

# Identificació de noves funcions de les proteïnes cinases Pkh en el llevat *Saccharomyces cerevisiae*



Anna Bahí Salavedra  
Novembre del 2013

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Institut de Biotecnologia i Biomedicina

**UAB**

Universitat Autònoma de Barcelona

# **Identificació de noves funcions de les proteïnes cinases Pkh en el llevat *Saccharomyces cerevisiae***

Tesi Doctoral

Anna Bahí Salavedra

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Institut de Biotecnologia i Biomedicina

Universitat Autònoma de Barcelona



# **Identificació de noves funcions de les proteïnes cinases Pkh en el llevat *Saccharomyces cerevisiae***

Memòria elaborada per

**ANNA BAHÍ SALAVEDRA,**

Llicenciada en Biologia,

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

**Antonio Casamayor Gracia**

Anna Bahí Salavedra

Antonio Casamayor Gracia

Cerdanyola del Vallès, Setembre del 2013



## AGRAÏMENTS

En primer lloc, m'agradaria donar les gràcies a la Dra. Cristina Costa, per pensar en mi i sobretot al Dr. Antonio Casamayor per donar-me aquesta oportunitat i permetrem endinsar-me en el món de la ciència acceptant-me al seu grup. Gràcies per guiar-me durant aquests anys i per l'esforç i dedicació que ha suposat tant la realització com la correcció d'aquest treball.

Al Dr. Enrique Claro per haver-me ajudat i ensenyat moltes de les coses que he après sobre lípids. El grup del Dr. Jose Miguel Lizcano i en especial en Gerard, per haver-me ajudat sempre que ho he necessitat i pels múltiples cultius cel·lulars que us he demanat. I també al Dr. J. Ramón Bayascas i el Dr. Ricardo Biondi i el seu grup, en especial a en Daniel Pastor per la col·laboració que ha permès realitzar part d'aquest treball.

A en Jofre, per estar disposat sempre ajudar-me i per tots aquells experiments que formen part d'aquesta tesi i que també són una mica teus.

I a totes aquelles persones que han fet possible aquesta tesi.



<b>I. ABREVIATURES</b> .....	<b>1</b>
<b>II. RESUMS</b> .....	<b>7</b>
<b>III. INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>13</b>
<b>1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com a model en la investigació</b> .....	<b>15</b>
<b>2. Fosforilació reversible de proteïnes</b> .....	<b>15</b>
2.1. Aspectes generals.....	15
2.2. Grup de les AGC cinases .....	17
2.3. PDK1, com a regulador de les AGC cinases en mamífer. ....	19
2.4. Pkh, PDK1 en llevats. ....	21
2.5. Funcions i substrats de Pkh. ....	25
<b>3. Paret cel·lular de <i>S. cerevisiae</i></b> .....	<b>33</b>
3.1. Via de la integritat de la paret cel·lular (CWI).....	34
3.2. Resposta a estrès i via de la integritat de la paret cel·lular.....	39
3.3. Vies de transducció de senyal implicades en la resposta a estrès, relacionades amb Pkh i la via de la Integritat de la paret cel·lular. ....	44
<b>4. Paper dels esfingolípid en el llevat <i>S. cerevisiae</i></b> . ....	<b>46</b>
4.1. Ruta de síntesi dels esfingolípid en <i>S. cerevisiae</i> , comparada amb mamífers. ....	46
4.2. Implicació dels esfingolípid en l'activació de la via Pkh.....	49
<b>IV. OBJECTIUS</b> .....	<b>53</b>
<b>V. MATERIALS I MÈTODES</b> .....	<b>57</b>
<b>1. Soques i medis de cultiu</b> .....	<b>59</b>
<b>2. Tècniques de DNA recombinant</b> .....	<b>59</b>
<b>3. Cassetts d'interrupció i delecions gèniques</b> .....	<b>60</b>
<b>4. Plasmidis</b> .....	<b>64</b>
<b>5. Obtenció de soques diploides, esporulació i selecció d'haploides</b> . ....	<b>68</b>
5.1. Esporulació de cèl·lules diploides .....	70
5.2. Selecció d'haploides .....	71
<b>6. Assaigs de creixement</b> .....	<b>71</b>
6.1. Assaigs de creixement en cultius líquids.....	71
6.2. Assaig de creixement en placa .....	71
<b>7. Extracció de proteïnes i immunodetecció mitjançant <i>Western Blot</i></b> . ....	<b>72</b>
<b>8. Expressió de GST-PDK1 i GST-PKBAPH en cèl·lules de mamífer</b> . ....	<b>74</b>
<b>9. Extracció i purificació de proteïnes de fusió a GST</b> .....	<b>75</b>



## ÍNDIX

---

<b>10. Extracció total de lípids de llevat .</b>	<b>77</b>
<b>11. Separació de lípids per cromatografia de capa fina HPTLC.</b>	<b>78</b>
<b>12. Test d'interacció proteïna-lípid mitjançant immunodetecció (<i>fat western</i>).</b>	<b>79</b>
<b>13. Formació de Liposomes</b>	<b>80</b>
<b>14. Assaig d'unió proteïna-liposomes.</b>	<b>81</b>
<b>15. Assaig d'activitat cinasa per fosforilació del substrat</b>	<b>81</b>
<b>16. Tècniques de microscòpia</b>	<b>82</b>
16.1. Detecció d'espècies reactives d'oxigen (ROS)	82
16.2. Visualització de l'actina.	83
16.3. Visualització de la quitina.	83
16.4. Detecció de fragmentació del DNA (TUNEL)	84
<b>17. Purificació de RNA, síntesis de cDNA i experiments de microarrays de DNA.</b>	<b>85</b>
17.1. Extracció, purificació del RNA total i síntesis de cDNA	85
17.2. Hibridació dels microarrays	86
17.3. Anàlisi de les dades	86
<b>18. Assaig d'activitat <math>\beta</math>-galactosidasa</b>	<b>88</b>
<b>VI. RESULTATS I DISCUSSIÓ</b>	<b>89</b>
<b>1. Caracterització de les soques delecionades per Pkh.</b>	<b>91</b>
1.1. Generació i caracterització de les soques mutants de Pkh.	93
1.2. La manca de proteïnes Pkh provoca sensibilitat a estressos de paret cel·lular.	98
1.3. Les proteïnes Pkh són essencials per la normal fosforilació de Slt2 sota condicions d'estrès de paret cel·lular.	101
1.4. Les cèl·lules amb manca d'activitat Pkh acumulen mRNAs implicats en respostes a estrès.	102
1.5. L'absència d'activitat Pkh efecte la resposta transcripcional al xoc tèrmic.	110
1.6. Les proteïnes Pkh són importants per la regulació dels factors de transcripció Hsf1 i Msn2/Msn4 després d'un estrès tèrmic.	114
1.7. Les cèl·lules sense activitat Pkh acumulen espècies reactives d'oxigen (ROS).	119
1.8. L'activació de la via Slt2 MAPK redueix l'estrès oxidatiu de les cèl·lules sense activitat Pkh.	121
1.9. La delecio de Pkh indueix mort cel·lular programada de manera dependent de Slt2 i independent de Mca1.	123

<b>2. Estudi de la funció del domini C-terminal de les proteïnes Pkh.....</b>	<b>129</b>
2.1. El domini C-terminal de les proteïnes Pkh no és rellevant per la supervivència cel·lular en condicions òptimes de creixement. ....	131
2.2. Les soques sense el domini catalític de Pkh també fosforilen Slt2 sota condicions d'estrès de paret cel·lular. ....	134
2.3. Les proteïnes Pkh no uneixen fosfoinosítids.....	136
2.4. Les proteïnes Pkh són capaces d'unir-se a la sulfogalactosilceramida (sulfàtid). ....	138
2.5. El domini C-terminal és el responsable de la unió a la sulfogalactosilceramida (sulfàtid).....	142
2.6. El domini C-terminal de Pkh1 és responsable de la sensibilitat als compostos que inhibeixen la ruta de síntesis dels esfingolípid.....	151
2.7. La regió no catalítica de Pkh uneix un lípid polar present a un extracte lipídic de llevat. ....	155
2.8. Pkh1 s'uneix a liposomes que contenen diferents lípids polars de llevat o sulfàtid. .160	
2.8.1 Assaig de <i>binding</i> amb liposomes de la fracció lipídica 1.1 de llevat. ....	161
2.8.2 Assaig de <i>binding</i> amb liposomes de sulfàtid. ....	161
2.9. La unió als diferents lípids polars de llevat o a sulfàtid modifiquen l'activitat de Pkh1 de manera diferent. ....	163
2.9.1 Assaig Pkh1 cinasa amb liposomes de la fracció lipídica 1.1 de llevat. ....	163
2.9.2 Assaig Pkh1 cinasa amb liposomes de sulfàtid. ....	164
<b>VII. CONCLUSIONS .....</b>	<b>167</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>173</b>
<b>IX. ANNEXOS .....</b>	<b>195</b>



## ÍNDIX DE FIGURES

<b>FIGURA 1.</b> Estructura general dels dominis que conformen la família de les AGC cinases. ....	19
<b>FIGURA 2.</b> Mecanisme d'activació dels substrats PKB, S6K i SGK per PDK1 .....	20
<b>FIGURA 3.</b> Alineació de la seqüència aminoacídica del domini catalític de les proteïnes de llevat Pkh1 i Pkh2 comparat amb els seu homòleg PDK1 i l'homòleg de drosophila DSTPK61 .....	22
<b>FIGURA 4.</b> Diagrama esquemàtic de l'estructura de PDK1, Pkh1, Pkh2 i Pkh3 i la identitat del domini cinasa respecte el de PDK1.....	23
<b>FIGURA 5.</b> Alineació de la seqüència aminoacídica del domini C-terminal de les proteïnes de llevat Pkh1, Pkh2 i Pkh3 comparat amb el seu homòleg PDK1 .....	24
<b>FIGURA 6.</b> Comparació dels motius de fosforilació conservats en la família de la AGC cinases en mamífers i llevats ( <i>S. cerevisiae</i> ).....	25
<b>FIGURA 7.</b> Cascada Pkh1-Ypk1 i Pkh2-Ykr2 i la via de senyalització de la paret cel·lular.....	26
<b>FIGURA 8.</b> Funció i regulació de les AGC cinases per part de les Pkh i esfingolípid .....	29
<b>FIGURA 9.</b> La PKA de <i>S. cerevisiae</i> té motius que estan conservats en els substrats de PDK1. .	30
<b>FIGURA 10.</b> Mecanisme d'activació de les AGC cinases/ Tpk1 per part de Pkh1 .....	32
<b>FIGURA 11.</b> La via de la integritat de la paret cel·lular (CWI). .....	35
<b>FIGURA 12.</b> Efectes fisiològics provocats per un xoc tèrmic .....	42
<b>FIGURA 13.</b> Estrès oxidatiu .....	43
<b>FIGURA 14.</b> Estructura general d'un esfingolípid .....	46
<b>FIGURA 15.</b> Via de síntesis dels esfingolípid en llevats i mamífers .....	48
<b>FIGURA 16.</b> Estratègia d'expressió de GST-Pkh1 .....	65
<b>FIGURA 17.</b> Estratègia utilitzada per construir la soca diploide AB01 i selecció dels seus haploides.....	69
<b>FIGURA 18.</b> Estratègia utilitzada per construir la soca diploide AB02 i selecció dels seus haploides.....	69
<b>FIGURA 19.</b> Esquema de la construcció de les soques MB005 i SDP8 .....	93
<b>FIGURA 20.</b> Les cèl·lules sense activitat Pkh1 i amb una expressió reduïda de <i>PKH2</i> no són viables .....	94
<b>FIGURA 21.</b> Els defectes de creixement per falta d'activitat Pkh en les soques MB005 i SDP8 no es veuen rescatats per estabilitzadors osmòtics. ....	95
<b>FIGURA 22.</b> La manca de Pkh provoca la despolarització del citoesquelet d'actina.....	97
<b>FIGURA 23.</b> Les cèl·lules que tenen l'activitat Pkh delecionada tenen compromesa la via de la CWI .....	98

## ÍNDEX

---

<b>FIGURA 24.</b> Les cèl·lules de la soca SDP8 tractades amb baixa concentració de doxiciclina són sensibles a altes temperatures .....	99
<b>FIGURA 25.</b> Les cèl·lules sense Pkh tractades amb baixa concentració de doxiciclina són sensibles a diferents estressos de paret .....	100
<b>FIGURA 26.</b> Les cèl·lules que tenen l'activitat Pkh delecionada tenen compromesa la via de la CWI .....	102
<b>FIGURA 27.</b> Agrupació de gens expressats diferencialment quan Pkh és delecionat .....	105
<b>FIGURA 28.</b> Les cèl·lules sense Pkh sintetitzen més glicogen .....	108
<b>FIGURA 29.</b> Efecte de l'absència de l'activitat Pkh en la resposta transcripcional del gen <i>PHO84</i> .....	110
<b>FIGURA 30.</b> Els canvis transcripcionals causats per un xoc tèrmic són atenuats en les cèl·lules que els hi manca l'activitat Pkh. ....	111
<b>FIGURA 31.</b> La resposta transcripcional a un xoc tèrmic requereix d'activitat Pkh .....	113
<b>FIGURA 32.</b> Factors de transcripció que es veuen afectats per la falta d'activitat Pkh sota un xoc tèrmic.....	115
<b>FIGURA 33.</b> Semblances entre les respostes transcripcionals que es donen durant un estrès tèrmic i la falta de Pkh. ....	117
<b>FIGURA 34.</b> La falta d'activitat Pkh indueix estrès oxidatiu en <i>S. cerevisiae</i> .....	120
<b>FIGURA 35.</b> La sobreexpressió de l'al·lel <i>BCK1-20</i> atenua els defectes en el creixement per la falta de Pkh .....	121
<b>FIGURA 36.</b> La sobreexpressió de l'al·lel <i>BCK1-20</i> fa disminuir els nivells de ROS en les soques sense activitat Pkh. ....	123
<b>FIGURA 37.</b> La manca de Pkh indueix la fragmentació del DNA parcialment dependent de l'activació de la via Slr2 MAPKs. ....	125
<b>FIGURA 38.</b> La manca de Pkh indueix la fragmentació del DNA de manera independent de la metacaspasa, Mca1, de llevat .....	126
<b>FIGURA 39.</b> Cladograma dels dominis C-terminal de les Pkh de llevat .....	132
<b>FIGURA 40.</b> El domini no catalític de Pkh1 no sembla ser essencial per la supervivència cel·lular en condicions òptimes i d'estrès de paret.....	133
<b>FIGURA 41.</b> La falta del domini C-terminal no té efecte en l'activació de la via Slr2 MAPK. ..	135
<b>FIGURA 42.</b> Pkh1 no uneix fosfoinosítids .....	137
<b>FIGURA 43.</b> Pkh1 i PDK1 s'uneixen a sulfàtid .....	139
<b>FIGURA 44.</b> Síntesi del Sulfàtid.....	140
<b>FIGURA 45.</b> En un extracte lipídic de llevat <i>S. cerevisiae</i> no trobem evidències de sulfàtid...	141
<b>FIGURA 46.</b> El domini C-terminal de Pkh1 és responsable de la unió a sulfàtid .....	143

## ÍNDEX

---

<b>FIGURA 47.</b> Els 100 últims aa de l'extrem C-terminal són els responsables de la unió al sulfàtid .....	144
<b>FIGURA 48.</b> Predicció de regions d'unió desestructurades del domini C-terminal de les proteïnes Pkh i PDK1 .....	148
<b>FIGURA 49.</b> El domini C-terminal de Pkh2 també uneix sulfàtid .....	150
<b>FIGURA 50.</b> El domini C-terminal de Pkh1 és responsable de la sensibilitat a Myr i AbA. ....	154
<b>FIGURA 51.</b> Pkh1 s'uneix a la fracció 1 d'una mescla de lípids polars de llevat.....	156
<b>FIGURA 52.</b> El lípid que s'uneix a Pkh deixa de sintetitzar-se durant un xoc tèrmic .....	157
<b>FIGURA 53.</b> Pkh1 s'uneix a la fracció 1.1 d'un extracte lipídic de llevat .....	158
<b>FIGURA 54.</b> Pkh1 s'uneix a la fracció 1.1.2 i 1.1.3 .....	159
<b>FIGURA 55.</b> Assaig de binding de Pkh1 amb liposomes que contenen la fracció lipídica de llevat, 1.1. ....	161
<b>FIGURA 56.</b> Assaig de binding de Pkh1 amb liposomes de sulfàtid.....	162
<b>FIGURA 57.</b> L'activitat de Pkh1 no es veu modificada per la unió a la fracció 1.1 .....	164
<b>FIGURA 58.</b> El sulfàtid modifica negativament l'activitat de Pkh1 .....	164



# ÍNDEX

---

## ÍNDEX DE TAULES

<b>TAULA 1.</b> Classificació de les cinases de <i>S. cerevisiae</i> .....	17
<b>TAULA 2.</b> Soques de <i>S. cerevisiae</i> utilitzades en aquest treball.....	62
<b>TAULA 3.</b> Oligonucleòtids utilitzats en aquest treball .....	64
<b>TAULA 4.</b> Constructes a partir del plasmidi pEGH i diferents fragments de DNA del gen <i>PKH1</i> .....	66
<b>TAULA 5.</b> Llistat de publicacions on es descriuen experiments en els que s'indueixen gens semblants als 257 gens induïts per la deleció de Pkh, segons el <i>Yeastmine</i> .....	107





## **I. ABREVIATURES**

---



aa	aminoàcids
AbA	<i>Aureobasidin A</i>
AMP	Adenosina 5' monofosfat
AMPC	AMP cíclic
BSA	Albúmina de sèrum boví
CAF	Cafeïna
CFW	<i>Calcofluor White</i>
CGT	<i>Ceramide Galactosyltransferase</i>
CR	<i>Congo Red</i>
CST	<i>Cerebroside Sulfotransferase</i>
CWI	<i>Cell Wall Integrity</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidino-2-phenylindole</i>
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DMSO	Dimetil sulfòxid
DHS	Dihidroesfingosina
DOX	Doxiciclina
<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>
ESR	<i>Environmental Stress Response</i>
FFAS	<i>Fold and Function Assignment System</i>
GAPs	<i>GTPase Activating Proteins</i>
GDP	Guanosina difosfat
GEFs	<i>Guanoside nucleotide Exchange Factors</i>
GTP	Guanosina 5'-trifosfat
h	hores
HPTLC	<i>High Performance Thin Layer Chromatography</i>
Hsf1	<i>Heat Shock Factor 1</i>
HSE	<i>Heat Shock Element</i>

HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
HSR	<i>Heat Shock Response</i>
IgG	Immunoglobulina G
kpb	Kilo parells de bases
kDa	Kilo Dalton
LCB	<i>Long Chain Base</i>
LiCl	Clorur de Liti
M	Molar
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinasa</i>
Min	Minut
mRNA	Àcid ribonucleic missatger
mTOR	<i>mamalian Target of Rampamicin</i>
Myr	Miriocina
NaCl	Clorur Sòdic
OD	Densitat òptica
ONPG	o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranòsid
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDK1	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1</i>
PHS	Fitoesfingosina
PKA	Proteïna cinasa depedent de AMPc
PKH	<i>Pkb-activating Kinase Homolog</i>
p/v	Pes/volum
PtdIns	Fosfatidilinositol
RNA	Àcid ribonucleic
ROS	Espècies reactives d'oxigen
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Dodecil Sulfat de Sodi
Ser	Serina
SPT	Serina Palmitoil Transferasa

## ABREVIATURES

---

SSC	Citrat sòdic salí
STRE	<i>STress Response Element</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
Thr	Treonina
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometà
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling</i>
UDP	Uridina difosfat
v/v	Volum/Volum



## **II. RESUMS**

---





**RESUM**

L'activitat Pkh resulta essencial pel creixement vegetatiu del llevat *Saccharomyces cerevisiae* i es proporcionada principalment per Pkh1 i Pkh2. Es desconeixen però, en gran mesura, tant la totalitat de les seves funcions cel·lulars com els mecanismes de regulació.

Amb l'objectiu d'estudiar les funcions de les proteïnes Pkh en llevat, els diferents grups d'investigació han utilitzat fins a dia d'avui una única aproximació consistent en l'eliminació del gen *PKH2* i la substitució de *PKH1* per una versió que codifica una proteïna l'activitat de la qual resulta suprimida a 37 °C. L'ús d'aquesta estratègia implica un estrès tèrmic per les cèl·lules de llevat, les quals responen activant la via de la CWI, on es troba implicada la via Pkh-Pkc1-MAPK. És per aquesta raó que en aquest treball s'ha utilitzat una estratègia diferent, desenvolupada al laboratori, la qual consisteix en l'obtenció d'una soca mutant en la que se li han suprimit els gens *PKH1* i *PKH3* i en la que s'ha col·locat un promotor regulable per doxiciclina que controla l'expressió de *PKH2*. Gràcies a aquesta soca hem pogut verificar per primera vegada que les proteïnes Pkh són necessàries per la fosforilació de Slt2 en front a diversos estressos de paret cel·lular.

A més, s'han estudiat els canvis a nivell transcripcional provocats per la manca de les proteïnes Pkh, revelant que es produeix una resposta característica d'una situació d'estrès oxidatiu. En efecte, les cèl·lules sense activitat Pkh acumulen més ROS i aquest fet va acompanyat d'un procés de mort cel·lular programada independent de la metacaspasa del llevat Mca1, segons els anàlisis de TUNEL que s'han realitzat. Els fenotips d'estrès oxidatiu i mort cel·lular es veuen disminuïts en part, per l'activació de la via MAPK de Slt2 mitjançant l'expressió d'una versió constitutivament activa de la MAPKK Bck1 .

Quelcom que afegeix complexitat a la regulació d'aquesta família de cinases, és el fet que alguns esfingolípid de cadena llarga o esfingolípid complexos de llevat, podrien regular la via de senyalització de Pkh1. Es coneix que les proteïnes Pkh tenen,

a diferència de PDK1, un domini C-terminal molt més extens, de funció desconeguda, sense el domini PH, essencial per la unió de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> en mamífers (que no sintetitza el llevat). Amb l'objectiu d'estudiar-ne la funcionalitat, s'han generat soques haploides on l'única activitat Pkh ve proporcionada per un plasmidi que porta la versió sencera de Pkh1 o bé una versió sense el domini C-terminal.

Gràcies a aquestes soques hem identificat l'esfingolípid sulfàtid, no descrit en llevats, capaç d'unir-se específicament als últims 100 aa del domini no catalític de Pkh1. Aquest fet ens ha portat a estudiar el lipidoma del llevat, el qual s'ha separat per la tècnica de HPTLC, que ens ha permès identificar una fracció polar del lipidoma que s'uneix a Pkh1. A més hem determinat que el domini C-terminal de Pkh1 és responsable de la sensibilitat als inhibidors de la síntesis dels esfingolípid, indicant així que els esfingolípid podrien tenir un paper en l'activació de les proteïnes Pkh. A partir d'un assaig cinasa fet amb liposomes que contenen sulfàtid, hem vist que la unió amb sulfàtid té una efecte negatiu sobre la capacitat de Pkh1 de fosforilar el substrat PKBΔPH, a diferència de l'assaig realitzat amb liposomes que contenen la fracció polar del lipidoma, que no en modifiquen l'activitat.

**SUMMARY**

Pkh activity is essential for vegetative growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae* and is mainly provided by Pkh1 and Pkh2. However, it is still largely unknown the set of cellular functions and the regulatory mechanisms of Pkh.

With the aim of studying the functions of Pkh proteins in yeast, different research groups have used the approach consisting in the deletion of the gene *PKH2* and replacement of *PKH1* by a protein version whose activity is suppressed at 37 °C. The use of this strategy involves a heat stress for yeast cells and, consequently, activation of the CWI pathway, where the Pkh-Pkc1-Slt2 MAPK pathway is involved. For this reason we have used a different strategy, developed in the laboratory, for this study, consisting in generate a mutant strain where *PKH1* and *PKH3* genes were deleted and *PKH2* was placed under control of doxycycline-repressed promoter. The use of this strain allowed us to verify, for the first time, that Pkh proteins are required for the phosphorylation of Slt2 in response to several cell wall stresses.

We have also studied the transcriptional changes caused by lack of Pkh proteins, revealing that there is a response similar to that induced by oxidative stress. Indeed, cells without Pkh activity accumulate ROS and this was accompanied by a process of programmed cell death that was independent of the yeast metacaspase Mca1, according to performed TUNEL analysis. The phenotypes of oxidative stress and cell death were attenuated, at least in part, by the activation of the Slt2 MAPK by expression of a constitutively active version of MAPKK Bck1.

An element that adds complexity to the regulation of this kinases family is that long-chain sphingolipids, or yeast complex sphingolipids, could regulate Pkh1 signaling pathway. It is known that Pkh proteins, unlike mammalian PDK1, have a larger C-terminal domain of unknown function that apparently lacks a PH domain, which is essential for the binding of PDK1 to PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> (a lipid that is not synthesized in yeast). In order to study the functions of this domain, we have generated haploid strains where the only Pkh activity is provided by a plasmid, which carries either the full Pkh1 or a version without its C-terminal domain.

With these strains, we have identified a sphingolipid sulfatide, not described in yeast, able to specifically bind to the last 100 aa of the non- catalytic domain of Pkh1. This has led us to study the yeast lipidome, which was separated by HPTLC technique, allowing us to identify a polar fraction that binds to Pkh1. In addition, we determined that the C-terminal domain is responsible for sensitivity to inhibitors of sphingolipid synthesis pathway, indicating that sphingolipids may play a role in the activation of Pkh proteins. Pkh1 kinase assay with liposomes containing sulfatide indicated that binding of Pkh1 to the sulfatide has a negative effect on the Pkh1 activity when PKB $\Delta$ PH was used as a substrate. In contrast, liposomes containing the polar lipidome fraction did not alter the Pkh1 activity.

### **III. INTRODUCCIÓ**

---



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

El llevat *Saccharomyces cerevisiae*, en l'àmbit de la investigació científica està considerat com un model d'estudi de mecanismes moleculars que tenen lloc a les cèl·lules eucariotes, ja que es tracta d'un llevat fàcil de cultivar i manipular. Prova de la utilitat d'aquest organisme en el món científic és que *S. cerevisiae* va ser el primer organisme eucariota, el genoma del qual va ser completament seqüenciat (Goffeau et al., 1996). El genoma de *S. cerevisiae* està compost de  $13 \cdot 10^6$  parells de bases i 6.275 gens, tot i que es creu que només prop d'uns 5.800 actuen com a veritables gens funcionals. S'ha estimat que aquest llevat comparteix un 23% dels seus gens amb l'espècie humana. A més, la maquinària molecular d'un gran nombre de processos cel·lulars es troba conservada des dels llevats fins a eucariotes superiors.

A part de l'àmbit científic, aquest llevat és conegut des de l'antiguitat pel seu interès en la indústria alimentària (vinificació, pa, etc) i actualment és un organisme molt utilitzat en el camp de la biotecnologia, com a productor de diferents compostos amb interès comercial (generació de biomassa, expressió heteròloga de proteïnes, producció de compostos organolèptics, etc).

Totes aquestes característiques fan del llevat *S. cerevisiae* un extraordinari model d'investigació per organismes més complexos com plantes o animals.

### **2. Fosforilació reversible de proteïnes**

#### **2.1. Aspectes generals**

La fosforilació reversible de proteïnes és un dels principals mecanismes de regulació de múltiples processos biològics, tals com el metabolisme, la transcripció gènica o el cicle cel·lular, que es dut a terme per l'acció específica oposada de les proteïnes cinases (PK) i fosfatases (PP). És un procés molt usual en la transducció de senyals i està considerat com el principal mecanisme de modificació post-traduccional



que modifica l'activitat enzimàtica, entre d'altres aspectes. Les alteracions en l'estat de fosforilació de les proteïnes són una de les causes de diverses malalties com el càncer, la diabetis, l'artritis reumatoide o la hipertensió. La importància d'aquest mecanisme de regulació es posa de manifest si es té en compte que aproximadament un 30% de totes les proteïnes de *S. cerevisiae* són susceptibles de ser fosforilades (Ptacek et al., 2005) i que el nombre de gens que codifiquen fosfatases i cinases representa el 2-4% del nombre total de gens d'un genoma eucariota típic (Manning et al., 2002).

Les proteïnes poden ser fosforilades en nou aminoàcids: serina (Ser), treonina (Thr), tirosina, cisteïna, lisina, histidina, aspartat i glutamat. En les cèl·lules eucariotes té lloc principalment en els residus de serina i treonina, i en menor grau en els residus de tirosina (Krebs, 1985). De fet un estudi del proteoma humà publicat l'any 2006 revela que els residus de fosfoserina, fosfotreonina i fosfotirosina constitueixen el 88.4%, 11.8% i 1.8% dels aminoàcids fosforilats, respectivament (Olsen et al., 2006).

Les proteïnes cinases constitueixen una de les majors i més importants superfamílies de proteïnes, corresponent aproximadament el 2% del genoma (Hunter & Plowman, 1997). Les proteïnes cinases que formen el llevat *S. cerevisiae* es subdivideixen en diferents famílies basant-se en la seva similitud estructural i els seus dominis catalítics (veure taula 1).

GRUP	Família	Subunitat catalítica ( <i>S.cerevisiae</i> )
AGC	PKA PKC AKT/PKB-like p70S6K-like pK38-like PDK1- like Altres...	Tpk1,Tpk2,Tpk3 <b>Pkc1</b> <b>Sch9,Ypk1,Ypk2</b> Kin82, Fpk1 Dbf2, Dbf20 <b>Pkh1, Pkh2, Pkh3</b>
CAMK	CAMK SNF1/AMPK GIN4 Altres...	Cmk1, Cmk2, Rck1 i 2 Snf1, Kin1, Kin2, Kin4, Lpi5 Gin4, Hsl1 Mek1...
CMGC	CDK MAPK GSK3 CLK Altres...	Cdc28, Pho85, Ck1, Ssn3.. Hog1, <b>Slt2</b> , Kss1, Fus3.. Mck1, Mds1, Mrk1.. Kns1, Yak1, Ime2...
STE7/MEK	STE7 NIMA/NEK	Ste7, Pbs2, Mkk1,Mkk2.. Kin3
STE11/STE20	STE11/MEKK STE20/PAK NRK/MESS	Ste11, <b>Bck1</b> , Ssk2, Ssk22 Ste20, Cla4, Hra655 NrK, Sps1, Cdc15
Altres	HAL5 ELM RAN PIM Caseïna cinases ...	Hal5, Ptk1 ...

**Taula 1. Classificació de les cinases de *S. cerevisiae*.** Els sis grups principals i les seves corresponents famílies. En la columna de la dreta apareixen els representants (únicament les subunitats catalítiques) de cada una de les famílies en el llevat *Saccharomyces cerevisiae*. En negreta es troben aquelles cinases d'interès pel present estudi. Classificació basada en la publicada per Hunter (Hunter & Plowman, 1997).

El genoma de *S. cerevisiae* codifica aproximadament 126 proteïnes cinases, de les quals uns 115 gens han sigut clarament identificats, i es troben distribuïdes en 6 grups, cinc d'ells conservats en mamífers (Hunter & Plowman, 1997).

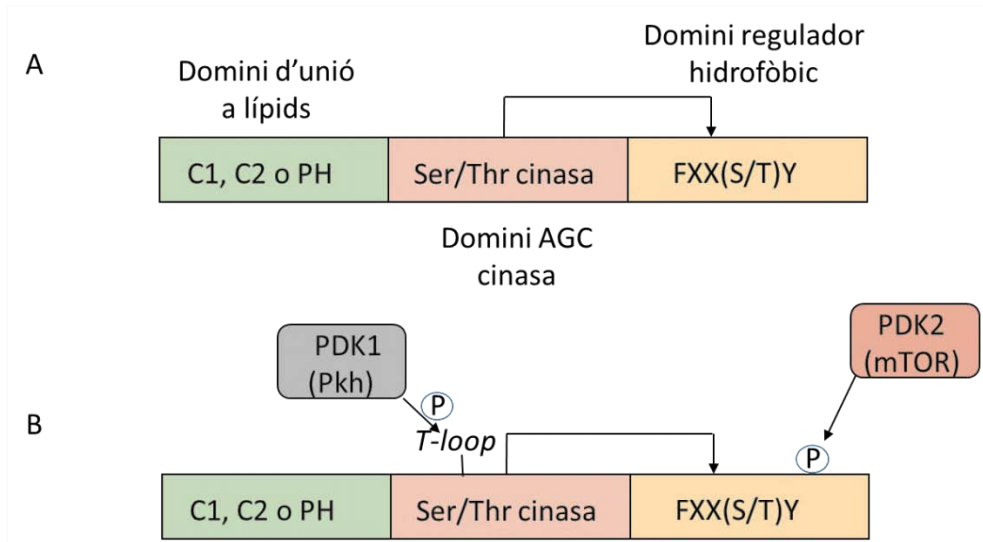
## 2.2. Grup de les AGC cinases

El terme AGC cinases va ser creat per Steven Hanks & Tony Hunter (Hanks & Hunter, 1995) per definir un subgrup de proteïnes Ser/Thr cinases, el seu nom ve de cAMP-dependent proteïna cinasa 1(PKA), cGMP-dependent proteïna cinasa (PKG o CGK) i proteïna cinasa C (PKC), la proteïna cinasa B (PKB), i la proteïna cinasa ribosomal S6. Aquestes cinases tenen unes seqüències molt similars sobretot pel que fa el seu

domini catalític i normalment també presenten una mateixa organització estructural. En el llevat *S. cerevisiae* trobem entre d'altres, Ypk1 i Ypk2 funcionalment redundants, i funcionalment homòlogues a la proteïna de mamífer SGK (Casamayor et al., 1999); Pkc1 homòleg al les PKC i Sch9, que en mamífer es coneix com a PKB (Roelants et al., 2004). Aquestes quatre cinases de la família AGC estan involucrades en el manteniment de la integritat de la paret cel·lular i seran en les que ens centrarem en el present estudi.

En llevats i organismes eucariòtics multicel·lulars, les AGC cinases regulen diversos processos fisiològics essencials com són el creixement cel·lular, proliferació, reorganització del citoesquelet, supervivència, metabolisme, etc. La disponibilitat de nutrients juga un paper important en l'activació de les AGC cinases. Les AGC cinases també estan implicades en processos d'emmagatzematge de carbohidrats, síntesis de DNA i proteïnes, biogènesis ribosomal, apoptosis, etc...(Wilson & Roach, 2002; Roosen et al., 2005).

Algunes AGC cinases tenen un o dos dominis d'unió a lípids, com poden ser dominis amb homologia a la Pleckstrina (PH) o bé dominis de tipus C1, C2 (regió conservada), un domini catalític i un domini regulador (H), caracteritzat per una seqüència consens hidrofòbica [FXX (S/T)Y] (Figura 1). Típicament, el model d'activació d'algunes d'aquestes cinases es base, en que una cinasa *upstream* (per exemple, l'activitat PDK2) fosforila el residu Ser o Thr de la regió conservada del motiu regulador hidrofòbic de la seva diana *downstream*, és a dir una AGC cinasa (Sobko, 2006) i/o es fosforila el *T-loop* que es troba dins el domini catalític (per exemple PKB) (Bayascas, 2010).

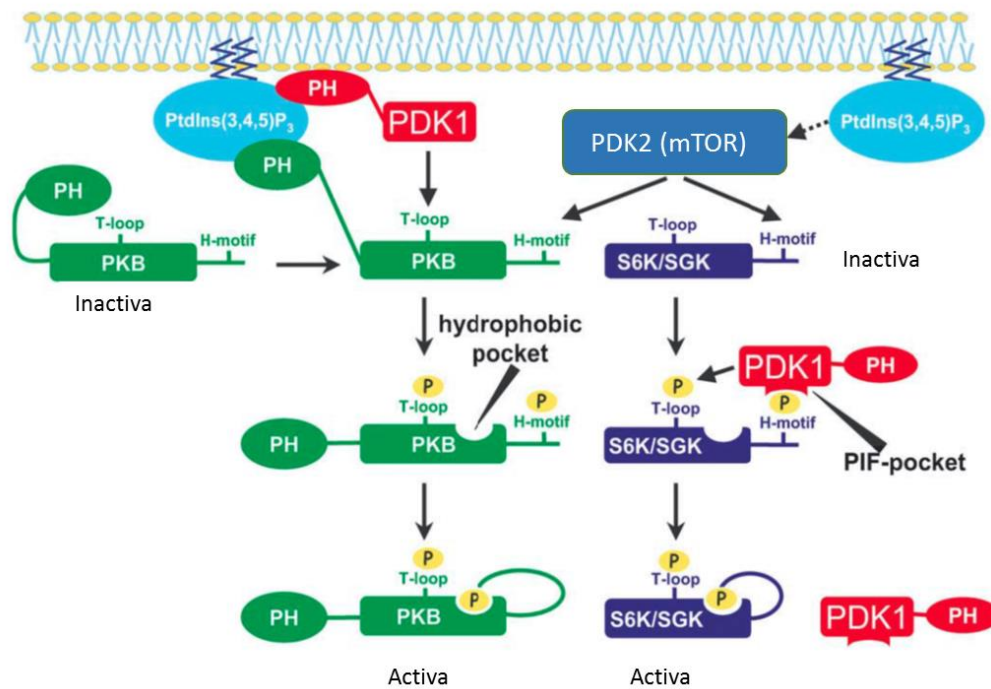


**Figura 1. Estructura general dels dominis que conformen la família de les AGC cinases. (A)** Esquema general de l'organització típica dels dominis: Domini d'unió a lípids (C1, C2 o PH), domini cinasa catalític i el domini regulador hidrofòbic. **(B)** Una Ser i Thr de la seqüència consens (FXX(S/T)Y), és fosforilada per una cinasa *upstream* (PDK2, en mamífers i el complex mTOR en llevats) i/o bé es fosforila la regió del *T-loop* del domini catalític per acció d'una altra cinasa *upstream* (PDK1, en mamífer i Pkh en llevat). Esquema modificat de (Sobko, 2006) .

### 2.3. PDK1, com a regulador de les AGC cinases en mamífer.

PDK1 fosforila i activa diversos membres de la família de les AGC cinases. PDK1 identificada per primera vegada com a proteïna capaç d'activar i fosforilar PKB (Alessi et al., 1997; Stokoe et al., 1997). A part, PDK1, també fosforila les cinases de la família AGC com S6K, SGK, diferents isoformes de PKC, PKA, etc (Roelants et al., 2004).

PDK1, està formada per dos dominis funcionals ben caracteritzats, el domini N-terminal catalític i el domini C-terminal d'homologia a la Pleckstrina que interacciona amb gran afinitat amb els fosfoinosítids: PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, i PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (Alessi et al., 1997). Ambdues, PDK1 i PKB, posseeixen el domini PH, en aquesta última localitzat en l'extrem N-terminal, capaç d'unir diferents fosfoinosítids, a diferència de la resta de substrats (PKC, S6K, etc) de PDK1. Aquest fet indica que existeix més d'un mecanisme d'activació PDK1-substrat (Figura 2).



**Figura 2. Mecanisme d'activació dels substrats PKB, S6K i SGK per PDK1.** PKB és activat després de ser reclutat a la membrana mitjançant la unió del seu domini PH a PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, on és fosforilada el seu domini hidrofòbic (*H-motif*) pel sistema mTOR i després en el seu *T-loop* per l'acció de PDK1. Un cop fosforilada en ambdós dominis, es forma en la regió catalítica un motiu d'unió hidrofòbic (*Hydrophobic pocket*) que hi permet la unió del domini H passant a estar a una forma activa. En canvi pel que fa l'activació de S6K i SGK, observem com el no tenir domini PH, no pot ser reconeguda per PDK1 i necessita de l'acció d'una altra cinasa (el complex mTOR) per fosforilar el seu domini H, acció que permet que PDK1 reconegui el motiu H fosforilat, gràcies el seu motiu *PIF-pocket* i fosforili així el domini *T-loop* d'aquests substrats. Figura adaptada de (Mora et al., 2004).

PDK1 activa majoritàriament els seus substrats mitjançant la fosforilació d'un residu de Thr conservat en el *T-loop* de les AGC cinases, de manera dependent de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, però per l'activació total dels substrats es requereix també la fosforilació d'un segon motiu dins del domini Hidrofòbic (H) situat a la regió C-terminal, respecte el domini catalític, per això molt sovint aquest domini H se l'anomena "PDK2". Per una banda certs estudis suggereixen que la fosforilació del domini H, es dona per autofosforilació del propi substrat (Behn-Krappa & Newton, 1999), per altra banda i més recentment s'ha vist com aquest motiu hidrofòbic és fosforilat pel complex mTOR (Nojima et al., 2003). En concret s'ha observat com la majoria dels substrats de PDK1 fosforilen el seu motiu hidrofòbic gràcies a l'acció dels complexos mTORC1 (S6K, alguna però no totes les isoformes de PKC) o mTORC2 (PKB,

SGK, isoformes de PKC), mentre que d'altres AGC cinases ho fan per autofosforilació com és el cas de certes isoformes de PKC i RSK (Bayascas, 2010).

El motiu hidrofòbic juga dos papers en l'activació de moltes de les AGC cinases. Primer, funciona com lloc d'unió a PDK1, permeten la fosforilació del substrat en el *T-loop* i segon, un cop fosforilat, aquest motiu hidrofòbic interacciona amb un solc en al domini catalític (anomenat *hidrofòbic pocket*), provocant un canvi d'estat en la AGC cinasa passant de la forma inactiva a activa. És interessant remarcar que la PDK1, per ella mateixa, no conté cap motiu hidrofòbic, però presenta un motiu d'unió hidrofòbic, anomenat *PIF-pocket*, el qual li permet unir-se i reconèixer el domini Hidrofòbic (H) (Mora et al., 2004).

### 2.4. Pkh, PDK1 en llevats.

S'ha observat que el llevat *S. cerevisiae* conté dos proteïnes cinases, Pkh1 i Pkh2, funcionalment homòlogues a PDK1 (Casamayor et al., 1999). *PKH1* i *PKH2* codifiquen proteïnes cinases, Pkh1 i Pkh2 respectivament, els dominis catalítics de les quals són 72-73% idèntics i mostren, aproximadament, un 50% d'identitat (Figura 3 i 4), amb la seva proteïna humana, PDK1, o de *Drosophila*, DSTPK61. *PKH1* es localitza en el cromosoma IV (Jacq et al., 1997) i codifica per una proteïna de 86 kDa, mentre que *PKH2* es troba en el cromosoma XV (Dujon et al., 1997) i codifica una proteïna de 121 kDa.



Figura 3. Alineació de la seqüència aminoacídica del domini catalític de les proteïnes de llevat Pkh1 i Pkh2 comparat amb els seu homòleg PDK1 i l'homòleg de *Drosophila* DSTPK61. Els residus idèntics es mostren en lletra blanca sobre fons negre, els residus similars amb lletra blanca sobre un fons gris. Els guions representen espais introduïts a la seqüència per optimitzar l'alineació. Figura adaptada de (Casamayor et al., 1999)

Cal dir també que el genoma de *S. cerevisiae* conté un tercer gen relacionat amb *PKH1* i *2*, anomenat *PKH3*, localitzat en el cromosoma IV i que no és essencial. *PKH3* codifica una proteïna de 100 kDa amb la mateixa estructura que Pkh1 i 2. El seu domini catalític presenta una homologia del 44% amb la PDK1 (Figura 4). Les dades d'expressió obtingudes al laboratori indiquen que el nivell d'expressió de *PKH3* és baix, per la qual cosa podria no tenir rellevància en condicions òptimes de cultiu. *PKH3* es va identificar com a gen supressor multicòpia de la letalitat de *PKH1* i *PKH2* (Inagaki et al., 1999).

Ambdues, Pkh1 i Pkh2, estan formades per un domini amino-terminal (N-terminal) i un domini carboxi-terminal (C-terminal) a més del seu domini catalític. Aquestes regions N i C-terminal no mostren similitud, a diferència del domini catalític, a les regions no catalítiques de PDK1 (Figura 5). A més, les proteïnes Pkh no posseeixen a diferència de PDK1, el domini d'homologia a Pleckstrina (PH) que permet la unió a fosfatidilinositols, a diferència però, presenten un extens domini C-terminal del qual se'n desconeix la seva funció, i que serà motiu d'estudi en aquest present treball (Figura 4).

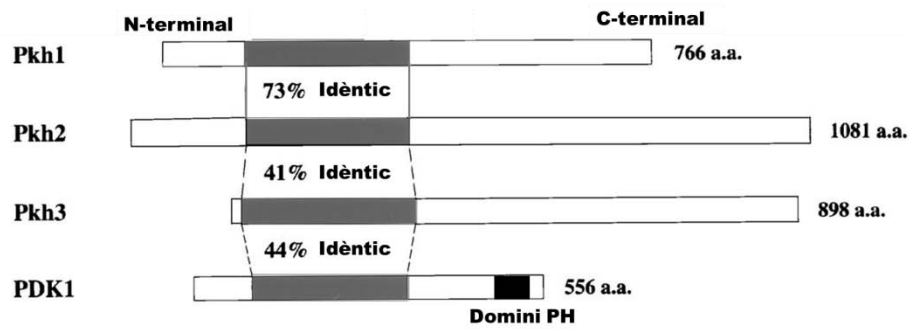


Figura 4. Diagrama esquemàtic de l'estructura de PDK1, Pkh1, Pkh2 i Pkh3 i la identitat del domini cinasa respecte el de PDK1. Figura adaptada de (Inagaki et al., 1999).

El doble mutant *pkh1Δ pkh2Δ* no és viable, a diferència d'un simple mutant *pkh1Δ* o *pkh2Δ*, indicant que *PKH1* i *PKH2* codifiquen per gens funcionalment redundants i que tenen un paper essencial per la supervivència i creixement de la cèl·lula (Casamayor et al., 1999). Aquesta letalitat pot ser rescatada per l'expressió de la PDK1 humana, fins hi tot és suficient sense el domini PH, el qual manca a les proteïnes Pkh, suggerint així que l'activitat d'aquestes no depèn de fosfoinosítids (Casamayor et al., 1999).



Pkh2	-FKDLNFKDGS-----VWSKTPPEIKPYKINAKSMQAMPSSGSDRKLVKKSVNTLGKSHLV	54
Pkh1	-FHEVNFEDGS-----VWDDNPPEIQPYKINAEAMKPLQKVSESDTTVKMAN-----	46
PDK1	FESVWEN-----LHQQTPPKLTAY-----LPAMSEDE-----	30
Pkh3	-FSKVDWWDKIKIWRGIWQSQGQLQQTTLGLPNIPQNILPTRQLHVIDTPARSIQITKQ	59
	* . : :: :	:
Pkh2	TQRSASSPSVEETHSTLYNNTHASTESEISIKKRPTDERTAQILENARKGINNRKNQP	114
Pkh1	-----LQLAGNGHADTFLQA	61
PDK1	-----DCYGNVDNLLSQFG	44
Pkh3	KRKKPTKISNTTSSIVVRKRLG-----ISTGKDDLGTVPSTTFAVTA	102
	:	
Pkh2	GKRTPSGAASAAALAAASAALTKKTMQSYPTSSSKSSRSSSPATTSRPGTYKRTSSTESKPF	174
Pkh1	PAATSQEHSVISMTAATAAFNKDYTSQPKLGSKSSTSVRSASNNTDREVIQKKVSKNRAS	121
PDK1	CMQVSSSSSHLSASDTGLPQRSNSIEQYIHDLDSNSFELDLQFSEDEKRLLEKQAG	104
Pkh3	PNDTNVLTNTAAHSTANIALPPNSQSNQVKRAQLVAPNRIIPKVPVINDVNRKNSIPRTK	162
	. : :: :	*
Pkh2	AKSPPLSASVLSKVPMPYPYTPMSPMPTPYDYQMTPPYTTKQDYSDTAIAAPKPCIS	234
Pkh1	VSSPISITTSRG-----	133
PDK1	GNP-----	107
Pkh3	PNVPPLQTSSIPQKLTSSASSALSAPSTEIRNQDLTHTLDGRNSIDIHVLKQDYVFIYG	222
	:	
Pkh2	KQNVKNSTDSPLMNKQDIQWSFYLNINEHVLRTKELDFVTTNYDILEKKMLKLGSLLD	294
Pkh1	KDNRSRSSD-----AFWSRYLQNMDERVLLMKEVALSTRN---LEDSPVGLEVALD	182
PDK1	-----WHQFVENN-----LILKMG-----	121
Pkh3	IPYEHEGPAMSLNSYNKIDNDLITSLVAQHKEELKNSSEFLQVLTLLKSGMLSYKNTVME	282
	.	:
Pkh2	PQLFGKPRHTFLSQVARSGGVEVTGFRNDPTMTAYSKTEDTYYSKNIIDLQLLEDDYRIEG	354
Pkh1	-----YKN-----	185
PDK1	-----	
Pkh3	GNDDQENKEHQMANIEDTDLMSYDFEFNELTRKGFLLILEKYKNRIWFISLPSYSTLSKIP	342
	:	
Pkh2	GDLSELLTNRSRGGYKCNQSSPMKDDKSESNKGSVFSGKIKKLFHPTSAETLSSS	414
Pkh1	-----PLDIEPPT	193
PDK1	-----PVD	124
Pkh3	FNAVKSSTINNENWVDCFFRARQLLEEKQILDKISN-----VSFDSKASSEPS	392
	.	:
Pkh2	DEKTKYYKRTIVMTSFGFRFLVFAKRRQPNPVTNLKYELEYDINLRQQGTKIKELIIPLEM	474
Pkh1	DSAGKFKYKMFLLITNLGRALVFVKRRSLMWEEQEFELQFELELND-----VEKIRF	245
PDK1	KRKGFLARRRQLLLEGPFLHYVDFVN---KVLKGEI PWSQELRP-----EA	168
Pkh3	PPPISRKERPLSIGNNVTLSYTAKNGSQNNAPQNDNVGEEKPFRIP-----SSTKDR	445
	. : . : *	. : . : . : . : . :
Pkh2	GTNHIVVIQTPYKSFLLSTDKKTTSKLFTVLKILNSNTNKEKELLQRNQKVIERTTS	534
Pkh1	ISDQVLEIDGSRITIFIGCKERAVLMKLWKLHNGMTAKPKVVS---PKSDHKMFDKFIQ	302
PDK1	KNFKTFFVHTPNRTYYLMDPSGNAHKWCRKIQEVWRQR-----	206
Pkh3	PGANSTPSSRHRVLSNNAGETPKKMNRI PMSAPSTNTYTNGSVPAFNHRPSTNVGNN	505
	:	*
Pkh2	SGRAIPKDLPTSKSPSPKPRTHSQSPSISKHNSFSESINSAKSNRSSRIFETFINAKEQN	594
Pkh1	K-----RQNTKKKNQAPPVQSNRLINGLPDR-----CILKTPPEG	338
PDK1	-----YQSHPDAAVQ-----	216
Pkh3	KHN-----ILTSKKQGSVFSFSSSTTKPQIKTTGYRQPTSPPLPQMEFPTTREKYSAP	560
	. . . .	.
Pkh2	SKKHAAPVPLTSKLVNGLPKRQVTVGLNLGTNFKNSSAKSKRS-	639
Pkh1	ALHTKRPTSLQTRSSSNYSK-----LLARSTQMRKNMTRTDEK-	376
PDK1	-----	
Pkh3	SNMVISSRYEVLHTLNNSQTNFREIASRGASAAFRSLQKSKKKK	606

**Figura 5. Alineació de la seqüència aminoacídica del domini C-terminal de les proteïnes de llevat Pkh1, Pkh2 i Pkh3 comparat amb el seu homòleg PDK1.** Els residus idèntics es mostren amb una (\*) i en lletra vermella, els residus fortament similars es mostren amb (:) i lletra groga i els poc similars amb (.) i de color verd. Els guions representen espais introduïts a la seqüència per optimitzar l'alineació. Figura obtinguda a partir del programari web ClustelW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

El genoma de *S. cerevisiae* codifica per quatre tipus de proteïnes cinases (Ypk1/Ypk2, Pkc1, Tpk1/Tpk2/Tpk3 i Sch9) substrats de Pkh de la família AGC, que es troben involucrades en la via de la integritat de la paret cel·lular (que expliquem en detall en l'apartat 3.1) i/o bé el en control del creixement cel·lular i resposta a l'estrès (apartat 3.3), les quals mantenen conservades tant el lloc d'unió a PDK1 en el seu T-loop, així com el lloc d'unió a PDK2 en el domini C-terminal (Figura 6).

**Enzims en Mamífers**

<b>PKB<math>\alpha</math></b>	303	GATMKTFCGTPEYLAP	MITITPPD	FPQFSYSAS	477
<b>SGK</b>	251	NSTTSTFCGTPEYLAP	SIGKSPDS	FLGFSYAPP	426
<b>p70<sup>SGK</sup></b>	247	GTVTHTFCGTIEYMAPE	TPVDSRDD	FLGFTYVAP	416
<b>PKC<math>\zeta</math></b>	405	GDTTSTFCGTPNYIAP	QPQITDDY	DTQFTSEPV	557

**Enzims *S.cerevisiae***

<b>Ypk1</b>	499	DDKTDTFCGTPEYLAP	KPIDSVVD	FGGWTYVGN	666
<b>Ykr2</b>	496	NDKTDTFCGTPEYLAP	KPIDSVVD	FGGWTYIGD	663
<b>Pkc1</b>	978	GNRTSTFCGTPEFMAPE	PPTLTPLP	FRGFSFMPD	1147
<b>Sch9</b>	565	KDRTNTFCGTTEYLAP	QPMMTATP	FAGFTFVDE	741



**Figura 6. Comparació dels motius de fosforilació conservats en la família de la AGC cinases en mamífers i llevats (*S.cerevisiae*).** Les seqüències corresponents en el lloc d'unió a PDK1, *T-loop*, en l'*Hydrophobic Pocket* i en el motiu hidrofòbic C-terminal o lloc d'unió a "PDK2". Els residus més conservats entre les diferents AGC cinases es mostren subratllats. Figura adaptada de (Roelants et al., 2004).

## 2.5. Funcions i substrats de Pkh.

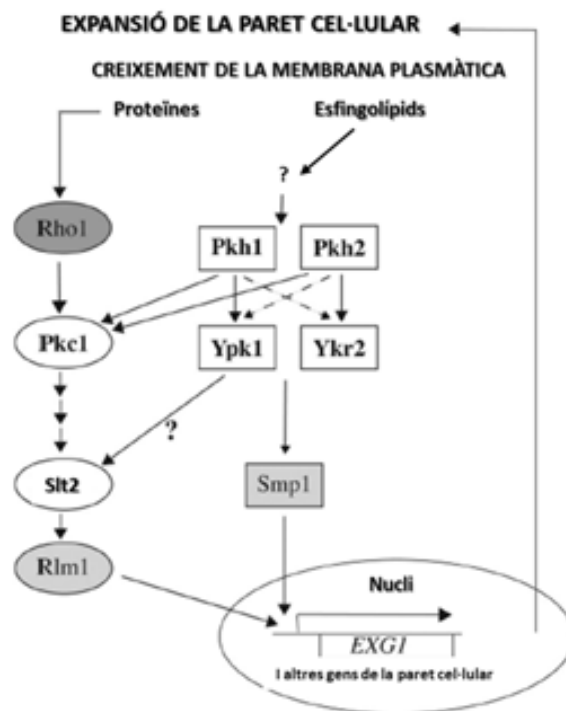
### Ypk1/Ypk2

Ypk1 i Ypk2 són proteïnes funcionalment redundants entre elles, ja que la falta d'ambdues en resulta una soca no viable (Chen et al., 1993). Ypk1 i Ypk2 presenten una similitud del 88% en el seu domini catalític i tenen un domini N-terminal i C-terminal, molt similar en longitud. Entre les proteïnes cinases de mamífer, el seu domini catalític presenta una gran similitud amb les proteïnes SGK (55% idèntic) i PKB (52% d'idèntic).

Fet que fa que l'expressió de la proteïna SGK de mamífer rescati la inviabilitat del doble mutant *ypk1Δ ypk2Δ* (Casamayor et al., 1999).

Un estudi mostra com Ypk1 és l'enzim que pren més importància dels dos, en dur a terme funcions importants per la viabilitat cel·lular. Mentre que Ypk1 es troba exclusivament en el citosol, Ypk2 és més present en el nucli, suggerint així que les dianes citosòliques d'aquests enzims són més importants pel creixement cel·lular que les dianes nuclears (Roelants et al., 2002). També s'ha observat que Pkh1 activa preferiblement Ypk1 i que Pkh2 preferentment activa Ypk2 (Roelants et al., 2002).

La majoria de fenotips que mostren els mutants *Ypk1-1<sup>ts</sup> Ypk2Δ*, incloent l'alteració de l'organització de l'actina, lisis cel·lular en temperatures restrictives, increment de sensibilitat a diferents compostos tòxics, consisteixen en defectes de la paret cel·lular, suggerint així la connexió entre aquestes proteïnes i la via de la CWI, i per tant la via de la MAPK (Figura 7) (Roelants et al., 2002) per més informació veure apartat 3.1.



**Figura 7. Cascada Pkh1-Ypk1 i Pkh2-Ykr2 i la via de senyalització de la paret cel·lular.** Pel creixement de la cèl·lula i de la membrana plasmàtica és necessari l'expansió de la paret cel·lular. Primerament es mostra la GTPasa Rho1, implicada en la via de la integritat de la paret cel·lular (per més informació veure apartat 3.1), la qual activa Pkc1, desencadenant l'activació de diferents MAPKs, fins arribar a la

MAPK Slt2, que permetrà la transcripció de diferents gens implicats en l'expansió i remodelació de la paret cel·lular. Tal com es mostra a l'esquema tant la cascada Pkh1-Ypk1 com Pkh2-Ypk2, apareixen monitoritzant el creixement de la membrana plasmàtica mitjançant un mecanisme diferent, en aquesta nova via els esfingolípidus estimulen Pkh1 i Pkh2, aquests enzims a la vegada fosforilen i activen Ypk1 i Ypk2, primerament en el citosol i en el nucli, respectivament. Evidències genètiques, indiquen que Ypk1 i Ypk2 actuen a través del factor de transcripció, Smp1. El creuament entre aquestes dos vies possiblement es dona en dos nivells diferents: l'activació completa de Pkc1 requereix la fosforilació per part de Pkh1 i/o Pkh2 (Inagaki et al., 1999), i Ypk1 (i potser Ypk2) potser contribueix (directe o indirectament) a l'activació de Slt2 (Schmelzle et al., 2002). Figura adaptada de (Roelants et al., 2002).

