues fases es troben separades per dos intervals coneguts com a G1 i G2. La successió d'aquests processos dona lloc al típic cicle cel·lular eucariota: G1-S-G2-M. Amb l'objectiu de regular que l'alternança de les diverses etapes es dur a terme correctament, la cèl·lula presenta dos punts de control o *checkpoints*. El primer té lloc a la fase G1 i controla que les condicions externes siguin adients, que la cèl·lula tingui una mida suficient com per iniciar un nou cicle i que els possibles danys en el DNA que s'hagin pogut produir en l'anterior duplicació s'hagin reparat correctament. El segon es dona a la fase G2 i controla que el DNA s'hagi duplicat correctament durant la fase S, que els possibles nous danys en el material genètic s'hagin corregit i que la cèl·lula sigui prou gran com per entrar en una nova mitosi (Per veure una revisió completa, veure (Tyson et al. 2002)).

4.1 Mecanismes de regulació del cicle cel·lular

En el llevat *Saccharomyces cerevisiae* l'inici d'un nou cicle ve determinat per un punt de control anomenat *Start* que es localitza en la transició de les fases G1 i S. L'element principal en la regulació de l'execució d'aquest punt de no retorn, on comença la duplicació del DNA, dels cossos polars i l'aparició de la gemma naixent, és la quinasa dependent de ciclins (CDK) codificada pel gen *CDC28* (Mendenhall & Hodge 1998). A diferència del què succeeix en mamífers, Cdc28 és la única de les cinc CDKs que s'encarrega del control del cicle cel·lular. L'activitat de Cdc28 no només està marcada pel seu estat fosfo-defosforilat, sinó que depèn també de la seva unió amb les proteïnes ciclins, les quals es defineixen per ser capaces d'unir-se i activar una CDK. Les ciclins presenten importants fluctuacions al llarg del cicle. És per això, que tradicionalment s'han classificat en dos grans grups: les ciclins de G1 (Cln1, Cln2 i Cln3), les quals s'expressen preferentment en aquesta fase, i les ciclins de tipus B (Clb1-6) que s'expressen en tres moments successius des del punt *Start* fins a la Mitosi (Nasmyth 1993) (Figura 6).

Al final de la telofase el complex format per Cdc28 i Cln3 s'encarrega de controlar la mida de la cèl·lula. Un cop aquesta ha assolit unes proporcions adequades, Cln3-Cdc28 activa els complexos transcripcionals coneguts com a SBF (format per Swi4 i swi6) i MBF (Swi6 i Mbp1). Ambdós complexos són responsables d'induir diversos gens durant la fase G1, entre els quals se'n destaquen les ciclines *CLN1*, *CLN2*, *CLB5* i *CLB6*. Aquestes regulen l'inici de la gemmació i duplicació tant dels cossos polars com del DNA i l'expressió de les ciclines de la fase S (*CLB3* i *CLB4*) (Tyers et al. 1993). A continuació comença la fase G2 on el llevat torna a créixer i es prepara per iniciar la Mitosi. En aquest cas, les ciclines implicades són les de la fase M (Clb1-Clb4), les quals promouen la formació del *spindle*, l'inici de la mitosi i, alhora, desencadenen l'expressió d'una nova onada de ciclines responsables de dirigir la transició M/G1. D'aquesta forma i, sempre que sigui pertinent, es permet l'entrada a un nou cicle cel·lular (Stark, 2004) (Figura 6).

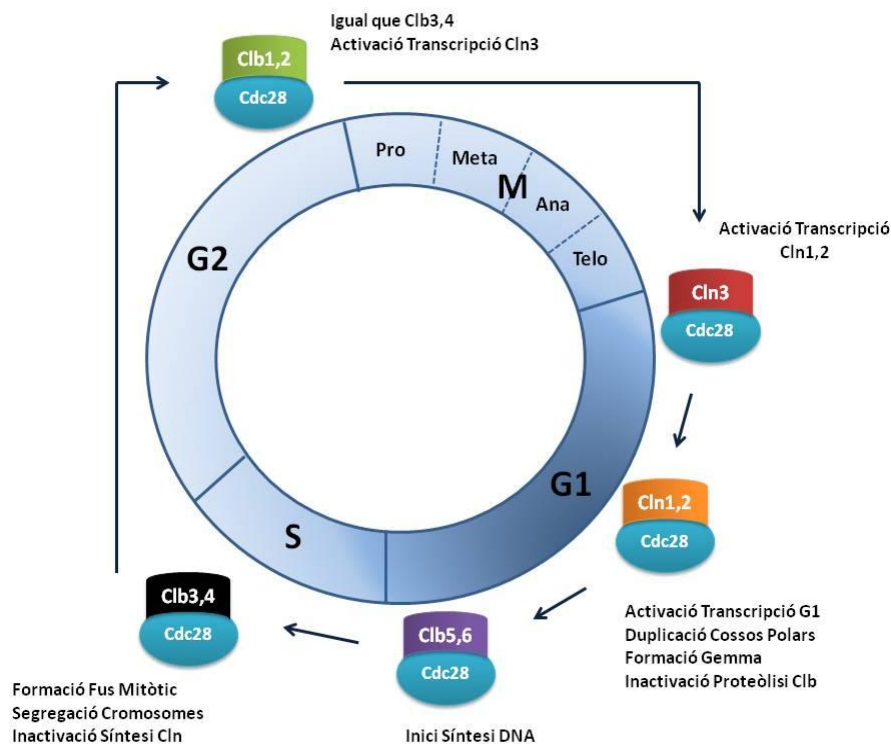


Figura 6. Fases del cicle cel·lular del llevat *S. cerevisiae*. A cada fase es determinen els ciclina-Cdc28 implicats així com les funcions que duen a terme (Figura adaptada de la Tesis de Ivan Muñoz).

4.2 Regulació de Cdc28 per fosforilació

L'activitat de Cdc28 pot ser regulada per mecanismes de fosfo-desfosforilació. Al llevat *S. cerevisiae* existeixen dues vies de regulació de Cdc28 per fosforilació. Una d'elles la dur a terme la quinasa Cak1 la qual fosforila el residu Thr169 del *loop* d'activació de Cdc28 activant-la (Kaldis et al. 1996). Els nivells de la quinasa Cak1 són constants al llarg del cicle cel·lular i són necessaris per l'activació dels complexos Cln-Cdc28 i Clb-Cdc28.

INTRODUCCIÓ

El segon mecanisme de regulació per fosforilació de Cdc28 té lloc al residu conservat Tyr19, el qual es troba molt pròxim al lloc d'unió a ATP. Al llevat *S. cerevisiae* aquesta regulació depèn de les activitats oposades de la quinasa Swe1 (Booher et al. 1993) i la fosfatasa Mih1 (Russell et al. 1989). Cal destacar que Cdc28 i Swe1 es regulen recíprocament. Així doncs, els complexos mitòtics Clb-Cdc28 fosforilen Swe1 provocant la seva degradació a través dels complexos de proteïnes que conjuguen ubiquitina coneguts com SCF (*Skp1/Cul1/F-box protein*) i APC (*Anaphase Promoting Complex*) (McMillan et al. 2002; Thornton & Toczyski 2003). S'ha demostrat que les cèl·lules que presenten defectes en la degradació de Swe1 mostren una inhibició de Cdc28 prolongada, fet que impedeix el canvi de creixement apical a isotròpic de les gemmes generant cèl·lules filles allargades (Pruyne & Bretscher 2000). A més a més, a partir d'estudis *in vitro* s'ha observat que Swe1 fosforila el complex Clb2-Cdc28 amb la consegüent inactivació d'aquest (Booher et al. 1993). Per altra banda, el paper de la tirosina fosfatasa Mih1 consisteix en eliminar la fosforilació inhibidòria de Cdc28. En aquesta situació Swe1 es troba hiperfosforilada fet que provoca la seva dissociació de Clb2-Cdc28 i la completa activació del complex Clb2-Cdc28 (Harvey et al. 2005).

En la majoria de cèl·lules eucariotes analitzades fins al moment, les fosforilacions dependents de les CDKs mitòtiques són revertides principalment per les fosfatases PP2A i, en menor rellevància, per les fosfatases PP1 (Wurzenberger & Gerlich 2011). En molts casos, les fosfatases es troben formant complexos que contenen una subunitat catalítica i diverses subunitats reguladores les quals aporten especificitat de substrat. Els complexos PP2A estan formats per una subunitat catalítica, una subunitat estructural i una subunitat reguladora (Mayer-Jaekel & Hemmings 1994). A partir d'experiments realitzats en diferents mutants de *Drosophila*, s'ha demostrat que la subunitat reguladora B55, de la qual existeixen diverses isoformes, confereix especificitat al complex PP2A contra els llocs de fosforilació dependents de Cdk1 (Mayer-Jaekel et al. 1994).

En comparació amb el què succeeix en altres organismes eucariotes, el complex PP2A^{Cdc55} de *S. cerevisiae* (que correspon al complex PP2A-B55) promou l'entrada a mitosi participant en un *feedback* positiu que activa Cdc28 (veure (Jiang 2006)). En concret, s'ha observat que PP2A^{Cdc55} contraresta l'efecte de Swe1 promovent la defosforilació de Cdc28 (Harvey et al. 2011) i defosforila i activa la fosfatasa Mih1 (Pal et al. 2008). A partir d'un estudi recent s'ha observat que la quinasa Rim15 fosforila les endosulfines Igo1 i Igo2 (*Initiation of G zero*) les quals s'han relacionat amb el control de la mitosi. Un cop fosforilades, Igo1/2 s'uneixen al complex PP2A^{Cdc55}, limitant la localització del complex al citoplasma i activant-lo, contribuint a l'activació de les CDKs mitòtiques (Juanes et al. 2013) (Figura 7). Per altra banda,

el paper del complex PP2A^{Cdc55} a la sortida de la mitosi es basa en desfosforilar Net1 que reté Cdc14, una proteïna fosfatasa necessària per la sortida de la mitosis, al nuclèol (Queralt & Uhlmann 2008). En ambdós processos la funció de PP2A^{Cdc55} està regulada positiva o negativament per Zds1/2, dues proteïnes involucrades en el creixement polaritzat depenent de Swe1. Malgrat que Zds1/2 proporcionen un efecte positiu sobre la desfosforilació dependent de PP2A^{Cdc55} de Mih1 (Wicky et al. 2011), regulen negativament la funció del complex PP2A^{Cdc55} sobre Net1 impedit la seva desfosforilació (Queralt & Uhlmann 2008). Cal destacar que no s'han implicat les proteïnes Zds1/2 en la desfosforilació de Swe1 dependent de PP2A^{Cdc55} (Wicky et al. 2011).

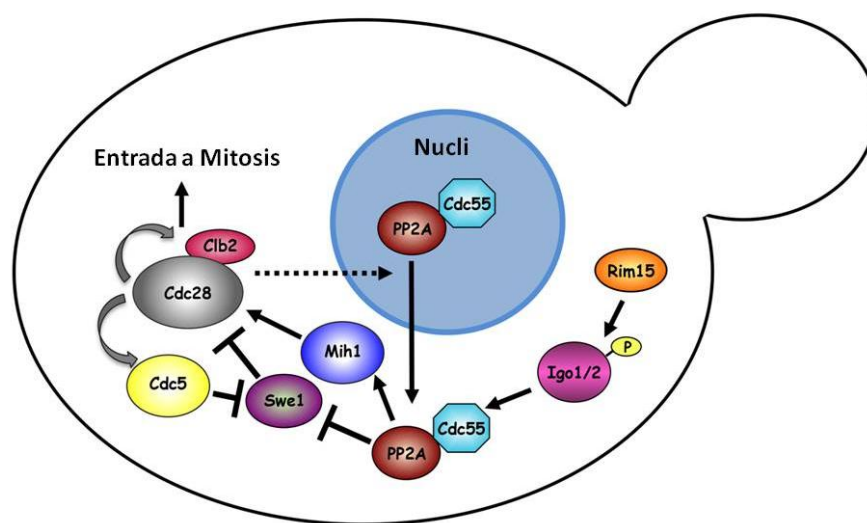


Figura 7. Regulació de l'entrada a Mitosis pel complex fosfatasa PP2A^{Cdc55}. El complex Clb2-Cdc28 forma part d'un *feedback* positiu en el qual contribueix a la seva pròpia activació promovent un programa transcripcional mitòtic que indueix la seva pròpia expressió i la de la quinasa Cdc5. La fosforilació de Swe1 dependent de Clb2-Cdc28 promou la fosforilació de la Tyr19 inhibint Cdc28. La fosforilació inicial de Swe1 degut a Cdc28 es veu contrarestatada per la fosfatasa PP2A^{Cdc55} la qual també desfosforila i activa Mih1 i, d'aquesta forma, participa en el *loop* positiu d'activació de Cdc28. Un cop les endosulfines Igo1 i Igo2 són fosforilades per Rim15, s'uneixen al complex PP2A^{Cdc55} i contribueixen tant a la seva activació com a la seva exportació del nucli. S'ha observat que la supressió de *SWE1* restaura la localització normal de Cdc55 en un doble mutant *igo1Δ igo2Δ* suggerint que Swe1 i/o Clb2-Cdc28 podrien regular l'export nuclear de Cdc55 a través d'algun mecanisme desconegut (Juanes et al. 2013).

5. Resposta a estrès en el llevat *S. cerevisiae*

El creixement òptim del llevat no només depèn de la composició del medi en el qual es troba sinó que es veu influenciat per molts altres paràmetres, alguns dels quals es detallen a continuació: la temperatura, suplement d'oxigen, agitació, pH àcid, condicions osmòtiques, entre d'altres. Així doncs, qualsevol alteració provocarà que les cèl·lules activin diverses respostes per tolerar i adaptar-se al nou entorn per evitar danys cel·lulars (Hohmann & Mager 2003).

INTRODUCCIÓ

Així doncs, les cèl·lules detecten la condició d'estrès i, per poder respondre al canvi, activen vies específiques depenent de l'estrès que propiciaran l'adaptació i la supervivència cel·lular. Les vies de resposta a estrès impliquen regulacions tant a nivell transcripcional, post-transcripcional com traduccionals. Algunes d'aquestes vies de senyalització s'explicaran a continuació en aquest treball.

5.1 Homeòstasi d'ions monovalents

L'homeòstasi iònica, propietat essencial dels llevats, permet a les cèl·lules mantenir una concentració intracel·lular adequada de cations. Aquest procés promou la supervivència cel·lular en entorns que varien respecte les condicions del citoplasma. En *S. cerevisiae*, l'homeòstasi iònica afecta diversos processos com són el potencial de membrana, el contingut iònic o el pH intracel·lular.

Els llevats han desenvolupat diversos mecanismes per captar cations indispensables com el potassi, necessari per dur a terme diferents funcions fisiològiques, alhora que mantenen concentracions intracel·lulars baixes d'ions monovalents tòxics (sodi i liti). D'aquesta forma, aquests organismes utilitzen tres estratègies diferents: **a)** discriminar entre els diferents cations metàl·lics alcalins que s'absorbeixen, ex. afavorint el transport de potassi respecte el de sodi; **b)** eliminar els cations tòxics emprant transportadors eficients; i **c)** segrestar l'excés de cations tòxics en orgànuls. Amb l'objectiu de mantenir la concentració citosòlica de cations, els llevats disposen de varis transportadors localitzats a la membrana plasmàtica o a les membranes dels orgànuls. Aquests transportadors tenen especificitat de substrat i utilitzen diferents mecanismes de transport: actiu primari (ATPasa), actiu secundari (simport i antiport), i canals passius. Tal i com es descriu a la Figura 8, com a mínim s'han caracteritzat cinc sistemes de transport a la membrana plasmàtica: l'absorció de potassi a través de Trk1 i Trk2, el canal de potassi Tok1, el simport de P_i - Na^+ per mitjà de Pho89, el sistema Na^+/K^+ -ATPasa Ena i l'antiportador Na^+/H^+ Nha1. A part d'aquests transportadors, existeix el canal catiònic Nsc1 el qual s'ha determinat experimentalment però no se n'ha identificat els gens. A més a més, també existeixen altres transportadors intracel·lulars com l'antiport vacuolar de cations alcalins/ H^+ (Vnx1), el cotransportador catió-clorur vacuolar (Vhc1) (Petreszelyova et al. 2013), l'endosomal (Nhx1) i el de l'aparell de Golgi (Kha1) (Ariño et al. 2010).

INTRODUCCIÓ

Malgrat que es coneix que diversos estressos causen un increment del calci intracel·lular en els llevats, encara se'n desconeixen les particularitats dels mecanismes implicats. Emprant diversos transportadors de calci, les cèl·lules de llevats poden regular de forma acurada la concentració intracel·lular d'aquest catió tant en el citosol com en altres orgànuls (Bonilla & Cunningham 2002).

La calcineurina és un heterodímer compost per dues subunitats: **a)** una subunitat reguladora codificada per *CNB1* i **b)** una subunitat catalítica codificada per dos gens, *CNA1* i *CNA2* (per més detall revisar (Cyert 2003)). La seva activitat fosfatasa es veu inhibida per compostos immunosupressors com són FK506 (tacrolimus) i ciclosporina A (Foor et al. 1992). La calcineurina està conservada entre els organismes eucariotes i és un component crític de la senyalització regulada per calci en la majoria d'organismes eucariotes tant unicel·lulars com pluricel·lulars. En el llevat *S. cerevisiae*, la calcineurina s'activa gràcies a la unió directe del Ca^{2+} a la calmodulina (Cyert et al. 1991).

Diversos estressos provoquen un increment en la concentració intracel·lular de calci com, per exemple, la temperatura elevada (Zhao et al. 1998), l'addició de glucosa a cèl·lules que venen d'un període amb limitació de nutrients (Nakajima-Shimada et al. 1991), la presència d'esfingosina (Birchwood et al. 2001), una llarga exposició a la feromona d'aparellament factor- α (Iida et al. 1990), elevades concentracions extracel·lulars d'ions com poden ser Mn^{2+} , Ca^{2+} , o Li^+/Na^+ (Farcasanu et al. 1995; Denis & Cyert 2002; Matsumoto et al. 2002), pH alcalí (Serrano et al. 2002; Viladevall et al. 2004), xoc hipotònic (Batiza et al. 1996) o la tunicamicina, un agent que provoca estrès degut al mal plegament de proteïnes (Bonilla & Cunningham 2002).

L'increment del calci intracel·lular enfront cada un d'aquests estímuls pot ser conseqüència tant de l'entrada de cations de calci de l'entorn extracel·lular com de l'alliberament dels principals orgànuls d'emmagatzematge intracel·lulars com són la vacuola i el RE (Figura 9) (Halachmi & Eilam 1989; Strayle et al. 1999). Generalment, en condicions d'estrès hipotònic el calci del citoplasma prové de la vacuola a través del canal de calci Yvc1 (Batiza et al. 1996), mentre que en situacions hipertòniques o en un medi alcalí el calci extracel·lular és el que entra a la cèl·lula travessant el canal de membrana Mid1-Cch1 (Fischer et al. 1997; Viladevall et al. 2004). Tot i així, diversos treballs apunten que l'origen del calci intracel·lular no sempre segueix els mecanismes descrits anteriorment (Denis & Cyert 2002; Matsumoto et al. 2002), fet que evidencia la complexitat d'aquesta via (Figura 9).

La calcineurina, en el seu estat activat, és capaç de defosforilar la seva diana principal, el factor de transcripció del tipus dit de zinc Crz1 (Stathopoulos & Cyert 1997; Matheos et al. 1997). La defosforilació de Crz1 permet un canvi en la seva estructura tridimensional exposant la seqüència de localització nuclear (NLS) la qual és reconeguda per la importina Nmd5. Aquesta última proteïna promou la translocació de Crz1 al nucli (Polizotto & Cyert 2001) on s'uneix als promotors que contenen un motiu específic de DNA (5'-GNGGC(G/T)CA-3') denominat Element de Resposta Dependent de Calcineurina (CDRE) (Stathopoulos & Cyert 1997). A partir d'estudis transcripcionals a gran escala realitzats en llevat i emprant tècniques de microarrays de DNA, es va revelar que l'activació de la calcineurina induïx l'expressió de més de 160 gens, la majoria dels quals presenten una o més còpies del CDRE en el seu promotor (Yoshimoto et al. 2002).

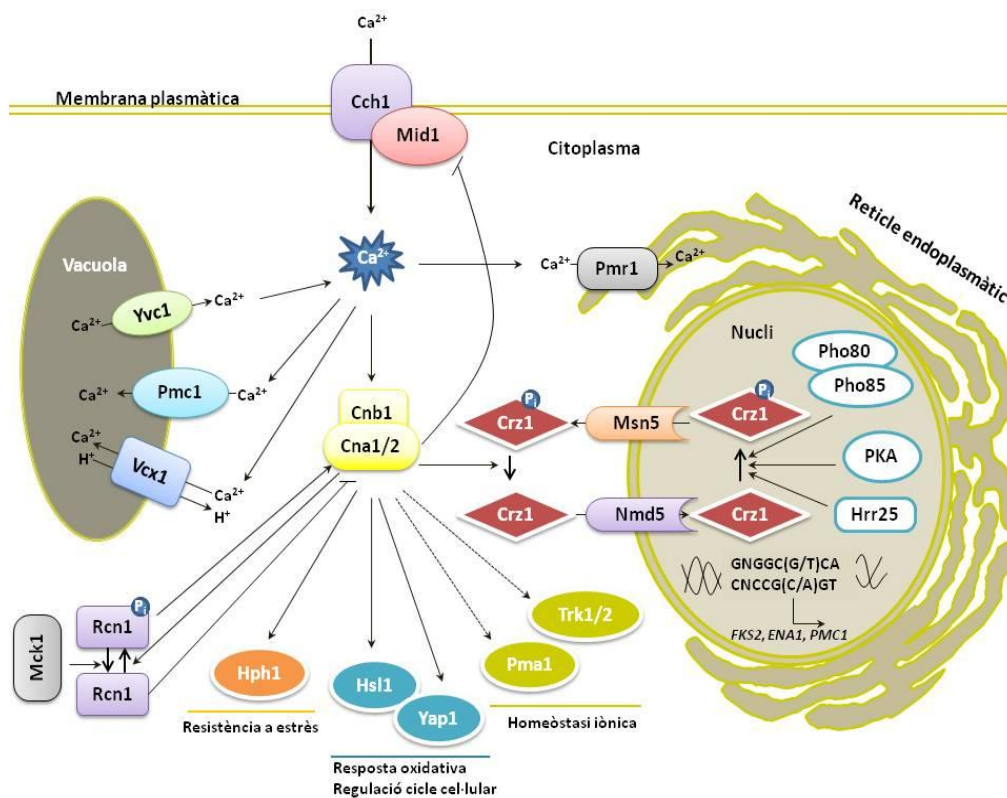


Figura 9. Esquema de la via de la calcineurina. Els principals transportadors involucrats en l'homeòstasi del calci es troben representats en aquest esquema: Mid-Cch1 i Yvc1 que contribueixen al augment del Ca^{2+} intracel·lular i Pmc1, Vcx1 i Pmr1 que eliminen el Ca^{2+} del citoplasma. Condicions ambientals específiques provoquen l'augment del Ca^{2+} intracel·lular i s'activa la fosfatasa calcineurina defosforilant Crz1 el qual entra al nucli per activar els gens que contenen els CDRE al promotor. La desactivació de Crz1 té lloc mitjançant la seva fosforilació la qual depèn de PKA, Hrr25 i del complex CDK Pho85-Pho80. L'activació de la calcineurina depèn de l'estat de fosforilació de la represina Rcn1. Figura adaptada de Jofre Ferrer-Dalmau (Tesis doctoral).

La sortida del nucli de Crz1 depèn del seu estat de fosforilació. S'ha demostrat en treballs anteriors que Crz1 és substrat de tres quinases diferents: la proteïna homòloga a la

INTRODUCCIÓ

isoforma δ de la caseïna quinasa de mamífers, Hrr25, la proteïna quinasa A dependent de AMP cíclic (PKA) i de la quinasa dependent de ciclins Pho85 (sota regulació de Pho80) (Kafadar et al. 2003; Kafadar & Cyert 2004; Sopko et al. 2006). Finalment, un cop Crz1 està fosforilat i, per mitjà de la proteïna Msn5, el factor de transcripció és translocat del nucli cap al citoplasma (Boustany & Cyert 2002).

Malgrat que Crz1 és la diana principal de la calcineurina, existeixen altres dianes involucrades en diverses funcions com són: Vcx1, Cch1-Mid1, Rcn1, Hsl1, Yap1, Hph1 i els transportadors iònics Pma1 i Trk1/2 (Figura 9).

Encara que existeix certa controvèrsia sobre la sensibilitat del mutant *ptc1* en presència d'alts nivells extracel·lulars de clorur de calci (Huang & Symington 1995; Gupta et al. 2003; Sakumoto et al. 2002; Sakumoto et al. 1999), un article publicat pel nostre grup l'any 2006 demostra que les cèl·lules *ptc1* són molt sensibles als ions de calci. Aquest fenotip es deu probablement a una hiperactivació de la fosfatasa calcineurina ja que es veu completament suprimit quan s'elimina el gen *CNB1* (González et al. 2006). A més, en el perfil transcripcional d'un mutant *ptc1* es troben induïts gens l'expressió dels quals depenen de l'activació del factor de transcripció Crz1.

5.3 Via de senyalització de la paret cel·lular

La paret cel·lular del llevat du a terme quatre funcions principals: **i)** protegir la cèl·lula enfront xocs osmòtics; **ii)** regular la forma i la mida cel·lular; **iii)** protegir les cèl·lules d'estressos mecànics i **iv)** serveix de bastida per les proteïnes de la superfície cel·lular (Klis et al. 2006; Levin 2011).

Aquesta estructura cel·lular pot comprendre entre el 10 i el 25 % del pes cel·lular sec dependent de les condicions de creixement. Estructuralment la paret cel·lular del llevat es compon de dues capes: una interna i una externa (Cappellaro et al. 1994). La capa interna es compon principalment de cadenes de β -1,3-glucà enllaçats per unions β -1,6 i cadenes de quitina, la funció principal de les quals és proveir a la paret cel·lular de resistència mecànica i elasticitat. Per altra banda, la capa exterior està formada per proteïnes altament glicosilades. Hi ha dues classes principals de proteïnes glicosilades a la paret: **1)** proteïnes glicosilfosfatidilinositol (GPI), les quals estan ancorades a la capa a través dels β -1,6-glucans, i **2)** les proteïnes Pir (*protein with internal repeats*) que es troben directament unides als β -1,3-glucans (Klis et al. 2002; Klis et al. 2006). Algunes de les funcions d'aquestes glicoproteïnes

estan relacionades amb l'adhesió cel·lular, el processament de la pròpia paret cel·lular, el creixement i el metabolisme (revisat de (Klis et al. 2002; Lesage & Bussey 2006)).

Gràcies a la via de la integritat de la paret cel·lular (CWI, *cell wall integrity pathway*), els llevats són capaços de respondre i modular canvis morfològics necessaris per adaptar-se a les diverses alteracions ambientals que poden esdevenir un perill. Aquesta ruta es basa en una família de sensors de membrana, proteïnes encarregades de transmetre les senyals i, finalment, els efectors els quals regulen específicament tant la transcripció de certs gens com la funció d'algunes proteïnes en funció de l'estímul produït (Figura 10).

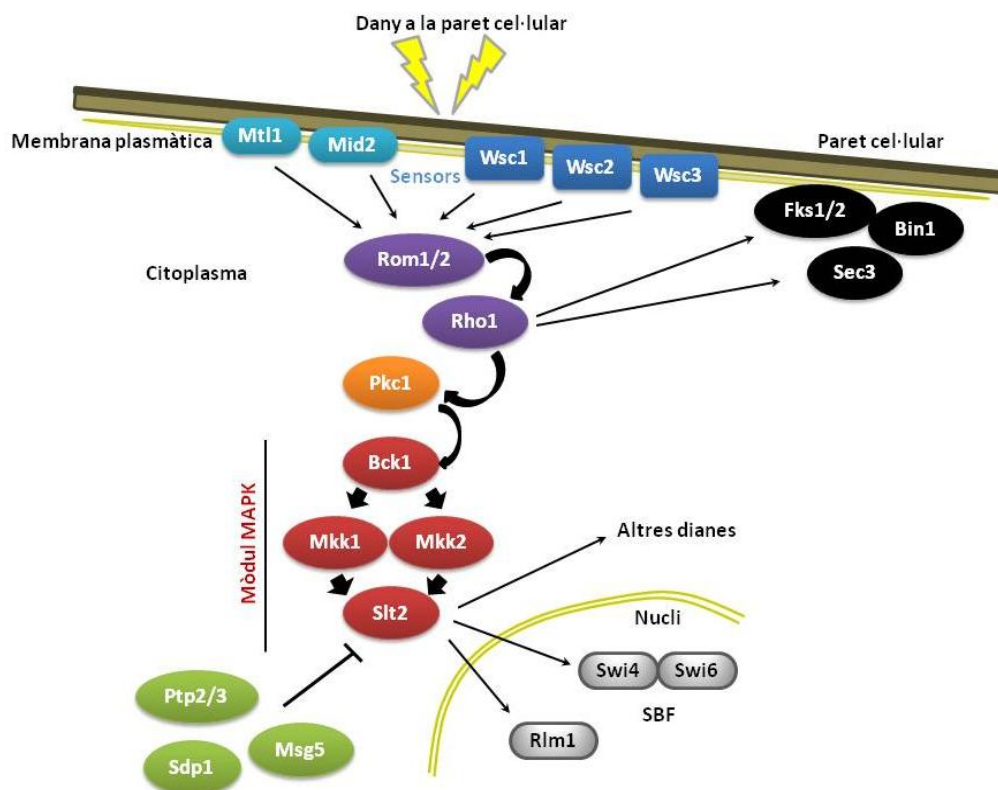


Figura 10. Mecanisme de la via de la integritat de la paret cel·lular enfront un dany a la paret cel·lular. L'estrès de la paret cel·lular és percebut pels sensors de la superfície cel·lular Wsc1-3, Mid2 i Mtl1 i, la senyal obtinguda, es transmet a través de la proteïna G Rho1 cap a la proteïna quinasa Pkc1. Un cop Pkc1 és activada, aquesta és capaç d'activar els membres de la cascada de les MAP quinases, Bck1, Mkk1/2 i Slt2. Els factors de transcripció diana de la MAP quinasa Slt2 són Rlm1 i el complex SBF (Swi4/Swi6) (Levin 2011).

La via de senyalització CWI pot ser activada per múltiples estressos dels quals se'n destaquen:

- i) Exposar les cèl·lules a elevades temperatures (37-39°C). Aquest fet provoca un increment de la pressió interna degut a una acumulació de trehalosa (Neves & Francois 1992; Kamada et al. 1995).

INTRODUCCIÓ

- ii) Agents que interfereixen en l'assemblatge de la paret cel·lular com són: blanc de calcofluor (CFW), un antagonista de la quitina; el colorant vermell Congo (CR) que s'uneix a diversos polisacàrids i té un efecte similar al del CFW (Roncero & Duran 1985; Kopecka & Gabriel 1992); la cafeïna, el mecanisme d'acció del qual no es coneix, tot i així, s'ha proposat que podria actuar a través de la via TOR (Kuranda et al. 2006); la zimoliasa, una β -1,3-glucanasa que provoca directament la lisis de la paret (De Nobel et al. 2000) o la rapamicina, inhivint la via TOR o despolaritzant el citoesquelet d'actina (Torres et al. 2002).
- iii) Altres circumstàncies com poden ser la morfogènesis induïda per la presència de feromones; l'estrès hipotònic (Davenport et al. 1995); l'estrès oxidatiu (Alic et al. 2004), l'estrès per pH alcalí (Serrano et al. 2006) o l'estrès físic sobre la membrana plasmàtica (Errede et al. 1995; Kamada et al. 1995; Zarzov et al. 1996; Buehrer & Errede 1997). Tot i que desencadenen una resposta relacionada amb la via CWI, els mecanismes implicats no es coneixen en detall.
- iv) Diverses mutacions que afecten a la biosíntesis de la paret cel·lular tenen també la capacitat d'activar la via CWI. Un exemple és la deleció de *FKS1*, un gen que codifica la subunitat catalítica de la β -1,3-glucà sintasa (Terashima et al. 2000).
- v) Agents estressants del reticle endoplasmàtic com, per exemple, tunicamicina o ditiotreitòl (Bonilla & Cunningham 2003).

La majoria d'aquests estímuls són detectats a la superfície cel·lular per diversos sensors com Wsc1/2/3, Mtl1 i Mid2 (el qual és també un sensor de calci) que recluten Rom1/2 a la membrana plasmàtica. Rom1/2, juntament amb Tus2, se les considera proteïnes GEF (guanosine nucleotide exchange factors) ja que intercanvien GDP a GTP activant la proteïna Rho1. Per altra banda, també existeixen les proteïnes GAP (GTPasa activating proteins): Bem2, Sac7, Bag7 i Lrg1, encarregades d'inactivar Rho1. Rho1 és considerat el regulador principal de la senyalització de la via CWI no només degut a que rep la majoria dels senyals de la superfície cel·lular, sinó també perquè regula una àmplia varietat de respostes involucrades en activar la proteïna quinasa C (PKC), augmentar la regulació de l'activitat de la β -1,3-glucà sintasa (Fks1 i Fks2), regular l'organització de l'actina (Bni1 i Bnr1) i la secreció polaritzada (Sec3) (Levin 2005). Cal destacar que els fosfoinosítids juguen un paper important tant en la correcta localització com en l'activació de Rom1 (Figura 10) (Levin 2011).

Entre els efectors de Rho1, la via més estudiada és Pkc1/Slt2, una de les cinc vies MAPK (mitogen activated protein kinase) trobades en *S. cerevisiae*, i que consisteix en una via de transducció de senyal lineal basada en fosforilacions. Una vegada la proteïna G Rho1 és

activada i s'associa amb Pkc1, s'inicia l'activació de la via de la MAP quinasa Slt2. En més detall, el complex Rho1-Pkc1 activa la MAPKKK Bck1 fosforilant-la en els residus Ser939, Thr1119 i Ser1134, la qual és capaç de fosforilar les MAPKK redundants Mkk1 i Mkk2. Aquestes, alhora, reconeixen i fosforilen la MAPK Slt2 en els residus Thr190 i Tyr192 localitzats en el motiu típic de les MAPK "T-X-Y" (revisat en (Levin 2005; Levin 2011)). En condicions basals, aquestes quatre quinases es diferencien a nivell de localització cel·lular: Bck1 i Mkk1/2 es troben al citoplasma, mentre que, Slt2 resideix principalment al nucli. Tot i així, en presència d'estressos de la paret cel·lular, Slt2 es transloca ràpidament en el citoplasma. Tal i com s'ha comentat en l'apartat 3.1.2, una petita fracció de Slt2 i de Mkk1/2 es troba associada al polarisoma, fet que depèn de la proteïna Spa2. S'ha demostrat que Slt2 és capaç de fosforilar *in vitro* tant Mkk1 com Mkk2, revelant la possible existència d'un mecanisme complex de retroalimentació, les funcions del qual encara no es coneixen (Jimenez-Sanchez et al. 2007).

La MAPK Slt2 s'inactiva per defosforilació catalitzada, com a mínim, per quatre fosfatases. Una d'elles és Msg5, una fosfatasa d'especificitat dual la qual és capaç d'inactivar també Fus3, la MAPK de les vies de resposta a feromones i del creixement filamentós invasiu (Doi et al. 1994; Flandez et al. 2004). L'any 2004 es va descriure un mecanisme de retroalimentació positiva en el que Slt2 fosforila la fosfatasa Msg5 interferint a l'associació d'ambdues proteïnes per evitar la defosforilació de Slt2 (Flandez et al. 2004). Dues fosfatases més implicades en la inactivació de Slt2 són Ptp2 i Ptp3, dues tirosina fosfatases que també actuen defosforilant les quinases Hog1 i Fus3 (Mattison et al. 1999). A diferència del cas de Msg5, Slt2 té un rol de retroalimentació negativa amb Ptp2, promovent la inactivació de Slt2. S'ha postulat que Ptp2 i Ptp3 probablement exerceixen la seva funció restaurant els nivells basals de la fosforilació de Slt2 un cop s'ha activat degut a un estrès. Tot i així, sembla que Ptp2 és més efectiva que Ptp3 (Levin 2005). Finalment, una altra fosfatasa dual, Sdp1, actua específicament defosforilant Slt2 (Collister et al. 2002; Hahn & Thiele 2002).

Els substrats coneguts de Slt2 es localitzen al nucli. El millor caracteritzat és el factor de transcripció Rlm1 que es situa al nucli constitutivament. Aquest és activat per Slt2 ja que el fosforila als residus Ser427 i Thr43, estimulants la seva funció. Rlm1 és responsable de la majoria de les respostes transcripcionals generades per la via CWI, afectant l'expressió dels gens involucrats en la biogènesi de la paret cel·lular. Aquests gens contenen en els seus promotors el motiu 5'-CTA(A/T)₄TAG-3' (Lee et al. 1993). Una de les dianes interessants de Rlm1 és el gen que codifica la pseudoquinasa Mlp1, molt similar a Slt2, i que es troba altament regulat per Rlm1 (de la Torre-Ruiz et al. 2002; Torres et al. 2002).

INTRODUCCIÓ

El segon factor de transcripció implicat en la via de senyalització de la paret cel·lular és el complex SBF, un regulador de la transcripció específica de G1 compost per Swi4 i Swi6 (Madden et al. 1997; Breeden 2003). Aquest factor de transcripció s'activa específicament durant l'emergència de la gemma i en la formació de les projeccions per l'aparellament, dos períodes del cicle cel·lular en els quals el creixement de la cèl·lula es troba altament polaritzat. Swi4 és la subunitat que s'uneix a una seqüència específica del DNA. En concret, reconeix la seqüència (CA/GCGAAA) anomenada SCB. Per altra banda, Swi6 és necessària per la unió als promotors (Taylor et al. 2000). S'ha descrit que el complex SBF dirigeix l'expressió gènica com a resposta de l'estrès de paret cel·lular independentment del seu rol en la transcripció específica de G1. Bàsicament, un cop s'han activat Slt2 i Mlp1, aquests són capaços de reclutar la RNA polimerasa II i Paf1 de forma dependent de Swi6, permetent el procés d'elongació dels gens relacionats amb la resposta de CWI (Kim et al. 2008; Truman et al. 2009; Kim & Levin 2010; Kim et al. 2010).

L'any 1995, Huang i col·laboradors van realitzar una cerca de mutacions que permetessin suprimir els fenotips de termosensibilitat a 34-37 °C i l'elevada taxa de recombinació de soques portadores de l'al·lel hipoactiu *pck1-4*. En aquest estudi es va aïllar el gen *KCS2* (*pck1-4* *supressor*) el qual es demostrà que és al·lèlic de *PTC1* (Huang & Symington 1995). Degut a que la manca de la fosfatasa Ptc1 compensa la reducció de l'activitat de la quinasa Pkc1, s'ha hipotetitzat que Ptc1 podria regular la desfosforilació d'alguns dels membres de la via de senyalització de Pkc1 o de dianes específiques de la pròpia proteïna Pkc1. Paral·lelament i, a partir de resultats que indiquen que el doble mutant *ptc1 slt2* és sintètic letal en alguns fons genètics, s'ha proposat també que Ptc1 podria tenir algun substrat addicional que controla la integritat de la paret cel·lular (Huang & Symington 1995).

El gen *PTC1* és conegut també com *CWH47* (que prové de *calcofluor white hipersensible*) perquè les cèl·lules que els manca aquesta fosfatasa són hipersensibles a l'antagonista de quitina CFW, un agent que, com s'ha esmentat anteriorment, produeix un dany directe a la paret cel·lular (Ram et al. 1994). Per altra banda, el mutant *ptc1* presenta tolerància a la toxina *killer* K1, un tret característic típic de mutants implicats en la regulació i síntesis de la paret cel·lular com són els gens *KRE1*, *KRE5*, *KRE6* i *KRE9* el nom dels quals prové de *killer resistance* (Page et al. 2003; Jiang et al. 1995). Una de les possibles explicacions d'aquest fenotip podria ser que en absència de Ptc1 s'han detectat nivells elevats de l'activitat de la exo- β -glucanasa Exg1. Aquest fet provocaria una disminució modesta però reproduïble de la quantitat de β -1,6-glucans, les molècules diana de la toxina *killer* k1 (Jiang et al. 1995).

A més a més de relacionar Ptc1 amb l'assemblatge dels β -1,6-glucans, també s'han descrit diversos fenotips que la involucren amb la via CWI. Així doncs, el mutant *ptc1* és sensible a caspofungina (Markovich et al. 2004), a cafeïna (Giaever et al. 2002) i a pH alcalí (Serrano et al. 2004a). Per altra banda, la mutació de *PTC1* presenta un fenotip sintètic letal amb diferents gens importants per la construcció de la paret cel·lular com són *FKS1*, *GAS1* i *SMI1* (Lesage et al. 2004; Tong et al. 2004).

5.4 Estrès per pH alcalí

El pH extracel·lular és un altre paràmetre important ja que influencia o determina molts aspectes de la biologia cel·lular com són el creixement i la diferenciació. El llevat *S. cerevisiae* creix molt millor en un entorn àcid que en ambients neutres o alcalins. El manteniment d'un entorn acídic es basa principalment en l'extrusió activa de protons gràcies a la H^+ -ATPasa Pma1 (Serrano et al. 1986). Pma1 és la proteïna més abundant de la membrana plasmàtica i la seva activitat electrogènica produeix el gradient electroquímico de protons a través de la membrana plasmàtica indispensable per tots els transportadors secundaris actius (Arino 2010; Serrano 1996; van der Rest et al. 1995). A més a més, juntament amb la H^+ -ATPasa vacuolar, també és crucial per mantenir l'homeòstasi del pH citosòlic (Martínez-Muñoz & Kane 2008). La funció de la H^+ -ATPasa vacuolar en la tolerància a l'alcalinització de l'entorn es coneix des de fa molts anys (Nelson & Nelson 1990), però es va confirmar posteriorment a través de cerques de mutants que conferissin sensibilitat a pH alcalí (Serrano et al. 2004a). Així doncs, l'alcalinització sobtada de l'entorn representa un estrès pel llevat *S. cerevisiae* enfront el qual ha de reaccionar activant una resposta adaptativa.

El coneixement principal sobre les respostes cel·lulars davant d'un estrès provocat per l'increment de pH prové d'estudis genòmics i transcriptòmics. El conjunt d'aquesta informació ha permès descobrir que diverses vies de senyalització s'activen com a resposta a l'estrès alcalí. Les principals rutes implicades són: la via de la calcineurina (Nakamura et al. 1993; Mendoza et al. 1994; Serrano et al. 2002), la ruta Rim101 (Lamb & Mitchell 2003), la via de senyalització de la MAPK Slt2 (Serrano et al. 2006), l'homeòstasi de macronutrients com la glucosa (Alepez et al. 1997) i el fòsfat (Serrano et al. 2002), l'homeòstasi de micronutrients (coure i ferro) (Lamb et al. 2001; Serrano et al. 2002) i els fosfoinosítids (Mollapour et al. 2006). A més a més, l'alcalinització del medi indueix la resposta enfront estrès oxidatiu (Serrano et al. 2002; Viladevall et al. 2004). Finalment, cal remarcar que la ruta PKA es veu inhibida quan les cèl·lules es troben en un entorn alcalí (Casado et al. 2011). Algunes d'aquestes vies es comentaran a continuació (Figura 11).

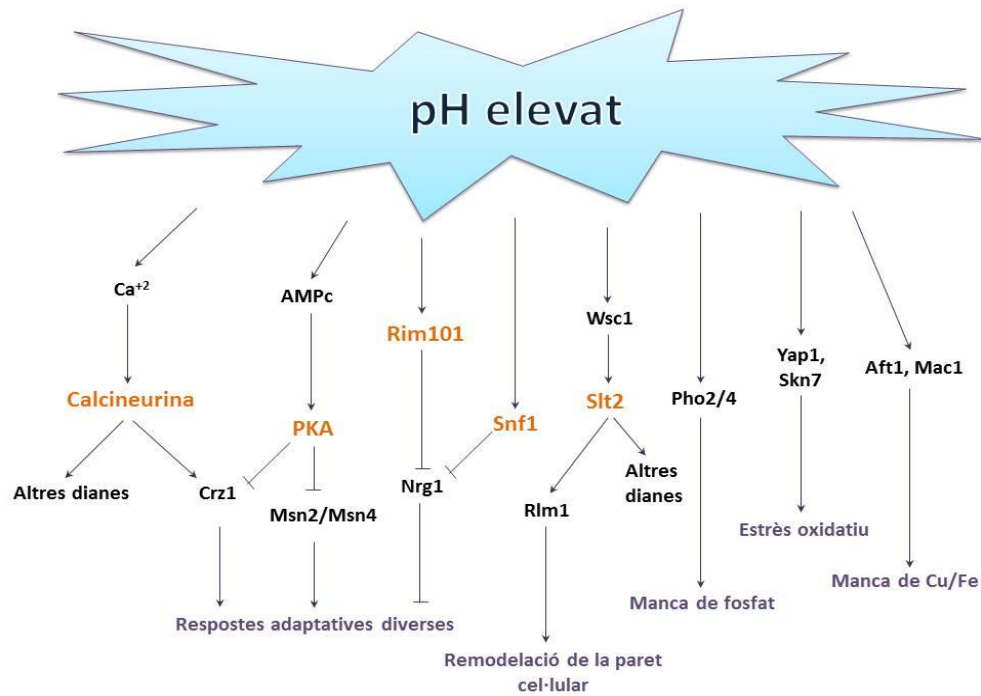


Figura 11: Vies de senyalització implicades en la resposta alcalina (adaptada de (Arino 2010)).

Els primers indicis que involucraven la via calcineurina (veure apartat 5.2) amb la resposta a estrès per pH alcalí es van obtenir temps enrere, quan es va observar que tant el mutant *cnb1* com una soca salvatge tractada amb l'inhibidor específic FK506 presenten sensibilitat a pH alcalí (Mendoza et al. 1994; Nakamura et al. 1993). Més tard, Serrano i col·laboradors van evidenciar que el sistema calcineurina/Crz1 tenia un paper rellevant en la resposta transcripcional depenent del increment de pH (Serrano et al. 2002). A més a més, també van demostrar que aquesta via regula, en part, l'activació de *ENA1* i *PHO89* (però no altres membres del reguló PHO). Treballs posteriors han mostrat que la calcineurina és responsable de la inducció d'un nombre considerable de gens que responen enfront l'alcalinització de l'entorn (Viladevall et al. 2004). Aquests últims autors han descrit també que l'exposició de les cèl·lules a pH alcalí desencadena una entrada ràpida de calci extracel·lular a través del canal de calci Cch1-Mid1. Això provoca un augment de la concentració de calci citosòlic que indueix l'activació de la calcineurina, la qual promou l'entrada del factor de transcripció Crz1 al nucli pocs minuts després que es produeixi l'increment de pH a l'entorn extracel·lular (Ruiz et al. 2008).

Una altra evidència que reforça la implicació de la via de la calcineurina en la senyalització de la tolerància a pH alcalí és el fet que més del 40 % dels mutants que presenten sensibilitat al inhibidor FK506 són també sensibles a pH alcalí (Viladevall et al. 2004). Tot i així, el mutant *crz1* no és sensible a l'alcalinització del medi. Degut que Crz1 és considerat el

principal efector de l'expressió dels gens dependents de calcineurina en *S. cerevisiae*, s'ha proposat que la resposta transcripcional regulada per la calcineurina juga un paper minoritari en la supervivència de la cèl·lula a pH alcalí i, per tant, han d'existir dianes addicionals de la calcineurina amb un rol més rellevant per l'adaptació a un entorn amb un pH elevat (Arino 2010). Un exemple podrien ser les proteïnes Ftr1 i Ftr2, les quals són necessàries *downstream* de la calcineurina per promoure el creixement en condicions de pH alcalí (així com també en condicions d'elevada concentració de Na⁺ i dany a la paret cel·lular) independentment de Crz1 (Heath et al. 2004).