### Pkc1

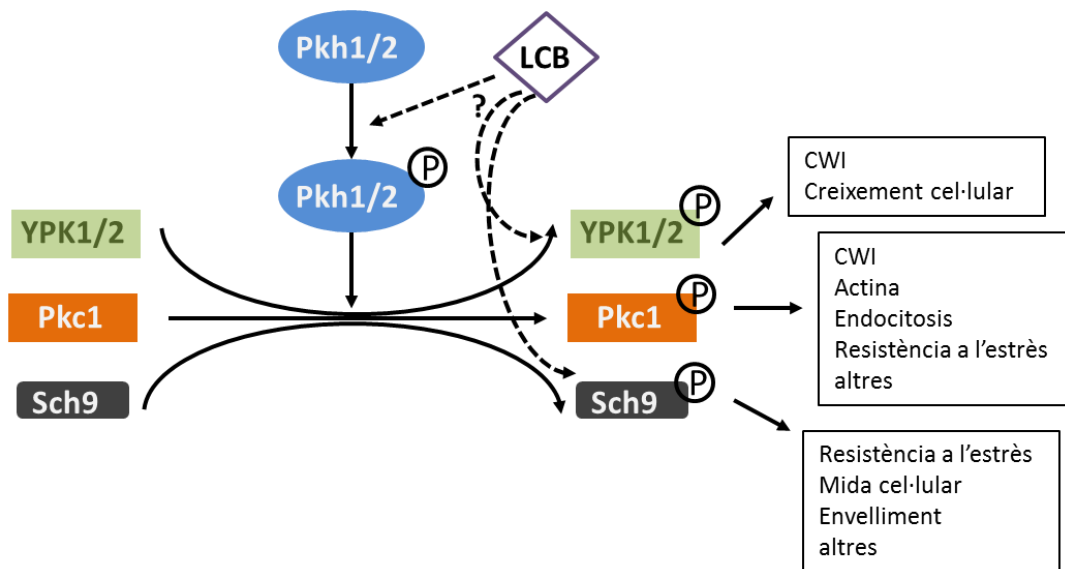
El genoma de *Saccharomyces cerevisiae* codifica un únic homòleg de les PKC cinases, a diferència de les cèl·lules de mamífer que en codifica aproximadament unes 10 isoformes diferents (D E Levin et al., 1990). Pkc1 és el primer component que s'ha descobert de la via CWI (Figura 7 i 8). La deleció de *PKC1* és letal sota condicions normals de creixement, però la viabilitat de les cèl·lules mutants *pkc1*, pot ser rescatada per suport osmòtic (D E Levin & Bartlett-Heubusch, 1992). La falta de *PKC1* dona un fenotip més greu en quant a defectes en el creixement, que la falta de qualsevol dels membres de la cascada de les MAPKs, indicant així que Pkc1 regula múltiples vies (K. S. Lee & Levin, 1992).

Pkc1 es localitza en llocs on es polaritza el creixement cel·lular (Andrews & Stark, 2000) i en l'anell de septines que es forma en el coll entre la cèl·lula mare i la cèl·lula filla. La funció de Pkc1 és essencial per la viabilitat cel·lular sota condicions d'estrès oxidatiu, ja que la sobreexpressió de Pkc1 confereix a les cèl·lules més resistència als agents oxidants (més informació apartat 3.2 i 3.3). A més Pkc1, es requereix per repolaritzar i restaura l'esquelet d'actina en resposta a l'estrès oxidatiu provocat per peròxid d'oxigen (Vilella et al., 2005). Pkc1, sembla controlar, per tant, tant la despolarització com repolarització del citoesquelet d'actina (Delley & Hall, 1999). Aquests autors proposen que la despolarització de l'actina es dur a terme a partir d'una altra branca de la via de CWI independent de la cascada de les MAPKs (Figura 11), per més informació sobre la implicació de Pkc1 en la via de CWI continuar en l'apartat 3.1.

### Sch9

Tots els organismes responen als senyals derivats dels nutrients per tal d'adaptar la seva fisiologia i desenvolupar les decisions necessàries per assegurar la seva supervivència. En el llevat *Saccharomyces cerevisiae* els senyals de glucosa activen la producció cel·lular de AMPc. Aquesta via de senyalització rep el nom de Ras-AMPc, la qual juga un paper molt important en la regulació del creixement cel·lular, metabolisme i resistència a l'estrès, en particular en connexió a la disponibilitat de nutrients (J M Thevelein & de Winde, 1999). Sch9 és un dels components principals d'aquesta via. Sch9 juga un paper molt important en la senyalització de nitrogen i glucosa. Diferents estudis mostren que Sch9 és un activador de translació i expressió de proteïnes ribosomals, de la biogènesis dels gens ribosomals, de la regulació del control de la mida cel·lular i la transcripció dels gens en resposta a la disponibilitat de nutrients, resposta a estrès osmòtic, entre d'altres (Crauwels et al., 1997; Jorgensen et al., 2002; Pedruzzi et al., 2003; Jorgensen et al., 2004; Pascual-Ahuir & Proft, 2007).

També es coneix que Pkh1/2 fosforila i activa Sch9 fosforilant-la en el residu Thr570 del seu *T-loop* (Roelants et al., 2004; Sobko, 2006). Alguns estudis també demostren que la fosforilació de Sch9 per part de Pkh1 ve estimulada per esfingolípid de cadena llarga (K. Liu et al., 2005). A més, Sch9 pot ser també fosforilada pel complex mTOR1/2, el qual fosforila sis aminoàcids que es troben en el seu motiu hidrofòbic (Urban et al., 2007).



**Figura 8. Funció i regulació de les AGC cinases per part de les Pkh i esfingolípids.** Tal com indiquen els estudis realitzats per (Robert C Dickson, Sumanasekera, & Lester, 2006; K. Liu et al., 2005; Luo, Gruhler, Liu, Jensen, & Dickson, 2008), els esfingolípids de cadena llarga (LCB) podrien estimular la fosforilació de Pkh1/2 i aquestes cinases activen per fosforilació els seus substrats tals com, Ypk1/2, Pkc1 i Sch9. LCB també podria estar estimulando l'autofosforilació dels substrats Ypk1/2 i Sch9 tal com s'indica a la figura. Aquests substrats de Pkh tindrien un paper molt important pel que fa a la via CWI, creixement cel·lular, remodelació de l'actina i el citoesquelet, resposta a l'estrès, entre d'altres. Figura modificada de (K. Liu et al., 2005).

### Tpk1-3

En *S. cerevisiae* la via de la proteïna cinasa dependent de AMPc (PKA) té un paper principal en el control del metabolisme, de la resistència a estrès o de la proliferació cel·lular. Quan aquesta cinasa està activa, degut a un augment de AMPc, efecte a nombroses dianes implicades en diversos processos, però que en un conjunt participen en la correcta adaptació a les condicions ambientals en les que es troba la cèl·lula. Entre aquests processos es troba la regulació del metabolisme energètic, la utilització de carbohidrats, la tolerància a diversos estressos, la progressió del cicle cel·lular, la selecció del lloc de gemmació, el creixement pseudohifal, l'envelliment cel·lular o l'autofàgia (Thevelein & de Winde, 1999; Santangelo, 2006; Tamaki, 2007; Smets et al., 2010).

La PKA és un heterotretàmer format per dos subunitats catalítiques, codificades per tres gens altament redundants *TPK1*, *TPK2* i *TPK3* i dos subunitats reguladores,

codificades per *BCY1* (Toda et al., 1987; Toda et al., 1987b). La unió de l'AMPC a les subunitats reguladores provoca la dissociació del heterotetràmer i l'alliberació de les subunitats catalítiques. L'activitat PKA és essencial per la cèl·lula ja que la deleció de les tres subunitats catalítiques és letal (Toda et al., 1987), però la presència d'una sola subunitat catalítica permet a la cèl·lula créixer de manera normal, indicant doncs, que probablement hi ha un solapament en les funcions de les diferents subunitats catalítiques. Les tres subunitats catalítiques són molt similars en la seva regió C-terminal. Els 320 residus de la regió C-terminal de Tpk1 i Tpk2 comparteixen un 77% d'identitat i són 88% i 75% idèntiques a Tpk3, respectivament. En canvi, pel que fa a les regions N-terminals d'aquestes proteïnes no presenten similitud de seqüència i tenen mides diferents (Toda et al., 1987).

Tpk1, Tpk2 i Tpk3, com la majoria de les AGC cinases, contenen un lloc d'unió a PDK1 (*T-loop*). Recentment s'ha observat *in vitro*, que Tpk1 interacciona físicament amb Pkh1, i que aquesta interacció depèn del motiu d'unió hidrofòbic en el domini cinasa de Pkh1 (Voordeckers et al., 2011). L'alineament de les seqüències de Tpk1, Tpk2 i Tpk3 amb substrats de PDK1 tant de mamífer com de *S. cerevisiae*, mostren que aquestes tres Tpk's tenen un *T-loop* conservat i un motiu Hidrofòbic truncat (HM) (veure figura 9). El contrari de Tpk1 i Tpk2, Tpk3 li falta el típic motiu hidrofòbic, ja que el primer residu hidrofòbic (fenilalanina) és substituït per metionina.

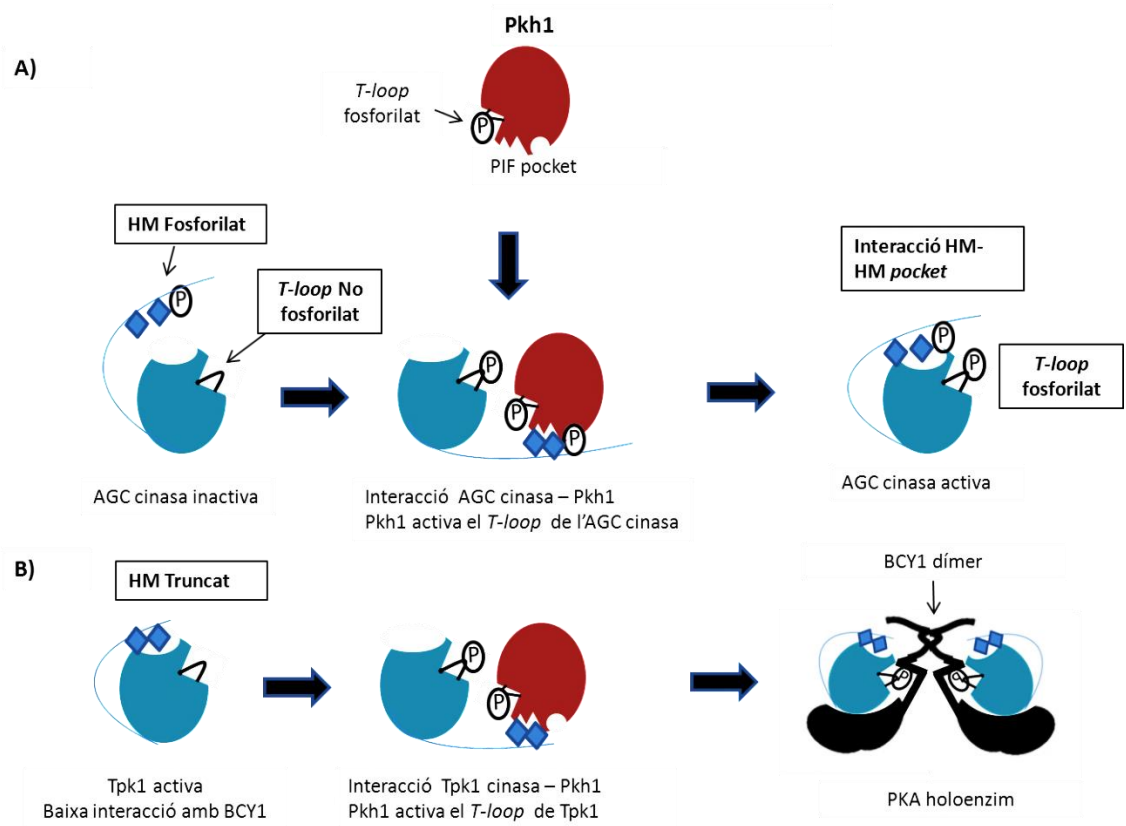
	<u>T-loop</u>		<u>Motiu Hidrofòbic (HM)</u>
Tpk1	241 <b>T</b> LCGTPDYIAPE	373	FDKYPEE-----DINYG <b>V</b> QG <b>E</b> DP-----YADLFRDF
Tpk2	224 <b>T</b> LCGTPDYIAPE	356	FDQYPEE-----QLDYGI <b>Q</b> GDDP-----YA <b>E</b> YFQDF
Tpk3	242 <b>T</b> LCGTPDYIAPE	374	FDRYPEE-----EFNYGI <b>Q</b> G <b>E</b> DP-----YMDLMKEF
Sgk1	256 <b>T</b> FCGTPEYLAPE	399	FDPEFTE----EPVPNSIGK <b>S</b> PD <b>S</b> VLVTASVKEAAEAFLGF <b>S</b> YAPPTDSFL
Prk2	387 <b>T</b> FCGTPEFLAPE	977	FDDEFTS-----EAPIL <b>T</b> PPREPRILSEEEQ <b>E</b> M-FRFD <b>F</b> YIADWC
Sch9	570 <b>T</b> FCGTTEYLAPE	719	FDPEFTTASTSYMNKHQ <b>P</b> MM <b>T</b> ATPL-----MQAKFAG <b>F</b> TFVDES
Ypk1	508 <b>T</b> FCGTPEYLAPE	646	FDEEFTRE-----KPID <b>S</b> VVDE-----VQ <b>Q</b> QFGG <b>W</b> TYVGNE
	↑		↑
	Lloc d'unió a PDK1	Lloc de fosforilació del <i>Turn Motif</i>	Lloc de fosforilació del Motiu Hidrofòbic

**Figura 9. La PKA de *S. cerevisiae* té motius que estan conservats en els substrats de PDK1.** Alineament de les seqüències dels substrats de PDK1 [ Sgk1 (ID 6446) i Prk2 (ID 5585) de mamífer] i substrats de Pkh [Sch9 (ID 856612) i Ypk1 (ID 853733)] amb les subunitats catalítiques de la PKA de *S. cerevisiae* [Tpk1 (ID 853275), Tpk2 (ID 855898) i Tpk3 (ID 853688)]. El número ID correspon al número d'accés a GenBank®. Les seqüències corresponen en el lloc d'activació de PDK1 (*T-loop*), en el *Turn Motif* i el lloc de fosforilació en el motiu hidrofòbic C-terminal, en negreta es mostren els residus susceptibles a ser fosforilats. Esquema adaptat de (Haesendonckx et al., 2012).

A més s'ha demostrat, que Pkh1 fosforila *in vivo* els *T-loop* d'aquestes subunitats catalítiques, Tpk1, Tpk2 i Tpk3, però amb diverses eficiències, per causa d'aquestes peculiaritats del motiu hidrofòbic (Haesendonckx et al., 2012; Voordeckers et al., 2011). Això fa que, mentre Tpk1 i Tpk2 interaccionen amb Pkh1 principalment a través d'un mecanisme que depèn de la interacció HM- *PIF pocket* (veure figura 10), però amb menys freqüència que un substrat de Pkh1 amb un HM típic com Sch9, Tpk3 mostra una dèbil interacció amb Pkh1, independent de la presència del *PIF pocket* de Pkh1. Aquesta dèbil interacció és, en part, pel seu domini C-terminal atípic, MXXF.

Pkh1 fosforila el residu Thr<sup>241</sup> de Tpk1, mentre que Tpk2 mostra *in vivo* una major fosforilació en el residu Thr<sup>224</sup>, encara que no sembli ser la diana de fosforilació preferent de Pkh1, suggerint que Tpk2 podria tenir una altra diana de Pkh1, encara no caracteritzada, al mateix semblaria suggerir-se en el cas de Tpk3 (Voordeckers et al., 2011). Cal dir, en aquest punt, que algunes AGC cinases, a part del seu *T-loop*, també tenen un tercer lloc de fosforilació anomenat *Turn motif* o *Zipper site* (Z/TM), el qual permet juntament amb la fosforilació del *T-loop* tenir una major estabilitat de la conformació activa de l'AGC cinasa i a més protegeix el motiu hidrofòbic de ser desfosforilat (veure figura 10) (Hauge et al., 2007).





**Figura 10. Mecanisme d'activació de les AGC cinases/ Tpk1 per part de Pkh1.** (A) Diagrama esquemàtic de Pkh1 que mostra el *T-loop* i el *PIF pocket*. Aquesta reconeix el domini hidrofòbic (HM) fosforilat d'una AGC cinasa i es dona una interacció entre HM- *PIF pocket*. Aquesta interacció promou l'activació de Pkh1 resultant en la fosforilació de l'AGC cinasa en el seu *T-loop*. L'AGC cinasa esdevé activa per la fosforilació del *T-loop* i la unió del seu motiu HM amb solc (*HM pocket*). (B) Les subunitats catalítiques de PKA tenen un motiu hidrofòbic truncat. La conformació que no té el *T-loop* fosforilat efecte negativament l'associació de Tpk1 amb Bcy1. La interacció del motiu HM truncat de Tpk1 amb el *PIF pocket* de Pkh1 porta a la fosforilació del *T-loop* de Tpk1, aquest fet permet interacció amb el dímer Bcy1 tot formant un holoenzim. Figura adaptada de (Haesendonckx et al., 2012).

### 3. Paret cel·lular de *S. cerevisiae*

La paret cel·lular del llevat és una estructura molt dinàmica amb un paper clau en el creixement, defensa i adaptació de les cèl·lules a les diferents condicions mediambientals (Klis et al., 2006). Una part substancial de l'energia metabòlica de *S. cerevisiae* es destina a la construcció i remodelació de la paret. Segons les condicions de creixement, la paret pot arribar a constituir entre el 10% i el 25% del pes sec cel·lular.

La paret està formada per dos capes, una interior formada per una xarxa de polisacàrids, els quals serveixen com esquelet de la capa exterior constituïda bàsicament per proteïnes manosilades que s'expandeixen fins el medi extracel·lular (Klis et al., 2002; Klis et al., 2006). La capa interna de la paret cel·lular és una xarxa tridimensional amb una gran elasticitat formada per quitina i  $\beta$ -1,3-glucans (molècules compostes per uns 1500 monòmers de glucosa) units per enllaços del tipus pont d'hidrogen. A la part exterior de la xarxa de  $\beta$ -1,3-glucans s'hi uneixen cadenes molt ramificades, i per tant molt hidrosolubles, de  $\beta$ -1,6-glucans (compostes per aproximadament 130 monòmers de glucosa) (Manners et al., 1973; Manners et al., 1973b).

La capa externa de la paret està formada per proteïnes altament glicosilades que poden agrupar-se en dos categories diferents: les proteïnes glicosilfosfatidilinositols (GPI) i les proteïnes ASL (*alkali sensitive linkage*). Les primeres són les més abundants i s'uneixen a l'estructura de polisacàrids a través de les molècules hidrosolubles de  $\beta$ -1,6-glucans. Totes aquestes proteïnes es troben implicades en diverses funcions entre les quals s'hi troben l'adhesió cel·lular, el creixement, el processament de la pròpia paret o el seu metabolisme (Klis et al., 2002).

### 3.1. Via de la integritat de la paret cel·lular (CWI)

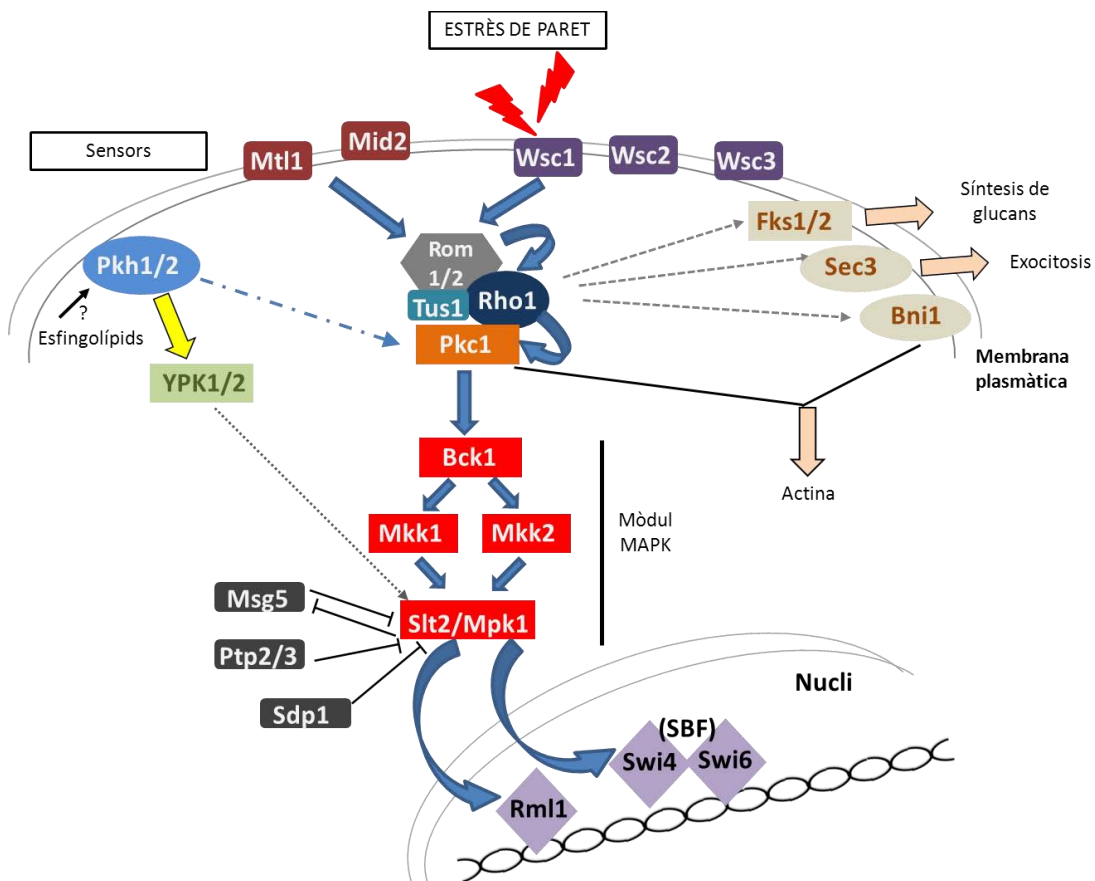
Tant la construcció com la remodelació de la paret cel·lular estan finalment regulades per la via de la integritat de la paret cel·lular (CWI). Aquesta via està formada per una família de sensors, transductors i efectors de la senyal que regulen l'expressió de gens i/o la funció de proteïnes de forma especialitzada dependent de l'estímul que l'activa i de l'acció requerida.

Típicament els estressos que activen la via CWI són l'exposició a elevades temperatures (que provoca un increment en la pressió interna sobre la paret degut a l'acumulació de trehalosa) i els agents que malmeten directament la paret com l'antagonista de quitina blanc de Calcofluor, el colorant roig Congo (que s'uneix a diversos polisacàrids, especialment quitina i cel·lulosa, i té un efecte semblant al blanc de Calcofluor), l'acció enzimàtica de la zimoliasa (mescla d'activitats  $\beta$ -1,3-glucanases i proteases, que directament causa la lisis de la paret) o la cafeïna (Manners et al., 1973b; Roncero & Durán, 1985; Neves & François, 1992; Kopecká & Gabriel, 1992; Kamada et al., 1995; Zarzov et al., 1996; Ketela et al., 1999; De Nobel et al., 2000; Martín et al., 2000; Un Sung Jung et al., 2002). Altres tipus de circumstàncies tals com la presència de feromones, l'estrès hipotònic, l'estrès oxidatiu i l'estrès físic sobre la membrana plasmàtica també desencadenen una resposta relacionada amb la via CWI, encara que els mecanismes implicats siguin encara objectiu d'estudi (Davenport et al., 1995; Errede et al., 1995; Kamada et al., 1995; Zarzov et al., 1996; Buehrer & Errede, 1997; Alic et al., 2004).

L'activació de la via de la integritat de la paret cel·lular sol estar a càrrec dels sensors localitzats a la membrana plasmàtica. S'ha identificat una família de cinc sensors que inclou les proteïnes Wsc1, Wsc2, Wsc3 (Verna et al., 1997; Gray et al., 1997; Jacoby et al., 1998), Mid2 i Mtl1 (Ketela et al., 1999; Rajavel et al., 1999). Tots ells són similars en el sentit de que posseeixen un domini carboxi-terminal citoplasmàtic, un únic domini transmembrana i un ectodomini periplasmàtic molt ric en residus Ser/Thr que es troba altament O-manosilat (Rajavel et al., 1999; Philip & Levin, 2001). S'ha proposat que funcionen com mecanosensors (David E Levin, 2005)

encara que només recentment Dupres i col·laboradors han proposat que Wsc1 actua com una nanomolla capaç de resistir una elevada força mecànica i de respondre a l'estrès de la paret cel·lular (Dupres et al., 2009).

Wsc1, 2 i 3 posseeixen una regió característica en el domini extracel·lular rica en Cys anomenada regió WSC que no es troba ni en Mid2 ni en Mtl1 (David E Levin, 2005). Les tres proteïnes Wsc tenen gran similitud de seqüència entre elles mentre que Mid2 té una identitat del 50% amb Mtl1 (Verna et al., 1997; Ketela et al., 1999; Rajavel et al., 1999; Vay, Philip, & Levin, 2004). Les dades experimentals apunten a Wsc1 i Mid2 com els sensors més importants.



**Figura 11. La via de la integritat de la paret cel·lular (CWI).** Els sensors de la membrana plasmàtica Wsc1-3, Mid2 i Mtl1 detecten danys a la paret cel·lular i ho senyalitzen mitjançant Rom1/2 i Tus1 (GEFs de Rho1) i la proteïna Rho1. Rho1 activa la proteïna cinasa C (Pkc1) que a la vegada activa el mòdul de les MAPK format per Bck1, Mkk1/2 i Slt2. Slt2 fosforila i activa els factors de transcripció Rml1 i Swi4/6 provocant una resposta transcripcional. A l'esquema es mostren a més altres funcions que duen a terme Rho1 i Pkc1. També es mostra la implicació de Pkh en la via, Pkh1/2 són activades possiblement per algun tipus d'esfingolípids (David E Levin, 2005) i aquestes a la vegada activen Pkc1 i Ypk1/2, aquestes últimes podrien estar actuant directament sobre l'activació de Slt2 (Schmelzle et al., 2002).

Rho1 és l'element central de regulació de la via, es tracte d'una proteïna G petita i com a tal cicle entre l'estat actiu (quant uneix GTP) i l'estat inactiu (uneix GDP). Per passar d'un a altre estat requereix de l'acció de GEFs que la converteixen en la seva forma activa i de GAPs que l'inactiven. Entre les GEFs de Rho1 s'han identificat Rom2, Rom1 i Tus1 mentre que Bem2, Sac7, Bag7 i Lrg1 són els seus GAPs (Peterson et al., 1994; Cid et al., 1998; Martín et al., 2000; S Friant et al., 2001; Schmelzle et al., 2002; Schmidt et al., 2002).

Rom1 i Rom2, que presenten un paper redundant, són principalment les encarregades d'activar Rho1 (Ozaki et al., 1996), aquestes s'uneixen a zones específiques del domini citoplasmàtic dels sensors Wsc1 i Mid2 (i probablement els altres sensors mencionats anteriorment) permetent així l'activació de Rho1 (Philip & Levin, 2001). Respecte Tus1, s'ha proposat, encara que no és del tot clar com activa Rho1, que Tus1 pot ser fosforilat directament per Cln2-Cdc28 i que aquesta fosforilació fos la clau per activar Rho1 durant la transició G1/S del cicle cel·lular (David E Levin, 2005; Kono et al., 2008). Un cop activa, aquesta proteïna G actua sobre diferents dianes: activant la proteïna cinasa C de *S. cerevisiae* (Pkc1), promovent l'activitat 1,3- $\beta$ -glucà sintasa (a càrrec de les subunitats catalítiques Fks1 i Fks2), participant en la regulació del citoesquelet (activant les formines Bni1 i Bnr1) i jugant un paper en la secreció polaritzada (mitjançant la seva funció sobre l'element del complex exocític Sec3) (Cabib et al., 1998; David E Levin, 2005).

La via de Pkc1/Slt2 és una de les 5 vies de MAPKs de *S. cerevisiae* i està constituïda per la cinasa Pkc1 (D E Levin et al., 1990) i el mòdul MAPK, format per la MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK) Bck1 (Costigan et al., 1992; K. S. Lee & Levin, 1992), les MAP cinases cinases (MAPKK) redundants Mkk1 i Mkk2 (Irie et al., 1993) i finalment la MAP cinasa (MAPK) Slt2 (Martín et al., 1993).

A l'inici de l'activació de la via Pkc1/Slt2, Pkc1 s'associa a Rho1-GTP (activa) i això permet que pugui ser estimulada per fosfatidilserina (però no per altres cofactors com diacilglicerol o calci, que convencionalment activen PKCs en altres organismes) (Nonaka et al., 1995; Kamada et al., 1996). Encara que l'activació de la via de les MAPK

(Bck1-Mkk1,2-Slt2) és el paper més estudiat de Pkc1, aquesta cinasa també actua sobre altres substrats. Aquesta conclusió s'extreu del fet que la deleció de Pkc1 és letal, a diferència de la deleció de qualsevol de les altres cinases de la via o de la doble deleció *mkk1 mkk2*, que únicament provoca deficiències de creixement a elevades temperatures o sota estrès de paret (David E Levin, 2005). Tant la letalitat de *pkc1* com la sensibilitat dels mutants dels elements de la via MAPK es pot revertir per estabilització osmòtica del medi, per exemple en presència de 1M sorbitol (K. S. Lee & Levin, 1992).

Pkc1 fosforila Bck1 en diversos residus (Ser<sup>939</sup>, Thr<sup>1119</sup> i Ser<sup>1134</sup>) en una zona situada entre el seu domini catalític i el domini regulador (D E Levin et al., 1994). A la vegada, Bck1 activa a Mkk1 i Mkk2 mitjançant fosforilació i aquestes reconeixen el motiu típic de MAPK T-X-Y en Slt2 i el fosforilen de forma dual en els residus Thr<sup>190</sup> i Tyr<sup>192</sup> (Irie et al., 1993; Kamada et al., 1995; Paravicini & Friedli, 1996). Aquestes tres cinases difereixen en la seva localització en absència d'estrès, ja que Bck1 i les Mkk1 i 2 es troben en el citoplasma mentre que Slt2 té localització nuclear. Encara que, en cas d'estrès de paret tant Slt2 com Mkk1 i 2 es distribueixen en les zones de creixement polaritzat, cosa que no s'ha pogut demostrar en el cas de Bck1 (Kamada et al., 1995; van Drogen & Peter, 2002).

La desfosforilació i per tant inactivació de Slt2 és catalitzada per almenys quatre fosfatases. Msg5 és una fosfatasa d'especificitat dual que també té la capacitat d'inactivar a Fus3, la MAPK de la via de la resposta a feromones (Doi et al., 1994; Flández et al., 2004). Altres fosfatases que també actuen sobre Slt2 són Ptp2 i Ptp3, tirosina fosfatases que desfosforilen Fus3 i Hog1, una MAPK de resposta a alta osmolaritat (Mattison et al., 1999). Finalment trobem Sdp1, una Ser/Thr fosfatasa com Msg5, però que sembla actuar de forma específica sobre Slt2 (Collister et al., 2002).

Els principals substrats coneguts de Slt2 es troben en el nucli. Es tracte de Rlm1 i el complex SBF format per Swi4 i Swi6. Rlm1 és el factor de transcripció responsable de la major part de la resposta transcripcional generada per la via CWI (Watanabe et al., 1997; U S Jung & Levin, 1999; García et al., 2004). Aquest factor de transcripció pot

funcionar com activador o com inhibidor de l'expressió depenent dels gens sobre els quals actua. Actua mitjançant la unió a motius 5'-CTA(A/T)<sub>4</sub>TAG-3' presents en els promotors de certs gens, la majoria dels quals estan implicats en la biogènesis de la paret cel·lular (Dodou & Treisman, 1997; Un Sung Jung et al., 2002). Per altra banda, s'ha descrit que el complex transcripcional SBF (*Swi4/Swi6 dependent cycle box*), capaç d'unir-se a seqüències CACGAAA durant la fase G1 del cicle cel·lular i regular la transició de G1 a S i la morfogènesis cel·lular, també posseeix una funció depenent de la seva fosforilació per Slt2 en resposta a un estrès de paret (Madden et al., 1997; Baetz et al., 2001).

El defecte de creixement d'un mutant *swi4 rlm1* no és tant greu com el que té el mutant simple *slt2*, cosa que, juntament amb el fet de que Slt2 es desplaci al citoplasma en situacions d'estrès de paret, concorda amb l'existència de dianes d'aquesta MAPK extracel·lulars (David E Levin, 2005). Algunes d'aquestes han sigut identificades: el canal de calci format per Cch1 i Mid1, la fosfatasa dual Msg5 i la tirosina fosfatasa Mih1. La relació entre Cch1-Mid1 i Slt2 no està del tot clara. S'ha demostrat que el correcte funcionament d'aquest canal depèn de Slt2 en resposta a estrès de reticle, el que suggereix una interacció entre la via CWI i la de la calcineurina (Bonilla & Cunningham, 2003). El paper de Slt2 sobre la fosfatasa Msg5 constitueix un excel·lent mecanisme de potenciació de la senyal (retroalimentació positiva) de forma que Slt2 fosforila Msg5 i això provoca una disminució en l'afinitat d'unió d'ambdues proteïnes (Flández et al., 2004). Per altra banda, encara que no se sap si directa o indirectament, Slt2 regula de forma negativa la fosfatasa Mih1 i això provoca que Mih1 no activi Cdc28 produint-se una parada del cicle cel·lular entre G2 i M (Harrison et al., 2001).

### 3.2. Resposta a estrès i via de la integritat de la paret cel·lular

Com a condicions fisiològiques òptimes de creixement del llevat es sol considerar la incubació a temperatures entre 25 i 30 °C amb agitació constant en un medi de cultiu ric en nutrients (incloent sucres fermentables com glucosa o fructosa) a pH pròxim a 5. En aquestes condicions el llevat adopta un metabolisme fermentatiu i creix ràpidament. Podríem definir com a situacions d'estrès aquelles condicions fora del rang fisiològic que permeten un creixement normal de la cèl·lula (Bond, 2006) o bé aquelles que amenacen la seva supervivència o creixement òptim (Hohman & Mager, 2003). Són per tant condicions d'estrès, l'alta o baixa osmolaritat, les temperatures extremadament baixes o altes, la presència d'agents oxidants, condicions de pH extremes, la falta de nutrients.

La cèl·lula per respondre aquestes condicions necessita d'un mecanisme de detecció de les situacions d'estrès i de l'activació de les vies de transducció de senyal. Aquestes desencadenen canvis transcripcionals (de tipus específic o general) que determinen l'adquisició de resistència a estrès i permeten així minimitzat els danys produïts per situacions adverses.

Un gran nombre de gens del llevat (aproximadament el 14% del genoma) veuen afectada la seva transcripció quan canvien les condicions mediambientals, donant lloc a l'anomenada *Environmental Stress Response* (ESR; Gasch et al., 2000, Hohman & Mager, 2003). Així els llevats activen una reprogramació de l'expressió gènica, independent del tipus d'estrès produït, i que efecte a més de la transcripció de gens d'estrès, a la maquinària de transcripció de carbohidrats i d'àcids grassos, el transport, el manteniment del potencial redox, la desintoxicació d'espècies reactives d'oxigen i altres tòxics, així com l'autofàgia, el plegament i degradació de proteïnes, modificació de la paret cel·lular, reparació del DNA, secreció vacuolar, funció mitocondrial, senyalització cel·lular i altres processos.

Les rutes de transcripció implicades en la resposta a estrès poden ser induïdes per estrès específic o poden ser activades per diverses condicions desfavorables pel creixement. Quan s'exposa una cèl·lula a un estrès relativament suau, aquestes



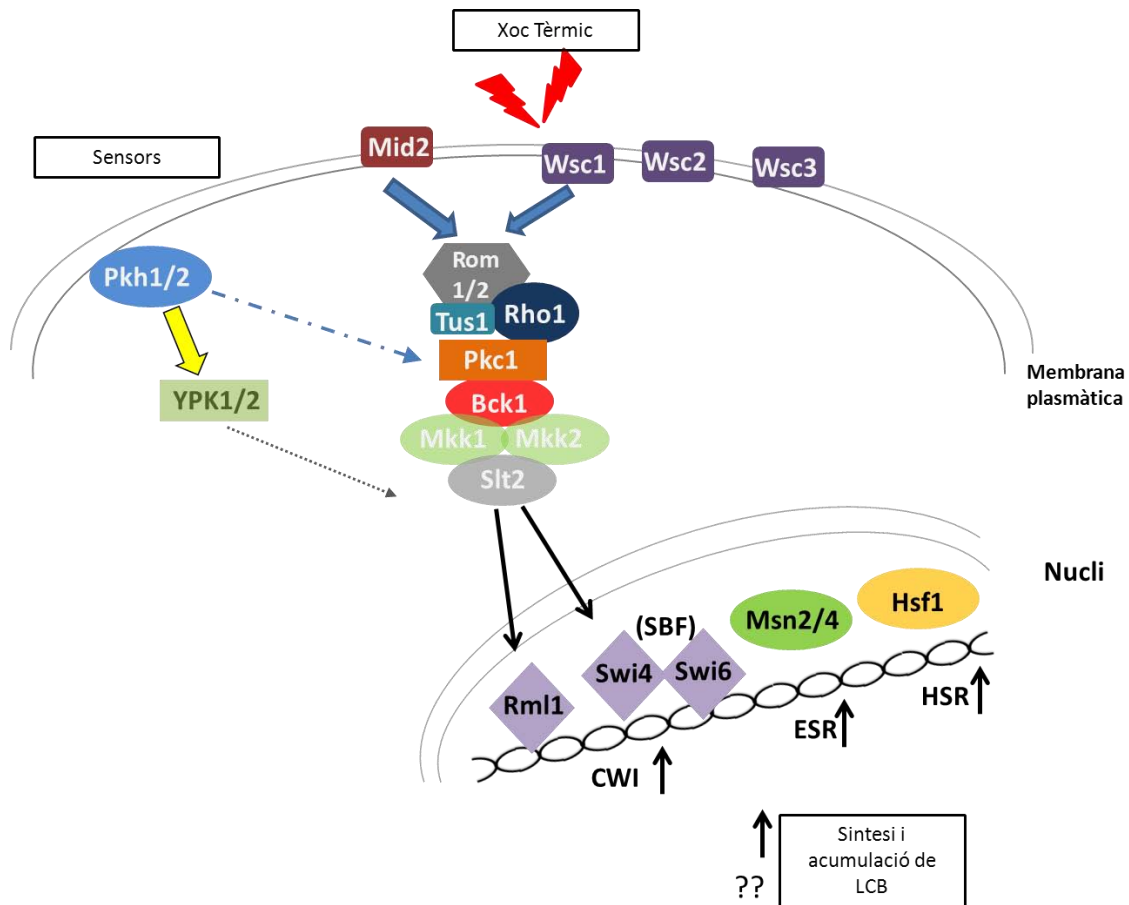
desenvolupen una major tolerància no només a dosis altes del mateix tipus d'estrès (resistència induïda o adquirida), sinó que també en front a altres tipus d'estrès. La existència d'una via general de resposta a estrès va ser suggerida per explicar aquest fenomen, com a mecanisme integrador que detecta i respon en front a diferents formes d'estrès. En els promotors de diferents gens implicats en la resposta general a estrès es va identificar un element responsable de la seva activació transcripcional (Kobayashi & McEntee, 1993; Marchler et al., 1993), funcional en ambdós orientacions, que presenta la seqüència consens CCCCT o AGGGG (Kobayashi & McEntee, 1990; Wieser et al., 1991). Aquesta seqüència es va denominar STRE. No tots els gens que contenen STREs funcionals en el seu promotor presenten el mateix patró d'expressió, no s'indueixen necessàriament per les mateixes condicions d'estrès, i les seves cinètiques i nivells d'expressió són variables (Winderickx et al., 1996). Aquestes diferències poden ser a causa de la presència en el seu promotor d'altres seqüències reguladores, que modularien addicionalment l'expressió del gen per estrès (Amorós & Estruch, 2001), o que el reconeixement dels STREs està condicionat per l'entorn que el rodeja. També es coneixen els dos factors transcripcionals, homòlegs i parcialment redundants, anomenats Msn2 i Msn4, que s'uneixen específicament als elements STREs mitjançant els seus dominis de dits de zinc, activant així la transcripció dels gens que els contenen en el seu promotor (Martínez-Pastor et al., 1996; Schmitt & McEntee, 1996). El doble mutant *msn2msn4* és hipersensible a diferents condicions d'estrès, com l'esgotament de la font de carboni, xoc tèrmic i estrès osmòtic. Per altra banda, la sobreexpressió d'aquests factors de transcripció millora la resistència a estrès per esgotament de nutrients i xoc tèrmic (Martínez-Pastor et al., 1996).

### **Estrès per xoc tèrmic**

Quan les cèl·lules estan exposades a condicions d'estrès més específiques, com temperatures no òptimes (> 36-37 °C), es produeixen importants danys cel·lulars que van des de la desnaturalització i agregació de proteïnes, fins alteracions de l'estructura de les membranes, així com l'activació del programa transcripcional anomenat HSR (Morano et al., 2012). La resposta a xoc tèrmic permet a les cèl·lules enfrontar-se a aquests danys i adquirir termotolerància o capacitat per sobreviure a exposicions breus a temperatures extremes. En eucariotes, la família dels factors de transcripció de

xoc tèrmic, HSF, són els primers moduladors de la resposta a estrès, HSR. En *S. cerevisiae* el factor de transcripció de xoc tèrmic, Hsf1, activa la transcripció, entre altres, de gens codificants de les proteïnes de xoc tèrmic, HSP (Lindquist & Craig, 1988; Parsell & Lindquist, 1993). Hsf1 s'expressa constitutivament i s'uneix a una seqüència conservada, l'element de xoc tèrmic, HSE, localitzat en el promotor d'aquests gens (Sorger, 1991). En absència d'estrès la proteïna, Hsf1, de llevat és poc activa, però durant un xoc tèrmic la seva capacitat d'unió al DNA augmenta (Giardina & Lis, 1995). Alguns gens de resposta a xoc tèrmic es veuen també activats per uns segons factors de transcripció, Msn2/4. Encara que el reguló Msn2/4 participa a més activant gens de resposta a estrès oxidatiu, metabòlic i altres respostes citoprotectives, sent característic doncs, d'una resposta de tipus ESR (Wieser et al., 1991; Amorós & Estruch, 2001; Morano et al., 2012).

Per tant, durant un xoc tèrmic s'indueixen principalment, tres vies de resposta: HSR, on hi troben implicat el factor de transcripció Hsf1; ESR, on s'indueixen els factors de transcripció Msn2/4; i també, la via de la CWI, on es troben implicats els factors de transcripció Rlm1 i Swi4 (Verghese, Abrams, Wang, & Morano, 2012) (Figura 12). A part també de la implicació que hi tenen els esfingolípid, dels quals es coneix que després de 5-10 min d'un xoc tèrmic hi ha una acumulació d'esfingolípid de tipus LCB (R C Dickson et al., 1997; Robert C Dickson & Lester, 2002), per més informació veure l'apartat 4.

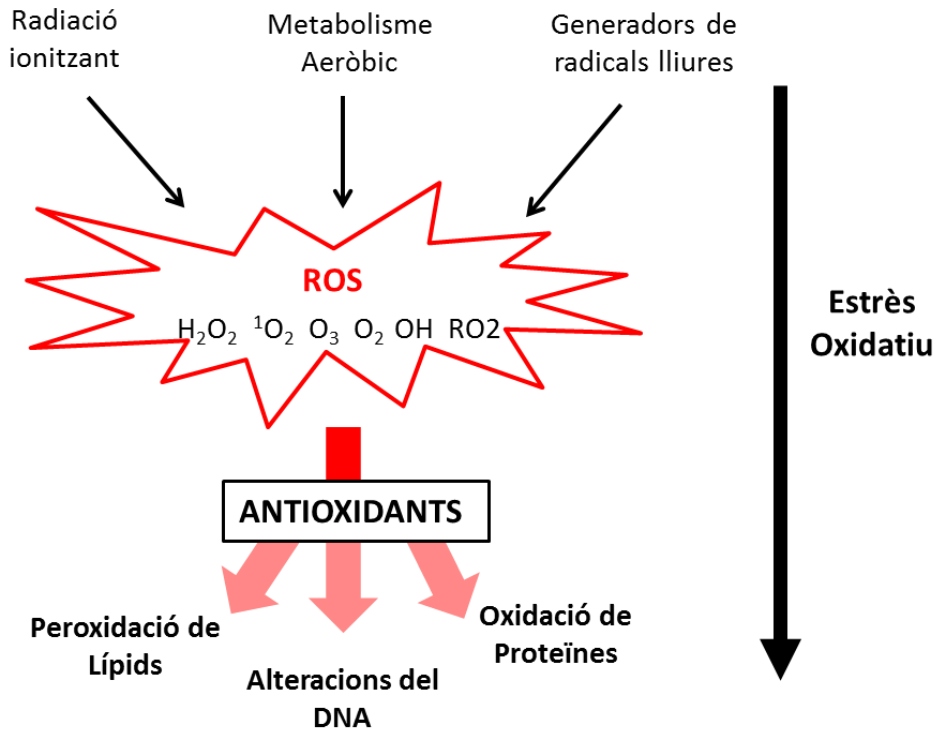


**Figura 12. Efectes fisiològics provocats per un xoc tèrmic.** Es mostren les tres vies que s'indueixen per xoc tèrmic: CWI (*Cell Wall Integrity*), ESR (*Environmental Stress Response*) i HSR (*Heat Shock Reponse*). Els efectes fisiològics de la síntesi i acumulació dels esfingolípid de cadena llarga (LCB), no estan del tots clars. Figura adaptada de (Verghese et al., 2012)

### Estrès oxidatiu

La resposta a estrès oxidatiu comprèn tots els mecanismes de detecció, transducció de senyal i protecció de les cèl·lules o organismes en front a la generació de ROS en diferents situacions, per exemple durant l'exposició a agents oxidants com l' $H_2O_2$  o durant el creixement aeròbic. Les ROS produeixen danys cel·lulars a diferents nivells: inactivació d'enzims o proteïnes, danys de membrana per peroxidació de lípids o alteracions del DNA (Coyle & Puttfarcken, 1993; Demple & Harrison, 1994) (Figura 13). S'han identificat 167 gens de llevat l'expressió de les quals canvia després d'un tractament amb  $H_2O_2$  (Godon et al., 1998). Entre aquests gens d'estrès s'hi troben gens que codifiquen proteïnes amb funcions antioxidants, altres, proteïnes d'estrès com

HSPs, i enzims relacionats amb el metabolisme. Entre d'altres factors de transcripció, també s'hi troben implicats els factors de transcripció Msn2/4 en resposta a estrès oxidatiu (Martínez-Pastor et al., 1996).



**Figura 13. Estrès oxidatiu.** Tots els organismes poden ser exposats a ROS durant un metabolisme aeròbic o bé per exposició contínua a radiacions ionitzants i compostos que generen radicals lliures. L'estrès oxidatiu té lloc quan els antioxidants i el mecanisme de supervivència cel·lular no són capaços de fer front a les espècies reactives d'oxigen o bé al dany causat per aquestes. L'estrès oxidatiu pot danyar una àmplia varietat de components cel·lulars resultants de la peroxidació lipídica, oxidació proteica i dany en el material genètic mitjançant la modificació del DNA. Figura adaptada de (Morano et al., 2012).

Altres estressos de gran interès, són els relacionats amb la limitació i la falta de nutrients, així com també la resposta a un estrès hiperosmòtic.

### **3.3. Vies de transducció de senyal implicades en la resposta a estrès, relacionades amb Pkh i la via de la Integritat de la paret cel·lular.**

Els canvis transcripcionals que s'han esmentat anteriorment, es troben controlats per diferents vies de transducció implicades en la regulació transcripcional de la resposta a canvis ambientals o interns que es produeixen a la cèl·lula, així com la via TOR, PKA, PKC, HOG, Calcineurina, entre d'altres. A continuació es detallen les més importants pel seguiment d'aquest treball.

#### **Via de la PKA, control de l'estat nutricional**

L'activitat dels factors transcripcionals Msn2/4 està regulada per diverses rutes, una d'elles és la ruta Ras/PKA, dependent dels nivells AMPc (apartat 2.5). En condicions òptimes de creixement, la ruta PKA regula positivament la proliferació cel·lular i negativament la resposta a estrès (J M Thevelein, 1994). En condicions d'elevades concentracions de nutrients l'AMPc s'uneix a la subunitat reguladora de PKA, el que fa que es dissocien les seves subunitats catalítiques, Tpk1/2/3 i es desencadeni la inhibició sobre la via general de resposta a estrès (Estruch, 2000), és a dir la inhibició de Hsf1 i Msn2/4. En canvi en condicions d'estrès s'inhibeix la via de la PKA i Msn2/4 pot activar la transcripció dels gens de resposta a estrès (Geymonat et al., 1998).

#### **Via de la Pkc1 d'integritat cel·lular**

Durant un estrès tèrmic, o qualsevol altre situació que efecte a la CWI, com un xoc hipoosmòtic (Davenport et al., 1995; Kamada et al., 1995) o la presència d'agents que efecten la paret cel·lular (K. S. Lee et al., 1993), s'activa un mecanisme particular de resposta a estrès, la via de la Pkc1 (Figura 12). Com ja hem comentat en els anteriors apartats, es tracta d'una via MAPK, la qual acaba fosforilant un factor de transcripció, Rlm1, que activa més de 20 gens (la major part d'ells relacionats amb la paret cel·lular) (Boorsma et al., 2004).

El dany en la paret es detectat en la superfície cel·lular pels sensors Wsc1/2/3, Mtl1 i Mid2, que juntament amb PI(4,5)P<sub>2</sub> recluten Rom1/2 a la membrana plasmàtica. La transducció de la senyal es dona a través de Pkc1, que fosforila el mòdul *downstream* de MAPKs, fins a fosforilar i activar Slt2 (Figura 11 i 12). Slt2 fosforila els factors de transcripció Rlm1 i Swi4 (que regula la transcripció de gens de paret cel·lular) o Swi4/6 (que regula els gens propis de la fase G1 tardana), en resposta a senyals procedents de la cinasa dependent de ciclina cdc28 (David E Levin, 2005).

La via Pkc1/Slt2, a part de ser regulada per Rho1, també pot ser activada per les proteïnes cinases, Pkh1 i Pkh2, amb funcions essencials i redundants en el manteniment de la integritat de la paret cel·lular (Inagaki et al., 1999; S Friant et al., 2001). A partir de mutants *pkh1(ts) pkh2* s'ha pogut observar que presenten defectes tant a nivell de la polarització de l'actina, com osmòtic en temperatures restrictives. El creixement és parcialment recuperat per una activació constitutiva de Pkc1, Bck1 o Mkk1, mostrant així la implicació directa entre Pkh i la via Pkc1/Slt2.

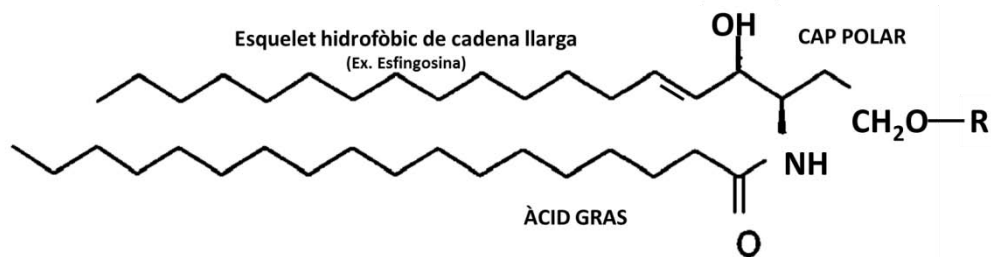
La importància d'aquesta via és clara, ja que els fenotips que mostren les cèl·lules que els hi manca algun dels components de la via CWI i que es troben creixent en temperatures restrictives, pateixen autòlisis (Martín et al., 1993). Aquesta sensibilitat a temperatura pot ser rescatada per estabilitzadors osmòtics com sorbitol. La falta de *PKC1* dona, però, un fenotip més greu en quant a defectes en el creixement, que la falta de qualsevol dels membres de la cascada de les MAPKs, indicant així que Pkc1 regula múltiples vies (K. S. Lee & Levin, 1992).

## 4. Paper dels esfingolípidis en el llevat *S. cerevisiae*.

### 4.1 . Ruta de síntesi dels esfingolípidis en *S. cerevisiae*, comparada amb mamífers.

Els esfingolípidis són essencials en tots els animals, en plantes, fongs, així com també en alguns virus i organismes procarïotes. En quan a les cèl·lules eucariotes juguen un paper molt important en la cèl·lula, ja que formen part dels components estructurals de les membranes, actuen com a segons missatgers de les vies de transducció de senyal implicades en processos cel·lulars essencials, com la diferenciació, migració, mort cel·lular programada i inflamació (Robert C Dickson, 2008). *S. cerevisiae* és un dels primers organismes on s'han identificat tots els gens implicats en el metabolisme dels esfingolípidis.

Els esfingolípidis es caracteritzen per tenir un esquelet hidrofòbic de cadena llarga, un àcid gras unit al grup amida i un cap polar (Figura 14).



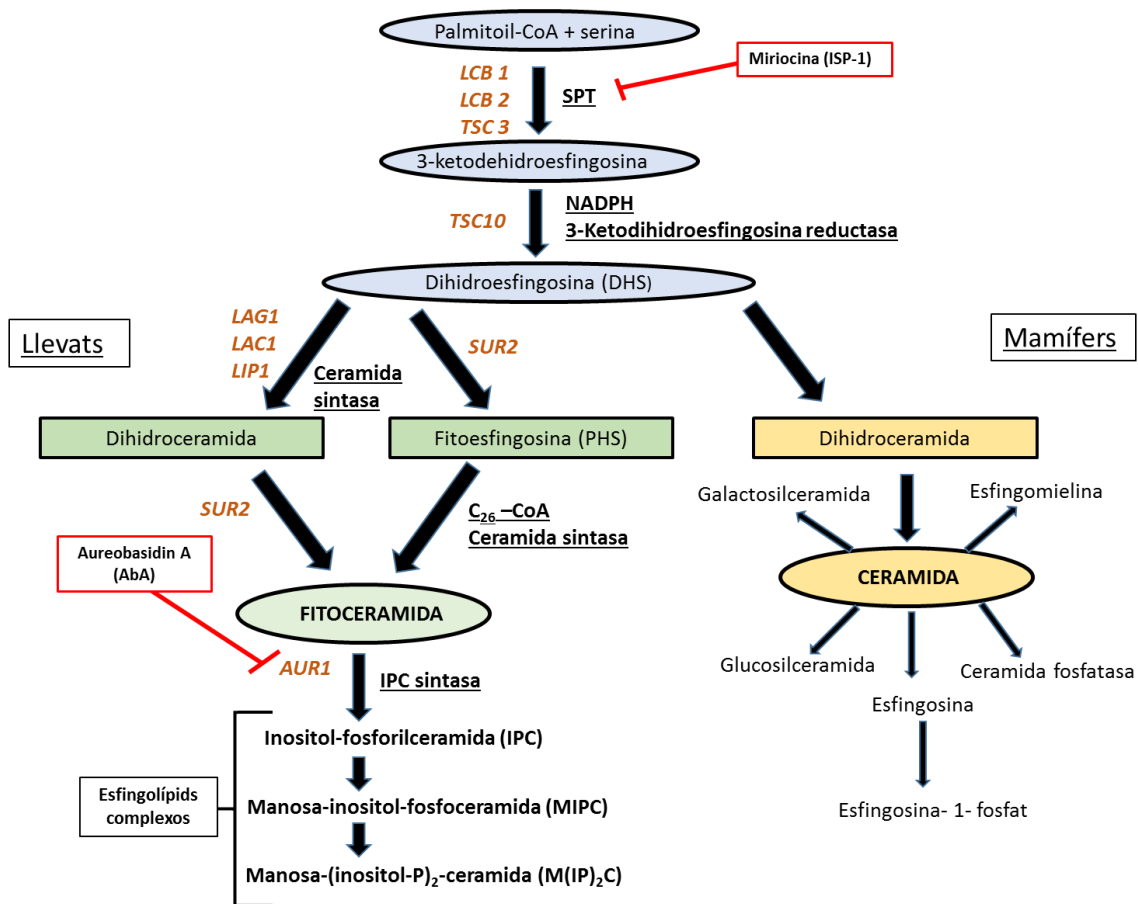
**Figura 14. Estructura general d'un esfingolípid.** Adaptada de la figura suplementaria de (Hayashi & Fujimoto, 2010).

Les bases esfingoides més freqüents en els teixits de mamífers són l'esfingosina ((2S, 3R, 4E)-2-aminoctadec-4-ene-1,3-diol), l'esfinganina ((2S, 3R)-2-amino-1,3,4-octadecanediol), i la 4-hidroxiesfinganina ((2S, 3R, 4R)-2-amino-1,3,4-heptadecanetriol) també anomenada fitoesfingosina, i molt abundant en llevats i plantes. En *S. cerevisiae* trobem únicament dos tipus d'esquelet hidrofòbic de cadena llarga (LCB), la

dihidroesfingosina (DHS) i la fitoesfingosina (PHS). Respecte els àcids grassos, en mamífer veiem com varien en la longitud de la seva cadena, el grau de saturació i la hidroxilació, mentre que els àcids grassos de llevat *Saccharomyces* són únicament de una longitud determinada, 26 carbonis i insaturats (Robert C Dickson et al., 2006). També cal esmentar que mentre que els animals sintetitzen ceramides, els llevats i les plantes sintetitzen fitoceramides i que l'addició d'un o dos grups OH a un àcid gras és comú en llevats però rar en mamífers (Lester & Dickson, 1993). Per tant, encara que els primers passos de la síntesi dels esfingolípid es trobin conservats des dels mamífers fins als llevats, el procés estructural i químic dona diferents tipus de bases de cadena llarga i ceramides.

El primer pas de la ruta de síntesi dels esfingolípid comença en el reticle endoplasmàtic on l'enzim SPT catalitza la condensació d'una serina amb l'àcid gras acyl-CoA formant una ketoefinganina (3-Ketodihidroesfingosina) i CO<sub>2</sub> (Figura 15). L'SPT és un heterodimer format per dos subunitats, Lcb1 i Lcb2, aquestes proteïnes són comunes en tots els organismes que sintetitzen esfingolípid. En llevat però, hi ha una tercera subunitat més petita i hidrofòbica, Tsc3, necessària per l'activitat òptima de l'enzim i per créixer a temperatures pròximes als 30 °C, la qual no es troba en mamífers (Gable et al., 2000). L'enzim SPT, és una diana potencial de molts inhibidors naturals com la miriocina (ISP-1) (Miyake et al., 1995), la lipoxamicina (Mandala et al., 1994), l'esfingofunfisina (Zweerink et al., 1992), etc.





**Figura 15. Via de síntesis dels esfingolípids en llevats i mamífers.** Els intermediaris metabòlics es mostren dins un requadre o circumferència, en blau els intermediaris comuns entre mamífers i llevats, en verd els intermediaris específics per llevats i en groc els corresponents a mamífers. Els esfingolípids complexos de llevat es mostren en negreta, les diferents modificacions dels esfingolípids complexos en mamífer es mostren en lletra normal. En taronja i cursiva es mostren els gens que sintetitzen els enzims (subratllats i en negreta) implicats en els diferents passos de síntesis dels esfingolípids. En un requadre vermell es mostren aquells compostos que actuen inhibint diferents gens/enzims de la ruta de síntesis dels esfingolípids. Figura adaptada de (R C Dickson, 1998; Robert C Dickson, 2008).

En un segon pas de la síntesi dels esfingolípids, es dona la reducció de la ketoesfingonina a DHS, gràcies a l'acció de l'enzim 3-ketodihidroesfingosina reductasa codificada pel gen *TSC10* (Beeler et al., 1998) (Figura 15). A partir d'aquest punt els procés de síntesis entre llevats i mamífers ja és clarament diferencial. La DHS després s'uneix a un àcid gras de 26 C mitjançant qualsevol de les dos ceramides sintases (acyl-CoA: Esfingosina N-aciltransferasa), Lag1 i Lac1 (Guillas et al., 2001; Schorling et al., 2001) per produir N-acilesfingonina (dihidroceramide), la qual és hidroxilada a 4C per

Sur2/Syr2 donant una fitoceramida (Figura 15). Alternativament, la fitoceramida també es pot sintetitzar a partir de l'hidroxilació de DHS, per part de Sur2, per formar PHS, la qual després se li afegeix una amida al seu àcid gras de 26 carbonis (Haak et al., 1997; Grilley et al., 1998). L'enzim ceramida sintasa requereix d'una altra subunitat catalítica, Lip1 per la seva funció en llevats (Vallée & Riezman, 2005).

Arribant en l'última etapa, l'obtenció dels esfingolípid complexos, cal destacar les diferències que es donen en el procés en quan als mamífers i els fongs i plantes. Mentre que en tots els fongs i plantes que s'han examinat s'observa com afegeixen un inositol fosfat a la fitoceramida per formar inositol-fosforilceramida (IPC) (Lester & Dickson, 1993), en mamífers en canvi transfereixen fosfocolina procedent de la fosfatidilcolina a la ceramida per formar un esfingolípid més complex, com és la esfingomielina (Figura 15). En animals es donen modificacions per l'addició de grups sulfat o bé addició de glucosa o galactosa a la ceramida, aconseguint un gran nombre de glicoesfingolípid complexos (Merrill et al., 2007). En canvi, *S. cerevisiae* sintetitza els esfingolípid complexos en tant sols tres passos: IPC, a aquest primer esfingolípid complex se li afegeix una manosa obtenint així manosa-inositol-fosfoceramida (MIPC) i finalment el tercer esfingolípid complex de llevat fabricat a l'aparell de Golgi és la manosa-(inositol-P)<sub>2</sub>-ceramida (M(IP)<sub>2</sub>C), format per la transferència d'un segon inositol fosfat del fosfatidilinositol a l'esfingolípid MIPC (Figura 15).

### **4.2. Implicació dels esfingolípid en l'activació de la via Pkh.**

Estudis recents com el de Ke Liu i col·laboradors (K. Liu et al., 2005) mostren evidències que la fitoesfingosina (PHS) o esfingolípid de cadena llarga (LCB), podria ser la molècula senyalitzadora que activés la proteïna Pkh1.

Els esfingolípid de cadena llarga (LCB) són els esfingolípid més ben caracteritzats responsables de la senyalització de molècules en resposta a un estrès tèrmic en llevat, mentre que en mamífers és la ceramida la que senyalitza a la cèl·lules i les indueix a un procés apoptòtic en cas de temperatures extremes (Jenkins, 2003). La

generació de senyals d'esfingolípids és una de les semblances en resposta a un xoc tèrmic, entre llevats i mamífers. Una de les funcions més importants, en llevats, durant la resposta a un xoc tèrmic és la d'induir l'expressió dels factors de transcripció, Hsf1 i Msn2/4, els quals eviten l'acumulació de proteïnes mal plegades i la formació d'agregats proteics, fet que es veu alterat en els mutants *lcb1-100* (Riezman, 2004).

Aquesta relació entre LCB i la via Pkh que ja observava Ke Liu, s'ha pogut demostrar per altres autors com Dickson (Robert C Dickson et al., 2006), el qual demostra com mutants *pkh1/2* mostren defectes en la producció de proteïnes de resposta a un xoc tèrmic, però no tant greus com en un mutant *lcb*, indicant així que els LCB podrien estar regulant l'activitat de Pkh1/2. A més també s'ha demostrat que mutants *ypk1/2* sintetitzen ràpidament les proteïnes de resposta a estrès tèrmic immediatament després de rebre el xoc tèrmic, però que a mesura que es prolonga aquest estrès tèrmic, les cèl·lules *ypk1/2* són deficientes en regular la síntesis dels factors de transcripció de resposta a un xoc tèrmic, Hsf1 i Msn2/4. Aquest fet indicaria que els LCB podrien regular l'activitat de la via Pkh-Ypk a dos nivells, actuant directament sobre Pkh1/2 i/o Ypk1/2 (Robert C Dickson et al., 2006).

A part de la rellevància que s'ha vist que tenen els esfingolípids en la resposta a estrès via Pkh-Ypk, també es coneix la importància del seu paper en la remodelació de citoesquelet d'actina (endositosi) i el manteniment de la paret cel·lular (Robert C Dickson et al., 2006). Tal com s'ha explicat anteriorment, Pkc1, substrat de Pkh1/2, es troba implicat en la remodelació del citoesquelet d'actina (Delley & Hall, 1999) i en l'activació de la via de la CWI (D E Levin & Bartlett-Heubusch, 1992). A partir d'un mutant *lcb1-100* es va observar que en les cèl·lules *lcb1-100*, a una temperatura òptima de creixement, els filaments d'actina es troben perfectament polaritzats, a diferència de les mateixes cèl·lules creixent a 37 °C que no mostraven polarització. Aquest fenotip es veia rescatat al afegit LCB al medi o bé addicionant còpies múltiples del gen *PKC1* i *PKH1* o *PKH2* en les cèl·lules *lcb1-100* (S Friant et al., 2001; Robert C Dickson et al., 2006).

Aquests fets donen suport a l'idea que els esfingolípidis de cadena llarga, ja sigui PHS o DHS, juguen un paper en el manteniment de la integritat de la paret cel·lular i que ho fan, almenys en part, a partir de la regulació de la cascada de Pkh-Pkc1-MAPKs (Robert C Dickson et al., 2006).

A part també s'ha vist com els LCB modulen l'endocitosi, la qual bé regulada pels *patches* d'actina via Pkh-Pkc1, com hem comentat anteriorment (Engqvist-Goldstein & Drubin, 2003). Aquest fet ha relacionat la via Pkh amb els eisosomes, els quals consisteixen en *patches* que contenen proteïnes de membrana agrupades i que són funcionalment equivalents als dominis *lipid raft* de les cèl·lules de mamífer (Malínská et al., 2003; Malinska et al., 2004; Opekarová et al., 2005; Grossmann et al., 2006). La funció d'aquests eisosomes no és encara del tot clara, però podrien proporcionar una zona per a la regulació eficient de diferents proteïnes de la membrana plasmàtica distribuïdes en diferents classes i en diferents grups, les quals podrien ser reclutades en un entorn lipídic/proteic especialitzat i ser endocitades per separat.

Els principals components que formen els eisosomes són les subunitats proteiques Pil1 i Lsp1, les quals van ser inicialment caracteritzades com a modificadors de la senyalització de Pkh (X. Zhang et al., 2004). Evidències genètiques suggereixen que els components majoritaris dels eisosomes, Pil1 i Lsp1, són fosforilats per Pkh *in vitro* i que regulen negativament Pkh (X. Zhang et al., 2004). A més diversos autors han trobat Pkh1 i Pkh2 associades als eisosomes (Ho et al., 2002; Krogan et al., 2006; Walther et al., 2007), Pkh1 s'ha trobat colocalitzat amb els eisosomes (Roelants et al., 2002) i ambdós tenen un paper en l'endocitosi (S Friant et al., 2001; deHart et al., 2002; Walther et al., 2006).

Autors com Walther (Walther et al., 2007) suggereixen que les cinases Pkh regulen aspectes de l'organització i assemblatge dels eisosomes i que formen part d'un mecanisme homeostàtic, el qual ajusta el conjunt d'eisosomes d'acord amb els nivells d'esfingolípidis, proporcionant una retroalimentació negativa per tal d'establir una abundància d'eisosomes adequada. També s'ha observat que la regulació d'aquests eisosomes vindria donada per la via LCB-Pkh1/2-Ypk1/2 (Luo et al., 2008).

Cal puntualitzar però, que la identitat de l'esfingolípid responsable de la regulació *in vivo* de Pkh, tant pel que fa al manteniment com a la remodelació de la paret cel·lular, és encara polèmica, ja que estudis més recents (Roelants et al., 2010) han observat *in vivo* que l'habilitat de Pkh1/2 per activar Ypk1/2 no es veu modificada per l'addició de PHS. En canvi semblaria que si que la poden modificar esfingolípid complexos com MIPC, els quals podrien ser els activadors d'aquesta via Pkh-Ypk.

## **IV. OBJECTIUS**

---



En aquest projecte ens proposem:

1. Profunditzar en l'estudi de les proteïnes cinases Pkh, essencials en el llevat *Sacharomyces cerevisiae*, mitjançant:

- La construcció de noves soques per poder deletar Pkh de les cèl·lules.
- La identificació de funcions cel·lulars de les Pkh mitjançant la caracterització en els canvis d'expressió provocats per la manca d'aquestes cinases.

2. Identificar la funció dels extensos dominis no catalítics de les proteïnes Pkh, mitjançant:

- L'estudi del paper dels esfingolípidis en la regulació de les vies de Pkh, tot observant si es produeix la unió d'esfingolípidis a Pkh, i en el cas que així sigui, identificar el(s) domini(s) de les proteïnes Pkh d'unió als esfingolípidis, així com el possible paper regulador sobre l'activitat cinasa.





## **V. MATERIALS I MÈTODES**

---



## **1. Soques i medis de cultiu**

La soca DH5 $\alpha$  d'*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) (suplementant, quan va ser necessari, amb 50  $\mu\text{g/ml}$  d'ampicil·lina (Roche) per la selecció dels plasmidis), en agitació i a una temperatura constant de 37  $^{\circ}\text{C}$ .

Les soques de *S. cerevisiae* que es van utilitzar en aquest estudi, es troben citades a la taula 2. Aquestes es van fer 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 més un suplement de 200  $\mu\text{g/ml}$  de G418), YPD-NAT (YPD més un suplement de 100  $\mu\text{g/ml}$  de nurseotricina), YPD-Dox (YPD més un suplement a diferents concentracions de doxiciclina a partir d'una solució stock de 5 mg/ml de doxiciclina, en etanol al 50%). El medi sintètic complet (SC) es va utilitzar per seleccionar mutacions i plasmidis, conté un 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 la mescla *drop-out* (mescla que conté tots els aminoàcids i dNTPs, menys aquells que aporten el marcador autotròfic) (Adams et al.,1997). Les soques de llevat es van fer créixer a una temperatura constant de 28  $^{\circ}\text{C}$  i en una agitació constant.

## **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 la seva separació en electroforesi en gels d'agarosa. Els fragments de DNA s'han recuperat dels gels utilitzant el sistema d'*Agarosa Gel DNA Extraction Kit* (Roche).

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 0.5 ml de medi YPD i incubar a 28 °C durant tres hores, per permetre que adquirissin resistència als antibiòtics G418 (Calbiochem) o nurseotricina (Werner Biogents), respectivament. Tot seguit es van sembrar les cèl·lules en plaques selectives pels transformants resistents a G418 o Nat (YPD-G418 o YPD-Nat) (Webster & Dickson, 1983).

La correcta recombinació dels cassets d'interrupció va ser verificat per PCR a partir de colònies (Huxley et al., 1990). Una petita quantitat de cèl·lules van ser recollides amb una punta estèril i dipositades a la base d'un microtub, que es va incubar durant 90 segons en el microones a màxima potència, mantenint la tapa del tub oberta. Immediatament, les cèl·lules es van col·locar a -20 °C durant 5 min i tot seguit en gel on si va afegir finalment 25 µl de la mescla de PCR.

### 3. Cassets d'interrupció i delecions gèniques.

La soca **YAB100** va ser generada transformant la soca MB005 (taula 2) amb un casset de 1.3 kpb *MCA1::nat1*. Aquest casset va ser obtingut mitjançant amplificació per PCR del casset *nat1* del plasmidi pAG25 (veure secció 4) utilitzant el parell de oligonucleòtids MCA1-*nat1\_fw1*/MCA1-*nat1\_rv1* (veure taula 3). La inserció del casset d'interrupció va ser comprovada per PCR utilitzant els oligonucleòtids MCA1-*nat1\_fw1*/*nat1-3'* (taula 3) obtenint un producte de 0.361 kpb aproximadament en els clons positius.

La soca **YAB001** va ser generada transformant la soca BY4742 (taula 2) amb un fragment de 2.9 kpb *Pkh1::HIS3*. Aquest casset va ser obtingut mitjançant l'amplificació per PCR del fragment *Pkh1::HIS3* de la soca YMB01 (taula 2) utilitzant el parell d'oligonucleòtids Oacg312/Oacg313 (taula 3). La inserció del casset va ser comprovat per PCR utilitzant els oligonucleòtids Oacg302/HIS3REV (taula 3), obtenint un producte de 0.3 kpb en els clons positius.

La soca diploide **AB02** va ser generada transformant la soca diploide **AB01** (veure taula 2 i apartat 5) amb un casset de 1.3 kpb *Pkh3::nat1*. Aquest casset va ser obtingut mitjançant l'amplificació per PCR del casset nat1 del plasmidi pAG25 utilitzant els següents oligonucleòtids OAB01/OAB02 (taula 3). La inserció del casset d'interrupció va ser comprovat per PCR de colònies utilitzant els oligonucleòtids PKH3-ext\_fw1/nat1-3' (taula 3) obtenint un producte de 0.795 kpb pels clons positius.

Nom	Genotip	Origen/referència
CML476	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 leu2<math>\Delta</math>1 his3<math>\Delta</math>200 GAL2 CMVp(tetR'-SSN6)::LEU2 trp1::Tta</i>	(Yen et al., 2003)
YMB002	CML476 <i>MAT<math>\alpha</math> KanMX4-(tetO<sub>7</sub>):PKH2</i>	(Construïda en el present laboratori)
YMB005	CML476 <i>MAT<math>\alpha</math> KanMX4-(tetO<sub>7</sub>):PKH2 pkh1::HIS3</i>	(Construïda en el present laboratori)
SDP7	CML476 <i>MAT<math>\alpha</math> KanMX4-(tetO<sub>7</sub>):PKH2 pkh3::nat1</i>	(Pastor-Flores et al., 2013)
SDP8	CML476 <i>MAT<math>\alpha</math> KanMX4-(tetO<sub>7</sub>):PKH2 pkh1::HIS3 pkh3::nat1</i>	(Pastor-Flores et al., 2013)
YAB100	CML476 <i>MAT<math>\alpha</math> KanMX4-(tetO<sub>7</sub>):PKH2 pkh1::HIS3 MCA1::nat1</i>	En aquest treball
YMB01	CML476 <i>MAT<math>\alpha</math> pkh1::HIS3</i>	(Construïda en el present laboratori)
BY4741	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math> met15<math>\Delta</math> ura3<math>\Delta</math></i>	(Winzeler et al., 1999)
BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math> lys2<math>\Delta</math> ura3<math>\Delta</math></i>	(Winzeler et al., 1999)
BY4743	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math> 0/his3<math>\Delta</math> 0; leu2<math>\Delta</math>/leu2<math>\Delta</math> 0; met15<math>\Delta</math> 0/MET15; LYS2/lys2<math>\Delta</math> 0; ura3<math>\Delta</math> 0/ura3<math>\Delta</math> 0</i>	(Winzeler et al., 1999)
YAB001	BY4742 <i>MAT<math>\alpha</math> Pkh1::HIS3</i>	En aquest treball
AB01	BY4743 <i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> pkh1::his3/PKH1 pkh2::kanMX4/PKH2</i>	En aquest treball
AB02	AB01 <i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> pkh3::nat1</i>	En aquest treball
--	BY4741 <i>MAT<math>\alpha</math> pep4::KanMX</i>	EUROFAN (Winzeler et al., 1999)
--	BY4741 <i>MAT<math>\alpha</math> Pkh2::KanMX</i>	EUROFAN (Winzeler et al., 1999)
AC306	AYS927 <i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> PKH1/pkh1::TRP1 PKH2/pkh2::HIS3</i>	(Casamayor et al., 1999)

Taula 2. Soques de *S. cerevisiae* utilitzades en aquest treball.

Nom	Seqüència (des de 5' a 3')
MCA1-nat1_fw1	TCTAAACTACCACCAAAGAAGACCGACTAGATTTACAATC <b>CGTACGCTGCAGGTCGAC</b>
MCA1-nat1_rv1	CAGTCTGAATACATCTACCAACGTACACATTCATATATTT <b>TCGATGAATTCGAGCTCG</b>
nat1-3'	GTGAAGGACCCATCCAGTGC
Oacg312	GGCTTGCCCGACTGTCGG
Oacg313	GATGAGCCCGACTGGAAC
Oacg302	TGGACAGTCACTATCTGG
HIS3REV	GCTTGCCAGAGCATGTATC
OAB01	AAGAGTAGGTGTGGGACATTGGTATGACATATG <b>CGTACGCTGCAGGTCGAC</b>
OAB02	GGATCG TCAACAAC TC GTGCATATTTTTTTGTT <b>TCGATGAATTCGAGCTCG</b>
PKH3-ext_fw1	ACCCGCGCGGTGATTTCTTG
pEGH-pkh1-FW	GGTAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGTGGTGGT <b>CTAGACATGGGAAATAGGTCTTTGACAG</b>
pEGH-pkh1-RV	GCGCGAGGGCAGATCGTCAGTCAGTCACGATGAATT <b>AAGCTCA</b> TTTTTCATCTGTCCGTGTC
pkh1_K_RV	GCGCGAGGGCAGATCGTCAGTCAGTCACGATGAATT <b>AAGCTTAAAGAGGTGTGCTTTGATCTG</b>
pkh1_CT_FW	GGTAGAGGATCGATCACCATCACCATCACGGTGGTGGT <b>CTAGACTTCCATGAAGTCAACTTTGAAG</b>
PKH1_C1RV	GCGCGAGGGCAGATCGTCAGTCAGTCACGATGAATT <b>AAGCTCAATCTGTGTTGTTGGAGGC</b>
PKH1_C2FW	GGTAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGTGGTGGT <b>CTAGACCCAGCAGCGACCTCTCAAG</b>
PKH1_C2RV	GCGCGAGGGCAGATCGTCAGTCAGTCACGATGAATT <b>AAGCTCACACGTTCTCAAGACCTAC</b>
PKH1_C3FW	GGTAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGTGGTGGT <b>CTAGACACTACATCACGGGGGAAAG</b>
PKH1_C3RV	GCGCGAGGGCAGATCGTCAGTCAGTCACGATGAATT <b>AAGCTCACTTCTCAACGTCATTCAACTC</b>
PKH1_C4FW	GGTAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGTGGTGGT <b>CTAGACATAACAAACCTAGGCAGAGC</b>
PKH1_C4RV	GCGCGAGGGCAGATCGTCAGTCAGTCACGATGAATT <b>AAGCTCATTGAGGTACGGGAGGAGC</b>
PKH1_C5FW	GGTAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGTGGTGGT <b>CTAGACCATAATGGAATGACCGCC</b>



<b>pEGH-pkh2-Fw-2</b>	GGTAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGTGGTGGT <u>CTAGAAATGTATTTTGATAAGGATAATTCC</u>
<b>PKH2_CT_FW</b>	GGTAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGTGGTGGT <u>CTAGATTTGAATTTAAAGACGGC</u>
<b>PKH2_CT_RV</b>	GC GCGAGGGCAGATCGTCAGTCAGTCACGATGAATT <u>AAGCTTTTACGACCTCTTCGATTTTGC</u>
<b>Oacg315</b>	TTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGGTGACGGTATCGATA <u>AAGCTTGACTCAATTAAGGCGAC</u>
<b>Oacg316</b>	AGCTCCACCGGGTGGCGCCGCTCTAGAAGTGGT <u>GATCCGCTATTGCAGGAAAAC</u>
<b>Oacg317</b>	TCTTACATATGCATATATATATATTATCAAGCACAGTTTCA <u>GTTGGCCATTTGACAGTGG</u>
<b>Oacg318</b>	AAGATCGACACAAATGCGG

Taula 3. Oligonucleòtids utilitzats en aquest treball.

\*Les seqüències subratllades mostren els llocs que reconeixen els respectius enzims restricció

\*Les seqüències en negreta mostren la regió homòloga als respectius plasmidis utilitzats per amplificar els cassets de clonació.

## 4. Plasmidis

- **pAG25**, utilitzat per amplificar el casset *nat1* (Goldstein & McCusker, 1999).
- **pEGH**, plasmidi utilitzat com a control amb un promotor *GAL1-10* que controla l'expressió de l'ORF clonat fusionat a GST en el seu extrem C-terminal i que conté el marcador *URA3* (Zhu et al., 2000).
- **pEGH-Pkh1**, un fragment de 2.3 kpb, aproximadament, que conté la regió codificant de *PKH1*, va ser amplificat per PCR amb els següents oligonucleòtids, pEGH-pkh1-FW/pEGH-pkh1-RV (taula 3), que contenen cues de recombinació amb les dianes de restricció XbaI i HindIII, respectivament, del plasmidi pEGH on fou clonat mitjançant recombinació homòloga (veure figura 16).

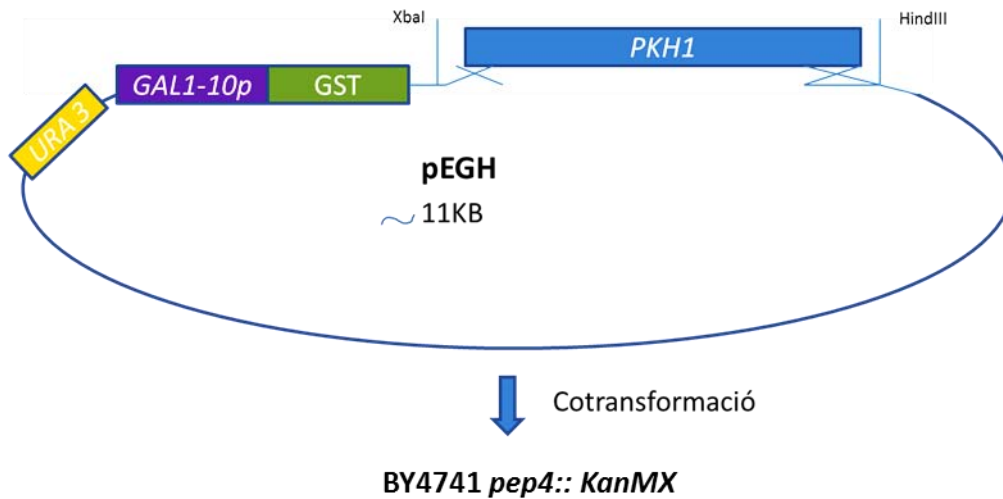


Figura 16. Estratègia d'expressió de GST-Pkh1.

- **pEGH-Pkh1-kin**, un fragment de 1.15 kpb que codifica el domini cinasa de *PKH1*, va ser amplificat per PCR utilitzant els oligonucleòtids, pEGH-pkh1-FW/pkh1\_K\_RV (veure taula 3). El fragment obtingut, juntament amb el plasmidi pEGH linealitzat (digerit amb XbaI i HindIII) va ser cotransformat en la soca BY4741 *pep4::KanMX*, on es va reconstituir el plasmidi pEGH-Pkh1-kin mitjançant recombinació homòloga.

- **pEGH-Pkh1-Cter**, un fragment de 1.13 kpb, aproximadament, que conté només, el domini no catalític de *PKH1*, va ser amplificat per PCR utilitzant els oligonucleòtids, pkh1\_CT\_FW/pEGH-pkh1-RV (veure taula 3), els quals tenen les dianes de restricció per XbaI i HindIII, respectivament. Aquest fragment va ser cotransformat juntament amb el plasmidi pEGH, prèviament linealitzat amb XbaI i HindIII, en la soca BY4741 *pep4::KanMX* tal com s'ha descrit anteriorment.

Seguint aquesta mateixa estratègia esmentada, s'han construït una sèrie de constructes que contenen diferents fragments del domini no catalític de Pkh1, que es recullen a la taula 4:

Nom	Aminoàcids	Total aa	Oligo Fw	Oligo Rv
pEGH-Pkh1	1-767	767aa	pEGH-pkh1-FW	pEGH-pkh1-RV
pEGH-Pkh1-kin	1-391	391aa	pEGH -pkh1-FW	pkh1_K_RV
pEGH-Pkh1-cter	391-767	376aa	pkh1_CT_FW	pEGH-pkh1-RV
pEGH-Pkh1-cter1	391-494	103aa	PKH1_CT_FW	PKH1_C1RV
pEGH-Pkh1-cter2	434-570	136aa	PKH1_C2FW	PKH1_C2RV
pEGH-Pkh1-cter3	521-633	112aa	PKH1_C3FW	PKH1_C3RV
pEGH-Pkh1-cter4	598-709	111aa	PKH1_C4FW	PKH1_C4RV
pEGH-Pkh1-cter5	669-767	98aa	PKH1_C5FW	pEGH-PKH1_RV

Taula 4. Constructes a partir del plasmidi pEGH i diferents fragments de DNA del gen *PKH1*.

- **pEGH-Pkh2** un fragment de 3.3 kpb que codifica el gen complet de *PKH2* va ser amplificat per PCR amb els oligonucleòtids, pEGH-pkh2-Fw-2/PKH2\_CT\_RV (veure taula 3), els quals tenen les dianes de restricció per XbaI i HindIII, respectivament, el fragment obtingut es va cotransformar, juntament amb el plasmidi pEGH, seguint l'estratègia descrita anteriorment.

- **pEGH-Pkh2-Cter**, un fragment de 2 kpb, aproximadament, que conté la regió no catalítica de *PKH2*, va ser amplificat per PCR utilitzant un parell de oligonucleòtids, PKH2\_CT\_FW/PKH2\_CT\_RV (veure taula 3), segons l'estratègia ja descrita.

- **pRS426**, plasmidi multicòpia utilitzat com a control amb el marcador *URA3* (Christianson et al., 1992).

- **pRS426-Pkh1**, un fragment de 3.1 kpb que conté l'ORF complet de *PKH1* va ser amplificat per PCR utilitzant els oligonucleòtids Oacg315/Oacg316 (veure taula 3), que tenen unes cues de recombinació homòloga amb el plasmidi pRS426 linealitzat (digerit amb HindIII i BamHI). El producte obtingut de PCR, després de ser comprovat per electroforesi, fou cotransformat juntament amb el plasmidi, en la soca BY4741 *pep4::KanMX*.

- **pRS426-Pkh1 $\Delta$ C-ter**, va ser obtingut mitjançant la cotransformació de tres fragments de DNA, en la soca BY4741 *pep4::KanMX* : 1) un fragment de 1.9 kpb que conté el domini cinasa complet de *PKH1* amplificat per PCR utilitzant els oligonucleòtids Oacg315/Oacg317 (veure la taula 3), 2) el producte de PCR de 0.28 kpb que correspon el terminador de Pkh1, amplificat amb els oligonucleòtids Oacg316/Oacg318 (taula 3) i 3) el plasmidi pRS426 digerit amb els enzims de restricció HindIII i BamHI.

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

- **pRS316-Pkh1**, obtingut a partir de la digestió del plasmidi **pRS426-Pkh1** amb els enzims XhoI i NotI, per tal de treure l'insert de 3.1 kpb que conté el gen *PKH1* i cotransformar-lo, juntament amb el plasmidi pRS316, prèviament digerit amb els enzims XhoI i NotI, en la soca de llevat BY4741 *pep4::KanMX*.

- **pRS316-Pkh1 $\Delta$ C-ter**, va ser obtingut seguint la mateixa estratègia anteriorment descrita.

- **pEBG-2T** vector utilitzat per expressar en la línia cel·lular HEK293T proteïnes fusionades en el seu extrem C-terminal amb GST (Sánchez et al., 1994).

- **pEBG-2T-PDK1** vector utilitzat per expressar PDK1 humana en cèl·lules HEK293T (Alessi et al., 1997).

- **pEBG-2T-PKB $\Delta$ PH** vector utilitzat per expressar el domini catalític de la PKB humana (sense el seu domini PH) en cèl·lules HEK293T (Alessi et al., 1997).

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

Per tal de determinar la funció de l'extens domini C-terminal de Pkh1, s'ha generat una soca diploide AB01, heterozigota per les delecions *pkh1* i *pkh2* (veure taula 2), a partir del *mating* entre les soques YAB001 (BY4742 MAT $\alpha$  *Pkh1::HIS3*) i un mutant de la col·lecció EUROFAN, BY4741 MAT $\alpha$  *Pkh2::KanMX4* (Winzeler et al., 1999). Un cop seleccionats els diploides en medi SC-histidina i amb l'antibiòtic G418, es transforma amb el plasmidi multicòpia pRS426 o amb el plasmidi pRS316, que contenen una de les següents construccions:

a) El gen complet de *PKH1*, pRS426-Pkh1 (*PKH1* controlat pel seu propi promotor), veure apartat 4, o

b) Un gen que expressa només el domini catalític de *PKH1*, pRS426-Pkh1 $\Delta$ C-ter, tal com es descriu a l'apartat de plasmidis número 4.

Posteriorment es procedeix a l'esporulació (veure apartat 5.1) per obtenir haploides homozigots en els quals l'única activitat Pkh vingui proporcionada pel plasmidi (veure figura 17).

En aquest treball també s'ha construït un segon diploide AB02, heterozigot (*pkh1::his3/PKH1*, *pkh2::kanMX4/PKH2*, *pkh3::NAT1/PKH3*), el qual també s'ha transformat amb el plasmidi centromèric, pRS316, pRS316-Pkh1 i pRS316-Pkh1 $\Delta$ C-ter (veure figura 18).

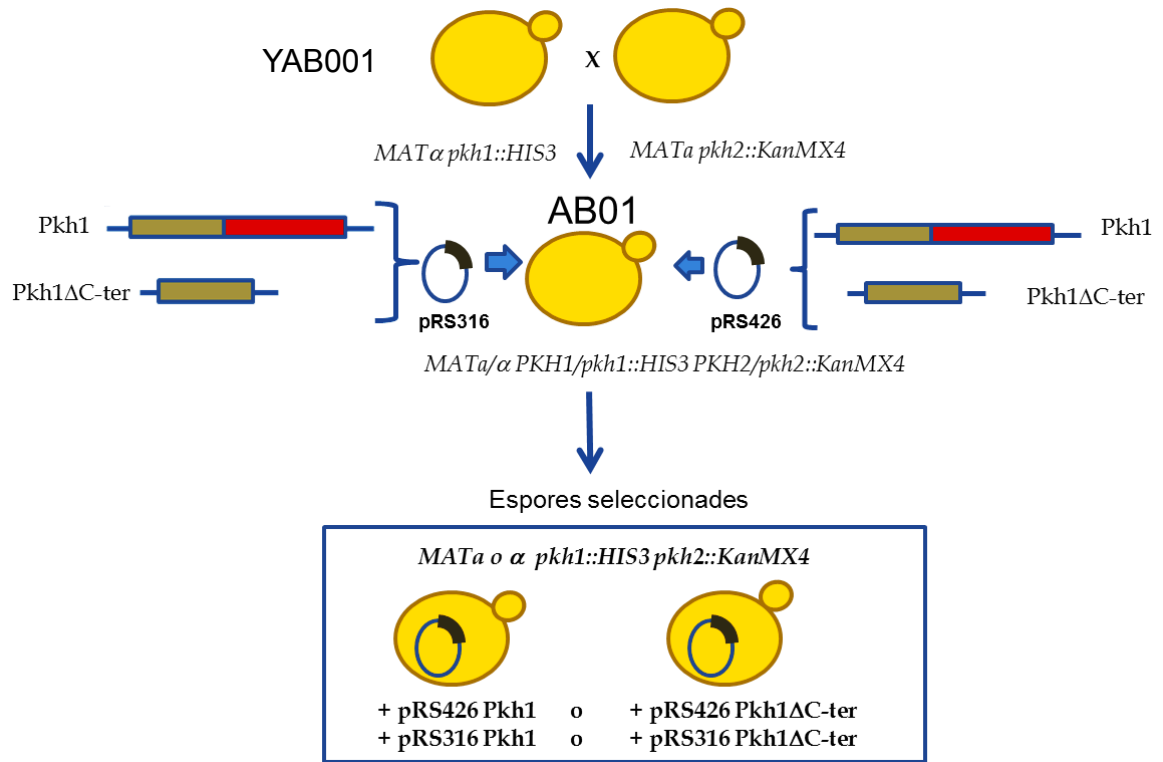


Figura 17. Estratègia utilitzada per construir la soca diploide AB01 i selecció dels seus haploides.

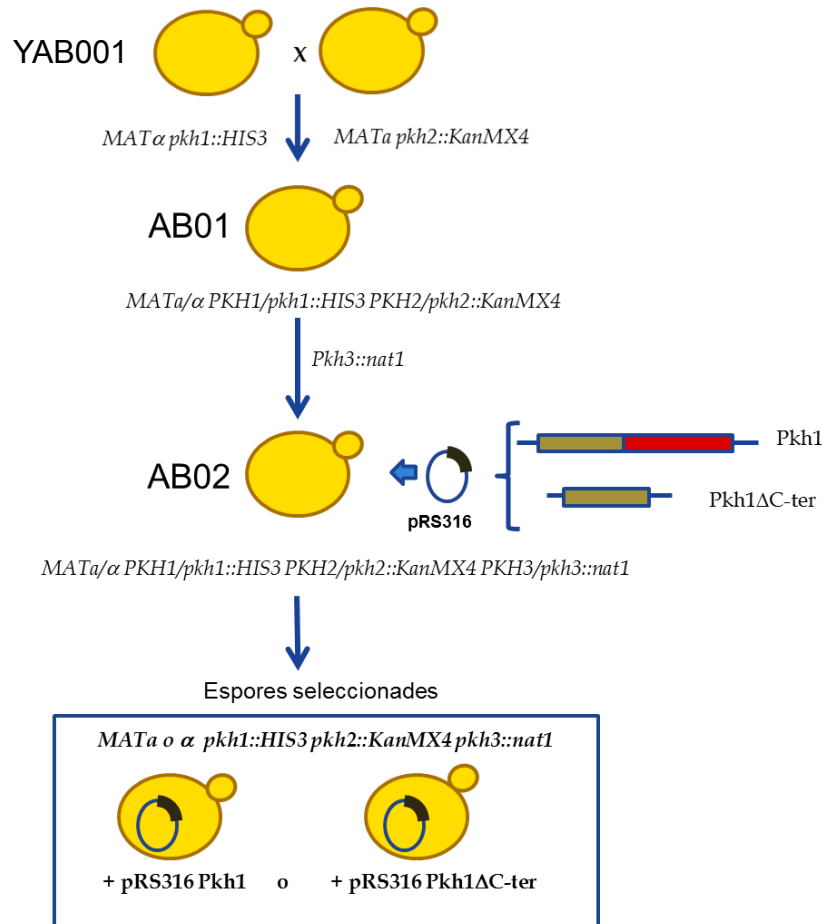


Figura 18. Estratègia utilitzada per construir la soca diploide AB02 i selecció dels seus haploides.

S'ha seguit aquesta mateixa estratègia per tal d'obtenir les cèl·lules haploides específiques amb un altre fons genètic, AC306 (*MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$  AYS927 PKH1/pkh1::TRP1 PKH2/pkh2::HIS3*). Aquesta soca diploide s'ha transformat amb els plasmidis pRS316, pRS316-Pkh1 i pRS316-Pkh1 $\Delta$ C-ter.

### 5.1. Esporulació de cèl·lules diploides

Les cèl·lules diploides es van inocular en 5 ml de medi SC-Ura, per la selecció del plasmidi i incubar durant 16h a 28 °C. Els cultius es van centrifugar a 1.200 x g durant 5 minuts i les cèl·lules van ser rentades 3 vegades amb H<sub>2</sub>O. Es van resuspendre en 5 ml de medi d'espurulació (Adams *et al.*, 1997), i varen ser incubades a 28 °C fins que més del 50% de les cèl·lules havien esporulat, aproximadament entre 5-7 dies. Posteriorment, les cèl·lules es van sotmetre a un anàlisi per *random Spore* (Adams *et al.*, 1997), amb les següents modificacions: 1ml de cultiu d'espurulació es va centrifugar a 1.200 x g 5 min i les cèl·lules es van resuspendre en 5 ml d'aigua amb 10 unitats de Zymoliasa-20T (MP Biomediacals, Inc.) i 10  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol. Aquestes cèl·lules van ser incubades durant 16 h a 30 °C en agitació constant. A partir d'aquest pas es va seguir el protocol descrit (Adams *et al.*, 1997).

En aquest treball, també s'ha utilitzat 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 d'un ml de cultiu d'espurulació, es van rentar amb aigua i es van resuspendre en 0.1 ml d'aigua que contenia 10  $\mu$ l de Zymoliasa-20T (100  $\mu$ g/ml), i varen ser incubades durant 20 min a temperatura ambient abans de procedir a la separació de les espores, que es van fer créixer en medi YPD i posteriorment en els medis selectius corresponents, com es detalla a continuació.

## **5.2. Selecció d'haploides**

Un cop realitzat l'anàlisi per *Random Spore* o bé per dissecció de tètades, les cèl·lules van ser plaquejades en els medis selectius corresponents (YPD-G418 o SC-Ura-His, pel cas de la soca AC306) i incubades a 28 °C durant 48-72 h. Un cop les colònies han crescut, es fan rèpliques en diferents plaques, per seleccionar la presència de marcadors, en els següents medis SC-His, YPD-NAT, SC-Ura i SC-Trp. Finalment les cèl·lules haploides caracteritzades genòticament es van inocular en YPD per la seva posterior caracterització del tipus de *mating* segons els protocols descrits (Trecó & Winston, 1998).

## **6. Assaigs de creixement**

### **6.1. Assaigs de creixement en cultius líquids**

La sensibilitat als compostos inhibidors de la ruta de síntesi dels esfingolípidis va ser avaluada mitjançant creixements en medi líquid utilitzant medi YPD més mirocina (MYR, Sigma) 1.5 µM i Aureobasidina A (AbA, Sigma) de 0.045 a 0.145 µM. També s'han avaluat els efectes de l'addició de fitoesfingosina (PHS, Sigma) a 5 µM i del sulfàtid (Sigma) a 5 µM.

Els creixements líquids efectuats amb els diferents compostos es van realitzar en plaques de 96 pouets (volum final de 250 µl) on les soques indicades van ser inoculades a una OD<sub>660</sub> de 0.004 i el seu creixement va ser monitoritzat després de 16 h mesurant la OD<sub>595</sub> en un lector de plaques Labsystems iEMS Reader MF (Labsystems).

### **6.2. Assaig de creixement en placa**

S'ha avaluat la capacitat de creixement de les diferents soques de *S. cerevisiae* en presència de diferents agents químics i físics que afecten la via de la CWI com: el CR, CFW, CAF, NaCl, LiCl, SDS, alta temperatura (50 °C i 42 °C), pH bàsic, β-mercaptoetanol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Diamida, etc... en plaques YPD, mitjançant el *drop test*. Així com



també la sensibilitat de les soques, MB005 i SDP8, a Doxiciclina (10-100 µg/ml) en plaques YPD. En aquests experiments es dipositen 3 µl d'una dilució del cultiu a OD<sub>660</sub> 0.05 procedint de cultius saturats, juntament amb dos dilucions seriades (1:5) a OD<sub>660</sub> 0.01 i 0.002. Els creixements es van monitoritzar després de 48 hores a 28 °C.

## 7. Extracció de proteïnes i immunodetecció mitjançant *Western Blot*.

### Detecció de la forma fosforilada de Slt2

Les soques indicades es van fer créixer fins a una OD<sub>660</sub> de 0.6 ( $7.5 \times 10^6$  cèl·lules/ml) en el medi selectiu requerit en cada cas. Posteriorment les cèl·lules sedimentades es van congelar a -80 °C fins la preparació dels extractes. Les cèl·lules van ser rentades amb aigua i resuspeses en 100-150 µl del tampó de lisi A. Es va afegir un volum equivalent a 100 µl de boles de Zirconia de 0.5 mm (BioSpec # 11079105z) i tot seguit es van lisar les cèl·lules mitjançant agitació mecànica intensa utilitzant un Fast Prep Cell Breaker a una potència de 5.5 durant 30 segons. Aquest procés es va repetir 4 vegades amb un interval d'un minut entre cada cicle, on les mostres es mantenien a -20 °C per preservar la integritat de les proteïnes. Posteriorment les mostres així tractades es van centrifugar durant 15 min a 15.700 x g a 4 °C i els sobrenedants (extracte proteic) es van recuperar i la seva concentració proteica va ser determinada amb Coomassie Brilliant Blue G-250, pel mètode de Bradford (Bradford, 1976).

Per analitzar els extractes proteics mitjançant *western blot* un volum d'extracte proteic contenint 40 µg de proteïna total va ser mesclat amb 1/3 del volum de tampó de càrrega SDS 4x .

La separació de proteïnes mitjançant electroforesis va ser realitzada mitjançant condicions desnaturalitzants en gels de poliacrilamida-SDS al 10% (p/v). Un cop separades per electroforesis, les proteïnes es van transferir a membranes de PVDF

Immobilon-P (Millipore). Primerament es bloquegen els llocs d'unió no específics incubant les membranes durant 1 h amb agitació amb el tampó de bloqueig A. Tot seguit es retira la solució de bloqueig i s'afegeix l'anticòs primari, anti-fosfo p42/p44 (Cell Signaling Technology) a una dilució 1:2000 en solució de bloqueig A, i es deixa incubant 16 hores a 4 °C amb agitació. Posteriorment es realitzen 3-4 rentats de 10-15 minuts amb TBS-Tween 20. Després dels rentats s'afegeix l'anticòs secundari IgG anti-conill conjugat a peroxidasa a una dilució de 1:20000 en tampó de bloqueig A i es deixa incubant durant 1 hora a temperatura ambient i amb agitació constant. Finalment es realitzen 3 rentats de 10 minuts amb TBS-Tween 20 per retirar l'excés d'anticòs secundari. Les bandes de proteïnes immunoreactives són visualitzades utilitzant el sistema de quimioluminiscència ECL Select (GE Healthcare).

\* **Tampó de lisi A:** 50 mM Tris HCl pH 7.5, 10% Glicerol, 1% Triton, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 50 mM  $\beta$ - Fosfat de Glicerol, 5 mM Pirofosfat sòdic, 5mM EDTA pH 8.0, 1 mM PMSF, Inhibidors de proteases 1x (Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche).

\* **Tampó de Bloqueig A:** TBS-Tween 20 i 5% de llet en pols desnatada.

\* **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.

\* **TBS-Tween 20:** 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20.

## 8. Expressió de GST-PDK1 i GST-PKB $\Delta$ PH en cèl·lules de mamífer.

Els experiments d'expressió dels constructes amb el vector pEBG-2T van ser realitzats en col·laboració amb el laboratori del Dr. José Miguel Lizcano, de la Unitat de Medicina del Dept. de Bioquímica i Biologia Molecular, de la Universitat Autònoma de Barcelona.

El DNA dels constructes pEBG-2T-PDK1 i pEBG-2T-PKB $\Delta$ PH es va transfectar en la línia cel·lular HEK293T, de ronyó embriònic humà (morfologia epitelial), a una confluència del 60-70%, utilitzant el mètode PEI (polietilenamina), un polímer catiònic d'alta eficiència de transfecció. El mètode es basa en la formació d'un complex PEI (de càrrega positiva) amb el DNA (de càrrega negativa), el qual és endocitat per la cèl·lula. Per transformar 20 plaques de 10 cm de diàmetre, es va barrejar 100  $\mu$ g de DNA (1  $\mu$ g/ml) amb 1 ml de PEI (1 mg/ml a pH 7.2) en 20 ml de DMEM (Sigma) sense sèrum. Després de mesclar-ho bé (vòrtex durant 5 segons) es va incubar 10 min a temperatura ambient per tal d'afavorir la formació d'aquests complexos DNA/PEI que es troben a una relació 1  $\mu$ g DNA: 10.5  $\mu$ l PEI. Tot seguit es diposita 1 ml de la mescla de transfecció, gota a gota, a cada placa (volum final de 5 ml de medi DMEM). Les cèl·lules així transfectades es van incubar durant 24-48 h abans de ser lisades.

En el cas de l'expressió de pEBG-2T-PKB $\Delta$ PH, abans de lisar-se les cèl·lules es va retirar el sèrum del medi i es va fer un tractament d'una hora amb Wortmannin (Sigma) 30 nM (en DMSO) per tal d'inhibir la fosfatidilinositol-3-kinasa i obtenir una PKB desfosforilada (inactiva). Posteriorment les cèl·lules es van lisar incubant-les amb el tampó de lisi B i en gel durant 10 min. El lisat es va recollir i es va guardar a -80 °C fins la seva utilització.

\* **Tampó de lisi B:** 50 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% TritonX-100, Inhibidors de Proteases 1x (Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche), 0.2 mM PMSF i 0.1%  $\beta$ -Mercaptoetanol.

## 9. Extracció i purificació de proteïnes de fusió a GST

Les soques que contenen el plasmidi pEGH es fan créixer en medi SC-Ura, fins a la saturació. Es van preparar nous cultius a OD<sub>660</sub> de 0.2-0.4, mitjançant la dilució en medi SC sense uracil que conté el 2% de rafinosa com a única font de carboni. Quan aquest cultius arriben a una OD<sub>660</sub> 0.6-0.8 se'ls hi afegeix galactosa fins a una concentració final del 2%, per tal d'induir l'expressió del gen clonat al promotor *GAL1-10*. Transcorregudes 3h en presència de galactosa les cèl·lules eren sedimentades i congelades a -80 °C.

L'extracció de proteïnes es va realitzar resuspenen les cèl·lules amb 100-150 µl de tampó de lisi C i 100 µl de boles de Zirconia 0.5 mm (BioSpec # 11079105z). Les cèl·lules es van lissar per agitació mecànica mitjançant el Fast Prep Cell Breaker a una potència de 5.5 durant 30 segons, procés que es va repetir 5 cops amb un interval d'un minut entre cada cicle, on les mostres es mantenien a -20 °C. Posteriorment es va centrifugar durant 1 min a 1.000 x g a 4 °C peliminar les boles i es va recuperar el sobrenedant a un tub nou. Tot seguit es va centrifugar durant 15 minuts a 15.700 x g a 4 °C, i el sobrenedant contenint l'extracte soluble es va guardar a -80 °C.

Per purificar les proteïnes de fusió amb GST, es va utilitzar la resina d'agarosa-glutació "Glutathione Agarose Resin 4B-Glu-20 ABT" seguint el següent protocol: Primerament es va equilibrar la resina fent primerament dos rentats amb H<sub>2</sub>O destil·lada, centrifugant a 500 x g durant 5 minuts i, finalment es va realitzar un últim rentat amb el tampó de lisi C. Tot seguit es va procedir a afegir l'extracte de proteïnes amb la resina d'agarosa-glutació, per cada 500 µl d'extracte s'afegeix 500 µl de la suspensió de resina i es complementa fins a un volum final de 2 ml amb el tampó de lisi C. La mescla s'incubava durant hora i mitja a 4 °C en agitació. Transcorregut aquest temps es feien de dos a tres rentats amb el tampó de lisi C contenint 0.5 M de NaCl i 3 rentats més amb el tampó de rentat C. La resina amb la proteïna de fusió es resuspenia en 1 volum de solució de rentat C que contenia 0.6 M de sucrosa i es guardava a -80 °C fins la seva utilització.

L'elució de la proteïnes es realitzava amb el tampó d'elució TBS-Glutatió de la següent manera: Primerament es feia un rentat amb TBS-Glutatió, peliminar la sucrosa, es centrifugava 1 min a 12.100 x g, tot seguit s'afegien 200-500 µl de tampó d'elució i s'incubava en gel durant 5 minuts mentre per inversió s'anava mesclant, es centrifugava a 12.100 x g durant 1 min i es recuperava el sobrenedant a un tub nou, procés que es repetia tres vegades. Un cop purificada la proteïna es quantificava mitjançant electroforesis en gels de PAGE-SDS al 10% (p/v) juntament amb estàndards de quantitat coneguda de BSA. Un cop separades pelectroforesis, les proteïnes del gel eren tenyides amb Oriole<sup>TM</sup> Fluorescent Gel Stain (Bio-RAD) durant 90 minuts en agitació constant i visualitzades per fluorescència.

\* **Tampó de lisi C:** 50 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1% TritonX-100, Inhibidors de Proteases "Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets" (Roche), 0.2 mM PMSF i 0,1% β-Mercaptotanol.

\* **Tampó de rentat C:** 50 mM Tris HCl pH 7.5, 0.1 mM EGTA i 0.1% β-Mercaptotanol.

\* **Tampó d'elució TBS-Glutatió:** 50mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% β-Mercaptotanol, 20 mM de Glutatió.

## 10. Extracció total de lípids de llevat .

Les cèl·lules de la soca BY4741 es van fer créixer en medi YPD a 28 °C fins una OD<sub>660</sub> 0.8. Tot seguit es van dividir els cultius i es van incubar a diferents temperatures (28 °C i a 40 °C) d'on es prenen mostres de 100 ml a diferents temps entre 5 i 40 min. També en paral·lel, es fa un tractament amb Myr 1.5 µM o AbA 0.145 µM i es prenen mostres de 300 ml a OD<sub>660</sub> d'entre 0.6-0.8 a diferents temps d'incubació amb aquests compostos. Les cèl·lules d'aquests cultius es van sedimentar per centrifugació i es van guardar a -80 °C.

L'extracció de lípids total de llevat es va realitzar afegint al precipitat de cèl·lules, procedent de 100 ml de cultiu i distribuïts en diferents microtubs, 500 µl de solució cloroform:metanol (1:2, v/v) i un volum de boles de Zirconia de 0.5 mm (BioSpec # 11079105z). Les cèl·lules es van lisar mitjançant dos cicles en el Fast Prep Cell Breaker a una potència de 5.5 durant 30 segons. Es recuperà el sobrenedant, que es va reservar en un tub de polipropilè, i es van afegir 500 µl més de la mateixa solució cloroform:metanol i es va repetir el procés descrit. En el lisat de cèl·lules que es troba el tub de polipropilè, s'hi van afegir 500 µl de cloroform i 500 µl d'aigua destil·lada, mesclant per agitació vigorosa (mitjançant "vòrtex") i es va centrifugar durant 10 min a 1.200 x g. En aquest pas es generen dos fases, una polar amb l'aigua i el metanol i una altra amb el cloroform on es queden els lípids (en la interfase es queden les proteïnes). Es va eliminar la fase aquosa, i es va rentar afegint 1 ml de Methanol:H<sub>2</sub>O destil·lada (1:1, v/v), agitant i centrifugant 10 min a 1.200 x g. Finalment es va recuperar la part orgànica (on tenim l'extracte lipídic), que es va transferir a un tub de vidre que es guardava a -80 °C.

## 11. Separació de lípids per cromatografia de capa fina HPTLC.

Per tal de separar els diferents components que conformen l'extracte lipídic de llevat es va utilitzar la tècnica analítica de la cromatografia de capa fina d'alt rendiment o HPTLC sobre plaques de gel de sílice amb zona de concentració (HPTLC Silica gel 60 with concentrating zone 20 x 2.5 cm, referència 1.13749.0001, Merck). L'extracte lipídic es va evaporar per incubació a 36 °C durant 1-2 h, depenent del volum a evaporar. Un cop evaporat, els lípids es resuspenien en 8 µl d'una solució de cloroform-metanol (1:1, v/v) i s'aplicava la mostra a l'apilador de la capa fina i es deixava assecar. Tot seguit s'introdueix la capa fina dins un tanc de vidre on prèviament s'hi ha introduït un paper secant de 15 cm d'ample humitejat amb la fase mòbil. Les fases mòbils utilitzades han sigut les següents: Fase mòbil 1: cloroform:metanol:àcid acètic:aigua (60:50:1:4) i Fase mòbil 2: Cloroform:Metanol:NH<sub>4</sub>OH (65:35:5). Les cromatografies es desenvolupaven durant 30 min aproximadament, fins que la fase mòbil estava a un centímetre aproximadament del límit superior de la placa. Després es posaven les plaques a assecar a la campana de gasos, aproximadament 30 min i un cop seques es tenyien amb solució de primulina (5 mg de Primuline (Sigma) en 100 ml d'una solució d'acetona i aigua, 80:20, (v/v)) per poder-les visualitzar per il·luminació amb llum fluorescent.

Un cop identificades les diferents bandes d'interès, es recuperava el gel de la placa, rasant-la amb un bisturí, i es dipositava dins un tub de vidre juntament amb 3 o 4 volums de solució cloroform:metanol (1:1, v/v) i es sonicava emprant un Bioruptor<sup>®</sup> Plus (Diagenode) aplicant 3 repeticions de 10 cicles 10 segons *on*/ 5 segons *off*. Tot seguit es centrifugava a 1.200 x g durant 2 minuts per sedimentar el gel i es transferia el sobrenedant en un nou tub de vidre que s'evaporava a 36 °C. Els lípids de la mostra es resuspenien amb 100 µl de cloroform i es dipositava 1 µl de cada mostra sobre una membrana de nitrocel·lulosa, Hybond-C Extra (GE Healthcare), on també es dipositava fosfatidilcolina, com a control negatiu, i sulfàtid, com a control positiu. Les membranes es guardaven a 4 °C fins a la seva utilització.

## 12. Test d'interacció proteïna-lípid mitjançant immunodetecció (*fat western*).

El *fat western* s'ha usat per detectar la intensitat d'interacció entre una proteïna de fusió amb GST i lípids o fraccions lipídiques immobilitzats a membranes de nitrocel·lulosa, ja siguin comercials o preparades, com s'ha descrit a l'apartat anterior, amb fraccions d'extractes lipídics de llevat o bé amb sulfàtid. En el nostre cas la tècnica es basa en la immunodetecció mitjançant anticossos contra la GST per detectar la interacció proteïna de fusió-lípid. Les membranes comercials utilitzades són les PIP-strips i Sphingo-strips (Echelon Biosciences), les quals tenen immobilitzats 100 pmols de diferents fosfoinosítids o esfingolípid, respectivament.

Les membranes que contenen els lípids s'incubaven una hora a temperatura ambient i en constant agitació amb el tampó de bloqueig B. A continuació s'eliminava l'agent bloquejant i les membranes s'incubaven durant 16 h a 4 °C en constant agitació amb 0.5-1 µg/ml de proteïna de fusió amb GST en tampó de bloqueig B fresc. Transcorregut aquest temps, es realitzaven tres rentats de 10 min amb TBS-Tween 20 i s'incubaven entre 1-3 hores a temperatura ambient amb la dilució 1:1000 de l'anticòs policlonal anti-GST preparat en conill (Santa Cruz Biotechnology SC-459) en tampó de bloqueig B. Es realitzaven tres rentats de 10 min amb TBS-Tween 20 i s'incubava durant 1 h a temperatura ambient en constant agitació amb l'anticòs secundari, IgG anti-conill (GE Healthcare NA934, dilució 1:20000) conjugat amb peroxidasa. Finalment es realitzaven 3 rentats de 10 min amb TBS-Tween 20 per retirar l'excés d'anticòs secundari i les bandes immunoreactives es visualitzaven utilitzant el sistema de quimioluminiscència ECL Select (GE Healthcare).

\* **Tampó de bloqueig B:** 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl i 2% del ECL *Advance<sup>TM</sup>* blocking agent (GE Healthcare).



### 13. Formació de Liposomes

La formació dels liposomes va ser realitzada en col·laboració amb el laboratori del Dr. Enrique Claro Izaguirre, de la Unitat de Medicina del Dept. de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Per la preparació dels liposomes amb sulfàtid es preparaven 80 µl de la mescla dels lípids que conté 200 µg de lípid total, tal com es descriu a continuació: per preparar els lipomes control amb una relació equimolar dels lípids, es mesclaven 53.5 µl de fosfatidocolina (5 mg/ml) amb 26.7 µl de colesterol (5 mg/ml). En quan els liposomes que contenen sulfàtid, es preparen els lípids estructurals, fosfatidilcolina; colesterol i el sulfàtid (2.5 mg/ml) en una relació de 1:1:1.6.

Pel que fa a la preparació del liposomes que contenen les fraccions de lípids de llevat obtingudes per separació de capa fina, es preparaven també 200 µg de lípids en 80 µl. En aquest cas la relació entre els diferents lípids no era tenint en compte la seva molaritat sinó els µg totals de cada un, en una relació de 50:50:0 (100 µg de fosfatidilcolina i 100 µg de colesterol) en quan a liposomes control i d'una relació 47.5:47.5:5 pels liposomes que contenen les fraccions lipídiques de llevat. En total es van posar uns 10 µg de la fracció a estudi i 95 µg d'ambdós lípids estructurals. Per l'assaig de *binding*, s'augmentava la proporció de la fracció lipídica fins a una relació final de 40:40:20, que corresponia a 40 µg de la fracció lipídica de llevat i 80 µg dels lípids estructurals.