Per altra banda, també s'ha relacionat la via de senyalització de la MAPK Slt2 amb la resposta enfront l'alcalinització del medi. A partir de resultats obtinguts per Serrano i col·laboradors es va detectar un solapament entre els gens induïts en cèl·lules de llevat sotmeses a estrès alcalí (Serrano et al. 2006) i els observats després de mutar gens que codifiquen alguns components de la paret cel·lular així com exposant les cèl·lules a agents que provoquen dany en aquesta superfície (Garcia et al. 2004; Lagorce et al. 2003). Un altre fet que reforça la implicació de la via de senyalització Slt2 és que els mutants *bck1* i *slt2* presenten sensibilitat a pH alcalí (Giaever et al. 2002; Serrano et al. 2004a). A més a més, s'ha demostrat que l'alcalinització provoca una ràpida i transitòria activació de Slt2, la qual depèn de la integritat del mòdul quinasa de la via i que es veu suprimida per l'addició de sorbitol al medi (Serrano et al. 2006). En aquest mateix treball s'identifica al sensor de membrana Wsc1 com a principal sensor de l'estrès per pH alcalí ja que la deleció d'aquest gen o mutacions específiques en aquest sensor de membrana deterioren la transducció de la senyal, provocant que les cèl·lules presentin sensibilitat a un entorn amb elevat pH i disminueix l'activació de Slt2 dependent d'aquest estrès. Per altra banda, s'ha demostrat que l'activació de Slt2 degut a un increment en l'alcalinitat de l'entorn induïx la transcripció de diversos gens que codifiquen proteïnes de la paret cel·lular com són *GSC2/FKS2*, *DFG5*, *SKT5* i *CRH1*, suggerint que aquesta resposta transcripcional dependent de Slt2 en resposta a l'alcalinització del medi contribueix a la tolerància a l'estrès per augment de pH (Serrano et al. 2006).

L'ús d'eines transcripcionals va mostrar que l'estrès alcalí causa alteracions importants en l'homeòstasi de coure i ferro (Lamb et al. 2001; Serrano et al. 2002). Paral·lelament, un estudi realitzat amb la biblioteca de mutants de *S. cerevisiae* amb l'objectiu de trobar mutants sensibles a pH alcalí va determinar que els mutants *ctr1* (gen que codifica un transportador de coure d'alta afinitat) i *aft1* (li manca el factor de transcripció que activa els gens implicats en la resposta en l'absorció de ferro) presenten un fenotip molt fort de sensibilitat a pH alcalí. A més a més, altres mutants també relacionats amb l'homeòstasi del ferro i el coure com són *ccs1*,

INTRODUCCIÓ

ccc2 i *fet3* també són sensibles a aquest estrès. En experiments realitzats per Serrano i col·laboradors basats en la cerca de gens que en multicòpia incrementessin la tolerància a pH alcalí es van identificar només els gens *CTR1* i *FET4* (aquest últim codifica un transportador de ferro i coure de baixa afinitat) (Serrano et al. 2004a). L'efecte beneficiós de la sobreexpressió de *CTR1* es deu, almenys en part, a una millora de l'absorció del ferro. En el mateix treball s'observa que la complementació del medi alcalí amb concentracions micromolars d'aquests dos metalls millora dràsticament el creixement de les cèl·lules, indicant que tant el ferro com el coure són factors limitants en condicions alcalines (Serrano et al. 2004a). Per altra banda, cal destacar que l'expressió de *FET4* depèn, en part, de Rim101 una altra via que s'activa degut a l'alcalinització del medi (Lamb & Mitchell 2003).

El mutant *ptc1* presenta una elevada sensibilitat a pH alcalí, un fenotip que s'observa també en diversos mutants vacuolars (Nelson & Nelson 1990). És per aquest motiu que s'ha proposat que en cèl·lules que els manca la fosfatasa Ptc1 la pèrdua de la funció vacuolar podria resultar en una alteració de la capacitat d'acidificació de la vacuola, provocant el defecte de creixement en condicions alcalines (González et al. 2006).

5.5 La ruta TOR i la senyalització per manca de nutrients

Com molts dels organismes unicel·lulars, el llevat *S. cerevisiae* ha evolucionat per aprofitar de forma òptima els nutrients als quals té accés. Malgrat que pot emprar diversos aminoàcids, amines orgàniques o amides com a font de nitrogen, les soques convencionals de laboratori utilitzen preferentment la glutamina o l'amoni. Aquest fet té com a conseqüència un augment de la taxa de creixement de les cèl·lules respecte a aquelles que es troben en un entorn amb una font de nitrogen de menor preferència i la capacitat que presenten la glutamina i l'amoni per induir la repressió de gens necessaris pel catabolisme (Cooper 2002; Zaman et al. 2008).

La diana de la rapamicina (TOR, *target of rapamycin*) es va identificar en *S. cerevisiae* gràcies a les mutacions *TOR1-1* i *TOR2-1*, les quals confereixen resistència a l'acció d'aquest compost (Heitman et al. 1991). En el mateix treball es va demostrar que, perquè la rapamicina faci el seu efecte, requereix el cofactor intracel·lular Fpr1, una peptidil-prolil cis/trans isomerasa. La rapamicina, juntament amb Fpr1, forma un complex que s'uneix i inhibeix a TOR. A diferència del que succeeix en la majoria d'eucariotes, alguns llevats (un dels quals és *S. cerevisiae*) presenten dos gens TOR (*TOR1* i *TOR2*) en comptes d'un (Helliwell et al. 1994). Ambdós gens codifiquen proteïnes de 282 kDa amb una identitat del 67% entre elles i amb una elevada similitud de seqüència amb la proteïna Tor de mamífers (37%). Les proteïnes Tor són

Ser/Thr quinases que contenen un domini catalític molt similar al de les quinases lipídiques (fosfatidil-inositol quinasa) a la regió C terminal i, per aquest motiu, són conegudes com quinases relacionades amb la fosfatidil-inositol 3' quinasa (PI3K) (Keith & Schreiber 1995). Malgrat la presència d'aquest domini, no mostren cap activitat quinasa de tipus lipídic.

Tots els organismes eucariotes estudiats fins el moment contenen dos complexos TOR: TORC1 i TORC2 (Loewith et al. 2002; De Virgilio & Loewith 2006; Wullschleger et al. 2006). Aquests complexos estan compostos per diverses proteïnes i s'encarreguen de regular diferents aspectes del creixement cel·lular. Les funcions de TORC1 són principalment les de gestionar el creixement cel·lular controlant la síntesi proteica, la biogènesi ribosomal, la transcripció, el cicle cel·lular, la meiosis, el consum de nutrients i l'autofagia; mentre que el complex TORC2 defineix l'orientació espacial del creixement regulant l'organització del citoesquelet d'actina, l'endocitosis, la síntesi de lípids i la supervivència cel·lular. A més a més de divergir en els rols biològics que desenvolupa cada un dels dos complexos, també es diferencien pel fet que només TORC1 presenta sensibilitat a rapamicina (revisat a (Conrad et al. 2014)). És per aquest motiu i per la implicació del complex TORC1 en el present treball que a continuació es detallarà les funcions i l'estructura d'aquest complex.

En el llevat, el complex TORC1 es troba actiu quan hi ha un excés de nutrients en el medi i s'inactiva quan aquests escassegen o per l'exposició de les cèl·lules a rapamicina (revisat en (Inoki et al. 2005)). De forma general, el tractament amb rapamicina produeix una forta repressió dels processos anabòlics i una activació dels processos catabòlics. Com a conseqüència, les cèl·lules tractades amb rapamicina aturen abruptament el seu creixement i entren en un estat de quiescència. A la Figura 12 es mostra un esquema global de la via.

A partir de diversos estudis transcriptòmics on utilitzen microxips de DNA en soques tractades amb rapamicina, es va mostrar que la inhibició de TORC1 provoca un profund canvi transcripcional (Cardenas et al. 1999; Hardwick et al. 1999; Shamji et al. 2000; Duvel et al. 2003). Probablement, l'efecte més dràstic provocat per la rapamicina és la ràpida repressió de pràcticament tots els gens implicats en la biogènesi dels ribosomes (incloent els 35S, 5S i tRNA, així com els de les proteïnes ribosomals (RP)). La rapamicina també contribueix a la repressió dels gens que codifiquen proteïnes no ribosomals implicades en la síntesi i maduració dels ribosomes, coneguts col·lectivament com reguló Ribi (Jorgensen et al. 2004). Aquests efectes es deuen a una inhibició general de l'activitat de les tres RNA polimerases (Powers & Walter 1999).

fosfatases relacionades amb les PP2A (en aquest cas les subunitats catalítiques poden ser Sit4, Ppg1 o Pph3) (Di Como & Arndt 1996; Wang & Jiang 2003; Di Como & Jiang 2006; Yan et al. 2006). El tractament amb rapamicina, la manca de nitrogen a l'entorn o les fonts de nitrogen no preferents induïx la inactivació de les quinases Tor, fet que permet l'alliberació dels complexos Tap42-fosfatases al citosol, provocant la defosforilació de Tap42 (Yan et al. 2006). L'alliberació del complex Tap42-Sit4 al citosol promou la defosforilació del factor de transcripció Gln3, un dels principals elements que relaciona l'efecte de la via TOR amb els gens implicats en la repressió per nitrogen (Beck & Hall 1999; Cardenas et al. 1999). Un cop Gln3 està defosforilat es dissocia de Ure2, una proteïna que manté el factor de transcripció al citoplasma, i pot importar-se al nucli on s'uneix als promotors de gens que contenen elements GATA (Crespo & Hall 2002; Inoki et al. 2005; Di Como & Jiang 2006; Yan et al. 2006).

Un fet a destacar és la implicació de la proteïna Tip41 en la regulació de l'activitat del complex Tap42-Sit4, ja que quan Tip41 es troba defosforilada competeix amb Sit4 per la unió a Tap42. Aquest fet sembla provocar un augment de l'associació de Tip41 amb Tap42 (Jacinto et al. 2001). En condicions basals Tip41 es troba fosforilat mentre que l'addició de rapamicina al medi promou la defosforilació d'aquesta proteïna, incrementant així la seva interacció amb Tap42.

Els complexos de les fosfatases de tipus 2A:

Les fosfatases de tipus 2A poden formar diversos complexos amb diferents proteïnes amb la finalitat de dur a terme una àmplia varietat de funcions. Normalment, les PP2A es troben formant un complex heterotrimèric que conté una subunitat estructural, Tpd3 (van Zyl et al. 1992), una subunitat catalítica, que pot ser una de les dues proteïnes redundants (Pph21 i Pph22), i una de les dues subunitats reguladores que existeixen al llevat *S. cerevisiae* (Cdc55 i Rts1) (Healy et al. 1991; Zhao et al. 1997). Aquests complexos es denominen PP2A^{Cdc55} i PP2A^{Rts1}. La principal funció del complex PP2A^{Cdc55} és controlar la progressió del cicle cel·lular regulant tant l'entrada com la sortida de la mitosi. Per altra banda, el complex PP2A^{Rts1} és necessari per mantenir l'organització de l'anell de septines durant la citoquinesis, per desfer l'anell durant l'etapa G1 del cicle cel·lular i per la defosforilació de la septina Shs1 (Dobbelaere et al. 2003).

Les subunitats catalítiques de les PP2A també poden formar un complex amb la proteïna Tap42 la qual competeix amb les altres subunitats del complex heterotrimèric amb aquesta finalitat. La unió Tap42-PP2Ac depèn de l'estat de fosforilació de Tap42 induïda per les quinases Tor1/2 (Di Como & Arndt 1996) (veure Figura 10). En condicions basals el complex

INTRODUCCIÓ

Tap42-PP2Ac es localitza a la membrana vacuolar juntament amb els altres elements del complex TORC1. Resultats publicats per Di como i col·laboradors indiquen que durant el període que engloba des de la l'alliberació dels complexos Tap42-PP2Ac de les quinases Tor fins a la completa dissociació dels propis complexos és quan aquests són funcionalment actius (Di Como & Jiang 2006). L'any 1996 es va observar que al complex Tap42-fosfatases també s'hi uneixen unes altres proteïnes reguladores conegudes com Rrd1 i Rrd2, les quals són activadores de l'activitat fosfotirosil fosfatasa de les PP2A (Di Como & Arndt 1996; Jiang & Broach 1999). En concret, es va determinar que la proteïna Rrd1 té afinitat pel complex Tap42-Sit4 mentre que, Rrd2 s'associa preferentment al complex Tap42-PP2Ac. Tot i així, alguns autors creuen que aquesta última interacció és promoguda per la presència de Rrd1 (Van Hoof et al. 2005) (veure Figura 13).

La formació i localització dels diversos complexos està regulada per les modificacions que pateixen les PP2Ac. En concret s'han descrit tres modificacions post-traduccionals: la metilació del residu leucina conservat en el domini C terminal (Leu369 de la proteïna Pph21), i la fosforilació de dos residus, una tirosina i una treonina, també situats a l'extrem C terminal (Tyr367 i Thr364 de Pph21) (Gentry et al. 2005). Malgrat que la metilació del residu L369 de Pph21 afecta la formació del complex PP2A^{Rts1} però no n'és un requisit imprescindible, si que ho és per l'assemblatge de l'heterotrímer PP2A^{Cdc55}. Quan aquest residu es troba desmetilat s'afavoreix la unió de la PP2Ac amb les proteïna Tap42 (Wu et al. 2000). Altres treballs mostren que la proteïna Rrd2 també té preferència d'unió amb la PP2Ac (Hombauer et al. 2007). Respecte l'estat de fosforilació de la Thr364 de Pph21, quan aquest residu es troba fosforilat és incapaç de formar el complex PP2A^{Cdc55} mentre que només redueix un 40% els nivells de l'holoenzim PP2A^{Rts1}. Per altra banda, quan el residu Tyr367 està fosforilat es produeix una dràstica dissociació d'ambdós complexos heterotrimèrics, impeding la seva formació (Gentry et al. 2005). El conjunt de les alteracions en les quantitats i proporcions dels diferents complexos de les PP2A resultaria en un canvi coordinat en múltiples fenotips que afecten el creixement cel·lular i la funcionalitat.

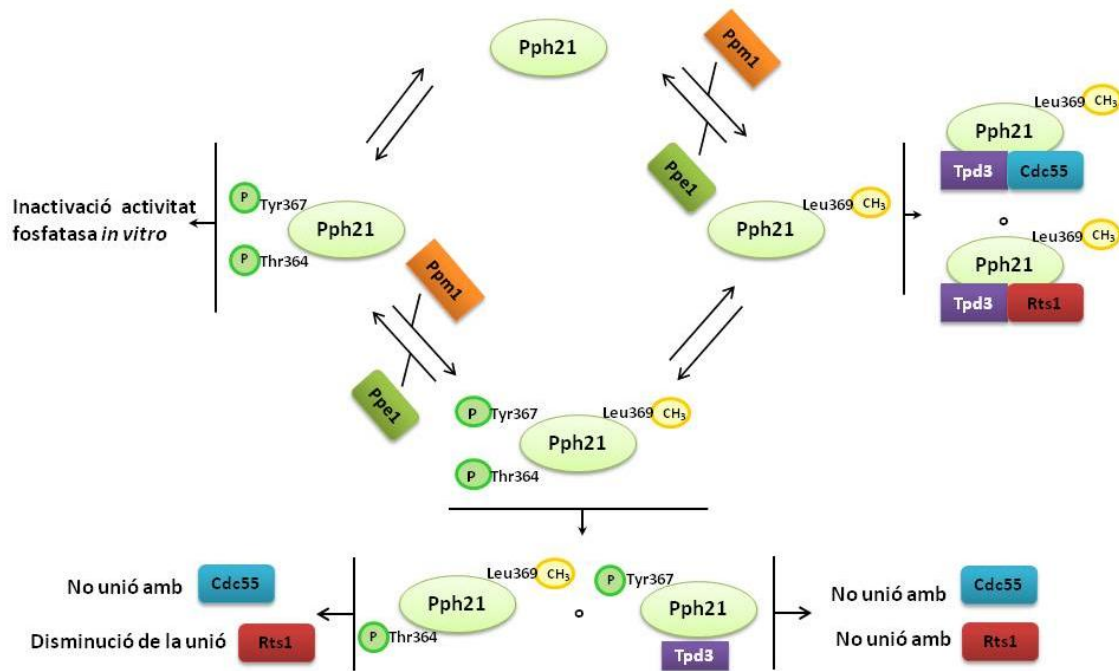


Figura 13. Esquema de les principals modificacions post-traduccionals de Pph21. Es mostren les tres modificacions que pateixen les PP2Ac i la implicació d'aquestes en la formació dels holoenzims PP2A^{Cdc55} i PP2A^{Rts1}. Figura adaptada de (Gentry et al. 2005).

L'any 2009, González i col·laboradors van demostrar que el mutant *ptc1* presenta sensibilitat tant a rapamicina com a cafeïna les quals depenen de l'activitat fosfatasa de Ptc1. A més, aquests efectes semblen ser independents de la via HOG. Per altra banda, la manca de Ptc1 provoca una atenuació general dels canvis transcripcionals provocats pel tractament amb rapamicina i afecta la migració nuclear dels factors de transcripció Gln3 i Msn2 en resposta a aquest compost. A partir d'anàlisis epistàtics es demostra que les mutacions de *SIT4* i/o *TIP41* suprimeixen el fenotip de sensibilitat a rapamicina i a cafeïna del mutant *ptc1*, fet que indica que Ptc1 podria estar actuant al nivell de Sit4 i/o Tip41 a la via TOR. En el mateix treball presenten que la pèrdua de Ptc1 redueix la interacció dependent entre Tap42 i Tip41 dependent de rapamicina. Aquest fenotip s'explica degut a la disminució del nivell de la proteïna Tip41 la qual, en un mutant *ptc1*, té un patró de fosforilació alterat. Gràcies a aquest treball es mostra la primera evidència que una fosfatasa de tipus 2C juga un paper en aquesta via tan important i conservada (Gonzalez et al. 2009).

IV. MATERIALS I MÈTODES

1. Soques i medis de cultiu

La soca DH5 α de *Escherichia coli* es va utilitzar com a hoste pels experiments de clonació de DNA. Les cèl·lules bacterianes es van fer créixer en medi LB (Luria Bertani), complementat amb 50 $\mu\text{g/ml}$ d'ampicilina (Roche) per la selecció de plasmidis, en agitació i a una temperatura constant de 37 °C.

Les soques de *S. cerevisiae* que es van utilitzar en aquest estudi es troben citades a l'annex I. Aquestes es van créixer en medi YPD (10 g/l d'extracte de llevat, 20 g/l de peptona i 20 g/l de glucosa), YPD-G418 (YPD complementat amb 200 $\mu\text{g/ml}$ de G418 (Calbiochem)), YPD-Nat (YPD amb un suplement de 100 $\mu\text{g/ml}$ de nurseotricina (Werner Biogents)) o YPD-G418-Nat a una temperatura constant de 28°C i amb una agitació de 230 rpm. Per seleccionar mutacions i/o plasmidis, es va utilitzar el medi sintètic complet (SC) que està compost per 0.17% de *Yeast Nitrogen Base* (YNB) sense aminoàcids ni sulfat amònic, 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2% glucosa i 0.13% de mescla *drop-out* (una barreja que conté tots els requeriments excepte aquells adequats per seleccionar les mutacions i els plasmidis d'interès) (Adams et al. 1997).

2. Tècniques de DNA recombinant

Les reaccions de restricció, lligacions de DNA i altres tècniques de DNA recombinant es van realitzar segons els mètodes descrits en (Sambrook et al. 1989).

La purificació de fragments específics de DNA, incloent productes de PCR i digestions amb enzims de restricció, es van realitzar aïllant els fragments d'interès mitjançant electroforesi en gels d'agarosa. Els fragments de DNA es van recuperar dels gels utilitzant el *Agarosa Gel DNA Extraction Kit* (Roche) o el NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Marcherey-Nagel).

Les cèl·lules d'*E. coli* van ser transformades mitjançant el tractament estàndard amb clorur càlcic (Sambrook et al., 1989). Les cèl·lules de *S. cerevisiae* es van transformar segons el mètode modificat d'acetat de liti (Ito et al., 1983). Per les transformacions heteròlogues emprant els cassets que contenen els gens *KanMx4* o *nat1*, després de la transformació les cèl·lules es van resuspendre en 0.7 ml de medi YPD i es van incubar a 28 °C durant tres hores, per permetre que adquirissin resistència als antibiòtics G418 o nurseotricina, respectivament. Tot seguit es van sembrar les cèl·lules en plaques de YPD-G418 (200 $\mu\text{g/ml}$) o YPD-Nat (200 $\mu\text{g/ml}$) (Webster & Dickson 1983).

La correcta recombinació dels cassets d'interrupció va ser verificada per PCR a partir de colònies (Huxley et al., 1990). Les cèl·lules van ser recollides amb una punta estèril i dipositades a la base d'un tub Eppendorf, que es va incubar durant 90 segons en un microones a màxima potència, mantenint la tapa del tub oberta. Immediatament, les cèl·lules es van col·locar a -20 °C durant 5 min.

3. Cassets d'interrupció i delecions gèniques

Moltes de les soques construïdes en aquest treball s'han basat en transformar el casset d'interrupció de 2 Kb *ptc1::nat1* en soques d'interès del fons genètic BY4741 provinents de la col·lecció EUROFAN (Annex I Taula 1). El casset *ptc1::nat1* es va obtenir mitjançant la digestió del plasmidi YEp112-*ptc1::nat1* (Ruiz et al. 2006)(veure secció 5) amb els enzims de restricció Sall i HindIII. Les colònies positives es van seleccionar en plaques YPD-G418-Nat. La correcta inserció del casset d'interrupció es va comprovar per PCR emprant els oligonucleòtids 3'_PTC1_comp i nat1-3' (Annex II Taula 1) obtenint un fragment de 900 pb per les cèl·lules positives. Les soques generades seguint aquesta estratègia són les **ASG33**, **AGS34**, **LTR049**, **LTR050**, **LTR063** i **LTR064** que es van construir a partir de les soques *cch1::KanMX4*, *mih1::KanMX4*, *ppe1::KanMX4*, *ppm1::KanMX4*, *rrd1::KanMX4* i *rrd2::KanMX4* respectivament (Annex I Taula 1), a més a més d'alguns dobles mutants quinasa/*ptc1* (Annex I Taula 2).

Els dobles mutants que combinen l'eliminació d'una proteïna quinasa, fosfoinositol quinasa o subunitats reguladores amb la mutació de la fosfatasa Ptc1 es van generar a partir de quatre estratègies diferents. Una de les estratègies emprades es basava en transformar les soques que els manca una quinasa, fosfoinositol quinasa o subunitat reguladora amb el casset d'interrupció *ptc1::nat1* (Annex I Taula 2). En alguns casos, les soques es van tornar a fer transformant el mutant *ptc1* amb els cassets d'interrupció de les quinases (Annex I Taula 3), els quals es van amplificar per PCR a partir de DNA genòmic del mutant quinasa de la col·lecció EUROFAN (Annex I Taula 1). Les colònies positives es van seleccionar en plaques YPD-G418-Nat. La correcta inserció del casset es va verificar per PCR amb els encebadors descrits a l'Annex II Taula 1. Per altra banda, també es van utilitzar dues metodologies que consistien en crear la soca del sexe alfa MAR216 (BY4742 *ptc1::nat1*) amb les soques mutants de la quinasa procedents de la col·lecció EUROFAN que són del sexe *a*. A continuació, algunes soques es van obtenir mitjançant *random spore analysis* (Annex I Taula 4), mentre que d'altres es van aïllar i disseccionar les tètrades per separar les espores (Annex I Taula 5). Finalment, es van seleccionar les cèl·lules haploides que tinguessin ambdues mutacions. El protocol seguit per l'obtenció d'aquestes soques està descrit a la secció 6 de Materials i mètodes.

4. Cerca de supressors en multicòpia dels fenotips de sensibilitat a CFW, pH alcalí o rapamicina característics d'un mutant *ptc1*

Per la cerca de supressors en multicòpia en presència de CFW (CWF Fluorescent Brightener F-6259, Sigma) o pH alcalí, es va transformar la soca MAR143 amb la biblioteca genòmica de llevat basada en el plasmidi multicòpia YEp24 (regal del Dr. Ramón Serrano, Universidad Politècnica de Valencia). Per altra banda, la cerca de supressors en presència de rapamicina (Rapamycin, Calbiochem), la soca MAR143 es va transformar també amb la biblioteca genòmica de llevat basada en el vector YEp13 (American Type Culture Collection 37415). Es van obtenir aproximadament 60000 transformants en la cerca en condicions de CFW i pH alcalí, i 50000 en presència de rapamicina (30000 basats en la genoteca YEp24 i 20000 provinents de la biblioteca genòmica basada en YEp13). Aquests transformants es van seleccionar en funció de la seva capacitat per créixer en plaques que contenen un medi sintètic sense uracil (biblioteca genòmica construïda en el vector YEp24) o sense leucina (genoteca generada en el plasmidi YEp13). Les cèl·lules es van recuperar en 1 ml de medi selectiu i es van plaquejar a una densitat de 3500 colònies per placa en plaques de YPD complementat amb CFW (5 o 10 µg/ml), amb 50 mM de TAPS i ajustant el pH a 8.0 o 8.2, o amb rapamicina (5 o 10 ng/ml). Després de 2-3 dies d'incubació a 28 °C, les colònies que van aparèixer es van considerar positives, es van recuperar, i es va detectar per PCR si els plasmidis contenen el gen *PTC1*. Els clons que no tenien el gen *PTC1* se'ls va donar un codi i es va procedir amb la seva caracterització. Es va aïllar el DNA plasmídic d'aquestes cèl·lules, les cèl·lules de *E. coli* DH5α es van transformar amb els plasmidis. Tot seguit, es va purificar el DNA plasmídic i es van dur a terme restriccions enzimàtiques amb EcoRI per identificar els mateixos fragments cromosòmics. Els plasmidis seleccionats es van transformar una altra vegada a la soca MAR143 per verificar la supressió de la sensibilitat al compost o a la condició de la cerca on es van obtenir. Finalment, el fragment genòmic de llevat que contenia cada plasmidi es va identificar per seqüenciació del DNA emprant els encebadors YEp13_seq.3' i YEp13_seq.5' (Annex II Taula 7). A la Figura 14 es mostra un esquema de l'estratègia utilitzada.

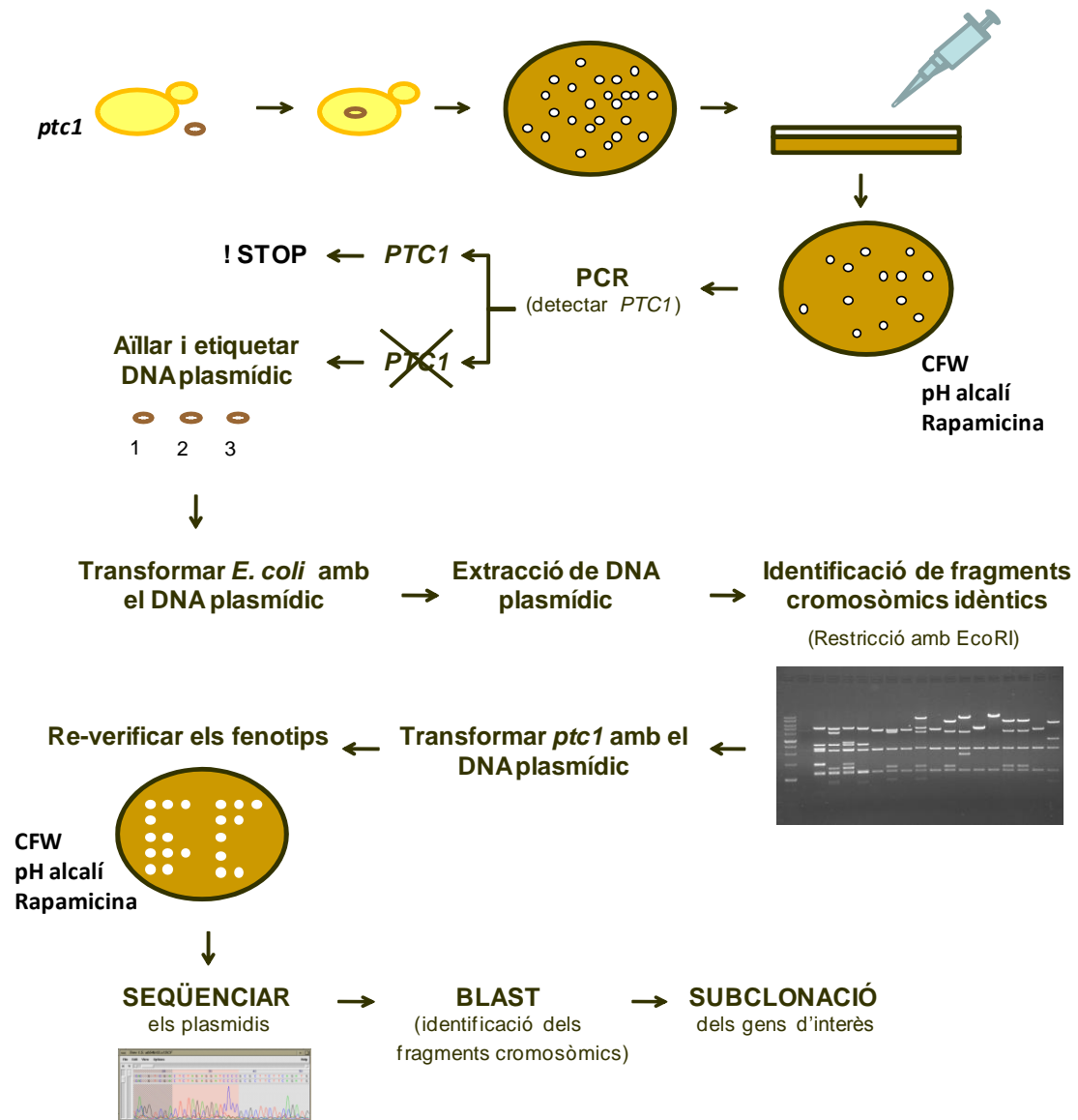


Figura 14. Esquema del procediment realitzat per la cerca de supressors en multicòpia dels fenotips de sensibilitat a CFW, pH alcalí o rapamicina característics del mutant *ptc1*.

5. Plasmidis

La subclonació dels ORF responsables de la supressió del fenotip de *ptc1* en presència de CFW, pH alcalí o rapamicina es va realitzar seguint diversos passos de restricció enzimàtica amb l'objectiu de clonar-los en el plasmidi YEplac195. Tots ells estan descrits a la Taula 1 de l'Annex III.

pRS316, plasmidi centromèric utilitzat com a control amb el marcador *URA3* (Sikorski & Hieter 1989).

pRS415, plasmidi centromèric amb marcador de selecció *LEU2* (Sikorski & Hieter 1989) utilitzat per subclonar *PPH21*.

pRS425, plasmidi episomal amb marcador de selecció *LEU2* (Christianson et al. 1992) utilitzat per subclonar *PPH21* i els diversos al·lels d'aquest gen cedides pel Dr. David C. Pallas, de la Emory University School of Medicine.

YEplac181, plasmidi episomal que conté el marcador de selecció *LEU2* (Gietz & Sugino 1988) que es va emprar com a control.

YEplac195, plasmidi episomal amb el marcador *URA3* que es va utilitzar principalment per clonar els gens obtinguts en les cerques de supressors en multicòpia d'un mutant *ptc1* en els tres fenotips analitzats. A més, també es va utilitzar com a control (Gietz & Sugino 1988).

pAMS366 conté quatre seqüències CDRE sintètiques en tàndem extreteres del promotor del gen *FKS2* i fusionades al sistema reporter *LacZ* (Stathopoulos & Cyert 1997).

pAN5-MEP2-LacZ, plasmidi YCplac111 que compren els oligonucleòtids -828 a +27 de la seqüència codificant per *MEP2* fusionat al gen *LacZ*. Aquest plasmidi va ser cedit pel Dr. Michael N. Hall, de la University of Basel.

pEGH-GST-SLT2, plasmidi que conté el gen *SLT2* fusionat amb la proteïna GST. L'expressió del gen es troba regulat sota el promotor de galactosa GAL1-10 UAS (Zhu et al. 2001).

pEJ27, plasmidi episomal YEplac195 amb marcador *URA3* que conté el gen *TAP42* amb el seu propi promotor unit a GST a l'extrem N-terminal (Jacinto et al. 2001). El plasmidi va ser un regal del Dr. Michael N. Hall, de la University of Basel.

pGAP1-LacZ, conté el promotor de *GAP1* fusionat al sistema reporter *LacZ*, es va construir amplificant per PCR la regió que compren els oligonucleòtids -968 a +21 i es van afegir les dianes KpnI i XbaI, amb l'objectiu de clonar el fragment en el plasmidi YEp357 (Gonzalez et al. 2009).

pKC201, és un plasmidi que conté la regió *upstream* del gen *ENA1*, des del nucleòtid -1385 a +35 (respecte el codó d'inici Met), fusionat al gen *LacZ* (Alepez et al. 1997).

pLT12 (CRH1-LacZ), plasmidi YEp356R que compren els oligonucleòtids -1153 a +1 de la seqüència del promotor de *CRH1* fusionat al gen *LacZ* (Bermejo et al. 2008). Aquest plasmidi va ser un regal del Dr. Javier Arroyo, de la Universidad Complutense de Madrid.

pMEP1-LacZ, conté el promotor de *MEP1* fusionat al sistema reporter *LacZ*, es va construir amplificant per PCR la regió que compren els oligonucleòtids -700 a +21 i es van afegir les

dianes EcoRI i XbaI, amb l'objectiu de clonar el fragment en el plasmidi YEp357 (Gonzalez et al. 2009).

pMLP1c-LacZ, plasmidi YEp356R que compren la regió -1189 pb a +1 pb de *MLP1* fusionat al gen *LacZ* (Garcia et al. 2009). Aquest plasmidi va ser un regal del Dr. Javier Arroyo, de la Universidad de Complutense de Madrid.

pRS316-BCK1-20, vector centromèric que conté un al·lel del gen *BCK1* que fa que la proteïna estigui constitutivament activa (Lee & Levin 1992).

pRS415-PPH21, es va obtenir tallant el plasmidi pRS316-HA-PPH21 amb els enzims NotI i Sall (2.5 kb). El fragment aïllat correspon a la seqüència que codifica *PPH21* regulada sota el seu propi promotor, a més a més, conté una seqüència que codifica l'epítot HA i una regió de reconeixement per la trombina just abans del ATG d'inici. Aquest fragment es va clonar en les mateixes dianes de restricció en el plasmidi pRS415 amb l'objectiu d'obtenir aquest constructe en un vector centromèric amb marcador de selecció *LEU2*.

Els plasmidis **pRS425-PPH21**, **pRS425-T364A**, **pRS425-T364D**, **pRS425-Y367E** i **pRS425-Y367F** es van obtenir tallant els plasmidis pRS316-HA-PPH21, pRS316-HA-T364A, pRS316-HA-T364D, pRS316-HA-Y367E i pRS316-HA-Y367F amb els enzims NotI i Sall (2.5 kb). Els fragments aïllats codifiquen la versió salvatge de *PPH21* i diferents al·lells d'aquesta fosfatasa, tots ells regulats sota el propi promotor de *PPH21*. Els vectors que codifiquen els diversos al·lells presenten mutacions puntuals en el cas de pRS316-HA-T364A i pRS316-HA-T364D al residu Thr364 on el codó ACG es va substituir per GCT i GAC, respectivament. Pel què fa als constructes pRS316-HA-Y367E i pRS316-HA-Y367F la mutació puntual afecta al residu Tyr367 on el codó TAC es va canviar per GAA i TTC, respectivament. A més a més, tots els plasmidis contenen una seqüència que codifica l'epítot HA i una regió de reconeixement per la trombina just abans del ATG d'inici. Aquests fragments es van clonar fent servir les mateixes dianes de restricció del plasmidi pRS425 amb l'objectiu d'obtenir aquests constructes en un vector episomal.

YEplac112-ptc1::nat1, vector episomal que té el casset *ptc1::nat1* (Ruiz et al. 2006).

YEplac181-SIT4, vector episomal YEplac181 que conté un fragment de 2.6 Kpb que codifica *SIT4*. Aquest insert es va obtenir digerint amb NheI-SnaBI un fragment genòmic obtingut a partir d'una biblioteca genòmica. El producte de la digestió es va clonar en el plasmidi YEplac181 a les dianes de restricció XbaI-SmaI (Munoz et al. 2003).

YEplac195-*CDC37*^{S14A}, vector episomal que conté el gen *CDC37* amb el codó que codifica el residu Ser14 canviat per una alanina. La mutació puntual es va realitzar fent dues PCRs paral·leles emprant el plasmidi YEplac195-*CDC37* (Annex III Taula 1) com a DNA motlle i les parelles d'encebadors *CDC37_S14A-Do* i *M13_Reverse* (genera un fragment de 800 pb) i *CDC37_S14A-Up* i *M13_Forward20* (fragment de 2.6 Kb) (Annex II Taula 1). Les condicions de la PCR utilitzades són les següents: 1) 5 min a 94°C, 2) 2 min a 94°C, 3) 1 min a 50°C, 4) 3 min a 72°C, 5) 6 min a 72°C, repetint 25 vegades el cicle que va del pas 2 al 4. Per l'amplificació dels fragments es va utilitzar la polimerasa Expand High Fidelity (Roche). Tot seguit, es va transformar la soca MAR143 (*ptc1::nat1*) amb els fragments obtinguts i el plasmidi YEplac195 digerit amb l'enzim BamHI per permetre la recombinació *in vivo* dels tres fragments de DNA. Es va extreure el DNA plasmídic de les colònies positives i es va comprovar la correcta mutació del codó per seqüenciació emprant els encebadors *M13_Forward20* i *M13_Reverse*.

YEplac195-*PPH3*, plasmidi episomal YEplac195 que té el gen *PPH3* regulat sota el seu propi promotor. Aquest vector va ser cedit pel Dr. H. Ronne (Hu & Ronne 1994).

YEplac195-*VPS73*^{E169A}, plasmidi episomal que conté el gen *VPS73* amb el residu Glu169 canviat per una alanina. El constructe es va generar seguint l'estratègia descrita pel vector YEplac195-*CDC37*^{S14A}. En aquest cas el DNA motlle utilitzat va ser el plasmidi YEplac195-*VPS73* (Annex III Taula 1) i les parelles d'encebadors *VPS73E169A_up* i *M13_Reverse*, i *NEW_VPS73E169A_down* i *M13_Forward20* (Annex II Taula 1). Les condicions de les PCR emprades són similars a les de YEplac195-*CDC37*^{S14A} variant els temps dels passos 4 i 5 que, en per aquesta condició van ser de 2.5 i 5 min respectivament.

YEplac195-*YBR241c*, vector episomal que conté el gen *YBR241c*. El gen *YBR241c* es va amplificar per PCR a partir de DNA genòmic amb els encebadors *YBR241C_UP* i *YBR241C_DO* (Annex II Taula 1) que hibriden a -282 pb i +1737 pb respecte el codó d'inici, respectivament. Les condicions de la PCR utilitzades són les següents: 1) 3 min a 94°C, 2) 1 min a 94°C, 3) 1 min a 50°C, 4) 3 min a 72°C, 5) 6 min a 72°C. El cicle que va del pas 2 al 4 es va repetir 25 vegades. L'amplificació es va fer amb Expand High Fidelity (Roche). El fragment amplificat es va digerir amb els enzims HindIII/XbaI i es va introduir al plasmidi YEplac195 obert amb els mateixos enzims.

6. Obtenció de soques diploides, esporulació i selecció d'haploides

L'obtenció dels dobles mutants descrits a les Taules 3 i 5 de l'Annex I és fruit de la conjugació entre un mutant simple quinasa provinent de la col·lecció EUROFAN (Winzeler et al.

1999) i el mutant MAR216 (BY4742 *ptc1::nat1*). Un cop es van seleccionar els diploides en el plaques YPD-G418-Nat, es va procedir a l' esporulació (veure apartat 6.1) per obtenir haploides en els quals estiguessin integrades les dues mutacions.

6.1 Esporulació de cèl·lules diploides

Els cultius de les cèl·lules diploides es van centrifugar a 1200 *xg* durant 5 minuts i les cèl·lules es van rentar 3 vegades amb H₂O. Es van resuspendre en 5 ml de medi d' esporulació (Adams *et al.*, 1997), i varen ser incubades a 28 °C amb agitació de 230 rpm fins que més del 50% de les cèl·lules havien esporulat (aproximadament entre 5-7 dies). Posteriorment, les cèl·lules es van sotmetre a *random spore analysis* (Adams *et al.*, 1997), amb les següents modificacions: 1 ml de cultiu d' esporulació es va centrifugar a 1200 *xg* durant 5 min i les cèl·lules es van resuspendre en 5 ml d' aigua amb 10 unitats de Zymoliasa-20T (MP Biomedicals, Inc.) i 10 µl de β-mercaptoetanol. Aquestes cèl·lules es van incubar durant 16 h a 30 °C en agitació constant. A partir d' aquest pas es va seguir el protocol descrit a (Adams *et al.*, 1997).

En aquest treball, també es va utilitzar el mètode de dissecció de tètredes amb l'ajuda d' un micromanipulador d' espores (Dissection Microscope MSM 400, de Singer Instruments). En aquest cas, les cèl·lules resuspeses en 1 ml de cultiu d' esporulació, es van rentar amb aigua i es van resuspendre en 0.1 ml d' aigua que contenia 10 µl de Zymoliasa-20T (100 µg/ml), i es van incubar durant 20 min a temperatura ambient abans de procedir a la separació de les espores.

6.2 Selecció d'haploides

Un cop separades les espores, les cèl·lules es van plaquejar en el medi YPD i incubades a 28 °C durant 48-72 h. Un cop les colònies havien crescut, es van fer rèpliques en plaques YPD-G418, YPD-Nat i YPD-G418-Nat per seleccionar la presència de marcadors. Finalment, les cèl·lules haploides caracteritzades genotípicament es van inocular en YPD per la caracterització del sexe de les cèl·lules segons els protocols descrits (Trecó & Winston 1998).

7. Assaigs de creixement

7.1 Assaig de creixement en medi líquid

Per analitzar el creixement dels cultius d' interès en medi YPD complementat amb 1 mM de peròxid d' hidrogen, les soques es van fer créixer en medi selectiu i, tot seguit, es van inocular a una OD₆₆₀ de 0.01 en plaques de 96 pous (volum final de 250 µl). El seu creixement

es va monitoritzar després de 16 hores mesurant la OD₆₃₀ en un lector de plaques Labsystems iEMS Reader MF (Labsystems). Per altra banda, també es va estudiar el creixement de les cèl·lules *ptc1* en pH alcalí i en presència d'ions metàl·lics seguint el protocol descrit a (Serrano et al. 2004a).

7.2 Assaig de creixement en medi sòlid

Es va analitzar la capacitat de creixement de les diferents soques de *S. cerevisiae* en presència de diversos compostos. Es van realitzar *drop tests* en plaques de YPD complementades amb cafeïna (2.5, 5, 7.5, 10 i 15 µg/ml), CFW (1, 2.5, 5, 7.5 i 10 mM), LiCl (50, 75, 100, 150 i 200 mM), CaCl₂ (50, 100, 150, 200 i 400 mM), rapamicina (2.5, 5, 7.5, 10 i 15 ng/ml) o ZnCl₂ (1, 2, 4 i 6 mM). Per analitzar el creixement de les cèl·lules enfront condicions alcalines es van emprar plaques de YPD amb 50 mM de TAPS ajustades amb KOH als següents pH: 7.8, 7.9, 8.0, 8.1 i 8.2. Per l'estudi del creixement cel·lular davant una font de carboni no fermentable es varen utilitzar plaques de YP amb 2% d'etanol. Per dur a terme aquests experiments es van dipositar 3 µl d'una dilució del cultiu a OD₆₆₀ 0.05 procedent de cultius saturats, juntament amb dues dilucions seriades (1:5) a OD₆₆₀ 0.01 i 0.002, o una única dilució seriada (1:10) 0.005. Les plaques es van incubar a 28 °C fins el moment d'enregistrar els creixements.

8. Assajos d'activitat β-galactosidasa

Les cèl·lules de llevat portadores del plasmidi amb el sistema reporter es van fer créixer fins a arribar a la fase estacionària en medi sintètic sense uracil (pAMS366, pCRH1, pGAP1, pKC201, pMEP1, i pMLP1) o leucina (pMEP2). A continuació, les cèl·lules es van inocular en 5 ml de YPD a una OD₆₆₀ de 0.2 i es van incubar fins arribar a una OD₆₆₀ de 0.6-0.8. Tot seguit, els cultius es van centrifugar durant 5 minuts a 1200 *xg* en una centrífuga 5810 (Eppendorf). Les cèl·lules es van resuspendre en 1 ml de YPD o YPD més una solució control (no induït), YPD suplementat amb 200 ng/ml rapamicina (estrès per rapamicina) o bé YPD amb 200 mM LiCl (estrès per liti), en funció de l'experiment a realitzar. El tractament amb rapamicina va ser de 60min (pGAP1) i de 90 min (pMEP1 i pMEP2), mentre que la inducció per LiCl es va dur a terme durant 60 min (pKC201).

L'assaig β-galactosidasa es realitzà com s'indica a (Reynolds et al. 1997). Les cèl·lules es van centrifugar durant 5 min a 1200 *xg* (centrífuga 5810, Eppendorf) i es van resuspendre en 300 µl de solució Z (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 35 mM 2-mercaptoetanol). Dочents µl d'aquesta suspensió es van guardar a 4 °C per analitzar

posteriorment la quantitat de cèl·lules mesurant l'absorbància a 630 nm en plaques de 96 pous i utilitzant el lector de plaques Labsystems iEMS Reader (Labsystems). Els 100 µl restants de la suspensió de cèl·lules es van afegir a tubs d'assaig que contenien 900 µl de solució Z, on les cèl·lules es van permeabilitzar gràcies a l'addició de 40 µl de cloroform, 20 µl de SDS al 0.1 %, i agitació en vòrtex durant 15 segons. Tot seguit, es van temperar col·locant els tubs d'assaig en un bany d'aigua a 30 °C. Un cop transcorreguts 15 minuts, es va afegir com a substrat 0.2 ml de ONPG (4 mg/ml) per començar la reacció enzimàtica, la qual s'evidencià per l'aparició d'un color groc a la barreja típica del producte format. La parada de la reacció enzimàtica es va dur a terme canviant el pH de la reacció gràcies a l'addició de 500 µl de 1 M de Na₂CO₃. A continuació, els tubs es van centrifugar durant 5 min a 1200 *xg* i 350 µl del sobrenedant van ser utilitzats per avaluar el producte format mitjançant espectrofotometria mesurant a 405 nm, en plaques de 96 pous i utilitzant el lector de plaques. L'activitat β-galactosidasa es va expressar en unitats de Miller utilitzant la següent fórmula: $V = [(1000 \times OD_{405}) / (\text{temps de reacció} \times OD_{630})]$.