Es feia la mescla dels diferents lípids, segons cada cas, en tubs de vidre i s'evaporava amb corrent de N<sub>2</sub>. El sediment lipídic es resuspenia en 250 µl de tampó D i s'escalfava durant 1 h en un bloc a 60 °C amb els tubs tapats (cada 15 min es mesclava per pipeteig). Les solucions lipídiques es refredaven en un bany a temperatura ambient i es sonicaven durant 1 o 2 minuts evitant, però, que no s'escalfés la mostra. El següent pas consistia en transferir el contingut a un microtub i centrifugar-ho durant 10 min a 15.700 x g. Es descartava el sobrenedant i als 200 µg de lípids totals s'afegien 80 µl de tampó D (2.5 µg/µl de liposomes), resuspenen suaument

per pipeteig. Els liposomes es guardaven a 4 °C fins a seva utilització (no més de tres dies).

\* **Tampó D:** 20 mM Tris pH 7.5 i 100 mM de NaCl

### **14. Assaig d'unió proteïna-liposomes**

Per realitzar un assaig d'unió entre la nostra proteïna d'interès, GST-Pkh1 i els liposomes, s'utilitzaven 50 µl de liposomes preparats anteriorment, que contenien aproximadament 125 µg de liposomes. Els liposomes es posaven en un tub de 1.5 ml juntament amb 3 µg de proteïna, es mesclava bé i es deixava durant una hora a temperatura ambient en agitació per inversió constant, pipetejant cada 10-15 min. La mesclat de liposomes-GST-Pkh1 va ser centrifugada durant 10 min a 15.700 x g a 23 °C i el sobrenedant, contenint la proteïna no unida als liposomes es reserva en un nou tub. El pellet, que contenia GST-Pkh1 unida als liposomes, es resuspensia amb 50 µl de tampó D.

Finalment s'afegia 1/3 del volum del tampó de carrega SDS 4x i es feia bullir durant 2 min abans de carregar en un gel poliacrilamida-SDS al 10% (p/v). Les proteïnes es detectaven per western blot, mitjançant el protocol d'immunodetecció descrit en l'apartat 7, on s'emprava l'anticòs policlonal anti-GST descrit anteriorment com anticòs primari, diluït 1:1000 en el tampó de bloqueig B i IgG anti-conill a una dilució de 1:20000 conjugat a peroxidasa com anticòs secundari.

### **15. Assaig d'activitat cinasa per fosforilació del substrat**

La immunodetecció de les proteïnes va ser realitzada en col·laboració amb el laboratori del Dr. José Ramón Bayascas, de la Unitat de Medicina del Dept. de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Uns 25 µg de cada un dels liposomes, aproximadament 12.5 µl es mesclaven amb 50 ng de proteïna, GST-Pkh1 i GST-φ i s'incubaven durant 10 min en gel. Tot seguit

s'afegien 50 µg de GST-PKBΔPH, com a substrat de GST-Pkh1. També es preparaven els respectius controls negatius de la proteïna cinasa sense substrat o bé sense liposomes. Un cop preparats les diferents reaccions, s'afegia el tampó cinasa i s'incubava a 30 °C durant 30 min. La reacció es parava afegint un 1/3 del volum de tampó de carrega SDS 4x i incubant durant 5 min a 100 °C. El producte de la reacció es separava en un gel poliacrilamida-SDS al 10% (p/v). La fosforilació de PKBΔPH es detectava mitjançant el protocol d'immunodetecció descrit en l'apartat 7, on s'emprava com anticòs primari Phospho-AKT(PKB) Thr308, diluït 1:2000 en tampó de bloqueig C durant 16h a 4 °C i IgG anti-conill conjugat a peroxidasa a una dilució de 1:20000 en solució de bloqueig A com l'anticòs secundari.

\* **Tampó cinasa:** 50 mM Tris PH 7.4, 0.1% β-Mercaptoetanol, 0.1 mM EGTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µM ATP.

\* **Tampó de Bloqueig C:** TBS-Tween 20 i 0.5% de BSA.

## 16. Tècniques de microscòpia

### 16.1. Detecció d'espècies reactives d'oxigen (ROS).

Els assaigs de detecció de ROS es van dur a terme en col·laboració amb el laboratori del Dr. Ricardo M. Biondi, de la Universitat de Frankfurt.

Les espècies reactives d'oxigen presents a les cèl·lules de les soques SDP8 i CML476 de llevat tractades amb doxiciclina (100 µg/ml) durant 24 h, es visualitzaven mitjançant la incubació amb 123-dihidrohodamina (D1054, Sigma) a una concentració final de 2.5 µg/ml en YPD durant 1 hora. Les cèl·lules es fixaven amb formaldehid 3.7 % a la foscor durant 5 minuts, transcorregut aquest temps, es centrifugaven a 1.200 x g durant 1 min a 4 °C i es realitzaven dos rentats amb PBS. Finalment es resuspenien en 20-50 µl de PBS i es guardaven a 4 °C a la foscor fins a la seva utilització. Per la visualització es va utilitzar el microscopi de fluorescència Nikon Eclipse E800 a 1000X amb el filtre FITC. La composició de les imatges es va fer usant el software Wasabi 1.5.

Per l'avaluació de l'estrès oxidatiu per citometria de flux, les cèl·lules tractades com s'ha explicat anteriorment, van ser fixades amb 3.7 % de formaldehid durant 30 min i sonicades abans de l'anàlisi usant el citòmetre de flux FACSCalibur (BD Biosciences) amb el detector FL2.

### 16.2. Visualització de l'actina.

Per visualitzar l'esquelet d'actina de les soques SDP8 i CML476 de llevat tractades amb doxiciclina durant 18 h, es prenen 15 ml del cultiu a OD<sub>660</sub> 0.05 aproximadament, i es fixaven durant 10 min amb formaldehid al 3.7%. Tot seguit es realitzaven 3 rentats amb PBS, sedimentant les cèl·lules a 800 x g durant 5 min, es resuspenien en 50 µl de PBS i s'incubaven amb 5 µl d'una solució al 6,6 µM de Rodamina/Faloidina (77418-Sigma Aldrich) durant 2 h a 4 °C a la foscor. Transcorregut aquest temps, es feien 5 rentats amb PBS, centrifugant les cèl·lules a 800 x g durant 5 min a 4 °C, i es resuspenien amb 50 µl de solució de muntatge A i es guardaven a -20 °C fins la seva visualització en el microscopi de fluorescència Nikon Eclipse E800. La composició de les imatges es va fer usant el software Wasabi 1.5.

\* **Tampó de muntatge A:** 1mg/ml de p-fenilendiamina, 50 ng/ml de DAPI en 90 % glicerol i 10 % PBS a pH 8.0.

### 16.3. Visualització de la quitina.

Dels cultius en medi d'esperulació de la soca YAB01 i del cultiu en medi YPD de BY4742, es prenia una mostra d'un ml i es fixaven les cèl·lules amb formaldehid al 3.7% durant 5 min. Es feien 2 rentats amb PBS sedimentant les cèl·lules mitjançant centrifugació a 1.200 x g 1 min i es resuspenien amb 20 µl de PBS, tot seguit s'afegeixen 2 µl de CFW (Fluorescent brightener 28; Sigma F3397) a una concentració final de 100 µg/ml. S'incubaven a 4 °C a la foscor durant 5 min. Posteriorment, es feien dos rentats amb PBS i es resuspenien les cèl·lules en 50 µl de solució de muntatge A. La quitina s'observava al microscopi de fluorescència Nikon Eclipse E800 amb el filtre compatible per DAPI.

**16.4. Detecció de fragmentació del DNA (TUNEL)**

Els assaigs de mort cel·lular programada es van dur a terme en col·laboració amb el laboratori del Dr. Ricardo M. Biondi, de la Universitat de Frankfurt, mitjançant l'assaig de TUNEL que detecta els extrems lliures que es generen quan es degrada el DNA per apoptosi. S'utilitza l'enzim terminal desoxinucleotidil transferasa (TdT) que transfereix una d'UTP marcat amb fluoresceïna, marcant així, els extrems lliures i per tant mostrant-nos on hi ha apoptosi.

Les cèl·lules de 50 ml de cultiu tractades amb doxiciclina durant 24 h, es van rentar, resuspendre en PBS, deixant les cèl·lules a una  $OD_{660} \approx 1$  final, i fixar amb 3.7% (v/v) de formaldehid durant 30 min a temperatura ambient. Les cèl·lules fixades es van rentar tres vegades amb PBS i es van resuspendre en 1 ml de PBS. La paret cel·lular es va digerir per incubació amb 100  $\mu$ l de Zymoliase 20T a 10 mg/ml (Seikagaku Biobusiness) a 37 °C, fins assolir aproximadament el 80% d'esferoplasts. Els esferoplasts es van rentar tres vegades amb PBS que contenia un 1 M de sorbitol, i es van permeabilitzar incubant durant 2 min en gel amb una solució de permeabilització (0.1% Triton X-100 i 0.1% de citrat de sodi). Es van rentar dues vegades amb el tampó de PBS-sorbitol, i després es van incubar durant 60 min a 37 °C amb 50  $\mu$ l de la mescla de reacció de TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) (Roche). Finalment els esferoplasts es van rentar tres vegades més amb PBS-sorbitol i es va fer una suspensió amb 2 ml de PBS, tot seguit es va analitzar utilitzant el mètode de citometria de flux, Becton Dickinson FACSCalibur.

Per la visualització al microscopi, 10  $\mu$ l de cada suspensió d'esferoplasts es van dipositar sobre un portaobjectes i es van deixar assecar durant 30 min a temperatura ambient i es van permeabilitzar tal com s'ha descrit, tot seguit, després de 2 rentats amb PBS, es va incubar amb 10  $\mu$ l de una solució de DNase-free RNase (5  $\mu$ g/ml) que es va incubar a 37 °C durant 30 min. Després de tres rentats amb PBS s'incuba amb 10  $\mu$ l de la reacció de TUNEL. Finalment, els esferoplasts es va rentar tres vegades amb PBS, i es van observar al microscopi de fluorescència Nikon Eclipse E800. El percentatge d'apoptosi va ser calculat a partir de 10.000 comptatges de FACS i es va analitzar amb el software Cyflogic v.1.2.1 (Cyflo Ltd).

## 17. Purificació de RNA, síntesis de cDNA i experiments de microarrays de DNA.

Els experiments de microarrays es van dur a terme en col·laboració amb el laboratori del Dr. Ricardo M. Biondi, de la Universitat de Frankfurt.

### 17.1. Extracció, purificació del RNA total i síntesis de cDNA

Per la purificació de RNA, es van fer créixer les soques CML476 (WT) i la soca SDP8 en 50 ml de medi YPD i en presència de doxiciclina (100 µg/ml) durant 8 h i 24 h. Pels experiments de 8 h amb doxiciclina, es van diluir els cultius saturats de WT i SDP8 en medi YPD a una  $OD_{660}$  0.05 amb 100 µg/ml de doxiciclina fins una  $OD_{660}$  de 0.55-0.6. Es van prendre les mostres de 8 h per la posterior purificació del RNA, recollint per centrifugació durant 5 min a 1.200 x g. Per l'obtenció de les mostres de 24 hores i d'estrès tèrmic, es van diluir els cultius de 8 h en doxiciclina en 50 ml de YPD a una  $OD_{660}$  de 0.01 amb 100 µg/ml de doxiciclina fresca durant 16 h més. Les cèl·lules tractades 24 h amb doxiciclina i les cèl·lules pels experiments de *heat shock* es van incubar a 40 °C o 28 °C durant 40 minuts. Les mostres es van recollir per centrifugació 5 min a 1.200 x g a 4 °C, van ser rentades amb aigua freda i els pellets de les cèl·lules es van guardar secs a -80 °C fins que es realitzà la purificació de l'RNA.

L'RNA total va ser purificat utilitzant el kit RiboPure-Yeast (Ambion) seguint les instruccions del fabricant i tractat amb DNase per tal d'eliminar les traces de DNA genòmic. La integritat i la qualitat dels RNAs va ser avaluada mitjançant una electroforesis en gel desnaturalitzant d'agarosa al 0.8%, i la quantificació es va realitzar mesurant la  $OD_{280}$  en un fotòmetre BioPhotometer (Eppendorf).

A partir de 8 µg de RNA total es va preparar el cDNA marcat amb els fluoròfors Cy3 i Cy5, utilitzant oligo (dT) com encebador de la transcriptasa inversa mitjançant el mètode de marcatge indirecte, emprant el kit Cyscribe Post-Labeling (GE Healthcare Life).

Els anàlisis transcripcionals van ser realitzats utilitzant microarrays de DNA, els quals contenen fragments amplificats de 6014 ORFs de *S. cerevisiae* (Alberola

et al., 2004; Viladevall et al., 2004). El DNA així amplificat va ser dissolt en DMSO al 50% i dipositat en una superfície de vidre coberta d'aminosilanat (ULTRAGAPS<sup>TM</sup>; Corning Glass) utilitzant un robot Micro Grid II Spotter (BioRobotics).

### 17.2. Hibridació dels microarrays

La prehibridació, hibridació i rentats de microchips es realitzaren seguint les indicacions de *l'Institute for Genomic Research*, amb petites modificacions. La prehibridació dels microarrays es va fer en una solució que conté 5x SSC, 0.1% de SDS i 1% de BSA (Sigma) durant 1 hora a 42 °C. Per la hibridació, cada cDNA marcat amb els fluoròfors Cy3 i Cy5 es va dissoldre en 35 µl de solució d'hibridació (50% de formamida, 5x SSC, 0.1% SDS). Es mesclaren i s'afegiren 5 µg de DNA (10 mg/ml) d'esperma de salmó abans de procedir a la desnaturalització durant 3 minuts a 95 °C. La hibridació del microarray de DNA es va realitzar en un equip *ArrayBoster Hybridization Station* (Sunergia Group) durant 14 hores a 42 °C.

Els rentats dels microarrays, de 5 minuts cadascú, es realitzaren en tres passos utilitzant cubetes de tinció i agitadors magnètics. El primer rentat es realitzà amb un solució de 1x SSC i 0.2% de SDS a 42 °C. El segon rentat en una solució de 0.1x SSC i 0.2% de SDS i el tercer en una solució 0.1x SSC, ambdós a temperatura ambient. Finalment els microarrays es submergeixen cinc vegades en aigua MilliQ i s'assecaren mitjançant centrifugació durant 1 minut a 300 x g (Centrífuga 5810; Rotor A-4-62, Eppendorf). Per detectar la fluorescència, els microarrays secs es van introduir en un escàner de fluorescència, ScanArray 4000 (Packard Instruments Co.), on les imatges Cy3 i Cy5 van ser obtingudes amb una resolució de 10 µm.

### 17.3. Anàlisi de les dades

L'escàner ScanArray 4000 està dotat d'un làser i dos filtres, que permeten detectar l'emissió de fluorescència i generar una imatge virtual indicant la intensitat de fluorescència en cada punt del microarray, la qual es mesurà i processà utilitzant el programa GenePix Pro 6.0 (Molecular Devices). Els *spots* amb un diàmetre inferior a 120 µm o amb una intensitat de fluorescència per Cy3 i Cy5 per sota les 150 unitats no van ser considerats per l'anàlisi posterior.

Per cada condició estudiada es realitzaren dos experiments independents i a més peliminar els efectes de les possibles diferències d'incorporació entre els fluorocroms es van fer repliques tècniques en les que es realitzava el marcatge recíproc. Per cada gen es va calcular el promig de tots els valors aptes pel seu anàlisi i únicament es van tenir en conta aquells gens pels quals es disposava d'almenys dos dades. Un determinat gen fou considerat com induït o reprimat quan la raó del seu valor en una soca sotmesa a l'estrès d'estudi *versus* la mateixa soca no sotmesa a estrès fou superior a 2.0 o inferior a 0.5 respectivament. Els programes de la plataforma GEPAS v4, actualment a la plataforma Babelomics (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>), es van utilitzar per realitzar els procediment inicial de les dades (Herrero, Díaz-Uriarte, & Dopazo, 2003). Els gens també van ser ordenats per categories funcionals mitjançant el classificador interactiu FunCat (Ruepp et al., 2004), disponible al web del MIPS (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funecatDB/>). L'anàlisi del perfil d'expressió dels gens seleccionats es va determinar utilitzant els programes Gene Cluster v3.0 (Eisen, Spellman, Brown, & Botstein, 1998) i Java TreeView v.1.1.3, disponible en les pàgines <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm> i <http://jtreeview.sourceforge.net/>, respectivament.

En els experiments on l'objectiu era identificar la resposta transcripcional en front a un xoc tèrmic dependent de Pkh1, es van definir diferents nivells de dependència de l'activitat Pkh. D'aquesta manera es van definir com a gens dèbilment dependents (WD, *Weakly Dependent*) aquells que mostraven un ratio SDP8/WT de  $0.67 > X > 0.50$ , aquells amb un quocient (X)  $0.50 > X > 0.25$  van ser considerats fortament dependents (SD, *Strongly Dependent*) i finalment aquells amb una ratio  $\leq 0.25$  van ser definits com a totalment dependents (TD, *Totally Dependent*). A més, els gens els quals la seva expressió es troba induïda més de 2.5 vegades en la soca salvatge i menys de 1.3 en la soca mutant, també són considerats com a totalment dependents.



## 18. Assaig d'activitat $\beta$ -galactosidasa

Per tal d'avaluar l'expressió del gen *PHO84* s'ha construït un plasmidi reporter que conté el promotor de *PHO84* fusionat al gen *lacZ*. Les cèl·lules de llevat, CML476 i SDP8, portadores del plasmidi es van fer créixer en presència de doxiciclina (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durant 8 h i 24 h, tal com s'ha descrit per la preparació del RNA. Les cèl·lules van ser recollides per centrifugació ( 5 min a 750 x g) i guardades a  $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  fins el moment de l'assaig.

L'assaig  $\beta$ -galactosidasa es va realitzar com s'indica en (Reynolds et al., 2001). Les cèl·lules són resuspeses en 300  $\mu\text{l}$  de tampó Z. 100  $\mu\text{l}$  de la suspensió de cèl·lules es dilueixen es tubs d'assaig que contenen 900  $\mu\text{l}$  de tampó Z, on les cèl·lules es permeabilitzen per addició de 40  $\mu\text{l}$  de cloroform i 20  $\mu\text{l}$  de SDS al 10 % i s'agita durant 15 segons. Els 200  $\mu\text{l}$  restants de suspensió de cèl·lules en tampó Z es guarden a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La suspensió de les cèl·lules permeabilitzades es col·loca a un bany a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Un cop atemperades, s'afegeix el substrat, 0.2 ml ONPG (4 mg/ml) per començar la reacció enzimàtica, la qual s'evidencia per l'aparició d'un color groguenc a la mescla, típic del producte format. La parada de la reacció enzimàtica es realitza canviant el pH de la reacció mitjançant l'addició de 500  $\mu\text{l}$  de 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . La formació del producte s'avalua mitjançant espectrofotometria mesurant 380  $\mu\text{l}$  de la solució d'assaig a OD<sub>405</sub> nm, en plaques de 96 pouets i usant el lector de plaques Labsystems iEMS Reader MF (Labsystems). La quantitat de cèl·lules de la suspensió va ser monitoritzada mitjançant l'absorbància a 620 nm. L'activitat  $\beta$ -galactosidasa va ser expressada en unitats de Miller (Miller, 1972).

\* **Tampó Z:** 60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 40 Mm  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM KCl, 1mM  $\text{MgSO}_4$ , 35 mM  $\beta$ -Mercaptoetanol.

## **VI. RESULTATS I DISCUSSIÓ**

---



## **1. Caracterització de les soques delecionades per Pkh.**



### 1.1. Generació i caracterització de les soques mutants de Pkh.

S'ha descrit que les proteïnes Pkh es troben involucrades en la via de la senyalització de la paret cel·lular (David E Levin, 2005). Per tal d'identificar noves funcions de les Pkh, s'ha utilitzat fins a dia d'avui com a única aproximació genètica l'ús d'un al·lel termosensible. Aquesta aproximació consisteix en l'eliminació del gen *PKH2* i la substitució de *PKH1* per una versió que codifica una proteïna, l'activitat de la qual resulta reprimida a 37 °C. Aquest fet implica, que per poder estudiar els efectes de la manca de Pkh en aquesta soca, es faci del tot necessari la incubació a 37 °C. Fet que representa un estrès tèrmic per la cèl·lula, la qual requereix una resposta adaptativa per part de la CWI, on es troba implicada la via Pkh. És per aquesta raó que al laboratori es va decidir dissenyar un nou sistema que no impliqui estrès tèrmic.

#### Disseny de les soques

Aquest nou sistema consistia en obtenir una soca doble mutant i una altre triple mutant Pkh, anomenades MB005 i SDP8 respectivament (veure taula 2 i Figura 19), en les quals s'hi han suprimit els gens *PKH1* o *PKH1* i *PKH3*, i s'ha incorporat un promotor regulable per doxiciclina (*tetO<sub>7</sub>*) que controla l'expressió de *PKH2*, mitjançant el sistema descrit per Yen i col·laboradors (Yen et al., 2003). Així, la soca doble mutant, MB005, en presència de doxiciclina només expressa el gen *PKH3*, mentre que la soca triple mutant, SDP8, quan s'incuba amb l'antibiòtic, no expressa cap Pkh.

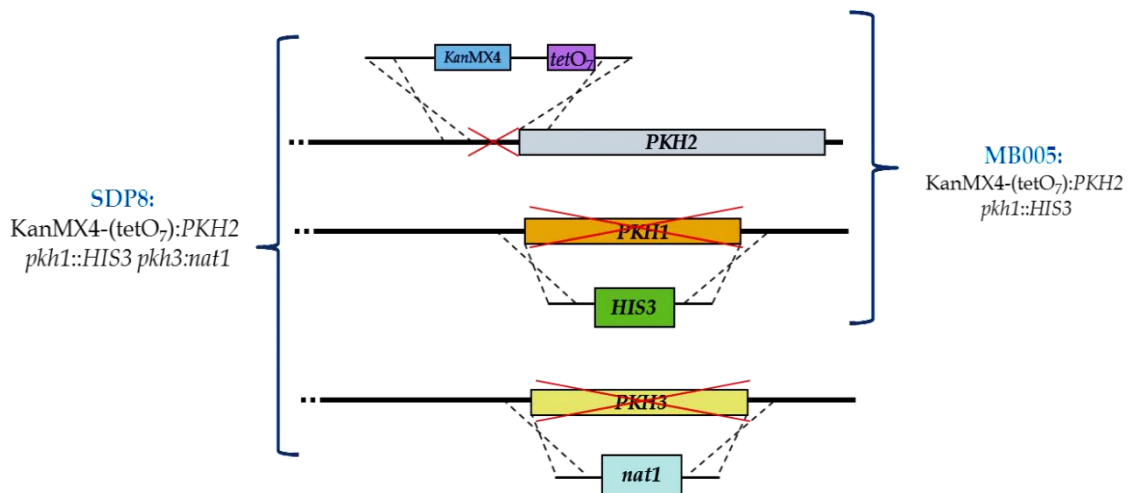
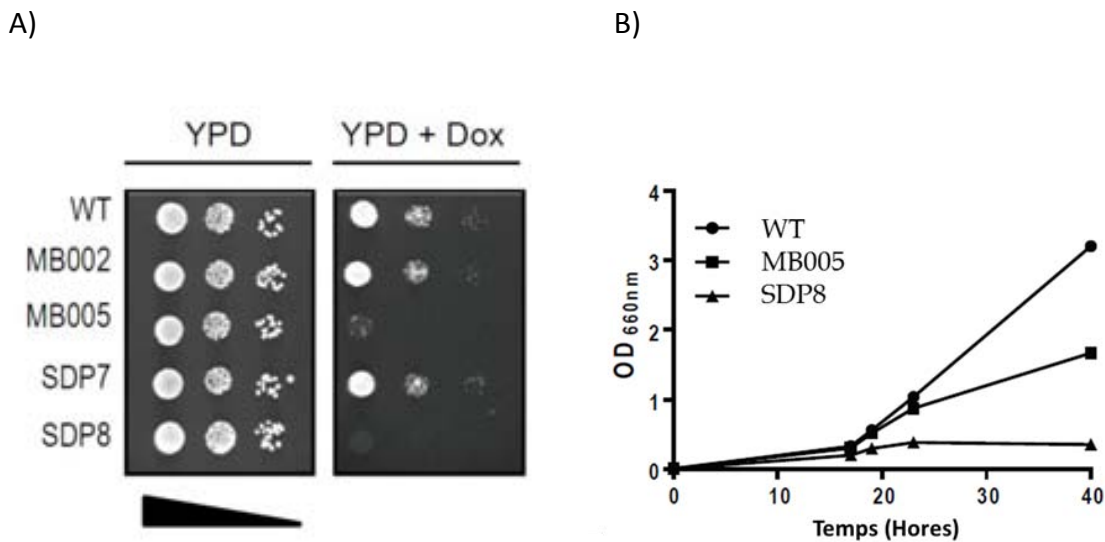


Figura 19. Esquema de la construcció de les soques MB005 i SDP8

**Estudi de l'efecte de doxiciclina sobre el creixement de les soques generades**

S'han caracteritzat aquestes soques, primerament comprovant la seva sensibilitat a la doxiciclina pel mètode de *drop test on*, tal com es mostra a la figura 20A, el creixement de les cèl·lules MB005 en presència d'altres quantitats de doxiciclina es veu molt reduït. Aquests defectes en el creixement són causats per la manca de les proteïnes Pkh, ja que l'expressió tant de *PKH2* procedent d'un plasmidi pRS316 o bé de l'expressió de PDK1 humana, en la soca MB005, rescaten el defecte en el creixement en medi sòlid en presència de doxiciclina (dades que no es mostren).



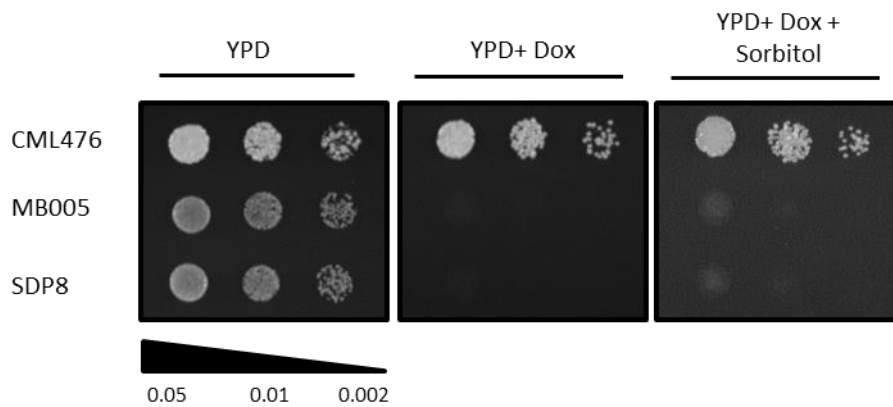
**Figura 20. Les cèl·lules sense activitat Pkh1 i amb una expressió reduïda de *PKH2* no són viables.** A) Creixement de les soques descrites en medi sòlid YPD, en absència o presència de 100 µg/ml de doxiciclina. Els cultius saturats d'aquestes soques s'han diluït fins una OD<sub>660</sub> del 0.05. 3 µl de cada dilució seriada 1:5 s'han gotejat en plaques YPD i YPD que conté 100 µg/ml de doxiciclina, les plaques s'han incubat a 28 °C durant 36 h. B) Els cultius saturats de les soques CML476 (WT), MB005 i SDP8 s'han diluït fins una OD<sub>660</sub> 0.05 en medi YPD que conté doxiciclina a una concentració final de 100 µg/ml. Els cultius s'han fet créixer durant 8 h, diluït a OD<sub>660</sub> 0.01 i afegit antibiòtic fresc (T0 h). S'ha afegit, també doxiciclina a les 16 i 26 h després de la dilució. Les ODs dels cultius a 660 nm s'han mesurat per cada temps indicat.

L'addicional deleció de *PKH3* no redueix el creixement de les soques MB002 i MB005 en medi sòlid (Figura 20A) però fa decreixer el creixement de MB005 en medi líquid, més apropiat per detectar petites diferències de creixement (Figura 20B).

**És la deficient activació de la CWI la responsable de la manca de creixement de les soques sense Pkh ?**

Els defectes en el creixement de molts mutants relacionats amb la CWI poden ser rescatats per l'addició d'un estabilitzador osmòtic, com ara 1 M sorbitol, al medi de creixement. Per tal de determinar si la manca de creixement de les soques que no expressen Pkh és causada exclusivament per un problema en la paret cel·lular o, si pel contrari, les Pkh tenen altres funcions importants, es va determinar el creixement de les soques mutants en presència d'una dosis letal de doxiciclina i de 1 M sorbitol.

Els resultats obtinguts indiquen que l'addició de 1 M sorbitol pràcticament no recupera el creixement de les soques MB005 o SDP8 en plaques que contenen doxiciclina (figura 21). Per tant, el defecte de creixement de les soques sense Pkh no és únicament conseqüència d'un problema en la via de la CWI.



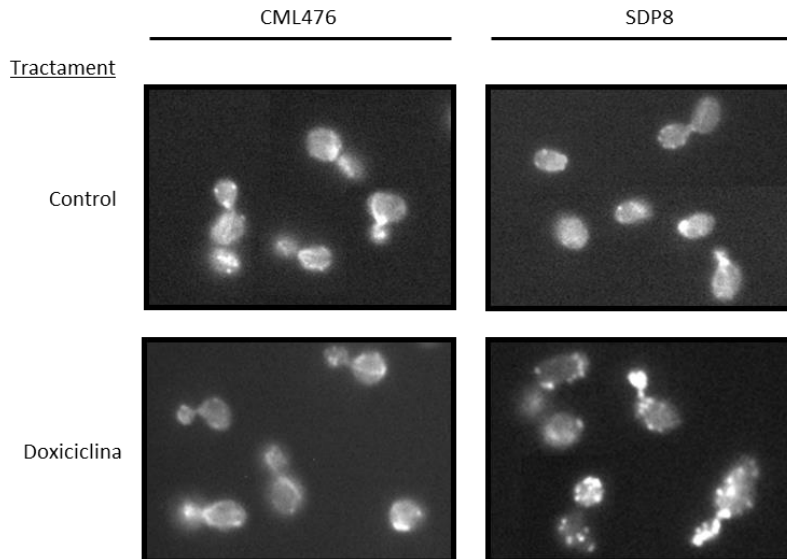
**Figura 21. Els defectes de creixement per falta d'activitat Pkh en les soques MB005 i SDP8 no es veuen rescatats per estabilitzadors osmòtics.** Els cultius saturats de les soques CML476, MB005 i SDP8 s'han diluït fins una OD<sub>660</sub> del 0.05 i 3 µl de cada dilució seriada 1:5 s'han gotejat en plaques YPD i YPD que conté 100 µg/ml de doxiciclina i en plaques que contenen YPD més 100 µg/ml de doxiciclina i 1 M de Sorbitol. Les plaques s'han incubat a 28 °C durant 48 h.



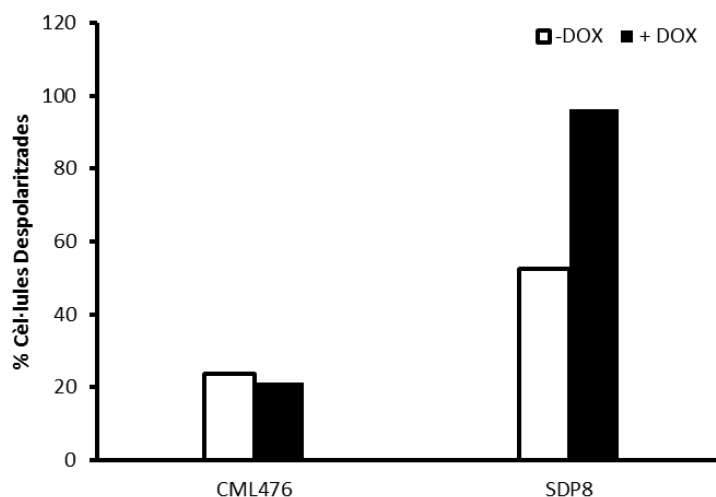
**Efectes de la manca de Pkh sobre el citoesquelet d'actina**

Coneixent la relació entre la via Pkh1-Pkc1 i la seva implicació en la despolarització i repolarització del citoesquelet d'actina (Delley & Hall, 1999) es va decidir observar el fenotip que mostra la soca SDP8 després d'un tractament amb doxiciclina de 18 h. Tal com es mostra a la figura 22A, i després de quantificar la localització de l'actina en més de 200 cèl·lules per cada soca i condició mitjançant l'analitzador d'imatge WASABI (Hamamatsu v1.5), veiem que les cèl·lules WT mostren el citoesquelet d'actina totalment polaritzat, on s'observen clarament filaments d'actina (només un 20% de cèl·lules despolaritzades, Figura 22B). En canvi, en la major part de les cèl·lules de la soca SDP8 (un 98 %) no s'observen els cables d'actina i els *patches* es troben despolaritzats (Figura 22B). Per tant podríem concloure que la falta de Pkh efecte la polaritat del citoesquelet d'actina.

A)



B)

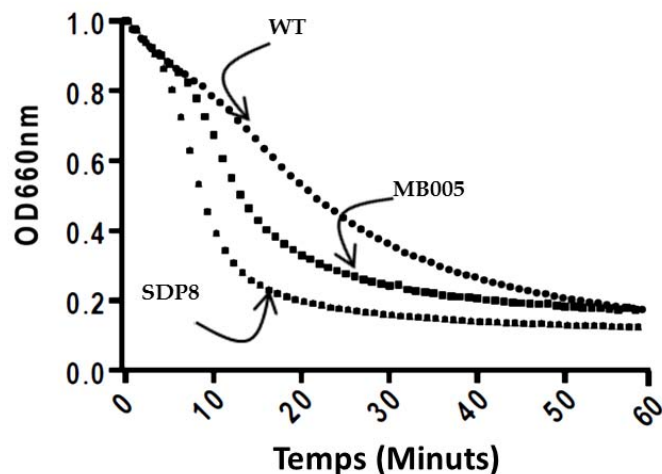


**Figura 22. La manca de Pkh provoca la despolarització del citoesquelet d'actina.** A) Les cèl·lules de la soca CML476 i SDP8, han sigut tractades amb i sense 100 µg/ml de doxiciclina durant 18 h i marcades amb Rodamina/Faloidina durant 2 h a 4 °C a la foscor. B) Es mostra la quantificació, a partir de l'analitzador d'imatges WASABI, d'almenys 200 cèl·lules en cada soca descrita en A) i per cada tractament. Representat en percentatge de cèl·lules despolaritzades amb o sense tractament en doxiciclina (-DOX/+DOX).

Aquestes dades en conjunt indiquen que les cèl·lules de la soca SDP8 tractades amb doxiciclina, tenen delecionada la seva activitat Pkh i que, per tant, aquesta soca pot ser un bon model per estudiar els fenotips causats per la falta d'activitat Pkh. A més a més, podem concloure que l'activitat Pkh es requereix per les condicions normals de creixement del llevat i que els defectes de creixement en aquestes cèl·lules deficientes en Pkh no és degut a la lisi cel·lular, ja que el defecte en el creixement no es veu alleujat en presència de sorbitol.

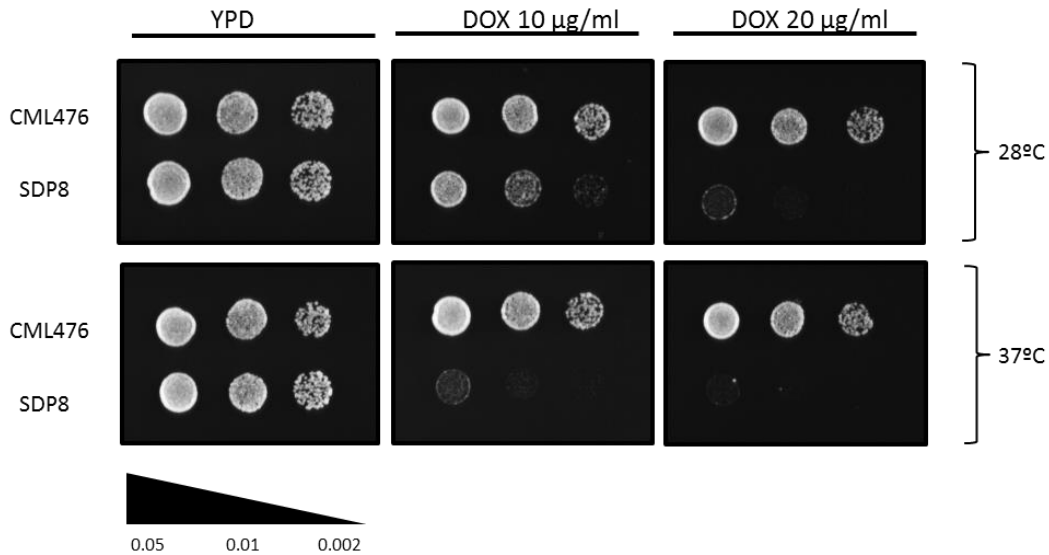
## 1.2. La manca de proteïnes Pkh provoca sensibilitat a estressos de paret cel·lular.

És ben acceptat que les proteïnes Pkh són necessàries per l'activació de Pkc1 (S Friant et al., 2001; Inagaki et al., 1999). Per tant, la falta de les proteïnes Pkh hauria d'inhibir l'activació de Pkc1 i, conseqüentment, comprometre la integritat de la paret cel·lular. D'acord amb aquesta hipòtesis, s'ha observat que les cèl·lules MB005 són més sensibles que les cèl·lules del WT CML476 a la digestió amb zimoliasa, mescla d'activitats que degraden la paret cel·lular i que promouen l'activació de la via de Slt2 MAPKs (de Nobel et al., 2000). A més, la deleció addicional del gen *PKH3* (soca SDP8) agreuja la lisis cel·lular sota el mateix tractament amb zimoliasa (Figura 23).



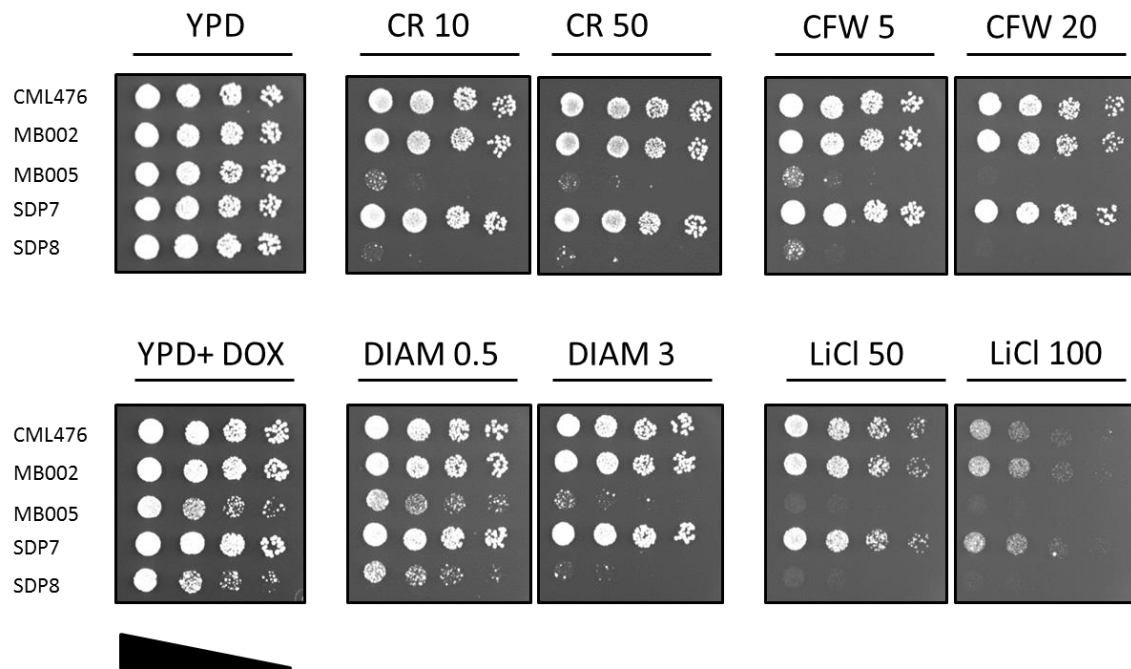
**Figura 23.** Les cèl·lules que tenen l'activitat Pkh delecionada tenen compromesa la via de la CWI. La sensibilitat a zimoliasa de les soques CML476, MB005 i SDP8. Dos mil·lilitres de cèl·lules en creixement exponencial ( $\approx 2 \times 10^7$  cèl·lules/ml) tractades amb 100  $\mu\text{g/ml}$  de doxiciclina durant 20 h s'han resuspès en PBS i incubat a 28 °C en agitació constant i en presència de 2  $\mu\text{g/ml}$  de zimoliasa 20T. El decreixement de la densitat òptica s'ha monitoritzat cada minut i es mostra com l'OD<sub>660 nm</sub> relativa a quan s'ha afegit la zimoliasa (a T0 min).

També s'ha observat que quan les cèl·lules de la soca SDP8 són tractades amb baixes concentracions de doxiciclina (dosis subletals), són també sensibles a la incubació a 37 °C, una temperatura que suposa un estrès tèrmic i activa la via de la CWI (Figura 24).



**Figura 24. Les cèl·lules de la soca SDP8 tractades amb baixa concentració de doxiciclina són sensibles a altes temperatures.** Els cultius saturats de les soques CML476 i SDP8 s'han diluït fins una OD<sub>660</sub> del 0.05 i 3 µl de cada dilució seriada 1:5 s'han gotejat en plaques YPD i YPD que conté concentracions baixes de doxiciclina a 10 i 20 µg/ml. Les plaques s'han incubat a 28 °C i a 37 °C durant 48 h.

A part, s'ha determinat el creixement de les soques mutants per Pkh en presència de doxiciclina i diferents estressos de paret com CR, CFW, LiCl, Diamida, etc en medi sòlid (Figura 25). On podem observar en tots els casos que les cèl·lules, tant del doble mutant, MB005, com del triple mutant, SDP8, hi són clarament sensibles.



**Figura 25.** Les cèl·lules sense Pkh tractades amb baixa concentració de doxiciclina són sensibles a diferents estressos de paret. Els cultius saturats de les soques CML476, MB002, MB005, SDP7 i SDP8 s'han diluït fins una OD<sub>660</sub> del 0.05 i 3 µl de cada dilució seriada 1:5 s'han gotejat en plaques YPD i YPD que conté concentracions baixes de doxiciclina a 10µg/ml i 10 i 50 µg/ml de roig congo (CR); 5 i 20 µg/ml de calcofluor (CFW); 0.5 i 3 mM de diamida (DIAM); 50 i 100 mM de LiCl. Les plaques s'han incubat a 28 °C i a 37 °C durant 48 h.

Aquests resultats ens estan indicant que les Pkh són necessàries per activar la via de la CWI i que sense Pkh les cèl·lules es tornen extremadament sensibles als estressos de la paret cel·lular (Figura 23, 24 i 25).

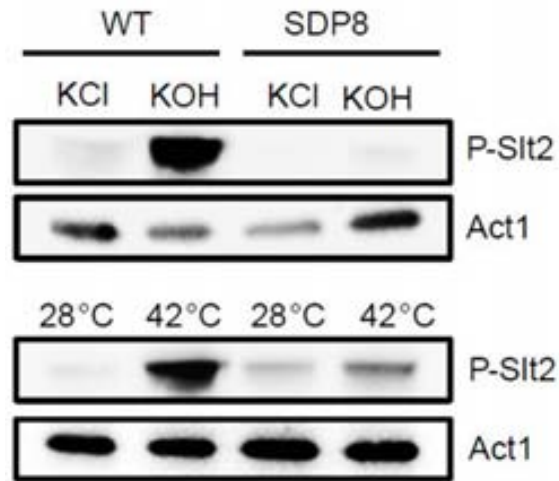
D'acord amb aquests fets, observats fins ara, podríem concloure que les cèl·lules deficientes d'activitat Pkh són hipersensibles als estressos de paret. També presentem evidències que la mort d'aquestes cèl·lules, deficientes en Pkh, en condicions estàndards de creixement no és només a causa d'un defecte de la lisis cel·lular com a conseqüència d'un defecte en la paret cel·lular, ja que, a diferència del que passa a les cèl·lules que no tenen Pkc1, l'addició d'un estabilitzador osmòtic al medi no restaura la supervivència cel·lular. Els nostres resultats estan d'acord amb els obtinguts per Voordeckers i col·laboradors, que mostren com el sorbitol rescata els defectes de creixement de la soca *pkh1<sup>ts</sup> pkh2Δ*, però, en canvi no pot ser completament rescatat el creixement en la soca *pkh1<sup>ts</sup> pkh2Δ pkh3Δ* quan les cèl·lules creixent a 35 °C (Voordeckers et al., 2011). A més les cèl·lules que els manca Ypk1 i

Ypk2, substrats de Pkh, no són viables, i aquesta letalitat no pot ser rescatada per sorbitol (Chen et al., 1993). Per tant, les proteïnes Pkh podrien estar involucrades en funcions essencials addicionals independents de la via de la CWI, importants fins hi tot en absència d'un estrès de paret.

### **1.3. Les proteïnes Pkh són essencials per la normal fosforilació de Slt2 sota condicions d'estrès de paret cel·lular.**

Els resultats de l'apartat anterior podrien ser explicats assumint que la falta de Pkh impedeix l'activació normal de la cascada de la MAPK, Slt2. Per tal d'investigar aquest aspecte, cèl·lules de les soques WT i SDP8 tractades amb doxiciclina s'han sotmès a estressos de paret cel·lular, com l'alcalinització del medi fins a pH 8.3 durant 15 min (Serrano et al., 2006) o com un estrès tèrmic per incubació a 42 °C durant 40 min (Cid et al., 1995), estressos que indueixen la fosforilació de Slt2. L'estat de fosforilació de Slt2 s'ha determinat mitjançant *western blot* amb un anticòs fosfoespecífic. Com es pot observar a la figura 26, l'estrès alcalí induït amb 35 mM KOH, durant 15 min, produeix un increment important de la fosforilació de Slt2 en les cèl·lules WT tractades amb doxiciclina, comparat amb les mateixes cèl·lules induïdes amb 35 mM de KCl, utilitzat com a control negatiu. En canvi, s'observa com la fosforilació de Slt2 es veu dràsticament reduïda quan les cèl·lules SDP8 tractades amb doxiciclina reben el mateix tractament amb KOH, indicant així que la fosforilació de Slt2 és depenent de la presència de l'activitat Pkh. El defecte en fosforilar Slt2 també es pot observar quan aquestes cèl·lules de SDP8, tractades amb doxiciclina, es sotmeten a un estrès tèrmic (Figura 26, a sota).

Un decreixement semblant en la fosforilació de Slt2 s'observa en les cèl·lules MB005 quan són estressades per alcalinització del medi i per estrès tèrmic (aquestes dades no es mostren). Aquests fets ens indiquen que Pkh és important per la resposta apropiada a un estrès de paret i que aquesta requereix de la fosforilació de Slt2 MAPK.



**Figura 26. Les cèl·lules que tenen l'activitat Pkh deletcionada tenen compromesa la via de la CWI.** La detecció de l'estat de fosforilació de Slt2 mitjançant *Western blot*. Les cèl·lules procedents de les soques indicades s'han fet créixer en presència de doxiciclina en un total de 24 h abans d'activar la via de la CWI per l'alcalinització del medi (a la part superior de la figura) o bé per un xoc tèrmic (a sota). Pel tractament alcalí, els cultius s'han tractat amb 35 mM KOH ( que produeix un pH de 8.3) o bé en 35 mM KCl (com a control) durant 15 min. Per l'activació de Slt2 per xoc tèrmic, les soques s'han incubat a 42 °C durant 40 min. Els cultius control s'han incubat a 28 °C durant el mateix temps. L'extracte total de proteïnes s'ha separat per SDS-PAGE, i la fosforilació de Slt2 (anomenat com P-Slt2) s'ha detectat utilitzant l'anticòs anti-fosfo p44/42 MAPK. Un cop elimines els anticossos, les mateixes membranes s'han incubat amb l'anticòs anti-actina, utilitzat com a control de càrrega (anomenat com Act1).

#### 1.4. Les cèl·lules amb manca d'activitat Pkh acumulen mRNAs implicats en respostes a estrès.

Per obtenir una major comprensió de la funcions cel·lulars de les cinases pkh, es van analitzar els canvis globals en la transcripció derivats de la manca d'activitat Pkh utilitzant microarrays de DNA. En contrast amb les dades publicades anteriorment (Chen et al., 1993), es van detectar una sèrie de canvis, petits en nombre, però rellevants, en la transcripció causats pel tractament doxiciclina (resultats sense publicar). Per tant, vam decidir comparar el patró d'expressió de les cèl·lules SDP8 i CML476, tractades ambdues amb doxiciclina.

El disseny de l'experiment va ser el següent:

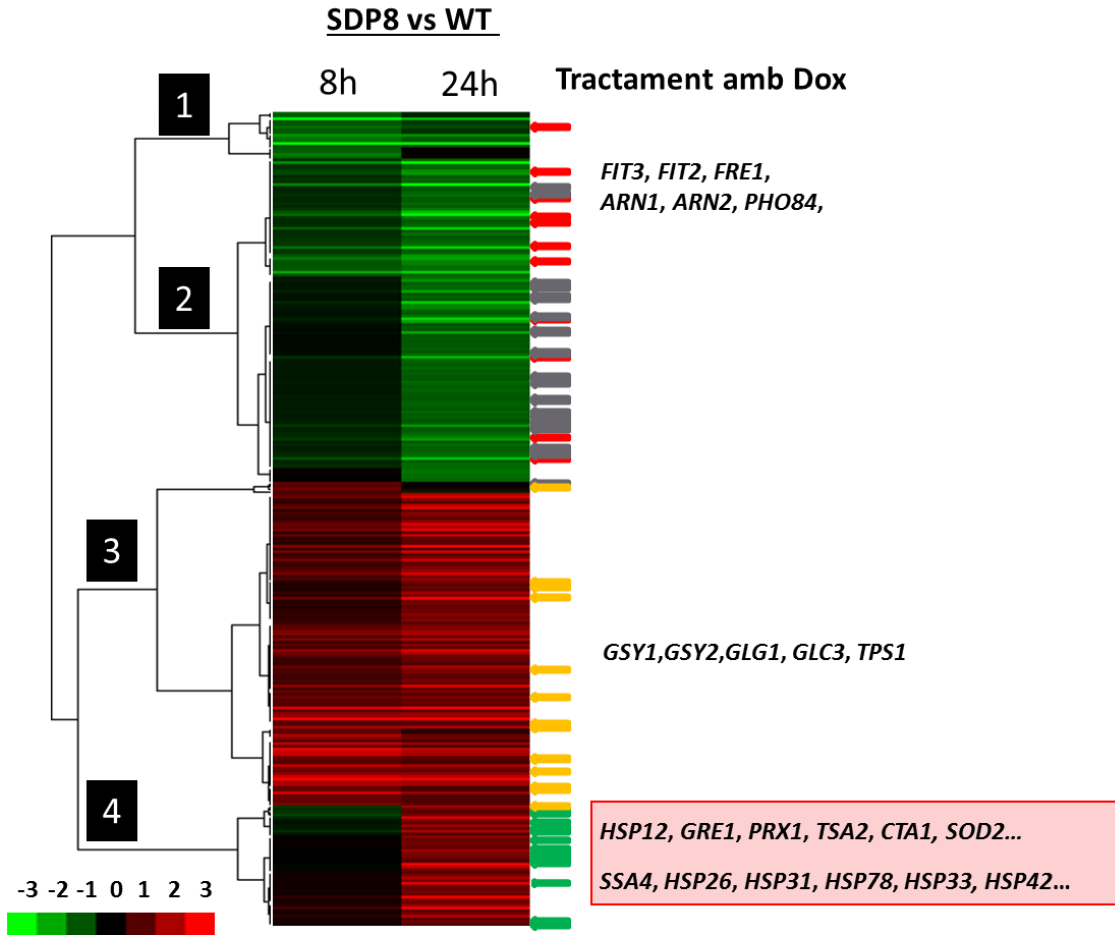
Xip 1 i 2: SDP8\_8 h Dox vs WT\_8 h Dox

Xip 3 i 4: SDP8\_24 h Dox vs WT\_24 h Dox





Considerant que l'expressió d'un gen varia quant els nivells del seu mRNA es menys de 0.5 o més de 2 cops el present en les cèl·lules WT, el tractament amb doxiciclina de 8 i 24 h canvia l'expressió de 113 i 368 gens, respectivament. Els nivells de 156 mRNAs decreixen en les cèl·lules SDP8 després de 8 o 24 h d'incubació amb l'antibiòtic (inclosos en els clústers 1 i 2 en la Figura 27 i annex taula 1). Entre ells, un grup de 15 gens involucrats en el transport d'ions (valor  $p$  2.46e-06, d'acord amb classificador FunCat de MIPS) es troben reprimits, molts d'ells (14 gens, incloent *ARN1*, *ARN2*, *COT1*, *FET3*, *FET4*, *FIT1*, *FIT2*, *FIT3*, *FRE1*, *FTR1*, *PHO84*, *PMA1* i *SIT1*), es troben especialment reprimits només després de les 24 h amb doxiciclina. Un grup de 31 gens que codifiquen proteïnes ribosomals (valor  $p$  9.98e-15) (Figura 27, clúster 2) també es troba específicament reprimat després de 24 h de tractament amb doxiciclina.

Per altra banda, hem trobat 257 mRNAs els quals es troben induïts després del tractament amb doxiciclina de 8 o 24 h (annex taula 2). Les categories més representatives entre aquests gens induïts inclouen els gens relacionats amb el metabolisme de carbohidrats (valor  $p$  2.53e-13) i energia (valor  $p$  1.17e-13). Per exemple, l'expressió de molts gens implicats en la síntesis de glicogen (així com *GSY1*, *GSY2*, *GAC1*, *GLG1* i *GLC3*) i fermentació (com ara *ALD2*, *ALD3*, *ALD4*, *ALD6*, *AAD3*, *AAD6*, *AAD14*, *AAD15*, *AAD16*) es troben induïts tant a les 8 com a les 24 h de tractament amb doxiciclina (clúster 3 Figura 27). Per tant, a curt termini, la resposta transcripcional en absència d'activitat Pkh, potencia la fermentació i augmenta els nivells de glicogen. Curiosament, hem observat un fort augment en l'expressió de gens implicats en la resposta a l'estrès (valor  $p$  3.81e-13, clúster 4 Figura 27), especialment després de les 24 h de la incubació amb doxiciclina. Entre aquests gens més induïts, hi hem trobat un grup de xaperones involucrades en la resposta a xoc tèrmic que pertanyen a la categoria funcional de resposta a plegament de proteïnes (com ara *HSP12*, *HSP26*, *HSP30*, *HSP31*, *HSP33*, *HSP42*, *HSP78*, *HSP82*, *HSP104* i *SSA4* entre d'altres). De la mateixa manera, també hem trobat un excés de gens típicament induïts en resposta a estrès oxidatiu (com *PRX1*, *TSA2*, *SOD2*, *CTA1*, i *GRE1* entre d'altres). Per tant, a llarg termini la falta de les proteïnes Pkh resulta en una resposta transcripcional semblant a la induïda per una resposta a xoc tèrmic i estrès oxidatiu.





	CATEGORIA FUNCIONAL	P-VALOR
<b>CLUSTER 1+2 (135 gens)</b>		
█	12.01.01 Proteïnes ribosomals	6,75E-14
	12 SINTESIS DE PROTEÏNES	7,94E-13
	12.01 Biogènesis dels ribosomes	3,60E-12
█	20.01.01 Transport iònic	3,76E-07
	20.01.01.01.01 Transport iònic de metalls pesats (Cu+, Fe3+, etc.)	1,16E-06
	20.01.01.01.01.01 Transport de ferro-sideròfors	2,59E-06
	20.01.01.01 Transport catiònic (H+, Na+, K+, Ca2+, NH4+, etc.)	4,20E-05
<b>CLUSTER 3 (118 gens)</b>		
█	02 ENERGIA	4,05E-08
	01.05 Metabolisme dels carbohidrats i compostos de Carboni	3,30E-07
	02.01 glucòlisis i gluconeogènesis	1,13E-05
	02.19 Metabolisme de les reserves energètiques (e.g. glucogen, trehalosa)	6,99E-05
	01 METABOLISME	1,45E-04
█	32.01 Resposta a estrès	5,61E-04
<b>CLUSTER 4 (44 gens)</b>		
█	32.01 Resposta a estrès	3,34E-08
█	14.01 Plegament i estabilització de proteïnes	2,35E-07
	32.01.07 Resposta a proteïnes mal plegades	8,22E-06

	CATEGORIA FUNCIONAL	P-VALOR
<b>257 GENS INDUÏTS (8 o 24 h + DOX)</b>		
	02 ENERGIA	1,17E-13
	01.05 Metabolisme dels carbohidrats i compostos de Carboni	2,53E-13
	32.01 Resposta a estrès	3,81E-13
	02.16 Fermentació	2,26E-09
	01 METABOLISME	3,32E-06
	32.01.01 Estrès oxidatiu	9,38E-06
	01.05.03.01 Metabolisme Glucogen	6,16E-04
<b>156 GENS REPRIMITS (8 o 24 h + DOX)</b>		
	12.01.01 Proteïnes ribosomals	9,98E-15
	12 SINTESIS DE PROTEÏNES	1,01E-12
	20.01.01 Transport iònic	2,46E-06
	20.01.01.01 Transport catiònic (H+, Na+, K+, Ca2+, NH4+, etc.)	3,91E-06
	20.01.01.01.01 Transport de ferro-sideròfors	5,30E-06

**Figura 27. Agrupació de gens expressats diferencialment quan Pkh és deletionat.** Els patrons d'expressió de les cèl·lules SDP8 tractades amb doxiciclina durant 8 o 24 h es van comparar amb els de les cèl·lules WT CML476 igualment tractades. Un conjunt de 297 gens amb les dades en ambdues condicions que són expressats diferencialment en almenys en una condició van ser agrupades jeràrquicament (*complete linkage clustering, uncentered correlation*) fent servir el programari de clúster (v 2.11) (Eisen et al., 1998) i es van visualitzar amb Java TreeView (v . 1.1.5r2) (Saldanha, 2004) (Arbre més taula superior). Les categories funcionals més rellevants per a cada un dels quatre grups, d'acord amb MIPS FunCat (Ruepp et al., 2004), es detallen en la taula superior, i per aquells 257 gens que es troben induïts tant a les 8 o 24 h de tractament amb dox, com aquells 156 gens reprimits, es detallen les seves categories funcionals en la taula inferior.

Resulta interessant el fet que mitjançant l'ús de l'aplicació "Publication Enrichment" disponible al web del *Yeastmine* (<http://yeastmine.yeastgenome.org/yeastmine/begin.do>) trobem coincidències importants entre el llistat d'aquests 257 gens induïts a qualsevol moment del tractament amb doxiciclina i els identificats a alguns experiments, com s'especifiquen a la taula 5:

Publicació	valor p	Coincidències	FunCat (valor p)
Genetic and Comparative Transcriptome Analysis of Bromodomain Factor 1 in the Salt Stress Response of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . (X. Liu et al., 2007)	e-34	56	32.01.01 Resposta a estrès oxidatiu (e-8)
Identifying gene regulatory modules of heat shock response in yeast. (Wu & Li, 2008)	e-26	50	32.01 Resposta a estrès (e-10)

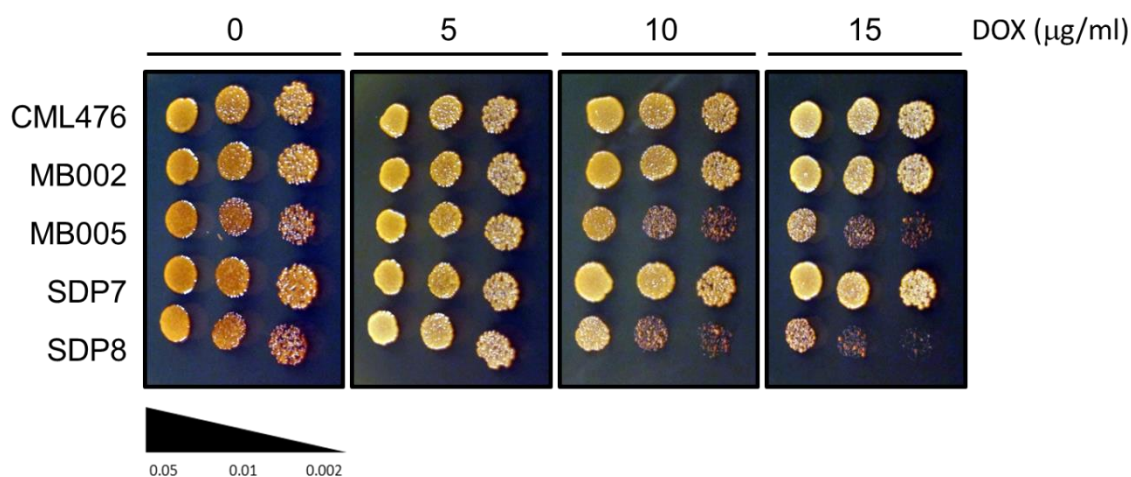
Role of transcriptional regulation in controlling fluxes in central carbon metabolism of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . A chemostat culture study. (Daran-Lapujade et al., 2004)	e-22	50	32.01 Resposta a estrès (e-10)
Response of genes associated with mitochondrial function to mild heat stress in yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . (Sakaki et al., 2003)	e-21	35	32.01 Resposta a estrès (e-10)
Induction of global stress response in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cells lacking telomerase. (Teng et al., 2002)	e-20	28	32 Rescat, defensa i virulència de la cèl·lula (e-4)
Global gene expression during short-term ethanol stress in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . (Alexandre et al., 2001)	e-15	24	02 ENERGIA (e-10)
Quantitative transcription dynamic analysis reveals candidate genes and key regulators for ethanol tolerance in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . (Ma & Liu, 2010)	e-14	29	02 ENERGIA (e-14)
Differentiating mechanisms of toxicity using global gene expression analysis in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . (Caba et al., 2005)	e-14	18	34.11.03.13 Osmodetecció i resposta (e-3)
Transcriptional, proteomic, and metabolic responses to lithium in galactose-grown yeast cells. (Bro et al., 2003)	e-14	30	02 ENERGIA (e-16)
Transcriptional regulation of fermentative and respiratory metabolism in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> industrial bakers' strains. (Dueñas-Sánchez et al., 2012)	e-14	28	01.05 Metabolisme del carbohidrats i compostos de carboni (e-13)
Extreme calorie restriction and energy source starvation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> represent distinct physiological states. (Boender et al.,	e-13	20	14.01 Estabilització i plegament de proteïnes

2011)			(e-7)
Ixr1p and the control of the <i>Saccharomyces cerevisiae</i> hypoxic response. (Vizoso-Vázquez et al., 2012)	e-13	43	32 Rescat, defensa i virulència de la cèl·lula (e-9)

**Taula 5. Llistat de publicacions on es descriuen experiments en els que s'indueixen gens semblants als 257 gens induïts per la deleció de Pkh, segons el *Yeastmine*.** La columna del Valor p indica el grau de significació amb les coincidències entre el 257 gens induïts i els gens induïts per a cada publicació; la columna titulada com a Coincidències, indica el nombre gens que es troben tant en llistat de gens induïts de la publicació corresponent com en els 257 gens que s'han trobat induït per la deleció de Pkh. La columna de FunCat indica la categoria funcional més rellevant en que es troben aquests gens induïts.

Dels 257 gens induïts en qualsevol dels moments de tractament amb doxiciclina, hem trobat coincidències principalment amb aquells gens que s'expressen en diferents condicions d'estrès, ja sigui per temperatura (Wu & Li, 2008); per falta de fons de carboni (Daran-Lapujade et al., 2004); per estrès salí (K. Liu et al., 2005), entre d'altres (veure taula 5). Tenint en compte aquests experiments realitzats per diversos autors, hem pogut comprovar com la resposta transcripcional en una soca sense activitat Pkh és típicament una resposta d'estrès, ja que dels 182 gens que es troben induïts per estrès tèrmic (Wu & Li, 2008), 43 es troben representats en aquests 257 gens induïts, sis vegades més del que s'esperaria, en resposta a manca de Pkh. Un fet semblant s'observa en el cas d'una resposta transcripcional per falta de diferents fonts de carboni com: glucosa, maltosa, etanol i acetat (Daran-Lapujade et al., 2004). La falta de Pkh, fa que s'indueixin part d'aquells gens, en concret 24 dels 257, propis d'una resposta per falta de glucosa i maltosa, sent 10 vegades el nombre esperat. També, s'ha observat una relació amb altres estressos com podria ser l'estrès salí (K. Liu et al., 2005). Dels 144 gens que veuen alterada la seva transcripció en vers un estrès salí, 119 es troben induïts dels quals 40 d'aquests es troben també induïts en una resposta transcripcional per falta de Pkh, representant 8 vegades més dels gens que esperaríem trobar.

A part també observàvem a curt termini la inducció de gens implicats en la síntesis de glicogen, per tal de comprovar aquesta possible acumulació de glicogen en les cèl·lules sense Pkh tractades amb doxiciclina, es van fer créixer les soques WT, MB005 i SDP8 en plaques YPD que contenien diferents concentracions de doxiciclina (Figura 28) i es va realitzar una tinció amb vapors de iode (el qual reacciona amb el glicogen donant un color marró-púrpura). Segons indiquen el resultats de la tinció de iode, les cèl·lules que els manca Pkh sintetitzen més glicogen que el seu WT, tal com podem observar a la figura 28, on les cèl·lules MB005 i SDP8 en presència de 10 i 15 µg/ml de doxiciclina, reaccionen amb el iode donant una coloració marronosa a diferència dels seus respectius controls.

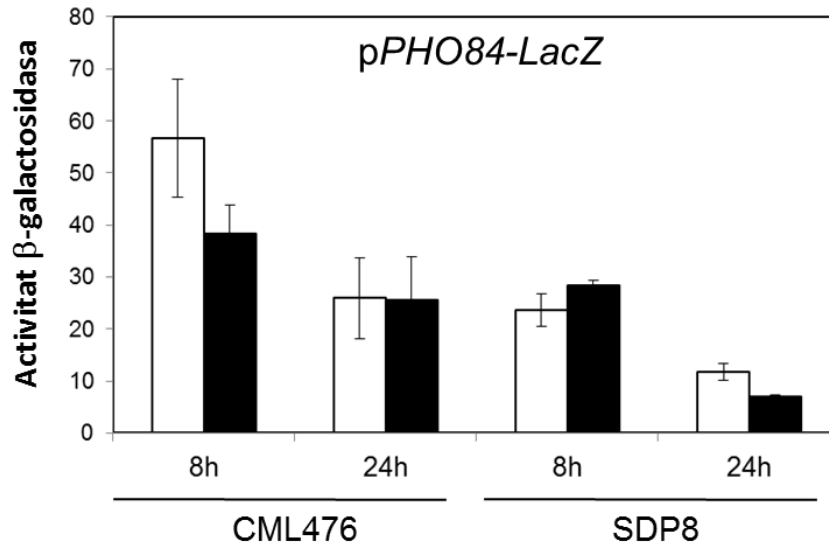


**Figura 28. Les cèl·lules sense Pkh sintetitzen més glicogen.** Els cultius saturats de les soques CML476, MB002, MB005, SDP7 i SDP8 s'han diluït fins una OD<sub>660</sub> del 0.05 i 3 µl de cada dilució seriada 1:5 s'han gotejat en plaques YPD i YPD que conté concentracions baixes de doxiciclina a 5, 10 i 15 µg/ml. Les plaques s'han incubat a 28 °C durant 48 h. Posteriorment s'inverteixen les plaques sobre cristalls de iode segons es descriu en (Posas et al., 1993).

Per tant, totes aquestes coincidències entre els 257 gens que hem trobat induïts en resposta a falta de Pkh, fan pensar que SDP8 podria, tenir ja basalment els gens típics d'una resposta a estrès, tant a xoc tèrmic com oxidatiu, induïts, sent Pkh, doncs essencial per la regulació d'aquests estressos. I explicant així la seva gran sensibilitat als estressos per calor i en baixes dosis de doxiciclina (Figura 24).

Pel que fa els 156 gens que trobem reprimits, tal com hem observat, un gran grup pertanyen a gens que codifiquen proteïnes ribosomals (Figura 27, clúster 2). Sch9 i PKA són proteïnes cinases substrats de Pkh, molt importants en el creixement de les cèl·lules del llevat. Es coneix que Sch9 és un activador de l'expressió de proteïnes ribosomals, entre moltes altres funcions (Crauwels et al., 1997; Jorgensen et al., 2002; Pedruzzi et al., 2003; Jorgensen et al., 2004; Pascual-Ahuir & Proft, 2007). Partint d'aquests coneixements podríem explicar perquè es dona la repressió d'aquests gens ribosomals a les cèl·lules que tenen la Pkh deletada, i és que la via Pkh-Sch9 no es trobaria activa i el mateix podria estar passant amb el cas de PKA. Se sap, però, que tant Sch9 com PKA, poden ser activades pel complex mTOR, per la qual cosa podria tractar-se més d'una resposta a estrès que d'una falta d'activació de la via, ja que la síntesi de proteïnes ribosomal sol donar-se en condicions òptimes de creixement. Per tant, si la manca de Pkh simula una situació d'estrès, induint-se gens de resposta a estrès, la cèl·lula deixaria de sintetitzar aquells gens no essencials per la supervivència, entre els quals hi trobem els de les proteïnes ribosomals.

De la mateixa manera, observem que un altre grup majoritari de gens que es veuen reprimits com a resposta a la falta de Pkh tant a curt com a llarg termini, són aquells implicats en el transport d'ions, com és el cas del gen *PHO84*, l'expressió del qual disminueix fins a 0.34 i 0.11 vegades a les 8 i 24 h de tractament amb doxiciclina, respectivament, quan comparem la soca SDP8 amb el corresponent WT. Per tal de verificar aquest fet per un mètode independent, s'han transformat les soques WT CML476 i SDP8 amb un plasmidi que conté el promotor del gen *PHO84* fusionat al gen reporter de la  $\beta$ -galactosidasa (Serrano et al., 2002). L'assaig  $\beta$ -galactosidasa que es mostra a la figura 29, indica que la falta de Pkh reprimeix l'activitat del promotor *PHO84* comparat amb la soca WT, suggerint que la via Pkh està implicada en la regulació d'aquest gen i, probablement, en la resta de gens implicats en el transport d'ions. Recentment, s'ha relacionat la via de PKA amb l'homeòstasi del fosfat, com a via que s'activa quan la cèl·lula detecta la presència de fosfat en el medi (Mouillon & Persson, 2006; Johan M Thevelein et al., 2008).



**Figura 29. Efecte de l'absència de l'activitat Pkh en la resposta transcripcional del gen *PHO84*.** Les soques CML476 i SDP8, es van transformar amb el plasmidi reporter p*PHO84-LacZ* i posteriorment es va determinar la seva activitat β-galactosidasa en presència de doxiciclina (barres negres) i en absència d'aquesta (barres blanques) a les 8 h i 24 h. Els resultats mostrats són la mitjana ± SEM de tres valors independents. El resultat es mostra en unitats de Miller.

### 1.5. L'absència d'activitat Pkh efecte la resposta transcripcional al xoc tèrmic.

Segons el resultat de l'apartat anterior sembla possible que Pkh sigui important per la regulació, directament o indirecta, de la transcripció de gens implicats en la resposta a estrès tèrmic. Per tal d'estudiar una possible funció de les cinases Pkh com a mediadors de la resposta transcripcional envers el xoc tèrmic vam decidir identificar els canvis transcripcionals provocats per un xoc tèrmic de 40 °C durant 40 min en les cèl·lules SDP8 i comparar-lo amb el provocat en cèl·lules WT CML476, després de 24 h de tractament de les dues soques amb doxiciclina.

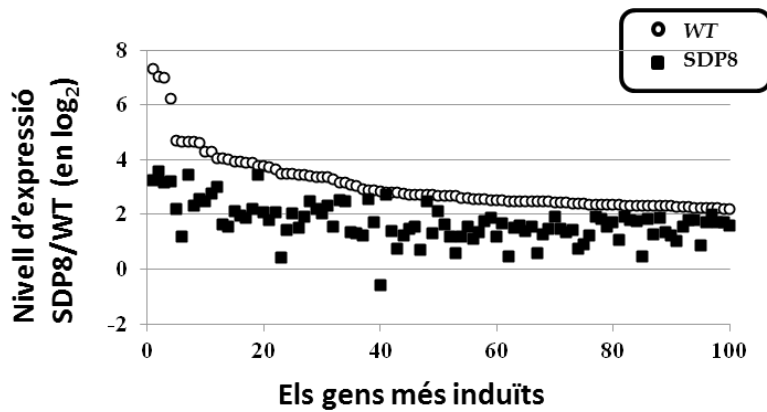
El disseny de l'experiment va ser el següent:

Xip 1 i 2: SDP8\_40 °C Dox vs SDP8\_28 °C Dox

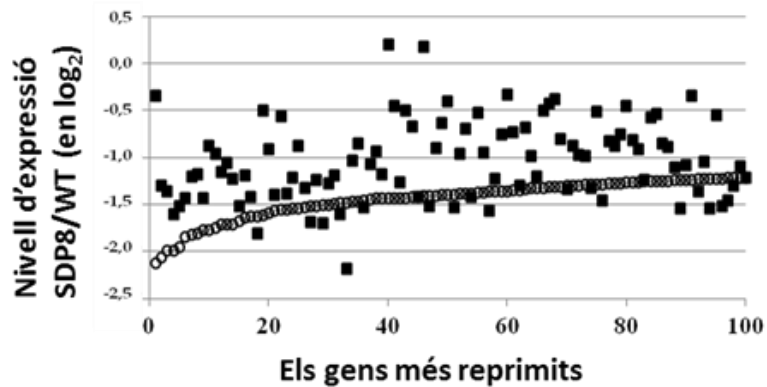
Xip 3 i 4: WT\_40 °C Dox vs WT\_28 °C Dox

Els resultats obtinguts ens van permetre observar que la manca de Pkh reduïa el nombre de gens l'expressió dels quals consideraven canviada (induits o reprimits) per xoc tèrmic, és a dir, la manca de Pkh provocava una atenuació global de la resposta transcripcional (Figura 30).

A)



B)



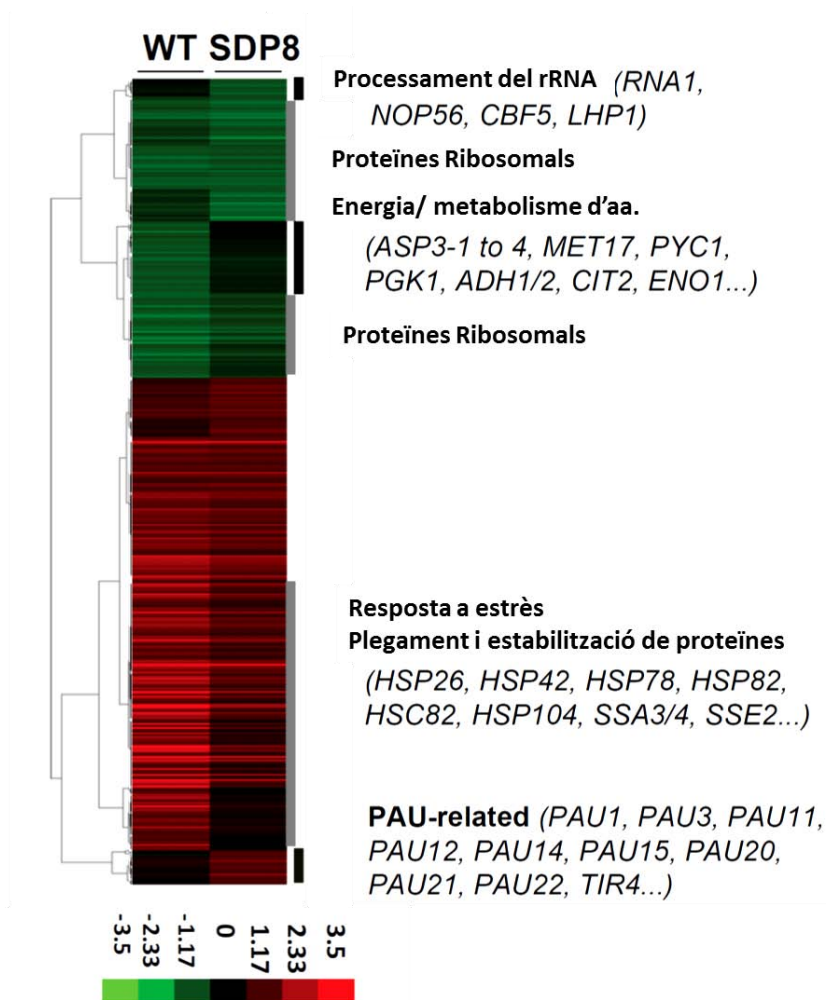
**Figura 30.** Els canvis transcripcionals causats per un xoc tèrmic són atenuats en les cèl·lules que els hi manca l'activitat Pkh. A) Els gràfics representen els valors d'expressió (en base log<sub>2</sub>) dels 100 gens més induïts, després d'un xoc tèrmic, en les cèl·lules WT tractades amb doxiciclina i el corresponent valor dels mateixos gens en la soca SDP8 sota les mateixes condicions. B) La mateixa representació gràfica dels 100 gens més reprimits després del xoc tèrmic en les cèl·lules WT tractades amb doxiciclina i els valors corresponents dels mateixos gens en la soca SDP8 tractada sota les mateixes condicions.

El nombre de gens considerats diferencialment expressats, en almenys una de les soques, després d'un xoc tèrmic és de 802 gens (Figura 31). Dels 433 gens induïts en les cèl·lules WT, 193 (44.6%) són Pkh dependents. Entre ells trobem diverses

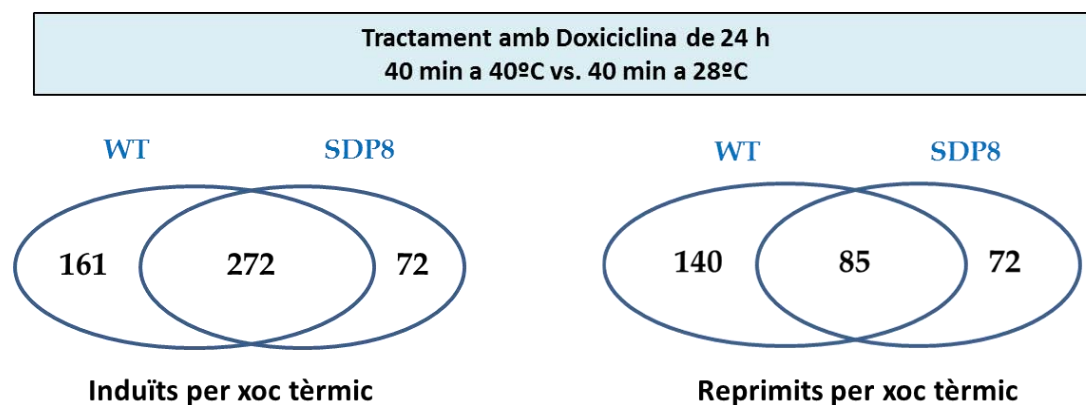


categories funcionals rellevants. Per exemple, hem trobat 39 gens involucrats en la resposta a estrès (valor p 6.61e-10) que es troben induïts de manera dependent de Pkh, però només 15 es troben induïts de manera independent de Pkh (valor p 5.76e-01). Similar a aquest cas, gens involucrats en el plegament i estabilització de proteïnes es troben sobre-representats en el grup de gens induïts dependents de Pkh (18 gens, valor p 1.59e-10, Figura 31A) quan ho comparem amb el 6 gens que es troben induïts independentment de Pkh (valor p 9.69e-02). Entre el conjunt de gens reprimits, 78 (34.7%) van mostrar algun grau de dependència a Pkh, com ara els que participen en el metabolisme d'aminoàcids (valor p 8.95e-08). Els 74 gens que codifiquen per proteïnes ribosomals es regulen de manera independent de Pkh, així com també els 89 gens reprimits que codifiquen per les proteïnes ribosomals implicades en la regulació d'un xoc tèrmic (Figura 31A).

A)



B)



**Figura 31. La resposta transcripcional a un xoc tèrmic requereix d'activitat Pkh.** A) L'expressió de les cèl·lules WT CML476 i SDP8 tractades amb doxiciclina durant 24 h i incubades a 40 °C durant 40 min s'ha comparat a l'expressió d'ambdós soques sense ser tractades. Un grup de 802 gens amb dades en ambdues soques i que mostren expressió diferencial en almenys en una de les soques s'han agrupat jeràrquicament (*complete linkage clustering, uncentered correlation*) fent servir el programari de clúster (v 2.11) (Eisen et al., 1998) i es van visualitzar amb Java TreeView (v 1.1.5r2) (Saldanha, 2004). Es mostren, també les categories funcionals més rellevants d'alguns dels clústers. B) Diagrama de Benn dels gens considerats induïts (a l'esquerra) i reprimits (a la dreta) sota un xoc tèrmic en les soques WT i SDP8.

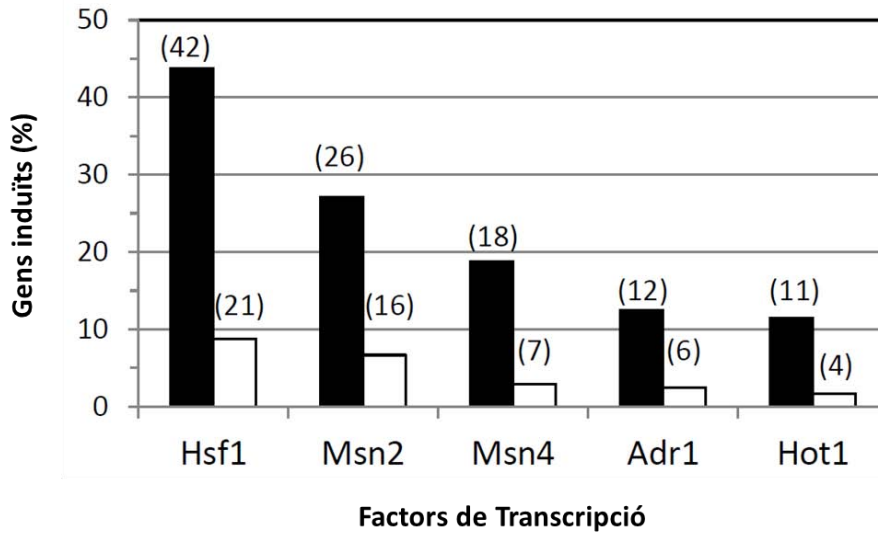
Cal destacar la presència de gens amb els nivells d'expressió alterats després de rebre un xoc tèrmic en les cèl·lules SDP8, però no en les cèl·lules WT. Per exemple un excés de la família multigènica seripauperina (gens *PAU*) codificada principalment per regions subtelmèriques, es troba induïda en resposta a un xoc tèrmic en les cèl·lules SDP8 (Figura 31A). De la mateixa manera, els nivells de mRNA d'un grup de gens involucrats en la maduració del rRNA són reprimits després del xoc tèrmic en les cèl·lules SDP8, però no en les cèl·lules WT (Figura 31A).

En conjunt les dades anteriors indiquen que Pkh és un mediador essencial de la transcripció provocada per un estrès tèrmic.

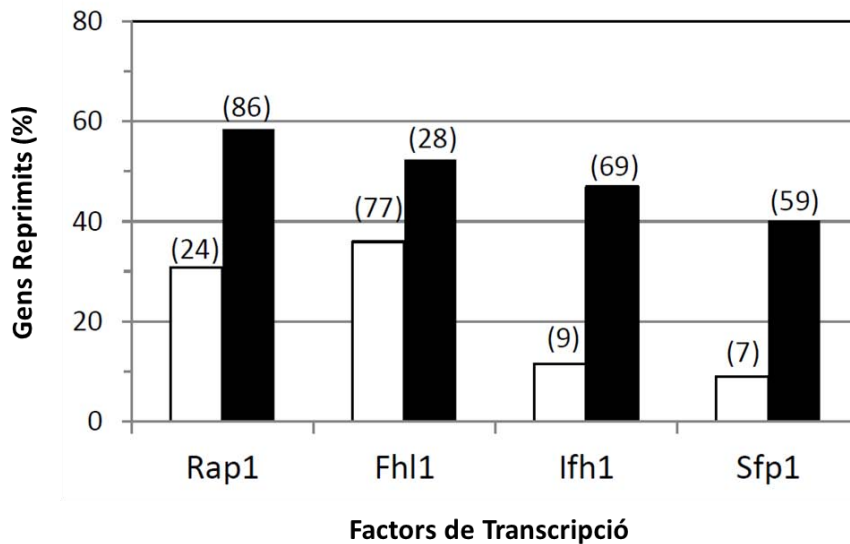
## 1.6. Les proteïnes Pkh són importants per la regulació dels factors de transcripció Hsf1 i Msn2/Msn4 després d'un estrès tèrmic.

Les cèl·lules del llevats responen a un xoc tèrmic modificant l'expressió dels gens. En la regulació d'un xoc tèrmic si troben implicats entre una dotzena de factors de transcripció (Wu & Li, 2008), així com el factor conservat de xoc tèrmic (Hsf1) i el factor de resposta general a estrès Msn2/Msn4, responsables de gairebé la totalitat de la resposta a xoc tèrmic (veure (Morano et al., 2012)), encara que altres factors de transcripció són també importants. Per tal d'investigar perquè les proteïnes Pkh són importants per una resposta normal a estrès tèrmic, hem identificat els factors de transcripció més abundants que regulen els gens induïts de manera dependent de Pkh, però no de manera independent. Dels 96 gens induïts de manera dependent de Pkh (TD+SD), 42 (43.8%) són dianes per Hsf1, 26 (27.1%) dianes per Msn2 i 18 (18.8%) per Msn4. Hi ha 34 gens (35.4%) que són dianes per la combinació Msn2 i Msn4, i 23 gens, que corresponen principalment a la categoria de resposta a l'estrès, i que són dianes simultànies pels tres factors de transcripció (*APJ1*, *GAC1*, *HSP12*, *HSP26*, *HSP30*, *HSP42*, *HSP82*, *HSP78*, *HSP104*, *MDJ1*, *MGA1*, *SIS1*, *SSA4*, *TSL1* i *XBP1*; valor  $p$   $7.76e-10$ ). Pel contrari, del 240 gens induïts de manera independent de Pkh, 21 (8.8%) són dianes per Hsf1, 16 (6.7%) per Msn2 i 7 (2.9%) per Msn4. Només 30 d'aquests gens (12.5%) són dianes per la combinació de Msn2 i Msn4 (Figura 32A). A més, hem trobat que Rap1, Ste2, Fhl 1, Ifh1 i Sfp1 són els factors de transcripció més importants per la repressió dels gens en un xoc tèrmic de manera independent de Pkh. Només un 10-20%, aproximadament, dels gens reprimits regulats per aquests factors de transcripció són dependents de Pkh (TD+SD+WD) (Figura 32B). És interessant dir, que aquest grup de factors de transcripció són els responsables de la transcripció de les proteïnes ribosomals, que hem trobat regulades independentment de Pkh (Figura 31A).

A)



B)



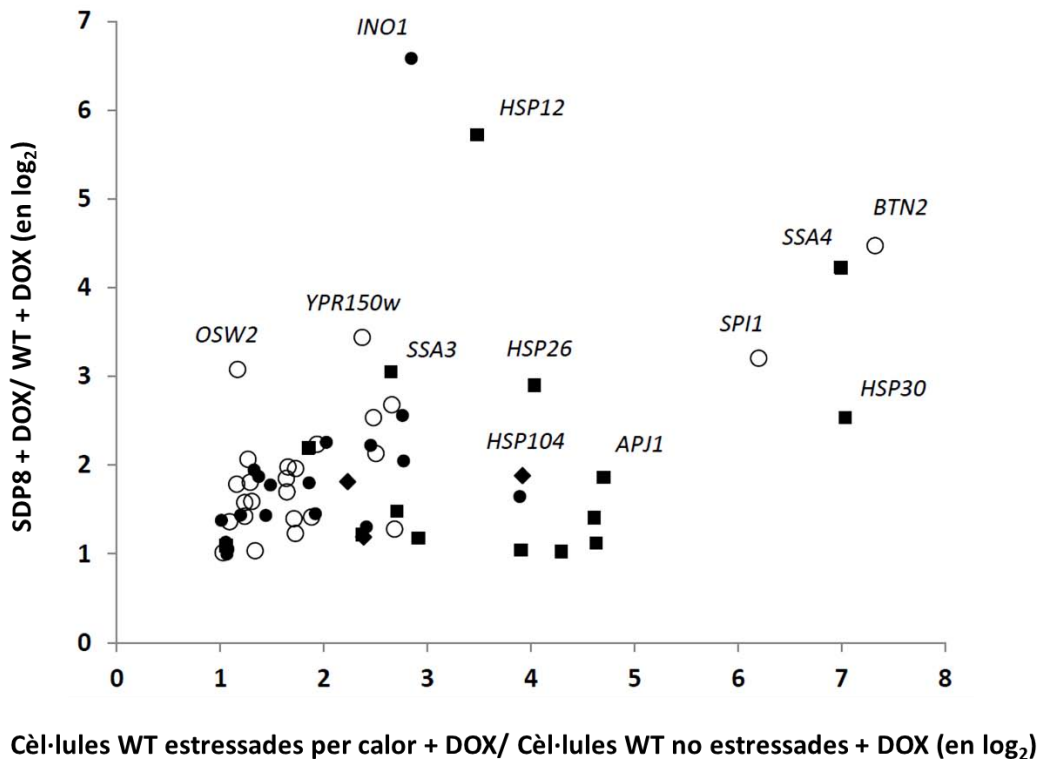
**Figura 32. Factors de transcripció que es veuen afectats per la falta d'activitat Pkh sota un xoc tèrmic.**  
 A) Grup de gens considerats induïts per l'incubació a 40 °C durant 40 min en les cèl·lules WT. Aquests s'han escanejat per tal de documentar els factors de transcripció reguladors en la base de dades YEASTRACT. El gràfic representa el percentatge dels gens regulats per aquests factors de transcripció respecte el total de gens induïts de manera dependent de Pkh (96 gens TD+SD, barres negres) o bé de manera independent de Pkh (240 gens, barres blanques) per aquells factors de transcripció amb 10 o més gens diana en almenys una circumstància. Només es mostren aquells amb un percentatge Pkh dependent vs Pkh independent igual o superior a 4. B) El grup de gens reprimits en les mateixes condicions descrites s'han analitzat segon s'explica en l'apartat a. El gràfic representa el percentatge dels gens regulats per aquests factors de transcripció respecte el total de gens reprimits de manera dependent de Pkh (78 gens TD+SD+WD, barres negres) o bé de manera independent de Pkh (147 gens, barres blanques) per aquells factors de transcripció amb 10 o més gens diana en almenys una circumstància. Només es mostren aquells amb un percentatge Pkh dependent vs Pkh independent igual o superior a 1.45.

Segons aquestes anàlisis de les dades, podem concloure que les proteïnes Pkh són importants per la inducció dels gens involucrats en el plegament de proteïnes i la resposta a l'estrès regulat pels factors de transcripció Hsf1 i Msn2/Msn4 i que la temperatura indueix la repressió d'un conjunt de gens que codifiquen per proteïnes ribosomals, els quals no requereixen d'activitat Pkh.

Durant la realització d'aquest estudi, es van publicar els perfils transcripcionals de les cèl·lules que els manca *pkh1* o bé *pkh3* (van Wageningen et al., 2010). La supressió d'aquests gens produïa uns canvis transcripcionals molt mínims (es van observar canvis en l'expressió de 3 i 5 gens, respectivament, d'acord amb els nostres criteris). Experiments similars duts a terme pel nostre laboratori mostraven que la falta de *PKH3* no efecte la transcripció de les cèl·lules, excepte per la pròpia transcripció de *PKH3* (dades no publicades). Els petits o canvis transcripcionals similars resultants de la falta de *pkh1* o *pkh3* contrasten amb els 228 i 140 gens que hem identificat en el present estudi com a gens induïts o reprimits, respectivament, quan les tres proteïnes Pkh estan absents. A més, també hem trobat que la deleció de les tres isoformes millora els fenotips del doble mutant MB005. Per tant, es pot concloure que les isoformes de Pkh juguen un paper redundant en algunes funcions clau.

Alguns dels canvis transcripcionals induïts per la falta de Pkh són realment evidents en la soca SDP8 després de les 8 h de tractament amb doxiciclina. En aquest temps, hem trobat una inducció d'aquells gens que es troben implicats en la síntesis de glicogen i trehalosa, els quals es mantenen després de les 24 h de tractament amb l'antibiòtic. S'ha observat prèviament que aquesta resposta a alguns estressos és duta a terme pels factors de transcripció Msn2/Msn4 (Parrou et al., 1997). És interessant dir, que entre els gens que es veuen sobreexpressats en falta de Pkh (tant pel que fa a les 8 com les 24 h de tractament amb doxiciclina), hi hem trobat membres del reguló de ferro, el qual podria indicar la possible disrupció del metabolisme del ferro en *S. cerevisiae* quan les proteïnes Pkh no hi són. A llarg termini la falta de Pkh incrementa específicament els nivells dels mRNAs necessaris per la resposta a l'estrès tant si és un estrès per calor com un estrès oxidatiu.

L'anàlisi del perfil transcripcional de les cèl·lules SDP8 incubades amb presència de doxiciclina durant 24 h mostra similituds en la resposta provocada per un estrès tèrmic, com es mostra en aquest estudi. Entre els gens induïts per la falta de Pkh hi ha 61 gens que també es veuen induïts en la soca WT tractada a 40 °C durant 40 min (a 3.6 vegades més de l'esperat). Molts d'aquests gens estan implicats en el plegaments i estabilització de proteïnes així com passa en una resposta a estrès. De fet, 17 d'aquests gens estan directament implicats en la resposta a estrès per xoc tèrmic (Figura 33). També trobem unes 3.85 vegades més reprimits els gens en les cèl·lules WT en els experiments de xoc tèrmic i en els de falta d'activitat Pkh. Aquests canvis transcriptòmics provocats per la falta de Pkh són també similars per aquells provocats per estressos tèrmics, com s'ha vist a diferents estudis (Sakaki et al., 2003; Wu & Li, 2008).



**Figura 33. Semblances entre les respostes transcripcionals que es donen durant un estrès tèrmic i la falta de Pkh.** Es mostren el grup de gens, l'expressió dels quals es troben induïts després de 24 h de tractament amb doxiciclina en les cèl·lules SDP8 i els induïts en les cèl·lules WT després de una xoc tèrmic (40 °C durant 40 min) amb doxiciclina. Les categories funcionals estan representades per símbols: plegament de proteïnes (■); metabolisme i regulació dels carbohidrats (●); plegament de proteïnes i metabolisme dels carbohidrats (◆) i altres funcions (○).

Les proteïnes Pkh també es troben associades en l'adaptació a l'estrès tèrmic de diferents maneres. Primera, estar descrit que l'activitat cinasa de Pkh incrementa en front a un estrès tèrmic (Luo et al., 2008). Segona, Pil1 i Lsp1, dos components dels eisosomes importants per la tolerància a l'estrès tèrmic (Robert C Dickson et al., 2006), són fosforilats per Pkh sota condicions d'estrès tèrmic (Luo et al., 2008). I tercera, el domini PH de les proteïnes Slm1 i Slm2, reguladores del citoesquelet d'actina en resposta a estrès, són també substrats de l'activitat Pkh sota condicions d'estrès tèrmic (Daquinag et al., 2007). A més les cèl·lules sense activitat Pkh són hipersensibles a la incubació a 37 °C (Figura 24). Per tant, era d'interès determinar si l'estrès per calor tenia efectes en la resposta transcripcional en les cèl·lules que no tenen activitat Pkh. Els nostres resultats indiquen que la manca de Pkh atenua la resposta transcripcional al xoc tèrmic (Figura 30). Aquesta atenuació és majoritàriament dirigida pels factors de transcripció Hsf1 i Msn2/Msn4 (Figura 32), els quals són els dos principals reguladors dels canvis d'expressió en front a un estrès. Hsf1 s'uneix al promotor de l'element de xoc tèrmic (HSE) el qual es troba a la regió promotora de la majoria dels gens implicats en la resposta a un xoc tèrmic. En canvi, els factors de transcripció, Msn2/Msn4, duen a terme la resposta en una ampla gamma d'estressos unint-se a l'element de resposta a estrès (STRE). Les proteïnes controlades per Pkh, com Slr2 i Tpk (PKA), són importants en la regulació de la resposta transcripcional a un estrès per calor. Mentre la cinasa Slr2 és necessària per la regulació transcripcional a través d'una resposta general dels factors de transcripció Msn2/Msn4 (García et al., 2004), Tpk es requereix per una resposta cel·lular a un estrès tèrmic mediat per Hsf1 i Msn2/Msn4 (P. Lee et al., 2008). Els esfingolípids són, també mediadors de les respostes cel·lulars a un estrès per calor per part dels factors de transcripció Hsf1 i Msn2/Msn4 (Sylvie Friant et al., 2003). Cal tenir present també, la possibilitat que part de l'atenuació que s'observa per l'absència de Pkh, en front a un xoc tèrmic, pot ser deguda a que en absència de Pkh ja existeixi una sobreexpressió dels gens relacionats amb estrès, per tant els gens d'estrès podrien no activar-se tant com en la soca WT, on no es troben basalment activats.

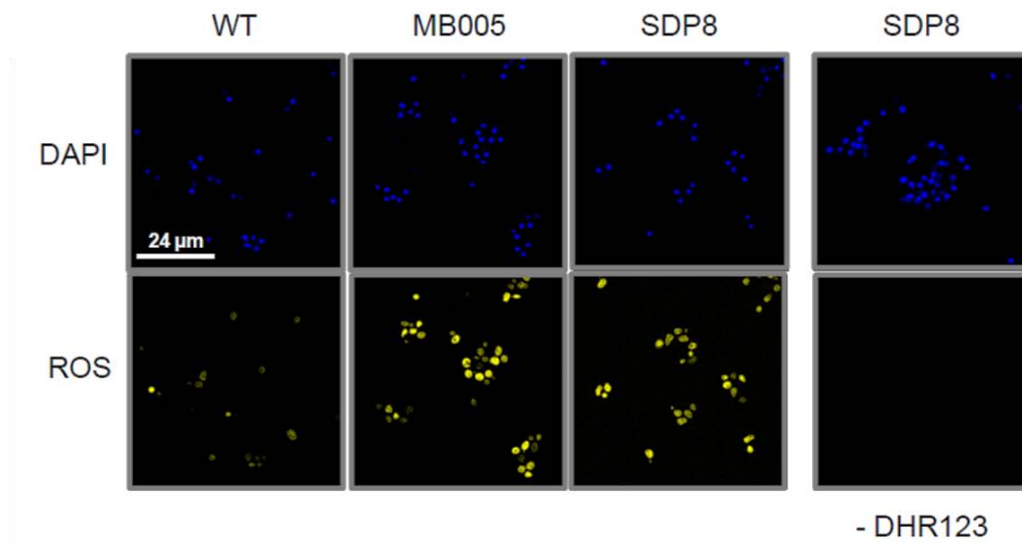
Per tant, el fet d'observar en els nostres experiments de microarrays que la falta de Pkh té efectes dependents de la transcripció de Hsf1 i Msn2/Msn4 concorda amb els estudis previs on s'implica, PKA, *upstream* i la via dels esfingolípid *downstream*.

### **1.7. Les cèl·lules sense activitat Pkh acumulen espècies reactives d'oxigen (ROS).**

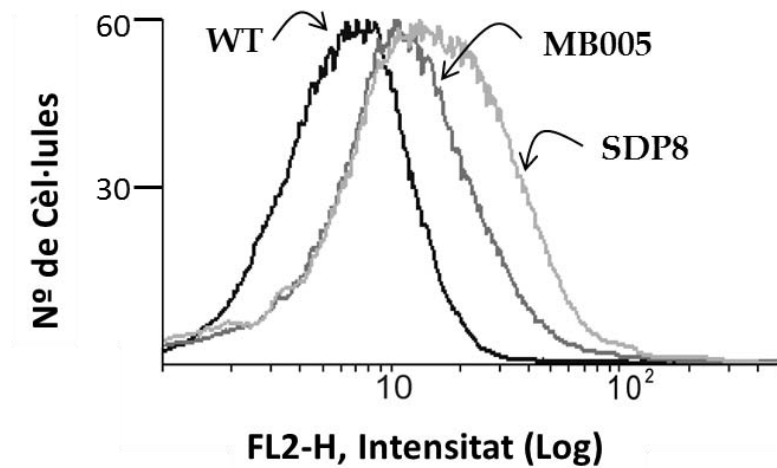
Les dades obtingudes a partir dels experiments de microarrays de DNA de les cèl·lules sense activitat Pkh són consistents amb la hipòtesis que la falta de Pkh pot desencadenar un estrès oxidatiu. Per tal de comprovar aquesta hipòtesis, les cèl·lules de la soca WT, MB005 i SDP8 s'han tractat amb doxiciclina durant 24 h i després incubat amb dihidrorodamina-1,2,3, per tal d'observar la generació de ROS a través d'un microscopi de fluorescència. El senyal de fluorescència s'ha quantificat per citometria de flux. Tal com es mostra a la figura 34A, les cèl·lules MB005 i SDP8 mostren una major intensitat de fluorescència que les cèl·lules WT CML476. L'anàlisi per citometria de flux revela que la quantitat de ROS en les cèl·lules MB005 és més elevada que en les cèl·lules WT i que l'addició de la falta de l'activitat Pkh3 incrementa l'aparició de les espècies reactives d'oxigen, ja que les cèl·lules SDP8 produeixen una senyal molt més intensa que la de les cèl·lules MB005 (Figura 34B). Aquests resultats també estant recolzats per la quantificació de la tinció d'almenys 200 cèl·lules individuals per cada soca amb l'analitzador d'imatge Wasabi (Hamamatsu v.1.5, les dades no es mostren). Per tant podem concloure que la falta de Pkh indueix l'acumulació de ROS.



A)



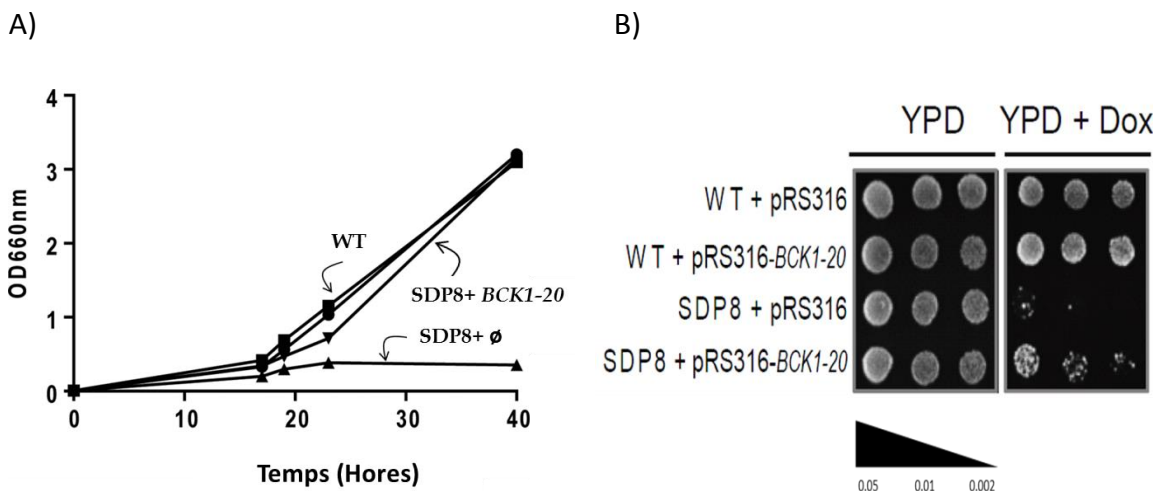
B)



**Figura 34. La falta d'activitat Pkh indueix estrès oxidatiu en *S. cerevisiae*.** A) La línia cel·lular CML476 i les seves derivades, MB005 i SDP8, han sigut tractades amb doxiciclina durant 24 h i marcades amb dihidrodamina 1,2,3 (DHR 123) durant 1 h. ROS oxida DHR 123 produint un derivat fluorescent, rodamina 123, la qual pot ser visualitzada amb un microscopi de fluorescència. La fluorescència de les cèl·lules SDP8 sense tractar amb DHR es mostra com a control (-DHR 123). Els nuclis també s'ha visualitzat per tinció de DAPI. Es mostra un camp representatiu per cada soca indicada. La barra blanca equival a 24 µm. B) Es mostra el perfil de FACS pel WT (línia negra), per MB005 (línia gris fosc) i per les cèl·lules SDP8 (línia gris clar). Les soques i els tractaments descrits a l'apartat a) s'han utilitzat per quantificar la intensitat de senyal de ROS per FAC *sorting*. S'han comptat deu mil cèl·lules, i la intensitat en el canal FL2 estar representat en escala logarítmica.

### 1.8. L'activació de la via Slt2 MAPK redueix l'estrès oxidatiu de les cèl·lules sense activitat Pkh.

Les proteïnes Pkh fosforilen i activen els membres de les proteïnes AGC cinases, en llevat. Així com la família Sch9, Ypk1/Ypk2, Trk1-3 i Pkc1. Estar ben demostrat que Pkc1 es requereix per la supervivència i per l'adaptació a un estrès oxidatiu provocat per diferents agents oxidants (Vilella et al., 2005). Pkc1 fosforila i activa directament Bck1, la MAPKKK de la via Slt2-MAPKs, així activa la via de la CWI. Nosaltres ens preguntàvem si l'estat d'estrès oxidatiu causat per la falta d'activitat Pkh podria ser conseqüència d'un defecte de l'activació de la via Pkc1-Slt2 o, contràriament era independent d'aquesta via. Per tal de respondre aquesta pregunta, vam expressar l'al·lel constitutivament actiu, *BCK1-20*, de Bck1 que fa que Slt2 estigui activada (K. S. Lee & Levin, 1992), en ambdues soques, WT CML476 i SDP8. Tal com es mostra en la figura 35A i B, l'activació de la via Slt2 no té efecte en el creixement de les cèl·lules WT en presència de doxiciclina. En canvi, el defecte en el creixement de les cèl·lules SDP8 en presència de doxiciclina és parcialment eliminat per l'activació de la via Slt2 tant en medi líquid com en medi sòlid, indicant que la falta d'activitat Pkh és letal degut, al menys, al seu paper en l'activació de la via de la MAPK Slt2.

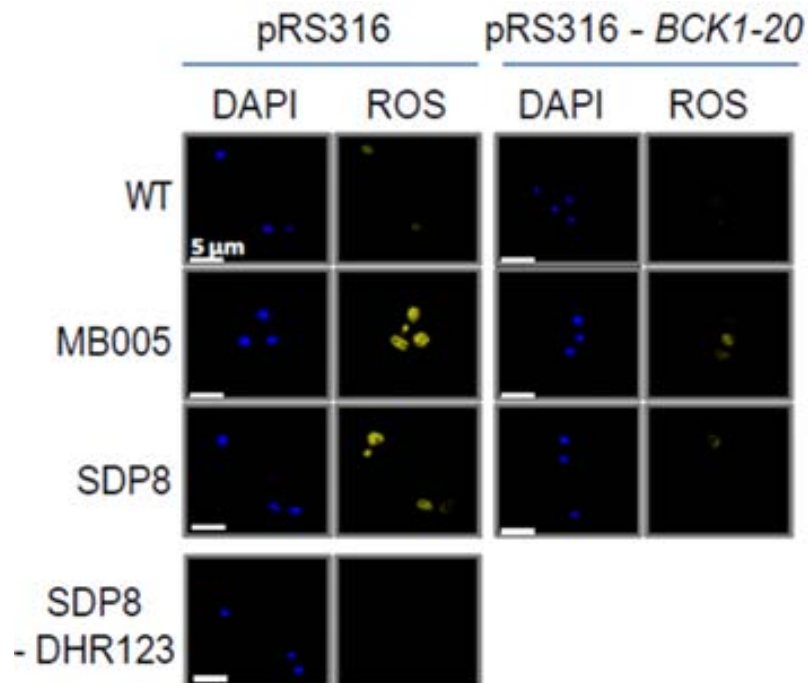


**Figura 35. La sobreexpressió de l'al·lel *BCK1-20* atenua els defectes en el creixement per la falta de Pkh.** A) Els cultius saturats de la soca WT amb el plasmidi buit o bé amb el plasmidi pRS316-*BCK1-20* i la soca SDP8 que porta el plasmidi buit o bé el pRS316-*BCK1-20* s'han diluït a OD<sub>660</sub> 0.05 en medi YPD que conté doxiciclina a una concentració final de 100 µg/ml. Els cultius s'han deixat créixer 8 h i han sigut diluïts a OD<sub>660</sub> 0.01 on s'ha afegit antibiòtic fresc (temps 0 h). S'ha afegit doxiciclina tant a les 16 h com

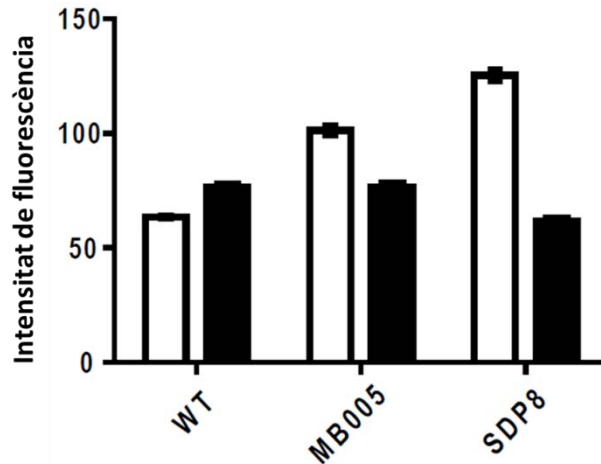
en les 26 h després de la dilució. La OD dels cultius a 660 nm s'ha mesurat en els diferents temps indicats. B) Les soques descrites s'han gotejat en plaques YPD en absència o presència de 100 µg/ml de doxiciclina. Les plaques s'han incubat durant 4 dies a 28 °C.

A continuació ens preguntem, doncs, si l'estrès oxidatiu detectat en les cèl·lules que els falta Pkh també és degut als efectes *downstream* de Pkc1. Per això, es fa una tinció de ROS, on podem observar, tant en la tinció com en la quantificació de ROS, que ambdues soques, MB005 i SDP8, les quals contenen l'al·lel *BCK1-20* mostren un decreixement notable de la quantitat de ROS comparat amb les mateixes soques que porten el plasmidi buit (Figura 36A i B). Analitzant junts aquests dos resultats, suggereixen que l'activació de la via MAPK Bck1-Slt2 suprimeix parcialment els defectes en el creixement i l'acumulació de ROS causada per la falta d'activitat Pkh.

A)



B)



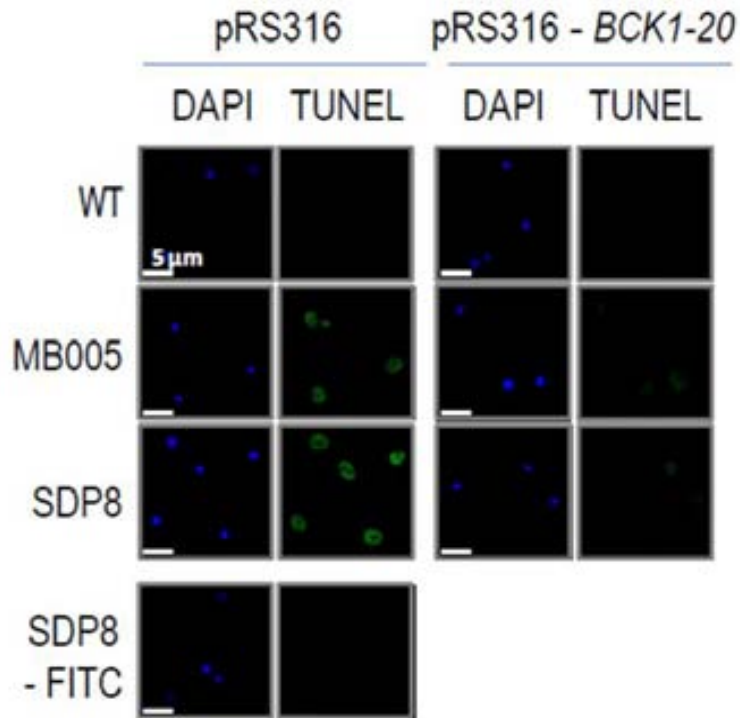
**Figura 36. La sobreexpressió de l'al·lel *BCK1-20* fa disminuir els nivells de ROS en les soques sense activitat Pkh.** A) Els camps representatius mostren les cèl·lules de les soques descrites en 27A, recollides després del tractament de 24 h amb doxiciclina (100 µg/ml) en medi YPD i incubades amb DHR 123, per tal de visualitzar ROS. La fluorescència de les cèl·lules SDP8 amb el plasmidi buit i sense tractar amb DHR es mostra com a control (-DHR 123). La barra blanca equival a 5 µm. B) Es mostra la quantificació per citometria de flux del senyal de fluorescència intracel·lular procedent de les soques WT, MB005 i SDP8, les quals porten o bé el plasmidi pRS316 buit (barres blanques) o bé l'al·lel *BCK1-20* (barres negres). Els cultius són tractats com c), i es mostra la mitjana ± SD de la intensitat de la senyal procedent de 10<sup>4</sup> cèl·lules per cada soca procedent d'un experiment representatiu. Els resultats són corregits per l'autofluorescència de les cèl·lules no marcades amb DHR 123.

### 1.9. La deleció de Pkh induïx mort cel·lular programada de manera dependent de Slt2 i independent de Mca1.

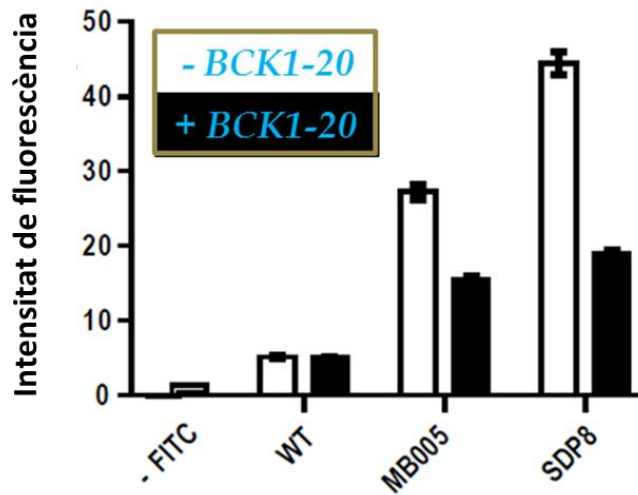
En llevats la presència de ROS pot ser un senyal d'apoptosis per mort cel·lular (F Madeo et al., 1999). Nosaltres hipotetitzem que les ROS detectades en les cèl·lules que els hi manquen les proteïnes Pkh podrien estar activant el procés de mort cel·lular programada. S'han descrit diversos tipus de mort cel·lular programada en metazous, així com apoptosis, autofàgia, catàstrofe mitòtica i mort cel·lular per desadhesió de la matriu extracel·lular o *anoikis* (Kroemer et al., 2005). Encara que s'han identificat una sèrie de formes fisiològiques de l'apoptosi, aquesta també pot ser induïda exògenament. L'acumulació de ROS és un regulador clau, evolutivament conservat, de forma tant exògena com endògena de l'apoptosi (Rockenfeller & Madeo,

2008). Algunes de les característiques clau de l'apoptosi en cèl·lules de mamífer i llevat és la translocació de la fosfatidilserina des de la capa interna de la membrana cel·lular a l'externa, així com l'aparició de fragmentació de DNA. Cal dir, que recentment, en el laboratori de Thorner, han trobat que les proteïnes Ypk1 (substrat de Pkh) estan implicades en la regulació de la flipasa de fosfatidilserina (Roelants et al., 2010), pel que el test comercial de localització de la fosfatidilserina, mitjançant annexina, no hauria de proporcionar resultats fiables. Per tant, es va analitzar la presència de DNA fragmentat en la soca WT CML476 i en les soques de llevat sense activitat Pkh, utilitzant l'assaig de TUNEL. Tal com es mostra a la figura 37A, les cèl·lules MB005 mostren una tinció molt més intensa que les cèl·lules WT. El senyal de la fragmentació del DNA és encara més intensa en les cèl·lules SDP8. En ambdues soques, l'activació de la via Slr2 per part de l'expressió de l'al·lel *BCK1-20* fa decreïxer dràsticament el nombre d'extrems lliures del DNA degradat (Figura 37A i B). Val la pena assenyalar que la senyal mostrada per les cèl·lules SDP8 que porten el plasmidi pRS316 buit no és degut a l'autofluorescència, ja que les cèl·lules que no han estat tractades amb fluoresceïna gairebé no mostren senyal d'acord amb la quantificació per FACS (Figura 37B). El resultat anterior estant d'acord amb la hipòtesi que la manca de Pkh indueix la fragmentació del DNA i que aquest efecte també està condicionat per la falta de l'activació de la cascada de senyalització *downstream* de Pkh-Pkc1.