9. Extracció de proteïnes i immunodetecció de les proteïnes transferides a membrana

9.1 Anàlisi d'interaccions proteiques per la purificació de proteïnes fusionades a GST

Per veure la interacció entre Tap42 i Pph21 es va seguir el protocol descrit per (Wang & Jiang 2003). Les cèl·lules es van fer créixer en medi YPD fins a una OD₆₆₀ entre 0.6-0.8 i, tot seguit, es van recollir i es van netejar dues vegades amb solució de lisis (50 mM Tris-Cl, pH 7.4, 50 mM NaF, 5 mM EDTA, 1 mM DTT i 5% de Glicerol). A continuació, es van resuspendre les cèl·lules amb 200 µl del mateix tampó però aquesta vegada afegint-li inhibidors de proteases 1x (Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche). A més, es va addicionar un mateix volum de boles de Zirconia de 0.5 mm (BioSpec # 11079105z) i, tot seguit, es van llisar les cèl·lules mitjançant agitació mecànica intensa utilitzant un Fast Prep Cell Breaker a una potència de 5.5 durant 25 segons. Aquest procés es va dur a terme 5 vegades amb un interval d'un minut entre cicles a -20 °C a fi de conservar la integritat de les proteïnes. Una vegada trencades les cèl·lules, es van diluir els cultius llisats quatre cops amb solució de rentat (50mM de Tris-Cl, pH 7.4, 50 mM NaF, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 1% Tritó X-100 i inhibidors de proteases 1x). Per tal d'eliminar les restes cel·lulars insolubles es van centrifugar els llisats durant 15 minuts a 12000 *xg* i a 4 °C i el sobrenedant es va guardar a -80 °C. Abans de prosseguir amb el protocol, es va determinar la concentració proteica de les mostres

mitjançant el mètode de Bradford (Bradford 1976) emprant CoomassiePlus™ protein Assay Reagent (Pierce).

Per realitzar la purificació de la proteïna fusionada amb GST, es van incubar durant 1.5 h a 4 °C alíquotes de 3 mg d'extracte proteic total amb 60 µl de resina Glutathione Agarose Beads (ABT) al 50% de la solució de rentat emprada anteriorment. Tot seguit, es van dur a terme 4 rentats de la resina amb 250 µl del tampó de rentat utilitzant una placa Multi Screen 96-well filter plate (Millipore). Després d'aquests rentats se'n van realitzar dos més amb una solució 20 mM Tris-Cl a pH 7.4. Les proteïnes unides a la resina es van recuperar bullint les mostres durant 5 min juntament amb 70 µl de l'últim tampó i 70 µl de solució de càrrega 2x (62.5 mM Tris HCl pH 6.8, 20% Glicerol, 4 % SDS, 0.1% blau de Bromofenol i 0.05 M DTT).

La separació de les proteïnes per electroforesis es va realitzar en condicions desnaturalitzants en gels de poliacrilamida-SDS al 10 % (p/v). Un cop separades, les proteïnes es van transferir del gel a una membrana de PVDF Immobilon-P (Millipore) emprant un transferidor semi-sec (Hoefer TE77XP) a un voltatge de 60 mA durant 90 min. Tot seguit, es van bloquejar tota la superfície d'unió no específica amb el tampó de bloqueig TBS-Tween 20 (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween 20) i 5% de llet en pols desnatada (Asturiana), durant 1 h en agitació. A fi de detectar Pph21-HA, es va retirar la solució de bloqueig i es va addicionar l'anticòs primari, anti-HA (Covance) a una dilució 1:1000 en solució de bloqueig, i s'incubà tota la nit a 4 °C amb agitació. Posteriorment es van realitzar 3-4 rentats de 10-15 minuts amb TBS-Tween 20. A continuació es va incubar la membrana amb l'anticòs secundari anti-IgG de ratolí conjugat a peroxidasa (GE Healthcare) a una dilució de 1:20000 en tampó de bloqueig i es va deixar incubant durant 1 hora a temperatura ambient i amb agitació constant. En darrer lloc, es van realitzar 3 rentats de 10 minuts amb TBS-Tween 20 per retirar l'excés d'anticòs secundari. Les bandes de proteïnes immunoreactives es van visualitzar utilitzant el sistema de quimioluminiscència ECL Select (GE Healthcare).

Amb l'objectiu d'analitzar la presència de la segona proteïna, GST-Tap42, es va realitzar un *stripping* de la membrana. Aquest consisteix en incubar la membrana amb solució de *stripping* (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.7, 2% SDS i 100 mM de 2-mercaptoetanol) durant 30 minuts a 50 °C, agitant ocasionalment. Tot seguit es va rentar la membrana amb TBS-Tween 20 una vegada durant 15 minuts i dos cops més de 5 minuts. A continuació es van repetir tots els passos de bloqueig i incubacions amb anticòs primari i secundari tal i com s'ha descrit anteriorment. En aquest cas, però, l'anticòs primari emprat va ser anti-GST (Santa Cruz

Biotechnology) a una dilució 1:2000 i com a secundari l'anticòs anti-IgG de conill (GE Healthcare) diluït 20000 vegades.

9.2 Determinació de l'estat de fosforilació de Slt2

Les soques d'interès es van fer créixer fins a una OD_{660} entre 1.2 i 1.4 en 5 ml del medi selectiu requerit en cada cas. Posteriorment les cèl·lules es van filtrar emprant membranes de 25 mm de diàmetre amb porus de 45 μm GN-6 (Pall Corporation), es van rentar amb aigua i, a continuació, es van congelar ràpidament en nitrogen líquid. Les membranes amb les cèl·lules es van congelar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fins la preparació dels extractes. Les cèl·lules es van resuspendre amb 100-150 μl del tampó de lisi (50 mM Tris HCl pH 7.5, 10% Glicerol, 1% Triton, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 50 mM β - Fosfat de Glicerol, 5 mM Pirofosfat sòdic, 5 mM EDTA pH 8.0, 1 mM PMSF, Inhibidors de proteases 1x (Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche)). Es va afegir 100 μl de boles de Zirconia de 0.5 mm (BioSpec # 11079105z) i tot seguit es van llisar les cèl·lules mitjançant agitació mecànica intensa utilitzant un Fast Prep Cell Breaker a una potència de 5.5 durant 25 segons. Aquest procés es va repetir 5 vegades amb un interval d'un minut entre cada cicle, on les mostres es mantenien a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per preservar l'estat de les proteïnes. Posteriorment, les mostres així tractades es van centrifugar durant 15 min a 15700 $\times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i els sobrenedants es van recuperar. La seva concentració proteica va ser determinada emprant CoomassiePlusTM protein Assay Reagent (Pierce).

A continuació, 40 μg de proteïna total es va mesclar amb 1/3 del volum de tampó de càrrega SDS 4x (125 mM Tris HCl pH 6.8, 40% Glicerol, 8% SDS, 0.2% blau de Bromofenol i 0.1 M DTT) i les mostres es van bullir durant 5 min. Les proteïnes es van separar en condicions desnaturalitzants en gels de poliacrilamida-SDS al 10 % (p/v) i, tot seguit, es van transferir del gel a la membrana i es van bloquejar els llocs inespecífics d'unió tal i com s'ha descrit a l'apartat anterior. Els passos d'incubació amb els anticòs primari i secundari es van dur a terme igual que a la secció anterior. En aquest cas però, l'anticòs primari utilitzat va ser el anti-fosfo-p42/p44 MAPK ($\text{Thr}^{202}/\text{Tyr}^{204}$) (Cell Signaling Technology) a una dilució 1:2000 en solució de bloqueig i l'anticòs secundari anti-IgG de conill conjugat a peroxidasa (GE Healthcare) a una dilució de 1:20000 en tampó de bloqueig. Les bandes de proteïnes immunoreactives es varen visualitzar utilitzant el sistema de quimioluminiscència ECL Select (GE Healthcare).

10. Purificació de la proteïna Slt2 fusionada a GST i anàlisi de fosfopèptids per MALDI-TOF

Es van fer créixer les soques d'interès portadores del plasmidi pEGH-GST-SLT2 fins obtenir una OD₆₆₀ entre 1.2 i 1.4 en un volum de 100 ml d'un medi sintètic que li manca l'aminoàcid uracil i al qual se li va substituir la glucosa per rafinosa. Tot seguit, es va induir l'expressió de la proteïna Slt2 afegint galactosa al 2% en el cultiu durant 5-6h. A continuació, es va induir la fosforilació de Slt2 augmentant el pH del cultiu a 8.2 durant 10 minuts. Posteriorment, els cultius es van filtrar i les cèl·lules es van rentar amb aigua abans de procedir a la seva ràpida congelació en nitrogen líquid. Els extractes proteics es van obtenir seguint el protocol de l'apartat 9.2 amb la única modificació que les cèl·lules es van resuspendre en 400-500 µl del tampó de lisi.

Amb l'objectiu de purificar la proteïna Slt2 es va incubar tota la nit a 4 °C tot l'extracte proteic obtingut amb un volum de 250 µl de resina de Glutathione Agarose Beads (ABT) al 50% de la solució de lisis utilitzada per obtenir els extractes proteics. Tot seguit, la resina es va rentar deu vegades amb 250 µl de solució de lisis emprant una placa Multi Screen 96-well filter plate (Millipore). Finalment, per recuperar les proteïnes la resina es va resuspendre amb 90 µl de la solució de lisis juntament amb 1/3 del volum de tampó de càrrega SDS 4x (125 mM Tris HCl pH 6.8, 40% Glicerol, 8% SDS, 0.2% blau de Bromofenol i 0.1 M DTT) i es van bullir durant 5 minuts.

La separació de les proteïnes per electroforesis es va realitzar en condicions desnaturalitzants en gels de poliacrilamida-SDS al 8 % (p/v). Es va tenyir el gel amb una solució de Coomassie (10 % àcid acètic, 25% isopropanol i 0.25% de Coomassie Brilliant Blue R250 (AMRESCO)). A continuació, es va destenyir el gel amb una solució composta per 10% d'àcid acètic i 25% d'isopropanol. Finalment, les bandes corresponents a la proteïna GST-Slt2 es van tallar del gel i es van entregar al Servei de Proteòmica del Mòdul de Recerca B de la Universitat Autònoma de Barcelona per posteriors anàlisis.

Abans de fer la digestió trípica de Slt2, la mostra es va incubar amb 10 mM DTT en 50 mM de bicarbonat d'amoni durant 30 min i, seguidament, es va tractar amb 25 mM iodoacetamida en 50 mM bicarbonat d'amoni durant 30 min, ambdós processos realitzats a temperatura ambient. Tot seguit, van dur a terme la digestió trípica de la proteïna incubant-la amb 40 ng de tripsina (Promega) durant 3 h a 37 °C. Els pèptids es van eluir per centrifugació amb 100 µl de acetonitril:H₂O (1:1) + 0.2% d'àcid trifluoroacètic (TFA), es van evaporar utilitzant un concentrador *speed-vacuum* i es van resuspendre en 35 µl de H₂O + 0.1% TFA.

Amb l'objectiu d'obtenir una mostra rica en pèptids fosforilats, es va tractar 30 µl de la mostra amb el kit TiO₂ Enrichment (Calbiochem; ref.539722) i els pèptids eluïts es van purificar utilitzant un ZipTip (Millipore; ref.ZTC18S096). A continuació, es van analitzar els pèptids per espectrometria de masses.

Els anàlisis per espectrometria de masses (MS) es van dur a terme tal i com es descriu tot seguit: 0.5 µl de mostra es va barrejar amb el mateix volum d'una solució que conté una matriu d'àcid α-cyano-4-hidroxicinàmic (10 mg/ml en 30% acetonitril, 60% d'aigua + 0.1% d'àcid trifluoroacètic), es va introduir en una placa d'acer (Bruker Daltonics) i es va deixar assecar a temperatura ambient. L'espectre de masses obtingut pel *matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight* (MALDI-TOF) es va realitzar en mode positiu en un espectròmetre de masses Ultraflex extreme (Bruker Daltonics) a una velocitat de 25 kV. Tots els espectres de masses es van calibrar externament utilitzant una mescla estàndard de pèptids (Bruker Daltonics).

11. Tècniques de microscòpia

11.1 Determinació de l'estat vacuolar

Amb l'objectiu d'estudiar la morfologia vacuolar es va seguir el mètode descrit a (Vida & Emr 1995). En resum, les cèl·lules es van fer créixer en 10 ml de medi YPD fins obtenir una OD₆₆₀ de 0.6 a 0.8. Tot seguit, el cultiu es va centrifugar durant 3 minuts a 1200 xg i les cèl·lules es van resuspendre en 500 µl de YPD complementat amb 20 µM del fluorocrom FM4-64 (Molecular Probes T13320, Invitrogen). Les mostres es van incubar durant 15 minuts a 28 °C, es van centrifugar 3 minuts a 1200 xg i es van incubar en 1 ml de YPD durant 30-60 minuts a 28 °C per permetre la internalització del colorant per endocitosis i la seva acumulació a la membrana de la vacuola. A continuació, es va agafar una alíquota de 200 µl de la mostra i es va centrifugar durant 5 minuts a 500 xg. Les cèl·lules es van netejar dues vegades amb PBS i es van concentrar 5 vegades. En tots els casos les cèl·lules es varen visualitzar utilitzant un microscopi de fluorescència Nikon Eclipse E800 (magnificació, x1000) i amb un filtre TxRED. Les imatges digitals van ser capturades per una càmera ORCA-ER4742-80 (Hamamatsu) utilitzant el programa Wasabi (Hamamatsu). L'estat de fragmentació vacuolar d'una soca es va quantificar classificant com a mínim 600 cèl·lules per soca.

11.2 Determinació del patró de gemmació per tinció amb CFW

Per poder visualitzar el patró de gemmació característic d'una soca, les cèl·lules es van fer créixer en 5 ml de medi YPD fins arribar a una OD₆₆₀ de 0.8-1 a 37 °C. Els cultius es varen

centrifugar a 1200 *xg* durant 5 minuts i el pèl·let es va fixar amb 1 ml de YPD-formaldehid (3.7%) de durant 1 h en agitació a 28 °C. Tot seguit, el cultiu es va centrifugar durant 5 minuts a 1200 *xg* i es van realitzar un parell de rentats amb 500 µl de PBS. A continuació es van incubar les cèl·lules amb 0.02 mg/ml de CFW durant 5 minuts. Finalment, es van netejar les cèl·lules dues vegades amb PBS i es van visualitzar utilitzant un microscopi de fluorescència Nikon Eclipse E800 (magnificació, x1000) i amb un filtre DAPI. Les imatges digitals van ser capturades per una càmera ORCA-ER4742-80 (Hamamatsu) utilitzant el programa Wasabi (Hamamatsu).

V. OBJECTIUS

OBJECTIUS

Amb el propòsit d'estudiar els mecanismes funcionals de la fosfatasa de tipus 2C Ptc1 del llevat *Saccharomyces cerevisiae* en la resposta davant diferents estressos, els objectius que ens vam plantejar en aquest treball són els següents:

1. Realitzar una cerca de gens supressors que en multicopia siguin capaços d'alleugerir o suprimir els fenotips de sensibilitat que el mutant *ptc1* presenta en presència de pH alcalí, blanc de calcoflúor i rapamicina.
2. Dur a terme una exploració d'interaccions gèniques amb cada una de les quinases no essencials i la fosfatasa Ptc1 amb la finalitat de trobar quinasa/es que suprimeixin o atenuïn els principals fenotips de sensibilitat característics del mutant *ptc1*.

VI. RESULTATS I DISCUSSIÓ

- 1. Cerca de supressors en multicòpia dels fenotips de sensibilitat d'un mutant *ptc1***

1.1 Identificació de gens supressors en multicòpia dels fenotips de sensibilitat a CFW, pH alcalí i rapamicina d'un mutant *ptc1*

Estudis previs demostren que el mutant *ptc1* presenta sensibilitat a diversos estressos. Per tal d'ampliar el coneixement dels mecanismes funcionals de la fosfatasa Ptc1, es va decidir buscar gens que sobreexpressats en una soca *ptc1Δ* suprimissin o alleugeressin algun fenotip de sensibilitat característic d'aquestes cèl·lules. Amb la intenció d'avaluar un ampli espectre funcional de Ptc1 es van dur a terme tres cerques independents per trobar supressors que milloressin el creixement del mutant *ptc1* en presència de blanc de calcoflúor (CFW), pH alcalí o rapamicina.

Per dur a terme aquesta aproximació es va transformar la soca mutant MAR143 (*ptc1Δ*) amb dues biblioteques genòmiques. Els transformants obtinguts es van recuperar en medi líquid i es van plaquejar 60000 clons tant en plaques que contenien CFW (5 o 10 µg/ml) com ajustades a pH alcalí (8.0 o 8.2), i 50000 clons en plaques complementades amb rapamicina (5 o 10 ng/ml). Després de 2-3 dies d'incubació, els clons capaços de generar colònies macroscòpiques es van seleccionar i es va determinar si els plasmidis contenien el gen *PTC1*. Aquells plasmidis que no contenien el gen de la fosfatasa Ptc1 es van tornar a introduir a la soca MAR143 per re-verificar el seu paper com a supressors. A continuació, els plasmidis representatius es van seqüenciar per identificar la regió cromosòmica de llevat que contenien. La informació dels fragments identificats en condicions de CFW, pH alcalí i rapamicina es representen a les Taules 1, 2 i 3, respectivament.

Nº Clon	Cromosoma	Regió cromosòmica (pb)	# Clons	Capacitat supressora	Gens inclosos
VPC-01	XIII	883748 - 890979 °	2	Força	<i>GAS1</i>
VPC-04	XIII	660707 - 664639 °	5	Força	<i>CLN1</i>
VPC-06	XV	380009 - 388957 °	11	Força	<i>STI1, CIN5, YOR029W, DFG16</i>
VPC-20	VII	698878 - 704642 °	1	Força	<i>VOA1, CLB1, CLB6, YGR107W</i>
VPC-23	IV	787241 - 798450	9	Força	<i>SEC5*, TAF10, CDC37, STB3, YDR169C-A</i>
VPC-25	XIII	338611 - 349136	1	Força	<i>YMR034C, IMP2, MIH1, MSN2, CCS1, *SUB1</i>
VPC-29	VII	305319 - 312079 °	1	Força	<i>RMD9*, MLC1, ARC1, VPS73, RPL28, YGL102C</i>
VPC-31	II	116797 - 124972 °	1	Força	<i>TOD6, YBL053W, SAS3, PIN4</i>
VPC-33	XVI	853583 - 861660	1	Força	<i>YPR158C-A, KRE6, YPR159C-A</i>

Taula 1. Regions cromosòmiques obtingudes a partir de la cerca de supressors en multicòpia del mutant *ptc1* en presència de blanc de calcoflúor. El símbol (°) indica que només es va obtenir la seqüència d'un dels extrems. L'extensió de la regió clonada es va calcular a partir de la longitud del insert. Els gens que presenten l'asterisc significa que tenen un truncament a l'extrem 5' o 3', en funció de la localització del símbol.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Nº Clon	Cromosoma	Regió cromosòmica (pb)	# Clons	Capacitat supressora	Gens inclosos
VPP-05	XI	205321 - 214007	25	Força	<i>YPK1, RRN3, SSH4, YKL123w, SRP21</i>
VPP-08	XVI	780327 - 787698	4	Força	<i>CTR1</i>
VPP-09	X	653361 - 659100 °	1	Dèbil	<i>ARS1020, ENT3, VPS70</i>
VPP-10	XIII	338605 - 349023	5	Força	<i>YMR034c, IMP2, MIH1, MSN2, CCS1</i>
VPP-17	IV	452600 - 460505 °	1	Força	<i>YRB1, RCR2, YDR003w-A, RAD57, MAF1</i>
VPP-18	VII	305182 - 312079	4	Dèbil	<i>MLC1, ARC1, VPS73, RPL28, YGL102C</i>
VPP-24	XIII	660707 - 664639 °	4	Força	<i>CLN1</i>
VPP-41	XVI	355186 - 360720	1	Força	<i>MSD1, FMP30</i>
VPP-44	VII	209125 - 219164	1	Dèbil	<i>GZF3, UTP10</i>
VPP-65	X	70444 - 83572	1	Força	<i>YGL220w, NIF3, EDC1, COG1, SDT1, VRG4, YGL226w, OST5</i>

Taula 2. Regions cromosòmiques obtingudes a partir de la cerca de supressors en multicòpia del mutant *ptc1* en condicions de pH alcalí. El símbol (°) indica que només es va obtenir la seqüència d'un dels extrems. L'amplada de la regió clonada es va calcular a partir de la longitud del insert.

Nº Clon	Cromosoma	Regió cromosòmica (pb)	# Clons	Capacitat supressora	Gens inclosos
A.5.4.40	IV	808584 - 817220	3	Força	<i>CDC65, YMRCltau3, YMRWdelta20, SCS7, YMR272W-A, YMR272W-B, ZDS1, RCE1 i ARS1330</i>
A.10.7.103	IV	803102 - 818052	1	Dèbil	<i>PRP24*, TMA23, ARS1329, RRN9, URA10, CDC65, YMRCltau3, YMRWdelta20, SCS7, YMR272W-A, YMR272W-B, ZDS1, RCE1 i ARS1330</i>
A.5.7.94	II	578667 - 583445	1	Dèbil	<i>SMY2, UMP1, YBR174C i SWD3</i>
A.10.7.102	X	242327 - 251180	1	Dèbil	<i>PHS1, MRPL49 i BCK1*</i>
B.5.3.2	X	246205 - 250785	1	Dèbil	<i>MRPL49 i BCK1*</i>
B.5.4.4	X	246205 - 250916	1	Dèbil	<i>MRPL49 i BCK1*</i>
B.5.4.8	IV	123402 - 129400	6	Força	<i>ARS406, PPH22, YDL186W, YDL187C, YDL185C-A i TFP1</i>
B.5.5.24	X	654986 - 660966	1	Dèbil	<i>ENT3* i VPS70</i>

Taula 3. Regions cromosòmiques obtingudes a partir de la cerca de supressors en multicòpia del mutant *ptc1* en presència de rapamicina. Els gens que presenten l'asterisc significa que tenen un truncament a l'extrem 3'.

Tot seguit, es va procedir a la subclonació per restricció enzimàtica dels diversos gens al plasmidi episomal YEplac195 menys en el cas del gen *PPH22*, del que ja disposàvem d'un constructe en el vector YEplac181 (Annex III Taula 8), i es va analitzar la capacitat de cada gen aïllat per alleugerir el fenotip de sensibilitat al compost o condició a partir del qual es va obtenir. A partir de la cerca de supressors de la sensibilitat a CFW es van identificar 13 gens, mentre que, se'n van trobar 11 i 6 que suprimien els fenotips de sensibilitat a pH alcalí i rapamicina, respectivament. Els gens *VPS73*, *MIH1* i *CLN1* van aparèixer com a supressors tant del fenotip de sensibilitat a CFW com a pH elevat, mentre que només el gen *VPS70* va coincidir en la supressió dels fenotips de rapamicina i pH alcalí. Així doncs, es van identificar un total de 25 gens supressors que es troben descrits a la Taula 4.

NOM SISTEMÀTIC	NOM GEN	CERCA	DESCRIPCIÓ
YBL051C	<i>PIN4</i>	CFW	Involucrat en la transició G2/M, resposta al dany de DNA i integritat de la paret
YBR172C	<i>SMY2</i>	Rapa	Proteïna amb domini GYF, involucrada en la formació de vesícules COPII
YDL188C	<i>PPH22</i>	Rapa	Subunitat catalítica de la proteïna fosfatasa 2A (PP2A)
YDR003W	<i>RCR2</i>	pH	Proteïna vacuolar
YDR167W	<i>TAF10</i>	CFW	Subunitat de 145 kDa dels complexos TFIID i SAGA
YDR168W	<i>CDC37</i>	CFW	Co-xaperona Hsp90p essencial
YGL104C	<i>VPS73</i>	CFW/pH	Proteïna mitocondrial, la seva deleció afecta al tràfic de les proteïnes vacuolars
YGL225W	<i>VRG4</i>	pH	Transportador de manosa-GDP del Golgi
YGL226C-A	<i>OST5</i>	pH	Subunitat Z del complex oligosacariiltransferasa del lumen del RE
YGR106C	<i>VOA1</i>	CFW	Proteïna del RE implicada en l'assemblatge del sector V0 de la V-ATPasa
YGR108W	<i>CLB1</i>	CFW	Ciclina de tipus B involucrada en la progressió del cicle cel·lular
YGR109C	<i>CLB6</i>	CFW	Ciclina de tipus B implicada en la replicació del DNA durant la fase S
YIR018W	<i>YAP5</i>	CFW	Factor de transcripció de tipus cremallera de leucines implicat en la senyalització de ferro
YJL095W	<i>BCK1</i>	Rapa	MAPKKK que actua a la via de senyalització de la proteïna quinasa C
YJL110C	<i>GZF3</i>	pH	Proteïna GATA de dit de zinc
YJR126C	<i>VPS70</i>	pH/Rapa	Proteïna de funció desconeguda involucrada en el tràfic de proteïnes vacuolars
YKL124W	<i>SSH4</i>	pH	Factor específic necessari per la ubiquitinació dependent de Rsp5
YMR036C	<i>MIH1</i>	CFW/pH	Tirosina fosfatasa involucrada en el control del cicle cel·lular
YMR199W	<i>CLN1</i>	CFW/pH	Ciclina G1 implicada en la regulació del cicle cel·lular
YMR273C	<i>ZDS1</i>	Rapa	Proteïna involucrada en la regulació del creixement polaritzat dependent de Swe1
YMR307W	<i>GAS1</i>	CFW	Beta-1,3-glucanosiltransferasa necessària per l'assemblatge de la paret cel·lular
YOR028C	<i>CIN5</i>	CFW	Factor de transcripció de la família yAP-1 de tipus cremallera de leucines
YPL104W	<i>MSD1</i>	pH	tRNA-aspartil sintetasa mitocondrial
YPR124W	<i>CTR1</i>	pH	Transportador de coure d'alta afinitat de la membrana plasmàtica
YPR159W	<i>KRE6</i>	CFW	Proteïna integral de membrana de tipus II, possible beta-glucà sintetasa

Taula 4. Resum dels supressors identificats a les tres cerques. Les descripcions funcionals dels gens provenen de la base de dades *Saccharomyces Genome Database* (SGD) i de la literatura.

Mitjançant un anàlisi de *Gene Ontology* (GO) es va assignar una categoria funcional als supressors obtinguts. La majoria d'ells es podien classificar en dues categories funcionals: regulació del cicle cel·lular (*CLN1*, *CLB1*, *CLB6*, *MIH1*, *TAF10*, *CDC37*, *ZDS1*, *PPH22* i *PIN4*), i regulació de la funció vacuolar i el tràfic de proteïnes (*VRG4*, *OST5*, *VPS70*, *VPS73*, *RCR2*, *SSH4*, *VOA1* i *SMY2*) (Figura 15). A més a més, es van identificar tres gens directament involucrats en el manteniment de la paret cel·lular (*GAS1*, *KRE6* i *BCK1*). Tot i així, dos gens inclosos a la categoria de funció vacuolar i tràfic de proteïnes també estan relacionats amb la paret cel·lular (*VRG4* i *OST5*). Cal destacar que a la cerca de gens supressors del fenotip de sensibilitat a rapamicina es van trobar tres versions del gen *BCK1*, que codifica la MAPKKK del mòdul quinasa de la via CWI, totes elles truncades en la regió codificant del domini catalític C-terminal (veure Taula 3), per la qual cosa la proteïna sintetitzada hauria de perdre l'activitat quinasa.

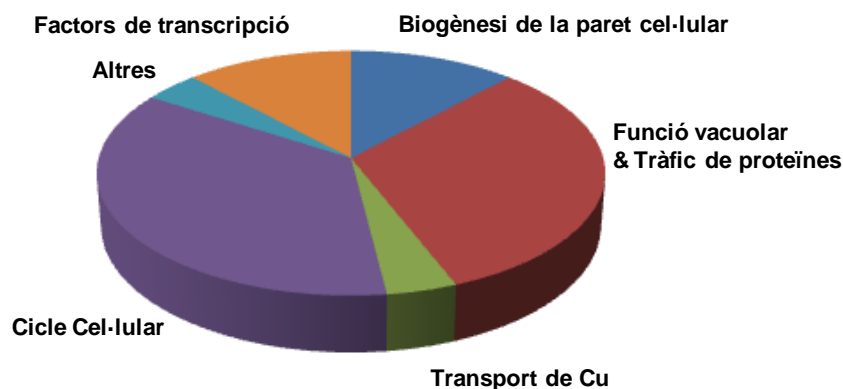


Figura 15. Categories funcionals dels supressors identificats. Distribució funcional mitjançant anàlisi de Gene Ontology dels 25 supressors obtinguts en les tres cerques. Aproximadament el 36% dels supressors estan relacionats amb la regulació del cicle cel·lular, el 32% amb la funció vacuolar i el tràfic de proteïnes, el 12% amb la biogènesi de la paret cel·lular, el 12% són factors de transcripció, el 4% estan involucrats amb el transport de coure i, finalment, el 4% restant s'ha classificat com a altres.

Dos dels 25 supressors trobats ens van cridar l'atenció: *CTR1* i *PPH22*. *CTR1* codifica un transportador de coure d'alta afinitat que va ser identificat prèviament pel nostre grup com un dels dos únics gens capaços d'incrementar la tolerància a pH alcalí en una soca salvatge (Serrano et al. 2004b). L'altre gen que es va identificar és *FET4*, que codifica una permeasa de ferro de baixa afinitat, capaç també de transportar altres ions metàl·lics com coure o zinc. Per aquest motiu, malgrat que *FET4* no es va aïllar en les nostres cerques, vam decidir incorporar-lo en posteriors anàlisis. Per altra banda, el gen *PPH22* codifica una subunitat catalítica de les fosfatases de tipus 2A. En el llevat *S. cerevisiae* aquesta fosfatasa és també codificada per un segon gen (*PPH21*) que presenta una elevada similitud amb *PPH22*. Es creu que les proteïnes Pph21 i Pph22 tenen funcions redundants. Així doncs, vam creure oportú afegir també el gen *PPH21* al nostre projecte.

1.2 Anàlisi dels diversos fenotips dels supressors identificats en el mutant *ptc1*

Amb l'objectiu de trobar gens capaços d'alleugerir diversos fenotips característics de cèl·lules que els manca la fosfatasa Ptc1, vam ampliar l'estudi fenotípic dels diferents gens en el mutant *ptc1*. En concret, es va analitzar el creixement en una font de carboni no fermentable com és l'etanol, a diferents pHs alcalins (des de 7.8 fins a 8.2), així com en un rang de concentracions de CFW, cafeïna, rapamicina, CaCl₂, LiCl, ZnCl₂, i en peròxid d'hidrogen. A més, també es va analitzar la capacitat de cada supressor per normalitzar la morfologia vacuolar. A fi de poder integrar tota la informació d'una forma quantitativa es van puntuar del 1 al 7 tots els supressor en cada una de les condicions, considerant com a 1 aquells comportaments equivalents als de la soca *ptc1Δ* amb un plasmidi buit, és a dir, sense cap efecte supressor, i atribuint el valor 6 als supressors capaços de restaurar el fenotip d'una soca

salvatge. La puntuació de 7 es va atribuir en els pocs casos en que els supressors incrementaven la tolerància respecte la soca salvatge. El conjunt de tota aquesta informació va permetre generar una matriu de dades que va ser posteriorment analitzada informàticament emprant algoritmes d'associació (clustering) amb els quals es va agrupar la informació tant per la similitud del comportament dels diversos gens com per les similituds de les condicions analitzades (Figura 16).

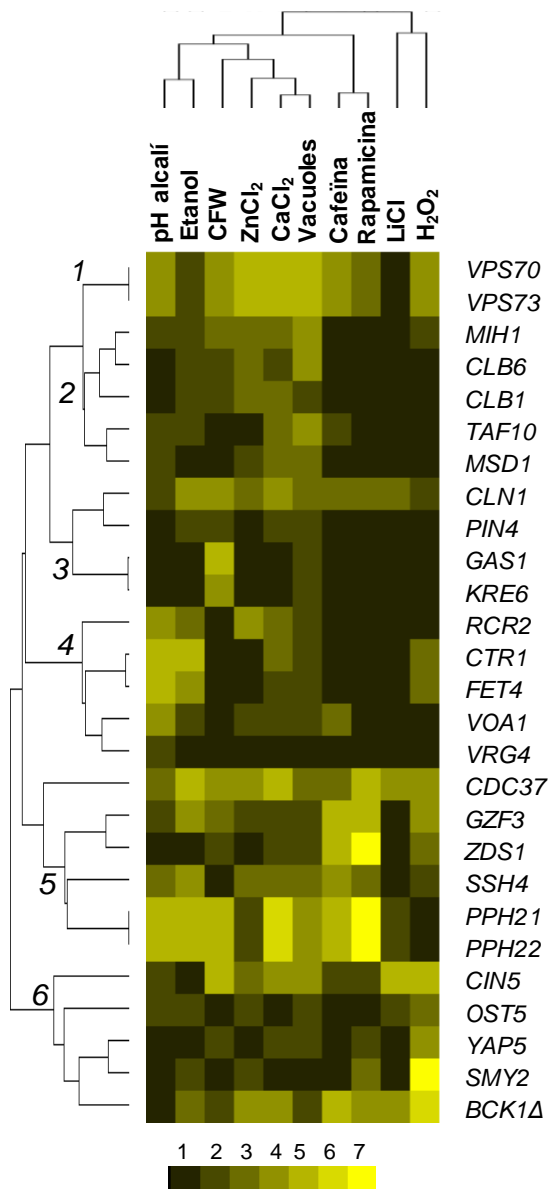


Figura 16. Matriu representativa del comportament dels supressors en un mutant *ptc1* en les diferents condicions analitzades. Les dades obtingudes es van analitzar amb el *software* Gene Cluster 2.11 emprant l'algoritme "similarity metrics, correlation centered; clustering method, average linkage". Aquests resultats es van representar mitjançant el programa Java TreeView (versió 11.6). Els números anotats a l'agrupament dels gens denoten els 6 principals clústers obtinguts. Els colors indiquen la intensitat de l'efecte supressor, segons el què es descriu al text.

A la Figura 16 s'observen 6 agrupacions diferents dels supressors en funció del comportament de cada un d'ells a cada condició. El clúster 1 està format per dos gens només, *VPS70* i *VPS73*, ambdós necessaris pel correcte funcionament del tràfic de proteïnes. Pel què fa

al clúster 2, quatre dels cinc membres estan implicats en la progressió del cicle cel·lular (*CLB1*, *CLB6*, *MIH1* i *TAF10*). El clúster 3 conté els gens *GAS1* i *KRE6* que codifiquen enzims que sintetitzen components de la paret cel·lular del llevat. Per altra banda cal destacar que, malgrat *FET4* no es va aïllar a les nostres cerques de supressors, apareix al clúster 4 juntament amb *CTR1*, mostrant ambdós gens comportaments molt similars. De la mateixa forma, els gens *PPH22* i *PPH21* s'aparellen integrant-se al clúster 5. És important puntualitzar que en aquest mateix grup s'hi troba el gen *ZDS1*, que codifica una proteïna la qual s'ha descrit que interacciona i regula algunes funcions específiques de les PP2As (Queralt & Uhlmann 2008; Wicky et al. 2011). Els tres gens presenten en comú una forta capacitat de millora del creixement del mutant *ptc1* enfront la rapamicina. Finalment, el clúster 6 inclou dos factors de transcripció relacionats, *CIN5/YAP4* i *YAP5*, que pertanyen a la família *yAP-1*. Aquests dos membres es troben induïts davant diferents estressos ambientals i, dels 8 components d'aquesta família que existeixen en el llevat (*YAP1-YAP8*), semblen formar un subgrup amb especificitat funcional que comparteix moltes dianes comunes (Rodrigues-Pousada et al. 2010).

1.3 Els efectes positius dels supressors *CTR1* i *CIN5* no semblen estar relacionats amb funcions específiques de *Ptc1*

Un cop analitzada la matriu de dades anterior, vam considerar la possibilitat que la millora dels creixements observats podria no ser específica del defecte del mutant *ptc1* i, per tant, podria ser que alguns d'aquests gens milloressin també el creixement d'una soca salvatge. Per explorar aquesta possibilitat es va transformar la soca BY4741 amb els 27 gens i els transformants obtinguts es van sotmetre als mateixos anàlisis fenotípics detallats anteriorment. En aquest cas, els gens es van puntuar del 0 al 5 per cada condició, atribuint el valor 1 a aquells comportaments equivalents als de la soca salvatge transformada amb el plasmidi buit. En les escasses situacions en les que els gens sobreexpressats empitjoraven el creixement de la soca salvatge es van puntuar amb el valor 0, mentre que quan la sobreexpressió del gen millorava el creixement obtenien una puntuació del 2 al 5 en funció de la potència de l'efecte causat a la soca salvatge.

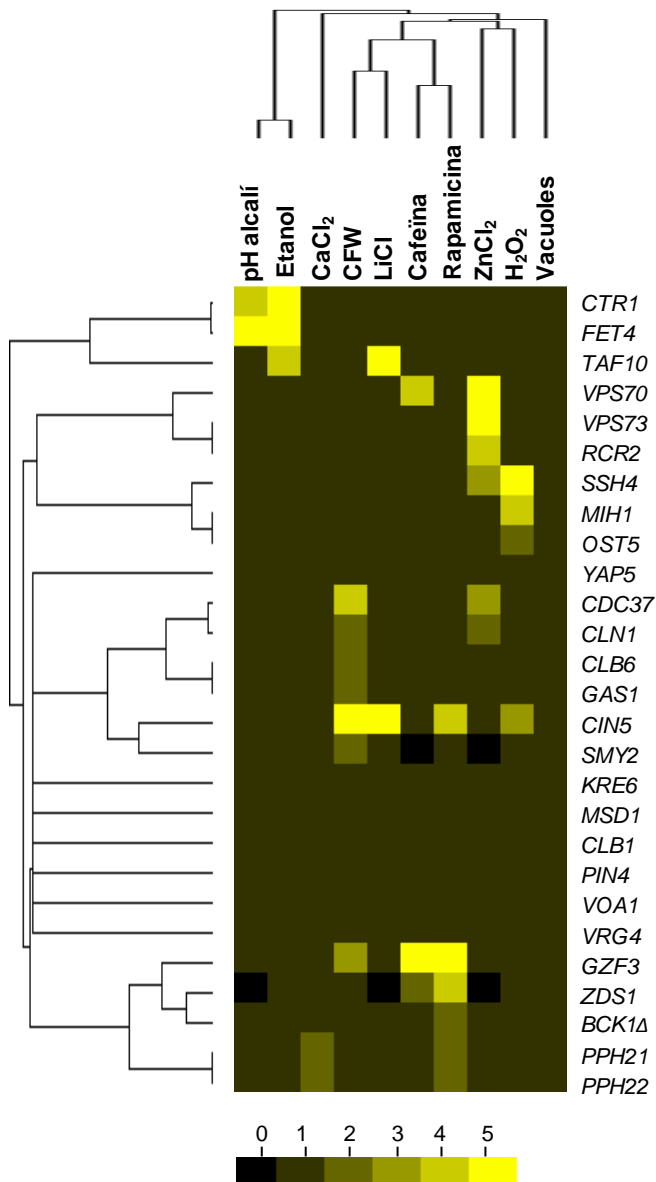


Figura 17. Matriu representativa del comportament dels supressors en una soca BY4741 en les diferents condicions estudiades. Les dades obtingudes es van analitzar amb el *software* Gene Cluster 2.11 emprant l'algoritme "similarity metrics, correlation centered; clustering method, average linkage". Aquests resultats es van representar mitjançant el programa Java TreeView (versió 11.6). Els colors indiquen la intensitat de l'efecte supressor, segons el què es descriu al text.

Tal i com s'observa a la Figura 17, la majoria de supressors no presenten cap efecte quan es sobreexpressen a la soca BY4741. Tot i així, l'expressió dels gens *CTR1* i *FET4* milloren considerablement el creixement de les cèl·lules salvatges en condicions d'estrès alcalí i quan l'única font de carboni és l'etanol. Aquests resultats eren d'esperar ja que el nostre grup havia descrit que ambdós gens eren els únics capaços de conferir tolerància a pH alcalí en una soca salvatge i, aquest fet s'havia relacionat amb els seus efectes beneficiosos en la captació de ferro, el qual es torna limitant sota condicions d'estrès alcalí (Serrano et al. 2004b). A l'article publicat per Serrano i col·laboradors es va demostrar que l'efecte beneficiós de la sobreexpressió de *CTR1* en una soca BY4741 desapareix quan es deleta el gen *FET3*, el qual codifica un component del sistema de transport d'alta afinitat de ferro. Si el principal efecte positiu de la sobreexpressió de *CTR1* en una soca salvatge i en un entorn alcalí es deu a un

RESULTATS I DISCUSSIÓ

increment en la captació de ferro, és d'esperar que la falta d'un dels elements del sistema de transport d'aquest metall produeixi que l'efecte es perdi. Per analitzar fins a quin punt la recuperació del mutant *ptc1* depenia d'aquesta mutació vam generar el doble mutant *fet3 ptc1*, el qual es va transformar amb els plasmidis multicòpia que porten els gens *CTR1* i *FET4* i es va analitzar la seva tolerància en condicions de pH alcalí.

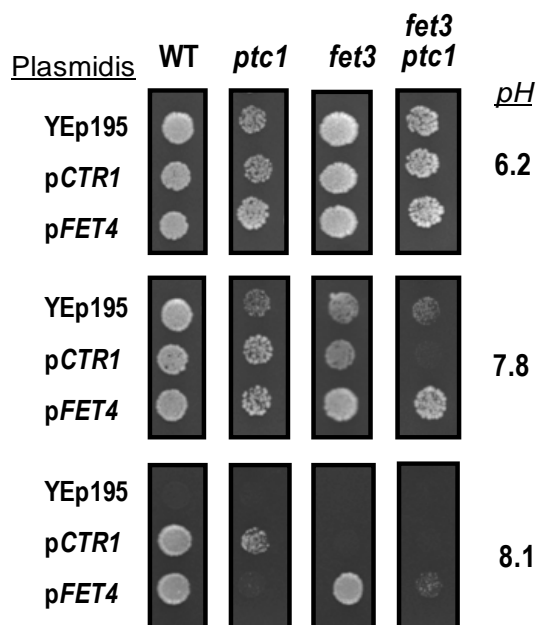


Figura 18. Anàlisi de l'especificitat de millora del creixement del mutant *ptc1* en condicions alcalines degut a la sobreexpressió dels supressors *CTR1* i *FET4*. La soca salvatge i els mutants *ptc1*, *fet3* i *fet3 ptc1* es van transformar amb el plasmidi buit YEplac195 així com amb els plasmidis que sobreexpressen *CTR1* i *FET4*. Els transformants es van plaquejar en plaques de YPD ajustades al pH indicat. Les fotografies es van realitzar després de 48 h.

A la Figura 18 s'observa que l'efecte beneficiós de la sobreexpressió de *CTR1* en un mutant *ptc1* es perd quan també s'elimina el gen *FET3*. Per contra, l'efecte de la sobreexpressió de *FET4*, el qual participa en la captació de coure, ferro i zinc, encara es detecta en el mutant *fet3*. Aquests fenotips són els mateixos que s'observen a la soca salvatge. Serrano i col·laboradors van demostrar que la tolerància a pH alcalí d'una soca BY4741 incrementava si el medi es complementava amb concentracions micromolars de ions coure o ferro. A fi de donar més validesa als resultats observats fins el moment es va analitzar l'efecte que tenia l'addició de ions coure o ferro en un mutant *ptc1* en condicions d'estrès alcalí.

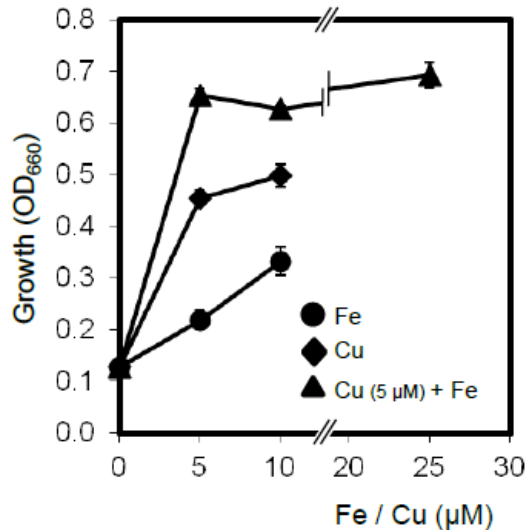


Figura 19. Efecte dels ions de coure i ferro en el creixement del mutant *ptc1* en condicions alcalines. El mutant *ptc1* es va inocular en YPD ajustat amb 50 mM TAPS a pH 7.6 en absència o presència de les concentracions indicades dels cations metàl·lics. El creixement es va quantificar determinant la A_{660} del cultiu després de 20h d'incubació a 28 °C.

A la Figura 19 s'observa que l'addició de ions de coure o ferro millora el creixement del mutant *ptc1* en presència d'estrès alcalí, sent més efectiu el coure que el ferro. A més, la complementació del medi amb una combinació d'ambdós metalls té un efecte additiu. Aquests resultats reproduïxen un cop més el comportament descrit en les cèl·lules salvatges (Serrano et al. 2004b). Tenint en compte el conjunt d'aquests resultats i que les potències dels supressors *CTR1* i *FET4* són relativament moderades i restringides al fenotip de pH alcalí (Figura 16), postulem que les millores observades no són específiques dels efectes de la mutació *ptc1*.

De forma similar, la sobreexpressió de *CIN5* en una soca salvatge provoca tolerància a LiCl, CFW, rapamicina i, en menor mesura, a peròxid d'hidrogen. L'efecte d'aquest gen en LiCl era d'esperar ja que el seu al·lel (*HAL6*) prové del seu descobriment com a gen capaç d'incrementar, quan es sobreexpressa, la tolerància a LiCl i NaCl (Mendizabal et al. 1998). Pel que fa a la tolerància a CFW, s'ha descrit que aquest gen està involucrat en la resposta transcripcional dels llevats quan es troben exposats al polímer de glucosamina quitosan i que el mutant *cin5* presenta sensibilitat a aquest compost (Zakrzewska et al. 2005). Donat que el quitosan provoca l'activació de la via de la integritat de la paret cel·lular (Zakrzewska et al. 2005) igual que el CFW, és d'esperar que la sobreexpressió d'aquest factor de transcripció confereixi avantatge en el creixement de les cèl·lules en presència d'agents que danyen la paret cel·lular. Finalment, és interessant la capacitat de *CIN5* per augmentar la tolerància de la soca salvatge a rapamicina (Figura 16). Malgrat que les raons d'aquest esdeveniment són poc

clares, podria estar relacionat amb el fet que l'exposició de les cèl·lules a rapamicina afecta la localització de *CIN5*, el qual es desplaça del nucli cap al citoplasma (Shin et al. 2009). En qualsevol cas, tots els resultats indiquen que els efectes de la sobreexpressió de *CIN5* probablement no són específics de la pèrdua de la funció de Ptc1.

1.4 Els efectes positius del supressor *VPS73* en un mutant *ptc1* podrien estar relacionats amb la seva possible activitat com a transportador

Vps73 és una proteïna de 486 residus de la qual se'n poden predir de 10 a 12 dominis transmembrana. Probablement es localitza als mitocondris i poc es coneix sobre la seva activitat bioquímica. Tot i així, els anàlisis de similitud revelen que Vps73 està relacionada amb transportadors de sucre de diversos organismes des de bacteris fins a humans (Figura 20 A i B).