A)

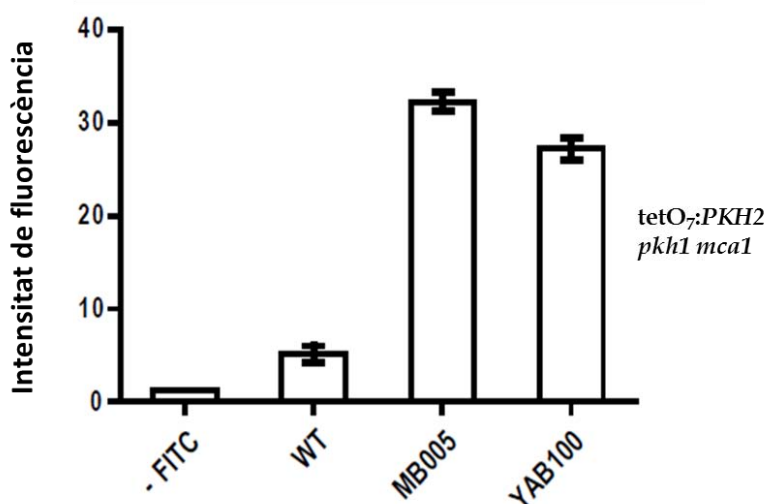


B)



**Figura 37. La manca de Pkh indueix la fragmentació del DNA parcialment dependent de l'activació de la via Slt2 MAPKs.** A) Els cultius procedents de les soques CML476, MB005 i SDP8 que porten el plasmidi pRS316 buit o bé pRS316-*BCK1-20*, es tracten amb 100 µg/ml de doxiciclina durant 24 h en medi YPD, i es realitza un tinció de TUNEL per tal de visualitzar el DNA fragmentat per microscòpia confocal. La barra blanca equival a 5 µm. B) La tinció de TUNEL dels cultius descrits en A) que porten el plasmidi pRS316 buit (barres blanques) o bé pRS316-*BCK1-20* (barres negres) es quantifica per FAC *sorting*, i es representa la intensitat de senyal de FL-H1 amb l'error estàndard. Les mostres marcades com a “-FITC” no s’han incubat amb fluoresceïna, i la seva senyal correspon a l’autofluorescència de les cèl·lules SDP8 que porten el plasmidi pRS316 buit.

Alguns dels estímuls apoptòtics en llevat, incloent el tractament amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Frank Madeo et al., 2002), requereixen de la metacaspasa de llevat, Mca1, per desencadenar el procés apoptòtic, però altres estímuls també poden induir el procés apoptòtic independentment de Mca1 (Wilkinson & Ramsdale, 2011). Per tal d'investigar si el procés de mort cel·lular programada provocada per la falta de Pkh és o no dependent de Mca1, hem eliminat el gen *MCA1* en la soca MB005, generant la soca que hem anomenat YAB100, i n'hem mesurat la fragmentació del DNA després de la seva incubació amb doxiciclina. Tal com es mostra a la figura 38, les cèl·lules MB005 tenen almenys 6 vegades més de fluorescència que les cèl·lules WT. La interrupció addicional de *MCA1* (soca YAB100) encara mostra més o menys 6 vegades més de fluorescència que les cèl·lules WT, és a dir no es veu significativament disminuïda. Per tant aquests resultats ens estan indicant que el procés apoptòtic causat per la falta d'activitat Pkh és parcialment dependent de l'activació de la via MAPK Bck1-Slt2 i que no depèn de la metacaspasa de llevat, Mca1.



**Figura 38. La manca de Pkh indueix la fragmentació del DNA de manera independent de la metacaspasa, Mca1, de llevat.** Els cultius de les soques CML476, MB005 i YAB100 s'han tractat amb 100 µg/ml de doxiciclina durant 24 h en medi YPD i s'han detectat per tinció de TUNEL els extrems lliures causat per la degradació del DNA i s'ha quantificat per citometria. Es representa la intensitat de senyal de FL-H1 amb l'error estàndard de 10<sup>3</sup> cèl·lules de cada soca. Les mostres marcades com a "-FITC" no s'han incubat amb fluoresceïna, i la seva senyal correspon a l'autofluorescència de les cèl·lules MB005.

Tenint en compte tots aquests resultats, hem pogut determinar que les cèl·lules que no tenen activitat Pkh tenen més fragmentació de DNA que la seva soca WT. També hem pogut demostrar que aquest procés apoptòtic causat per la manca de Pkh es dona de manera independent de la metacaspasa de llevat Mca1. Hi ha altres formes d'apoptosis en llevat independents de Mca1 que inclouen, però no es limiten a, l'addició de coure o C2-ceramida al medi. Diferents escenaris fisiològics, com ara l'envelliment i la diferenciació, també induïxen una apoptosi independent de Mca1 (Carmona-Gutierrez et al., 2011; Frank Madeo et al., 2009). Degut a que els esfingolípidis es troben implicats en la regulació de l'apoptosi en el llevat (Aerts et al., 2008; Almeida et al., 2008; Carmona-Gutierrez et al., 2011), les proteïnes Pkh podrien ser importants en la mediació d'aquest procés. Curiosament, la via de senyalització ortòloga en mamífers, PDK1-PKB/Akt és important per bloquejar el procés d'apoptosi (Duronio, 2008).

L'activació de la via Slt2 per l'expressió de l'al·lel *BCK1-20* parcialment rescata la letalitat de les cèl·lules que els hi manca Pkh (Figura 35A i B). L'activació de la via de la CWI també eludeix la presència d'espècies reactives d'oxigen intracel·lulars quan les cèl·lules sense activitat Pkh creixent sota condicions estàndards (Figura 36A i B) i també evita la mort cel·lular programada en aquestes cèl·lules (Figura 37A i B). Per tant, les nostres dades proporcionen evidències que la manca de creixement a causa del procés d'apoptosi en les cèl·lules deficientes en Pkh és causat, almenys en part, per una deficiència de l'activació de la via de la CWI.

Curiosament, estudis anteriors mostren que les cèl·lules deficientes en Slt2 són hipersensibles a ROS, i aquest fenotip es correlaciona amb alts nivells de mort cel·lular programada (Krasley et al., 2006). El procés de mort cel·lular també es dona en resposta a les hormones d'aparellament en absència de la parella de *mating*, en cèl·lules que són deficientes en la via Slt2-MAPK (N.-N. Zhang et al., 2006). A més, també està descrit que l'activació de la via Slt2 rescata les cèl·lules de la mort cel·lular d'un procés induït per ROS dependent de l'isoprenoide, farnesol, les quals no es veuen afectades quan creixen en presència de sorbitol (Fairn et al., 2007). Per tant, el nostre treball està d'acord amb els resultats anteriors i proporciona evidències que el conjunt Pkh-Pkc1-Slt2-MAPK juga un paper important en la resposta a ROS i que la falta de Pkh



desencadena mort cel·lular programada. No obstant això, el nostre treball també posa de manifest el paper de Pkh en l'acumulació de ROS i la fragmentació del DNA. Actualment no està clar que les dianes *downstream* de Pkh mediïn aquests efectes. No obstant això, l'efecte de la falta de Pkh és molt més radical que la falta d'altres cinases més *downstream* de la via de la CWI.

Les noves soques de llevat aquí descrites ens han permès, doncs estudiar el paper de Pkh en absència d'un canvi de temperatura i identificar que té un paper important en la resposta transcripcional a estrès per calor. A més, el nostre treball mostra que la falta de Pkh efecte la transcripció de nombrosos gens implicats en un ampli espectre d'activitats cel·lulars. En particular, es descriu que la manca de Pkh desencadena una apoptosi semblant a la mort cel·lular programada. Des de *Candida*, *Aspergillus* i altres organismes infecciosos s'han conservat les vies de senyalització, aquests resultats per tant, apunten els ortòlegs de Pkh, com a possibles dianes de medicaments per antifúngics amb efectes pleiotròpics desencadenants de la mort cel·lular programada.

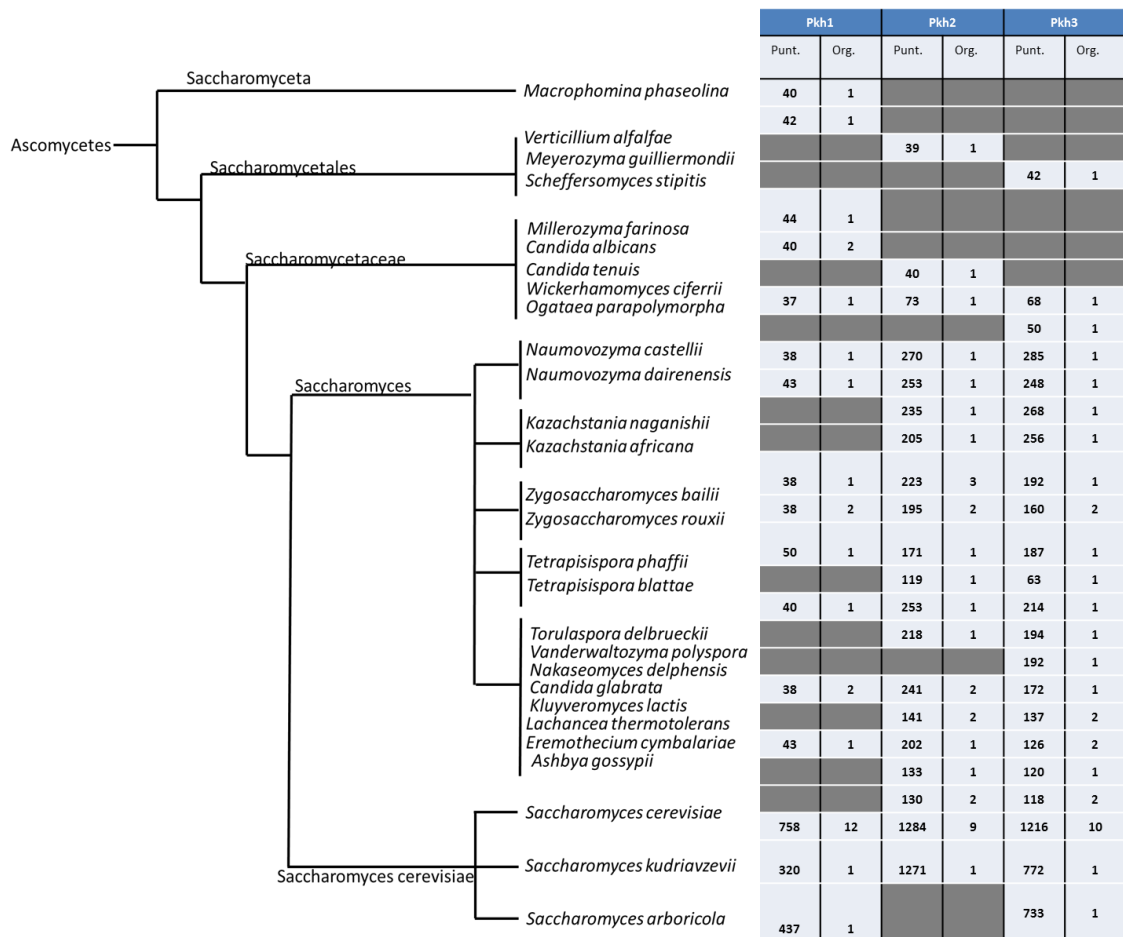
## **2. Estudi de la funció del domini C-terminal de les proteïnes Pkh.**



**2.1. El domini C-terminal de les proteïnes Pkh no és rellevant per la supervivència cel·lular en condicions òptimes de creixement.**

Les proteïnes Pkh tenen unes regions C-terminal, no catalítiques, de funció encara desconeguda, molt extenses en comparació amb el seu ortòleg en mamífer, PDK1 (Inagaki et al., 1999). PDK1, per la seva banda, presenta en la seva regió no catalítica un domini PH, essencial per la unió a PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> i necessari per la seva fosforilació i activació (Bayascas, 2010).

A partir d'una anàlisi filogenètica del domini C-terminal de les Pkh, on s'ha utilitzat el programari web del NCBI, hem pogut comprovar que aquest domini només es conserva fins als ascomicets, en concret ens quedem en els Sacaromicetales, és a dir que no es conserven més enllà dels fongs estretament relacionats amb *S. cerevisiae* (Figura 39).



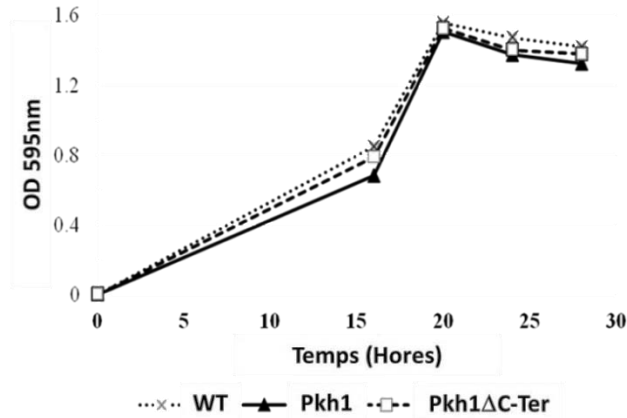
**Figura 39. Cladograma dels dominis C-terminal de les Pkh de llevat.** Les dades obtingudes a partir d'anàlisi de BLAST dels dominis C-terminal de Pkh1, 2 i 3, s'han inclòs al cladograma taxonòmic obtingut segons el programari web NCBI disponible a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. La taula informativa generada per a cada Pkh, s'indica, per a cada llinatge, la puntuació (Punt.) basada en l'homologia del dominis C-terminal de cada Pkh. S'inclou també el nombre d'organismes (Org.) que conformen cada llinatge. Les seqüències utilitzades dels dominis C-terminal de Pkh1 de l'aa 390 al 766; Pkh2 de l'aa 442 al 1081 i Pkh3 de l'aa 292 al 898.

És evident la rellevància d'aquesta extensió C-terminal no catalítica de PDK1 de mamífers, on es troba el domini PH. Donat que les Pkh de *S. cerevisiae* no poden unir PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> o PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> (aquest últim absent en cèl·lules de llevat) i la manca d'identitat entre les seqüències aminoacídiques dels extrems C-terminal de les Pkh i la del domini PH de PDK1, podríem hipotetitzar que les Pkh de llevat no tenen un clar domini PH, encara que tenen una regió C-terminal molt més extensa que la de PDK1. Per tant, ens vam proposar identificar la funció d'aquest extens domini C-terminal de les Pkh. Per tal d'acomplir el nostre objectiu es va construir una soca en que la regió C-terminal de Pkh1 estigues delecionada. La soca diploide heterozigota BY4743 *MATa/MATα pkh1::HIS3/PKH1 pkh2::kanMX4/PKH2* (AB01, veure taula 2 i apartat 5 materials i mètodes), es va transformar amb un plasmidi multicòpia pRS426 que contenia la versió sencera del gen *PKH1* o bé versió delecionada *PKH1ΔC-Ter*. Posteriorment es van seleccionar aquells haploides que no tenien la còpia genòmica ni de *PKH1* ni de *PKH2*, i que contenien el plasmidi pRS426-Pkh1 o bé pRS426-Pkh1ΔC-Ter. D'aquesta manera l'única activitat Pkh d'aquestes cèl·lules venia proporcionada pel plasmidi. S'ha realitzat el mateix amb un plasmidi centromèric, pRS316, obtenint els mateixos resultats dels quals només es mostren els del multicòpia.

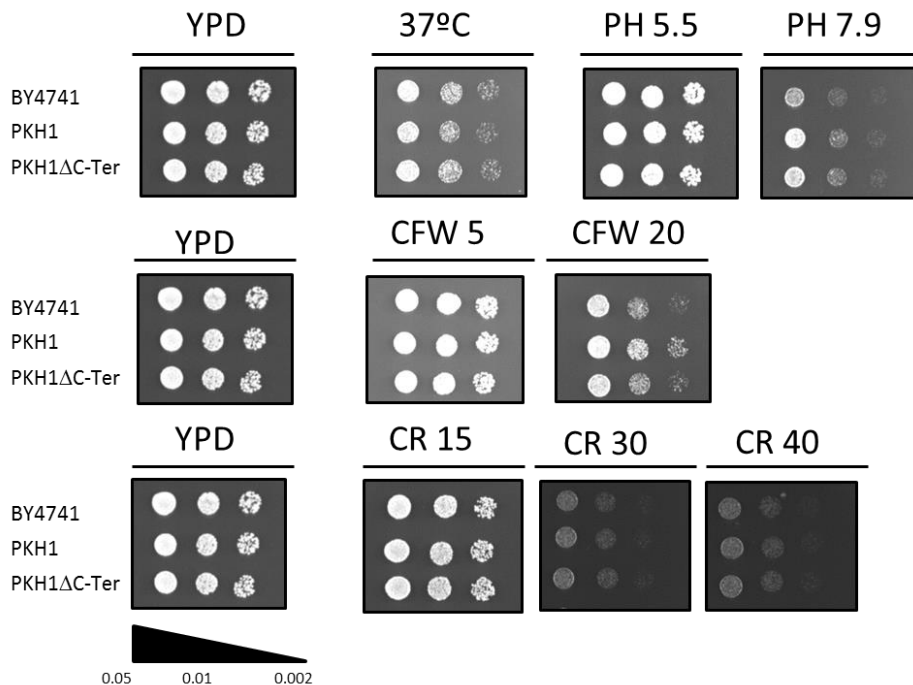
Es van caracteritzar aquests haploides, primerament comparant el creixement en condicions òptimes d'una soca WT BY4741 amb els haploides Pkh1 i Pkh1ΔC-T, els quals semblen no mostrar diferències entre si (Figura 40A). És a dir, que el domini C-terminal de Pkh, aparentment sembla no ser essencial per la supervivència cel·lular en condicions òptimes de creixement. I segon, observant el seu comportament en front a diferents estressos de paret en medi sòlid, com per exemple pH alcalí (7.9), diferents concentracions de roig Congo (15, 30 i 40 μg/ml), etc. Pel mètode de *drop test*, tal com es mostra en la figura 40B es pot observar que aquestes cèl·lules Pkh1 i Pkh1ΔC-Ter es comporten igual que el seu WT BY4741.

Per tant, tenint en compte aquests resultats es podria dir, que la regió C-terminal de les proteïnes Pkh, no és essencial pel seu creixement òptim ni tampoc per fer front aquells estressos relacionats amb la CWI.

A)



B)



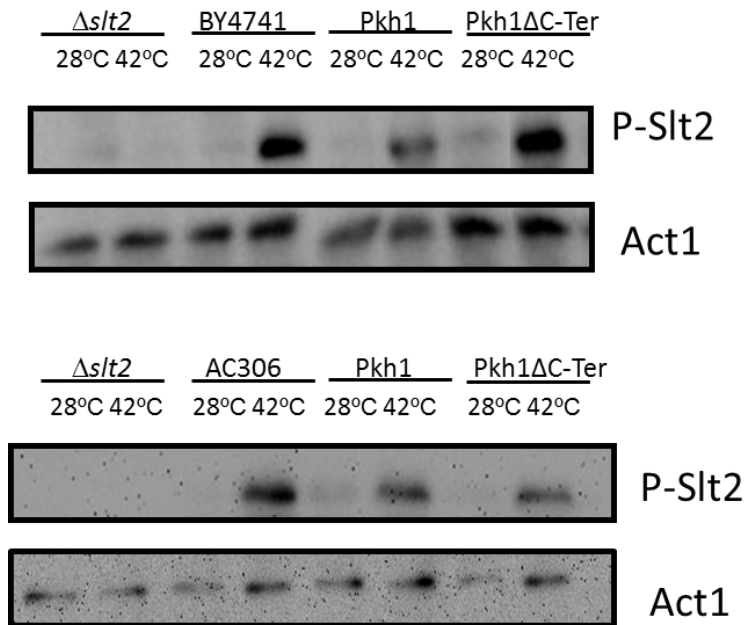
**Figura 40. El domini no catalític de Pkh1 no sembla ser essencial per la supervivència cel·lular en condicions òptimes i d'estrès de paret.** A) Els cultius saturats de les cèl·lules WT BY4741, Pkh1 i Pkh1ΔC-Ter, van ser inoculats en plaques de 96 pouets a una OD<sub>595</sub> de 0.004 en medi YPD. Les OD dels cultius a 595 nm s'han mesurat per cada temps indicat. B) Es mostren els creixements de les soques descrites en A) en medi sòlid YPD; en YPD a pH 5.5 i 7.9; en YPD contenint 5 i 20 µg/ml de Calcofluor (CFW); 15, 30 i 40 µg/ml de roig Congo (CR) i en YPD incubant a 37 °C. Els cultius saturats d'aquestes soques s'han diluït fins una OD<sub>660</sub> del 0.05. 3 µl de cada dilució seriada 1:5 s'han dipositat en les plaques indicades que s'han incubat (si no s'indica el contrari) a 28 °C durant 48h.

## 2.2 . Les soques sense el domini catalític de Pkh també fosforilen Slt2 sota condicions d'estrès de paret cel·lular.

Com s'ha pogut observar en l'apartat 1.3 de resultats, les proteïnes Pkh són necessàries per l'activació de la via Pkc1-Slt2 MAPKs, ja que la fosforilació de Slt2 observada a la soca WT sota condicions d'estrès, ja sigui per temperatura o bé per alcalinització del medi, és troba disminuïda en la soca SDP8. Per tant, ens vam preguntar què els passava aquestes soques que els hi manca el domini C-terminal de Pkh1 i si són capaces d'activar la via de l'Slt2 MAPK, de la mateixa manera que ho faria una soca WT.

Per tal d'investigar aquest aspecte, es van utilitzar les següents soques: Els haploides en fons BY4741, pRS426-Pkh1 i pRS426-Pkh1 $\Delta$ C-Ter, anteriorment descrits. I els haploides en fons AC306 (taula 2, apartat 5 materials i mètodes), que porten un plasmidi centromèric, pRS316, pRS316-Pkh1 i pRS316-Pkh1 $\Delta$ C-Ter. D'aquesta manera en ambdós casos, l'única activitat Pkh ve proporcionada pel plasmidi.

Aquestes soques anteriorment descrites se'ls va induir un estrès de paret per estrès tèrmic, que consistia en una incubació a 42 °C durant 40 min, estrès que indueix la fosforilació de Slt2 (Cid et al., 1995). Tal com es mostra a la figura 41 (panell superior), l'estrès per calor a 42 °C, produeix un increment important de la fosforilació de Slt2 en les cèl·lules WT BY4741, comparat amb les mateixes condicions per un mutant  $\Delta$ slt2, utilitzat com a control negatiu. Aquest increment en la fosforilació també sembla donar-se amb el mateix grau en les cèl·lules Pkh1 i Pkh1 $\Delta$ C-ter. Pel que fa al WT AC306, també es dona aquest increment en la fosforilació de Slt2, però en menor grau que en el fons BY4741, això podria explicar-se en part, pel nombre de còpies de Pkh1 que porta el WT BY4741, ja que hem de tenir en compte, que aquest últim porta un plasmidi multicòpia pRS426, mentre que les cèl·lules amb un fons genètic AC306 porten un plasmidi centromèric, és a dir una única còpia de Pkh1 o Pkh1 $\Delta$ C-ter. Tot hi això, en les cèl·lules amb una única còpia de Pkh, sigui en una o altra versió, no mostren cap increment i/o reducció de la fosforilació de Slt2 comparat amb el seu WT AC306 (Figura 41, panell inferior).



**Figura 41. La falta del domini C-terminal no té efecte en l'activació de la via Slt2 MAPK.** Es mostra l'estat de fosforilació de Slt2 mitjançant *western blot*. Les cèl·lules procedents de les soques WT BY4741, pRS426-Pkh1 i pRS426-Pkh1 $\Delta$ C-Ter (panell superior) així com les soques WT AC306, pRS316-Pkh1 i pRS316-Pkh1 $\Delta$ C-Ter (panell inferior), s'han fet créixer en medi SC-Ura, abans d'activar la via de la CWI per xoc tèrmic. Per l'activació per xoc tèrmic, les soques s'han incubat a 42 °C durant 40 min. Els cultius control s'han incubat a 28 °C durant el mateix temps. Pel control experimental s'ha utilitzat un mutant *slt2* ( $\Delta slt2$ ), el qual s'ha tractat sota les mateixes condicions. L'extracte total de proteïnes s'ha separat per SDS-PAGE, i la fosforilació de Slt2 (anomenat com P-Slt2) s'ha detectat utilitzant l'anticòs anti-fosfo p44/42 MAPK. Un cop eliminats els anticossos, les mateixes membranes s'han incubat amb l'anticòs anti-actina, utilitzat com a control de càrrega (anomenat com Act1).

Podríem concloure doncs, que el domini C-terminal de les proteïnes Pkh no és essencial, almenys pel que fa a l'activació de la via MAPK de Slt2 implicada en la via de la CWI, a diferència de l'activitat cinasa de Pkh1 que si que s'ha observat que és essencial i que es requereix per l'activació de Slt2 sota condicions d'estrès (veure resultats apartat 1.3).



### 2.3 . Les proteïnes Pkh no uneixen fosfoinosítids.

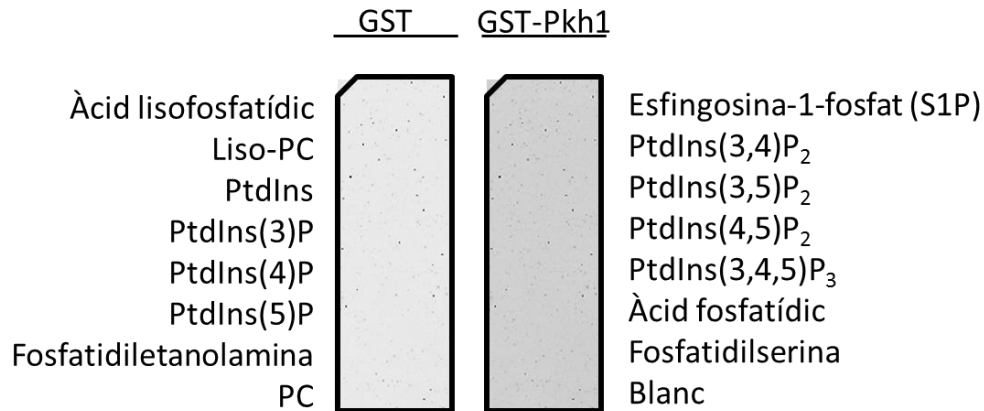
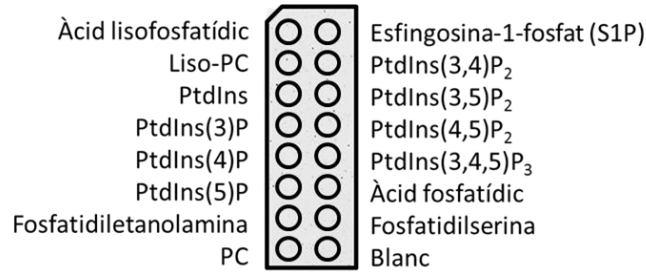
Un cop sabent que aquest domini no catalític de les proteïnes Pkh no és essencial per la supervivència cel·lular ni en condicions òptimes de creixement, ni en els estressos provats, ni per la fosforilació de Slt2 per estrès tèrmic, ens preguntàvem si com en el cas del seu ortòleg en mamífer, PDK1, podria tenir algun paper en la unió fosfotidilinositols. Com s'ha comentat en l'apartat 2.3 de la introducció, PDK1 té un domini PH en el seu domini C-terminal que uneix fosfoinosítids. En les proteïnes Pkh no s'ha descrit que tinguin aquest domini d'homologia a Pleckstrina (Inagaki et al., 1999).

Per tal de comprovar si Pkh1 uneix fosfoinosítids, es va expressar en llevat i purificar la proteïna Pkh1, fusionada a GST. Per això, s'ha clonat el gen *PKH1* al plasmidi pEGH, el qual té un promotor *GAL1-10* que controla l'expressió de l'ORF clonat fusionat a GST. Aquesta proteïna Pkh1 purificada, ens ha permès realitzar un assaig d'unió proteïna-lípid "*fat western*", a partir d'unes membranes comercials les quals contenen 100 pmols de diferents fosfoinosítids descrits a la figura 42A. A part també, com a control positiu, es va expressar en cèl·lules HEK293T de mamífer, la proteïna PDK1 humana, fusionada a GST en el vector d'expressió pEBG-2T, que finalment es va purificar i incubar amb les membranes comercials anteriorment esmentades (Figura 42B).

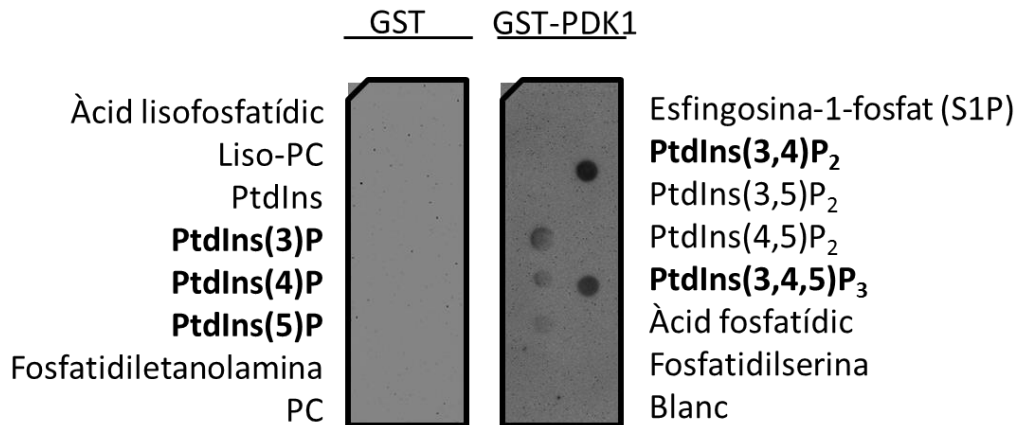
A la figura 42A, es pot observar com GST-Pkh1, no reconeix cap fosfoinosítid present a la membrana, fet que esperàvem trobar tenint en compte els antecedents bibliogràfics descrits per Casamayor i col·laboradors (Casamayor et al., 1999) on observaven que Pkh1 no unia fosfoinosítids a causa de la manca del domini PH, d'unió a fosfoinosítids present en el seu ortòleg en mamífer, PDK1. Pel contrari, en la figura 42B, PDK1 s'uneix molt específicament a PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> i PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, fet que concorda amb la bibliografia (Bayascas, 2010), i a part també s'observa que s'uneix en menor intensitat, però no menys important, amb PtdIns(3)P, PtdIns(4)P i PtdIns(5)P.

Tenint en compte aquests resultat obtinguts, podem dir que el domini C-terminal de Pkh1, a diferència del de PDK1, no uneix fosfoinosítids.

A)



B)



**Figura 42. Pkh1 no uneix fosfoinosítids.** A) A dalt, esquema de la distribució, en la membrana, dels diferents fosfoinosítids. (a baix) 3 ml de solució de les proteïnes (a 0.5 µg/ml), GST-Pkh1 i GST (com a control negatiu), purificades s'han incubat durant 16h a 4 °C amb les membranes que contenen 100 pmols de diferents fosfoinosítids. La proteïna unida al lípid s'ha detectat utilitzant l'anticòs anti-GST. B) 3 ml de solució de les proteïnes (a 0.5 µg/ml), GST-PDK1 i GST (com a control negatiu), purificada s'ha incubat durant 16h a 4 °C amb les membranes que contenen 100 pmols de diferents fosfoinosítids. La proteïna unida al lípid s'ha detectat utilitzant l'anticòs anti-GST. En negreta es mostren els fosfoinosítids que s'uneixen a GST-PDK1. PC, fosfatidilcolina; Liso-PC, lisofosfatidilcolina; PtdIns, fosfatidilinositol.

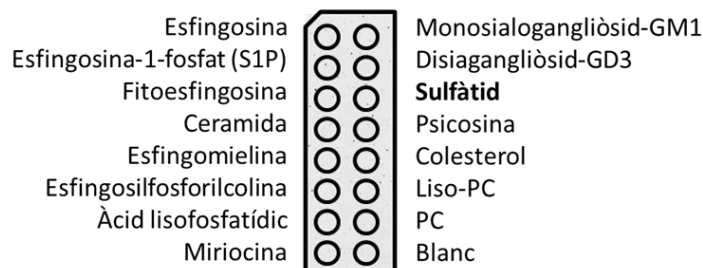
**2.4 . Les proteïnes Pkh són capaces d'unir-se a la sulfogalactosilceramida (sulfàtid).**

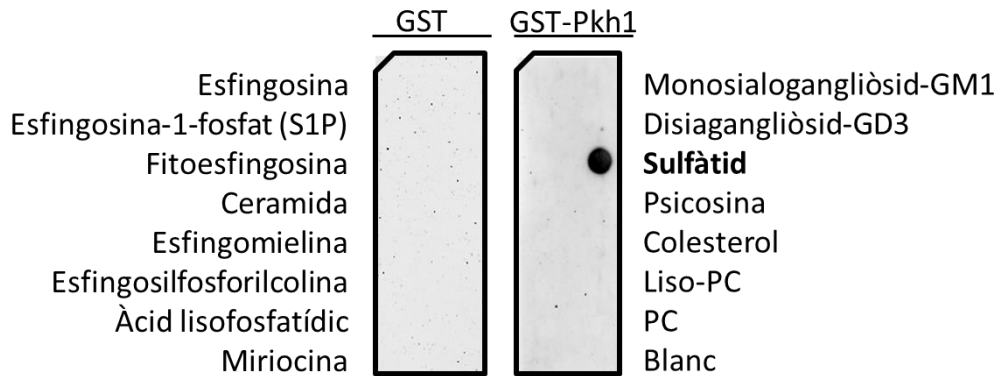
S'ha suggerit que algun tipus d'esfingolípid o bé lípid de cadena llarga (LCB), podria estar activant la via Pkh1-Ypk (Luo et al., 2008). Per tal de comprovar si algun esfingolípid és capaç d'unir-se a Pkh1, s'ha realitzat un experiment anàleg al descrit anteriorment utilitzant, però membranes comercials que contenen 100 pmols de diferents esfingolípids

A la figura 43A, s'observa com la proteïna GST-Pkh1, però no GST, s'uneix molt específicament a un únic esfingolípid, en aquest cas observem que es tracte d'un sulfàtid. Fet que sorprèn, ja que esperàvem que s'unís algun esfingolípid de cadena llarga com PHS, tal com havien observat Liu i Dickson i col·laboradors (Robert C Dickson et al., 2006; K. Liu et al., 2005), encara que actualment certament discutit per Roelants i col·laboradors, que suggereixen que les Pkh s'uneixen a esfingolípids més complexos com MIPC (Roelants et al., 2010).

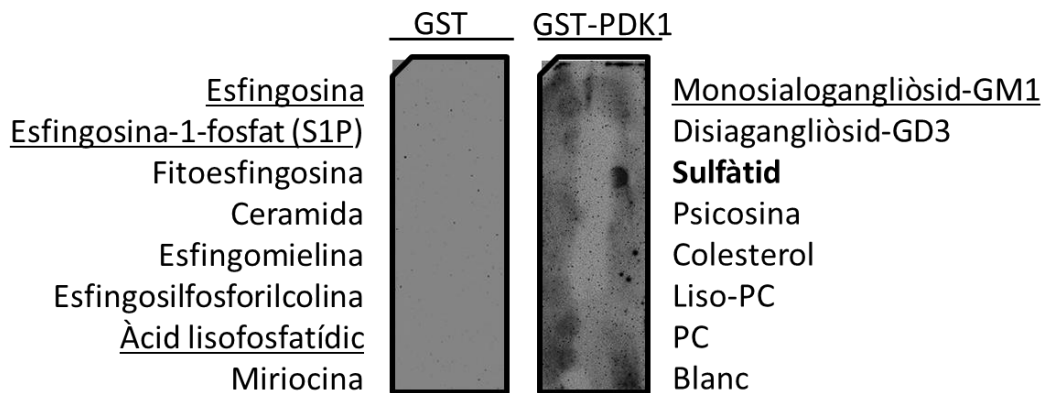
En aquest cas, també hem utilitzat com a control GST-PDK1 purificada, de la qual només es coneix que pot ser activada per esfingosina (King et al., 2000). Sorprenentment i com es pot observar PDK1, també, sembla unir-se al sulfàtid, i curiosament amb una afinitat molt similar al de la Pkh1. Així com també sembla unir-se a d'altres esfingolípids com: esfingosina, esfingosina-1-fosfat, àcid lisofosfatídic, miriocina i monosialogangliòsid (GM1), encara que amb molta menor intensitat que en el cas del sulfàtid (Figura 43B).

A)





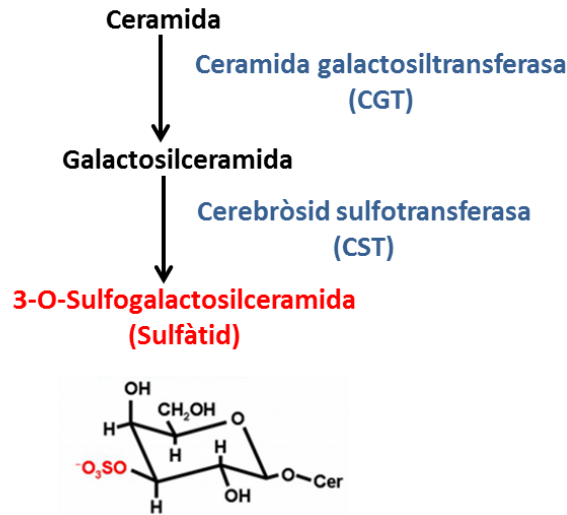
B)



**Figura 43. Pkh1 i PDK1 s'uneixen a sulfàtid.** A) A dalt, esquema de la distribució, en la membrana, dels diferents esfingolípid. (A baix) 3 ml de solució de les proteïnes (a 0.5 µg/ml), GST-Pkh1 i GST (com a control negatiu), purificades s'han incubat durant 16 h a 4 °C en unes membranes que contenen 100 pmols de diferents esfingolípid. La proteïna que s'ha unit al lípid es detecta amb l'anticòs anti-GST, i en mostra en negreta. B) 3 ml de solució de les proteïnes (a 0.5 µg/ml), GST-PDK1 i GST (com a control negatiu), purificades com a A) s'han incubat durant 16 h a 4 °C en unes membranes que contenen 100 pmols de diferents esfingolípid. La proteïna que s'ha unit al lípid es detecta amb l'anticòs anti-GST. En negreta es mostren els esfingolípid que s'uneixen a GST-PDK1 i subratllat aquells que semblen mostrar una petita afinitat, però no clara, per unir-se a GST-PDK1. PC, fosfatidilcolina; Liso-PC, lisofosfatidilcolina.

El sulfàtid, és una sulfogalactosilceramida, sintetitzat principalment en els oligodendrocits del sistema nerviós central. En mamífers es localitza, principalment en l'aparell de Golgi, membrana cel·lular, i lisosomes, o al citosol especialment en moltes línies cel·lulars de càncer. El metabolisme del sulfàtid és molt simple en

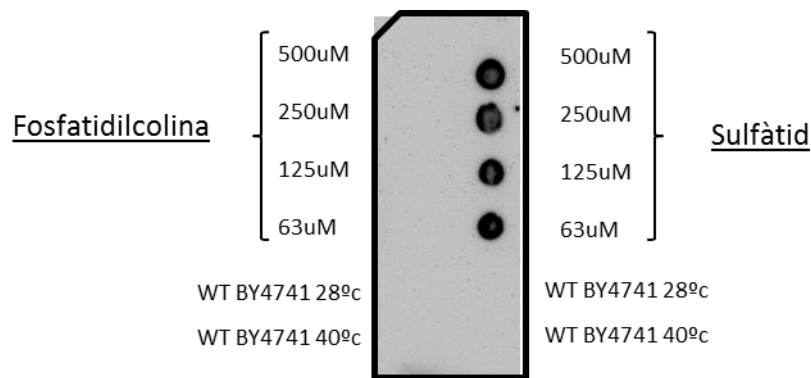
comparació amb la de molts gangliòsids. La síntesi de sulfàtid s'inicia al reticle endoplasmàtic per l'addició de galactosa des de la UDP-galactosa a ceramides per formar la galactosilceramida, reacció catalitzada per la CGT (Schaeren-Wiemers et al., 1995). La galactosilceramida es transporta a l'aparell de Golgi, on és finalment sulfatada, per la CST, formant així el sulfàtid (Honke et al., 1997) (Figura 44).



**Figura 44. Síntesi del Sulfàtid.** Es mostra l'estructura química del sulfàtid. El sulfàtid (en vermell) és sintetitzat a partir de la ceramida i a través de la galactosilceramida, gràcies a l'acció de dos transferases (CGT i CST), que es mostren amb lletres de color blau. Figura adaptada de (Suzuki et al., 2008).

Aquest esfingolípide complex, no s'ha descrit ni en fongs ni en plantes, ja que pel que fa als llevats la formació d'esfingolípids complexos és molt més simple i en moltes menys modificacions que en el cas dels mamífers (veure apartat 4 de la introducció i figura 15). Mentre que en mamífers s'afegeixen diferents sucres com glucosa o galactosa, per formar gluco o galactosilceramides, (entre d'altres modificacions) (Merrill et al., 2007), en llevats, no s'ha descrit cap enzim capaç de dur a terme l'addició de galactosa a la ceramida o la d'afegir un grup sulfat a la galactosa. En llevats únicament existeixen tres esfingolípids complexos formats per l'addició d'una manosa i 1 o 2 inositolsfosfats a una ceramida, donant lloc a l'inositol-fosfoceramida (IPC); manosa-inositol-fosfoceramida (MIPC) i finalment el manosa- (inositol-P)<sub>2</sub>-ceramida (M(IP)<sub>2</sub>C) (Lester & Dickson, 1993).

Per tal de comprovar, si hi ha o no sulfàtid, en llevats, es va utilitzar un anticòs específic anti-sulfàtid (Fredman et al., 1988). Es van preparar extractes lipídics de llevat, extrets de les cèl·lules crescudes a diferents condicions de temperatura, tant a 28 °C, condicions òptimes com a 40 °C, i es va dipositar una gota de cada un dels extractes (aproximadament 0.8 µg de lípid) a una membrana de nitrocel·lulosa reforçada, juntament amb un control negatiu (fosfatidilcolina) i el sulfàtid com a control positiu, a unes concentracions conegudes. La possible presència de sulfàtid en l'extracte lipídic de llevat, es va detectar mitjançant la incubació de la membrana amb l'anticòs anti-sulfàtid. Els resultats indiquen, que no podem detectar la presència de sulfàtid en llevat, almenys amb aquest sistema (Figura 45).



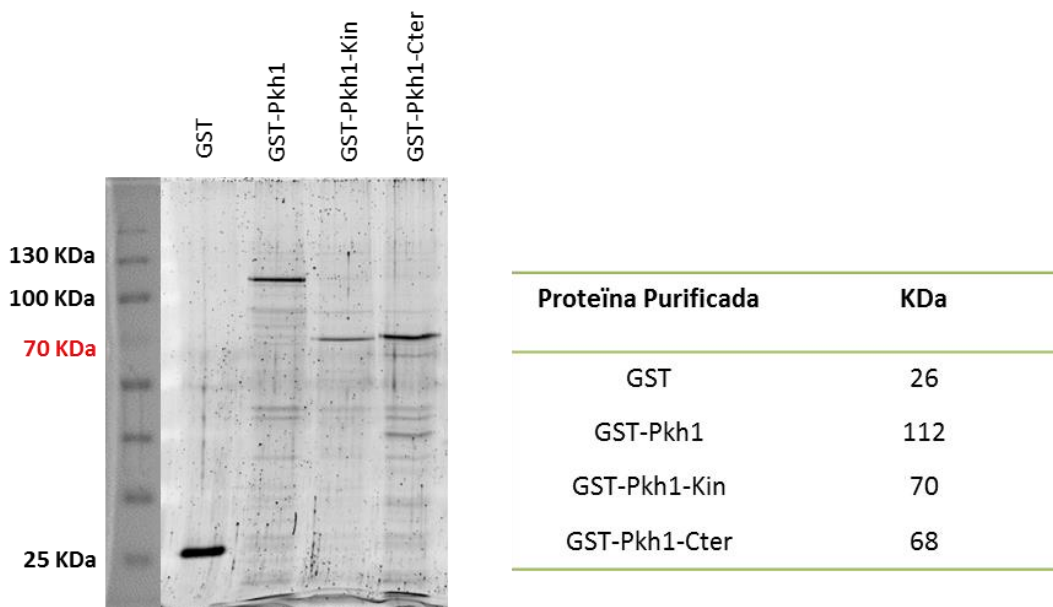
**Figura 45. En un extracte lipídic de llevat *S. cerevisiae* no trobem evidències de sulfàtid.** Aproximadament 0.8 µg d'extracte lipídic de la soca WT BY4741 s'ha gotejat en una membrana d'Hybon-C Extra (GE Healthcare), juntament amb diferents concentracions de fosfatidilcolina (500 – 63 µM) i sulfàtid (500 – 63 µM), que ens serveixen de control negatiu i positiu, respectivament. La detecció del sulfàtid s'ha dut a terme mitjançant la incubació amb un anticòs anti-sulfàtid (Fredman et al., 1988).

## 2.5 . El domini C-terminal és el responsable de la unió a la sulfogalactosilceramida (sulfàtid).

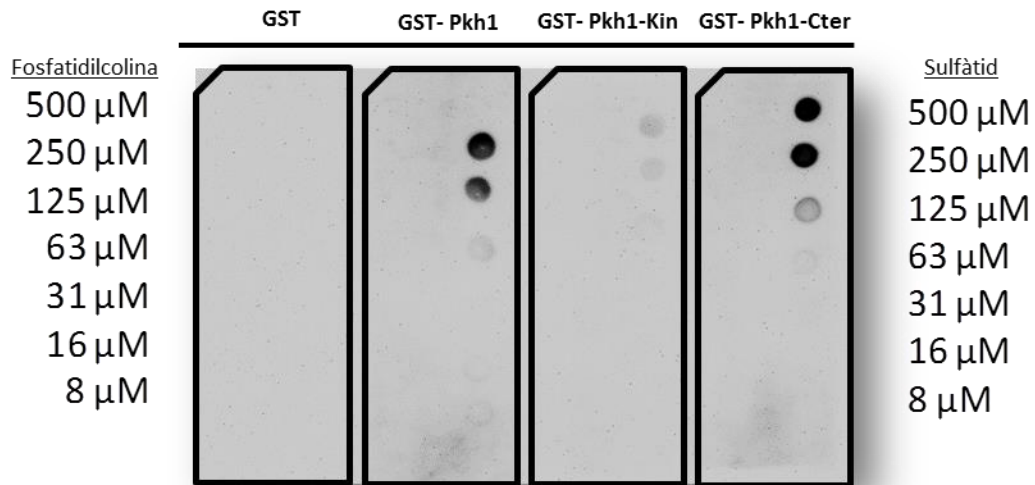
Tot hi saber de la inexistència del sulfàtid en llevat, ens preguntàvem si aquest lípid s'uneix al domini cinasa o és el domini C-terminal el responsable d'aquesta unió. Per això es va clonar en el plasmidi pEGH la regió C-terminal per un costat i la regió cinasa (N-terminal) per l'altra, seguint la mateixa estratègia anteriorment descrita, obtenint així el domini C-terminal o bé el domini cinasa, fusionat a GST. El domini C-terminal de 376 aa i el domini cinasa de 391 aa, es van purificar (Figura 46A) i incubar amb unes membranes que contenien diferents dilucions de sulfàtid, per tal de conèixer la intensitat de les interaccions proteïna-lípid.

Els resultats obtinguts indiquen que el domini C-terminal de Pkh1 uneix sulfàtid amb la mateixa intensitat (dilucions de 500 a 125  $\mu$ M, Figura 46B) que la proteïna entera de Pkh1, a diferència del domini cinasa, el qual pràcticament no mostra unió. Fet que ens estaria indicant que aquesta regió C-terminal pot unir algun tipus d'esfingolípid, tal com esperàriem trobar tenint en compte que el seu ortòleg en mamífer, PDK1, posseeix un domini d'unió a lípids, en aquest cas però a fosfoinosítids (Bayascas, 2010).

A)



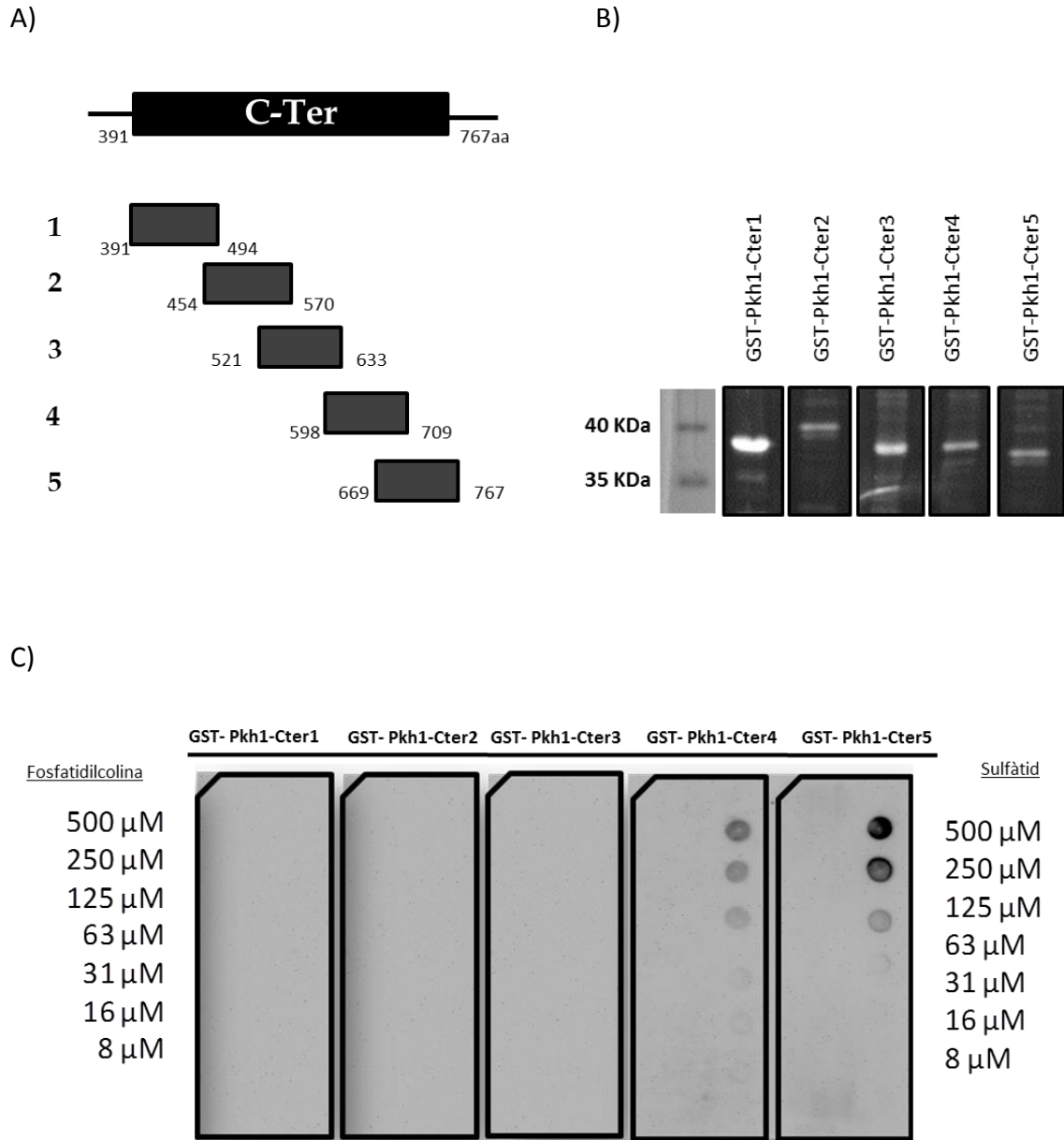
B)



**Figura 46. El domini C-terminal de Pkh és el responsable de la unió a sulfàtid.** A) Separació mitjançant electroforesis en gel de PAGE-SDS al 10% (p/v) de les diferents proteïnes purificades, visualitzades pel sistema de fluorescència amb Oriole™ Fluorescent Gel Stain, juntament amb taula que indica el seu corresponent pes molecular en KDa. B) 3 ml de solució de les proteïnes (a 0.5 μg/ml), GST (control negatiu), GST-Pkh1, GST-Pkh1-kin i GST-Pkh1-Cter, purificades s’han incubat durant 16 h a 4 °C en unes membranes que contenen diferents dilucions de fosfatidilcolina, com a control negatiu, ( de 500 a 8 μM, a l’esquerra) i diferents concentracions de sulfàtid ( de 500 a 8 μM, a la dreta). La proteïna unida al lípid s’ha detectat utilitzant l’anticòs Anti-GST.

Havent identificat una regió de 376 aa com la responsable de la unió del sulfàtid a la Pkh1, ens interessava saber quins aminoàcids en concret tenen aquesta propietat d’unir-se al sulfàtid. Per tal de respondre aquesta qüestió, seguint la mateixa estratègia descrita, es van dissenyar (Figura 47A), clonar i purificar (Figura 47B) cinc fragments solapats d’aproximadament 100 residus cada un, que conformen tota la regió C-terminal, fusionats a GST (per més detalls veure material i mètodes apartat 4). Els quals, com en la regió cinasa i C-terminal, es van incubar en membranes que contenen diferents dilucions de sulfàtid (de 500 a 8 μM) durant 16 h a 4 °C, per tal d’observar si algun dels cinc fragments era capaç d’unir-se a sulfàtid amb una afinitat semblant a la proteïna entera Pkh1 (Figura 47).





**Figura 47. Els 100 últims aa de l'extrem C-terminal són els responsables de la unió al sulfàtid.** A) Esquema dels cinc fragments de la regió C-terminal clonats al plasmidi pEGH. B) Tinció amb Oriole<sup>TM</sup> Fluorescent Gel Stain dels cinc fragments purificats separats mitjançant electroforesi en gel de PAGE-SDS al 10% (p/v) on en mostra que els diferents fragment purificats corresponent, aproximadament a 40 KDa. C) 3 ml de solucions de 0.5 μg/ml de proteïna purificada de cada fragment del domini C-terminal fusionat a GST, s'ha incubat s'ha incubat durant 16 h a 4 °C en unes membranes que contenen diferents dilucions de fosfatidilcolina, com a control negatiu, (de 500 a 8 μM, a l'esquerra) i diferents concentracions de sulfàtid (de 500 a 8 μM, a la dreta). La proteïna unida al lípid s'ha detectat utilitzant l'anticòs Anti-GST.

Tal com es mostra a la figura 47C, el fragment anomenat número 5, que correspon als últims 98 aa, presenta una afinitat d'unió a sulfàtid molt similar a l'observada per part del domini C-terminal i la proteïna sencera de Pkh1, mostrada a la

figura 46B. A diferència de l'absència d'unió que s'observa al fragment 1, 2 i 3, només en el fragment 4 semblaria unir, amb menys afinitat però, el sulfàtid. S'ha de tenir en compte que la regió 4 i 5 comparteixen 40 aa, ja que són fragments solapats, i per tant podria explicar-se així aquesta unió. Es pot concloure doncs, amb tots els resultats obtinguts fins el moment, que la regió no catalítica de Pkh uneix esfingolípids, en concret i de manera molt específica, sulfàtid, i que la regió responsable d'aquesta unió està formada per 98 aa situats a l'extrem més C-terminal.

Hem utilitzat l'algoritme FFAS (Jaroszewski et al., 2011), que compara i alinea perfils proteics, per detectar homologies remotes que prediuen estructures proteiques, per tal de determinar si els 100 últims aa de Pkh1 poden contenir un domini d'homologia a Pleckstrina.

Hem vist que quan s'introdueix la seqüència de Pkh1 des de la posició 660 fins els 100 últims aminoàcids al programari FFAS, buscant a la base de dades, PfamA26U, trobem que hi ha un alineament amb un 14 % d'identitat amb el domini d'homologia a Pleckstrina (Puntuació de -5).

Alineament entre els 82 últims aminoàcid de la seqüència de Pkh1, corresponents el nostre fragment 5, i la seqüència PH (a baix):

```
685 MFDKEI-----LQKRONTKKKNOAPFVPSNRLINGLPDRCILKTPPEEGALHTKRPTSLQTRSSSNYS-----KLLARSTQMRKNMTRIDEK 767
23  LFDHATLLLVKIKVVKRDOYKVKRPIPLELLVINEMAENVLPERGIKRPPSSLLPKAGNOQKADANAKNGYSITFQHLGKRGYVLSLFAATVVG 116
```

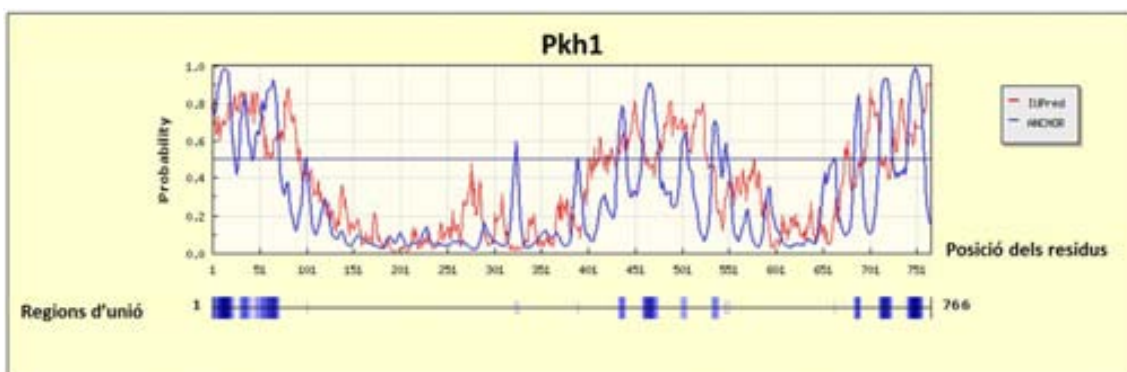
Per comparà els resultats fem la mateixa anàlisi per la PDK1, introduint els últims 100 aa al programari FFAS, sabent que el domini PH en PDK1 es troba entre els residus 457-544. Els resultats indiquen que es pot trobar un alineament amb el domini PH amb una identitat del 53% (puntuació de -57.4).

Alineament entre els 100 últims aminoàcids de la seqüència de PDK1 i la seqüència del domini PH (PF14593) (a baix):

```
456 I L K M G P V D K R R K G L F A R R R Q L L T E G P H L Y Y V D P V N K V L K G E I P W S Q E L R P E A K N E K T F F V H T P N R T Y Y I M D P S G N A H K W C R K T Q E V W R Q R Y Q 548
13  I I K T G I I H K R R K G L F S K R R Q L V L T D K P R C L Y I D V D K M E I K G E I P W S T E M R F E V K N K T F F I H T P N R T Y Y I E D L S A D A Y G W C E Q F N A L L K Q Y R A 104
```

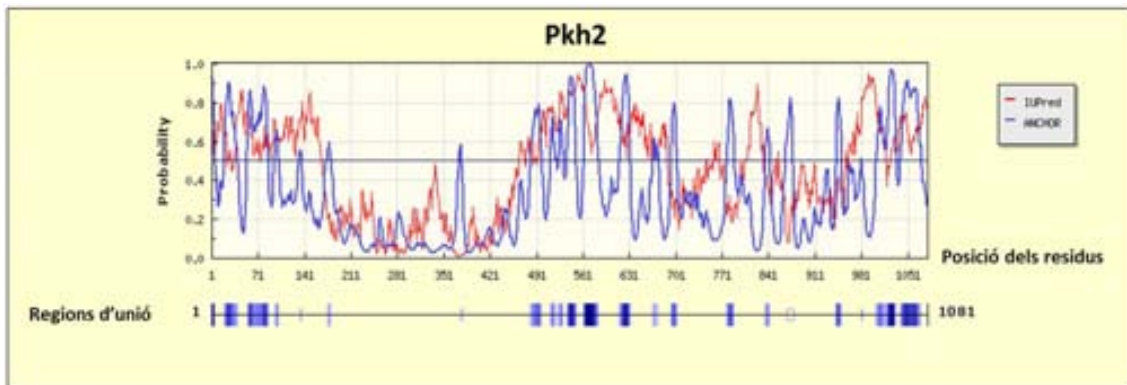
Cal dir, que a partir del programari ANCHOR (Dosztányi et al., 2009), disponible a <http://anchor.enzim.hu/> i que prediu les regions desestructurades de les proteïnes que al unir-se a proteïnes o d'altres elements li confereix una estabilització energètica, es va poder determinar que el domini C-terminal de Pkh1 conté una regió, compresa entre els residus 685-758 aa (Figura 48A), desestructurada i que correspon justament amb el fragment C-terminal 5, que és el que s'uneix en més afinitat a sulfàtid. Per tant, aquesta desestructuració del domini C-terminal, i el fet de trobar en aquests mateixos residus una similitud amb el domini PH, podria explicar la capacitat d'unió a esfingolípids, per tal d'aconseguir una estabilització energètica. En canvi, pel que fa a PDK1, la predicció de regions d'unió només mostra desestructuració entre els residus 376-386 que corresponguin en la regió C-terminal, els quals no són coincidents amb el seu domini PH (Figura 48D).

A)



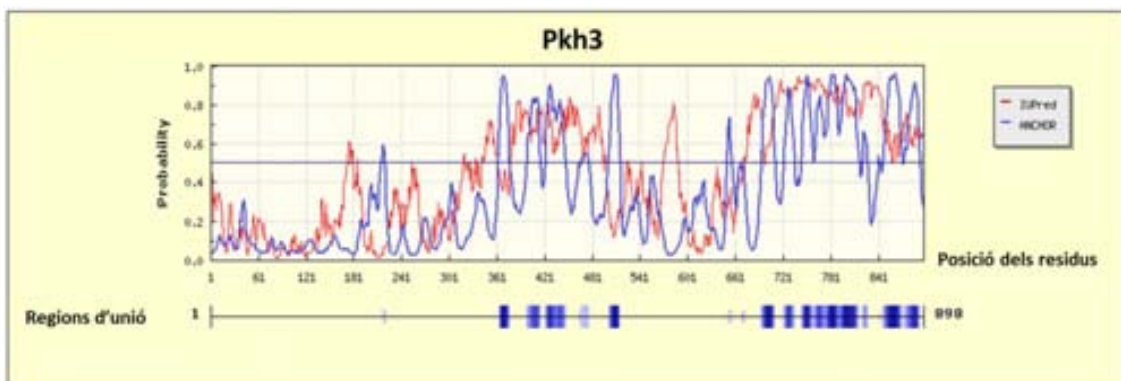
Predicció de les regions d'unió desestructurades			
	aa posició inicial	aa posició final	Total aa
1	1	24	24
2	29	43	15
3	45	72	28
4	433	441	9
5	459	476	18
6	500	507	8
7	533	541	9
8	685	692	8
9	711	725	15
10	741	758	18

B)



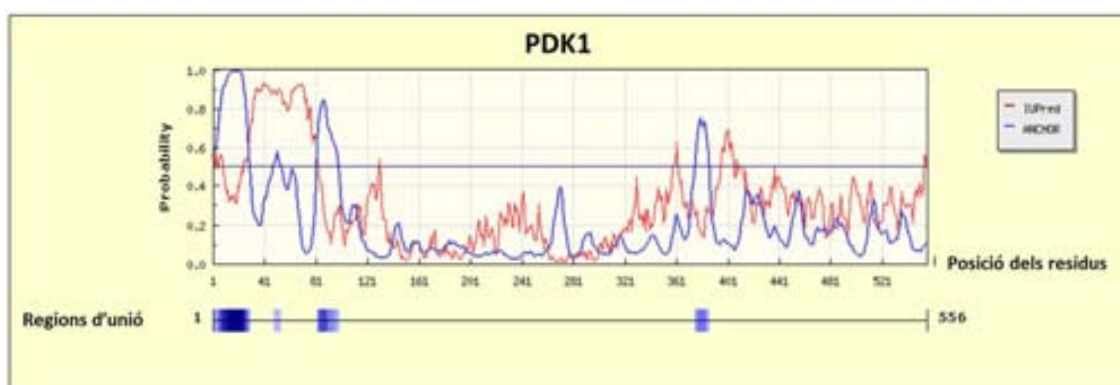
Predicció de les regions d'unió desestructurades			
	aa posició inicial	aa posició final	Total aa
1	1	6	6
2	20	40	21
3	55	86	32
4	96	102	7
5	175	180	6
6	482	499	18
7	512	521	10
8	525	531	7
9	537	550	14
10	562	584	23
11	616	632	17
12	667	675	9
13	694	703	10
14	778	789	12
15	836	843	8
16	943	951	9
17	1004	1033	30
18	1041	1071	31

C)



Predicció de les regions d'unió desestructurades			
	aa posició inicial	aa posició final	Total aa
1	364	377	14
2	399	415	17
3	422	447	26
4	467	477	11
5	502	516	15
6	694	711	18
7	722	736	15
8	745	817	73
9	822	828	7
10	848	872	25
11	874	894	21

D)



Predicció de les regions d'unió desestructurades			
	aa posició inicial	aa posició final	Total aa
1	1	29	29
2	48	53	6
3	82	98	17
4	376	386	11

**Figura 48. Predicció de regions desestructurades del domini C-terminal de les proteïnes Pkh i PDK1 amb potencial capacitat d'unió a d'altres molècules.** Els gràfics i les taules, obtingudes a partir del programari ANCHOR, indiquen les posicions d'aquells aminoàcids que presenten desestructuració per a Pkh1 (A), Pkh2 (B), Pkh3 (C) i PDK1 (D). Els aminoàcids (aa) en vermell a la taula A indiquen les posicions d'aquells que coincideixen amb els aa identificats com d'unió al sulfàtid per a Pkh1. Els aminoàcids (aa) en vermell a la taula B indiquen aquells aa del domini C-terminal de Pkh2 que podrien contenint un domini PH, segons les prediccions del programari FFAS. En negreta aquells aa més desestructurats que es posicionen en l'extrem del domini C-terminal, segons el programari ANCHOR. En C) es mostra en negreta, els últims 200 aa posicionats en l'extrem més C-terminal de Pkh3 els quals pertanyen en la regió més desestructurada del domini. En D) trobem el perfil per PDK1.

Quan fem la mateixa anàlisi predictiva per la seqüència de Pkh2, també s'observa que la regió més desestructurada correspon al domini C-terminal i en concret en el últims residus (943-1071 aa) tal com s'ha observat en el cas de Pkh1 (Figura 48B). Aquesta regió, i segons les prediccions fetes pel programa FFAS, només coincideix amb l'estructura del domini PH entre els residus 943-951, el qual es trobaria situat entre els aa 905 i 952 de Pkh2 amb un identitat del 10 % i una puntuació de -12, més rellevant que la que té Pkh1.

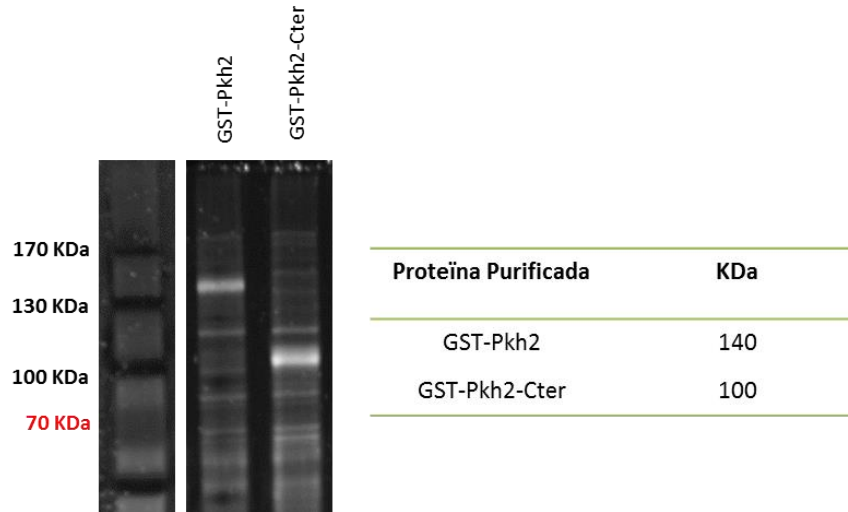
Alineament entre els aa 905 i 952 de la seqüència de Pkh2 i la seqüència del domini PH (PF14593) ( a baix):

```
905 TKIKELIIPLEMGTNHVVIQTFYKSFLLSTDKKTTSKLFTVLKKIIN 952
54 LPWSTEMRFEVKNKK-TFFIHTFNRTYYLEDLSADAYGWCEQFNALIK 100
```

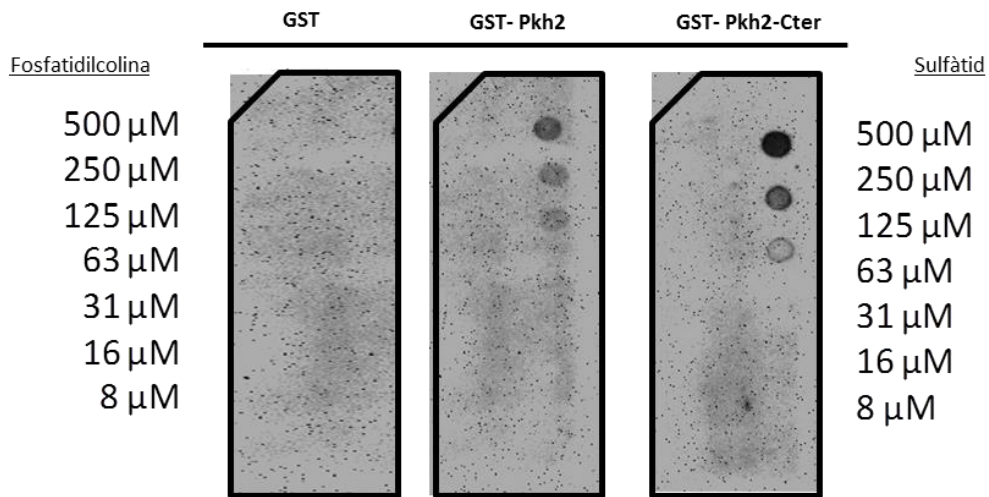
Pel que fa a Pkh3, no s'ha trobat cap regió d'homologia a Pleckstrina, segons el programari FFAS. Pel que fa a les seves regions desestructurades predites a partir del programari ANCHOR, que es mostren a la figura 48C, podem dir que la regió més C-terminal, compresa entre els residus 694-894, és una de les més desestructurades de Pkh3.

Tenint en compte els resultats d'alineament, podríem suposar que el domini C-terminal de Pkh2 també podria ser responsable de la unió al sulfàtid. Per comprovar que aquesta hipòtesis és certa, com en el cas de Pkh1, es va purificar la proteïna Pkh2 i el fragment C-terminal d'aquesta, fusionada a GST, seguint la mateixa estratègia descrita. Tal com es pot observar en la figura 49, Pkh2 també uneix sulfàtid, i un cop més el domini C-terminal sembla ser-ne el responsable, ja que aquest domini té aproximadament la mateixa afinitat pel sulfàtid que la proteïna sencera. A més, semblaria que Pkh2 tindria una afinitat similar pel sulfàtid que l'observada en el cas de Pkh1 (Figura 49).

A)



B)



**Figura 49. El domini C-terminal de Pkh2 també uneix sulfàtid amb una afinitat similar a la de Pkh1.** A) Tinció amb Oriole<sup>TM</sup> Fluorescent Gel Stain de la proteïna Pkh2 i els seu domini C-terminal, purificades i separades mitjançant electroforesi en gel de PAGE-SDS al 10% (p/v) on es mostren els pesos moleculars aproximats dels productes purificats. B) 3ml de solució contenint 0.5 μg/ml de cada proteïna purificada, GST (control negatiu), GST-Pkh2, i GST-Pkh2-Cter, s'ha incubat durant 16 h a 4 °C en unes membranes que contenen diferents dilucions de fosfatidilcolina ( de 500 a 8 μM, a l'esquerra), com a control negatiu, i diferents concentracions de sulfàtid (de 500 a 8 μM, a la dreta). La proteïna unida al lípid s'ha detectat utilitzant l'anticòs Anti-GST.

Observant aquests resultats, veiem que no es tracte d'un fet aïllat sinó que aquest esfingolípid, el sulfàtid, s'uneix tant a les dues Pkh redundants amb funcions essencials, Pkh1 i Pkh2, així com en el seu ortòleg PDK1. Aquest fet, ens pot fer pensar que els esfingolípid, i en concret el sulfàtid, podrien tenir un paper en la regulació de les proteïnes tipus PDK1, fet que encara s'ha d'estudiar.

### **2.6 . El domini C-terminal de Pkh1 és responsable de la sensibilitat als compostos que inhibeixen la ruta de síntesis dels esfingolípid.**

Per tant, tenint en compte els resultats anteriors, ens vam proposar estudiar com podia afectar l'absència del domini C-terminal de Pkh1 a la inhibició de la síntesi dels esfingolípid. L'estratègia dissenyada consistia en l'anàlisi dels efectes que tenen sobre el creixement cel·lular dos inhibidors diferents: 1) la miriocina (Myr), inhibidor específic de l'enzim serina palmitoiltransferasa (SPT) i, per tant, de la síntesi d'esfingolípid, i 2) l'aureobasidin A (AbA), que actua inhibint específicament l'enzim inositolfosforilceramida sintasa (*AUR1*) i, en conseqüència, la síntesi d'esfingolípid complexos. Per aquesta finalitat es van utilitzar les cèl·lules haploides de la soca AB01, prèviament descrita, on l'única activitat Pkh bé proporcionada pel gen (sencer o truncat a l'extrem C-terminal de la proteïna que codifica) de la Pkh1.

Per tal d'esbrinar com efecte la inhibició de la síntesi dels esfingolípid a la viabilitat cel·lular, es van fer créixer en medi líquid YPD en plaques de 96 pous la soca WT BY4741 i els haploides Pkh1 i Pkh1 $\Delta$ C-ter, en absència i presència de Myr a una concentració final de 1.5  $\mu$ M o en presència de AbA (0.108  $\mu$ M). A la figura 50A, s'observa com en una soca WT BY4741 la presència de l'inhibidor Myr té un efecte molt negatiu sobre el seu creixement, sent pràcticament nul en les primeres 24 h de creixement en presència d'aquest compost. Quan aquesta mateixa soca WT, en canvi, es fa créixer en presència d'un inhibidor específic de la síntesi dels esfingolípid complexos, AbA, s'observa que l'efecte sobre el creixement no és tant bruscat com en el cas de la miriocina (Figura 50A gràfic dret).



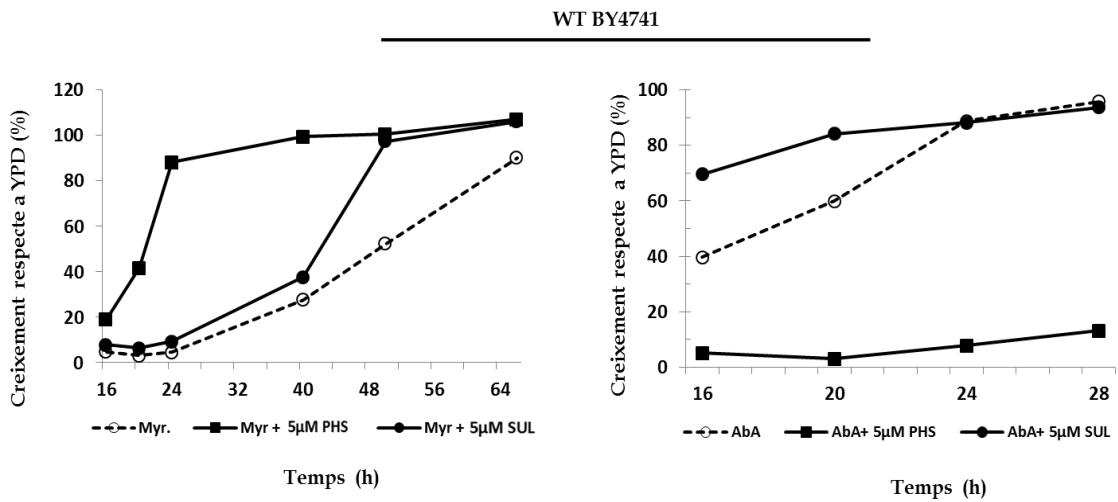
A diferència del que observàvem en condicions òptimes de creixement (Figura 40A), si que s'observa diferència en el fet de tenir o no el domini C-terminal de Pkh1 quan es fan créixer les cèl·lules en presència d'inhibidors de la ruta de síntesis dels esfingolípid. En la figura 50B es veu com el fet de no tenir el domini C-terminal confereix més resistència als compostos, Myr i AbA, en comparació als haploides Pkh1 que hi mostren una major sensibilitat. Per tant, podríem concloure a partir d'aquestes dades que el domini C-terminal és responsable de la sensibilitat a Myr i AbA.

A part també s'ha dut a terme un altre experiment paral·lel, que consisteix en l'addició d'esfingolípid com PHS i/o sulfàtid, a les cèl·lules tractades amb els inhibidors Myr i AbA, per tal de veure si els fenotips de creixement que causaven aquests inhibidors podien ser conseqüència de la manca de fitoesfingosina (PHS) o sulfàtid i, podrien ser rescatats per l'addició d'aquests lípid. Per tal de comprovar-ho, es van fer creixements líquids, com el cas anterior, en plaques de 96 pouets de la soca WT, Pkh1 i Pkh1 $\Delta$ C-ter, en medi YPD en presència de Myr i de PHS o Sulfàtid a una concentració final de 5  $\mu$ M. Així com també creixements en presència de AbA i amb sulfàtid.

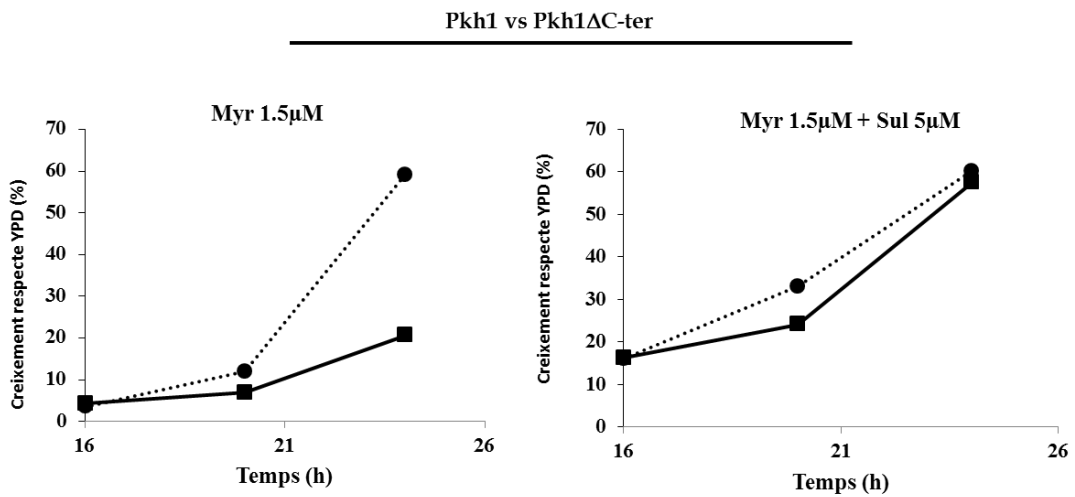
En la soca WT s'observa que l'addició de PHS, un component *upstream* de la ruta de síntesis dels esfingolípid complexos, la síntesi del qual es veu inhibida per la Myr, sembla millorar-li el creixement, és a dir li rescata l'efecte de la miriocina (Figura 50A gràfic esquerra). Per tant, part dels efectes sobre el creixement que té la Myr és conseqüència de la disminució dels nivells de PHS. Un efecte semblant, però amb menys eficàcia, sembla tenir l'addició del sulfàtid, indicant que no sembla ser l'absència d'un esfingolípid complex la causant del defecte de creixement causat per la miriocina. Si aquesta mateixa soca tractada amb AbA es fa créixer en presència de sulfàtid, observem com li millora el creixement, mostrant així, com l'addició de Sulfàtid hi té un efecte positiu (Figura 50A gràfic dret). A diferència del cas anterior cal dir però, que l'addició de PHS en una soca tractada amb AbA, resulta tòxic per la cèl·lula, això és deu a l'acumulació de PHS a la cèl·lula, ja que aquest lípid es troba *upstream* de l'element de la via de síntesi dels esfingolípid on actua l'inhibidor AbA (Figura 50A gràfic dret).

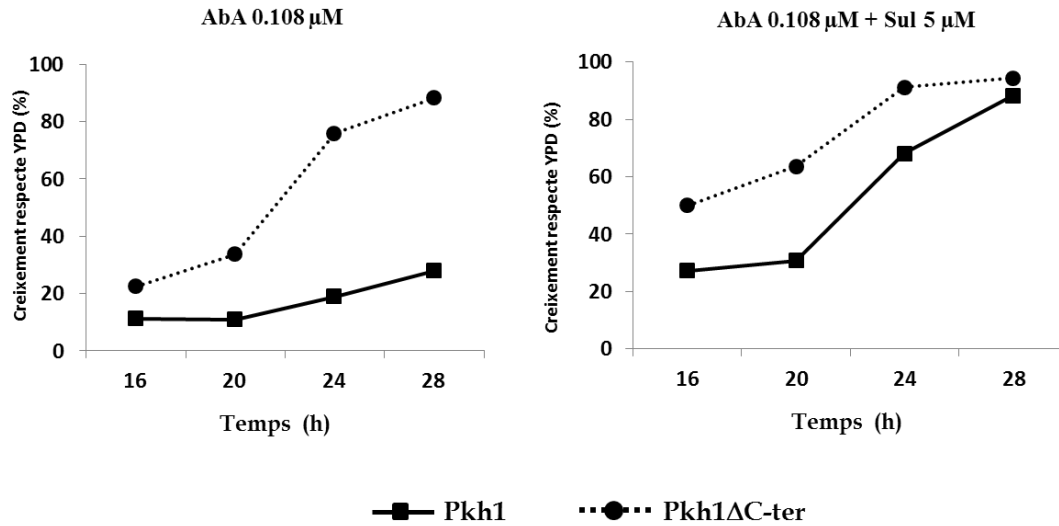
Pel que fa a les cèl·lules Pkh1 i Pkh1 $\Delta$ C-ter (Figura 50B), podem dir que l'efecte dels inhibidors, es veu rescatat en ambdós casos quan s'afegeix sulfatid al medi, sent molt més efectiu en el cas de l'inhibidor AbA. Així doncs, l'haploide Pkh1 mostra un creixement de gairebé el 100% a les 28 h de tractament amb AbA en presència de 5  $\mu$ M de sulfatid (Figura 50B, gràfic inferior dret).

A)



B)





**Figura 50. El domini C-terminal de Pkh1 és responsable de la sensibilitat a Myr i AbA.** A) El cultiu saturat de la soca WT BY4741 s'ha diluït fins  $OD_{660}$  0.004 en medi YPD que conté 1.5 μM de miriocina (Myr) amb presència o absència de fitoesfigosina (PHS) 5 μM o bé 5 μM de sulfàtid (SUL) (gràfic de l'esquerra). Per altre banda, s'ha diluït el cultiu saturat del WT fins  $OD_{660}$  0.004 en medi YPD que conté 0.108 μM d'Aureobasidin A (AbA) amb o sense PHS 5 μM o 5 μM de sulfàtid (SUL). Els cultius s'han fet créixer a 28 °C i les OD dels cultius a 595 nm s'han mesurat per cada temps indicat i s'han representat com a percentatges respecte el creixement en YPD. B) Els cultius saturats dels haploides Pkh1 i Pkh1ΔC-ter s'ha diluït fins  $OD_{660}$  0.004 en medi YPD contenint 1.5 μM de Myr amb o sense 5 μM de sulfàtid (Sul) o bé contenint 0.108 μM d'Aureobasidin A (AbA) amb o sense 5 μM de sulfàtid (Sul). Els cultius s'han fet créixer a 28 °C i les  $OD_{595}$  nm dels cultius s'han mesurat per cada temps indicat i s'han referit al percentatge de creixement respecte a YPD.

Podríem dir doncs, que encara que el domini no catalític de Pkh1 no sigui necessari per la supervivència cel·lular, si que sembla tenir un paper rellevant en la unió a esfingolípid i en la sensibilitat *in vitro* als compostos que inhibeixen la síntesis d'aquestes esfingolípid.

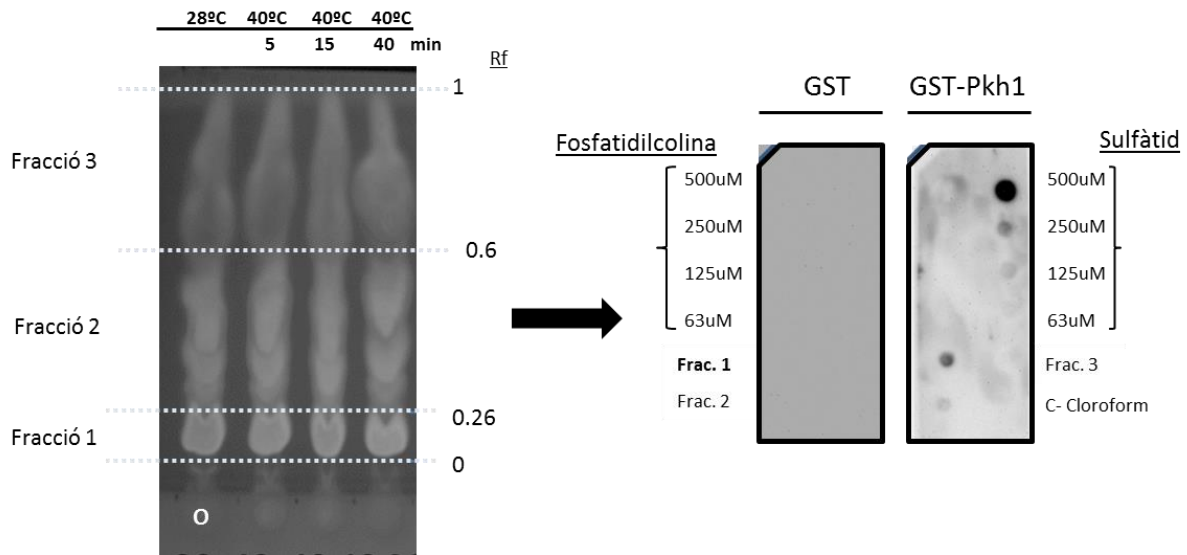
### **2.7 . La regió no catalítica de Pkh uneix un lípid polar present a un extracte lipídic de llevat.**

El fet de no trobar sulfàtid en l'extracte lipídic de llevat i de no disposar comercialment dels diferents esfingolípid complexos sintetitzats en cèl·lules de llevat, ens porta a plantejar-nos si la proteïna GST-Pkh1, és capaç de reconèixer i unir-se algun component lipídic d'aquest extracte. Per tal de poder respondre aquesta qüestió, es va fraccionar el lipidoma del llevat i es van dipositar mostres de les diferents fraccions sobre membranes. Aquestes membranes, es van incubar amb la proteïna purificada GST-Pkh1, per tal de detectar si la proteïna s'uneix alguna de les fraccions obtingudes.

En un primer experiment es va utilitzar una mescla de diferents extractes lipídics del llevat obtinguts a partir de cèl·lules de la soca WT BY4741 incubades a 28 °C o a 40 °C durant diferents temps (5, 15 i 40 min).

Els components dels extractes de lípids totals obtinguts com s'especifica a l'apartat 10 de materials i mètodes, es van separar pel mètode de cromatografia de capa fina HPTLC (veure apartat 11 de materials i mètodes), utilitzant la següent fase mòbil: cloroform: metanol: àcid acètic: aigua (63:50:1:4), (v:v). La cromatografia s'ha revelat utilitzant una solució de primuline i s'ha visualitzat per fluorescència. En aquest primer moment recuperem tres fraccions, separades en funció del seu valor Rf, i que comprenen la totalitat dels lípids extrets del llevat. Els lípids que componen cadascuna de les fraccions es van recuperar de la placa, es van resuspendre amb cloroform: metanol (1:1) i es van dipositar a una membrana de nitrocel·lulosa reforçada, juntament amb diferents dilucions de sulfàtid (control positiu) i de fosfatidilcolina (control negatiu).

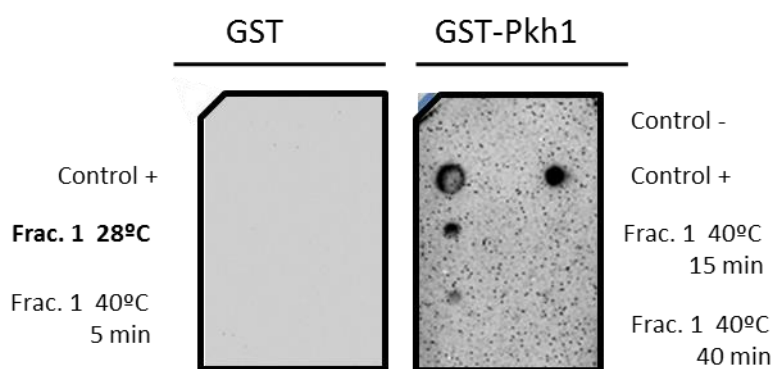
La figura 51, ens indica que la proteïna GST-Pkh1 és capaç de reconèixer algun component de la mescla lipídica que constitueix la fracció de menor mobilitat, que s'ha anomenat, número 1 (Rf comprès entre 0 i 0.26). Pel moment, es pot dir que els lípids que pertanyen en aquesta fracció són de caràcter polar, ja que són els que han migrat menys amb la fase mòbil utilitzada.



**Figura 51. Pkh1 s'uneix a la fracció 1 d'una mescla de lípids polars de llevat.** ( a l'esquerra) 75 ml de cultiu de la soca WT BY4741, per a cada condició, s'han fet créixer fins a una  $OD_{660} \approx 1$  a 28 °C. Tot seguit s'ha fet un xoc tèrmic a 40 °C de 5, 15 i 30 min. S'ha realitzat l'extracte lipídic total de les mostres, el qual s'ha carregat en una capa fina, on s'ha separat utilitzant la fase mòbil: cloroform: metanol: àcid acètic: aigua (63:50:1:4). La capa fina un cop seca, s'ha revelat amb la solució fluorescent de primulina i si han identificat 3 fraccions de diferent Rf: Fracció 1 Rf 0.26; Fracció 2 Rf 0.6 i la Fracció 3 Rf 1. Un cop recuperades aquestes fraccions de la placa es diposita 1  $\mu$ l ( $\approx 0.8 \mu$ g) de la mescla lipídica dissolta en cloroform, en una membrana de nitrocel·lulosa (a la dreta), juntament amb diferents dilucions de fosfatidilcolina (600-63  $\mu$ M) i de sulfàtid (600-63  $\mu$ M), i també com a control negatiu s'afegeix 1  $\mu$ l de cloroform. S'incuba amb 0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l de proteïna purificada GST o GST-Pkh1 i la proteïna unida es detecta amb l'anticòs anti-GST. En negreta es mostra la fracció que uneix GST-Pkh1 (Frac.1). L'origen de la capa fina es representa amb una circumferència amb blanc (o).

Sabent que hi ha algun component d'aquesta mescla lipídica de la Fracció 1 que s'uneix a la proteïna d'interès, s'ha fet un segon experiment per tal de determinar en quina condició de temperatura es dóna la presència d'aquest component lipídic. Per tant, els extractes lipídics anteriors, s'han tractat de manera independent, cada condició per separat i es recull la fracció 1 per a cada cas per dipositar-la sobre una nova membrana de nitrocel·lulosa, la qual es va incubar amb la proteïna GST-Pkh1. Tal com es pot observar en la figura 52, aquells extractes lipídics tractats a 40 °C durant més de 5 min, no s'hi uneix la proteïna, a diferència de la mostra de la fracció 1 tractada a condicions òptimes de creixement, 28 °C i amb menor intensitat, aquell extracte tractat durant 5 min a 40 °C. Per tant, aquests fets ens estan indicant, que el component lipídic que és capaç d'unir-se a la regió C-terminal de la

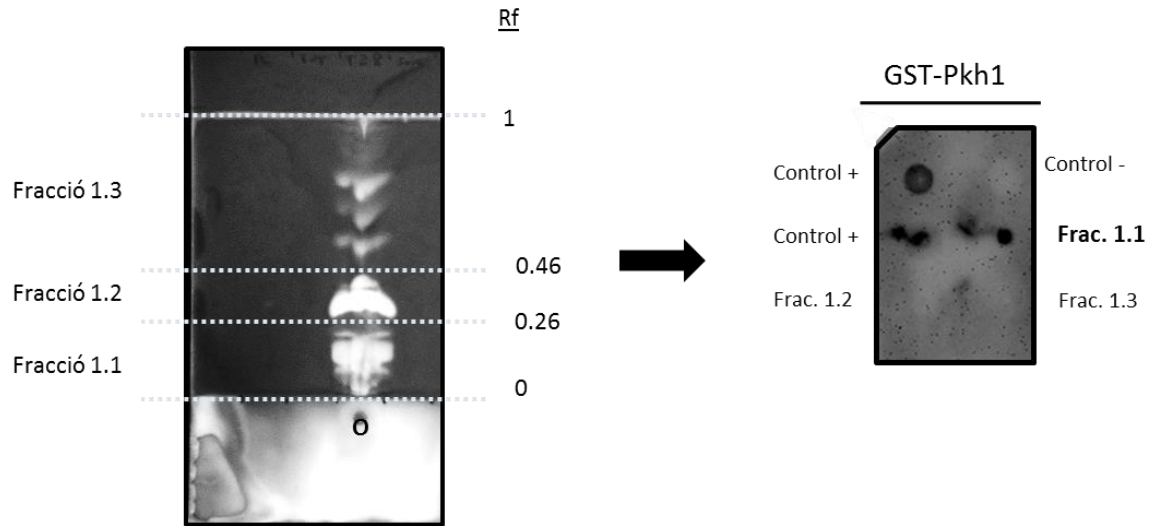
proteïna d'interès, desapareix durant un xoc tèrmic de més de 5 min a 40 °C, és a dir deixa de sintetitzar-se i/o es degrada. Aquest fet és contrari el que ens esperariem trobar, ja que s'ha observat que durant un xoc tèrmic, hi ha un increment dels esfingolípid, els quals actuarien com a mecanisme de protecció i com a segons missatgers, per tal d'activar un mecanisme de resposta a aquest estrès (Robert C Dickson et al., 2006). De totes maneres, desconeixem la naturalesa d'aquest lípid en qüestió i tampoc sabem quin paper funcional podria tenir sobre l'activació de la via Pkh.



**Figura 52. El lípid que s'uneix a Pkh deixa de sintetitzar-se durant un xoc tèrmic.** Les fraccions s'han obtingut seguint el mateix protocol descrit en la figura 41. En aquest cas però cada mostra ha estat tractada individualment. S'ha dipositat  $\approx 0.8 \mu\text{g}$  de la fracció 1 de l'extracte lipídic per a cada condició. Els controls positius corresponen a una concentració de  $600 \mu\text{M}$  de sulfàtid, i a  $0.8 \mu\text{g}$  de la fracció 1 que havia donat positiu en la figura 41. El control negatiu correspon a  $600 \mu\text{M}$  de fosfatilcolina. La membrana s'ha incubat  $0.5 \mu\text{g}/\text{ul}$  de proteïna GST o GST-Pkh1, i la proteïna unida s'ha detectat a partir de l'anticòs anti-GST. En negreta es mostra la fracció que uneix GST-Pkh1 (Frac.1 28 °C).

Un cop coneguda quina fracció conté els lípids que uneixen Pkh1 i en quines condicions es troba, es va intentar acotar una mica més, i veure si érem capaços d'aconseguir una subfracció que portés aquest lípid polar que uneix Pkh. Per això es va utilitzar una fase mòbil més polar: cloroform: metanol:  $\text{NH}_4\text{OH}$  (65:35:5), per tal de subfraccionar el conjunt de lípids presents a la fracció 1. En la figura 53, s'observa la capa fina d'aquest subfraccionament, on distingim 3 fraccions diferents segons el seu  $R_f$ , les quals s'han anomenat fracció 1.1 ( $R_f < 0.26$ ); fracció 1.2 ( $0.26 < R_f < 0.46$ ) i fracció 1.3 ( $R_f < 0.46$ ). Els lípids d'aquestes noves subfraccions, es van purificar i dipositar sobre la membrana de nitrocel·lulosa pel mateix mètode descrit anteriorment. Els resultats de l'assaig d'unió amb GST-Pkh1 denota que la proteïna Pkh1, s'uneix específicament a

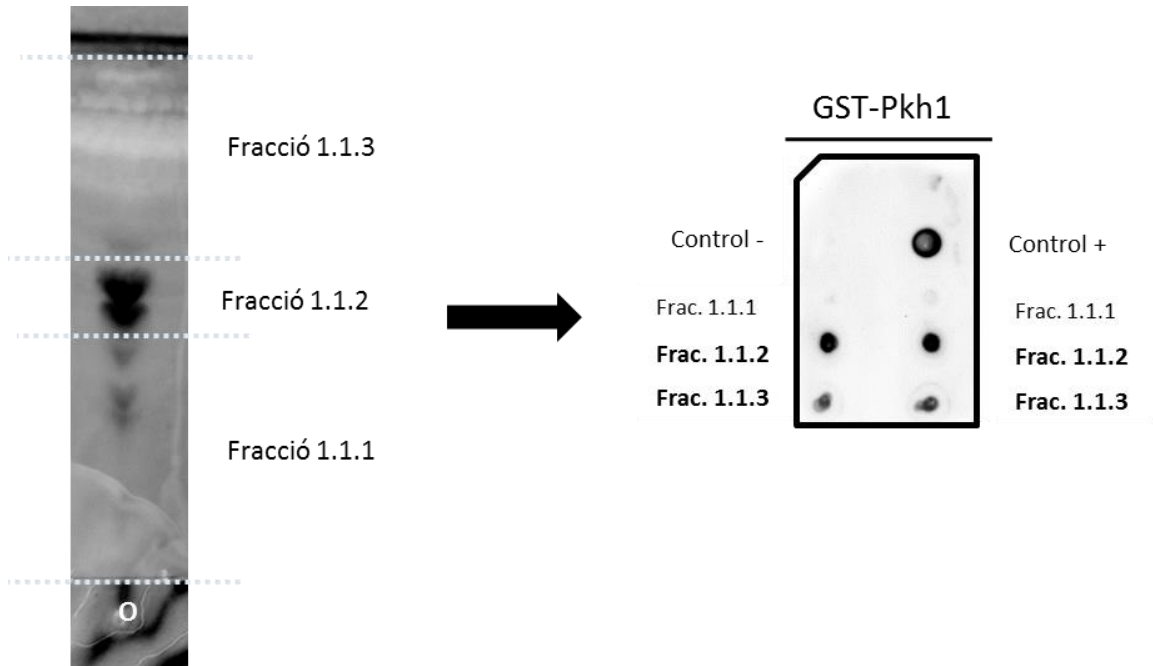
la subfracció 1.1, amb una afinitat molt similar a l'observada per la fracció 1. Per tant, podem estar segurs que el o els lípids d'interès es troben en aquesta subfracció i que un cop més mostra ser la més polar de les fraccions (Figura 53).



**Figura 53. Pkh1 s'uneix a la fracció 1.1 d'un extracte lipídica de llevat.** (a l'esquerra) La fracció lipídica 1 d'un extracte de llevat creixent a 28 °C, s'ha separat per cromatografia de capa fina utilitzant la fase mòbil: cloroform: metanol: NH<sub>4</sub>OH (65:35:5). La capa fina un cop seca, s'ha revelat amb la solució fluorescent de primulina i si han identificat 3 subfraccions de diferent Rf: Fracció 1.1 Rf<0.26; Fracció 1.2 Rf 0.26-0.46 i la Fracció 1.3 Rf>0.46. Un cop recuperades aquestes fraccions de la placa es disposa 1 µl (≈0.8 µg) de la mescla lipídica dissolta en cloroform, en una membrana de nitrocel·lulosa (a la dreta), juntament amb un control positiu de sulfàtid (600 µM) i un control positiu corresponent a 0.8 µg de la fracció 1. I un control negatiu corresponent a fosfatidilcolina (600 µM). S'incuba amb 0.5µg/ul de proteïna purificada GST-Pkh1 i la proteïna unida es detecta amb l'anticòs anti-GST. En negreta es mostra la fracció que uneix GST-Pkh1 (Frac.1.1). L'origen de la capa fina es representa amb una circumferència (o).

Per tal de discernir els diferents components lipídics que formen part de la subfracció 1.1, vam separar novament aquesta fracció en una nova HPTLC amb la mateixa fase mòbil esmentada en la darrera cromatografia, desenvolupant però, sis vegades la cromatografia, obtenint així un perfil de bandes fàcilment fraccionable, tal com es mostra a la figura 54. Un cop més es distribueixen aquestes bandes en tres fraccions diferents (1.1.1, 1.1.2, 1.1.3) en funció del Rf i recuperem els lípids presents en cadascuna d'aquestes fraccions, per tot seguit dipositar-les en una membrana i observar si hi ha unió per part de Pkh1. Es pot observar doncs, que la GST-Pkh1,

s'uneix tant a la fracció 1.1.2 com a la 1.1.3, sent més intensa però la unió a 1.1.2 (Figura 54).



**Figura 54. Pkh1 s'uneix a la fracció 1.1.2 i 1.1.3.** (a l'esquerra) La fracció lipídica, 1.1 d'extracte de llevat s'ha separat per cromatografia de capa fina utilitzant la fase mòbil: cloroform: metanol:  $\text{NH}_4\text{OH}$  (65:35:5), un cop seca la capa fina s'ha repetit el procés fins a 6 vegades. S'ha revelat amb la solució fluorescent de primulina i si han identificat 3 subsubfraccions diferents: Fracció 1.1.1; Fracció 1.1.2 i la Fracció 1.1.3. Un cop recuperades aquestes fraccions de la placa es diposita  $1 \mu\text{l}$  ( $\approx 0.8 \mu\text{g}$ ) de la mescla lipídica dissolta en cloroform, en una membrana de nitrocel·lulosa (a la dreta), juntament amb un control positiu de sulfàtid ( $600 \mu\text{M}$ ) i un control negatiu, fosfatidilcolina ( $600 \mu\text{M}$ ). S'incuba amb  $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  de proteïna purificada GST-Pkh1 i la proteïna unida es detecta amb l'anticòs anti-GST. En negra es mostren les fraccions que uneixen GST-Pkh1 (Frac.1.1.2 i 1.1.3). L'origen de la capa fina es representa amb una circumferència (o).

Es tractaria, doncs a hores d'ara d'intentar identificar la naturalesa d'aquest o aquests possibles esfingolípid, que es troben en aquestes fraccions lipídiques identificades, 1.1.2, majoritàriament i 1.1.3, els quals són reconeguts per una regió de 98 aa de l'extrem del domini C-terminal de Pkh1. Per això, s'està intentant trobar una col·laboració amb un grup que tingui experiència en lípids i que disposi de tècniques d'identificació de lípids com seria l'espectrometria de masses, molt útil pel nostre objectiu d'identificar quina és la naturalesa dels lípids polars i veure si com han observat diferents autors com Liu i Dickson (Robert C Dickson et al., 2006; K. Liu et al.,



2005), es tracte d'un LCB, ja sigui DHS o PHS o bé si es tracte d'un element *upstream* o *downstream* de la via de síntesis dels esfingolípid. Seria una dada molt valuosa pel nostre treball, que malauradament no disposem a dia d'avui, però que esperem tenir-la en un futur molt pròxim. Fins el moment però, podem estudiar si els lípids d'aquestes fraccions identificades, a més a més d'unir Pkh1, tenen la capacitat de modificar la seva activitat, com es detalla al següent punt.

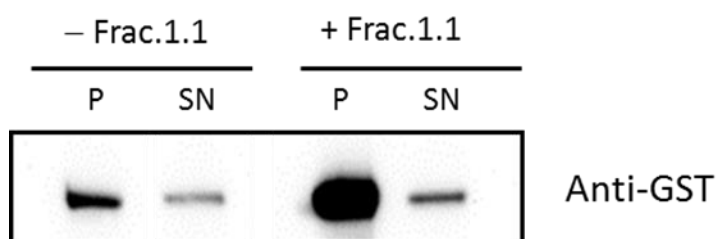
### **2.8 . Pkh1 s'uneix a liposomes que contenen diferents lípids polars de llevat o sulfàtid.**

Per tal de confirmar la unió observada pels assaigs de *fat western*, a la fracció lipídica identificada com 1.1 i sulfàtid, s'ha realitzat un assaig de *binding*, mitjançant la formació de liposomes que contenen els diferents lípids polars de llevat o bé sulfàtid.

L'assaig de *binding*, s'ha realitzat mitjançant la formació de liposomes (veure apartat 13 de materials i mètodes) tant de lípids estructurals (fosfatidilcolina i colesterol, com a control negatiu) com de liposomes que a més a més porten sulfàtid a una relació molar de 1:1:1.6 o bé porten la fracció lipídica 1.1 en una relació 2:2:1 tenint en compte els µg totals de cada component. Aquests liposomes s'han incubat amb 3 µg de proteïna GST-Pkh1 seguint el protocol descrit (apartat 14 materials i mètodes) i s'ha realitzat un *western blot* per tal de detectar la proteïna unida al liposomes o bé la proteïna no unida del sobrenedant, mitjançant l'anticòs anti-GST.

**2.8.1 Assaig de *binding* amb liposomes de la fracció lipídica 1.1 de llevat.**

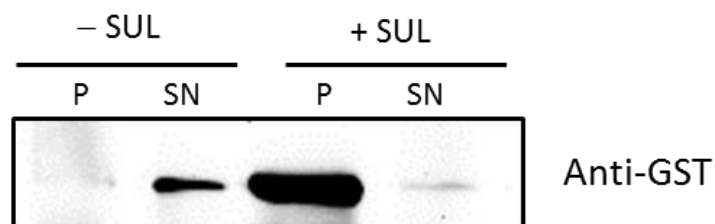
L'assaig de *binding*, realitzat tal com s'ha descrit anteriorment, ens ha permès comprovar *in vitro*, que la proteïna Pkh1 s'uneix als liposomes que contenen la fracció 1.1 de l'extracte lipídic de llevat, però no totalment, ja que tal com es mostra a la figura 55, la proteïna d'interès també s'uneix en part als liposomes estructurals i en roman una quantitat en el sobrenedant d'ambdós casos.



**Figura 55. Assaig de *binding* de Pkh1 amb liposomes que contenen la fracció lipídica de llevat, 1.1.** 100 µg de fosfatidilcolina i 100 µg de colesterol es van utilitzar per formar els liposomes control (-Frac. 1.1), per formar els liposomes que contenen la fracció 1.1 es van utilitzar 40 µg de fracció 1.1, 80 µg de fosfatidilcolina i 80 µg de colesterol a una relació de µg totals 40:40:20. 125 µg de liposomes es van incubar amb 3 µg de proteïna GST-Pkh1 purificada en 400 µl de tampó d'elució glutatió, durant una hora per inversió. Finalment es va centrifugar la mescla liposomes-proteïna durant 10 min a 15.700 x g a temperatura ambient i es va obtenir per separat el sobrenedant (SN) i el pellet (P), on es troben els liposomes. El pellet es va resuspendre en 50 µl de tampó D, dels quals només 25 µl es van carregar en un gel desnaturalitzant de SDS amb poliacrilamida al 10 %, juntament amb 25 µl de la mostra SN. Les proteïnes unides als liposomes o bé solubles, presents al SN, es van detectar mitjançant l'anticòs anti-GST.

**2.8.2 Assaig de *binding* amb liposomes de sulfàtid.**

Aquest assaig ens ha permès comprovar *in vitro*, que la proteïna Pkh1 s'uneix efectivament al sulfàtid (Figura 56) tal com s'havia pogut observar en els experiments de *fat western*, ja que els liposomes que contenen sulfàtid uneixen tota la proteïna GST-Pkh1 (pellet), mentre que en els liposomes estructurals (-SUL) la proteïna resta tota en el sobrenedant.



**Figura 56. Assaig de *binding* de Pkh1 amb liposomes de sulfàtid.** 133.36 µg de fosfatidilcolina i 66.67 µg de colesterol es van utilitzar per formar els liposomes control (-SUL). Per formar els liposomes que contenen sulfàtid es van utilitzar 112.40 µg de sulfàtid, 57.16 µg de fosfatidilcolina i 28.6 µg de colesterol a una relació molar de 1:1:1.6. 110 µg de liposomes es van incubar amb 3 µg de proteïna GST-Pkh1 purificada en 400 µl de tampó d'elució glutatió, durant una hora, agitant, per inversió. Finalment es va centrifugar la mescla liposomes-proteïna durant 10 min a 15.700 x g a temperatura ambient i es va obtenir per separat el sobrenedant (SN) i el pellet (P), on es troben els liposomes. El pellet es va resuspendre en 50 µl de tampó D, dels quals només 25 µl es van carregar en un gel desnaturalitzant de SDS amb poliacrilamida al 10 %, juntament amb 25 µl de la mostra SN. Les proteïnes unides al liposomes o bé solubles, presents al SN, es van detectar mitjançant l'anticòs anti-GST.

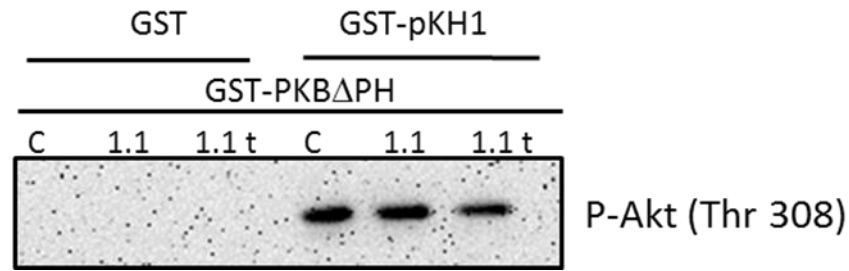
Cal tenir en compte que els liposomes estructurals emprats en ambdós casos no són exactament els mateixos, la diferència rau en les proporcions de cada component, fosfatidilcolina i colesterol, mentre que pel cas del liposomes control del sulfàtid es té en compte la relació molar (1:1), en els liposomes usats com a control per la fracció lipídica d'estudi es té en compte la quantitat de µg totals utilitzats per cada lípid estructural (50:50), aquesta diferència de relacions fa que la quantitat final en µg de colesterol sigui molt més elevada en el darrer cas. En llevats no hi ha l'esterol colesterol com a tal, sinó que s'hi troba ergosterol, cosa que podria explicar aquesta unió parcial de la proteïna GST-Pkh1 als liposomes control pel cas de les fraccions lipídiques de llevat, encara que si observem la figura 55, la quantitat de proteïna unida en els liposomes que contenen la fracció 1.1 és molt més elevada que la que s'uneix als liposomes control. Per tant podem concloure que la proteïna GST-Pkh1 si que s'uneix *in vitro* a aquesta mescla lipídica continguda a la fracció 1.1.

## **2.9 . La unió als diferents lípids polars de llevat o a sulfàtid modifiquen l'activitat de Pkh1 de manera diferent.**

D'aquesta manera hem comprovat que *in vitro* es dona la unió per part de la proteïna Pkh1 a sulfàtid per una banda i a la fracció lipídica 1.1 per l'altra. A continuació ens vam plantejar determinar si aquests liposomes, bé amb sulfàtid o bé amb la fracció 1.1 de la mescla de lípids de llevat, modifiquen l'activitat cinasa de Pkh1. És a dir, observar si el fet d'afegir liposomes amb sulfàtid o bé la fracció 1.1 de la mescla de lípids de llevat, modifica la capacitat de Pkh1 per fosforilar el seu substrat. En aquest cas es va utilitzar la proteïna cinasa humana PKB com a substrat de Pkh, com ja es va utilitzar en assajos previs (Casamayor et al., 1999). La proteïna substrat PKB es troba fusionada a GST i li manca el domini PH d'unió a fosfoinosítids, per la qual cosa no és necessari l'ús de PIP<sub>3</sub> per tal de que es pugi fosforilar.

### **2.9.1 Assaig Pkh1 cinasa amb liposomes de la fracció lipídica 1.1 de llevat.**

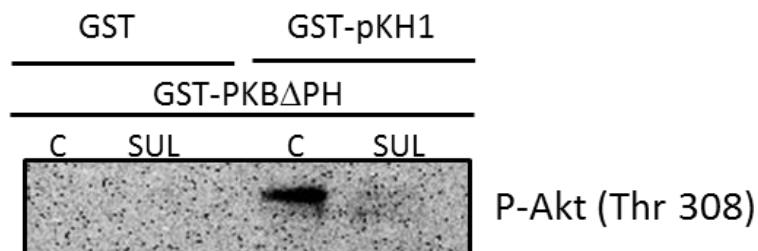
S'han utilitzat liposomes que contenen la fracció 1.1 tant procedent d'un cultiu tractat en condicions normals de creixement com d'un cultiu que s'ha sotmès a un estrès tèrmic de 40 °C durant 40 min. Com es pot observar a la figura 57, el fet de que en la reacció hi hagi o no aquesta fracció lipídica sembla no afectar a la fosforilació de PKB $\Delta$ PH, és a dir que no té cap efecte aparent sobre l'activació de Pkh1, almenys en les condicions utilitzades.



**Figura 57. L'activitat de Pkh1 no es veu modificada per la unió a la fracció 1.1.** 25 µg de liposomes preparats a partir de 95 µg de fosfatidilcolina, 95 µg de colesterol i 10 µg de la fracció 1.1 de cèl·lules incubades a 28 °C (1.1), i de la mateixa fracció procedent de cèl·lules incubades a 40 °C durant 40 min (1.1 t) o de liposomes control preparats com a la Figura 51, s'incubaven amb 50 ng de proteïna GST o GST-Pkh1 purificada i amb 50 ng totals de proteïna GST-PKBΔPH (com a substrat de Pkh1), juntament amb 15 µl de buffer cinasa, en un volum final de 50 µl de reacció. L'assaig s'ha realitzat incubant a 30 °C durant 30 min. La reacció s'ha parat afegint tampó de carrega i bullint la reacció durant 5 min. Es carreguen 30 µl de reacció en un gel d'acrilamida al 10% i la fosforilació de PKB es detecta utilitzant l'anticòs anti-P-Akt (Thr 308).

### 2.9.2 Assaig Pkh1 cinasa amb liposomes de sulfàtid.

En la figura 58 es pot observar com el fet d'afegir liposomes que contenen sulfàtid en la reacció de GST-Pkh1 i PKBΔPH, fa disminuir la capacitat de fosforilació de Pkh1 envers PKBΔPH sent pràcticament nul·la, per tant es podria dir que aquesta unió Pkh1-sulfàtid regula negativament l'activitat de Pkh1, ja que el seu control negatiu amb liposomes estructurals Pkh1 si que fosforila PKBΔPH.



**Figura 58. El sulfàtid modifica negativament l'activitat de Pkh1.** Per l'assaig Pkh1 cinasa s'ha utilitzat 25 µg (12.5 µl) de liposomes obtinguts a partir de 112.40 µg de sulfàtid, 57.16 µg de fosfatidilcolina i 28.6 µg de colesterol a una relació molar de 1:1:1.6. Els liposomes s'han incubat amb 50 ng totals de proteïna GST o GST-Pkh1 purificada i amb 50 ng totals de proteïna GST-PKBΔPH (com a substrat de Pkh1), juntament amb 15 µl de buffer cinasa, en un volum final de 50 µl de reacció. L'assaig s'ha realitzat incubant a 30 °C durant 30 min. La reacció s'ha parat afegint tampó de carrega i bullint la reacció durant 5 min. Es carreguen 30 µl de reacció en un gel d'acrilamida al 10% i la fosforilació de PKB es detecta utilitzant l'anticòs anti-P-Akt (Thr 308).

Per una banda aquests resultats ens estan indicant que la naturalesa del lípid en estudi de llevat, que és capaç d'unir-se a la regió C-terminal de Pkh1, presenta una naturalesa diferents a la del sulfàtid. Les primeres proves realitzades mostren que el sulfàtid té un efecte negatiu sobre l'activitat de Pkh1, disminuint la fosforilació de PKB $\Delta$ PH i per tant inactivant, possiblement, una o diverses de les vies que tenen origen en Pkh. La mescla lipídica amb capacitat d'unir-se a Pkh1, en canvi, semblaria no tenir cap paper en la regulació i/o modificació de l'activitat de Pkh1 i per tant, en la seva capacitat d'activar els seus respectius substrats. No es pot descartar, però, que aquesta mescla contingui diferents lípids amb diferents efectes sobre l'activitat de Pkh1.

A hores d'ara, caldria doncs, verificar l'efecte del sulfàtid sobre PDK1 humana en la seva capacitat de fosforilar tant la PKB $\Delta$ PH, com la situació més fisiològica, que consistiria en utilitzar com a substrat la PKB entera, en presència de sulfàtid i a més en presència de fosfoinosítids.