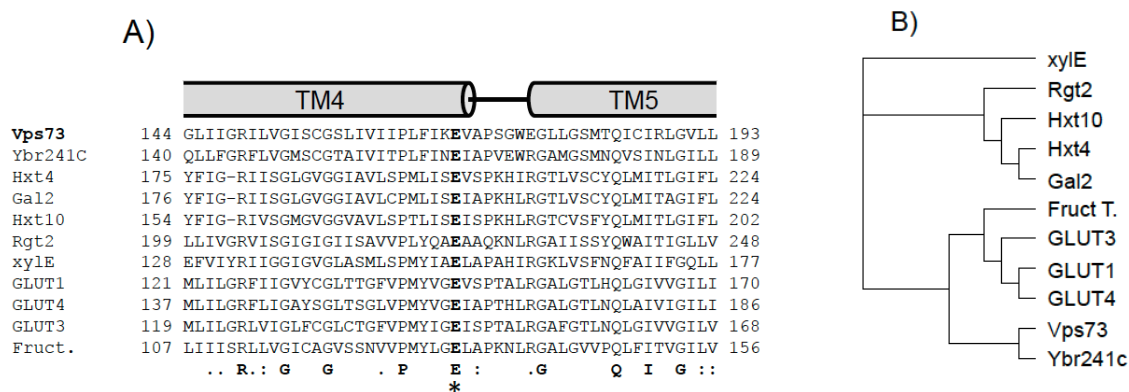


Figura 20. Anàlisi de similitud de *VPS73*. A) Alineament múltiple de les seqüències de les proteïnes relacionades amb Vps73 generat a partir del programa ClustalW2 emprant els paràmetres per defecte. Les seqüències analitzades són: Vps73, Ybr241c, Hxt4, Gal2 i Rgt2 de *S. cerevisiae*; GLUT1, GLUT3, GLUT4 i Fruct de *Homo sapiens*; i xylE de *E. coli*. A la figura es mostra la seqüència que envolta el residu conservat Glu169 de Vps73. B)Arbre filogenètic de les proteïnes relacionades amb Vps73 basat en l'alineament de l'apartat A. La representació gràfica es va dur a terme amb el software TreeView 1.6.6.

Tal i com s'observa a la Figura 20 A, en el llevat *S. cerevisiae*, a part del paràleg Ybr241c, la proteïna Vps73 té una seqüència similar a la diversos transportadors d'hexoses com Hxt4, Hxt2, Hxt10 o Gal2. La comparació de les diferents seqüències revela alguns residus altament conservats. En aquesta direcció, ens va cridar l'atenció el residu de glutàmic de la posició 169 de Vps73, localitzat en el *loop* intracel·lular curt situat entre els dominis transmembranals TM4 i TM5. A partir de l'estructura cristal·logràfica de l'homòleg bacterià xylE es va relacionar aquest glutàmic (E153) amb el manteniment de les interaccions entre les hèlixs- α intracel·lulars i els dominis TMs. Cal destacar que la substitució d'aquest residu per una alanina elimina completament l'activitat d'aquest transportador procarionota (Sun et al. 2012). Aquest fet és rellevant ja que mutacions en el corresponent Glu (Glu146) de la proteïna humana GLUT1 s'han identificat en pacients que presenten el síndrome de deficiència del

transportador de glucosa 1 (Wang et al. 2000). Degut al paper rellevant que presenta aquest residu en els diferents transportadors, vam decidir mutar el glutàmic equivalent de Vps73 (Glu169) a Ala i comparar la capacitat de les dues versions de la proteïna per alleugerir alguns defectes del mutant *ptc1*.

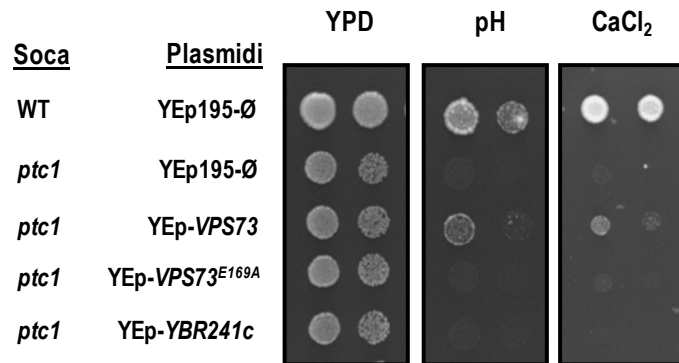


Figura 21. Efecte de la mutació del residu Glu169 de VPS73 i de la sobreexpressió del gen YBR241c en l'alleujament dels fenotips de sensibilitat a pH alcalí i a CaCl₂ en un mutant *ptc1*. Els plasmidis indicats es van fer servir per transformar cèl·lules *ptc1Δ*. Les colònies positives es van seleccionar en medi selectiu i es dipositar en plaques YPD complementades amb CaCl₂ o YPD amb 50 mM TAPS ajustades a diferents pHs. Les fotografies es van realitzar després de 48 h (CaCl₂) o 96 h (pH alcalí) d'incubació a 28 °C. A la figura es mostren els creixements de les plaques: pH 8.2 i CaCl₂ 100 mM.

Com s'observa a la Figura 21, la mutació del residu Glu169 de la proteïna Vps73 elimina completament l'efecte d'aquest supressor. Aquest resultat suggereix que VPS73 deu codificar un transportador funcional l'activitat del qual és beneficiosa en cèl·lules que els manca la fosfatasa Ptc1 en algunes situacions d'estrès com l'alcalinització del medi. Aquesta possibilitat és interessant ja que se sap que l'exposició a pH alcalí també promou una resposta transcripcional que mimetitza la resposta obtinguda en condicions de manca de glucosa i que la tolerància a pH alcalí augmenta si s'incrementa la glucosa del medi (Ruiz et al. 2008; Viladevall et al. 2004).

El gen *YBR241c* codifica una proteïna de 488 residus, lleugerament més gran que Vps73, per la qual s'han predit entre 10-11 dominis transmembrana. Considerant la similitud de la seqüència entre Vps73 i Ybr241c, també vam estudiar la possibilitat que *YBR241c* mimetitzés l'efecte de VPS73 en un mutant *ptc1*. Tal i com es mostra a la Figura 20, la sobreexpressió de *YBR241c* no és capaç de millorar el creixement de la soca *ptc1Δ* en condicions de pH alcalí ni quan el medi es complementa amb clorur de calci. Aquests resultats ens van sorprendre ja que els residus necessaris per la funció dels altres transportadors esmentats es troben conservats tant en Vps73 com en Ybr241c. Per altra banda, i a partir d'anàlisis dels patrons de co-expressió emprant el programa SPELL (Hibbs et al. 2007) es mostra que els gens que s'expressen en condicions similars a VPS73 estan involucrats

principalment amb el metabolisme de carbohidrats (p-value 5.27×10^{-10}). Per contra, el patró d'expressió de *YBR241c* és molt semblant al de gens implicats en les reaccions redox (p-value 8.83×10^{-08}). A més a més, emprant la base de dades d'interaccions genètiques de *S. cerevisiae* DRYGIN generada a partir de matrius de dobles mutants no hem trobat cap correlació entre les interaccions genètiques de *YBR241c* i *VPS73* amb altres gens (Koh et al. 2010). El conjunt d'aquesta informació ens permet hipotetitzar que, encara que *Vps73* i *Ybr241c* comparteixen alguns determinants estructurals, probablement existeixen diferències funcionals entre les dues proteïnes.

1.5 Els supressors de la cerca suggereixen una relació funcional entre *Ptc1*, la integritat de la paret cel·lular i la regulació del cicle cel·lular

Les cerques realitzades van proporcionar diversos gens supressors involucrats en la integritat de la paret cel·lular, com *GAS1*, que codifica la 1,3- β -glucanosiltransferasa necessària per la formació i el manteniment de la majoria dels polisacàrids de la paret cel·lular. També es va identificar *KRE6* que codifica una possible β -glucà sintasa involucrada en la biosíntesis dels β -1,6-glucans. El fet d'haver trobat *GAS1* com a supressor, principalment en condicions d'estrès per CFW, encaixa amb resultats d'altres grups on demostren que els mutants *gas1* i *ptc1* tenen interaccions genètiques negatives (Lesage et al. 2004; Tong et al. 2004). Per altra banda no hem trobat a la literatura interaccions entre *KRE6* i *PTC1*. A més a més, evidències recents indiquen que un altre supressor trobat a la nostra cerca, *PIN4* (conegut també com *MDT1*), que es va relacionar inicialment amb la resposta al dany al DNA, podria estar involucrat en la via de la integritat de la paret cel·lular. Per exemple, les cèl·lules *pin4* Δ són molt sensibles a CFW i cafeïna, i aquesta mutació presenta defectes sintètics severos quan es combina amb les mutacions dels gens *BCK1* i *SLT2* (Traven et al. 2010). És important destacar que en la nostra cerca també vam aïllar tres fragments que contenien diferents versions del gen *BCK1*, que codifica la MAPKKK que actua a la via CWI, tots ells amb truncaments substancials al domini C-terminal de la proteïna. Aquestes delecions afecten exclusivament el domini catalític de la quinasa, que es troba localitzat entre els residus 1175 i 1439, mentre que la capacitat reguladora no es veuria afectada (Figura 22).

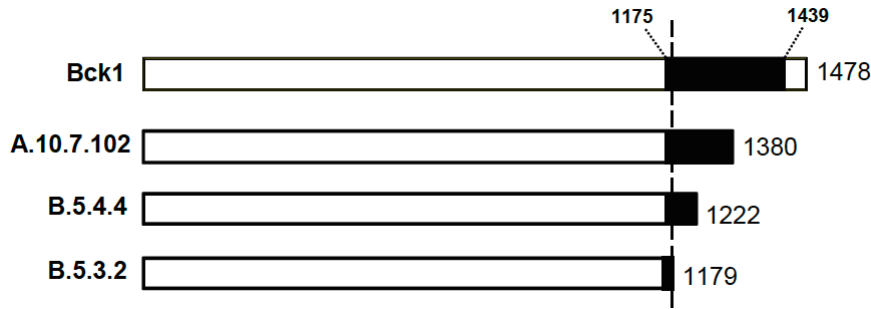


Figura 22. Esquema dels troncaments detectats al domini C-terminal dels supressors Bck1. La caixa negra simbolitza el domini quinasa de la proteïna Bck1 amb les posicions que el delimiten.

S’ha descrit que les cèl·lules que els manca la fosfatasa Ptc1 tenen quantitats més elevades de Slr2 activa (Du et al. 2006; González et al. 2006) i, a més a més, existeixen diverses evidències que recolzen que un mutant *ptc1* té la via CWI hiperactivada (veure (Arino et al. 2011) per una revisió). Com que es va proposar que Ptc1 pot interaccionar amb Bck1 a través de la proteïna adaptadora Nbp2 (Stanger et al. 2012), és probable que els supressors truncats identificats produeixin versions inactives de Bck1 que podrien estar actuant com a dominants negatius regulant negativament el mòdul Pkc1-Slr2.

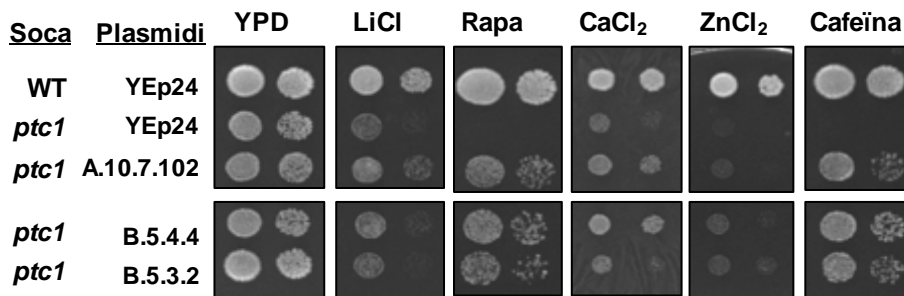


Figura 23. Fenotips de les diferents versions dels supressors BCK1. El mutant *ptc1* es va transformar amb els plasmidis portadors de cada una de les versions aïllades a la cerca de supressors. Les colònies positives es van fer créixer en medi selectiu i es van dipositar en una bateria de plaques de YPD complementades amb LiCl, rapamicina, CaCl₂, ZnCl₂ i cafeïna. Les fotografies es van realitzar després de 48 h d’incubació a 28 °C. A la figura es mostren els creixements de les plaques: LiCl 100 mM, rapamicina 2.5 ng/ml, CaCl₂ 150 mM de, 4 mM ZnCl₂ i cafeïna 5 mM.

Tal i com s’observa a la Figura 23 quan es sobreexpressen les tres versions truncades de *BCK1* en un mutant *ptc1* alleugeren un ampli ventall de condicions analitzades si es compara amb els fenotips de *GAS1* i *KRE6*, els quals només contraresten l’estrès de la paret cel·lular causat per CFW (Figura 16 i Figura 23). Aquest fet reforça la idea que les tres versions de *BCK1* aïllades podrien estar actuant com a dominants negatius de l’activitat del mòdul MAPK de la via CWI. Cal remarcar que els nostres resultats no descarten la possibilitat que Ptc1 pugui regular altres elements que es trobin *downstream* la MAPKKK Bck1.

A continuació, vam decidir analitzar els possibles efectes que tindrien les delecions dels gens *BCK1* i *SLT2* en cèl·lules que els manca Ptc1 (Figura 24).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

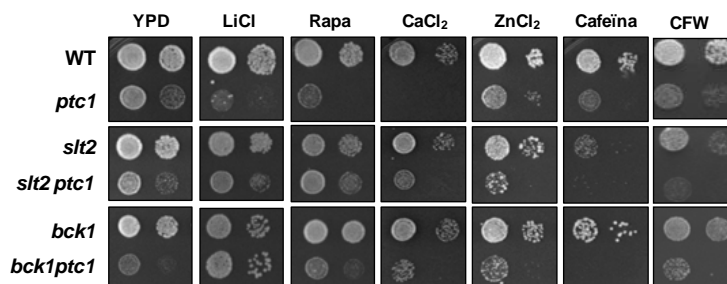


Figura 24. Efecte de la deleció dels gens *BCK1* i *SLT2* en un mutant *ptc1*. Les soques indicades es van seleccionar en medi selectiu i es van dipositar en plaques de YPD complementades amb LiCl 100 mM, rapamicina 5 ng/ml, CaCl₂ 200 mM, 2 mM ZnCl₂, cafeïna 5 mM i CFW 1 µg/ml. Les fotografies es van realitzar després d'incubar les plaques durant 48 h a 28 °C.

Figura 24. Efecte de la deleció dels gens *BCK1* i *SLT2* en un mutant *ptc1*. Les soques indicades es van seleccionar en medi selectiu i es van dipositar en plaques de YPD complementades amb LiCl 100 mM, rapamicina 5 ng/ml, CaCl₂ 200 mM, 2 mM ZnCl₂, cafeïna 5 mM i CFW 1 µg/ml. Les fotografies es van realitzar després d'incubar les plaques durant 48 h a 28 °C.

Els creixements en medi sòlid dels dobles mutants *bck1 ptc1* i *slt2 ptc1* mostren que la deleció d'aquestes quinases en un mutant *ptc1* agreugen els fenotips relacionats amb l'estrès a la paret cel·lular. Aquests resultats són d'esperar, ja que tant Bck1 com Slt2 són necessaris en qualsevol cas enfront compostos que generen un dany a la paret cel·lular i pels que es necessita una via CWI funcional. En canvi, les mutacions de *BCK1* o *SLT2* milloren el creixement de les cèl·lules que els manca *PTC1* en presència d'altres estressos com, per exemple, en presència de LiCl, CaCl₂ o rapamicina (Figura 24). Això suggereix que els efectes negatius observats en cèl·lules *ptc1Δ* en aquestes circumstàncies (que no requereixen la integritat de la via MAP quinasa) poden ser deguts a la hiperactivació de Slt2. Aquest fet es veu reforçat pels resultats de la sobreexpressió de les versions truncades de Bck1 les quals milloren el creixement d'una soca *ptc1Δ* enfront agents que activen la via CWI (Figura 16). Com que els tres al·lels de Bck1 no tindrien activitat quinasa però si els determinants estructurals que permeten la unió a altres components de la via, esperaríem que la seva sobreexpressió reduís la transducció del senyal del mòdul MAPK de la via CWI, tot interferint amb la Bck1 endògena. Per tant, la hiperactivació del mòdul Pkc1-Slt2 podria ser una de les bases moleculars de diversos defectes observats en cèl·lules que els manca la fosfatasa Ptc1.

A diferència de les isoformes Ptc2 i Ptc3, considerades les principals fosfatases implicades en la desfosforilació de la proteïna quinasa dependent de ciclins Cdc28 en el llevat (Cheng et al. 1999), no s'ha relacionat la fosfatasa Ptc1 amb la desfosforilació de components implicats en la maquinària del cicle cel·lular. Tot i així, hem aïllat nombrosos gens relacionats amb el control de la progressió del cicle cel·lular, com són: *CLN1*, *CLB1*, *CLB6*, *MIH1*, *CDC37*, *ZDS1* i *PPH22*. *CLN1* codifica una ciclina de la fase G1, mentre que, *CLB6* codifica una ciclina de tipus B necessària al final de la fase G1 per promoure l'inici de la síntesis de DNA. Per altra

banda, *CLB1* (i *CLB2*) s'associen a la quinasa Cdc28 per promoure la transició de la fase G2 a la M del cicle cel·lular. La progressió de la fase M està controlada per l'estat de fosforilació del complex ciclina-Cdc28. Mentre que Swe1 fosforila i inactiva aquest complex, l'acció de Mih1, la fosfatasa de Cdc28 en llevat, reverteix aquesta fosforilació promovent la progressió del cicle cel·lular (veure Figura 25).

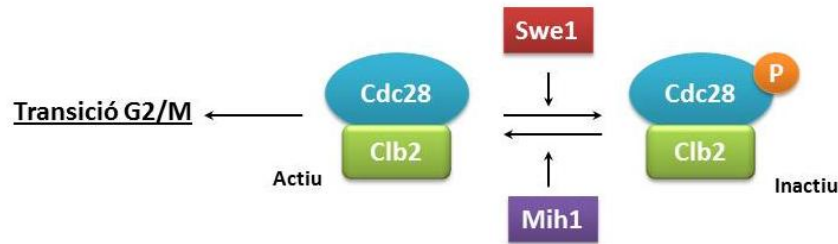


Figura 25. Regulació de la fosforilació del complex Cdc28-Clb2 que afecten l'entrada a Mitosis de la cèl·lula. El complex Cdc28-Clb2 es veu inactivat per la fosforilació de Cdc28 degut a l'acció de la quinasa Swe1 impedit que el cicle cel·lular progressi. Per contra, la desfosforilació de Cdc28 depèn de la fosfatasa Mih1 la qual permet la transició de la fase G2 al inici de la mitosis. Figura adaptada de (Sia et al. 1996).

És interessant destacar que l'activació de la via de Slt2 degut a alguns estressos provoca un bloqueig del cicle cel·lular a la transició G2/M. En alguns casos, s'ha explicat per un efecte en l'activació de Swe1 (Mizunuma et al. 1998; Zhang & Rao 2008), mentre que en altres ocasions s'ha proposat la inactivació de la fosfatasa Mih1 com a diana de l'activació de Slt2 (Harrison et al. 2001; Martinez-Anaya et al. 2003). Tenint present aquest fet, és lògic pensar que haver identificat *MIH1* com a supressor tant de la cerca en CFW com en pH alcalí podria estar relacionat amb superar la possible inhibició de Cdc28 dependent de Slt2. Per aquest motiu vam considerar la possibilitat que alguns defectes del mutant *ptc1* depenguessin en part d'una alteració en l'etapa de transició G2/M degut a la hiperactivació del mòdul Pkc1-Slt2 existent en cèl·lules *ptc1Δ*. Així doncs, vam analitzar l'efecte de la mutació del regulador positiu Mih1 a la soca *ptc1Δ*.

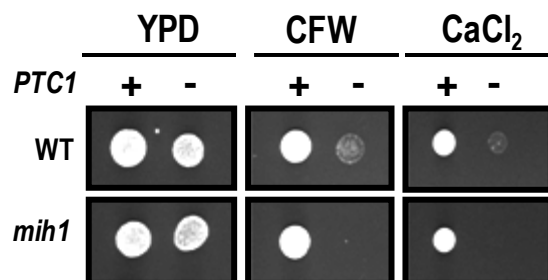


Figura 26. Efecte de la deleció de *MIH1* en un mutant *ptc1*. Les soques indicades es van fer créixer en medi selectiu i es van dipositar en plaques de YPD complementades amb CFW 5 µg/ml i CaCl₂ 100 mM. Les fotografies es van realitzar després de 48 h d'incubació a 28 °C.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

A la Figura 26 es mostra que la deleció de la fosfatasa *MIH1* en un mutant *ptc1* empitjora el creixement d'aquesta soca enfront els compostos CFW i CaCl_2 , dues condicions on la sobreexpressió de *MIH1* millora el creixement de les cèl·lules *ptc1Δ*.

A continuació, vam investigar l'efecte de la mutació del regulador negatiu Swe1 en una soca *ptc1Δ* en diversos fenotips on el mutant *ptc1* presenta sensibilitat (Figura 26).

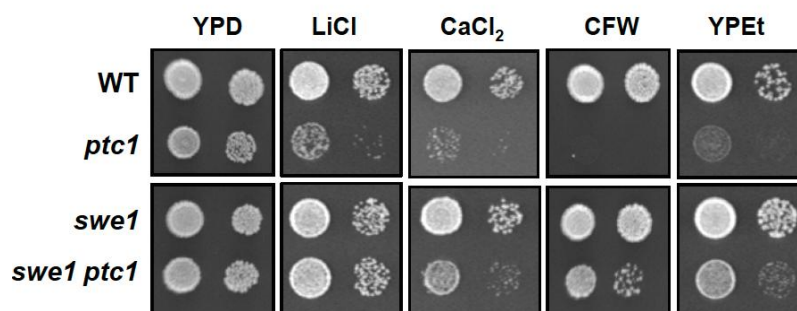


Figura 27. Efecte de la deleció de *SWE1* en un mutant *ptc1*. Les soques indicades es van fer créixer en medi selectiu i es van dipositar en plaques de YPD complementades amb LiCl 75 mM, CaCl_2 150 mM, CFW 2.5 $\mu\text{g/ml}$ i en YP etanol. Les fotografies es van realitzar després de 72 h d'incubació a 28 °C.

Tal i com s'observa a la Figura 27, la deleció de *SWE1* en cèl·lules que els manca la fosfatasa Ptc1 millora clarament la tolerància a ions de liti i calci, a CFW i el creixement quan l'única font de carboni és l'etanol. La millora a pH alcalí, a ZnCl_2 i a cafeïna va ser, però, bastant limitada (veure apartat 2.1 de Resultats i discussió).

Un altre gen necessari per la progressió del cicle cel·lular és *CDC37* que codifica una co-xaperona essencial de Hsp90 (MacLean & Picard 2003). Moltes proteïnes quinases són dianes de Cdc37 i, s'ha demostrat que al voltant del 75% del quinoma es troba afectat quan disminueix la funció de Cdc37 (Mandal et al. 2007), entre elles la quinasa Cdc28. Es va proposar que Cdc37 és necessària per l'associació de Cdc28 amb les ciclins que regulen la fase G1 i la mitosis (Gerber et al. 1995) i això promouria l'estabilització de la proteïna Cdc28 (Farrell & Morgan 2000). La proteïna Cdc37 pot ser fosforilada al residu Ser14 per la caseïna quinasa II (Bandhakavi et al. 2003; Miyata & Nishida 2004). A més, cal destacar que el mutant *cdc37*^{S14A} presenta un fenotip molt sever probablement com a resultat de la reducció de l'activitat de Cdc28, ja que les cèl·lules *cdc37*^{S14A} són rescatades tant si es sobreexpressa *CDC28* com si perden la tirosina quinasa Swe1 (Bandhakavi et al. 2003). Per aquest motiu, vam considerar interessant analitzar si la mutació del residu Ser14 alteraria la millora dels creixements del mutant *ptc1* degut a la sobreexpressió de *CDC37* (Figura 28).

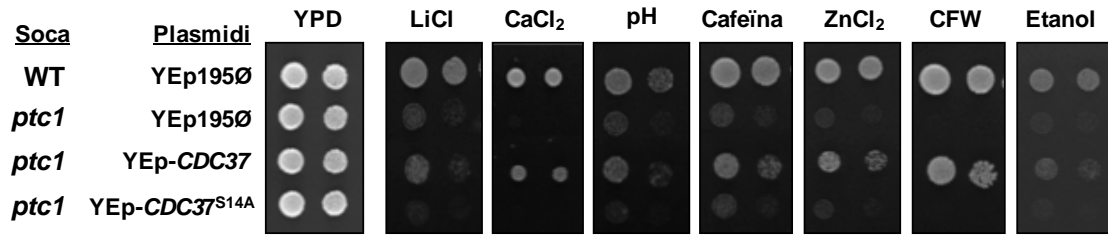


Figura 28. Efecte de la mutació del residu Ser14 de Cdc37 en un mutant *ptc1*. El mutant *ptc1* es va transformar amb els plasmidis indicats. Les colònies positives es van fer créixer en medi selectiu i es van dipositar en plaques YPD complementades amb LiCl, CaCl₂, cafeïna, ZnCl₂ i CFW. També es va analitzar el creixement en plaques YP amb 2% d'etanol i en plaques YPD amb 50 mM de TAPS ajustades a diferents pHs. Les fotografies es van realitzar després de 48 h d'incubació de les plaques a 28 °C. Les plaques que es mostren corresponen a: LiCl 125 mM, CaCl₂ 100 mM, pH 8.0, cafeïna 5 mM, 2 mM ZnCl₂ i CFW 2,5 µg/ml.

Els creixements en medi sòlid van mostrar que, així com la sobreexpressió de *CDC37* contraresta la sensibilitat del mutant *ptc1* a diverses condicions d'estrès, quan el residu Ser14 de Cdc37 es canvia a Ala l'efecte beneficiós es perd. Aquest resultat, juntament amb l'efecte positiu que provoca mutar *SWE1* en una soca *ptc1Δ* i l'efecte negatiu de la mutació *MIH1* en absència de Ptc1, suggereix que l'activitat de Cdc28 podria ser limitant en cèl·lules deficientes en Ptc1.

Per altra banda, està descrit que Mih1 es troba hiperfosforilat durant l'anafase i es va desfosforilant durant l'entrada a mitosis gràcies al complex PP2A^{Cdc55} (Pal et al. 2008). També s'ha demostrat que el complex PP2A^{Cdc55} està regulat per un parell de proteïnes redundants conegudes com Zds1 i Zds2, les quals s'associen amb PP2A^{Cdc55} i l'uneixen amb Mih1 (Queralt & Uhlmann 2008; Wicky et al. 2011; Yasutis et al. 2010). Cal destacar que a les nostres cerques es va aïllar no només una de les subunitats catalítiques de les PP2A (*PPH22*), sinó també *ZDS1* com a supressors d'alguns defectes de *ptc1*. Mentre que l'activitat de les PP2A s'ha relacionat també amb la regulació d'altres fases del cicle cel·lular, *ZDS1* només es troba involucrat en la mitosis (Baro et al. 2013; Queralt & Uhlmann 2008; Rossio & Yoshida 2011). El conjunt de resultats obtinguts a partir de les cerques mostren que tant els supressors *PPH22* i *ZDS1* com la segona isoforma de les PP2A (*PPH21*) són capaços d'alleugerir nombrosos defectes del mutant *ptc1* quan es sobreexpressen en aquesta soca (Figura 16). Aquest fet, juntament amb el coneixement bibliogràfic del qual disposem, indica que la fase del cicle cel·lular que estaria alterada en absència de la fosfatasa Ptc1 seria la transició de G2/M.

Finalment, en un article recent es proposa un model en el qual la proteïna quinasa Rim15 contribuiria a l'activació de PP2A^{Cdc55} a través de la fosforilació de les endosulfines de llevat Igo1 i Igo2 (Juanes et al. 2013). D'acord amb aquesta idea, vam estudiar l'efecte que tenia la deleció del gen *RIM15* en un mutant *ptc1*. Tal i com s'observa a la Figura 29, la

supressió del gen *RIM15* en cèl·lules *ptc1Δ* agreuja la majoria dels fenotips de sensibilitat d'aquesta soca com són al clorur de zinc, CFW, cafeïna i etanol, fet que recolza el model proposat.

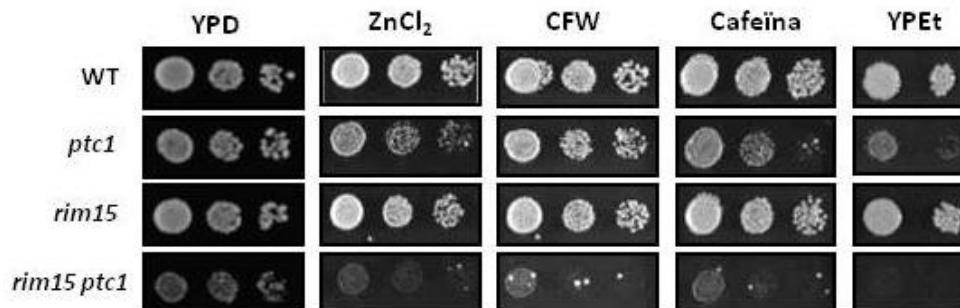


Figura 29. Efecte de la mutació *RIM15* en un mutant *ptc1*. Les soques indicades es van dipositar en plaques YPD complementades amb $ZnCl_2$, cafeïna, i CFW. A més, també es va analitzar el creixement en plaques YP amb 2% d'etanol. Les fotografies es van realitzar després de 72 h d'incubació de les plaques a 28 °C. Les plaques que es mostren tenen les següents concentracions del compost: 2 mM $ZnCl_2$, CFW 1 µg/ml i cafeïna 5 mM.

Així doncs, la supressió d'elements que promouen directa o indirectament la desfosforilació de Cdc28 (Rim15 i Mih1) en una soca *ptc1Δ* empitjoren el creixement d'aquest mutant en diferents condicions d'estrès mentre que la mutació de Swe1, que promou la parada del cicle cel·lular a la fase G2 a través de la fosforilació de Cdc28, en un mutant *ptc1* millora el creixement d'aquesta soca enfront un ampli ventall de compostos o estressos. El conjunt de la informació és coherent amb el model de regulació d'entrada a mitosis de Juanes i col·laboradors (Juanes et al. 2013) indicant que l'activitat de Cdc28 seria limitant en el mutant *ptc1*.

1.6 La sobreexpressió de les PP2Ac suprimeix el fenotip de sensibilitat a rapamicina augmentant el nivell del complex PP2Ac-Tap42 el qual es troba reduït en un mutant *ptc1*.

De tots els supressors que es van obtenir a partir de les tres cerques, els que han demostrat alleugerir amb més potència la majoria de defectes del mutant *ptc1* són els gens *PPH21* i *PPH22*. Per aquest motiu, vam decidir indagar més profundament en els possibles mecanismes funcionals de les PP2Ac en un mutant *ptc1*.

Les subunitats catalítiques de la fosfatasa de tipus 2A (Pph21 i Pph22) es troben implicades en la regulació de varies funcions. Com ja s'ha comentat anteriorment, les PP2A regulen el cicle cel·lular promovent la transició G2/M. A més, també regulen la formació de l'anell de septines i desencadenen diverses respostes adaptatives associades a la via TOR, la

qual senyalitza la manca de nutrients, quan el complex TORC1 es veu inhibit per la falta de nitrogen, fonts de nitrogen no preferents o pel tractament de les cèl·lules amb rapamicina. En condicions basals les PP2Ac i la proteïna Sit4, una fosfatasa similar a les PP2A, formen dos complexos independents amb la proteïna Tap42 els quals es troben segregats a les membranes de la vacuola i dels endosomes juntament amb les proteïnes quinases Tor1 i Tor2. Aquest fet induïx la inactivació de les fosfatases. En presència de rapamicina o quan les fonts de nitrogen no són les preferides per les cèl·lules, les quinases Tor1 i Tor2 són inhibides i permeten l'alliberació dels complexos PP2Ac-Tap42 i Sit4-Tap42 al citosol. Des de l'alliberació fins a la completa dissociació de les fosfatases de la proteïna Tap42 és quan aquests complexos són funcionalment actius.

Tal i com es mostra a la Figura 16, la sobreexpressió de les PP2Ac normalitza el creixement del mutant *ptc1* en presència de rapamicina. Degut que existeixen altres fosfatases que actuen regulant la resposta adaptativa quan la via TOR és inhibida, vam creure convenient investigar si l'efecte positiu observat de la sobreexpressió de *PPH21* i *PPH22* era específic de les PP2Ac o era un efecte general de les fosfatases implicades en la via TOR. Per aquest motiu vam sobreexpressar les fosfatases *PPH21*, *PPH22*, *SIT4* i *PPH3* en cèl·lules *ptc1Δ* i vam analitzar el seu creixement en presència de rapamicina. A la Figura 30 A es mostra que tant la sobreexpressió de *PPH21* com la de *PPH22* suprimeix el fenotip de sensibilitat de la soca *ptc1Δ*, mentre que, no s'observa cap efecte positiu quan es sobreexpressen les altres dues fosfatases implicades en la transmissió de la senyal del complex TORC1. Aquests resultats indiquen que els efectes són específics de *PPH21* i *PPH22* i no és un efecte general de totes les fosfatases involucrades en aquesta via de senyalització.

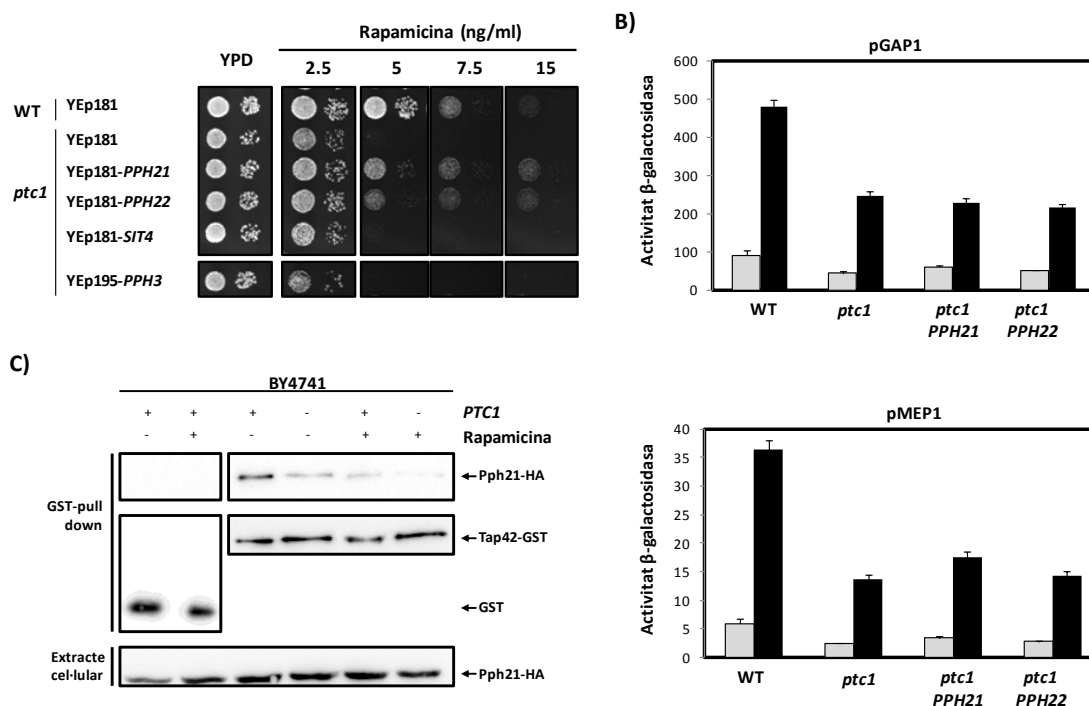


Figura 30. Relació entre la sobreexpressió de les PP2Ac en un mutant *ptc1* i els defectes fenotípics relacionats amb la via TOR. A) La millora del fenotip de sensibilitat a rapamicina de la soca *ptc1* Δ és específic de les PP2Ac i no de les fosfatases similars a les PP2A. El mutant *ptc1* es va transformar amb diversos plasmidis que expressen les PP2Ac i les PP2A-like. Les colònies positives es van fer créixer en medi selectiu i es van diluir a una OD₆₆₀ 0.05. Els cultius es van dipositar en plaques YPD complementades amb rapamicina. Les fotografies es van realitzar després de 72 h d'incubació a 28 °C. B) La sobreexpressió de les PP2Ac no és capaç de normalitzar l'activitat dels promotors activats per la repressió de nitrogen. Les soques indicades es van transformar amb els plasmidis pGAP1 i pMEP1. Les colònies positives es van fer créixer i es van tractar amb una solució control (barres clares) o amb 200 ng/ml de rapamicina (barres fosques) durant 60 min (pGAP1) o 90 min (pMEP1). Tot seguit, es va mesurar l'activitat β -galactosidasa dels promotors. Els resultats són la mitjana \pm SEM de 7 experiments. C) El complex Tap42-Pph21 es troba disminuït en un mutant *ptc1*. Les soques indicades es van co-transformar amb els plasmidis pEJ27 (Tap42-GST) i pRS415-PPH21 (Pph21-HA). Les colònies positives es van fer créixer en medi selectiu i es van tractar amb solució control (- rapamicina) o amb 200 ng/ml de rapamicina (+ rapamicina). La proteïna Tap42-GST es va purificar per afinitat amb glutatió-sepharosa. Les proteïnes recuperades es van analitzar per *western blot*. Els dos carrils de l'esquerra tenen GST en comptes de Tap42-GST i serveixen de control negatiu ja que no hauria de co-purificar cap proteïna unida a GST.

Es coneix que en un mutant *ptc1* l'activitat dels promotors de dos gens que pertanyen a la família NCR (*MEP1* i *GAP1* que codifiquen permeases d'amoni o d'aminoàcids, respectivament) disminueix en comparació amb la d'una soca salvatge (Gonzalez et al. 2009). Per obtenir més informació del paper de les PP2Ac en la millora del creixement de la soca *ptc1* Δ en presència de rapamicina vam decidir analitzar l'activitat d'aquests promotors. Per dur-ho a terme es va transformar el mutant *ptc1* i la soca salvatge amb els plasmidis que porten els promotors dels gens reporters *GAP1* (pGAP1) i *MEP1* (pMEP1) fusionats amb el gen *lacZ*. A la Figura 30 B es mostra que la sobreexpressió de *PPH21* i *PPH22* no varia l'activitat dels promotors dels gens NCR característica de la soca *ptc1* Δ , indicant que l'efecte positiu dels

supressors *PPH21* i *PPH22* en la normalització del creixement del mutant *ptc1* en presència de rapamicina no està relacionat amb una millora de l'activitat dels promotors regulats per NCR. L'activació de l'expressió dels gens NCR depèn de la migració al nucli del factor de transcripció Gln3 un cop aquest es troba desfosforilat. S'ha descrit que els complexos Sit4-Tap42 (Georis et al. 2008), Pph21/22-Tpd3-Cdc55 i Pph21/22-Tpd3-Rts1 (Tate et al. 2009; Tate et al. 2010) són els principals reguladors de la desfosforilació de Gln3 i que la implicació de cada un d'ells en aquest procés depèn de la font i/o de la quantitat de nitrogen al medi i de la presència de rapamicina. En el cas analitzat, només s'han tractat les cèl·lules amb rapamicina i no s'ha alterat la font de nitrogen present en l'entorn. En aquestes condicions, s'ha demostrat que el complex encarregat de desfosforilar Gln3 és Sit4-Tap42, però aquest és insuficient per aconseguir que el factor de transcripció desfosforilat entri al nucli. Resultats publicats pel nostre grup mostren que la deleció de *SIT4* millora tant el creixement del mutant *ptc1* en presència de rapamicina com l'activitat dels promotors dels gens regulats per NCR (Gonzalez et al. 2009) suggerint que el complex Sit4-Tap42 no és l'únic implicat en l'activació dels gens regulats per NCR. És important destacar que els comportaments de les fosfatases PP2A i Sit4 en un mutant *ptc1* enfront rapamicina són diferents. Mentre que les PP2A provoquen un efecte positiu en cèl·lules *ptc1Δ*, la proteïna Sit4 repercuteix negativament. Per aquest motiu proposem que les fosfatases PP2A i Sit4 tindrien rols oposats en la resposta adaptativa del mutant *ptc1* en presència de rapamicina.

Com que, un cop inhibida la via TOR, la resposta adaptativa està regulada pels complexos PP2A-Tap42 i Sit4-Tap42, i la sobreexpressió de les PP2Ac però no la de *SIT4* restaura el creixement del mutant *ptc1* enfront la rapamicina, vam analitzar l'estat del complex PP2Ac-Tap42 en cèl·lules *ptc1Δ*. Així doncs vam investigar la interacció d'ambdues proteïnes tant en condicions basals com en presència de rapamicina. La soca salvatge i el mutant *ptc1* es van co-transformar amb els plasmidis pRS415-*PPH21*-HA i pEJ27-*TAP42*-GST. Els cultius es van fer créixer i es van tractar amb una solució control o amb 200 ng/ml de rapamicina durant 1h. Els extractes proteics es van incubar amb la resina de glutatió-sepharose per purificar la proteïna Tap42 fusionada a GST i les proteïnes unides a ella. En les nostres condicions experimentals vam poder confirmar que a la soca salvatge les proteïnes Tap42 i Pph21 interaccionen formant el complex Pph21-Tap42 el qual es dissocia en presència de rapamicina (Figura 30 C) (Di Como & Arndt 1996). Per contra, en el mutant *ptc1* es veu que en condicions basals hi ha menys interacció entre ambdues proteïnes. Com que la quantitat de Tap42 sembla força constant, cal deduir que a la soca *ptc1* hi ha menys formació del complex Tap42-Pph21. El tractament amb rapamicina encara disminueix més l'associació Tap42-Pph21. La disminució

RESULTATS I DISCUSSIÓ

del complex Tap42-Pph21 provocaria un problema en la senyalització de les cèl·lules que els falta la fosfatasa Ptc1 que podria justificar el fenotip de sensibilitat a aquest compost. Amb l'objectiu d'avaluar si l'efecte de la sobreexpressió de les PP2Ac en el mutant *ptc1* i en presència de rapamicina està relacionat amb una millora dels nivells del complex Tap42-Pph21, vam comparar la interacció entre Tap42 i Pph21 a les soques salvatge i *ptc1Δ* expressant Pph21 tant amb un plasmidi centromèric com episomal.

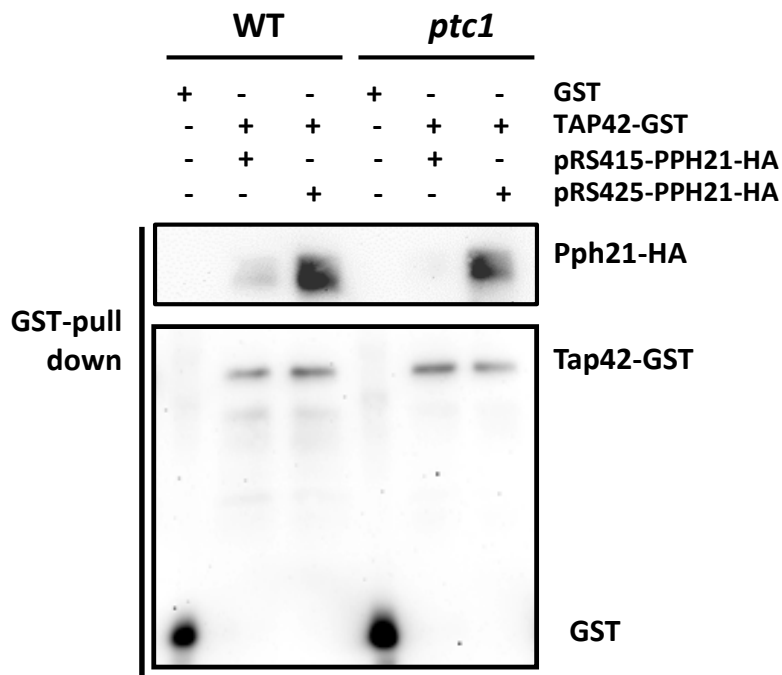


Figura 31. La sobreexpressió de PPH21 en un mutant *ptc1* augmenta els nivells del complex Tap42-Pph21. Les soques indicades es van co-transformar amb els plasmidis pEJ27 (Tap42-GST) i pRS415-PPH21 (centromèric) o pRS425-PPH21-HA (episomal). Les colònies positives es van fer créixer en medi selectiu. La proteïna Tap42-GST es va purificar per afinitat amb glutatió-sepharosa. Les proteïnes recuperades es van analitzar per *western blot* com a la Figura 30 C.

A la Figura 31 es mostra que la sobreexpressió de PPH21 augmenta la interacció entre les proteïnes Tap42 i Pph21 tant en una soca salvatge com en el mutant *ptc1*. Aquests resultats concorden amb els obtinguts en la cerca de supressors ja que la sobreexpressió de les PP2Ac milloren el creixement a rapamicina tant de la soca *ptc1Δ* (Figura 16) com de la soca salvatge (Figura 17). El conjunt dels resultats reforça la idea que la restauració del creixement de les cèl·lules *ptc1Δ* en presència de rapamicina degut a la sobreexpressió de les PP2A podria ser una conseqüència de l'augment de la interacció entre les proteïnes Tap42 i Pph21.

1.7 La supressió del fenotip de sensibilitat a CaCl₂ del mutant *ptc1* degut a la sobreexpressió de les PP2Ac podria estar relacionat amb una millora de l'estat vacuolar.

La sobreexpressió de *PPH21* i *PPH22* també millora el creixement de les cèl·lules que els manca la fosfatasa Ptc1 en altres condicions, com ara en presència del catió calci (Figura 32 A).

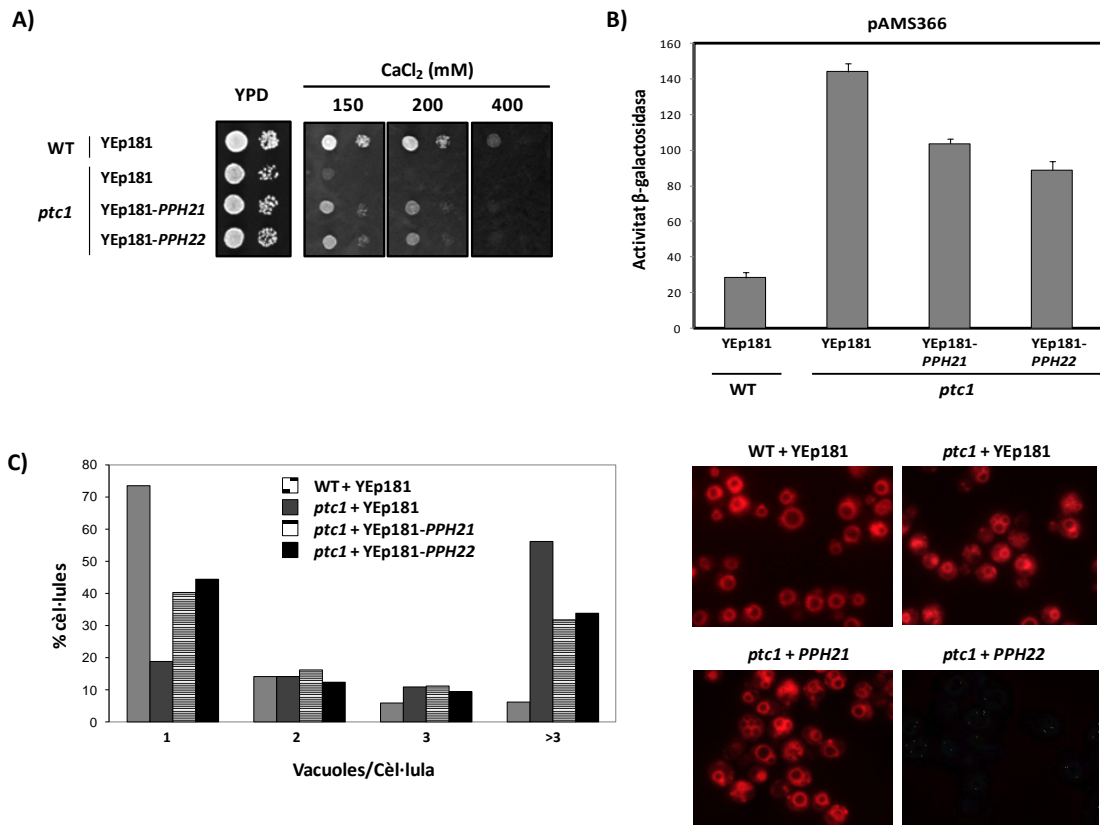


Figura 32. Efecte de la sobreexpressió de les PP2Ac en la millora dels defectes del mutant *ptc1* associats a l'estrès per CaCl₂. A) Sobreexpressar les PP2Ac a la soca *ptc1Δ* millora el creixement en presència de CaCl₂. El mutant *ptc1* es va transformar amb els plasmidis que contenen cada una de les subunitats catalítiques de les PP2A. Les colònies positives es van fer créixer en medi selectiu i es van diluir a una OD₆₆₀ 0.05. Els cultius es van dipositar en plaques YPD complementades amb CaCl₂. Les fotografies es van realitzar després de 72 h d'incubació a 28 °C. B) La sobreexpressió de les PP2Ac disminueix l'activació del promotor de *FKS2* induït per calcineurina. Les soques indicades es van transformar amb el plasmidi pAMS366 que conté 4 còpies de les seqüències CDRE del promotor de *FKS2* i, tot seguit, es va mesurar l'activitat β-galactosidasa. Els resultats són la mitjana ± SEM de 12 experiments. C) La sobreexpressió de les PP2Ac en un mutant *ptc1* disminueix la fragmentació vacuolar. La soca *ptc1Δ* es va transformar amb els plasmidis que contenen els gens de les PP2Ac. Les colònies positives es van fer créixer en medi sintètic i, tot seguit, es va procedir a analitzar l'estat vacuolar de les cèl·lules. Es van analitzar un mínim de 320 cèl·lules per cada cultiu.

S'ha descrit que el mutant *ptc1* presenta una hiperactivació de la calcineurina en condicions basals (González et al. 2006). Amb l'objectiu d'investigar si l'efecte de la sobreexpressió de les PP2Ac en una soca *ptc1Δ* enfront un estrès per CaCl₂ està relacionat amb

l'alteració de l'activitat de la calcineurina, vam analitzar el comportament d'un promotor sintètic que conté quatre còpies de la seqüència CDRE del promotor del gen *FKS2* fusionades al gen *lacZ* (pAMS366) en un mutant *ptc1* quan se li sobreexpressa els gens *PPH21* i *PPH22*. Com s'observa a la Figura 32 B, malgrat que la sobreexpressió d'aquests gens en una soca *ptc1Δ* no és capaç de normalitzar l'activitat basal d'aquest promotor, es mostra una disminució de l'activitat. Aquests resultats són coherents amb el fet que la sobreexpressió de les PP2Ac tampoc restaura completament el creixement del mutant *ptc1* en presència de calci.

Com ja s'ha comentat anteriorment, les vacuoles estan considerades els principals reservoris dels ions de calci en el llevat. Tenint present que en un mutant *ptc1* la majoria de cèl·lules tenen les vacuoles fragmentades en comparació amb una soca salvatge (González et al. 2006), vam analitzar l'estat vacuolar en una soca *ptc1Δ* quan se li sobreexpressen els gens *PPH21* i *PPH22*. A la Figura 32 C es mostra que la sobreexpressió de les subunitats catalítiques de les PP2A en una soca *ptc1Δ* disminueix la fragmentació vacuolar d'aquestes cèl·lules. Aquests resultats concorden amb els obtinguts en l'estudi de l'assaig β -galactosidasa ja que, malgrat no s'observen restauracions totals en els tres estudis realitzats, sí que es mostra una millora. Malgrat que el conjunt de resultats suggereix una possible relació entre les PP2As i la l'homeòstasi del calci en un mutant *ptc1*, els experiments realitzats són insuficients per generar un model funcional.

1.8 La sobreexpressió de les PP2Ac disminueix la hiperactivació de la via Slt2 induïda per rapamicina en un mutant *ptc1*.

A més de millorar els defectes del creixement en presència de rapamicina i CaCl_2 , la sobreexpressió de les PP2Ac en un mutant *ptc1* millora, tot i que no normalitza, el creixement d'aquestes cèl·lules en presència de CFW i cafeïna tal i com es mostra a la Figura 30 A.

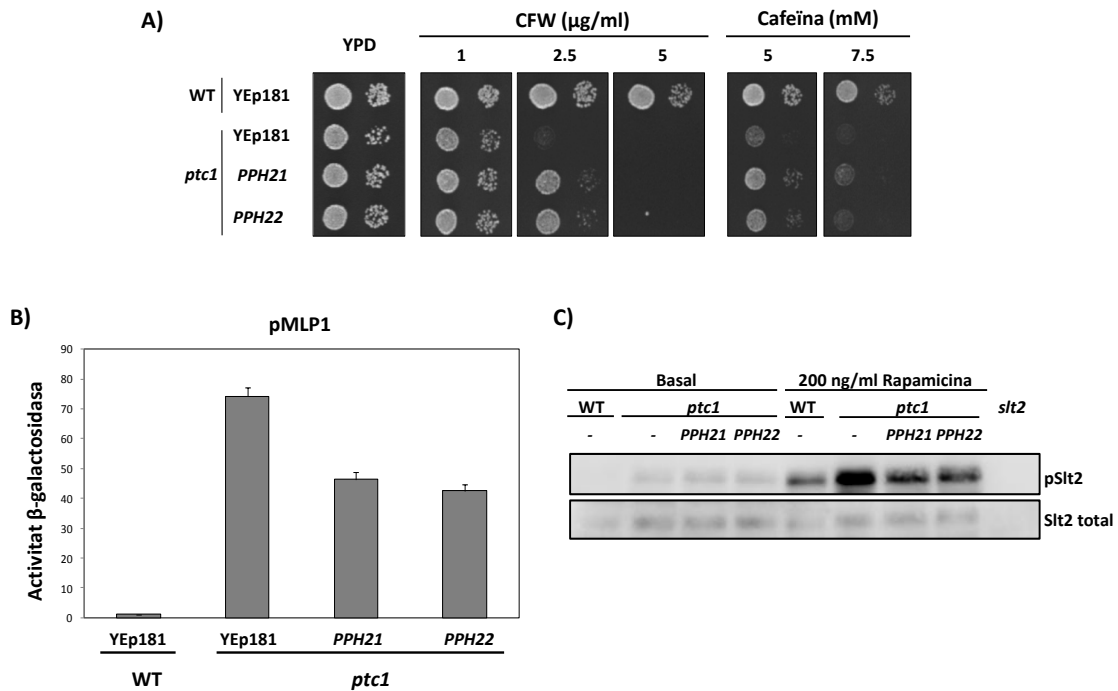


Figura 33. Efecte de la sobreexpressió de les PP2Ac en el mutant *ptc1* en fenotips relacionats amb la via CWI. A) La sobreexpressió de *PPH21* i *PPH22* millora el creixement de la soca *ptc1Δ* en presència de CFW i cafeïna. El mutant *ptc1* es va transformar amb els plasmidis que expressen *PPH21* i *PPH22*. Les colònies positives es van fer créixer en medi selectiu i es van diluir a una OD₆₆₀ 0.05. Els cultius es van dipositar en plaques YPD complementades amb CFW o cafeïna. Les fotografies es van realitzar després de 72 h d'incubació a 28 °C. B) La sobreexpressió de les PP2Ac disminueix l'activitat d'un promotor induït per l'activació de Slt2. Les soques indicades es van transformar amb el plasmidi pMLP1 que conté el promotor del gen *MLP1* i, tot seguit, es va mesurar l'activitat β-galactosidasa. Els resultats són la mitjana ± SEM de 7 experiments. C) La sobreexpressió de les PP2Ac normalitza el nivell de fosforilació de Slt2 quan es tracta el mutant *ptc1* amb rapamicina. La soca *ptc1Δ* es va transformar amb els plasmidis que expressen les PP2Ac. Els cultius es van tractar amb 200 ng/ml de rapamicina durant 1 h. La quantitat de Slt2 fosforilada (P-Slt2) i total presents a les soques indicades es va determinar per *western blot*. El mutant *slt2* serveix com a control negatiu.

S'ha descrit que en el mutant *ptc1* la via de senyalització Slt2 es troba hiperactivada i aquest fet provoca, entre d'altres, un increment de l'activitat dels promotors induïbles per Slt2 (González et al. 2006). Com que la sobreexpressió de les PP2Ac millora el creixement del mutant *ptc1* en presència de CFW (un agent que provoca dany a la paret cel·lular) i de cafeïna (la qual s'ha relacionat amb una hiperactivació de la via CWI), vam creure interessant estudiar l'activitat d'un promotor l'expressió del qual depèn de l'activació del mòdul MAPK de la via CWI. En concret vam analitzar l'activitat del promotor del gen *MLP1* en un mutant *ptc1* quan es sobreexpressen les PP2Ac. A la Figura 33 B s'observa que la sobreexpressió dels gens *PPH21* i *PPH22* en cèl·lules que els manca la fosfatasa Ptc1 disminueix, però no normalitza, l'activitat del promotor de *MLP1* en condicions basals. Aquests resultats concorden amb l'efecte de la sobreexpressió de les PP2Ac en el creixement de la soca *ptc1Δ* en presència de CFW i cafeïna, la qual no és capaç de normalitzar totalment els creixements enfront aquests compostos. Una

possible interpretació dels resultats seria que la sobreexpressió de les PP2Ac contrarestarà el dany de la paret cel·lular, fet que explicaria una atenuació de la via de CWI.

Anteriorment, les vies CWI i TOR s'han relacionat en varies ocasions (Evans & Stark 1997; de la Torre-Ruiz et al. 2002; Torres et al. 2002; Kuranda et al. 2006). Concretament, s'ha descrit que el tractament de les cèl·lules amb rapamicina induïx l'activació de la via CWI detectant-se una hiperfosforilació de la MAPK Slt2 (de la Torre-Ruiz et al. 2002). S'ha proposat que el complex que regula l'activitat de la via CWI és Sit4-Tap42, ja que tant la pèrdua de *SIT4* com les cèl·lules que tenen un al·lel termosensible de *TAP42* provoquen un augment de la fosforilació de Slt2 (de la Torre-Ruiz et al. 2002; Torres et al. 2002). Per altra banda, alguns autors han postulat que les PP2Ac podrien estar també relacionades amb la via de la integritat de la paret cel·lular ja que la pèrdua de la seva funció presenta defectes de creixement a 35 °C que són revertits en presència de sorbitol (Evans & Stark 1997). En aquesta publicació proposen que probablement les fosfatases PP2A duen a terme un paper indirecte en el manteniment de la via CWI regulant components del citoesquelet i suggereixen que la pèrdua de la funció de les PP2A bloquejaria una via alternativa i necessària per la integritat de la paret cel·lular la qual seria paral·lela a Pkc1-Slt2. Cal destacar però, que aquests resultats també són consistents amb la idea que les PP2A podrien dur a terme funcions *downstream* de Slt2. Encara que no disposem de més informació que relacioni les PP2A amb la via CWI, el fet que la sobreexpressió de les PP2Ac en un mutant *ptc1* millori el creixement d'aquestes cèl·lules en presència de CFW i cafeïna i disminueixi l'activitat del promotor de *MLP1* de la soca *ptc1Δ*, suggereix que Pph21 i Pph22 estan, directa o indirectament, relacionades amb la integritat de la paret cel·lular. Amb l'objectiu d'aprofundir el coneixement entre les PP2Ac i la integritat de la paret en un mutant *ptc1*, vam estudiar l'estat de fosforilació de la proteïna Slt2 a la soca *ptc1Δ* tant en condicions basals com després de tractar les cèl·lules amb rapamicina quan es sobreexpressen els gens *PPH21* i *PPH22*. Tal i com es mostra a la Figura 30 C, la sobreexpressió de les PP2Ac en un mutant *ptc1* no produeix cap efecte significatiu en l'estat de fosforilació de la MAPK Slt2 en condicions basals. Per contra, quan les cèl·lules són tractades amb rapamicina es veu un increment de l'estat fosforilat de Slt2 en totes les mostres analitzades (Torres et al. 2002). Aquest fet reforça els resultats publicats per altres grups que evidencien la interacció d'ambdues vies (Torres et al. 2002; Soulard et al. 2010). Cal destacar però, que després del tractament els nivells de fosforilació de Slt2 del mutant *ptc1* són molt superiors als observats en una soca salvatge i disminueixen quan es sobreexpressen les PP2Ac. Encara que els resultats en condicions basals no concorden amb els obtinguts en l'estudi de l'activitat del promotor de *MLP1* on s'observa una disminució, malgrat no ser completa, de l'activitat del

promotor induïble per l'activitat de Slt2, recolzarien la idea que les PP2A podrien estar actuant *downstream* Slt2 proposada per Evans i Stark el 1997. A més, encara que fins el moment només s'han relacionat les proteïnes Sit4 i Tap42 amb la fosforilació de Slt2 després d'un tractament amb rapamicina, els resultats presentats evidencien un possible rol de les PP2A en la desfosforilació de Slt2 enfront aquest estrès.

1.9 Es necessiten diferents complexos de les PP2A per suprimir diversos fenotips associats a la pèrdua de Ptc1.

Les subunitats catalítiques de la fosfatasa de tipus 2A duen a terme diverses funcions gràcies a la formació de diferents complexos. La unió amb la subunitat estructural (Tpd3), i proteïnes reguladores (Cdc55 i Rts1) així com la proteïna Tap42 li confereixen una àmplia varietat de substrats. La formació de cada complex depèn principalment de les modificacions post-traduccionals que poden patir les PP2Ac. En concret es coneixen 3 modificacions: la metilació del residu de leucina localitzat a l'extrem C terminal i, dues fosforilacions en els residus Thr364 i Tyr367 de la subunitat Pph21 (Gentry et al. 2005). La incorporació d'un grup metil al residu leucina la realitza la metil transferasa Ppm1 i l'eliminació d'aquesta modificació és duta a terme per la carboxil metil esterasa Ppe1. La metilació promou l'associació de les PP2Ac amb Tpd3 i les proteïnes Cdc55 i Rts1 formant els complexos PP2A^{Cdc55} i PP2A^{Rts1} respectivament. Per contra, la pèrdua de la metilació indueix la dissociació d'aquests complexos. Respecte a les altres dues modificacions post-traduccionals, s'ha descrit que la fosforilació del residu Thr364 de Pph21 provoca la dissociació de la proteïna reguladora Cdc55 així com una disminució de la unió de Rts1 amb Tpd3 i Pph21. Per altra banda, la fosforilació del residu Tyr367 provoca la dissociació d'ambdós complexos PP2A^{Cdc55} i PP2A^{Rts1}. Les implicacions de les diverses modificacions post-traduccionals en la formació dels diferents complexos de les PP2Ac es resumeixen a la Figura 34.

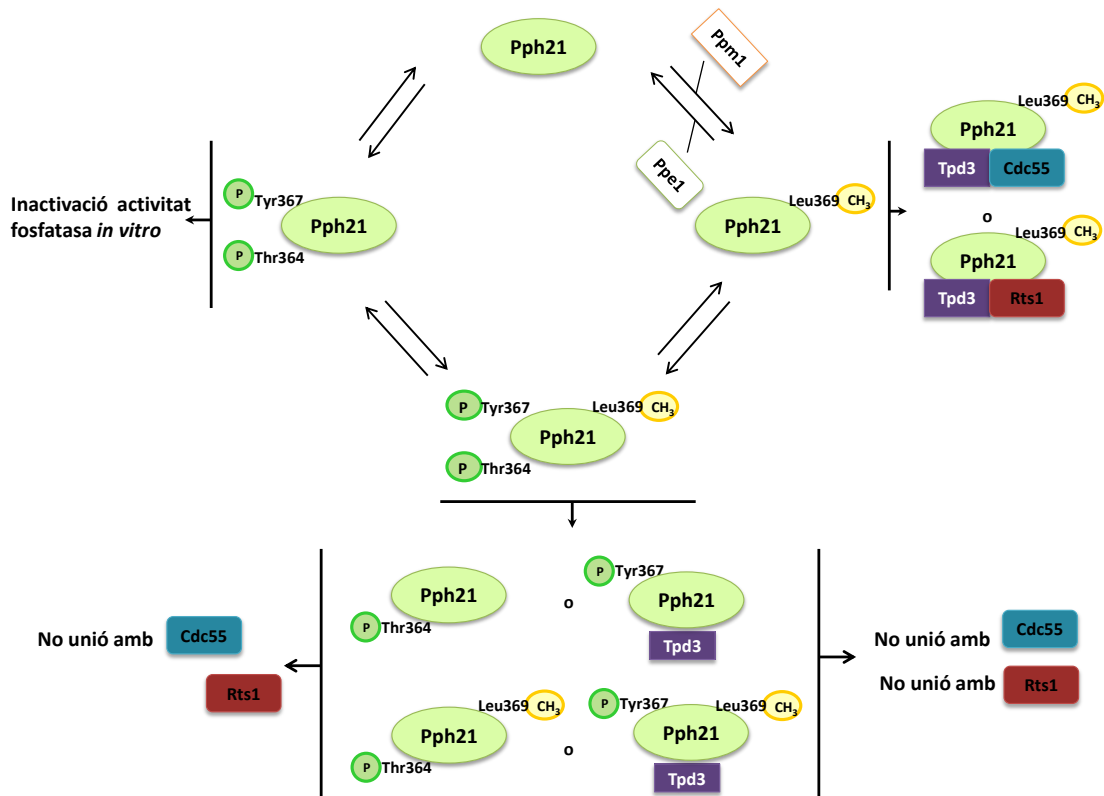


Figura 34. Esquema de les principals modificacions post-traduccionals de Pph21. Es mostren les tres modificacions que pateixen les PP2Ac i la implicació d'aquestes en la formació dels holoenzims PP2A^{Cdc55} i PP2A^{Rts1}. Figura adaptada de (Gentry et al. 2005).

Amb l'objectiu d'aprofundir el paper de les PP2Ac en els diferents fenotips analitzats vam trobar oportú estudiar els requisits post-traduccionals de Pph21 en cada condició estudiada. Primer vam analitzar la implicació de la metil·lació del residu Leu369 de Pph21. Per això, es van generar els dobles mutants *ppm1 ptc1* i *ppe1 ptc1* i es va sobreexpressar el gen *PPH21* en aquestes soques. A la Figura 35 es mostra que la deleció de *PPE1*, però no la de *PPM1*, agreuja el fenotip d'un mutant *ptc1* en presència de rapamicina indicant que la pèrdua de la metil transferasa no és rellevant pel creixement de les cèl·lules *ptc1Δ* a rapamicina però sí la pèrdua de la carboxil metil esterasa. Per altra banda, la sobreexpressió de *PPH21* produeix un efecte beneficiós en el creixement dels dobles mutants *ptc1 ppm1* i *ptc1 ppe1* suggerint que l'estat de metil·lació de Pph21 no influeix en el creixement de la soca *ptc1Δ* enfront rapamicina. Tenint en compte que la mutació de *PPE1* per si mateixa afecta negativament la tolerància a rapamicina, aquests resultats es podrien explicar pel fet que l'activitat de Ppe1 probablement no està limitada a la desmetil·lació de les PP2Ac ja que s'ha identificat també com a subunitat petita d'una de les proteïnes ribosomals mitocondrials (Gan et al. 2002). En el cas del CaCl₂, es mostra que l'eliminació dels gens *PPM1* i *PPE1* afecta negativament al creixement de la soca *ptc1Δ* enfront aquest estrès indicant que ambdós gens són necessaris pel creixement del mutant *ptc1* en presència del catió calci. Al sobreexpressar *PPH21* s'observa

una millora del creixement dels dobles mutants suggerint que un augment de l'expressió de *PPH21* és beneficiós per aquestes soques. Cal destacar però, que la recuperació del creixement de les cèl·lules *ptc1 ppe1* quan es sobreexpressa *PPH21* és major que el del mutant *ptc1 ppm1* indicant que la metilació de Pph21 seria important pel creixement de la soca *ptc1Δ* enfront CaCl_2 . Respecte l'estrès per CFW, la deleció del gen *PPE1*, però no de *PPM1*, agreuja el fenotip de sensibilitat del mutant *ptc1*. Per contra, quan es sobreexpressa *PPH21* només es millora el creixement del doble mutant *ptc1 ppe1*. Aquests resultats indiquen que l'efecte positiu en presència de CFW de la sobreexpressió de *PPH21* en cèl·lules *ptc1Δ* estaria relacionat amb un estat metilat d'aquesta subunitat catalítica. Finalment, en el cas de la cafeïna, la deleció de *PPE1* empitjora el creixement del mutant *ptc1* en presència d'aquest compost. Per contra, la sobreexpressió de *PPH21* provoca un efecte positiu en el creixement tant de les cèl·lules *ptc1Δ ppm1Δ* com *ptc1Δ ppe1Δ* suggerint que, com en el cas de la rapamicina, l'estat de metilació de Pph21 no influeix en el creixement de la soca *ptc1Δ*. El fet que els requisits de la metilació variïn entre els diferents fenotips indica que són necessaris diversos complexos de les PP2Ac per millorar el creixement del mutant *ptc1* davant diferents condicions d'estrès.

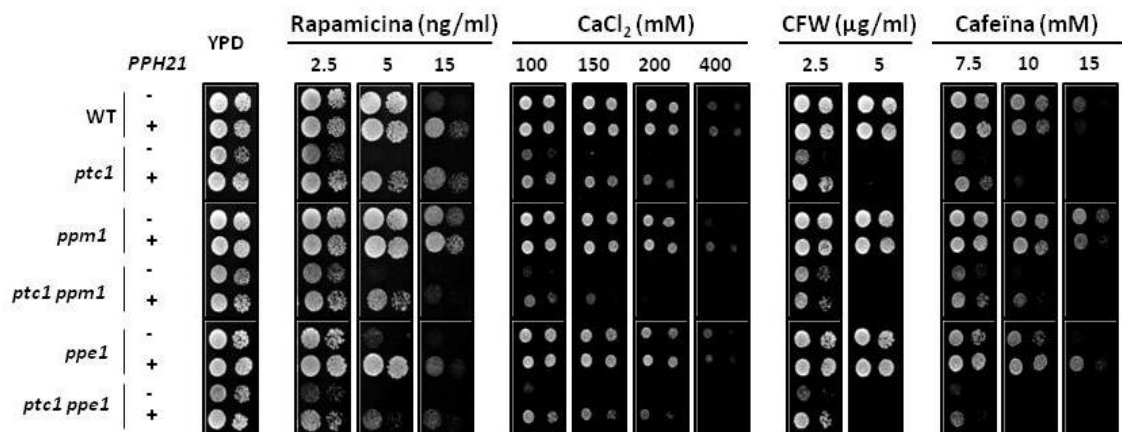


Figura 35. La metilació de Pph21 en la millora del creixement en condicions on el mutant *ptc1* presenta sensibilitat. Les soques indicades es van transformar amb el plasmidi que sobreexpressa Pph21 (+) o un plasmidi control (-). Les colònies positives es van fer créixer en medi selectiu i es van diluir a una OD₆₀₀ 0.05. Els cultius es van dipositar en plaques YPD complementades amb diferents compostos a les concentracions indicades. Les fotografies es van fer després de 72 h d'incubació a 28 °C.

A continuació, vam investigar els requisits de les altres dues modificacions post-traduccionals. Per assolir aquest objectiu vam procedir a sobreexpressar diversos al·lells de Pph21 que contenen els residus fosforilables Thr364 i Tyr367 substituïts per un aspàrtic i una glutàmica (T364D i Y367E) mimetitzant versions de Pph21 constitutivament fosforilades, o els al·lells T364A i Y367F els quals no es poden fosforilar. A la Figura 36 es mostra que els al·lells de *PPH21* capaços de millorar el creixement del mutant *ptc1* amb la mateixa potència fenotípica que el gen salvatge en presència de rapamicina, CaCl_2 i CFW són T364A i Y367E. Cal destacar

RESULTATS I DISCUSSIÓ

però, que enfront la rapamicina l'expressió de les versions Y367F i sobretot T364D suposen encara un cert benefici pel mutant *ptc1*. En el cas de la cafeïna, la sobreexpressió de totes les versions millora el creixement de la soca *ptc1Δ*. El conjunt de resultats indica que l'eliminació dels fenotips de sensibilitat del mutant *ptc1* a rapamicina, CaCl_2 i CFW degut a la sobreexpressió de *PPH21* requereix que la fosfatasa Pph21 tingui el residu Thr364 desfosforilat i el residu Tyr367 fosforilat. Com que s'ha descrit que la fosforilació del residu tirosina 367 provoca la dissociació dels complexos $\text{PP2A}^{\text{Cdc55}}$ i $\text{PP2A}^{\text{Rts1}}$ i en presència de rapamicina, CaCl_2 i CFW és necessari que estigui fosforilada, els resultats suggereixen que la formació d'aquests dos complexos no seria necessària per donar lloc a l'efecte supressor de les PP2A enfront aquestes condicions. Cal destacar que en el cas de la cafeïna s'observa una millora lleu de tots els al·lels sobreexpressats indicant que l'efecte positiu observat de la sobreexpressió de *PPH21* en un mutant *ptc1* en aquest fenotip és independent de l'estat de fosforilació d'aquests dos residus de la fosfatasa Pph21.

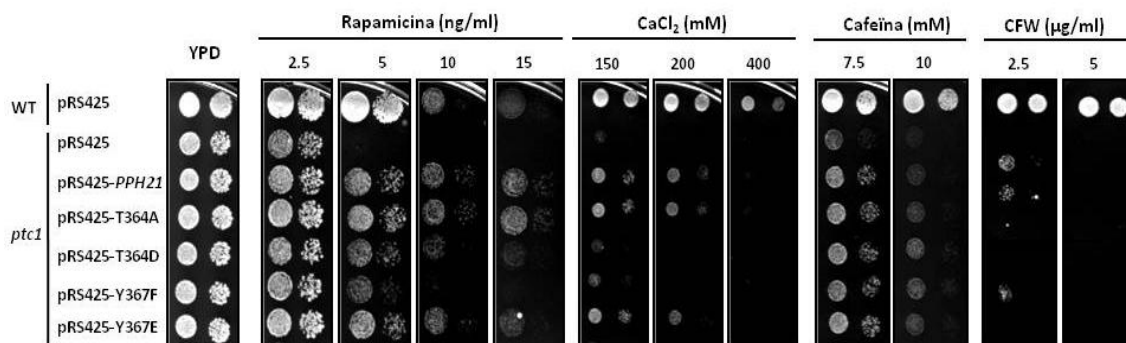


Figura 36. Rellevància de l'estat de fosforilació de Pph21 en la millora del creixement d'una soca *ptc1* en diverses condicions. Les soques indicades es van transformar amb els plasmidi que sobreexpressen diferents al·lels de Pph21, les versions que mimetitzen la fosforilació dels residus indicats (T364D i Y367E) i les que no es poden fosforilar (T364A i Y367F). Les colònies positives es van fer créixer en medi selectiu i es van diluir a una OD_{660} 0.05. Els cultius es van dipositar en plaques YPD complementades amb diferents compostos a les concentracions indicades. Les fotografies es van realitzar després de 72 h d'incubació a 28 °C.

Paral·lelament a la formació dels complexos $\text{PP2A}^{\text{Cdc55}}$ i $\text{PP2A}^{\text{Rts1}}$ també es coneix el complex Tap42-PP2Ac. S'ha descrit que Rrd2, un activador de l'activitat fosfotirosil fosfatasa de les PP2A podria estar interaccionant amb aquest complex (Van Hoof et al. 2005; Zheng & Jiang 2005). En el llevat hi ha dos gens que codifiquen les PTPA, *RRD1* i *RRD2*. S'ha demostrat que la proteïna Rrd1 té afinitat pel complex Sit4-Tap42 mentre que Rrd2 interacciona amb Pph21/Pph22-Tap42, tot i que s'ha proposat que la presència de Rrd1 potencia l'associació de Rrd2 amb PP2Ac-Tap42 (Van Hoof et al. 2005; Zheng & Jiang 2005). A més, la interacció de les PTPA amb els complexos és sensible a rapamicina la qual provoca l'alliberació del complex Tap42-PP2Ac-Rrd2 que acaba dissociant-se i, inclús pot generar el dímer PTPA-fosfatasa com

un altre complex funcional. Per aquest motiu vam decidir analitzar la importància de la presència de les PTPA en la millora dels creixements del mutant *ptc1* associada a la sobreexpressió de les PP2Ac. Per això vam generar els dobles mutants *rrd1 ptc1* i *rrd2 ptc1* i es va sobreexpressar *PPH21* en aquestes soques. Cal destacar que les mutacions de *RRD1* i *RRD2* augmenten la tolerància de les cèl·lules enfront rapamicina (Xie et al. 2005), mentre que només la deleció del gen *RRD1* millora també el creixement en presència a cafeïna (Kapitzky et al. 2010). Tal i com s'observa a la Figura 37 la deleció del gen *RRD2* i, sobretot, la de *RRD1* agreuja el defecte del creixement del mutant *ptc1* en presència de rapamicina i CaCl_2 . Així doncs, aquests resultats indiquen que les PTPAs són necessàries pel creixement de la soca *ptc1Δ* en aquestes condicions. A més, la sobreexpressió de *PPH21* en una soca *ptc1 rrd2* no produeix cap efecte beneficiós en el creixement d'aquestes cèl·lules enfront rapamicina, CaCl_2 i CFW. Per altra banda, la sobreexpressió de *PPH21* provoca que el creixement de la soca *rrd1 ptc1* en presència de rapamicina sigui similar al del mutant *ptc1*. Aquests resultats indiquen que la proteïna Rrd2 és necessària perquè la sobreexpressió de *PPH21* tingui un efecte positiu en el creixement del mutant *ptc1* enfront aquest compost. Cal destacar però, que les diferències entre els creixements de les cèl·lules *ptc1* i *ptc1 rrd1* quan es sobreexpressa *PPH21* recolzarien el concepte publicat per Van Hoof i col·laboradors que suggereix que la proteïna Rrd1 és important per augmentar la interacció de Rrd2 amb les PP2Ac i Tap42 (Van Hoof et al. 2005). D'aquesta manera, la manca de la proteïna Rrd1 afectaria probablement la formació del complex Tap42-PP2Ac-Rrd2 i, per això, la sobreexpressió de *PPH21* no seria capaç de millorar el creixement d'aquesta soca amb la mateixa potència fenotípica que en el mutant *ptc1*. El conjunt de resultats mostra que la presència de Rrd2 és important per la supressió del fenotip de sensibilitat a rapamicina del mutant *ptc1* i confirma que el complex PP2Ac-Tap42-Rrd2 és necessari en un mutant *ptc1* per activar la resposta adaptativa quan la via TOR és inhibida. En presència de CaCl_2 i CFW, els resultats suggereixen que les dues PTPAs són necessàries perquè la sobreexpressió de *PPH21* a la soca *ptc1Δ* produeixi un efecte positiu en el creixement d'aquestes cèl·lules indicant la necessitat d'altres complexos no detectats fins el moment.

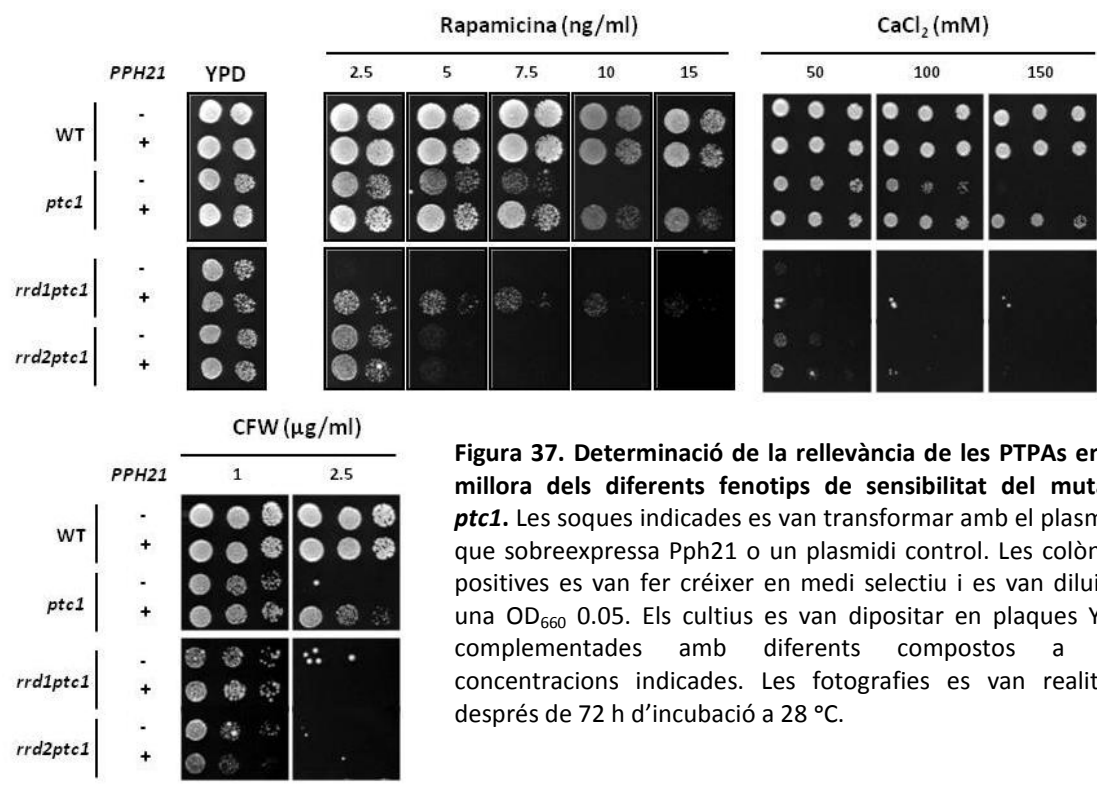


Figura 37. Determinació de la rellevància de les PTPAs en la millora dels diferents fenotips de sensibilitat del mutant *ptc1*. Les soques indicades es van transformar amb el plasmidi que sobreexpressa Pph21 o un plasmidi control. Les colònies positives es van fer créixer en medi selectiu i es van diluir a una OD₆₆₀ 0.05. Els cultius es van dipositar en plaques YPD complementades amb diferents compostos a les concentracions indicades. Les fotografies es van realitzar després de 72 h d'incubació a 28 °C.

El conjunt dels diferents requisits post-traduccional de Pph21 per la millora dels creixements de la soca *ptc1Δ* en presència de rapamicina, CaCl₂ i CFW s'han integrat generant la Taula 5.

Fenotip	L369-CH ₃	L369	T364	T364-P	Y367	Y367-P	Rrd1	Rrd2
Rapamicina	+++	+++	+++	++	+	+++	-	++
CaCl ₂	+++	++	+++	-	-	+++	-	-
CFW	+++	-	+++	-	-	+++	-	-

Taula 5. Diferents requisits de Pph21 per la millora dels creixements del mutant *ptc1* enfront diversos estressos. En aquesta taula es resumeix la importància de la metilació del residu L369 de Pph21 on L369-CH₃ indica que està metilat i L369 desmetilat. També es fa referència de l'estat de fosforilació dels residus T364 i Y367 on T364-P i Y367-P implica que es requereixen fosforilats. Finalment, es té en compte la importància de la presència de les PTPAs Rrd1 o Rrd2. El símbol (-) denota que no és necessari per suprimir el fenotip de sensibilitat analitzat. Per contra, +++ simbolitza que és important perquè el creixement de la soca sigui similar al observat quan es sobreexpressa la versió salvatge de *PPH21*.

La integració dels resultats dels diferents requisits post-traduccional de Pph21, així com la interacció amb les PTPAs, per millorar el creixement d'un mutant *ptc1* davant diversos estressos ens ha permès aprofundir el coneixement de la funció de les PP2As a les cèl·lules

ptc1Δ. Com que en els tres fenotips analitzats l'efecte positiu de la sobreexpressió de *PPH21* requereix que Pph21 estigui fosforilada al residu Y367 i, la fosforilació d'aquest residu provoca la dissociació completa de les subunitats catalítiques de les subunitats reguladores, els complexos PP2A^{Cdc55} i PP2A^{Rts1} no estarien implicats en la millora del creixement del mutant *ptc1* en presència de rapamicina, ions calci i CFW. A més, el fet que enfront rapamicina sigui necessària la proteïna Rrd2 indica que la millora del creixement de la soca *ptc1Δ* degut a la sobreexpressió de *PPH21* requereix el complex Tap42-PP2Ac-Rrd2. Aquesta idea es veu reforçada pels resultats de l'apartat 1.6, els quals confirmen que part dels defectes del mutant *ptc1* al compost rapamicina es deu a una disminució del complex Tap42-PP2Ac, el qual augmenta quan es sobreexpressa *PPH21*. Pel que fa a la millora del creixement del mutant *ptc1* en presència de CaCl₂ i CFW degut a la sobreexpressió de *PPH21*, els resultats obtinguts descarten una implicació dels principals complexos de les PP2A descrits i no permeten relacionar l'efecte positiu observat amb l'activitat d'un complex determinat. Aquest fet indica que probablement existeixen altres complexos de les PP2A que encara no es coneixen. Així doncs, tots els resultats indiquen que en un mutant *ptc1* es necessiten diversos complexos de les PP2A més o menys específics per millorar diferents defectes associats a la pèrdua de Ptc1.

2. Estudi de les interaccions genètiques entre Ptc1 i les subunitats catalítiques o reguladores de proteïna quinases no essencials.

2.1 Cerca de mutants de gens de proteïna quinases capaces de suprimir els fenotips del mutant *ptc1*

Les cèl·lules que els manca la fosfatasa Ptc1 presenten una varietat de fenotips els quals, directa o indirectament, poden ser deguts a una hiperfosforilació d'alguns substrats de Ptc1 encara desconeguts. Partint d'aquesta idea, ens vam proposar examinar l'efecte que produïa eliminar en un mutant *ptc1* gens que codifiquessin tant les subunitats catalítiques de quinases no essencials com subunitats reguladores. Amb aquesta finalitat es va preparar una col·lecció de dobles mutants combinant la deleció de 104 quinases no essencials, dos polipèptids amb activitat quinasa lipídica (*FAB1* i *VPS34*) i nou subunitats reguladores, amb la mutació de *PTC1*, emprant tècniques de transformació amb cassets d'interrupció o per creuaments genètics (veure materials i mètodes).

Un cop generada tota la col·lecció de soques es va prosseguir amb el seu anàlisi fenotípic estudiant el creixement en 8 condicions diferents on el mutant *ptc1* és sensible: LiCl, CaCl₂, ZnCl₂, CFW, cafeïna, rapamicina, pH alcalí o en etanol com a única font de carboni. Es van provar un ampli rang de condicions, fet que va permetre assignar una puntuació per cada soca en cada fenotip. Quan la combinació de les mutacions no alterava el fenotip del mutant *ptc1* se'ls va puntuar amb el valor 0. Els pocs casos on els dobles mutants creixien pitjor que el mutant fosfatasa es van puntuar amb els valors -1 o -2 en funció de l'efecte observat. Per contra, aquelles combinacions en les que la deleció del gen de la quinasa millorava el creixement del mutant *ptc1* es van puntuar en funció de la potència de recuperació des de molt lleu (1) a molt forta (7). A la Taula 6 es mostren en síntesi els resultats acumulats per cada fenotip. Tal i com es pot observar, els fenotips de sensibilitat a ions de Zn²⁺ i a l'agent CFW no només són dues condicions on s'han observat menys recuperacions del creixement d'una soca *ptc1Δ* degut a la deleció del gen quinasa sinó que, a més a més, són les situacions on s'han detectat més agreujaments del defecte del mutant *ptc1*. Per altra banda, la tolerància del mutant *ptc1* en presència de CaCl₂, rapamicina, pH alcalí i LiCl va millorar al deleccionar un nombre substancial de quinases. Aquest efecte va ser particularment rellevant en el cas del fenotip de LiCl en el qual la mutació de 22 quinases van permetre un increment substancial de tolerància a aquest catió tòxic (puntuacions entre 4 i 7).

Condicions analitzades

Efecte	ZnCl ₂	CFW	Cafeïna	CaCl ₂	Rapamicina	Etanol	pH	LiCl
Negatiu	23	16	12	4	10	5	7	10
Neutre	72	80	54	27	16	33	13	24
Positiu	20	19	49	84	89	77	95	81
<i>Puntuació 1-3</i>	20	18	48	82	88	76	86	59
<i>Puntuació 4-7</i>	0	1	1	2	1	1	9	22

Taula 6. Resum del nombre i tipus d'interaccions genètiques detectades entre els gens de les quinases no essencials i *PTC1*. A la columna de l'esquerra es detalla el tipus d'interacció genètica i, en el cas de les interaccions positives, la seva potència. Els números indiquen quantes mutacions es troben en cada categoria.

A partir del conjunt de les puntuacions obtingudes es va generar una matriu que es va utilitzar per fer anàlisis de clústers. Els anàlisis realitzats ens van permetre formar la Figura 35 on es representa un mapa en el qual s'observen 7 clústers principals. En el clúster 7 es troben les quinases que, un cop mutades en cèl·lules que els manca la fosfatasa *Ptc1*, empitjoren el creixement d'aquest mutant en la majoria de les condicions analitzades. En concret s'hi troben les dues isoformes de la subunitat catalítica de la caseïna quinasa 1 (*YCK1* i *YCK2*), i una de les subunitats catalítiques de la caseïna quinasa 2 (*CKA2*) així com la seva subunitat reguladora (*CKB1*). El clúster 6 està format només per dos mutants que corresponen a *BCK1* i *SLT2*, als quals els manca la MAPKKK i la MAPK *downstream* respectivament, localitzades al mòdul quinasa de la via de la integritat de la paret cel·lular. En aquest cas, i tal i com ja s'ha mostrat a l'apartat 1.5 de Resultats i discussió, la mutació d'aquestes quinases en una soca *ptc1Δ* produeixen efectes negatius o nuls en condicions o estressos que activen la via CWI. Per altra banda, aquests dobles mutants milloren els fenotips de sensibilitat a CaCl₂, rapamicina, etanol com a única font de carboni i a LiCl. Cal destacar que el clúster 1 està format només per un únic mutant al que li manca el gen *MKK1*. Tal i com s'observa, la supressió d'aquest gen en una soca *ptc1Δ* provoca una millora substancial de tots els fenotips analitzats. El gen *MKK1* codifica una de les dues MAPKK que actuen per sobre de *Slr2*, la quinasa implicada en la senyalització enfront del dany de paret (Levin 2005). És important remarcar que, tot i que s'ha postulat que *Mkk1* podria ser la principal MAPKK en la senyalització de *Slr2* (Martín et al. 2000), durant molt de temps s'ha considerat també que *Mkk1* i *Mkk2* tenen activitats redundants sobre l'activació de *Slr2*. Tot i així, el mutant *MKK2* el trobem en el clúster 3 i, com es mostra a la Figura 38, aquesta mutació no reproduïx l'efecte de la supressió del gen *MKK1* en un mutant *ptc1*.

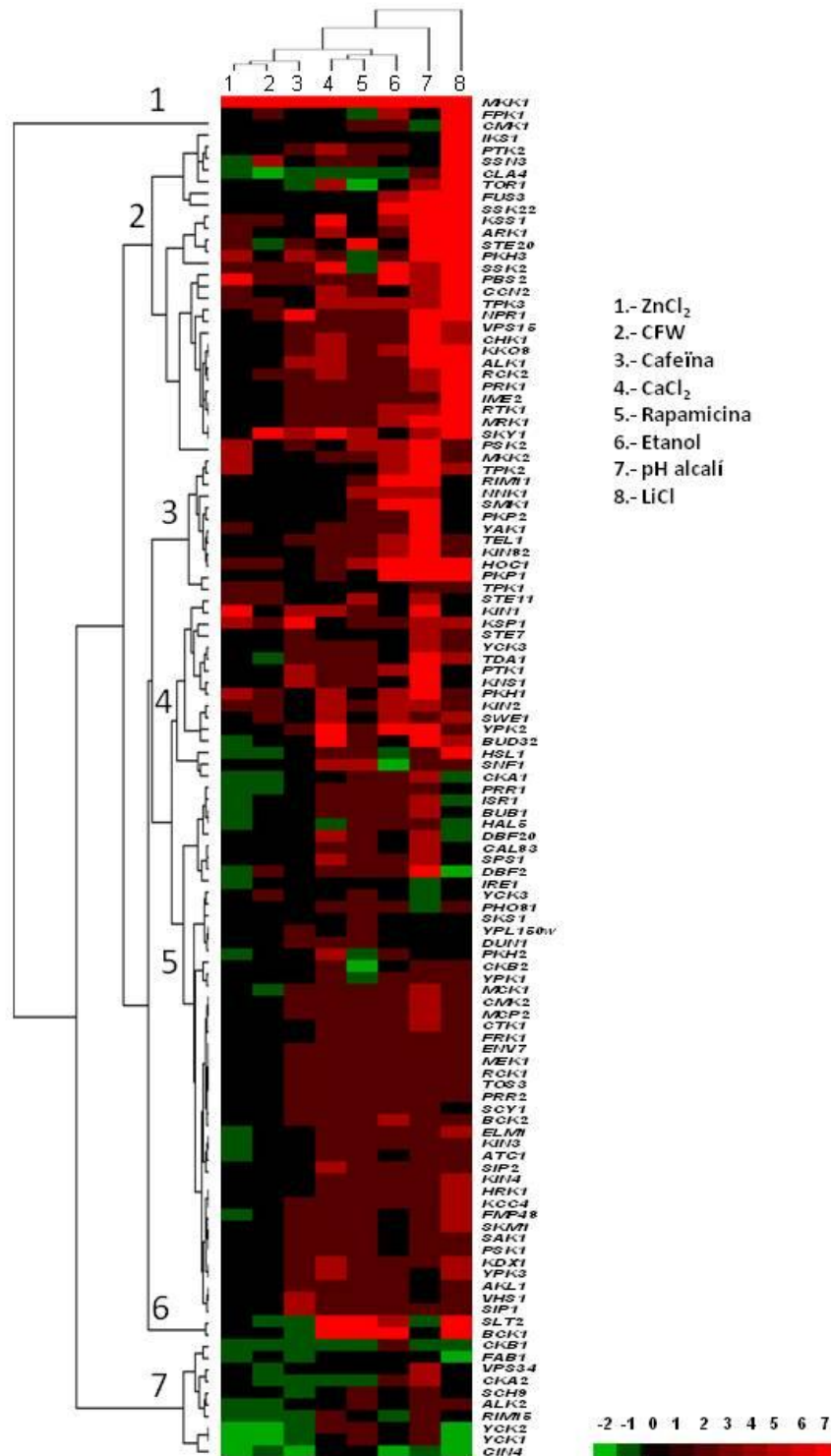


Figura 38. Anàlisi fenotípics dels dobles mutants *quinasa-ptc1*. Les 115 soques que combinen la mutació de les subunitats catalítiques o reguladores de les proteïnes quinases amb la de *ptc1* es van analitzar en els fenotips indicats (A-H) i se'ls va assignar una puntuació en cada condició. Els anàlisis de *clustering* es van realitzar amb el *software* Cluster 3.0 emprant els mètodes *euclidean distance* i *complete linkage* i van ser posteriorment representats mitjançant Java Treeview (Saldanha 2004). El valor 0 indica que la mutació de la quinasa no altera el fenotip d'un mutant *ptc1*, les puntuacions negatives i positives denoten un empitjorament o una millora dels creixements en la condició analitzada, respectivament.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Per confirmar les diferències fenotípiques observades entre l'eliminació dels gens *MKK1* i *MKK2* en una soca *ptc1Δ*, es varen comparar directament totes dues mutacions en medi sòlid. A la Figura 39 es mostra que la supressió dels gens *MKK1* i *MKK2* no afecta el creixement de les cèl·lules en les diverses condicions analitzades. Per altra banda, quan es muta el gen *MKK2* en una soca *ptc1Δ* provoca efectes lleus o nuls en els fenotips de sensibilitat derivats de la manca de Ptc1. Per contra, la supressió de la isoforma *MKK1* en un mutant *ptc1* és capaç de millorar el creixement en presència dels diferents compostos o estressos analitzats. En alguns casos com la tolerància a LiCl o a rapamicina les recuperacions del creixement observades són molt robustes. Aquests resultats suggereixen que Mkk1 i Mkk2 podrien no ser enzims necessàriament redundants i apunten la via de la integritat de la paret cel·lular, i específicament a Mkk1, com una de les possibles dianes principals de la fosfatasa Ptc1.

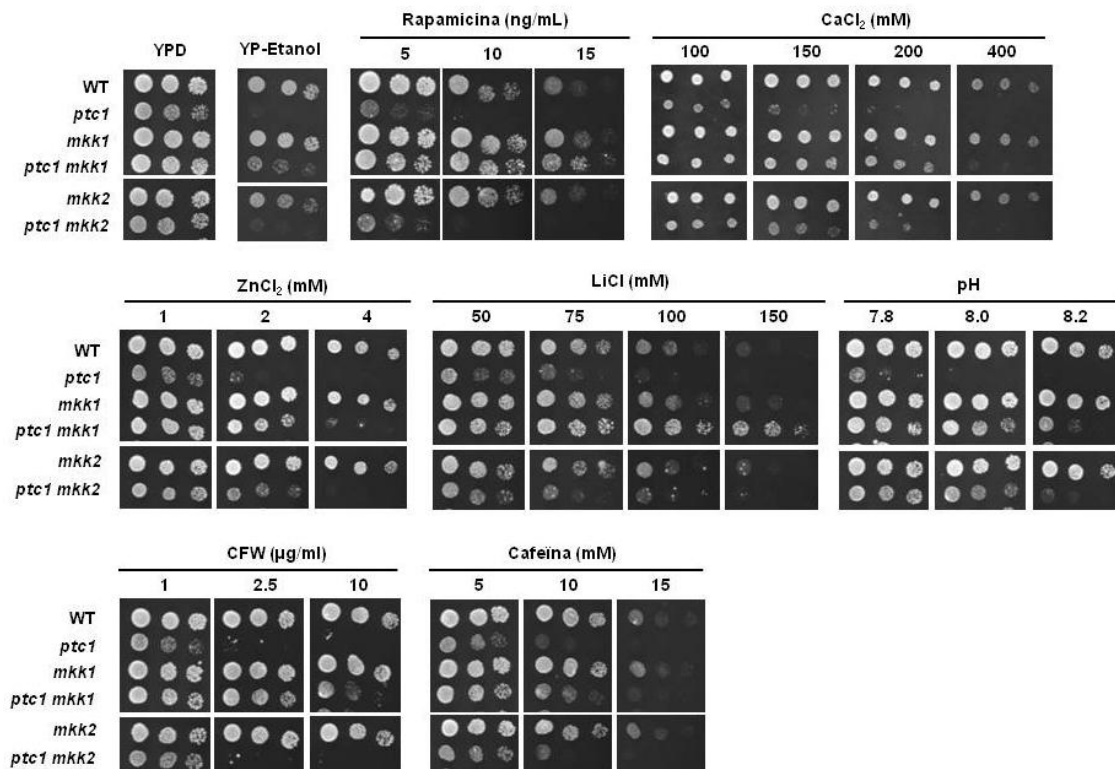


Figura 39. Anàlisi comparatiu dels efectes de les mutacions de *MKK1* o *MKK2* en una soca *ptc1Δ*. Els cultius dels mutants generats en el fons genètic BY4741 es van diluir i es van dipositar en plaques YPD que contenen els compostos indicats, ajustades a diferents pHs, o en plaques de YP amb etanol com a única font de carboni. Les fotografies es van realitzar després de 72 h d'incubació a 28 °C.

Al contrari a *MKK1*, la pèrdua de Slr2 agreuja el fenotip del mutant *ptc1* específicament en presència de CFW, cafeïna i pH alcalí (Figura 40 i Figura 24). Tal i com s'ha discutit a l'apartat 1.5 de Resultats i discussió, aquests resultats simplement indiquen que la resposta adaptativa de la via CWI és essencial en aquestes condicions. Les evidències són coherents

amb la literatura ja que s’ha descrit que les cèl·lules necessiten activar la via de la integritat de la paret cel·lular per poder fer front als estressos de CFW, cafeïna o pH alcalí (Roncero & Duran 1985; Kuranda et al. 2006; Serrano et al. 2006). Tot i així, quan les cèl·lules estan sotmeses a altres tractaments com rapamicina, etanol, CaCl₂ o LiCl, la pèrdua de Slt2 restaura el creixement del mutant *ptc1* de forma similar a eliminar *MKK1* (Figura 40). Aquests resultats indiquen que la resposta adaptativa de la via CWI no és crucial per la supervivència en aquestes condicions. A més, la deleció de qualsevol dels determinants estructurals del mòdul MAPK de la via CWI millora el creixement del mutant *ptc1* en aquestes condicions suggerint que la hiperactivació de Slt2 agreujaria el creixement de la soca *ptc1Δ* enfront rapamicina, etanol, CaCl₂ o LiCl.

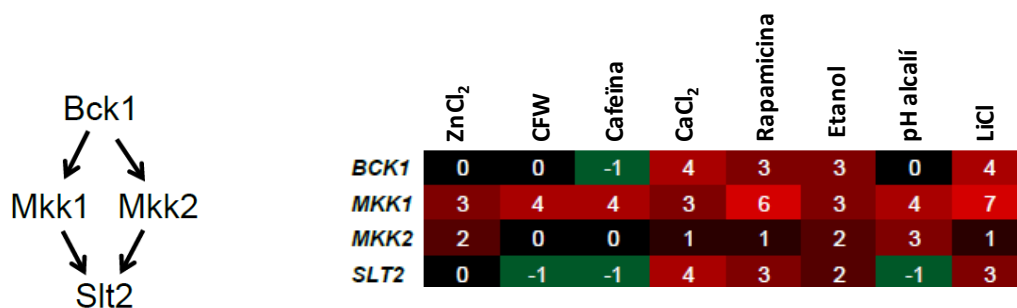


Figura 40. Anàlisi comparatiu dels efectes de les mutacions dels elements del mòdul MAPK de la via CWI en una soca *ptc1Δ*. El requadre de la dreta mostra els valors de les quinases que formen part del mòdul MAPK de la via de senyalització de Slt2.

2.2 Anàlisi de l’efecte de les mutacions de *MKK1* i *MKK2* en diversos *readouts* relacionats amb els fenotips de sensibilitat del mutant *ptc1*

A fi de confirmar els efectes diferencials de les mutacions *mkk1* i *mkk2* i d’obtenir informació addicional dels possibles mecanismes que expliquessin la interacció entre *MKK1* i *PTC1*, vam seleccionar diferents *readouts* relacionats amb els fenotips de rapamicina, Li⁺ i calci. La inhibició de la via TOR deguda a la presència de rapamicina al medi provoca la inducció d’un nombre de gens sotmesos a la repressió catabòlica per nitrogen necessaris per utilitzar fonts de nitrogen no preferents (Cooper 2002), com ara *GAP1*, que codifica una permeasa general d’aminoàcids, i *MEP1* i *MEP2*, que codifiquen permeases d’amoni. Com ja hem esmentat, en cèl·lules sense la fosfatasa Ptc1 hi ha una disminució de la inducció dels promotors d’aquests gens respecte a la resposta d’una soca salvatge (Gonzalez et al. 2009). Per aquest motiu vam decidir analitzar si la supressió dels gens *MKK1* o *MKK2* podria normalitzar l’expressió d’aquests gens. Per fer-ho es van emprar fusions transcripcionals dels seus promotors amb el gen reporter *lacZ*. Tal i com s’observa a la Figura 41, ni la mutació de *MKK1* ni la de *MKK2*

RESULTATS I DISCUSSIÓ

restauren els nivells normals de l'activitat dels promotors de *GAP1*, *MEP1* i *MEP2* en una soca *ptc1Δ*. Per tant, aquests resultats suggereixen que l'efecte positiu de la supressió de *MKK1* en un mutant *ptc1* no depèn de la correcta senyalització de la repressió catabòlica per nitrogen.

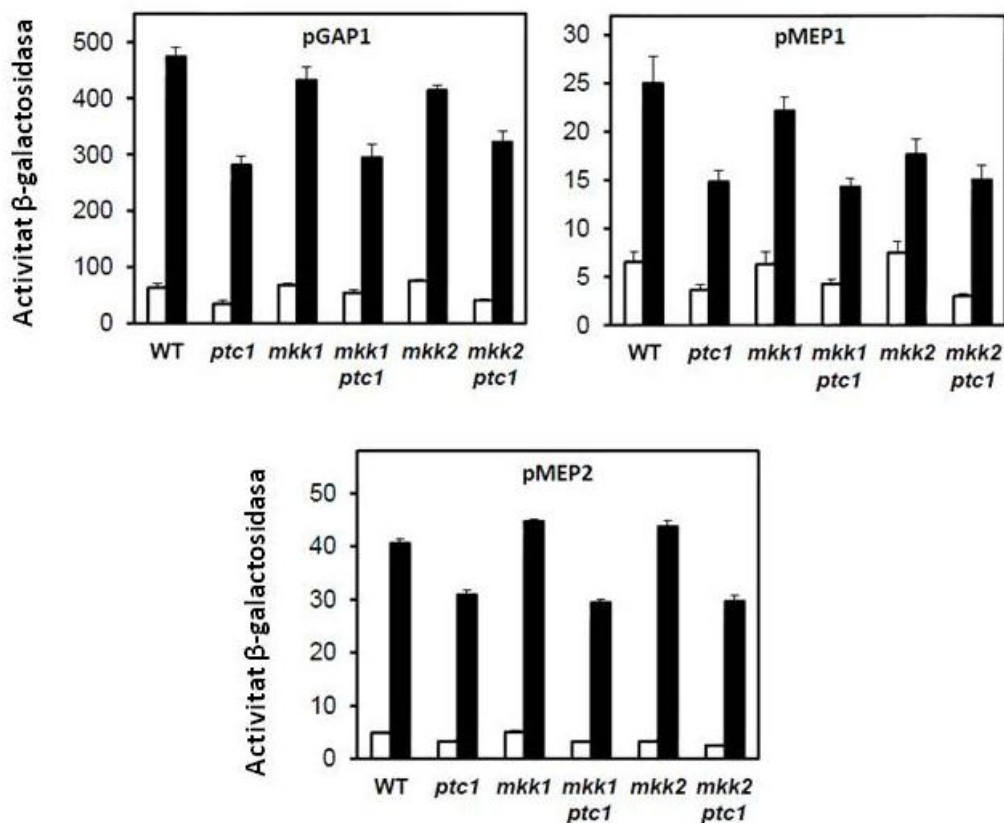


Figura 41. La mutació de *MKK1* o *MKK2* no rescata la deficient expressió dels gens regulats per NCR del mutant *ptc1*. Les soques indicades es van transformar amb els plasmidis reporters *lacZ* de diferents gens regulats per NCR: *GAP1*(pGAP1), *MEP1* (pMEP1), and *MEP2* (pMEP2). Les cèl·lules es van tractar amb la solució control (barres blanques) o rapamicina 200 ng/ml (barres negres) durant 60 min (pGAP1) o 90 min (pMEP1 i pMEP2) i tot seguit es va mesurar l'activitat β-galactosidasa. Els resultats són la mitjana ± SEM de 6 a 10 experiments.

En la tolerància de les cèl·lules enfront la toxicitat produïda per cations monovalents hi juga un paper determinant el gen *ENA1* que codifica una Na^+ -ATPasa. Aquest gen s'indueix per estrès a sal i s'ha descrit que en cèl·lules *ptc1* tractades amb LiCl l'increment de l'expressió de *ENA1* és menor del normal (Ruiz et al. 2006). Així doncs, a fi de trobar una possible explicació de l'efecte beneficiós de la deleció de les quinases en un mutant *ptc1* en presència de LiCl, vam emprar un constructe reporter *ENA1-lacZ* (pKC201) per investigar la resposta d'aquest promotor en els dobles mutants *mkk1 ptc1* i *mkk2 ptc1*. Tal i com s'observa a la Figura 42 A, la pèrdua de Ptc1 disminueix l'activitat del promotor de *ENA1* després d'exposar les cèl·lules a 0.2 M de LiCl i aquest efecte es reverteix de forma significativa ($p < 0.001$) quan s'elimina la quinasa Mkk1. En canvi, la pèrdua del gen *MKK2* en un mutant *ptc1* no produeix cap efecte. Per tant, és probable que la restauració de la funció de *ENA1* podria explicar, com a mínim en

part, la normalització de la tolerància a Li⁺ que la pèrdua de l'activitat de Mkk1 confereix al mutant *ptc1*.

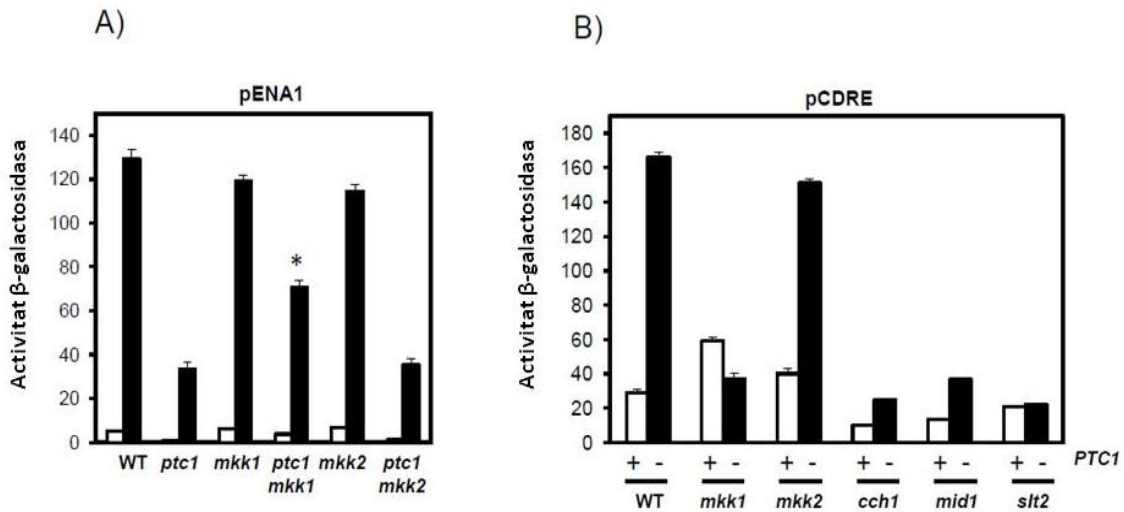


Figura 42. La deleció de *MKK1* en el mutant *ptc1* normalitza tant l'expressió del promotor *ENA1* com la d'un promotor regulat per calcineurina. A) Les soques indicades es van transformar amb el plasmidi pKC201 (*pENA1*) que porta el promotor de *ENA1* fusionat amb el gen *lacZ*. Les cèl·lules es van tractar amb 0.2 M de LiCl durant 1 h (barres negres) i tot seguit es va mesurar l'activitat β-galactosidasa. Els resultats són la mitjana ± SEM de com a mínim 10 determinacions independents. L'asterisc mostra la diferència estadísticament significativa ($p < 0.001$) entre les soques *ptc1* i *mkk1 ptc1*. B) Les soques indicades es van transformar amb el plasmidi pAMS366 (*pCDRE*) que conté 4 còpies de les seqüències CDRE del promotor de *FKS2* i, tot seguit, es va mesurar l'activitat β-galactosidasa. Els resultats mostrats són la mitjana ± SEM de 6 a 14 experiments.

També s'ha publicat que les cèl·lules que els manca la fosfatasa Ptc1 presenten una hiperactivació de la calcineurina (González et al. 2006). Aquest fet es pot demostrar analitzant l'increment de l'expressió del plasmidi pAMS366, el qual porta quatre repeticions de l'element de resposta dependent de calcineurina (CDRE) del promotor del gen *FKS2* fusionat amb el gen *lacZ*. A la Figura 42 B es mostra que la supressió del gen *MKK1* elimina completament l'increment de l'expressió de pAMS366 causat per la mutació de *ptc1*, restaurant l'expressió del promotor als nivells d'una soca salvatge. Per contra, l'activitat d'aquest promotor sintètic a la soca *mkk2 ptc1* és similar a l'observada en un mutant *ptc1*. El conjunt d'aquesta informació indica que l'impacte en la via de senyalització de la calcineurina degut a l'absència de l'activitat de la fosfatasa Ptc1 es veu normalitzat quan es suprimeix específicament el gen *MKK1*. Per altra banda, el mateix efecte s'observa quan s'eliminen els gens que codifiquen Cch1 i Mid1, els quals formen conjuntament, el canal de calci d'alta afinitat localitzat a la membrana plasmàtica, o quan es suprimeix el gen *SLT2*. Tenint present que l'activació de Slt2 pot provocar l'entrada de calci del medi a través del canal Cch1-Mid1 en condicions d'estrès de RE (Bonilla & Cunningham 2003) i que recentment s'ha observat que el doble mutant fosfatasa *ptp2 msg5* té augmentada l'activació de la quinasa Slt2 i presenta elevada sensibilitat a calci

que és dependent de calcineurina (Laviña et al. 2013), els resultats obtinguts suggereixen que en un mutant *ptc1* l'increment de l'activitat de Slt2 resultaria en un augment de l'entrada d'ions calci a través del canal Cch1-Mid1 provocant la sensibilitat d'aquesta soca en presència de CaCl₂.

2.3 La supressió de *MKK1*, però no de *MKK2*, contraresta els defectes vacuolars i morfològics associats a la pèrdua de la funció de *Ptc1*

A més a més dels fenotips característics emprats per la cerca de possibles interaccions genètiques descrites anteriorment, la pèrdua de *Ptc1* també provoca altres deficiències com, per exemple, defectes en la separació de les cèl·lules, un patró de gemmació alterat de les cèl·lules haploides quan s'incuben a 37 °C (González et al. 2006), i una fragmentació vacuolar (Bonangelino et al. 2002). Inicialment, vam examinar l'efecte de la supressió dels gens *MKK1* i *MKK2* en el fenotip vacuolar del mutant *ptc1*. La morfologia vacuolar es va avaluar a partir de cèl·lules tractades amb el tint lipofílic fluorescent FM4-64. Tal i com s'observa a la Figura 43, la pèrdua de la funció de *Mkk1* normalitza l'estat vacuolar del mutant *ptc1* mentre que, la supressió del gen *MKK2* no té cap efecte. En aquest estudi vam decidir analitzar també els mutants *bck1 ptc1* i *slt2 ptc1*. És interessant destacar que en ambdós casos es va percebre una normalització parcial de la morfologia vacuolar.

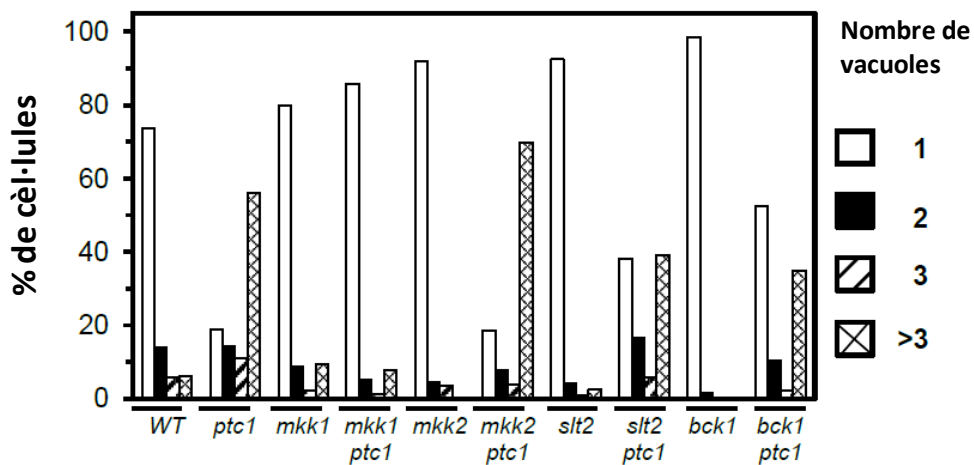


Figura 43. Restauració de la morfologia vacuolar normal degut a la supressió de *MKK1* en mutant *ptc1*. Les soques indicades es van incubar amb el tint fluorescent FM4-64 per visualitzar la morfologia vacuolar. Es van comptar un mínim de 150 cèl·lules per cada soca i es van classificar en quatre classes diferents (1, 2, 3 o més de tres vacuoles per cèl·lula). En el gràfic es mostren els percentatges obtinguts a partir de la relació entre el nombre de cèl·lules de cada classe morfològica sobre el total de cèl·lules analitzades.

Els resultats obtinguts fins el moment emfatitzen la idea que la via CWI regula múltiples funcions i remarca la importància de la necessitat d'una modulació negativa apropiada d'aquesta ruta per l'homeòstasi cel·lular. Un exemple seria l'impacte de Ptc1 en l'homeòstasi del calci. El nostre grup va demostrar que un dels efectes principals de la pèrdua de Ptc1 és un increment de la sensibilitat als ions de calci, mediat per la calcineurina, i un increment en l'expressió dels gens dependents d'aquesta fosfatasa (Gonzalez et al. 2009). Tal i com mostren els nostres resultats, aquests efectes són eliminats quan es suprimeix el gen *MKK1*. A partir dels resultats obtinguts proposem que la hiperactivació de la via SlT2 provocada per la pèrdua de Ptc1 podria impactar en l'homeòstasi de calci de la següent manera. En primer lloc, l'increment de l'activitat de la via SlT2 resultaria en un augment de l'entrada d'ions calci del medi. Aquesta interpretació es veuria recolzada per l'evidència que l'activació de SlT2 provoca l'entrada de calci a través dels transportadors de membrana Cch1 i Mid1 en resposta a un estrès del RE (Bonilla & Cunningham 2003), per l'alta sensibilitat del doble mutant *ptp2 msg5*, el qual té hiperactivat SlT2 (Laviña et al. 2013), i pels nostres experiments que demostren que tant la deleció de SlT2 com dels transportadors de calci de la membrana plasmàtica eliminen l'activació dels reporters regulables per calci observada en el mutant *ptc1* (Figura 39 B). En segon lloc, la deleció conjunta de *PTP2* i *MSG5* provoca fragmentació vacuolar (Hermansyah et al. 2009) com s'observa en cèl·lules que els manca la fosfatasa Ptc1. Degut a que la vacuola és el principal reservori del calci intracel·lular, es podria pensar que la fragmentació vacuolar podria provocar un alliberament de calci al citosol, el qual agreujaria el possible efecte de l'entrada anormal de calci pels transportadors. No obstant, cal considerar que la fragmentació causada per la mutació de *ptc1* podria ser precisament una resposta fisiològica a l'estrès a calci, amb la finalitat d'afavorir el segrest del calci a la vacuola maximitzant la seva relació superfície/volum (Kane 2006), ja que aquest fenotip s'ha observat en mutants amb elevats nivells constitutius de calci citosòlic (Kellermayer et al. 2003).

A continuació vam investigar el patró de gemmació del mutant *ptc1* quan se li suprimien els diversos elements del mòdul de la MAPK SlT2. Amb aquesta finalitat, les cèl·lules es van tenyir amb CFW i es van examinar amb el microscopi de fluorescència. La Figura 44 A mostra que la pèrdua de Mkk1 normalitza àmpliament l'anòmal patró de gemmació característic del mutant *ptc1*, mentre que la supressió de *MKK2* provoca un efecte força limitat. L'eliminació dels gens *BCK1* i *SLT2* provoca també un efecte positiu, ja que el patró de gemmació d'aquestes cèl·lules és similar al de les cèl·lules d'una soca salvatge. De la mateixa forma, el defecte de la separació cel·lular característic d'un mutant *ptc1* és eliminat quan es suprimeix el gen *MKK1* mentre que l'efecte generat per la mutació de *MKK2* és menys marcat

(Figura 44 B). A més, la supressió de *BCK1* i *SLT2* en cèl·lules que els manca *Ptc1* també dona lloc a una millora en la separació de les cèl·lules. El conjunt d'aquests experiments demostren que l'eliminació de l'activitat del mòdul MAPK de la via CWI en cèl·lules deficientes de la funció de *Ptc1* suprimeix tots els fenotips característics atribuïbles a l'absència de la fosfatasa menys en aquelles situacions on l'activitat de la via de la integritat de la paret cel·lular és, en qualsevol cas, necessària.

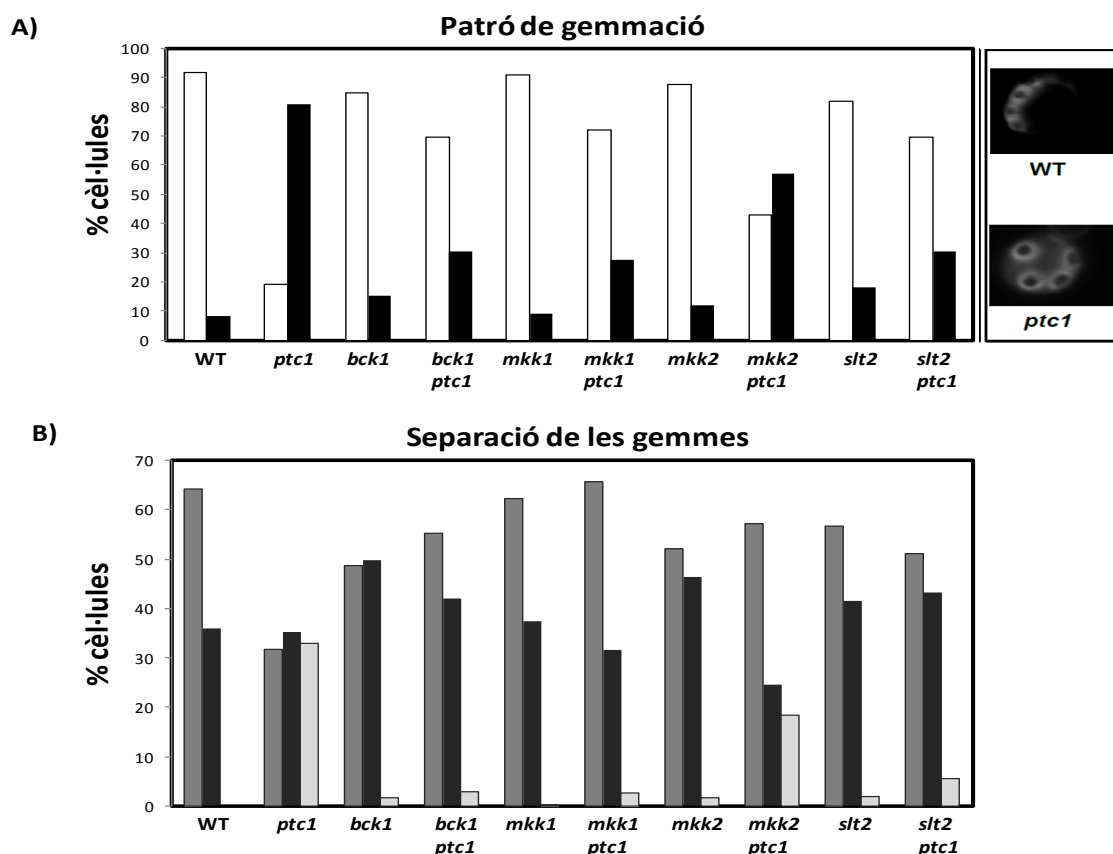


Figura 44. La inactivació del mòdul MAPK de la via *Sl2* en mutant *ptc1* normalitza tant el patró de gemmació com els defectes en la separació de les gemmes. A) Els cultius de les soques indicades es van créixer a 37 °C i es van tenyir amb CFW per visualitzar les cicatrius de les gemmes. Es va analitzar el patró de gemmació d'un mínim de 250 cèl·lules i es va determinar el percentatge de cèl·lules amb el patró normal (barres blanques) o el patró de gemmació a l'atzar de les cèl·lules haploides (barres negres). El requadre de la dreta mostra els patrons de gemmació típic normal (WT) o alterat (*ptc1*) a x600. B) Els cultius es van preparar com els de l'apartat A malgrat no es van tenyir les cèl·lules. Els cultius es van sonicar lleugerament i les mostres es van analitzar comptant les gemmes que tenia cada cèl·lula. Es van generar 3 categories diferents: cèl·lules sense gemmes (barres grises), cèl·lules amb una gemma (barres negres) o cèl·lules amb més d'una gemma (barres clares). Al gràfic es representen els percentatges corresponents a cada categoria. S'han examinat un mínim de 750 cèl·lules per cada soca.

2.4 Mkk1 és la principal MAPKK responsable de l'increment de la senyalització de la via de CWI observat en el mutant *ptc1*

Degut que Mkk1 és un element de la via CWI i que aquesta es troba hiperactivada en un mutant *ptc1*, vam creure rellevant analitzar l'efecte de la supressió de les MAPKK Mkk1 i Mkk2 en l'activació de la via Slt2 i la transmissió de la senyal d'aquesta quinasa en cèl·lules que els manca la fosfatasa Ptc1. Així doncs vam procedir a analitzar l'activitat transcripcional del promotor del gen *MLP1*, l'expressió del qual és induïda degut a l'activació de la via Slt2. En un mutant *ptc1*, on la via Slt2 es troba hiperactivada, l'activitat d'aquest promotor es veu incrementada en comparació amb l'activitat d'aquest promotor en una soca salvatge (González et al. 2006). Tal i com s'observa a la Figura 45, la supressió del gen *MKK1* en un mutant *ptc1* promou la normalització de l'activitat del promotor de *MLP1* disminuint-lo als nivells d'una soca salvatge. Per contra, encara que l'eliminació de *MKK2* produeix una disminució de l'activitat del promotor de *MLP1* no és capaç de restablir-la als nivells normals. Aquests resultats indiquen que la hiperactivació de Slt2 en absència de Ptc1 depèn essencialment de la funció de la MAPKK Mkk1.

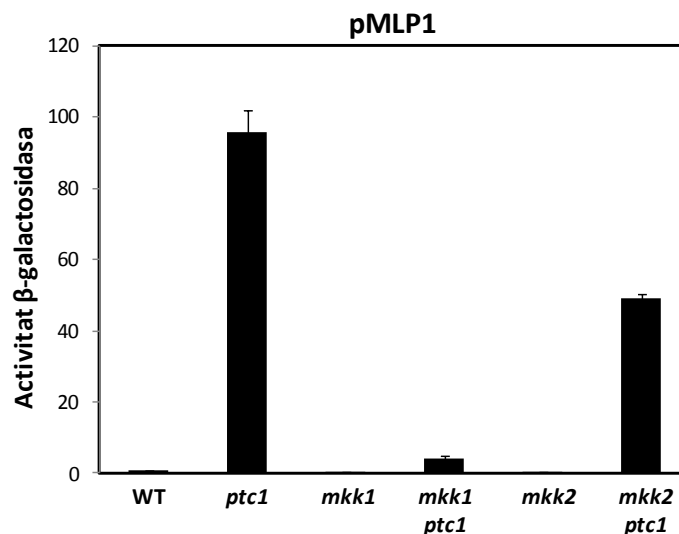


Figura 45. La supressió de *MKK1* però no la de *MKK2* normalitza l'expressió del promotor *MLP1* en mutant *ptc1*. Les soques indicades es van transformar amb el plasmidi reporter pMLP1 que porta el promotor d'aquest gen fusionat amb el *lacZ* i es determinar l'activitat β-galactosidasa. Els resultats són la mitjana ± SEM de 6 a 11 experiments.

Després d'observar una reducció de la transmissió del senyal de la via CWI en el doble mutant *ptc1 mkk1* vam creure convenient determinar si aquest fet estava relacionat amb una reducció de l'estat de fosforilació de Slt2. D'aquesta forma vam estudiar l'estat de fosforilació d'un mutant *ptc1* quan se li suprimia les MAPKK Mkk1 o Mkk2 per *western blot* i emprant anticossos específics per la detecció de la fosforilació dels residus Thr i Tyr que es troben

RESULTATS I DISCUSSIÓ

situats al *loop* d'activació. Tal i com s'observa a la Figura 46, la pèrdua de *MKK1* en un mutant *ptc1* provoca una forta reducció de Slt2 fosforilat així com una disminució dels nivells de Slt2 totals comparat amb els d'una soca *ptc1Δ*. Per contra, encara que en el doble mutant *mkk2 ptc1* es detecta una menor quantitat tant de Slt2 fosforilat com total en comparació amb els nivells de Slt2 de la soca *ptc1Δ*, el nivell de fosforilació de Slt2 és encara prou significatiu i suggereix que la via es troba hiperactivada.

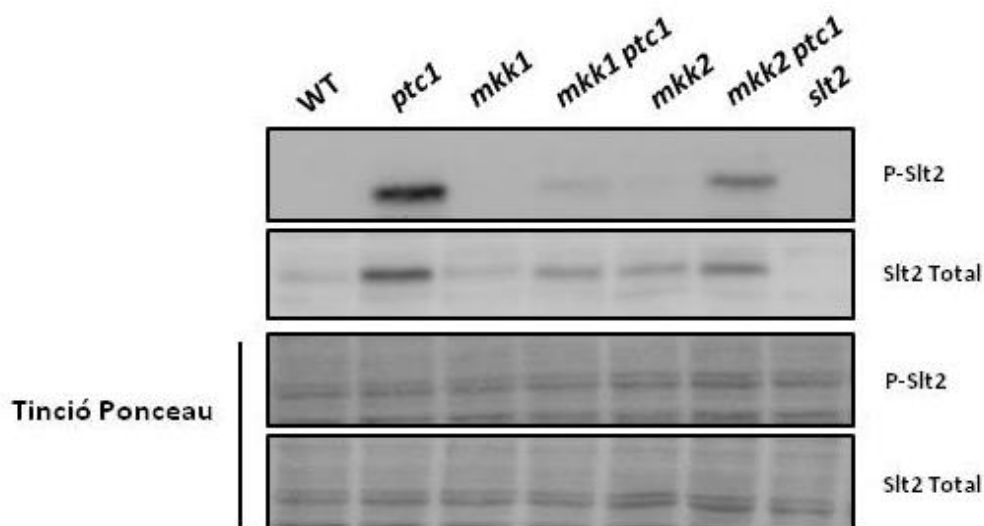


Figura 46. La mutació de *MKK1* però no la de *MKK2* normalitza la hiperfosforilació de Slt2 en el mutant *ptc1*. La quantitat de Slt2 fosforilada (P-Slt2) i total presents a les soques indicades es va determinar per *western blot*. El carril de la dreta serveix com a control i correspon al mutant *slt2* que no conté el gen de la quinasa. A sota es mostra la tinció de les membranes amb el colorant Ponceau a fi d'assegurar que tots els carrils contenen quantitats similars d'extracte proteic total.

Amb l'objectiu de validar la implicació de *Mkk1* en la hiperfosforilació de la proteïna Slt2 observada en el mutant *ptc1* es va analitzar l'estat de fosforilació de Slt2 en les soques salvatge, *ptc1Δ*, *mkk1Δ* i *mkk1 ptc1Δ* emprant tècniques d'espectrometria de masses. Així doncs, aquestes soques es van transformar amb un plasmidi que expressa una versió de la proteïna Slt2 fusionada a la proteïna GST. Els cultius incubats es van tractar a pH alcalí (8.2) durant 10 minuts just abans de recol·lectar les cèl·lules ja que aquest estrès provoca una activació de la via CWI induint la ràpida fosforilació de la MAPK (Serrano et al. 2006). Tot seguit es va purificar GST-Slt2 per cromatografia d'afinitat de glutatió-agarosa, les mostres es van separar en un gel SDS-PAGE el qual va ser posteriorment tenyit per identificar les bandes proteïques. Un cop detectada la banda que corresponia a la fusió GST-Slt2 es va retallar i es va procedir a la digestió de la proteïna per tripsina. Després d'enriquir les mostres en fosfopèptids es van analitzar per espectrometria de masses. Amb aquesta tècnica es va identificar un únic pèptid fosforilat que correspon al que conté els residus fosforilables Thr i Tyr situats al *loop* d'activació. Cal destacar que era d'esperar obtenir aquest pèptid ja que la

fosforilació d'aquests residus és la que es detecta per *western blot*. A partir de les dades obtingudes es va calcular la relació entre el pèptid fosforilat i els pèptids totals. Els nostres resultats indiquen que els nivells de fosforilació d'aquest pèptid és 5.6 vegades més elevat en el mutant *ptc1* en comparació als de les cèl·lules *mkk1Δ* i que la supressió de la MAPKK *MKK1* a la soca *ptc1Δ* mostra els mateixos nivells de fosforilació que els del mutant simple *mkk1*.

Paral·lelament als nostres resultats i a fi d'aprofundir en el paper de la fosfatasa Ptc1 amb la via CWI, vam establir una col·laboració amb el grup de la Dra. María Molina de la Universidad Complutense de Madrid. Aquest grup va dur a terme diversos experiments similars als descrits en aquesta Tesi, com ara l'estudi de l'expressió de *MLP1* fusionat a GFP per citometria de flux o l'estat de fosforilació de Slt2 dels mutants *ptc1*, *mkk1 ptc1* i *mkk2 ptc1*, tant en condicions basals com en presència de vermell Congo, un agent que provoca dany a la paret cel·lular (María Molina i col·laboradors, comunicació personal). Els seus resultats, juntament amb els nostres, apunten a la MAPKK Mkk1 com una molt possible diana de la fosfatasa Ptc1.

El conjunt dels resultats reforça la idea que la MAPKK Mkk1 és més efectiva que Mkk2 en la senyalització de Slt2 (Martín et al. 2000). A més a més, la supressió de *MKK1* però no la de *MKK2* alleugera els fenotips de sensibilitat del mutant *ptc1* enfront diverses condicions que provoquen dany a la paret cel·lular com CFW, cafeïna i pH. Aquestes dades encaixen amb la idea que la sensibilitat davant d'aquests compostos o estressos de les cèl·lules que els manca la fosfatasa Ptc1 es deu principalment a una hiperactivació de la via CWI sota aquestes condicions i permet explicar perquè es redueix, principalment, en absència de Mkk1. Això implicaria que qualsevol hiperactivació de la via provocaria sensibilitat enfront estressos que activin la via CWI. Un exemple és el cas presentat per Watanabe i col·laboradors, els quals van demostrar que la sobreexpressió d'una versió de *MKK1* hiperfosforilada en una soca salvatge i en un mutant *bck1* provoca sensibilitat d'aquestes cèl·lules a 35 °C (Watanabe et al. 1995).

3. Bases moleculars que apunten a una relació entre la fosfatasa Ptc1, la via CWI i la regulació del cicle cel·lular.

Les cerques de gens supressors que en multicòpia fossin capaços d'eliminar el defecte del creixement del mutant *ptc1* en presència de CFW, pH alcalí o rapamicina ens van permetre aïllar un total de 25 gens. Posteriorment, es va ampliar l'estudi fenotípic d'aquests gens en una soca *ptc1Δ* en presència de LiCl, CaCl, ZnCl₂, cafeïna i peròxid d'hidrogen o quan l'única font de carboni és l'etanol i, a més, es va estudiar els seus efectes amb l'estat vacuolar del mutant *ptc1*. El conjunt de la informació obtinguda reforça la idea que les propietats biològiques de la fosfatasa Ptc1 són específiques d'aquesta isoforma i no les comparteix amb els altres membres de la família de fosfatases de tipus 2C ja que no s'ha aïllat cap dels altres 6 membres de les PP2C com a supressors dels defectes associats a la falta de l'activitat de Ptc1 (González et al. 2006; Gonzalez et al. 2009). Cal destacar que, encara que alguns dels gens identificats són capaços d'alleugerir diversos fenotips relacionats amb el mutant *ptc1*, com ara *PPH22*, *VPS73*, *VPS70*, *CDC37* o les tres versions truncades de *BCK1*, cap d'ells reverteix completament el fenotip del mutant convertint-lo en una soca salvatge. Aquest fet es podria interpretar com si cap dels gens identificats pogués contrarestar l'absència de Ptc1. Una possible explicació podria ser que la fosfatasa Ptc1 tingués diferents dianes cel·lulars i, les seves hiperfosforilacions provocarien col·lectivament els nombrosos defectes derivats de la pèrdua de Ptc1. Aquesta idea es veu reforçada també pels resultats obtinguts en l'estudi de les interaccions genètiques entre les proteïnes quinases i la fosfatasa Ptc1, ja que es van detectar un elevat nombre d'interaccions. A l'hora d'interpretar les interaccions genètiques de *PTC1* cal considerar que aquestes poden tenir un caire indirecte, ja que poden tenir com intermediària la proteïna adaptadora de Ptc1, Nbp2, la qual presenta també un gran nombre d'interaccions (Hruby et al. 2011). Entre elles hi ha les quinases Gin4, Kcc4 i Cla4, les quals estan involucrades en processos morfogènics com el creixement de la gemma i l'assemblatge de l'anell de septines. És interessant el fet que els gens que codifiquen aquestes proteïnes així com altres relacionades amb la mateixa funció com la quinasa Hsl1 o les caseïna quinases Yck1 i Yck2, presenten interaccions genètiques negatives amb Ptc1 en presència de diverses condicions, especialment aquelles relacionades amb el dany a la paret cel·lular. Degut que el mutant *ptc1* també exhibeix defectes morfogènics, com ara el patró de gemmació i la morfologia vacuolar, els quals es restauren al bloquejar la senyalització de la via CWI deguda a l'eliminació dels elements del mòdul MAPK de la via Pkc1-Slt2, és probable que la hiperactivació de la via CWI contribueixi a les interaccions negatives de *PTC1* amb *HSL1*, *YCK1* i *YCK2*.

La resposta compensatòria regulada per la via CWI és essencial per la viabilitat cel·lular enfront condicions que danyen la paret cel·lular però un excés en l'activació d'aquesta arriba a ser negatiu, tal i com s'observa quan es sobreexpressen els al·lels hiperactius de Pkc1 o Mkk1

(Martín et al. 2000; Watanabe et al. 1995). La manca de Ptc1 causa un augment dels nivells constitutius de Slr2 fosforilat que es veuen fortament incrementats en condicions conegudes per activar la via CWI com el tractament amb CFW i el vermell Congo (De Nobel et al. 2000), la cafeïna (Martín et al. 2000), la rapamicina (Torres et al. 2002) o el pH alcalí (Serrano et al. 2006). Probablement, aquesta hiperactivació és la causa del marcat defecte de creixement del mutant *ptc1* enfront condicions que activen la via CWI. El fet que la deleció de *MKK1* però no de *MKK2* en aquesta soca dóna lloc a una forta reducció tant de la fosforilació de Slr2 com de la resposta transcripcional derivada d'aquesta MAPK i, a més a més, millora el creixement de *ptc1* en presència de compostos que activen la via CWI reforcen aquesta idea i indiquen que Mkk1 és la principal MAPKK activadora de Slr2 i suggereixen que Mkk1 podria ser una diana immediata de Ptc1. Aquest rol preferent de Mkk1 sobre Mkk2 sembla abastar totes les condicions analitzades i, per tant, estaria basada en les propietats intrínseques d'aquesta MAPKK i no dependria de mecanismes regulats sota estímuls específics.

Els resultats obtinguts a les dues aproximacions genètiques indiquen que la hiperactivació del mòdul quinasa Pkc1-Slr2 podria ser la base de molts dels fenotips causats per la manca de *PTC1*.

Un terç dels supressors multicòpia obtinguts estan implicats en la regulació del cicle cel·lular. Els resultats presentats mostren que la pèrdua de la quinasa *SWE1* (necessària per la fosforilació i inhibició de Cdc28) en un mutant *ptc1* atenua alguns defectes fenotípics d'aquestes cèl·lules alhora que la deleció de la fosfatasa *MIH1* (desfosforila Cdc28 i permet la progressió de G2/M) agreuja el creixement de la soca *ptc1Δ* en presència de CFW i CaCl₂. A més, la sobreexpressió de *CDC37*, un gen necessari per la progressió del cicle cel·lular la funció del qual és necessària per l'associació de Cdc28 amb les ciclins que regulen la fase G1 i la mitosis, millora varis defectes del mutant *ptc1*. Per altra banda, també s'ha aïllat *PPH22*, implicat en la regulació de varies fases del cicle cel·lular i *ZDS1*, específicament involucrat en la regulació de la mitosis, la sobreexpressió dels quals alleugeren molts defectes associats a la pèrdua de Ptc1. Finalment, a partir de l'estudi d'interaccions genètiques entre les quinases no essencials i Ptc1 s'ha observat que la deleció de la quinasa *HSL1*, que actua com a regulador negatiu primari de Swe1 (Ma et al. 1996; Barral et al. 1999), així com la mutació de les caseïna quinases *YCK1* i *YCK2*, que fosforilen Mih1 (Pal et al. 2008), empitjoren alguns fenotips del mutant *ptc1*. El conjunt d'aquests resultats indica que l'activitat de la quinasa Cdc28, necessària per la transició de G2/M, seria limitant en una soca *ptc1Δ*, relacionant per primera vegada la isoforma Ptc1 amb la regulació del cicle cel·lular.

El conjunt dels resultats obtinguts permeten proposar un model en el qual la hiperactivació de Slr2 desencadenaria dues conseqüències principals. Per una banda, inhibiria Mih1 tal i com ja s'havia proposat en el passat (Harrison et al. 2001; Martinez-Anaya et al. 2003) i/o activaria Swe1, com han suggerit Mizunuma i col·laboradors (Mizunuma et al. 1998). Per altra banda, incrementaria el calci intracel·lular regulant els transportadors de calci localitzats a la membrana plasmàtica, fet que activaria la calcineurina, com indica que l'expressió anormalment alta del reporter que respon a calcineurina observada en el mutant *ptc1* (González et al. 2006) s'aconsegueix eliminar no només per la deleció del gen *CNB1*, sinó també amb la de *CCH1*, *MID1* o *SLT2*. Així doncs, l'activació constitutiva de la calcineurina en una soca *ptc1Δ* donaria lloc a un augment de l'activitat de la quinasa Swe1 (Miyakawa & Mizunuma 2007). La combinació dels diversos efectes resultaria en un retràs en la transició G2/M del cicle cel·lular com a conseqüència de la pèrdua de la funció de Ptc1 (Figura 47).

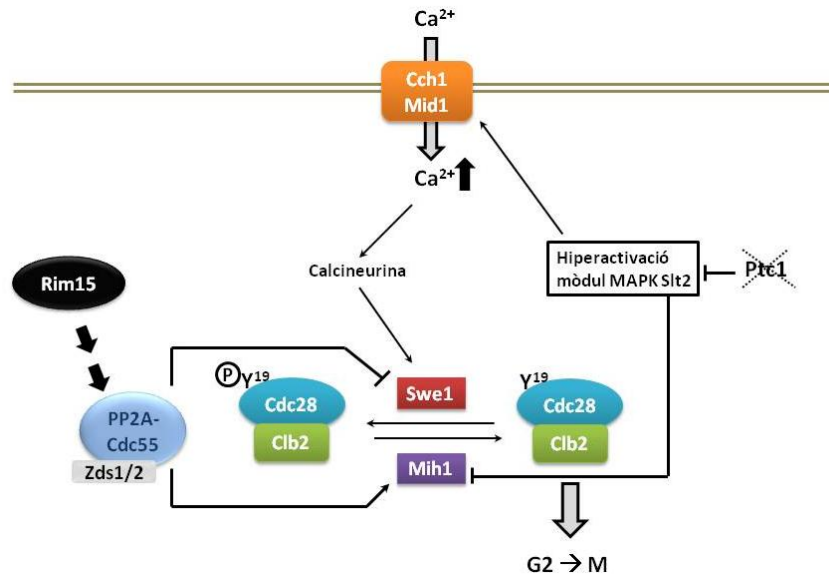


Figura 47. Model de la regulació de la transició G2/M degut a la hiperactivació del mòdul MAPK Slr2 en un mutant *ptc1*.

Recentment s'ha descrit que Ptc1 interacciona amb Bck1 a través de la proteïna adaptadora Nbp2 (Stanger et al. 2012) tot i que no hi ha cap evidència que Bck1 sigui un substrat de Ptc1. El conjunt dels nostres resultats i els obtinguts pels nostres col·laboradors de la UCM indiquen que Mkk1 podria ser una diana directa de la fosfatasa Ptc1. Malauradament, els nostres intents per demostrar experimentalment aquesta hipòtesi han estat obstaculitzats per la gran dificultat de sobreexpressar aquesta MAPKK en *S. cerevisiae*, la qual cosa no ens ha permès aïllar Mkk1 fosforilat *in vivo* en quantitats suficients per dur a terme experiments de desfosforilació *in vitro* amb Ptc1 recombinant. En el moment d'escriure aquestes línies estem

RESULTATS I DISCUSSIÓ

posant a punt la reconstitució *in vitro* de tot el mòdul MAPK amb proteïnes recombinants a fi i efecte de comprovar la nostre hipòtesi.

VII. CONCLUSIONS

- 1) La cerca de gens supressors que en multicòpia alleugereren el fenotip de sensibilitat a CFW, pH alcalí o rapamicina del mutant *ptc1* ha produït un total de 25 gens. La gran majoria estan implicats en la regulació del cicle cel·lular, la funció vacuolar i el tràfic de proteïnes, i amb la integritat de la paret cel·lular.
- 2) La cerca de supressors no ha proporcionat cap altra isoforma de la família PTC, la qual cosa reforça el concepte que les propietats biològiques de Ptc1 són específiques d'aquesta isoforma i no les comparteix amb els altres 6 membres de les PP2C.
- 3) S'han identificat nombroses interaccions genètiques entre *PTC1* i els gens de les proteïnes quinases no essencials confirmant l'ampli espectre funcional de la fosfatasa Ptc1. Aquesta informació obre noves vies d'investigació per identificar els substrats d'aquesta fosfatasa.
- 4) La sobreexpressió de versions de *BCK1* probablement deficientes en l'activitat quinasa, així com la deleció dels elements del mòdul quinasa de la via CWI milloren el creixement del mutant *ptc1* enfront diverses condicions on no es requereix la integritat de la via CWI. Per aquests motius, proposem la hiperactivació del mòdul MAPK de la via CWI com una de les bases de molts dels fenotips derivats de la pèrdua de la funció de Ptc1.
- 5) Les dues aproximacions genètiques utilitzades indiquen que la hiperactivació del mòdul MAPK de la via CWI en una soca *ptc1Δ* podria ser la causa de la sensibilitat a CaCl_2 d'aquest mutant, que té com origen la hiperactivació de la calcineurina.
- 6) Els resultats obtinguts en la cerca de supressors indiquen una relació entre la fosfatasa Ptc1, la via de la integritat de la paret cel·lular i el cicle cel·lular. Proposem un model on la pèrdua de la funció de Ptc1 augmenta l'activació de Slr2, que comportaria un retràs en la transició de les fases G2/M de dues formes. Per una banda, Slr2 inhibiria de manera immediata la funció de Mih1 i/o activaria la quinasa Swe1. Per altra, la hiperactivació de la calcineurina induiria un augment de l'activitat de Swe1. Com a resultat, l'activitat de la quinasa Cdc28 seria limitant en el mutant *ptc1*, relacionant per primera vegada aquesta fosfatasa amb la regulació del cicle cel·lular.
- 7) La deleció de *Mkk1*, però no la de *Mkk2*, en un mutant *ptc1* millora tots els defectes derivats de la manca de la fosfatasa Ptc1 reforçant la idea que *Mkk1* és la principal MAPKK de la via de la integritat de la paret cel·lular. Així, proposem la proteïna *Mkk1* com a possible diana de Ptc1.
- 8) La sobreexpressió de les PP2Ac en un mutant *ptc1* incrementa els nivells del complex Tap42-Pph21 els quals són més baixos en una soca *ptc1Δ*. Aquest fet pot ser la causa de la millora del creixement en presència de rapamicina del mutant *ptc1* quan es sobreexpressen les PP2Ac.

CONCLUSIONS

- 9) L'estudi dels requeriments post-traduccionals de Pph21 per la formació dels diversos complexos de les PP2A suggereixen que en un mutant *ptc1* es necessiten diversos complexos de les PP2A més o menys específics per millorar els defectes associats a la pèrdua de Ptc1 en presència de rapamicina, CFW i CaCl₂.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Adams, A., Gottschling, D.E., Kaiser, C.A. & Stearns, T., 1997. *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Alepuz, P.M., Cunningham, K.W. & Estruch, F., 1997. Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated ENA1 gene. *Molecular microbiology*, 26(0950-382; 1), pp.91–98.
- Alic, N., Felder, T., Temple, M.D., Gloeckner, C., Higgins, V.J., Briza, P. & Dawes, I.W., 2004. Genome-wide transcriptional responses to a lipid hydroperoxide: adaptation occurs without induction of oxidant defenses. *Free Radic.Biol.Med.*, 37(0891-5849; 1), pp.23–35.
- Altman, R. & Kellogg, D., 1997. Control of mitotic events by Nap1 and the Gin4 kinase. *J.Cell Biol.*, 138(0021-9525; 1), pp.119–130.
- Arino, J., 2010. Integrative responses to high pH stress in *S. cerevisiae*. *Omics : a journal of integrative biology*, 14(5), pp.517–523.
- Arino, J., Casamayor, A. & Gonzalez, A., 2011. Type 2C protein phosphatases in fungi. *Eukaryotic cell*, 10(1), pp.21–33.
- Ariño, J., Ramos, J. & Sychrová, H., 2010. Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 74(1), pp.95–120.
- Bandhakavi, S., McCann, R.O., Hanna, D.E. & Glover, C.V.C., 2003. A positive feedback loop between protein kinase CKII and Cdc37 promotes the activity of multiple protein kinases. *The Journal of biological chemistry*, 278(5), pp.2829–36.
- Baro, B., Rodriguez-Rodriguez, J.-A., Calabria, I., Hernández, M.L., Gil, C. & Queralt, E., 2013. Dual Regulation of the mitotic exit network (MEN) by PP2A-Cdc55 phosphatase. *PLoS genetics*, 9(12), p.e1003966.
- Barral, Y., Parra, M., Bidlingmaier, S. & Snyder, M., 1999. Nim1-related kinases coordinate cell cycle progression with the organization of the peripheral cytoskeleton in yeast. *Genes & development*, 13(2), pp.176–87.
- Batiza, A.F., Schulz, T. & Masson, P.H., 1996. Yeast respond to hypotonic shock with a calcium pulse. *Journal of Biological Chemistry*, 271(0021-9258; 38), pp.23357–23362.
- Beck, T. & Hall, M.N., 1999. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors 2. *Nature*, 402(0028-0836; 6762), pp.689–692.
- Bermejo, C., Rodriguez, E., Garcia, R., Rodriguez-Pena, J.M., Rodriguez de la Concepcion, M.L., Rivas, C., Arias, P., Nombela, C., Posas, F. & Arroyo, J., 2008. The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Molecular biology of the cell*, 19(3), pp.1113–1124.
- Birchwood, C.J., Saba, J.D., Dickson, R.C. & Cunningham, K.W., 2001. Calcium influx and signaling in yeast stimulated by intracellular sphingosine 1-phosphate accumulation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(0021-9258; 15), pp.11712–11718.
- Bonangelino, C.J., Chavez, E.M. & Bonifacino, J.S., 2002. Genomic screen for vacuolar protein sorting genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 13(7), pp.2486–2501.

BIBLIOGRAFIA

Bonilla, M. & Cunningham, K.W., 2002. Calcium release and influx in yeast: TRPC and VGCC rule another kingdom. *Sci.STKE.*, 2002(1525-8882; 127), p.E17.

Bonilla, M. & Cunningham, K.W., 2003. Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca²⁺ signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Mol.Biol.Cell*, 14(1059-1524; 10), pp.4296–4305.

Booher, R.N., Deshaies, R.J. & Kirschner, M.W., 1993. Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. *The EMBO journal*, 12(9), pp.3417–26.

Boustany, L.M. & Cyert, M.S., 2002. Calcineurin-dependent regulation of Crz1p nuclear export requires Msn5p and a conserved calcineurin docking site. *Genes Dev.*, 16(0890-9369; 5), pp.608–619.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, pp.248–54.

Breeden, L.L., 2003. Periodic transcription: a cycle within a cycle. *Current biology : CB*, 13(1), pp.R31–8.

Buehrer, B.M. & Errede, B., 1997. Coordination of the mating and cell integrity mitogen-activated protein kinase pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 17(0270-7306; 11), pp.6517–6525.

Butow, R.A. & Avadhani, N.G., 2004. Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol.Cell*, 14(1097-2765; 1), pp.1–15.

Cappellaro, C., Baldermann, C., Rachel, R. & Tanner, W., 1994. Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of α - and α -agglutinin 1. *The EMBO journal*, 13(0261-4189; 20), pp.4737–4744.

Cardenas, M.E., Cutler, N.S., Lorenz, M.C., Di Como, C.J. & Heitman, J., 1999. The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev.*, 13(0890-9369; 24), pp.3271–3279.

Casado, C., Gonzalez, A., Platara, M., Ruiz, A. & Arino, J., 2011. The role of the protein kinase A pathway in the response to alkaline pH stress in yeast. *The Biochemical journal*, 438(3), pp.523–533.

Cheng, A., Kaldis, P. & Solomon, M.J., 2000. Dephosphorylation of human cyclin-dependent kinases by protein phosphatase type 2C α and β 2 isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 275(0021-9258; 44), pp.34744–34749.

Cheng, A., Ross, K.E., Kaldis, P. & Solomon, M.J., 1999. Dephosphorylation of cyclin-dependent kinases by type 2C protein phosphatases. *Genes & development*, 13(22), pp.2946–57.

Cheng, V., Stotz, H.U., Hippchen, K. & Bakalinsky, A.T., 2007. Genome-wide screen for oxalate-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(18), pp.5919–5927.

Christianson, T.W., Sikorski, R.S., Dante, M., Shero, J.H. & Hieter, P., 1992. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene*, 110(1), pp.119–22.

Cohen, P., 1989. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu.Rev.Biochem.*, 58(0066-4154), pp.453–508.

Cohen, P.T., 1997. Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life 2. *Trends Biochem.Sci.*, 22(0968-0004; 7), pp.245–251.

- Cohen, P.T., 2002. Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J.Cell Sci.*, 115(0021-9533), pp.241–256.
- Collister, M., Didmon, M.P., MacIsaac, F., Stark, M.J., MacDonald, N.Q. & Keyse, S.M., 2002. YIL113w encodes a functional dual-specificity protein phosphatase which specifically interacts with and inactivates the Slit2/Mpk1p MAP kinase in *S. cerevisiae*. *FEBS letters*, 527(0014-5793; 1-3), pp.186–192.
- Di Como, C.J. & Arndt, K.T., 1996. Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev.*, 10(0890-9369; 15), pp.1904–1916.
- Di Como, C.J. & Jiang, Y., 2006. The association of Tap42 phosphatase complexes with TORC1: another level of regulation in Tor signaling. *Cell Cycle*, 5(1551-4005; 23), pp.2729–2732.
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H.N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Teixeira, M. & Thevelein, J.M., 2014. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews*, 38(2), pp.254–99.
- Cooper, T.G., 2002. Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. *FEMS Microbiol.Rev.*, 26(0168-6445; 3), pp.223–238.
- Crespo, J.L. & Hall, M.N., 2002. Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae* 2. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, 66(1092-2172; 4), pp.579–91, table.
- Cyert, M.S., 2003. Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. *Biochemical and biophysical research communications*, 311(0006-291; 4), pp.1143–1150.
- Cyert, M.S., Kunisawa, R., Kaim, D. & Thorner, J., 1991. Yeast has homologs (CNA1 and CNA2 gene products) of mammalian calcineurin, a calmodulin-regulated phosphoprotein phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(0027-8424; 16), pp.7376–7380.
- Das, A.K., Helps, N.R., Cohen, P.T. & Barford, D., 1996. Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *The EMBO journal*, 15(0261-4189; 24), pp.6798–6809.
- Davenport, K.R., Sohaskey, M., Kamada, Y., Levin, D.E. & Gustin, M.C., 1995. A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 270(0021-9258; 50), pp.30157–30161.
- De, V.C. & Loewith, R., 2006. Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. *Oncogene*, 25(0950-9232; 48), pp.6392–6415.
- Denis, V. & Cyert, M.S., 2002. Internal Ca²⁺ release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *J.Cell Biol.*, 156(0021-9525; 1), pp.29–34.
- Dobbelaere, J., Gentry, M.S., Hallberg, R.L. & Barral, Y., 2003. Phosphorylation-dependent regulation of septin dynamics during the cell cycle. *Developmental cell*, 4(3), pp.345–57.
- Doi, K., Gartner, A., Ammerer, G., Errede, B., Shinkawa, H., Sugimoto, K. & Matsumoto, K., 1994. MSG5, a novel protein phosphatase promotes adaptation to pheromone response in *S. cerevisiae*. *The EMBO journal*, 13(0261-4189; 1), pp.61–70.
- Van Drogen, F. & Peter, M., 2002. Spa2p functions as a scaffold-like protein to recruit the Mpk1p MAP kinase module to sites of polarized growth. *Current biology : CB*, 12(0960-9822; 19), pp.1698–1703.
- Du, Y., Walker, L., Novick, P. & Ferro-Novick, S., 2006. Ptc1p regulates cortical ER inheritance via Slit2p. *The EMBO journal*, 25(19), pp.4413–22.

BIBLIOGRAFIA

- Dubouloz, F., Deloche, O., Wanke, V., Camerini, E. & De, V.C., 2005. The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast. *Mol.Cell*, 19(1097-2765; 1), pp.15–26.
- Duvel, K., Santhanam, A., Garrett, S., Schnepfer, L. & Broach, J.R., 2003. Multiple roles of Tap42 in mediating rapamycin-induced transcriptional changes in yeast. *Mol.Cell*, 11(1097-2765; 6), pp.1467–1478.
- Errede, B., Cade, R.M., Yashar, B.M., Kamada, Y., Levin, D.E., Irie, K. & Matsumoto, K., 1995. Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Molecular reproduction and development*, 42(1040-452; 4), pp.477–485.
- Evans, D.R. & Stark, M.J., 1997. Mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* type 2A protein phosphatase catalytic subunit reveal roles in cell wall integrity, actin cytoskeleton organization and mitosis. *Genetics*, 145(2), pp.227–41.
- Fagarasanu, A. & Rachubinski, R.A., 2007. Orchestrating organelle inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current opinion in microbiology*, 10(6), pp.528–538.
- Farcasanu, I.C., Hirata, D., Tsuchiya, E., Nishiyama, F. & Miyakawa, T., 1995. Protein phosphatase 2B of *Saccharomyces cerevisiae* is required for tolerance to manganese, in blocking the entry of ions into the cells 1. *European journal of biochemistry / FEBS*, 232(0014-2956; 3), pp.712–717.
- Farrell, A. & Morgan, D.O., 2000. Cdc37 promotes the stability of protein kinases Cdc28 and Cak1. *Molecular and cellular biology*, 20(3), pp.749–54.
- Ferrigno, P., Posas, F., Koepp, D., Saito, H. & Silver, P.A., 1998. Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *The EMBO journal*, 17(0261-4189; 19), pp.5606–5614.
- Fischer, M., Schnell, N., Chattaway, J., Davies, P., Dixon, G. & Sanders, D., 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* CCH1 gene is involved in calcium influx and mating. *FEBS letters*, 419(0014-5793; 2-3), pp.259–262.
- Flandez, M., Cosano, I.C., Nombela, C., Martin, H. & Molina, M., 2004. Reciprocal regulation between Slt2 MAPK and isoforms of Msg5 dual-specificity protein phosphatase modulates the yeast cell integrity pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279(0021-9258; 12), pp.11027–11034.
- Fong, C.S., Temple, M.D., Alic, N., Chiu, J., Durchdewald, M., Thorpe, G.W., Higgins, V.J. & Dawes, I.W., 2008. Oxidant-induced cell-cycle delay in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the SWI6 transcription factor. *FEMS yeast research*, 8(3), pp.386–399.
- Foor, F., Parent, S.A., Morin, N., Dahl, A.M., Ramadan, N., Chrebet, G., Bostian, K.A. & Nielsen, J.B., 1992. Calcineurin mediates inhibition by FK506 and cyclosporin of recovery from alpha-factor arrest in yeast. *Nature*, 360(6405), pp.682–4.
- Gan, X., Kitakawa, M., Yoshino, K.-I., Oshiro, N., Yonezawa, K. & Isono, K., 2002. Tag-mediated isolation of yeast mitochondrial ribosome and mass spectrometric identification of its new components. *European journal of biochemistry / FEBS*, 269(21), pp.5203–14.
- Garcia, R., Bermejo, C., Grau, C., Perez, R., Rodriguez-Pena, J.M., Francois, J., Nombela, C. & Arroyo, J., 2004. The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279(0021-9258; 15), pp.15183–15195.

- Garcia, R., Rodriguez-Pena, J.M., Bermejo, C., Nombela, C. & Arroyo, J., 2009. The high osmotic response and cell wall integrity pathways cooperate to regulate transcriptional responses to zymolyase-induced cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 284(16), pp.10901–10911.
- Gentry, M.S., Li, Y., Wei, H., Syed, F.F., Patel, S.H., Hallberg, R.L. & Pallas, D.C., 2005. A novel assay for protein phosphatase 2A (PP2A) complexes in vivo reveals differential effects of covalent modifications on different *Saccharomyces cerevisiae* PP2A heterotrimers. *Eukaryotic cell*, 4(6), pp.1029–40.
- Georis, I., Tate, J.J., Cooper, T.G. & Dubois, E., 2008. Tor pathway control of the nitrogen-responsive DAL5 gene bifurcates at the level of Gln3 and Gat1 regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(0021-9258; 14), pp.8919–8929.
- Gerber, M.R., Farrell, A., Deshaies, R.J., Herskowitz, I. & Morgan, D.O., 1995. Cdc37 is required for association of the protein kinase Cdc28 with G1 and mitotic cyclins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10), pp.4651–5.
- Gey, U., Czupalla, C., Hoflack, B., Rodel, G. & Krause-Buchholz, U., 2008. Yeast pyruvate dehydrogenase complex is regulated by a concerted activity of two kinases and two phosphatases. *Journal of Biological Chemistry*, 283(0021-9258; 15), pp.9759–9767.
- Giaever, G. et al., 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 418(0028-0836; 6896), pp.387–391.
- Gietz, R.D. & Sugino, A., 1988. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, 74(0378-1119; 2), pp.527–534.
- Goffeau, A. et al., 1996. Life with 6000 Genes. *Science*, 274(5287), pp.546–567.
- Gonzalez, A., Ruiz, A., Casamayor, A. & Arino, J., 2009. Normal function of the yeast TOR pathway requires the type 2C protein phosphatase Ptc1. *Molecular and cellular biology*, 29(10), pp.2876–2888.
- González, A., Ruiz, A., Serrano, R., Ariño, J. & Casamayor, A., 2006. Transcriptional profiling of the protein phosphatase 2C family in yeast provides insights into the unique functional roles of Ptc1. *The Journal of biological chemistry*, 281(46), pp.35057–69.
- Gupta, S.S., Ton, V.K., Beaudry, V., Rulli, S., Cunningham, K. & Rao, R., 2003. Antifungal activity of amiodarone is mediated by disruption of calcium homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(0021-9258; 31), pp.28831–28839.
- Hahn, J.S. & Thiele, D.J., 2002. Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Slt2 kinase pathway by the stress-inducible Sdp1 dual specificity phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(0021-9258; 24), pp.21278–21284.
- Halachmi, D. & Eilam, Y., 1989. Cytosolic and vacuolar Ca²⁺ concentrations in yeast cells measured with the Ca²⁺-sensitive fluorescence dye indo-1. *FEBS letters*, 256(0014-5793; 1-2), pp.55–61.
- Hardwick, J.S., Kuruvilla, F.G., Tong, J.K., Shamji, A.F. & Schreiber, S.L., 1999. Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(0027-8424; 26), pp.14866–14870.
- Harrison, J.C., Bardes, E.S., Ohya, Y. & Lew, D.J., 2001. A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint. *Nature cell biology*, 3(4), pp.417–20.

BIBLIOGRAFIA

- Harvey, S.L., Charlet, A., Haas, W., Gygi, S.P. & Kellogg, D.R., 2005. Cdk1-dependent regulation of the mitotic inhibitor Wee1. *Cell*, 122(3), pp.407–20.
- Harvey, S.L., Enciso, G., Dephoure, N., Gygi, S.P., Gunawardena, J. & Kellogg, D.R., 2011. A phosphatase threshold sets the level of Cdk1 activity in early mitosis in budding yeast. *Molecular biology of the cell*, 22(19), pp.3595–608.
- Healy, A.M., Zolnierowicz, S., Stapleton, A.E., Goebel, M., DePaoli-Roach, A.A. & Pringle, J.R., 1991. CDC55, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in cellular morphogenesis: identification, characterization, and homology to the B subunit of mammalian type 2A protein phosphatase. *Molecular and cellular biology*, 11(11), pp.5767–80.
- Heath, V.L., Shaw, S.L., Roy, S. & Cyert, M.S., 2004. Hph1p and Hph2p, novel components of calcineurin-mediated stress responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell*, 3(1535-9778; 3), pp.695–704.
- Heitman, J., Movva, N.R. & Hall, M.N., 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science (New York, N.Y.)*, 253(5022), pp.905–909.
- Helliwell, S.B., Wagner, P., Kunz, J., Deuter-Reinhard, M., Henriquez, R. & Hall, M.N., 1994. TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Molecular biology of the cell*, 5(1), pp.105–18.
- Hermansyah, Sugiyama, M., Kaneko, Y. & Harashima, S., 2009. Yeast protein phosphatases Ptp2p and Msg5p are involved in G1-S transition, CLN2 transcription, and vacuole morphogenesis. *Archives of microbiology*, 191(9), pp.721–33.
- Hibbs, M.A., Hess, D.C., Myers, C.L., Huttenhower, C., Li, K. & Troyanskaya, O.G., 2007. Exploring the functional landscape of gene expression: directed search of large microarray compendia. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(20), pp.2692–9.
- Hohmann, S. & Mager, W.H. eds., 2003. *Yeast Stress Responses*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Hombauer, H., Weismann, D., Mudrak, I., Stanzel, C., Fellner, T., Lackner, D.H. & Ogris, E., 2007. Generation of active protein phosphatase 2A is coupled to holoenzyme assembly. *PLoS biology*, 5(6), p.e155.
- Van Hoof, C., Martens, E., Longin, S., Jordens, J., Stevens, I., Janssens, V. & Goris, J., 2005. Specific interactions of PP2A and PP2A-like phosphatases with the yeast PTPA homologues, Ypa1 and Ypa2. *The Biochemical journal*, 386(Pt 1), pp.93–102.
- Hruby, A., Zapatka, M., Heucke, S., Rieger, L., Wu, Y., Nussbaumer, U., Timmermann, S., Dünkler, A. & Johnsson, N., 2011. A constraint network of interactions: protein-protein interaction analysis of the yeast type II phosphatase Ptc1p and its adaptor protein Nbp2p. *Journal of cell science*, 124(Pt 1), pp.35–46.
- Hu, G.Z. & Ronne, H., 1994. Overexpression of yeast PAM1 gene permits survival without protein phosphatase 2A and induces a filamentous phenotype. *The Journal of biological chemistry*, 269(5), pp.3429–35.
- Huang, K.N. & Symington, L.S., 1995. Suppressors of a *Saccharomyces cerevisiae* *pkc1* mutation identify alleles of the phosphatase gene *PTC1* and of a novel gene encoding a putative basic leucine zipper protein. *Genetics*, 141(0016-6731; 4), pp.1275–1285.

Huxley, C., Green, E.D. & Dunham, I., 1990. Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR. *Trends in genetics : TIG*, 6(8), p.236.

Iida, H., Yagawa, Y. & Anraku, Y., 1990. Essential role for induced Ca²⁺ influx followed by [Ca²⁺]_i rise in maintaining viability of yeast cells late in the mating pheromone response pathway. A study of [Ca²⁺]_i in single *Saccharomyces cerevisiae* cells with imaging of fura-2. *Journal of Biological Chemistry*, 265(0021-9258; 22), pp.13391–13399.

Ingebritsen, T.S. & Cohen, P., 1983. Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation 1. *Science*, 221(0036-8075; 4608), pp.331–338.

Inoki, K., Ouyang, H., Li, Y. & Guan, K.L., 2005. Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, 69(1092-2172; 1), pp.79–100.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. & Kimura, A., 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology*, 153, pp.163–168.

Ito, T., Tashiro, K., Muta, S., Ozawa, R., Chiba, T., Nishizawa, M., Yamamoto, K., Kuhara, S. & Sakaki, Y., 2000. Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: A comprehensive system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between the yeast proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(0027-8424; 3), pp.1143–1147.

Jacinto, E., Guo, B., Arndt, K.T., Schmelzle, T. & Hall, M.N., 2001. TIP41 interacts with TAP42 and negatively regulates the TOR signaling pathway. *Mol.Cell*, 8(1097-2765; 5), pp.1017–1026.

Jacoby, T., Flanagan, H., Faykin, A., Seto, A.G., Mattison, C. & Ota, I., 1997. Two protein-tyrosine phosphatases inactivate the osmotic stress response pathway in yeast by targeting the mitogen-activated protein kinase, Hog1. *Journal of Biological Chemistry*, 272(0021-9258; 28), pp.17749–17755.

Jiang, B., Ram, A.F., Sheraton, J., Klis, F.M. & Bussey, H., 1995. Regulation of cell wall beta-glucan assembly: PTC1 negatively affects PBS2 action in a pathway that includes modulation of EXG1 transcription. *Mol.Gen.Genet.*, 248(0026-8925; 3), pp.260–269.

Jiang, L., Whiteway, M., Ramos, C., Rodriguez-Medina, J.R. & Shen, S.H., 2002. The YHR076w gene encodes a type 2C protein phosphatase and represents the seventh PP2C gene in budding yeast. *FEBS letters*, 527(0014-5793; 1-3), pp.323–325.

Jiang, Y., 2006. Regulation of the cell cycle by protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 70(2), pp.440–9.

Jiang, Y. & Broach, J.R., 1999. Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *The EMBO journal*, 18(0261-4189; 10), pp.2782–2792.

Jimenez-Sanchez, M., Cid, V.J. & Molina, M., 2007. Retrophosphorylation of Mkk1 and Mkk2 MAPKs by the Sit2 MAPK in the yeast cell integrity pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 282(0021-9258; 43), pp.31174–31185.

Jin, Y., Taylor, E.P., Tang, F. & Weisman, L.S., 2009. PTC1 is required for vacuole inheritance and promotes the association of the myosin-V vacuole-specific receptor complex. *Mol.Biol.Cell*, 20(1939-4586; 5), pp.1312–1323.

Johnson, S.A. & Hunter, T., 2005. Kinomics: methods for deciphering the kinome. *Nature methods*, 2(1), pp.17–25.

BIBLIOGRAFIA

- Jorgensen, P., Rupes, I., Sharom, J.R., Schneper, L., Broach, J.R. & Tyers, M., 2004. A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes & development*, 18(20), pp.2491–2505.
- Journo, D., Mor, A. & Abeliovich, H., 2009. Aup1-mediated regulation of Rtg3 during mitophagy. *The Journal of biological chemistry*, 284(51), pp.35885–35895.
- Juanes, M.A., Khoueiry, R., Kupka, T., Castro, A., Mudrak, I., Ogris, E., Lorca, T. & Piatti, S., 2013. Budding yeast greatwall and endosulfines control activity and spatial regulation of PP2A(Cdc55) for timely mitotic progression. *PLoS genetics*, 9(7), p.e1003575.
- Juneau, K., Nislow, C. & Davis, R.W., 2009. Alternative splicing of PTC7 in *Saccharomyces cerevisiae* determines protein localization. *Genetics*, 183(1), pp.185–194.
- Kafadar, K.A. & Cyert, M.S., 2004. Integration of stress responses: modulation of calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae* by protein kinase A. *Eukaryot. Cell*, 3(1535-9778; 5), pp.1147–1153.
- Kafadar, K.A., Zhu, H., Snyder, M. & Cyert, M.S., 2003. Negative regulation of calcineurin signaling by Hrr25p, a yeast homolog of casein kinase I. *Genes Dev.*, 17(0890-9369; 21), pp.2698–2708.
- Kaldis, P., Sutton, A. & Solomon, M.J., 1996. The Cdk-activating kinase (CAK) from budding yeast. *Cell*, 86(4), pp.553–64.
- Kamada, Y., Jung, U.S., Piotrowski, J. & Levin, D.E., 1995. The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev.*, 9(0890-9369; 13), pp.1559–1571.
- Kamada, Y., Sekito, T. & Ohsumi, Y., 2004. Autophagy in yeast: a TOR-mediated response to nutrient starvation. *Current topics in microbiology and immunology*, 279(0070-217), pp.73–84.
- Kane, P.M., 2006. The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 70(1), pp.177–191.
- Kapitzky, L., Beltrao, P., Berens, T.J., Gassner, N., Zhou, C., Wüster, A., Wu, J., Babu, M.M., Elledge, S.J., Toczyski, D., Lokey, R.S. & Krogan, N.J., 2010. Cross-species chemogenomic profiling reveals evolutionarily conserved drug mode of action. *Molecular systems biology*, 6, p.451.
- Keith, C.T. & Schreiber, S.L., 1995. PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5233), pp.50–1.
- Kellermayer, R., Aiello, D.P., Miseta, A. & Bedwell, D.M., 2003. Extracellular Ca²⁺ sensing contributes to excess Ca²⁺ accumulation and vacuolar fragmentation in a *pmr1*Δ mutant of *S. cerevisiae*. *Journal of cell science*, 116(Pt 8), pp.1637–46.
- Kellogg, D.R. & Murray, A.W., 1995. NAP1 acts with Clb1 to perform mitotic functions and to suppress polar bud growth in budding yeast. *J. Cell Biol.*, 130(0021-9525; 3), pp.675–685.
- Kerk, D., Bulgrien, J., Smith, D.W., Barsam, B., Veretnik, S. & Gribskov, M., 2002. The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of *Arabidopsis* 18. *Plant Physiol*, 129(0032-0889; 2), pp.908–925.
- Kim, K.-Y. & Levin, D.E., 2010. Transcriptional reporters for genes activated by cell wall stress through a non-catalytic mechanism involving Mpk1 and SBF. *Yeast (Chichester, England)*, 27(8), pp.541–8.

- Kim, K.-Y., Truman, A.W., Caesar, S., Schlenstedt, G. & Levin, D.E., 2010. Yeast Mpk1 cell wall integrity mitogen-activated protein kinase regulates nucleocytoplasmic shuttling of the Swi6 transcriptional regulator. *Molecular biology of the cell*, 21(9), pp.1609–19.
- Kim, K.Y., Truman, A.W. & Levin, D.E., 2008. Yeast Mpk1 mitogen-activated protein kinase activates transcription through Swi4/Swi6 by a noncatalytic mechanism that requires upstream signal. *Molecular and cellular biology*, 28(1098-5549; 8), pp.2579–2589.
- Klis, F.M., Boorsma, A. & De Groot, P.W., 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, West Sussex)*, 23(0749-503; 3), pp.185–202.
- Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K. & Brul, S., 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol.Rev.*, 26(0168-6445; 3), pp.239–256.
- Koh, J.L.Y., Ding, H., Costanzo, M., Baryshnikova, A., Toufighi, K., Bader, G.D., Myers, C.L., Andrews, B.J. & Boone, C., 2010. DRYGIN: a database of quantitative genetic interaction networks in yeast. *Nucleic acids research*, 38(Database issue), pp.D502–7.
- Kopecka, M. & Gabriel, M., 1992. The influence of congo red on the cell wall and (1----3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, 158(0302-8933; 2), pp.115–126.
- Krause-Buchholz, U., Gey, U., Wunschmann, J., Becker, S. & Rodel, G., 2006. YIL042c and YOR090c encode the kinase and phosphatase of the *Saccharomyces cerevisiae* pyruvate dehydrogenase complex. *FEBS letters*, 580(0014-5793; 11), pp.2553–2560.
- Kuranda, K., Leberre, V., Sokol, S., Palamarczyk, G. & Francois, J., 2006. Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Molecular microbiology*, 61(0950-382; 5), pp.1147–1166.
- De la Torre-Ruiz, A., Torres, J., Arino, J. & Herrero, E., 2002. Sit4 is required for proper modulation of the biological functions mediated by Pkc1 and the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(0021-9258; 36), pp.33468–33476.
- Lagorce, A., Hauser, N.C., Labourdette, D., Rodriguez, C., Martin-Yken, H., Arroyo, J., Hoheisel, J.D. & Francois, J., 2003. Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(0021-9258; 22), pp.20345–20357.
- Lamb, T.M. & Mitchell, A.P., 2003. The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes NRG1 and SMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 23(0270-7306; 2), pp.677–686.
- Lamb, T.M., Xu, W., Diamond, A. & Mitchell, A.P., 2001. Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 276(0021-9258; 3), pp.1850–1856.
- Lammers, T. & Lavi, S., 2007. Role of type 2C protein phosphatases in growth regulation and in cellular stress signaling. *Crit Rev.Biochem.Mol.Biol.*, 42(1549-7798; 6), pp.437–461.
- Laviña, W.A., Hermansyah, Sugiyama, M., Kaneko, Y. & Harashima, S., 2013. Functionally redundant protein phosphatase genes PTP2 and MSG5 co-regulate the calcium signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae* upon exposure to high extracellular calcium concentration. *Journal of bioscience and bioengineering*, 115(2), pp.138–46.

BIBLIOGRAFIA

Lee, K.S., Hines, L.K. & 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. *Molecular and cellular biology*, 13(0270-7306; 9), pp.5843–5853.

Lee, K.S. & Levin, D.E., 1992. Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Molecular and cellular biology*, 12(0270-7306; 1), pp.172–182.

Lesage, G. & Bussey, H., 2006. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, 70(1092-2172; 2), pp.317–343.

Lesage, G., Sdicu, A.-M., Ménard, P., Shapiro, J., Hussein, S. & Bussey, H., 2004. Analysis of beta-1,3-glucan assembly in *Saccharomyces cerevisiae* using a synthetic interaction network and altered sensitivity to caspofungin. *Genetics*, 167(1), pp.35–49.

Levin, D.E., 2005. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, 69(1092-2172; 2), pp.262–291.

Levin, D.E., 2011. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics*, 189(4), pp.1145–75.

Li, X., Du, Y., Siegel, S., Ferro-Novick, S. & Novick, P., 2010. Activation of the mitogen-activated protein kinase, Slt2p, at bud tips blocks a late stage of endoplasmic reticulum inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 21(10), pp.1772–82.

Li, X., Ferro-Novick, S. & Novick, P., 2013. Different polarisome components play distinct roles in Slt2p-regulated cortical ER inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 24(19), pp.3145–54.

Liu, Z. & Butow, R.A., 2006. Mitochondrial retrograde signaling. *Annual Review of Genetics*, 40, pp.159–185.

Lockshon, D., Surface, L.E., Kerr, E.O., Kaeberlein, M. & Kennedy, B.K., 2007. The sensitivity of yeast mutants to oleic acid implicates the peroxisome and other processes in membrane function. *Genetics*, 175(1), pp.77–91.

Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J.L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P. & Hall, M.N., 2002. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular cell*, 10(3), pp.457–468.

Ma, X.J., Lu, Q. & Grunstein, M., 1996. A search for proteins that interact genetically with histone H3 and H4 amino termini uncovers novel regulators of the Swe1 kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development*, 10(11), pp.1327–40.

MacLean, M. & Picard, D., 2003. Cdc37 goes beyond Hsp90 and kinases. *Cell stress & chaperones*, 8(2), pp.114–9.

Madden, K., Sheu, Y.J., Baetz, K., Andrews, B. & Snyder, M., 1997. SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science*, 275(0036-8075; 5307), pp.1781–1784.

Maeda, T., Tsai, A.Y. & Saito, H., 1993. Mutations in a protein tyrosine phosphatase gene (PTP2) and a protein serine/threonine phosphatase gene (PTC1) cause a synthetic growth defect in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 13(0270-7306; 9), pp.5408–5417.

- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M. & Saito, H., 1994. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, 369(0028-0836; 6477), pp.242–245.
- Mandal, A.K., Lee, P., Chen, J.A., Nillegoda, N., Heller, A., DiStasio, S., Oen, H., Victor, J., Nair, D.M., Brodsky, J.L. & Caplan, A.J., 2007. Cdc37 has distinct roles in protein kinase quality control that protect nascent chains from degradation and promote posttranslational maturation. *The Journal of cell biology*, 176(3), pp.319–28.
- Manning, G., Plowman, G.D., Hunter, T. & Sudarsanam, S., 2002. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends in biochemical sciences*, 27(10), pp.514–520.
- Mapes, J. & Ota, I.M., 2004. Nbp2 targets the Ptc1-type 2C Ser/Thr phosphatase to the HOG MAPK pathway. *The EMBO journal*, 23(0261-4189; 2), pp.302–311.
- Markovich, S., Yekutieli, A., Shalit, I., Shadkchan, Y. & Osherov, N., 2004. Genomic approach to identification of mutations affecting caspofungin susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(0066-4804; 10), pp.3871–3876.
- Marsolier, M.C., Roussel, P., Leroy, C. & Mann, C., 2000. Involvement of the PP2C-like phosphatase Ptc2p in the DNA checkpoint pathways of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 154(0016-6731; 4), pp.1523–1532.
- Martín, H., Rodríguez-Pachón, J.M., Ruiz, C., Nombela, C. & Molina, M., 2000. Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 275(2), pp.1511–9.
- Martinez-Anaya, C., Dickinson, J.R. & Sudbery, P.E., 2003. In yeast, the pseudohyphal phenotype induced by isoamyl alcohol results from the operation of the morphogenesis checkpoint. *Journal of cell science*, 116(Pt 16), pp.3423–31.
- Martínez-Muñoz, G.A. & Kane, P., 2008. Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *The Journal of biological chemistry*, 283(29), pp.20309–19.
- Martín-Montalvo, A., González-Mariscal, I., Pomares-Viciano, T., Padilla-López, S., Ballesteros, M., Vazquez-Fonseca, L., Gandolfo, P., Brautigan, D.L., Navas, P. & Santos-Ocaña, C., 2013. The phosphatase Ptc7 induces coenzyme Q biosynthesis by activating the hydroxylase Coq7 in yeast. *The Journal of biological chemistry*, 288(39), pp.28126–37.
- Matheos, D.P., Kingsbury, T.J., Ahsan, U.S. & Cunningham, K.W., 1997. Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, 11(0890-9369; 24), pp.3445–3458.
- Matsumoto, T.K., Ellsmore, A.J., Cessna, S.G., Low, P.S., Pardo, J.M., Bressan, R.A. & Hasegawa, P.M., 2002. An osmotically induced cytosolic Ca²⁺ transient activates calcineurin signaling to mediate ion homeostasis and salt tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(0021-9258; 36), pp.33075–33080.
- Mattison, C.P., Spencer, S.S., Kresge, K.A., Lee, J. & Ota, I.M., 1999. Differential regulation of the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast by the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3. *Molecular and cellular biology*, 19(0270-7306; 11), pp.7651–7660.
- Mayer-Jaekel, R.E. & Hemmings, B.A., 1994. Protein phosphatase 2A--a "ménage à trois". *Trends in cell biology*, 4(8), pp.287–91.

BIBLIOGRAFIA

- Mayer-Jaekel, R.E., Ohkura, H., Ferrigno, P., Andjelkovic, N., Shiomi, K., Uemura, T., Glover, D.M. & Hemmings, B.A., 1994. Drosophila mutants in the 55 kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A show strongly reduced ability to dephosphorylate substrates of p34cdc2. *Journal of cell science*, 107 (Pt 9, pp.2609–16.
- McMillan, J.N., Theesfeld, C.L., Harrison, J.C., Bardes, E.S.G. & Lew, D.J., 2002. Determinants of Swe1p degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 13(10), pp.3560–75.
- Mendenhall, M.D. & Hodge, A.E., 1998. Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 62(4), pp.1191–243.
- Mendizabal, I., Rios, G., Mulet, J.M., Serrano, R. & de Larrinoa, I.F., 1998. Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS letters*, 425(2), pp.323–8.
- Mendoza, I., Rubio, F., Rodriguez-Navarro, A. & Pardo, J.M., 1994. The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 269(12), pp.8792–8796.
- Miyakawa, T. & Mizunuma, M., 2007. Physiological roles of calcineurin in *Saccharomyces cerevisiae* with special emphasis on its roles in G2/M cell-cycle regulation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71(3), pp.633–45.
- Miyata, Y. & Nishida, E., 2004. Supervision of multiple signaling protein kinases by the CK2-Cdc37 couple, a possible novel cancer therapeutic target. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1030, pp.150–7.
- Mizunuma, M., Hirata, D., Miyahara, K., Tsuchiya, E. & Miyakawa, T., 1998. Role of calcineurin and Mpk1 in regulating the onset of mitosis in budding yeast. *Nature*, 392(6673), pp.303–6.
- Mollapour, M., Fong, D.N., Balakrishnan, K., Harris, N., Thompson, S., Schuller, C., Kuchler, K. & Piper, P.W., 2004. Screening the yeast deletion mutant collection for hypersensitivity and hyper-resistance to sorbate, a weak organic acid food preservative. *Yeast (Chichester, West Sussex)*, 21(11), pp.927–946.
- Mollapour, M., Phelan, J.P., Millson, S.H., Piper, P.W. & Cooke, F.T., 2006. Weak acid and alkali stress regulate phosphatidylinositol bisphosphate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical journal*, 395(1), pp.73–80.
- Moorhead, G.B.G., De Wever, V., Templeton, G. & Kerk, D., 2009. Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *The Biochemical journal*, 417(2), pp.401–9.
- Munoz, I., Simon, E., Casals, N., Clotet, J. & Arino, J., 2003. Identification of multicopy suppressors of cell cycle arrest at the G1-S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, West Sussex)*, 20(0749-503; 2), pp.157–169.
- Nakajima-Shimada, J., Iida, H., Tsuji, F.I. & Anraku, Y., 1991. Monitoring of intracellular calcium in *Saccharomyces cerevisiae* with an apoaequorin cDNA expression system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(0027-8424; 15), pp.6878–6882.
- Nakamura, T., Liu, Y., Hirata, D., Namba, H., Harada, S., Hirokawa, T. & Miyakawa, T., 1993. Protein phosphatase type 2B (calcineurin)-mediated, FK506-sensitive regulation of intracellular ions in yeast is an important determinant for adaptation to high salt stress conditions. *The EMBO journal*, 12(0261-4189; 11), pp.4063–4071.

- Nasmyth, K., 1993. Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. *Current opinion in cell biology*, 5(2), pp.166–79.
- Nelson, H. & Nelson, N., 1990. Disruption of genes encoding subunits of yeast vacuolar H(+)-ATPase causes conditional lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(9), pp.3503–3507.
- Neves, M.J. & Francois, J., 1992. On the mechanism by which a heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical journal*, 288 (Pt 3(0264-6021), pp.859–864.
- De Nobel, H., Ruiz, C., Martin, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M. & Klis, F.M., 2000. Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology*, 146 (Pt 9(1350-0872), pp.2121–2132.
- Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P. & Mann, M., 2006. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*, 127(3), pp.635–648.
- Page, N., Gerard-Vincent, M., Menard, P., Beaulieu, M., Azuma, M., Dijkgraaf, G.J., Li, H., Marcoux, J., Nguyen, T., Dowse, T., Sdicu, A.M. & Bussey, H., 2003. A *Saccharomyces cerevisiae* genome-wide mutant screen for altered sensitivity to K1 killer toxin. *Genetics*, 163(0016-6731; 3), pp.875–894.
- Pal, G., Paraz, M.T.Z. & Kellogg, D.R., 2008. Regulation of Mih1/Cdc25 by protein phosphatase 2A and casein kinase 1. *The Journal of cell biology*, 180(5), pp.931–45.
- Petrezselyova, S., Kinclova-Zimmermannova, O. & Sychrova, H., 2013. Vhc1, a novel transporter belonging to the family of electroneutral cation-Cl(-) cotransporters, participates in the regulation of cation content and morphology of *Saccharomyces cerevisiae* vacuoles. *Biochimica et biophysica acta*, 1828(2), pp.623–31.
- Polizotto, R.S. & Cyert, M.S., 2001. Calcineurin-dependent nuclear import of the transcription factor Crz1p requires Nmd5p. *J.Cell Biol.*, 154(0021-9525; 5), pp.951–960.
- Posas, F. & Saito, H., 1997. Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science*, 276(0036-8075; 5319), pp.1702–1705.
- Powers, T. & Walter, P., 1999. Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 10(4), pp.987–1000.
- Protchenko, O., Rodriguez-Suarez, R., Androphy, R., Bussey, H. & Philpott, C.C., 2006. A screen for genes of heme uptake identifies the FLC family required for import of FAD into the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*, 281(30), pp.21445–21457.
- Pruyne, D. & Bretscher, A., 2000. Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *Journal of cell science*, 113 (Pt 3, pp.365–75.
- Ptacek, J. et al., 2005. Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature*, 438(1476-4687; 7068), pp.679–684.
- Queralt, E. & Uhlmann, F., 2008. Cdk-counteracting phosphatases unlock mitotic exit. *Current opinion in cell biology*, 20(6), pp.661–8.
- Ram, A.F., Wolters, A., Ten, H.R. & Klis, F.M., 1994. A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast (Chichester, West Sussex)*, 10(0749-503; 8), pp.1019–1030.

BIBLIOGRAFIA

- Ramos, C.W., Guldener, U., Klein, S., Hegemann, J.H., Gonzalez, S. & Rodriguez-Medina, J.R., 2000. Molecular analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* YHR076w gene. *IUBMB life*, 50(6), pp.371–377.
- Reiser, V., Ruis, H. & Ammerer, G., 1999. Kinase activity-dependent nuclear export opposes stress-induced nuclear accumulation and retention of Hog1 mitogen-activated protein kinase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Biol.Cell*, 10(1059-1524; 4), pp.1147–1161.
- Van der Rest, M.E., Kamminga, A.H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B. & Konings, W.N., 1995. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol.Rev.*, 59(0146-0749; 2), pp.304–322.
- Reynolds, A., Lundblad, V., Dorris, D. & Keaveney, M., 1997. *Current Protocols in Molecular Biology* 121 F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, & K. Struhl, eds., John Wiley & Sons.
- Robinson, M.K., van Zyl, W.H., Phizicky, E.M. & Broach, J.R., 1994. TPD1 of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a protein phosphatase 2C-like activity implicated in tRNA splicing and cell separation. *Molecular and cellular biology*, 14(0270-7306; 6), pp.3634–3645.
- Rodrigues-Pousada, C., Menezes, R.A. & Pimentel, C., 2010. The Yap family and its role in stress response. *Yeast (Chichester, England)*, 27(5), pp.245–58.
- Roeder, A.D., Hermann, G.J., Keegan, B.R., Thatcher, S.A. & Shaw, J.M., 1998. Mitochondrial inheritance is delayed in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking the serine/threonine phosphatase PTC1. *Mol.Biol.Cell*, 9(1059-1524; 4), pp.917–930.
- Roncero, C. & Duran, A., 1985. Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *Journal of Bacteriology*, 163(0021-9193; 3), pp.1180–1185.
- Rossio, V. & Yoshida, S., 2011. Spatial regulation of Cdc55-PP2A by Zds1/Zds2 controls mitotic entry and mitotic exit in budding yeast. *The Journal of cell biology*, 193(3), pp.445–54.
- Ruan, H., Yan, Z., Sun, H. & Jiang, L., 2007. The YCR079w gene confers a rapamycin-resistant function and encodes the sixth type 2C protein phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 7(1567-1356; 2), pp.209–215.
- Ruiz, A., Gonzalez, A., Garcia-Salcedo, R., Ramos, J. & Arino, J., 2006. Role of protein phosphatases 2C on tolerance to lithium toxicity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology*, 62(0950-382; 1), pp.263–277.
- Ruiz, A., Serrano, R. & Ariño, J., 2008. Direct regulation of genes involved in glucose utilization by the calcium/calcineurin pathway. *The Journal of biological chemistry*, 283(20), pp.13923–33.
- Runner, V.M. & Brewster, J.L., 2003. A genetic screen for yeast genes induced by sustained osmotic stress. *Yeast (Chichester, England)*, 20(10), pp.913–920.
- Russell, P., Moreno, S. & Reed, S.I., 1989. Conservation of mitotic controls in fission and budding yeasts. *Cell*, 57(2), pp.295–303.
- Saito, H. & Posas, F., 2012. Response to hyperosmotic stress. *Genetics*, 192(2), pp.289–318.
- Sakumoto, N. et al., 1999. A series of protein phosphatase gene disruptants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 15(15), pp.1669–1679.

- Sakumoto, N., Matsuoka, I., Mukai, Y., Ogawa, N., Kaneko, Y. & Harashima, S., 2002. A series of double disruptants for protein phosphatase genes in *Saccharomyces cerevisiae* and their phenotypic analysis. *Yeast (Chichester, West Sussex)*, 19(0749-503; 7), pp.587–599.
- Saldanha, A.J., 2004. Java Treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 20(17), pp.3246–8.
- Sambrook, J., Fritsch E F & Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C.P., 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(0027-8424; 11), pp.5857–5864.
- Schweighofer, A., Hirt, H. & Meskiene, I., 2004. Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends in plant science*, 9(1360-1385; 5), pp.236–243.
- Serrano, R., 1996. Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int.Rev.Cytol.*, 165(0074-7696), pp.1–52.
- Serrano, R., Bernal, D., Simón, E. & Ariño, J., 2004a. Copper and iron are the limiting factors for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an alkaline environment. *The Journal of biological chemistry*, 279(19), pp.19698–704.
- Serrano, R., Bernal, D., Simón, E. & Ariño, J., 2004b. Copper and iron are the limiting factors for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an alkaline environment. *The Journal of biological chemistry*, 279(19), pp.19698–704.
- Serrano, R., Kielland-Brandt, M.C. & Fink, G.R., 1986. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. *Nature*, 319(0028-0836; 6055), pp.689–693.
- Serrano, R., Martin, H., Casamayor, A. & Arino, J., 2006. Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the SlT2 MAPK pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 281(0021-9258; 52), pp.39785–39795.
- Serrano, R., Ruiz, A., Bernal, D., Chambers, J.R. & Arino, J., 2002. The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Molecular microbiology*, 46(0950-382; 5), pp.1319–1333.
- Shamji, A.F., Kuruvilla, F.G. & Schreiber, S.L., 2000. Partitioning the transcriptional program induced by rapamycin among the effectors of the Tor proteins. *Current biology : CB*, 10(0960-9822; 24), pp.1574–1581.
- Shi, Y., 2009. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell*, 139(1097-4172; 3), pp.468–484.
- Shimizu, Y., Akashi, T., Okuda, A., Kikuchi, A. & Fukui, K., 2000. NBP1 (Nap1 binding protein 1), an essential gene for G2/M transition of *Saccharomyces cerevisiae*, encodes a protein of distinct sub-nuclear localization. *Gene*, 246(0378-1119; 1-2), pp.395–404.
- Shin, C.-S., Kim, S.Y. & Huh, W.-K., 2009. TORC1 controls degradation of the transcription factor Stp1, a key effector of the SPS amino-acid-sensing pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of cell science*, 122(Pt 12), pp.2089–99.

BIBLIOGRAFIA

Shiozaki, K., Akhavan-Niaki, H., McGowan, C.H. & Russell, P., 1994. Protein phosphatase 2C, encoded by *ptc1+*, is important in the heat shock response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and cellular biology*, 14(0270-7306; 6), pp.3742–3751.

Shiozaki, K. & Russell, P., 1995. Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAP kinase kinase homolog in the osmoregulation of fission yeast. *The EMBO journal*, 14(0261-4189; 3), pp.492–502.

Shitamukai, A., Hirata, D., Sonobe, S. & Miyakawa, T., 2004. Evidence for antagonistic regulation of cell growth by the calcineurin and high osmolarity glycerol pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(0021-9258; 5), pp.3651–3661.

Sia, R.A., Herald, H.A. & Lew, D.J., 1996. Cdc28 tyrosine phosphorylation and the morphogenesis checkpoint in budding yeast. *Molecular biology of the cell*, 7(11), pp.1657–66.

Sikorski, R.S. & Hieter, P., 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122(1), pp.19–27.

Sopko, R., Huang, D., Preston, N., Chua, G., Papp, B., Kafadar, K., Snyder, M., Oliver, S.G., Cyert, M., Hughes, T.R., Boone, C. & Andrews, B., 2006. Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression. *Molecular cell*, 21(3), pp.319–30.

Soulard, A., Cremonesi, A., Moes, S., Schütz, F., Jenö, P. & Hall, M.N., 2010. The rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that TOR controls protein kinase A toward some but not all substrates. *Molecular biology of the cell*, 21(19), pp.3475–86.

Stanger, K., Gorelik, M. & Davidson, A.R., 2012. Yeast adaptor protein, Nbp2p, is conserved regulator of fungal Ptc1p phosphatases and is involved in multiple signaling pathways. *The Journal of biological chemistry*, 287(26), pp.22133–41.

Stark, M.J., 1996. Yeast protein serine/threonine phosphatases: multiple roles and diverse regulation. *Yeast (Chichester, England)*, 12(16), pp.1647–1675.

Stathopoulos, A.M. & Cyert, M.S., 1997. Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev.*, 11(0890-9369; 24), pp.3432–3444.

Strayle, J., Pozzan, T. & Rudolph, H.K., 1999. Steady-state free Ca²⁺ in the yeast endoplasmic reticulum reaches only 10 microM and is mainly controlled by the secretory pathway pump *pmr1*. *The EMBO journal*, 18(0261-4189; 17), pp.4733–4743.

Sun, L., Zeng, X., Yan, C., Sun, X., Gong, X., Rao, Y. & Yan, N., 2012. Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1-4. *Nature*, 490(7420), pp.361–6.

Swayne, T.C., Zhou, C., Boldogh, I.R., Charalel, J.K., McFaline-Figueroa, J.R., Thoms, S., Yang, C., Leung, G., McInnes, J., Erdmann, R. & Pon, L.A., 2011. Role for cER and Mmr1p in anchorage of mitochondria at sites of polarized surface growth in budding yeast. *Current biology : CB*, 21(23), pp.1994–9.

Tal, R., Winter, G., Ecker, N., Klionsky, D.J. & Abeliovich, H., 2007. Aup1p, a yeast mitochondrial protein phosphatase homolog, is required for efficient stationary phase mitophagy and cell survival. *Journal of Biological Chemistry*, 282(0021-9258; 8), pp.5617–5624.

Tate, J.J., Georis, I., Dubois, E. & Cooper, T.G., 2010. Distinct phosphatase requirements and GATA factor responses to nitrogen catabolite repression and rapamycin treatment in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 285(23), pp.17880–95.

- Tate, J.J., Georis, I., Feller, A., Dubois, E. & Cooper, T.G., 2009. Rapamycin-induced Gln3 Dephosphorylation Is Insufficient for Nuclear Localization: Sit4 and PP2A phosphatases are regulated and function differently. *Journal of Biological Chemistry*, 284(0021-9258; 4), pp.2522–2534.
- Tatebayashi, K., Takekawa, M. & Saito, H., 2003. A docking site determining specificity of Pbs2 MAPKK for Ssk2/Ssk22 MAPKKs in the yeast HOG pathway. *The EMBO journal*, 22(0261-4189; 14), pp.3624–3634.
- Taylor, I.A., McIntosh, P.B., Pala, P., Treiber, M.K., Howell, S., Lane, A.N. & Smerdon, S.J., 2000. Characterization of the DNA-binding domains from the yeast cell-cycle transcription factors Mbp1 and Swi4. *Biochemistry*, 39(14), pp.3943–54.
- Terashima, H., Yabuki, N., Arisawa, M., Hamada, K. & Kitada, K., 2000. Up-regulation of genes encoding glycosylphosphatidylinositol (GPI)-attached proteins in response to cell wall damage caused by disruption of FKS1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Gen.Genet.*, 264(0026-8925; 1-2), pp.64–74.
- Thornton, B.R. & Toczyski, D.P., 2003. Securin and B-cyclin/CDK are the only essential targets of the APC. *Nature cell biology*, 5(12), pp.1090–4.
- Tong, A.H.Y. et al., 2004. Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5659), pp.808–13.
- Torres, J., Di Como, C.J., Herrero, E. & De la Torre, M.A., 2002. Regulation of the cell integrity pathway by rapamycin-sensitive TOR function in budding yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 277(0021-9258; 45), pp.43495–43504.
- Traven, A., Lo, T.L., Pike, B.L., Friesen, H., Guzzo, J., Andrews, B. & Heierhorst, J., 2010. Dual functions of Mdt1 in genome maintenance and cell integrity pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 27(1), pp.41–52.
- Treco, D.A. & Winston, F., 1998. *Current Protocols in Molecular Biology* F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, & K. Struhl, eds., NY: John Wiley & Sons, NY.
- Truman, A.W., Kim, K.Y. & Levin, D.E., 2009. Mechanism of Mpk1 mitogen-activated protein kinase binding to the Swi4 transcription factor and its regulation by a novel caffeine-induced phosphorylation. *Molecular and cellular biology*, 29(24), pp.6449–6461.
- Tyers, M., Tokiwa, G. & Futcher, B., 1993. Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. *The EMBO journal*, 12(5), pp.1955–68.
- Tyson, J.J., Csikasz-Nagy, A. & Novak, B., 2002. The dynamics of cell cycle regulation. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 24(12), pp.1095–109.
- Uetz, P. et al., 2000. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 403(0028-0836; 6770), pp.623–627.
- Vida, T.A. & Emr, S.D., 1995. A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *The Journal of cell biology*, 128(5), pp.779–92.
- Viladevall, L., Serrano, R., Ruiz, A., Domenech, G., Giraldo, J., Barceló, A. & Ariño, J., 2004. Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 279(42), pp.43614–24.
- De Virgilio, C. & Loewith, R., 2006. The TOR signalling network from yeast to man. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(1357-2725; 9), pp.1476–1481.

BIBLIOGRAFIA

Vögtle, F.-N., Burkhart, J.M., Rao, S., Gerbeth, C., Hinrichs, J., Martinou, J.-C., Chacinska, A., Sickmann, A., Zahedi, R.P. & Meisinger, C., 2012. Intermembrane space proteome of yeast mitochondria. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 11(12), pp.1840–52.

Wang, D., Kranz-Eble, P. & De Vivo, D.C., 2000. Mutational analysis of GLUT1 (SLC2A1) in Glut-1 deficiency syndrome. *Human mutation*, 16(3), pp.224–31.

Wang, H. & Jiang, Y., 2003. The Tap42-protein phosphatase type 2A catalytic subunit complex is required for cell cycle-dependent distribution of actin in yeast. *Molecular and cellular biology*, 23(0270-7306; 9), pp.3116–3125.

Wang, Y.X., Zhao, H., Harding, T.M., Gomes de Mesquita, D.S., Woldringh, C.L., Klionsky, D.J., Munn, A.L. & Weisman, L.S., 1996. Multiple classes of yeast mutants are defective in vacuole partitioning yet target vacuole proteins correctly. *Molecular biology of the cell*, 7(9), pp.1375–1389.

Warmka, J., Hanneman, J., Lee, J., Amin, D. & Ota, I., 2001. Ptc1, a type 2C Ser/Thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogen-activated protein kinase Hog1. *Molecular and cellular biology*, 21(0270-7306; 1), pp.51–60.

Watanabe, Y., Irie, K. & Matsumoto, K., 1995. Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slf2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecular and cellular biology*, 15(10), pp.5740–9.

Webster, T.D. & Dickson, R.C., 1983. Direct selection of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the antibiotic G418 following transformation with a DNA vector carrying the kanamycin-resistance gene of Tn903. *Gene*, 26(2-3), pp.243–52.

Welihinda, A.A., Tirasophon, W., Green, S.R. & Kaufman, R.J., 1998. Protein serine/threonine phosphatase Ptc2p negatively regulates the unfolded-protein response by dephosphorylating Ire1p kinase. *Molecular and cellular biology*, 18(0270-7306; 4), pp.1967–1977.

Wicky, S., Tjandra, H., Schieltz, D., Yates, J. & Kellogg, D.R., 2011. The Zds proteins control entry into mitosis and target protein phosphatase 2A to the Cdc25 phosphatase. *Molecular biology of the cell*, 22(1), pp.20–32.

Winzeler, E.A. et al., 1999a. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 285(0036-8075; 5429), pp.901–906.

Winzeler, E.A. et al., 1999b. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5429), pp.901–6.

Wolfe, K.H. & Shields, D.C., 1997. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature*, 387(0028-0836; 6634), pp.708–713.

Wu, J., Tolstykh, T., Lee, J., Boyd, K., Stock, J.B. & Broach, J.R., 2000. Carboxyl methylation of the phosphoprotein phosphatase 2A catalytic subunit promotes its functional association with regulatory subunits in vivo. *The EMBO journal*, 19(21), pp.5672–81.

Wullschleger, S., Loewith, R. & Hall, M.N., 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124(0092-8674; 3), pp.471–484.

Wurzenberger, C. & Gerlich, D.W., 2011. Phosphatases: providing safe passage through mitotic exit. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(8), pp.469–82.

Xie, M.W., Jin, F., Hwang, H., Hwang, S., Anand, V., Duncan, M.C. & Huang, J., 2005. Insights into TOR function and rapamycin response: chemical genomic profiling by using a high-density cell array method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(0027-8424; 20), pp.7215–7220.

Xue, T., Wang, D., Zhang, S., Ehltling, J., Ni, F., Jakab, S., Zheng, C. & Zhong, Y., 2008. Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and Arabidopsis. *BMC genomics [computer file]*, 9(1471-2164), p.550.

Yan, G., Shen, X. & Jiang, Y., 2006. Rapamycin activates Tap42-associated phosphatases by abrogating their association with Tor complex 1. *The EMBO journal*, 25(0261-4189; 15), pp.3546–3555.

Yasutis, K., Vignali, M., Ryder, M., Tameire, F., Dighe, S.A., Fields, S. & Kozminski, K.G., 2010. Zds2p regulates Swe1p-dependent polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae* via a novel Cdc55p interaction domain. *Molecular biology of the cell*, 21(24), pp.4373–86.

Yoshimoto, H., Saltsman, K., Gasch, A.P., Li, H.X., Ogawa, N., Botstein, D., Brown, P.O. & Cyert, M.S., 2002. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(0021-9258; 34), pp.31079–31088.

Young, C., Mapes, J., Hanneman, J., Al Zarban, S. & Ota, I., 2002. Role of Ptc2 type 2C Ser/Thr phosphatase in yeast high-osmolarity glycerol pathway inactivation. *Eukaryot.Cell*, 1(1535-9778; 6), pp.1032–1040.

Zakrzewska, A., Boorsma, A., Brul, S., Hellingwerf, K.J. & Klis, F.M., 2005. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to the plasma membrane-perturbing compound chitosan. *Eukaryotic cell*, 4(4), pp.703–15.

Zaman, S., Lippman, S.I., Zhao, X. & Broach, J.R., 2008. How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu.Rev.Genet.*, 42(0066-4197), pp.27–81.

Zarzov, P., Mazzone, C. & Mann, C., 1996. The SLT2(MPK1) MAP kinase is activated during periods of polarized cell growth in yeast. *The EMBO journal*, 15(0261-4189; 1), pp.83–91.

Zhang, N., Osborn, M., Gitsham, P., Yen, K., Miller, J.R. & Oliver, S.G., 2003. Using yeast to place human genes in functional categories. *Gene*, 303, pp.121–129.

Zhang, Y.-Q. & Rao, R., 2008. A spoke in the wheel: calcium spikes disrupt yeast cell cycle. *Cell cycle*, 7(7), pp.870–3.

Zhao, C., Jung, U.S., Garrett-Engele, P., Roe, T., Cyert, M.S. & Levin, D.E., 1998. Temperature-induced expression of yeast FKS2 is under the dual control of protein kinase C and calcineurin. *Molecular and cellular biology*, 18(0270-7306; 2), pp.1013–1022.

Zhao, Y., Boguslawski, G., Zitomer, R.S. & DePaoli-Roach, A.A., 1997. *Saccharomyces cerevisiae* homologs of mammalian B and B' subunits of protein phosphatase 2A direct the enzyme to distinct cellular functions. *The Journal of biological chemistry*, 272(13), pp.8256–62.

Zheng, Y. & Jiang, Y., 2005. The yeast phosphotyrosyl phosphatase activator is part of the Tap42-phosphatase complexes. *Mol.Biol.Cell*, 16(1059-1524; 4), pp.2119–2127.

Zhi, H., Tang, L., Xia, Y. & Zhang, J., 2013. Ssk1p-independent activation of Ssk2p plays an important role in the osmotic stress response in *Saccharomyces cerevisiae*: alternative activation of Ssk2p in osmotic stress. *PLoS one*, 8(2), p.e54867.

BIBLIOGRAFIA

Zhu, H. et al., 2001. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science*, 293(0036-8075; 5537), pp.2101–2105.

Van Zyl, W., Huang, W., Sneddon, A.A., Stark, M., Camier, S., Werner, M., Marck, C., Sentenac, A. & Broach, J.R., 1992. Inactivation of the protein phosphatase 2A regulatory subunit A results in morphological and transcriptional defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 12(11), pp.4946–59.

Van Zyl, W.H., Wills, N. & Broach, J.R., 1989. A general screen for mutant of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in tRNA biosynthesis. *Genetics*, 123(0016-6731; 1), pp.55–68.

IX. ANNEXOS

ANNEX I

Nom	Genotip	Origen/Referència
BY4741	Mat a his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>akl1</i>	BY4741 <i>akl1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>alk1</i>	BY4741 <i>alk1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>alk2</i>	BY4741 <i>alk2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>ark1</i>	BY4741 <i>ark1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>atg1</i>	BY4741 <i>atg1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>bck1</i>	BY4741 <i>bck1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>bck2</i>	BY4741 <i>bck2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>bub1</i>	BY4741 <i>bub1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>bud32</i>	BY4741 <i>bud32::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>cch1</i>	BY4741 <i>cch1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>chk1</i>	BY4741 <i>chk1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>cka1</i>	BY4741 <i>cka1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>cka2</i>	BY4741 <i>cka2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>ckb1</i>	BY4741 <i>ckb1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>ckb2</i>	BY4741 <i>ckb2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>cla4</i>	BY4741 <i>cla4::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>cmk1</i>	BY4741 <i>cmk1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>cmk2</i>	BY4741 <i>cmk2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>ctk1</i>	BY4741 <i>ctk1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>dbf2</i>	BY4741 <i>dbf2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>dbf20</i>	BY4741 <i>dbf20::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>dun1</i>	BY4741 <i>dun1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>elm1</i>	BY4741 <i>elm1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>env7</i>	BY4741 <i>env7::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>fab1</i>	BY4741 <i>fab1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>fmp48</i>	BY4741 <i>fmp48::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>fpk1</i>	BY4741 <i>fpk1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>frk1</i>	BY4741 <i>frk1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>fus3</i>	BY4741 <i>fus3::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>gal83</i>	BY4741 <i>gal83::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>gcn2</i>	BY4741 <i>gcn2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>gin4</i>	BY4741 <i>gin4::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>hal5</i>	BY4741 <i>hal5::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>hog1</i>	BY4741 <i>hog1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>hrk1</i>	BY4741 <i>hrk1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>hsl1</i>	BY4741 <i>hsl1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)

BY4741 <i>iks1</i>	BY4741 <i>iks1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>ime2</i>	BY4741 <i>ime2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>ire1</i>	BY4741 <i>ire1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>isr1</i>	BY4741 <i>isr1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>kcc4</i>	BY4741 <i>kcc4::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>kdx1</i>	BY4741 <i>kdx1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>kin1</i>	BY4741 <i>kin1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>kin2</i>	BY4741 <i>kin2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>kin3</i>	BY4741 <i>kin3::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>kin4</i>	BY4741 <i>kin4::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>kin82</i>	BY4741 <i>kin82::KanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>kkq8</i>	BY4741 <i>kkq8::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>kns1</i>	BY4741 <i>kns1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>ksp1</i>	BY4741 <i>ksp1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>kss1</i>	BY4741 <i>kss1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>mck1</i>	BY4741 <i>mck1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>mcp2</i>	BY4741 <i>mcp2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>mek1</i>	BY4741 <i>mek1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>mid2</i>	BY4741 <i>mid2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>mkk1</i>	BY4741 <i>mkk1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>mkk2</i>	BY4741 <i>mkk2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>mlp1</i>	BY4741 <i>mlp1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>mrk1</i>	BY4741 <i>mrk1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>nnk1</i>	BY4741 <i>nnk1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>npr1</i>	BY4741 <i>npr1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>pbs2</i>	BY4741 <i>pbs2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>pho81</i>	BY4741 <i>pho81::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>pkh1</i>	BY4741 <i>pkh1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>pkh2</i>	BY4741 <i>pkh2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>pkh3</i>	BY4741 <i>pkh3::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>pkp1</i>	BY4741 <i>pkp1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>pkp2</i>	BY4741 <i>pkp2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>ppe1</i>	BY4741 <i>ppe1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>ppm1</i>	BY4741 <i>ppm1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>prk1</i>	BY4741 <i>prk1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>prr1</i>	BY4741 <i>prr1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>prr2</i>	BY4741 <i>prr2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>psk1</i>	BY4741 <i>psk1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)

ANNEX I

BY4741 <i>psk2</i>	BY4741 <i>psk2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>ptk1</i>	BY4741 <i>ptk1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>ptk2</i>	BY4741 <i>ptk2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>rck1</i>	BY4741 <i>rck1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>rck2</i>	BY4741 <i>rck2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>rim11</i>	BY4741 <i>rim11::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>rim15</i>	BY4741 <i>rim15::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>rlm1</i>	BY4741 <i>rlm1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>rom2</i>	BY4741 <i>rom2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>rrd1</i>	BY4741 <i>rrd1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>rrd2</i>	BY4741 <i>rrd2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>rtk1</i>	BY4741 <i>rtk1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>sak1</i>	BY4741 <i>sak1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>sch9</i>	BY4741 <i>sch9::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>scy1</i>	BY4741 <i>scy1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>sip1</i>	BY4741 <i>sip1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>sip2</i>	BY4741 <i>sip2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>skm1</i>	BY4741 <i>skm1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>sks1</i>	BY4741 <i>sks1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>sky1</i>	BY4741 <i>sky1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>slt2</i>	BY4741 <i>slt2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>smk1</i>	BY4741 <i>smk1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>snf1</i>	BY4741 <i>snf1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>sps1</i>	BY4741 <i>sps1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>ssk2</i>	BY4741 <i>ssk2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>ssk22</i>	BY4741 <i>ssk22::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>ssn3</i>	BY4741 <i>ssn3::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>ste11</i>	BY4741 <i>ste11::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>ste20</i>	BY4741 <i>ste20::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>ste7</i>	BY4741 <i>ste7::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>swe1</i>	BY4741 <i>swe1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>tda1</i>	BY4741 <i>tda1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>tel1</i>	BY4741 <i>tel1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>tor1</i>	BY4741 <i>tor1::KanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>tos3</i>	BY4741 <i>tos3::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>tpk1</i>	BY4741 <i>tpk1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>tpk2</i>	BY4741 <i>tpk2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 <i>tpk3</i>	BY4741 <i>tpk3::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)

BY4741 vhs1	BY4741 <i>vhs1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 vps15	BY4741 <i>vps15::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 vps34	BY4741 <i>vps34::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 yak1	BY4741 <i>yak1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 wsc1	BY4741 <i>wsc1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 yck1	BY4741 <i>yck1::KanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 yck2	BY4741 <i>yck2::KanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 yck3	BY4741 <i>yck3::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 ygk3	BY4741 <i>ygk3::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 ypk1	BY4741 <i>ypk1::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 ypk2	BY4741 <i>ypk2::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 ypk3	BY4741 <i>ypk3::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)
BY4741 ypl150w	BY4741 <i>ypl150w::kanMX4</i>	(Winzeler et al. 1999)

Taula 1. Soques de *S. cerevisiae* derivades del fons genètic BY4741 (Mat a *his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) de la col·lecció de mutants EUROFAN.

Nom	Genotip	Origen/Referència
CCV66	BY4741 <i>ypk3::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
CCV69	BY4741 <i>kcc4::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
CCV77	BY4741 <i>prr2::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
CCV83	BY4741 <i>snf1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
CCV92	BY4741 <i>fab1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
CCV99	BY4741 <i>sip2::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
CCV101	BY4741 <i>fmp48::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
CCV110	BY4741 <i>yck1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
CCV111	BY4741 <i>sch9::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
CCV114	BY4741 <i>prk1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
CCV121	BY4741 <i>hal5::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
CCV124	BY4741 <i>tor1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
CCV125	BY4741 <i>elm1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
CCV126	BY4741 <i>hsl1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
CCV129	BY4741 <i>ctk1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
CCV134	BY4741 <i>ptk1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
CCV137	BY4741 <i>hog1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
CCV144	BY4741 <i>sky1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
CCV149	BY4741 <i>cla4::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
CCV150	BY4741 <i>mck1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
CCV162	BY4741 <i>mek1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
CCV169	BY4741 <i>ssn3::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
LTR060	BY4741 <i>ire1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
MAR154	BY4741 <i>slt2::kanMX4 ptc1::nat1</i>	(González et al. 2006)
MAR213	BY4741 <i>bck1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	(González et al. 2006)
RP1	BY4741 <i>chk1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
RP3	BY4741 <i>rim15::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
RP4	BY4741 <i>scy1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball
RP5	BY4741 <i>mcp2::kanMX4 ptc1::nat1</i>	En aquest treball

Taula 2. Soques haploides de *S. cerevisiae* construïdes transformant les soques quinasa, fosfoinositol quinasa o subunitats reguladores provinents de la col·lecció EUROFAN amb el casset d'interrupció *ptc1::nat1*.

Soca	Casset amplificat	Informació dels encebadors emprats per l'amplificació del casset			Informació dels encebadors emprats per la verificació de la correcta inserció del casset			Origen
		Nom	Posició respecte el ATG del ORF (pb)	Mida del fragment	Nom	Posició respecte el ATG del ORF (pb)	Mida del fragment	
MAR143	<i>ptc1::nat1</i>							(Ruiz et al. 2006)
CCV68	<i>vps15::kanMX4</i>	VPS15-F VPS15-R	-500 +4650	≈ 2.2 Kpb	VPS15-comp-forw-5' K2	-594	766 pb	En aquest treball
CCV138	<i>vps34::kanMX4</i>	5'-VPS34 3'-VPS34	-970 +3344	≈ 3.1 Kpb	VPS34-comp-forw-5' K2	-651	823 pb	En aquest treball
LTR009	<i>mkk2::kanMX4</i>	MKK2-disr_forw-5' MKK2-disr_rev-3'	-511 +1810	≈ 2.2 Kpb	MKK2-comp-forw-5' K2	-700	872 pb	En aquest treball
LTR010	<i>iks1::kanMX4</i>	IKS1-disr_forw-5' IKS1-disr_rev-3'	-520 +2302	≈ 2.2 Kpb	IKS1-comp-forw-5' K2	-683	855 pb	En aquest treball
LTR011	<i>ste20::kanMX4</i>	STE20-disr_forw-5' STE20-disr_rev-3'	-520 +3079	≈ 2.2 Kpb	STE20-comp-forw-5' K2	-679	851 pb	En aquest treball
LTR014	<i>tpk3::kanMX4</i>	5'-tpk3_disr 3'-tpk3_disr	-728 +2126	≈ 3 Kpb	5'-tpk3_comp K2	-880	1052 pb	En aquest treball
LTR018	<i>pkp2::kanMX4</i>	PKP2-disr_forw-5' PKP2-disr_rev-3'	-516 +1723	≈ 2.2 Kpb	PKP2-comp-forw-5' K2	-625	797 pb	En aquest treball
LTR019	<i>nkk1::kanMX4</i>	NNK1-disr_forw-5' NNK1-disr_rev-3'	-522 +3077	≈ 2.2 Kpb	NNK1-comp-forw-5' K2	-680	852 pb	En aquest treball
LTR020	<i>ssk22::kanMX4</i>	SSK22-disr_forw-5' SSK22-disr_rev-3'	-520 +4294	≈ 2.2 Kpb	SSK22-comp-forw-5' K2	-678	850 pb	En aquest treball
LTR021	<i>tpk1::kanMX4</i>	TPK1-disr_forw-5' TPK1-disr_rev-3'	-531 +1459	≈ 2.2 Kpb	TPK1-comp-forw-5' K2	-681	853 pb	En aquest treball
LTR028	<i>mkk1::kanMX4</i>	MKK1-disr_forw-5' MKK1-disr_rev-3'	-523 +1818	≈ 2.2 Kpb	MKK1-comp-forw-5' K2	-698	870 pb	En aquest treball
LTR030	<i>skk1::kanMX4</i>	5'-SKS1_EcoRI 3'-SKS1_Hind III	-777 +2120	≈ 2.8 Kpb	SKS1-comp-forw-5' K2	-700	872 pb	En aquest treball
LTR031	<i>ygk3::kanMX4</i>	YGK3-disr_forw-5' YGK3-disr_rev-3'	-526 +1426	≈ 2.2 Kpb	YGK3-comp-forw-5' K2	-689	861 pb	En aquest treball

LTR036	<i>cmk1::kanMX4</i>	CMK1-disr_forw-5' CMK1-disr_rev-3'	-526 +1603	≈ 2.2 Kpb	CMK1-comp-forw-5' K2	-678	850 pb	En aquest treball
LTR037	<i>ste11::kanMX4</i>	STE11-disr_forw-5' STE11-disr_rev-3'	-557 +2952	≈ 2.2 Kpb	STE11-comp-forw-5' K2	-682	854 pb	En aquest treball
LTR038	<i>smk1::kanMX4</i>	SMK1-disr_forw-5' SMK1-disr_rev-3'	-516 +1461	≈ 2.2 Kpb	SMK1-comp-forw-5' K2	-700	872 pb	En aquest treball
LTR039	<i>fpk1::kanMX4</i>	FPK1-disr_forw-5' FPK1-disr_rev-3'	-520 +3025	≈ 2.2 Kpb	FPK1-comp-forw-5' K2	-666	838 pb	En aquest treball
LTR043	<i>rim11::kanMX4</i>	RIM11-disr_forw-5' RIM11-disr_rev-3'	-402 +1393	≈ 2.1 Kpb	RIM11-comp-forw-5' K2	-675	847 pb	En aquest treball
LTR044	<i>npr1::kanMX4</i>	NPR1-disr_forw-5' NPR1-disr_rev-3'	-515 +2669	≈ 2.2 Kpb	NPR1-comp-forw-5' K2	-685	857 pb	En aquest treball
LTR046	<i>fus3::kanMX4</i>	FUS3-disr_forw-5' FUS3-disr_rev-3'	-532 +1315	≈ 2.2 Kpb	FUS3-comp-forw-5' K2	-667	839 pb	En aquest treball
LTR048	<i>cka1::kanMX4</i>	CKA1-disr_forw-5' CKA1-disr_rev-3'	-282 +1380	≈ 2 Kpb	CKA1-comp-forw-5' K2	-646	818 pb	En aquest treball
RP2	<i>ste7::kanMX4</i>	STE7-disr_forw-5' STE7-disr_rev-3'	-518 +1843	≈ 2.2 Kpb	STE7-comp-forw-5' K2	-671	843 pb	En aquest treball

Taula 3. Soques quinasas/*ptc1* generades transformant la soca MAR143 amb el d'interrupció del mutant quinasas amplificat.

Soca	Genotip	Soques emprades per obtenir la soca diploide		Origen/Referència
		Soca haploide Mat a	Soca haploide Mat α	
BY4742	Mat α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0			(Winzeler et al. 1999)
MAR216	BY4742 <i>ptc1::nat1</i>			Construïda en el present laboratori
CCV61	<i>psk1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>psk1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV62	<i>kin3::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>kin3::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV63	<i>alk2::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>alk2::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV65	<i>tel1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>tel1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV67	<i>akl1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>akl1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV72	<i>kin82::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>kin82::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV73	<i>rtk1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>rtk1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV74	<i>mrk1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>mrk1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV75	<i>dun1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>dun1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV79	<i>vhs1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>vhs1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV81	<i>sip1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>sip1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV85	<i>gin4::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>gin4::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV86	<i>sps1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>sps1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV87	<i>gal83::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>gal83::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV88	<i>yck3::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>yck3::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV89	<i>sak1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>sak1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV90	<i>bck2::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>bck2::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV94	<i>alk1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>alk1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV96	<i>rck1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>rck1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV97	<i>tos3::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>tos3::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV98	<i>atg1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>atg1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV102	<i>dbf2::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>dbf2::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball

ANNEX I

CCV103	<i>bub1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>bub1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV104	<i>pho81::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>pho81::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV105	<i>bud32::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>bud32::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV113	<i>pkp1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>pkp1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV117	<i>ime2::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>ime2::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV118	<i>pbs2::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>pbs2::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV122	<i>swe1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>swe1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV123	<i>ptk2::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>ptk2::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV127	<i>prr1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>prr1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV128	<i>ypk1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>ypk1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV130	<i>kdx1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>kdx1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV132	<i>kkq8::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>kkq8::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV135	<i>kns1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>kns1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV139	<i>rck2::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>rck2::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV142	<i>ypk2::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>ypk2::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV145	<i>tda1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>tda1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV147	<i>yck2::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>yck2::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV153	<i>cmk2::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>cmk2::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV156	<i>skm1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>skm1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV160	<i>kin4::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>kin4::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV161	<i>hrk1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>hrk1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV167	<i>frk1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>frk1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV168	<i>ypl150w::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>ypl150w::kanM X4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV170	<i>env7::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>env7::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV172	<i>isr1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>isr1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
CCV173	<i>dbf20::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>dbf20::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball

Taula 4. Soques haploides de *S. cerevisiae* obtingudes per *Random Spore Analysis*. També es descriuen les soques del fons genètic BY4742 necessàries per la generació dels dobles mutants.

Soca	Genotip	Soques emprades per obtenir la soca diploide		Origen/Referència
		Soca haploide Mat a	Soca haploide Mat α	
LTR012	<i>gcn2::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>gcn2::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
LTR013	<i>yak1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>yak1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
LTR015	<i>cka2::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>cka2::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
LTR016	<i>kin2::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>kin2::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
LTR017	<i>tpk2::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>tpk2::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
LTR032	<i>psk2::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>psk2::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
LTR033	<i>ckb2::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>ckb2::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
LTR034	<i>kss1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>kss1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
LTR035	<i>ark1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>ark1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
LTR040	<i>kin1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>kin1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
LTR041	<i>ksp1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>ksp1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
LTR042	<i>ckb1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>ckb1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
LTR045	<i>ssk2::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>ssk2::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
LTR047	<i>pkh1::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>pkh1::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
LTR061	<i>pkh2::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>pkh2::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball
LTR062	<i>pkh3::kanMX4 ptc1::nat1</i>	<i>pkh3::kanMX4</i>	MAR216	En aquest treball

Taula 5. Soques haploides de *S. cerevisiae* obtingudes per dissecció de tètredes.

ANNEX II

Nom	Seqüència (des de 5' a 3')
3'_PTC1_comp	CTCCAGCCGACAACGGTGAAG
nat1-3'	GTGAAGGACCCATCCAGTGC
5'-PTC1_fw	CCAGAAACACCATATGACATAAC
RT_PTC1_DOWN	CTTGATTAATTCGCATGCATC
YEp13_seq.3'	GCGATATAGGCGCCAGCAAC
YEp13_seq.5'	ATCGACTACGCGATCATGGC
CDC37_S14A-Up	GGATAAAATTGAACTAGCAGATGATTCTGATGTCGAGG
CDC37_S14A-Do	CCTCGACATCAGAATCATCTGCTAGTTCAATTTATCC
VPS73E169A_up	CCCCTTTTTCATTAAGGCAGTTGCTCCAAGCGGTTG
NEW_VPS73E169A_down	TGCCTTAATGAAAAGGGGTATAATC
YBR241C_UP	GCGAAAAAAGCTTAGCTTCTG
YBR241C_DO	GCTCTAGATAGACGCTCGCCCGTG
M13_reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
M13_forward20	GTAAAACGACGGCCAG
K2	CACGTCAAGACTGTCAAGGA
FUS3-disr_forw-5'	CCATATAAAGACCCGAGTAG
FUS3-disr_rev- 3'	GATGCTAGTCACCTATATGG
FUS3-comp-forw-5'	GAGCTGTTGCATCATGCTG
IRE1-disr_forw-5'	GAGGTTTTATTACCTCTG
IRE1-disr_rev- 3'	CAGTGTGAATAACTGGAG
IRE1-comp-forw-5'	GAGATGCCGTTTAAGGTTG
CKA1-disr_forw-5'	CAGCAGCACTAAGTGGTAG
CKA1-disr_rev- 3'	CTCGAGCTGCATCCTTTC
CKA1-comp-forw-5'	CAATCATTCTGCACTTGGAC
RIM11-disr_forw-5'	CCCAATAATCGTCTAAGATG
RIM11-disr_rev- 3'	CGTACTGGCAAAGAATACG
RIM11-comp-forw-5'	CAATGCCGTTTGACGAAACC
CMK1-disr_forw-5'	GCACGAATGGAGCCATCGAC
CMK1-disr_rev- 3'	CAGCGCACTTAGACAACACTAG
CMK1-comp-forw5'	GGTCTTCGTAGGGCCTATCC
FPK1-disr_forw-5'	CCTACCAAACCATCCTTCCC
FPK1-disr_rev- 3'	GCTTCATCTGATGTTTACAC
FPK1-comp-forw-5'	CCCTACAGTACGACGGCAGC
IKS1-disr_forw-5'	GAAGATTCATATAAGAACCC
IKS1-disr_rev-3'	GCGTTGTGTCGTAGTAGATG
IKS1-comp-forw-5'	GTCATTTAAAAGTGCATTCCG
MKK1-disr_forw-5'	GCATCTACAAGCCCTATACC

MKK1-disr_rev- 3'	GAGTTACGTTTGCTTCAAAC
MKK1-comp-forw-5'	CGATACCATTGCTCCTCCTC
MKK2-disr_forw-5'	GTAAACATTAATTATTAGC
MKK2-disr_rev- 3'	GCGCCTAGTACTCACTTGAG
MKK2-comp-forw-5'	GTATATAAGCCGTTTACTGG
NNK1-disr_forw-5'	CTTCTGCTGATGTCAGCGGC
NNK1-disr_rev- 3'	CCACGCTTCACAATTTATCC
NNK1-comp-forw-5'	CAACGAGATCGATCACTCCG
NPR1-disr_forw-5'	GGAGTTACGTGACATGCACG
NPR1-disr_rev- 3'	GGAATTGTCGCCTTGTAAG
NPR1-comp-forw-5'	CAGGTCAAAACGCAAGAATC
PKP2-disr_forw-5'	CACTATTAATGAAGATCGC
PKP2-disr_rev- 3'	CTTTGGAATTCGATCTTCG
PKP2-comp-forw-5'	CTGAGGCTGCTAATCGTGAC
5'-SKS1_EcoRI	GCGGAATTCCATTGAGGCTTAGTGGAG
3'-SKS1_Hind III	GCCCCAAGCTTGTGCTATATTATAAGCCGC
SKS1-comp-forw-5'	GCCCTCGCGCTCTCTACATG
SMK1-disr_forw-5'	CGTAAGGCTGCTTTTCCTC
SMK1-disr_rev-3'	CTCCGAAAGACTGTTTATGG
SMK1-comp-forw-5'	GGGCAGTAGAGAAAAGAGG
SSK22-disr_forw-5'	CTGATGTTGGGAACAGAGTG
SSK22-disr_rev- 3'	CTTCTCTGGGAAGTTGAGC
SSK22-comp-forw-5'	CTTCGATCAATGACCCACCG
STE11-disr_forw-5'	CTTTATACAAGTTAGCCTTC
STE11-disr_rev-3'	CACCTCGCAAAGAAAGGC
STE11-comp-forw5'	GGTATCTGCGATCTAAAAAG
STE20-disr_forw-5'	CCTTGTGTTACGGCAGTGCC
STE20-disr_rev- 3'	GGTACCCGACACTCGATGAG
STE20-comp-forw-5'	CACGTGGCAAGCCGGGAGCG
STE7-disr_forw-5'	CCTGGGATAAGTTATTATGC
STE7-disr_rev- 3'	GTTAGAGGAACCGAAGTTG
STE7-comp-forw-5'	GTATTACCCTTTGTATTTAAG
TPK1-disr_forw-5'	GAACCCTCCGCTGGACGGGC
TPK1-disr_rev- 3'	GCAAGCTTTCGAAAGTGGCGC
TPK1-comp-forw-5'	GGTAAGGTCCTGTGTTATGC
5'-tpk3_disr	CACAGCGAAGCTTGGACCAC
3'-tpk3_disr	CTGACAATATTCAGACAATCC
5'-tpk3_comp	GTTGTACATGGAGGTCCATC

ANNEX II

YGK3-disr_forw-5'	CGCACAATGACTGCTGAGAC
YGK3-disr_rev- 3'	GCGTTGTTTTATGGATAGCCC
YGK3-comp-forw-5'	CCCCTTGTCGTCCAGTGAG
VPS15-F	GGGATGAGAAATGGATTTACG
VPS15-R	TCAACATTTGAGGGTCCATC
VPS15-comp-forw-5'	CTTTCATAAGAGCAATAGC
5'-VPS34	CGATGTTATGGAACGTCTGACG
3'-VPS34	CTTACTGGAGATATAACGCACAC
VPS34-comp-forw-5'	GAATGAACTTTCATAAGCC

Taula 1. Descripció dels encebadors emprats en aquest treball.

PLASMIDI	Longitud del gen (pb)	Des de ATG/ després de STOP	Longitud del fragment (pb)	Digerit amb	Clonat a YEplac195	Referència
YEplac195-VPS70	2444	-668/+834	3946	PstI/EcoRI	PstI/EcoRI	En aquest treball
YEplac195-VPS73	1469	-1040/+299	2808	XhoI/BglII	Sall/BamHI	(González et al. 2006)
YEplac195-GAS1	1680	-491/+150	2321	BamHI	BamHI	En aquest treball
YEplac195-CLN1	1640	-1053/+654	3347	Smal/Smal	Smal	En aquest treball
YEplac195-CIN5	896	-2488/+676	4060	EcoRI	EcoRI	En aquest treball
YEplac195-YAP5	738	-592/+267	1597	EcoRV/KpnI	Smal/KpnI	En aquest treball
YEplac195-CLB1	1416	-546/391	2353	HincII/XbaI	Smal/XbaI	En aquest treball
YEplac195-CLB6	1151	-553/+299	2003	NheI	XbaI	En aquest treball
YEplac195-VOA1	798	-1450/+1063	3319	EcoRI/Sall	EcoRI/Sall	En aquest treball
YEplac195-CDC37	1521	-695/+1414	3630	NsiI/NheI	PstI/XbaI	En aquest treball
YEplac195-TAF10	621	-1118/604	2343	BglII	BamHI	En aquest treball
YEplac195-MIH1	1665	-755/+600	3020	KpnI	KpnI	En aquest treball
YEplac195-PIN4	2007	-450/+935	3392	Sall/NsiI	Sall/PstI	En aquest treball
YEplac195-KRE6	2163	-450/+381	2994	BamHI	BamHI	En aquest treball
YEplac195-GZF3	1656	-1427/+486	3577	HincII	Smal	En aquest treball
YEplac195-OST5	410	-200/+690	1300	NheI	XbaI	En aquest treball
YEplac195-VRG4	1014	-1637/+732	3383	EcoRI	EcoRI	En aquest treball
YEplac195-MSD1	1977	-1138/+485	3600	BglII/StyI	BamHI/XbaI	En aquest treball
YEplac195-RCR2	632	-616/+1087	2335	BglII	BamHI	En aquest treball
YEplac195-SSH4	1739	-935/+310	2984	DraI/HincII	Smal	En aquest treball
YEplac195-CTR1	1220	-1040/+378	2638	EcoRV	Smal	(Serrano et al. 2004)
YEplac195-FET4	1658	-1117/+610	3385	HindIII/XhoI	HindIII/Sall	(Serrano et al. 2004)

YEplac195-ZDS1	2747	-445/+312	3504	EcoRI/SpeI	EcoRI/SpeI	En aquest treball
YEplac195-SMY2	2222	-724/+254	3200	PstI/XbaI	PstI/XbaI	En aquest treball
YEplac181-PPH21	1109	-797/+544	2450	XbaI/HindIII	XbaI/HindIII	(Muñoz et al. 2003)
YEplac181-PPH22	1133	-926/+357	2416	BamHI/EcoRI	BamHI/EcoRI	(Muñoz et al. 2003)
YE24-A.102	Plasmidi YE24 que conté la regió de DNA entre 242332 – 251186 pb del cromosoma X En aquest treball					

Taula 1. Descripció de la construcció dels plasmidis dels supressors multicòpia. Tots s'han generat per digestió enzimàtica tant de les regions cromosòmiques d'interès com del vector receptor desitjat (generalment YEplac195 menys pels gens PPH21 i PPH22 que es va utilitzar el plasmidi YEplac181). En el cas de YE24-A.102, que conté la versió truncada de BCK1 es va utilitzar el mateix plasmidi aïllat.