## **VII. CONCLUSIONS**

---





### 1. Caracterització de les soques delecionades per Pkh

L'estratègia de regular l'expressió del gen *PKH2* pel promotor tetO<sub>7</sub>, regulable per doxiciclina, ens ha permès generar diverses soques on podem delecionar les proteïnes Pkh sense necessitat d'induir estrès tèrmic a les cèl·lules. Gràcies a aquestes soques s'ha pogut concloure que:

- L'activitat Pkh és essencial pel creixement normal de les cèl·lules de llevat i no efecte només a la via de la CWI. Els defectes en el creixement de les cèl·lules sense Pkh no són únicament degut a lisis cel·lular, tot i que l'activació de la via de la CWI parcialment restaura el creixement de les cèl·lules sense Pkh. La disminució d'activitat Pkh provoca sensibilitat a estressos de paret cel·lular.
- Les proteïnes Pkh són essencials per la normal fosforilació de Slt2 sota condicions d'estrès de paret cel·lular.
- Els anàlisis de microarrays ens han permès observar que a) la falta de Pkh dóna una resposta transcripcional semblant a la induïda per una resposta a xoc tèrmic i estrès oxidatiu i b) existeix una notable atenuació dels canvis transcripcionals causats per un xoc tèrmic en les cèl·lules que els manca l'activitat Pkh. Això pot indicar que PKH és un mediador essencial de la transcripció provocada per un estrès tèrmic o bé que l'alt nivell d'expressió dels gens implicats en la resposta a estressos en cèl·lules sense Pkh impedeix la inducció addicional de l'expressió d'aquestes gens sota condicions d'estrès.
- Les proteïnes Pkh són importants per la regulació transcripcional dels gens controlats pels factors de transcripció Hsf1 i Msn2/4, implicats en la inducció dels gens de resposta a estrès.

- La falta de Pkh desencadena un estat d'estrès oxidatiu que resulta concomitant amb una situació de mort cel·lular que és independent de la metacaspasa Mca1. Ambdós fenotips són parcialment rescatats per l'activació constitutiva de la via MAPK Slr2.
- Les Pkh podrien ser considerades com a dianes de medicaments antifúngics atès que, en conjunció amb altres fàrmacs que afecten la paret cel·lular, causarien la mort cel·lular de llevats patògens.

### **2. Estudi de la funció del domini C-terminal de les proteïnes Pkh.**

- La generació d'haplòides, on l'única activitat Pkh ve proporcionada per un plasmidi, ens ha permès estudiar la funció del domini C-terminal de les proteïnes Pkh, fins ara totalment desconegut, i observar que aquest domini no és essencial per la supervivència cel·lular en condicions òptimes de creixement.
- El domini C-terminal de Pkh no és important per la fosforilació de Slr2 sota condicions d'estrès de paret cel·lular.
- A diferència de PDK1, les proteïnes Pkh no uneixen fosfoinosítids. Pkh1 i Pkh2, així com PDK1, són capaces d'unir sulfàtid, el qual no es troba en llevat.
- La regió de Pkh1 responsable d'unir-se al sulfàtid és el domini C-terminal de les Pkh, en concret els últims 100 aa.
- El domini C-terminal de les proteïnes Pkh és responsable de la sensibilitat als inhibidors de la síntesi d'esfingolípid. L'addició de PHS i, en menor mesura, de sulfàtid disminueix l'efecte nociu dels diferents inhibidors, indicant així que el sulfàtid podria tenir un paper funcional *in vitro*.

- El domini C-terminal reconeix i s'uneix a lípids de caràcter polar que es troben a la fracció lipídica 1.1 ( i en concret a les 1.1.2 i 1.1.3) que hem obtingut a partir de diferents cromatografies HPTLC i que resten pendents d'identificació.
- El sulfàtid té un efecte negatiu sobre l'activitat de Pkh1, mentre que la fracció lipídica 1.1 no la modifica.



## **VIII. BIBLIOGRAFIA**

---



- Adams, A., Gottschlings, D.E., Kaiser, C.A., and Stearns, T. (1997). *Methods in Yeast Genetics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Aerts, A. M., Zabrocki, P., François, I. E. J. A., Carmona-Gutierrez, D., Govaert, G., Mao, C., ... Thevissen, K. (2008). Ydc1p ceramidase triggers organelle fragmentation, apoptosis and accelerated ageing in yeast. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, *65*(12), 1933–42.
- Alberola, T. M., García-Martínez, J., Antúnez, O., Viladevall, L., Barceló, A., Ariño, J., & Pérez-Ortín, J. E. (2004). A new set of DNA macrochips for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: features and uses. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, *7*(3), 199–206.
- Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., & Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Current biology : CB*, *7*(4), 261–9.
- Alexandre, H., Ansanay-Galeote, V., Dequin, S., & Blondin, B. (2001). Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, *498*(1), 98–103.
- 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 radical biology & medicine*, *37*(1), 23–35.
- Almeida, T., Marques, M., Mojzita, D., Amorim, M. A., Silva, R. D., Almeida, B., ... Costa, V. (2008). Isc1p plays a key role in hydrogen peroxide resistance and chronological lifespan through modulation of iron levels and apoptosis. *Molecular biology of the cell*, *19*(3), 865–76.
- Amorós, M., & Estruch, F. (2001). Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes *HSP26* and *HSP104* in a gene- and stress type-dependent manner. *Molecular microbiology*, *39*(6), 1523–32.
- Andrews, P. D., & Stark, M. J. (2000). Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth. *Journal of cell science*, *113* (15), 2685–93.
- Baetz, K., Moffat, J., Haynes, J., Chang, M., & Andrews, B. (2001). Transcriptional coregulation by the cell integrity mitogen-activated protein kinase Slt2 and the cell cycle regulator Swi4. *Molecular and cellular biology*, *21*(19), 6515–28.
- Bayascas, J. R. (2010). PDK1: the major transducer of PI 3-kinase actions. *Current topics in microbiology and immunology*, *346*, 9–29.



- Beeler, T., Bacikova, D., Gable, K., Hopkins, L., Johnson, C., Slife, H., & Dunn, T. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* TSC10/YBR265w gene encoding 3-ketosphinganine reductase is identified in a screen for temperature-sensitive suppressors of the Ca<sup>2+</sup>-sensitive csg2Delta mutant. *The Journal of biological chemistry*, 273(46), 30688–94.
- Behn-Krappa, A., & Newton, A. C. (1999). The hydrophobic phosphorylation motif of conventional protein kinase C is regulated by autophosphorylation. *Current biology : CB*, 9(14), 728–37.
- Boender, L. G. M., Almering, M. J. H., Dijk, M., van Maris, A. J. A., de Winde, J. H., Pronk, J. T., & Daran-Lapujade, P. (2011). Extreme calorie restriction and energy source starvation in *Saccharomyces cerevisiae* represent distinct physiological states. *Biochimica et biophysica acta*, 1813(12), 2133–44.
- Bond, U. (2006). Stressed out! Effects of environmental stress on mRNA metabolism. *FEMS yeast research*, 6(2), 160–70.
- Bonilla, M., & Cunningham, K. W. (2003). Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca<sup>2+</sup> signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Molecular biology of the cell*, 14(10), 4296–305.
- Boorsma, A., de Nobel, H., ter Riet, B., Bargmann, B., Brul, S., Hellingwerf, K. J., & Klis, F. M. (2004). Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 21(5), 413–27.
- 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, 248–54.
- Bro, C., Regenberg, B., Lagniel, G., Labarre, J., Montero-Lomelí, M., & Nielsen, J. (2003). Transcriptional, proteomic, and metabolic responses to lithium in galactose-grown yeast cells. *The Journal of biological chemistry*, 278(34), 32141–9.
- 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(11), 6517–25.
- Caba, E., Dickinson, D. A., Warnes, G. R., & Aubrecht, J. (2005). Differentiating mechanisms of toxicity using global gene expression analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation research*, 575(1-2), 34–46.
- Cabib, E., Drgonová, J., & Drgon, T. (1998). Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annual review of biochemistry*, 67, 307–33.
- Carmona-Gutierrez, D., Reisenbichler, A., Heimbucher, P., Bauer, M. A., Braun, R. J., Ruckenstuhl, C., ... Madeo, F. (2011). Ceramide triggers metacaspase-independent mitochondrial cell death in yeast. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 10(22), 3973–8.

- Casamayor, A., Torrance, P. D., Kobayashi, T., Thorner, J., & Alessi, D. R. (1999). Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Current biology : CB*, *9*(4), 186–97.
- Chen, P., Lee, K. S., & Levin, D. E. (1993). A pair of putative protein kinase genes (*YPK1* and *YPK2*) is required for cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & general genetics : MGG*, *236*(2-3), 443–7.
- Christianson, T. W., Sikorski, R. S., Dante, M., Shero, J. H., & Hieter, P. (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene*, *110*(1), 119–22.
- Cid, V. J., Cenamor, R., Sánchez, M., & Nombela, C. (1998). A mutation in the Rho1-GAP-encoding gene *BEM2* of *Saccharomyces cerevisiae* affects morphogenesis and cell wall functionality. *Microbiology (Reading, England)*, *144*(1), 25–36.
- Cid, V. J., Durán, A., del Rey, F., Snyder, M. P., Nombela, C., & Sánchez, M. (1995). Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews*, *59*(3), 345–86.
- 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 Slt2/Mpk1p MAP kinase in *S. cerevisiae*. *FEBS letters*, *527*(1-3), 186–92.
- Costigan, C., Gehrung, S., & Snyder, M. (1992). A synthetic lethal screen identifies *SLK1*, a novel protein kinase homolog implicated in yeast cell morphogenesis and cell growth. *Molecular and cellular biology*, *12*(3), 1162–78.
- Coyle, J. T., & Puttfarcken, P. (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science (New York, N.Y.)*, *262*(5134), 689–95.
- Crauwels, M., Donaton, M. C., Pernambuco, M. B., Winderickx, J., de Winde, J. H., & Thevelein, J. M. (1997). The Sch9 protein kinase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* controls cAPK activity and is required for nitrogen activation of the fermentable-growth-medium-induced (FGM) pathway. *Microbiology (Reading, England)*, *143*(8), 2627–37.
- Daquinag, A., Fadri, M., Jung, S. Y., Qin, J., & Kunz, J. (2007). The yeast PH domain proteins Slm1 and Slm2 are targets of sphingolipid signaling during the response to heat stress. *Molecular and cellular biology*, *27*(2), 633–50.
- Daran-Lapujade, P., Jansen, M. L. A., Daran, J.-M., van Gulik, W., de Winde, J. H., & Pronk, J. T. (2004). Role of transcriptional regulation in controlling fluxes in central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. A chemostat culture study. *The Journal of biological chemistry*, *279*(10), 9125–38.

- 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. *The Journal of biological chemistry*, 270(50), 30157–61.
- 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 (Reading, England)*, 146(9), 2121–32.
- deHart, A. K. a, Schnell, J. D., Allen, D. a, & Hicke, L. (2002). The conserved Pkh-Ypk kinase cascade is required for endocytosis in yeast. *The Journal of cell biology*, 156(2), 241–8.
- Delley, P. A., & Hall, M. N. (1999). Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *The Journal of cell biology*, 147(1), 163–74.
- Demple, B., & Harrison, L. (1994). Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annual review of biochemistry*, 63, 915–48.
- Dickson, R C. (1998). Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison to mammals. *Annual review of biochemistry*, 67, 27–48.
- Dickson, R C, Nagiec, E. E., Skrzypek, M., Tillman, P., Wells, G. B., & Lester, R. L. (1997). Sphingolipids are potential heat stress signals in *Saccharomyces*. *The Journal of biological chemistry*, 272(48), 30196–200.
- Dickson, Robert C. (2008). Thematic review series: sphingolipids. New insights into sphingolipid metabolism and function in budding yeast. *Journal of lipid research*, 49(5), 909–21.
- Dickson, Robert C, & Lester, R. L. (2002). Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta*, 1583(1), 13–25.
- Dickson, Robert C, Sumanasekera, C., & Lester, R. L. (2006). Functions and metabolism of sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Progress in lipid research*, 45(6), 447–65.
- Dodou, E., & Treisman, R. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecular and cellular biology*, 17(4), 1848–59.
- 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(1), 61–70.
- Dosztányi, Z., Mészáros, B., & Simon, I. (2009). ANCHOR: web server for predicting protein binding regions in disordered proteins. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(20), 2745–6.

- Dueñas-Sánchez, R., Gutiérrez, G., Rincón, A. M., Codón, A. C., & Benítez, T. (2012). Transcriptional regulation of fermentative and respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* industrial bakers' strains. *FEMS yeast research*, *12*(6), 625–36.
- Dujon, B., Albermann, K., Aldea, M., Alexandraki, D., Ansorge, W., Arino, J., ... Kleine, K. (1997). The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XV. *Nature*, *387*(6632 Suppl), 98–102.
- Dupres, V., Alsteens, D., Wilk, S., Hansen, B., Heinisch, J. J., & Dufrêne, Y. F. (2009). The yeast Wsc1 cell surface sensor behaves like a nanospring in vivo. *Nature chemical biology*, *5*(11), 857–62.
- Duronio, V. (2008). The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *The Biochemical journal*, *415*(3), 333–44.
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., & Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(25), 14863–8.
- Engqvist-Goldstein, A. E. Y., & Drubin, D. G. (2003). Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annual review of cell and developmental biology*, *19*, 287–332.
- 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*(4), 477–85.
- Estruch, F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS microbiology reviews*, *24*(4), 469–86.
- Fairn, G. D., Macdonald, K., & McMaster, C. R. (2007). A chemogenomic screen in *Saccharomyces cerevisiae* uncovers a primary role for the mitochondria in farnesol toxicity and its regulation by the Pkc1 pathway. *The Journal of biological chemistry*, *282*(7), 4868–74.
- Flández, M., Cosano, I. C., Nombela, C., Martín, H., & Molina, M. (2004). Reciprocal regulation between Slt2 MAPK and isoforms of Msg5 dual-specificity protein phosphatase modulates the yeast cell integrity pathway. *The Journal of biological chemistry*, *279*(12), 11027–34.
- Fredman, P., Mattsson, L., Andersson, K., Davidsson, P., Ishizuka, I., Jeansson, S., ... Svennerholm, L. (1988). Characterization of the binding epitope of a monoclonal antibody to sulphatide. *The Biochemical journal*, *251*(1), 17–22.
- Friant, S, Lombardi, R., Schmelzle, T., Hall, M. N., & Riezman, H. (2001). Sphingoid base signaling via Pkh kinases is required for endocytosis in yeast. *The EMBO journal*, *20*(23), 6783–92.

Friant, Sylvie, Meier, K. D., & Riezman, H. (2003). Increased ubiquitin-dependent degradation can replace the essential requirement for heat shock protein induction. *The EMBO journal*, 22(15), 3783–91.

Gable, K., Slife, H., Bacikova, D., Monaghan, E., & Dunn, T. M. (2000). Tsc3p is an 80-amino acid protein associated with serine palmitoyltransferase and required for optimal enzyme activity. *The Journal of biological chemistry*, 275(11), 7597–603.

García, R., Bermejo, C., Grau, C., Pérez, R., Rodríguez-Peña, J. M., Francois, J., ... Arroyo, J. (2004). The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*, 279(15), 15183–95.

Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., ... Brown, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular biology of the cell*, 11(12), 4241–57.

Geymonat, M., Wang, L., Garreau, H., & Jacquet, M. (1998). Ssa1p chaperone interacts with the guanine nucleotide exchange factor of ras Cdc25p and controls the cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology*, 30(4), 855–64.

Giardina, C., & Lis, J. T. (1995). Dynamic protein-DNA architecture of a yeast heat shock promoter. *Molecular and cellular biology*, 15(5), 2737–44.

Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J. M., Kieffer, S., Perrot, M., ... Labarre, J. (1998). The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 273(35), 22480–9.

Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., ... Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5287), 546, 563–7.

Goldstein, A. L., & McCusker, J. H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 15(14), 1541–53.

Gray, J. V., Ogas, J. P., Kamada, Y., Stone, M., Levin, D. E., & Herskowitz, I. (1997). A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. *The EMBO journal*, 16(16), 4924–37.

Grilley, M. M., Stock, S. D., Dickson, R. C., Lester, R. L., & Takemoto, J. Y. (1998). Syringomycin action gene *SYR2* is essential for sphingolipid 4-hydroxylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 273(18), 11062–8.

Grossmann, G., Opekarova, M., Novakova, L., Stolz, J., & Tanner, W. (2006). Lipid raft-based membrane compartmentation of a plant transport protein expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell*, 5(6), 945–53.

- Guillas, I., Kirchman, P. A., Chuard, R., Pfefferli, M., Jiang, J. C., Jazwinski, S. M., & Conzelmann, A. (2001). C26-CoA-dependent ceramide synthesis of *Saccharomyces cerevisiae* is operated by Lag1p and Lac1p. *The EMBO journal*, 20(11), 2655–65.
- Haak, D., Gable, K., Beeler, T., & Dunn, T. (1997). Hydroxylation of *Saccharomyces cerevisiae* ceramides requires Sur2p and Scs7p. *The Journal of biological chemistry*, 272(47), 29704–10.
- Haesendonckx, S., Tudisca, V., Voordeckers, K., Moreno, S., Thevelein, J. M., & Portela, P. (2012). The activation loop of PKA catalytic isoforms is differentially phosphorylated by Pkh protein kinases in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical journal*, 448(3), 307–20.
- Hanks, S. K., & Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(8), 576–96.
- 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), 417–20.
- Hauge, C., Antal, T. L., Hirschberg, D., Doehn, U., Thorup, K., Idrissova, L., ... Frödin, M. (2007). Mechanism for activation of the growth factor-activated AGC kinases by turn motif phosphorylation. *The EMBO journal*, 26(9), 2251–61.
- Hayashi, T., & Fujimoto, M. (2010). Detergent-resistant microdomains determine the localization of sigma-1 receptors to the endoplasmic reticulum-mitochondria junction. *Molecular pharmacology*, 77(4), 517–28.
- Herrero, J., Díaz-Uriarte, R., & Dopazo, J. (2003). An approach to inferring transcriptional regulation among genes from large-scale expression data. *Comparative and functional genomics*, 4(1), 148–54.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S.-L., ... Tyers, M. (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*, 415(6868), 180–3.
- Hohmann, S., & Mager, W.H. (eds) (2003). *Yeast stress responses*. Springer.
- Honke, K., Tsuda, M., Hirahara, Y., Ishii, A., Makita, A., & Wada, Y. (1997). Molecular cloning and expression of cDNA encoding human 3'-phosphoadenylylsulfate:galactosylceramide 3'-sulfotransferase. *The Journal of biological chemistry*, 272(8), 4864–8.
- Hunter, T., & Plowman, G. D. (1997). The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends in biochemical sciences*, 22(1), 18–22.

- Huxley, C., Green, E. D., & Dunham, I. (1990). Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR. *Trends in genetics : TIG*, 6(8), 236.
- Inagaki, M., Schmelzle, T., Yamaguchi, K., Irie, K., Hall, M. N., & Matsumoto, K. (1999). PDK1 homologs activate the Pkc1-mitogen-activated protein kinase pathway in yeast. *Molecular and cellular biology*, 19(12), 8344–52.
- Irie, K., Takase, M., Lee, K. S., Levin, D. E., Araki, H., Matsumoto, K., & Oshima, Y. (1993). MKK1 and MKK2, which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Molecular and cellular biology*, 13(5), 3076–83.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., & Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of bacteriology*, 153(1), 163–8.
- Jacoby, J. J., Nilius, S. M., & Heinisch, J. J. (1998). A screen for upstream components of the yeast protein kinase C signal transduction pathway identifies the product of the *SLG1* gene. *Molecular & general genetics : MGG*, 258(1-2), 148–55.
- Jacq, C., Alt-Mörbe, J., Andre, B., Arnold, W., Bahr, A., Ballesta, J. P., ... Zaccaria, P. (1997). The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome IV. *Nature*, 387(6632 Suppl), 75–8.
- Jaroszewski, L., Li, Z., Cai, X., Weber, C., & Godzik, A. (2011). FFAS server: novel features and applications. *Nucleic acids research*, 39(Web Server issue), W38–44.
- Jenkins, G. M. (2003). The emerging role for sphingolipids in the eukaryotic heat shock response. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 60(4), 701–10.
- Jorgensen, P., Nishikawa, J. L., Breikreutz, B.-J., & Tyers, M. (2002). Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5580), 395–400.
- 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), 2491–505.
- Jung, U S, & Levin, D. E. (1999). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Molecular microbiology*, 34(5), 1049–57.
- Jung, Un Sung, Sobering, A. K., Romeo, M. J., & Levin, D. E. (2002). Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Molecular microbiology*, 46(3), 781–9.
- 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 & development*, 9(13), 1559–71.

- Kamada, Y., Qadota, H., Python, C. P., Anraku, Y., Ohya, Y., & Levin, D. E. (1996). Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. *The Journal of biological chemistry*, 271(16), 9193–6.
- Ketela, T., Green, R., & Bussey, H. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *Journal of bacteriology*, 181(11), 3330–40.
- King, C. C., Zenke, F. T., Dawson, P. E., Dutil, E. M., Newton, A. C., Hemmings, B. A., & Bokoch, G. M. (2000). Sphingosine is a novel activator of 3-phosphoinositide-dependent kinase 1. *The Journal of biological chemistry*, 275(24), 18108–13.
- Klis, F. M., Boorsma, A., & De Groot, P. W. J. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 23(3), 185–202.
- Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K., & Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews*, 26(3), 239–56.
- Kobayashi, N., & McEntee, K. (1990). Evidence for a heat shock transcription factor-independent mechanism for heat shock induction of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(17), 6550–4.
- Kobayashi, N., & McEntee, K. (1993). Identification of cis and trans components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 13(1), 248–56.
- Kono, K., Nogami, S., Abe, M., Nishizawa, M., Morishita, S., Pellman, D., & Ohya, Y. (2008). G1/S cyclin-dependent kinase regulates small GTPase Rho1p through phosphorylation of RhoGEF Tus1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 19(4), 1763–71.
- Kopecká, 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(2), 115–26.
- Krasley, E., Cooper, K. F., Mallory, M. J., Dunbrack, R., & Strich, R. (2006). Regulation of the oxidative stress response through Slt2p-dependent destruction of cyclin C in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 172(3), 1477–86.
- Krebs, E. G. (1985). The phosphorylation of proteins: a major mechanism for biological regulation. Fourteenth Sir Frederick Gowland Hopkins memorial lecture. *Biochemical Society transactions*, 13(5), 813–20.
- Kroemer, G., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Peter, M. E., Vaux, D., Vandenabeele, P., ... Melino, G. (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell death and differentiation*, 12 Suppl 2, 1463–7.



- Krogan, N. J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., ... Tikuisis, A. P. (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, *440*(7084), 637–43.
- 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*(9), 5843–53.
- 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*(1), 172–82.
- Lee, P., Cho, B.-R., Joo, H.-S., & Hahn, J.-S. (2008). Yeast Yak1 kinase, a bridge between PKA and stress-responsive transcription factors, Hsf1 and Msn2/Msn4. *Molecular microbiology*, *70*(4), 882–95.
- Lester, R. L., & Dickson, R. C. (1993). Sphingolipids with inositolphosphate-containing head groups. *Advances in lipid research*, *26*, 253–74.
- Levin, D E, & Bartlett-Heubusch, E. (1992). Mutants in the *S. cerevisiae* *PKC1* gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *The Journal of cell biology*, *116*(5), 1221–9.
- Levin, D E, Bowers, B., Chen, C. Y., Kamada, Y., & Watanabe, M. (1994). Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cellular & molecular biology research*, *40*(3), 229–39.
- Levin, D E, Fields, F. O., Kunisawa, R., Bishop, J. M., & Thorner, J. (1990). A candidate protein kinase C gene, *PKC1*, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell*, *62*(2), 213–24.
- Levin, David E. (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, *69*(2), 262–91.
- Lindquist, S., & Craig, E. A. (1988). The heat-shock proteins. *Annual review of genetics*, *22*, 631–77.
- Liu, K., Zhang, X., Sumanasekera, C., Lester, R. L., & Dickson, R. C. (2005). Signalling functions for sphingolipid long-chain bases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Society transactions*, *33*(5), 1170–3.
- Liu, X., Zhang, X., Wang, C., Liu, L., Lei, M., & Bao, X. (2007). Genetic and comparative transcriptome analysis of bromodomain factor 1 in the salt stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current microbiology*, *54*(4), 325–30.
- Luo, G., Gruhler, A., Liu, Y., Jensen, O. N., & Dickson, R. C. (2008). The sphingolipid long-chain base-Pkh1/2-Ypk1/2 signaling pathway regulates eisosome assembly and turnover. *The Journal of biological chemistry*, *283*(16), 10433–44.

- Ma, M., & Liu, L. Z. (2010). Quantitative transcription dynamic analysis reveals candidate genes and key regulators for ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC microbiology*, *10*, 169.
- 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 (New York, N.Y.)*, *275*(5307), 1781–4.
- Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S. J., Wolf, D. H., & Fröhlich, K. U. (1999). Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *The Journal of cell biology*, *145*(4), 757–67.
- Madeo, Frank, Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Büttner, S., Eisenberg, T., & Kroemer, G. (2009). Caspase-dependent and caspase-independent cell death pathways in yeast. *Biochemical and biophysical research communications*, *382*(2), 227–31.
- Madeo, Frank, Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lächelt, S., Herlan, M., ... Fröhlich, K. U. (2002). A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Molecular cell*, *9*(4), 911–7.
- Malinska, K., Malinsky, J., Opekarova, M., & Tanner, W. (2004). Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living *S. cerevisiae* cells. *Journal of cell science*, *117*(25), 6031–41.
- Malínská, K., Malínský, J., Opekarová, M., & Tanner, W. (2003). Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Molecular biology of the cell*, *14*(11), 4427–36.
- Mandala, S. M., Frommer, B. R., Thornton, R. A., Kurtz, M. B., Young, N. M., Cabello, M. A., ... Horn, W. S. (1994). Inhibition of serine palmitoyl-transferase activity by lipoxamycin. *The Journal of antibiotics*, *47*(3), 376–9.
- Manners, D. J., Masson, A. J., & Patterson, J. C. (1973). The structure of a beta-(1 leads to 3)-D-glucan from yeast cell walls. *The Biochemical journal*, *135*(1), 19–30.
- Manners, D. J., Masson, A. J., Patterson, J. C., Björndal, H., & Lindberg, B. (1973b). The structure of a beta-(1–6)-D-glucan from yeast cell walls. *The Biochemical journal*, *135*(1), 31–6.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, *298*(5600), 1912–34.
- Marchler, G., Schüller, C., Adam, G., & Ruis, H. (1993). A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *The EMBO journal*, *12*(5), 1997–2003.

- Martín, H., Arroyo, J., Sánchez, M., Molina, M., & Nombela, C. (1993). Activity of the yeast MAP kinase homologue Slr2 is critically required for cell integrity at 37 degrees C. *Molecular & general genetics : MGG*, 241(1-2), 177–84.
- Martín, H., Rodríguez-Pachón, J. M., Ruiz, C., Nombela, C., & Molina, M. (2000). Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slr2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 275(2), 1511–9.
- Martínez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., & Estruch, F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *The EMBO journal*, 15(9), 2227–35.
- 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(11), 7651–60.
- Merrill, A. H., Wang, M. D., Park, M., & Sullards, M. C. (2007). (Glyco)sphingolipidology: an amazing challenge and opportunity for systems biology. *Trends in biochemical sciences*, 32(10), 457–68.
- Miyake, Y., Kozutsumi, Y., Nakamura, S., Fujita, T., & Kawasaki, T. (1995). Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. *Biochemical and biophysical research communications*, 211(2), 396–403.
- Miller, J. H. (1972) Experiments in Molecular Genetics pp. 352-355, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Mora, A., Komander, D., van Aalten, D. M. F., & Alessi, D. R. (2004). PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Seminars in cell & developmental biology*, 15(2), 161–70.
- Morano, K. A., Grant, C. M., & Moye-Rowley, W. S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(4), 1157–95.
- Mouillon, J.-M., & Persson, B. L. (2006). New aspects on phosphate sensing and signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*, 6(2), 171–6.
- Neves, M. J., & François, J. (1992). On the mechanism by which a heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical journal*, 288(3), 859–64.

Nojima, H., Tokunaga, C., Eguchi, S., Oshiro, N., Hidayat, S., Yoshino, K., ... Yonezawa, K. (2003). The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *The Journal of biological chemistry*, 278(18), 15461–4.

Nonaka, H., Tanaka, K., Hirano, H., Fujiwara, T., Kohno, H., Umikawa, M., ... Takai, Y. (1995). A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal*, 14(23), 5931–8.

Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., & Mann, M. (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*, 127(3), 635–48.

Opekarová, M., Malínská, K., Nováková, L., & Tanner, W. (2005). Differential effect of phosphatidylethanolamine deletion on raft proteins: further evidence for diversity of rafts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta*, 1711(1), 87–95.

Ozaki, K., Tanaka, K., Imamura, H., Hihara, T., Kameyama, T., Nonaka, H., ... Takai, Y. (1996). Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal*, 15(9), 2196–207.

Paravicini, G., & Friedli, L. (1996). Protein-protein interactions in the yeast PKC1 pathway: Pkc1p interacts with a component of the MAP kinase cascade. *Molecular & general genetics : MGG*, 251(6), 682–91.

Parrou, J. L., Teste, M. A., & François, J. (1997). Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiology (Reading, England)*, 143(6), 1891–900.

Parsell, D. A., & Lindquist, S. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual review of genetics*, 27, 437–96.

Pascual-Ahuir, A., & Proft, M. (2007). The Sch9 kinase is a chromatin-associated transcriptional activator of osmostress-responsive genes. *The EMBO journal*, 26(13), 3098–108.

Pastor-Flores, D., Schulze, J. O., Bahí, A., Giacometti, R., Ferrer-Dalmau, J., Passeron, S., ... Biondi, R. M. (2013). The PIF-pocket as a target for *C. albicans* Pkh selective inhibitors. *ACS chemical biology*.

Pedruzzi, I., Dubouloz, F., Cameroni, E., Wanke, V., Roosen, J., Winderickx, J., & De Virgilio, C. (2003). TOR and PKA signaling pathways converge on the protein kinase Rim15 to control entry into G0. *Molecular cell*, 12(6), 1607–13.

- Peterson, J., Zheng, Y., Bender, L., Myers, A., Cerione, R., & Bender, A. (1994). Interactions between the bud emergence proteins Bem1p and Bem2p and Rho-type GTPases in yeast. *The Journal of cell biology*, 127(5), 1395–406.
- Philip, B., & Levin, D. E. (2001). Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Molecular and cellular biology*, 21(1), 271–80.
- Posas, F., Clotet, J., Muns, M. T., Corominas, J., Casamayor, A., & Ariño, J. (1993). The gene PPG encodes a novel yeast protein phosphatase involved in glycogen accumulation. *The Journal of biological chemistry*, 268(2), 1349–54.
- Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., ... Snyder, M. (2005). Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature*, 438(7068), 679–84.
- Rajavel, M., Philip, B., Buehrer, B. M., Errede, B., & Levin, D. E. (1999). Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 19(6), 3969–76.
- Reynolds, A., Lundblad, V., Dorris, D., & Keaveney, M. (2001). Yeast vectors and assays for expression of cloned genes. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]*, Chapter 13, Unit13.6.
- Riezman, H. (2004). Why do cells require heat shock proteins to survive heat stress? *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 3(1), 61–3.
- Rockenfeller, P., & Madeo, F. (2008). Apoptotic death of ageing yeast. *Experimental gerontology*, 43(10), 876–81.
- Roelants, F. M., Baltz, A. G., Trott, A. E., Fereres, S., & Thorner, J. (2010). A protein kinase network regulates the function of aminophospholipid flippases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(1), 34–9.
- Roelants, F. M., Torrance, P. D., Bezman, N., & Thorner, J. (2002). Pkh1 and Pkh2 differentially phosphorylate and activate Ypk1 and Ykr2 and define protein kinase modules required for maintenance of cell wall integrity. *Molecular biology of the cell*, 13(9), 3005–28.
- Roelants, F. M., Torrance, P. D., & Thorner, J. (2004). Differential roles of PDK1- and PDK2-phosphorylation sites in the yeast AGC kinases Ypk1, Pkc1 and Sch9. *Microbiology (Reading, England)*, 150(10), 3289–304.
- Roncero, C., & Durán, A. (1985). Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *Journal of bacteriology*, 163(3), 1180–5.

- Roosen, J., Engelen, K., Marchal, K., Mathys, J., Griffioen, G., Cameroni, E., ... Winderickx, J. (2005). PKA and Sch9 control a molecular switch important for the proper adaptation to nutrient availability. *Molecular microbiology*, 55(3), 862–80.
- Ruepp, A., Zollner, A., Maier, D., Albermann, K., Hani, J., Mokrejs, M., ... Mewes, H. W. (2004). The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic acids research*, 32(18), 5539–45.
- Sakaki, K., Tashiro, K., Kuhara, S., & Mihara, K. (2003). Response of genes associated with mitochondrial function to mild heat stress in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of biochemistry*, 134(3), 373–84.
- Saldanha, A. J. (2004). Java Treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 20(17), 3246–8.
- Sánchez, I., Hughes, R. T., Mayer, B. J., Yee, K., Woodgett, J. R., Avruch, J., ... Zon, L. I. (1994). Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature*, 372(6508), 794–8.
- Santangelo, G. M. (2006). Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 70(1), 253–82.
- Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schaeren-Wiemers, N., van der Bijl, P., & Schwab, M. E. (1995). The UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase: expression pattern in oligodendrocytes and Schwann cells during myelination and substrate preference for hydroxyceramide. *Journal of neurochemistry*, 65(5), 2267–78.
- Schmelzle, T., Helliwell, S. B., & Hall, M. N. (2002). Yeast protein kinases and the RHO1 exchange factor TUS1 are novel components of the cell integrity pathway in yeast. *Molecular and cellular biology*, 22(5), 1329–39.
- Schmidt, A., Schmelzle, T., & Hall, M. N. (2002). The RHO1-GAPs SAC7, BEM2 and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology*, 45(5), 1433–41.
- Schmitt, A. P., & McEntee, K. (1996). Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(12), 5777–82.
- Schorling, S., Vallée, B., Barz, W. P., Riezman, H., & Oesterhelt, D. (2001). Lag1p and Lac1p are essential for the Acyl-CoA-dependent ceramide synthase reaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 12(11), 3417–27.

- Serrano, R., Martín, H., Casamayor, A., & Ariño, J. (2006). Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Slr2 MAPK pathway. *The Journal of biological chemistry*, 281(52), 39785–95.
- Serrano, R., Ruiz, A., Bernal, D., Chambers, J. R., & Ariño, J. (2002). The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Molecular microbiology*, 46(5), 1319–33.
- 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), 19–27.
- Smets, B., Ghillebert, R., De Snijder, P., Binda, M., Swinnen, E., De Virgilio, C., & Winderickx, J. (2010). Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics*, 56(1), 1–32.
- Sobko, A. (2006). Systems biology of AGC kinases in fungi. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2006(352), re9.
- Sorger, P. K. (1991). Heat shock factor and the heat shock response. *Cell*, 65(3), 363–6.
- Stokoe, D., Stephens, L. R., Copeland, T., Gaffney, P. R., Reese, C. B., Painter, G. F., ... Hawkins, P. T. (1997). Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5325), 567–70.
- Suzuki, T., Takahashi, T., & Suzuki, Y. (2008). [Role of sulfatide on influenza A virus replication]. *Tanpakushitsu kakusan koso. Protein, nucleic acid, enzyme*, 53(12 Suppl), 1676–82.
- Tamaki, H. (2007). Glucose-stimulated cAMP-protein kinase A pathway in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 104(4), 245–50.
- Teng, S.-C., Epstein, C., Tsai, Y.-L., Cheng, H.-W., Chen, H.-L., & Lin, J.-J. (2002). Induction of global stress response in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking telomerase. *Biochemical and biophysical research communications*, 291(3), 714–21.
- Thevelein, J. M. (1994). Signal transduction in yeast. *Yeast (Chichester, England)*, 10(13), 1753–90.
- Thevelein, J. M., & de Winde, J. H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology*, 33(5), 904–18.
- Thevelein, Johan M, Bonini, B. M., Castermans, D., Haesendonckx, S., Kriel, J., Louwet, W., ... Voordeckers, K. (2008). Novel mechanisms in nutrient activation of the yeast protein kinase A pathway. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 55(2), 75–89.

Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Scott, J. D., McMullen, B., ... Wigler, M. (1987b). Cloning and characterization of *BCY1*, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 7(4), 1371–7.

Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., & Wigler, M. (1987). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell*, 50(2), 277–87.

Treco, D.A., and Winston, F. (1998). Current Protocols in Molecular Biology. In Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G. Smith, J. A. and Struhl, K. (Chap, 13: *Saccharomyces cerevisiae*). Greene Publishing Associates and Wiley InterScience, N. Y.

Urban, J., Soulard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., ... Loewith, R. (2007). Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cell*, 26(5), 663–74.

Vallée, B., & Riezman, H. (2005). Lip1p: a novel subunit of acyl-CoA ceramide synthase. *The EMBO journal*, 24(4), 730–41.

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(19), 1698–703.

Van Wageningen, S., Kemmeren, P., Lijnzaad, P., Margaritis, T., Benschop, J. J., de Castro, I. J., ... Holstege, F. C. P. (2010). Functional overlap and regulatory links shape genetic interactions between signaling pathways. *Cell*, 143(6), 991–1004.

Vay, H. A., Philip, B., & Levin, D. E. (2004). Mutational analysis of the cytoplasmic domain of the Wsc1 cell wall stress sensor. *Microbiology (Reading, England)*, 150(10), 3281–8.

Vergheese, J., Abrams, J., Wang, Y., & Morano, K. a. (2012). Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 76(2), 115–58.

Verna, J., Lodder, A., Lee, K., Vagts, A., & Ballester, R. (1997). A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(25), 13804–9.

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), 43614–24.



Vilella, F., Herrero, E., Torres, J., & de la Torre-Ruiz, M. A. (2005). Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*, 280(10), 9149–59.

Vizoso-Vázquez, A., Lamas-Maceiras, M., Becerra, M., González-Siso, M. I., Rodríguez-Belmonte, E., & Cerdán, M. E. (2012). Ixr1p and the control of the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic response. *Applied microbiology and biotechnology*, 94(1), 173–84.

Voordeckers, K., Kimpe, M., Haesendonckx, S., Louwet, W., Versele, M., & Thevelein, J. M. (2011). Yeast 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) orthologs Pkh1-3 differentially regulate phosphorylation of protein kinase A (PKA) and the protein kinase B (PKB)/S6K ortholog Sch9. *The Journal of biological chemistry*, 286(25), 22017–27.

Walther, T. C., Aguilar, P. S., Fröhlich, F., Chu, F., Moreira, K., Burlingame, A. L., & Walter, P. (2007). Pkh-kinases control eisosome assembly and organization. *The EMBO journal*, 26(24), 4946–55.

Walther, T. C., Brickner, J. H., Aguilar, P. S., Bernales, S., Pantoja, C., & Walter, P. (2006). Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature*, 439(7079), 998–1003.

Watanabe, Y., Takaesu, G., Hagiwara, M., Irie, K., & Matsumoto, K. (1997). Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Slt2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecular and cellular biology*, 17(5), 2615–23.

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), 243–52.

Wieser, R., Adam, G., Wagner, A., Schüller, C., Marchler, G., Ruis, H., ... Bilinski, T. (1991). Heat shock factor-independent heat control of transcription of the *CTT1* gene encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 266(19), 12406–11.

Wilkinson, D., & Ramsdale, M. (2011). Proteases and caspase-like activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Society transactions*, 39(5), 1502–8.

Wilson, W. A., & Roach, P. J. (2002). Nutrient-regulated protein kinases in budding yeast. *Cell*, 111(2), 155–8.

Winderickx, J., de Winde, J. H., Crauwels, M., Hino, A., Hohmann, S., Van Dijck, P., & Thevelein, J. M. (1996). Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: novel variations of STRE-mediated transcription control? *Molecular & general genetics : MGG*, 252(4), 470–82.

Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., ... Bussey, H. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science (New York, N.Y.)*, *285*(5429), 901–6.

Wu, W.-S., & Li, W.-H. (2008). Identifying gene regulatory modules of heat shock response in yeast. *BMC genomics*, *9*, 439.

Yen, K., Gitsham, P., Wishart, J., Oliver, S. G., & Zhang, N. (2003). An improved tetO promoter replacement system for regulating the expression of yeast genes. *Yeast (Chichester, England)*, *20*(15), 1255–62.

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

Zhang, N.-N., Dudgeon, D. D., Paliwal, S., Levchenko, A., Grote, E., & Cunningham, K. W. (2006). Multiple signaling pathways regulate yeast cell death during the response to mating pheromones. *Molecular biology of the cell*, *17*(8), 3409–22.

Zhang, X., Lester, R. L., & Dickson, R. C. (2004). Pil1p and Lsp1p negatively regulate the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-like kinase Pkh1p and downstream signaling pathways Pkc1p and Ypk1p. *The Journal of biological chemistry*, *279*(21), 22030–8.

Zhu, H., Klemic, J. F., Chang, S., Bertone, P., Casamayor, A., Klemic, K. G., ... Snyder, M. (2000). Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nature genetics*, *26*(3), 283–9.

Zweerink, M. M., Edison, A. M., Wells, G. B., Pinto, W., & Lester, R. L. (1992). Characterization of a novel, potent, and specific inhibitor of serine palmitoyltransferase. *The Journal of biological chemistry*, *267*(35), 25032–8.



## **IX. ANNEXOS**

---



TAULA 1. Gens reprimits per manca de Pkh.

GENS REPRIMITS			
ORF	GEN	- valor de disminució	
		8h	24h
YAL023C	PMT2	0,84	0,47
YAR071W	PHO11	0,30	0,31
YBR031W	RPL4A	0,77	0,47
YBR048W	RPS11B	0,92	0,49
YBR067C	TIP1	0,98	0,41
YBR069C	TAT1	0,71	0,49
YBR092C	PHO3	0,49	0,34
YBR093C	PHO5	0,37	0,45
YBR158W	AMN1	0,94	0,49
YBR231C	SWC5	0,44	1,12
YBR238C		0,65	0,36
YBR249C	ARO4	0,67	0,44
YCL030C	HIS4	0,51	0,35
YCR013C		0,82	0,49
YDL003W	MCD1	0,41	
YDL061C	RPS29B	0,86	0,45
YDL083C	RPS16B	0,78	0,48
YDL157C		0,86	0,48
YDL191W	RPL35A	0,82	0,49
YDR023W	SES1	0,71	0,44
YDR025W	RPS11A	0,81	0,48
YDR033W	MRH1	0,75	0,27
YDR240C	SNU56		0,49
YDR300C	PRO1	0,71	0,44
YDR324C	UTP4	0,49	0,66
YDR490C	PKH1	0,05	0,09
YDR508C	GNP1	0,76	0,47
YDR534C	FIT1	0,75	0,18
YEL021W	URA3	0,10	0,21
YEL022W	GEA2	0,68	0,50
YEL065W	SIT1	0,38	0,26
YEL071W	DLD3	0,41	0,53
YER011W	TIR1	0,82	0,34
YER056C	FCY2	0,80	0,46
YER070W	RNR1	0,74	0,18
YER082C	UTP7	0,29	
YER131W	RPS26B	0,98	0,42

GENS REPRIMITS			
ORF	GEN	- valor de disminució	
		8h	24h
YER145C	FTR1	0,55	0,28
YFL004W	VTC2	0,78	0,42
YFR031C-A	RPL2A	0,81	0,49
YGL008C	PMA1	0,68	0,22
YGL012W	ERG4	0,81	0,33
YGL039W		0,71	0,48
YGL103W	RPL28	0,88	0,49
YGL123W	RPS2	0,79	0,46
YGL147C	RPL9A	0,84	0,43
YGL245W	GUS1	0,83	0,44
YGR035C		0,80	0,43
YGR061C	ADE6	0,67	0,44
YGR079W			0,33
YGR108W	CLB1	0,67	0,41
YGR168C		0,82	0,27
YGR211W	ZPR1	0,45	1,06
YGR234W	YHB1	0,79	0,30
YGR264C	MES1	0,72	0,47
YHL035C	VMR1		0,50
YHL040C	ARN1	0,40	0,18
YHL047C	ARN2	0,47	0,18
YHR019C	DED81	0,76	0,48
YHR020W		0,60	0,38
YHR068W	DYS1	0,69	0,40
YHR143W	DSE2	1,10	0,38
YHR182C-A		0,94	0,48
YHR203C	RPS4B		0,49
YHR215W	PHO12	0,25	0,19
YIL018W	RPL2B	0,87	0,45
YIL052C	RPL34B	0,88	0,48
YJL006C	CTK2	1,02	0,44
YJL012C	VTC4	0,64	0,29
YJL078C	PRY3	0,62	0,44
YJL079C	PRY1	0,85	0,38
YJL080C	SCP160	0,79	0,49
YJL138C	TIF2	0,90	0,49
YJL178C	ATG27		0,47

GENS REPRIMITS			
ORF	GEN	- valor de disminució	
		8h	24h
YJL190C	RPS22A	0,68	0,41
YJR029W		0,72	0,48
YJR123W	RPS5	0,85	0,46
YJR148W	BAT2	0,94	0,48
YKL008C	LAC1	0,90	0,42
YKL081W	TEF4	0,71	0,47
YKL180W	RPL17A		0,35
YKR103W	NFT1		0,32
YKR104W			0,49
YLR027C	AAT2	0,67	0,46
YLR029C	RPL15A	0,94	0,48
YLR048W	RPSOB	0,75	0,50
YLR056W	ERG3	0,66	0,47
YLR058C	SHM2	0,72	0,43
YLR073C	RFU1	0,46	0,77
YLR134W	PDC5	0,65	0,44
YLR167W	RPS31	0,90	0,48
YLR188W	MDL1	0,63	0,44
YLR214W	FRE1	0,50	0,61
YLR300W	EXG1	0,65	0,38
YLR304C	ACO1	0,47	0,28
YLR332W	MID2	0,50	0,55
YLR339C		0,83	0,40
YLR340W	RPP0	0,78	0,46
YLR348C	DIC1	0,73	0,42
YLR349W		0,80	0,43
YLR355C	ILV5	0,41	0,50
YLR406C	RPL31B	0,78	0,48
YLR413W		0,69	0,36
YLR441C	RPS1A		0,48
YLL044W		0,72	0,42
YML027W	YOX1	0,34	
YML052W	SUR7	0,83	0,46
YML063W	RPS1B	0,91	0,46
YML080W	DUS1	0,46	0,66
YML123C	PHO84	0,34	0,11
YMR006C	PLB2	0,81	0,43

GENS REPRIMITS			
ORF	GEN	- valor de disminució	
		8h	24h
YMR058W	FET3	0,54	0,20
YMR116C	ASC1	0,78	0,49
YMR120C	ADE17	0,84	0,47
YMR189W	GCV2	0,70	0,39
YMR205C	PFK2	0,73	0,48
YMR272C	SCS7	0,91	0,48
YMR303C	ADH2	0,81	0,45
YMR317W			0,25
YMR319C	FET4	1,07	0,40
YNL066W	SUN4	0,95	0,49
YNL067W	RPL9B	0,83	0,46
YNL069C	RPL16B	0,83	0,48
YNL145W	MFA2		0,33
YNL164C	IBD2	0,49	1,02
YNL209W	SSB2	0,65	0,49
YNL231C	PDR16	0,52	0,45
YNL289W	PCL1	0,36	1,06
YNR056C	BIO5		0,34
YNR067C	DSE4	0,65	0,42
YOL058W	ARG1	0,47	0,39
YOL086C	ADH1	0,82	0,48
YOR009W	TIR4		0,29
YOR010C	TIR2		0,50
YOR011W	AUS1		0,38
YOR063W	RPL3	0,80	0,47
YOR096W	RPS7A	0,80	0,48
YOR135C	IRC14	0,65	0,29
YOR136W	IDH2	0,58	0,31
YOR153W	PDR5	0,75	0,41
YOR306C	MCH5		0,34
YOR316C	COT1	0,80	0,44
YOR345C		0,67	0,40
YOR359W	VTS1	0,45	0,71
YOR382W	FIT2	0,42	0,13
YOR383C	FIT3	0,31	0,10
YPL019C	VTC3	0,51	0,21
YPL030W	TRM44	0,49	0,61

<b>GENS REPRIMITS</b>			
<b>ORF</b>	<b>GEN</b>	<b>- valor de disminució</b>	
		<b>8h</b>	<b>24h</b>
<i>YPL068C</i>		<b>0,34</b>	
<i>YPL090C</i>	<i>RPS6A</i>	<b>0,83</b>	<b>0,48</b>
<i>YPL131W</i>	<i>RPL5</i>	<b>0,73</b>	<b>0,47</b>
<i>YPL178W</i>	<i>CBC2</i>	<b>0,88</b>	<b>0,26</b>
<i>YPL198W</i>	<i>RPL7B</i>	<b>0,83</b>	<b>0,41</b>
<i>YPR074C</i>	<i>TKL1</i>	<b>0,71</b>	<b>0,42</b>
<i>YPR136C</i>			<b>0,47</b>
<i>YPR145W</i>	<i>ASN1</i>	<b>0,50</b>	<b>0,42</b>



TAULA 2. Gens induïts per manca de Pkh.

GENS INDUÏTS			
ORF	GEN	- valor d'increment	
		8h	24h
YAL054C	ACS1		<b>12,32</b>
YAL061W	BDH2	<b>2,66</b>	<b>4,19</b>
YAR028W		<b>1,05</b>	<b>2,56</b>
YAR035W	YAT1		<b>2,92</b>
YBL015W	ACH1	<b>1,40</b>	<b>2,60</b>
YBL042C	FUI1		<b>3,42</b>
YBL064C	PRX1	<b>1,85</b>	<b>2,86</b>
YBL075C	SSA3		<b>8,28</b>
YBL078C	ATG8		<b>4,98</b>
YBR005W	RCR1	<b>2,05</b>	<b>1,87</b>
YBR006W	UGA2		<b>2,07</b>
YBR008C	FLR1	<b>0,94</b>	<b>2,58</b>
YBR050C	REG2		<b>4,78</b>
YBR056W		<b>1,72</b>	<b>2,30</b>
YBR072W	HSP26	<b>6,07</b>	<b>7,47</b>
YBR083W	TEC1	<b>2,95</b>	
YBR101C	FES1	<b>0,58</b>	<b>2,66</b>
YBR112C	CYC8	<b>1,18</b>	<b>2,57</b>
YBR117C	TKL2		<b>9,88</b>
YBR126C	TPS1	<b>1,53</b>	<b>2,02</b>
YBR132C	AGP2	<b>2,43</b>	<b>1,22</b>
YBR169C	SSE2	<b>1,03</b>	<b>2,80</b>
YBR203W	COS111		<b>2,44</b>
YBR214W	SDS24	<b>1,65</b>	<b>2,89</b>
YBR230C	OM14	<b>2,37</b>	<b>2,73</b>
YBR284W			<b>3,02</b>
YBR287W		<b>1,64</b>	<b>2,34</b>
YBR298C	MAL31	<b>3,13</b>	
YCL040W	GLK1	<b>1,84</b>	<b>2,02</b>
YCR021C	HSP30	<b>0,71</b>	<b>5,81</b>
YCR051W		<b>2,01</b>	<b>2,20</b>
YCR091W	KIN82	<b>2,10</b>	
YCR102C			<b>5,51</b>
YCR107W	AAD3	<b>0,69</b>	<b>4,11</b>
YCRX21C			<b>3,68</b>
YDL014W	NOP1		<b>2,77</b>
YDL085W	NDE2		<b>4,34</b>

GENS INDUÏTS			
ORF	GEN	- valor d'increment	
		8h	24h
YDL113C	ATG20	<b>1,71</b>	<b>2,06</b>
YDL124W		<b>1,63</b>	<b>2,32</b>
YDL149W	ATG9		<b>2,07</b>
YDL169C	UGX2		<b>3,47</b>
YDL174C	DLD1	<b>1,97</b>	<b>4,20</b>
YDL204W	RTN2	<b>1,33</b>	<b>2,43</b>
YDL222C	FMP45		<b>12,70</b>
YDL223C	HBT1		<b>5,00</b>
YDL233W		<b>1,67</b>	<b>2,25</b>
YDL234C	GYP7	<b>2,75</b>	<b>3,68</b>
YDR011W	SNQ2	<b>1,01</b>	<b>2,21</b>
YDR043C	NRG1	<b>1,58</b>	<b>3,14</b>
YDR055W	PST1	<b>1,06</b>	<b>3,01</b>
YDR059C	UBC5	<b>1,26</b>	<b>2,02</b>
YDR070C	FMP16		<b>5,90</b>
YDR085C	AFR1	<b>2,05</b>	<b>1,88</b>
YDR096W	GIS1	<b>2,12</b>	<b>1,82</b>
YDR123C	INO2		<b>2,35</b>
YDR171W	HSP42	<b>1,16</b>	<b>2,04</b>
YDR178W	SDH4	<b>1,69</b>	<b>2,27</b>
YDR216W	ADR1		<b>4,68</b>
YDR223W	CRF1		<b>3,05</b>
YDR256C	CTA1	<b>1,01</b>	<b>2,05</b>
YDR258C	HSP78	<b>1,02</b>	<b>2,18</b>
YDR342C	HXT7	<b>4,39</b>	<b>2,30</b>
YDR380W	ARO10		<b>13,25</b>
YDR453C	TSA2		<b>2,24</b>
YDR533C	HSP31	<b>1,42</b>	<b>4,50</b>
YEL011W	GLC3	<b>5,01</b>	<b>3,81</b>
YEL039C	CYC7	<b>2,72</b>	
YEL045C		<b>1,10</b>	<b>2,10</b>
YEL049W	PAU2		<b>2,90</b>
YEL060C	PRB1	<b>2,08</b>	<b>3,55</b>
YER020W	GPA2	<b>2,04</b>	<b>2,17</b>
YER053C	PIC2	<b>1,03</b>	<b>2,64</b>
YER054C	GIP2		<b>3,43</b>
YER067W		<b>5,72</b>	<b>3,61</b>

GENS INDUÏTS			
ORF	GEN	- valor d'increment	
		8h	24h
YER103W	SSA4		18,71
YER143W	DDI1	1,05	2,34
YER150W	SPI1	1,74	9,21
YFL014W	HSP12		52,73
YFL016C	MDJ1	0,69	2,26
YFL054C		2,37	1,91
YFL056C	AAD6		10,71
YFL057C	AAD16		10,58
YFR015C	GSY1	5,35	4,14
YFR053C	HXK1	4,84	3,86
YGL006W	PMC1	1,53	2,96
YGL053W	PRM8	1,46	2,11
YGL055W	OLE1	1,24	2,66
YGL121C	GPG1		2,34
YGL156W	AMS1		2,45
YGL231C	EMC4	2,10	
YGR008C	STF2	2,32	2,27
YGR032W	GSC2	2,01	2,10
YGR043C	NQM1		8,04
YGR110W	CLD1		3,72
YGR142W	BTN2		22,19
YGR197C	SNG1	1,19	2,88
YGR201C			3,37
YGR213C	RTA1		4,71
YGR243W	FMP43	2,97	4,02
YGR248W	SOL4	2,66	5,90
YGR249W	MGA1	2,11	
YGR256W	GND2		4,00
YHL021C	AIM17	3,14	3,50
YHL027W	RIM101	1,44	2,13
YHR008C	SOD2	1,17	2,01
YHR033W			2,24
YHR087W	RTC3	2,65	6,42
YHR092C	HXT4	6,37	
YHR096C	HXT5		7,88
YHR104W	GRE3	1,23	2,28
YHR138C		2,17	2,86

GENS INDUÏTS			
ORF	GEN	- valor d'increment	
		8h	24h
YHR139C	SPS100	0,96	4,50
YHR209W	CRG1	1,72	2,35
YIL017C	VID28	1,55	2,04
YIL136W	OM45	2,07	
YIL144W	TID3	1,18	4,11
YIL169C		2,02	0,78
YIRO16W		2,09	1,70
YJL016W			3,51
YJL048C	UBX6		4,09
YJL066C	MPM1	1,41	2,10
YJL116C	NCA3	0,80	2,22
YJL141C	YAK1	1,96	2,71
YJL153C	INO1		95,70
YJL165C	HAL5	1,89	3,45
YJL166W	QCR8	2,21	
YJL219W	HXT9		2,74
YJL221C	FSP2		2,19
YJR073C	OPI3	1,94	3,30
YJR096W			2,88
YJR115W		4,14	
YKL001C	MET14	1,87	2,68
YKL062W	MSN4	2,23	1,41
YKL071W		0,95	7,36
YKL087C	CYT2	1,16	2,32
YKL109W	HAP4	2,08	2,14
YKL150W	MCR1	1,68	2,62
YKL163W	PIR3		2,67
YKL216W	URA1	3,93	4,27
YKL218C	SRY1	1,41	2,19
YKR024C	DBP7	1,14	2,78
YKR058W	GLG1	2,15	
YKR061W	KTR2	1,22	2,08
YKR075C		6,89	4,80
YKR076W	ECM4	2,47	2,86
YKR091W	SRL3	2,40	1,89
YKR097W	PCK1		8,44
YKR098C	UBP11	1,45	2,81

<b>GENS INDUÏTS</b>			
<b>ORF</b>	<b>GEN</b>	<b>- valor d'increment</b>	
		<b>8h</b>	<b>24h</b>
YLR054C	OSW2		<b>8,44</b>
YLR120C	YPS1	<b>2,17</b>	<b>2,99</b>
YLR142W	PUT1	<b>5,31</b>	<b>4,68</b>
YLR149C		<b>1,81</b>	<b>3,14</b>
YLR174W	IDP2		<b>3,77</b>
YLR177W		<b>2,19</b>	<b>1,47</b>
YLR178C	TFS1	<b>2,73</b>	<b>5,41</b>
YLR194C		<b>2,53</b>	<b>5,92</b>
YLR216C	CPR6	<b>0,87</b>	<b>2,32</b>
YLR257W		<b>1,85</b>	<b>2,74</b>
YLR258W	GSY2	<b>2,26</b>	<b>1,88</b>
YLR267W	BOP2		<b>2,46</b>
YLR272C	YCS4	<b>2,33</b>	<b>6,68</b>
YLR277C	YSH1	<b>1,15</b>	<b>2,81</b>
YLR282C		<b>3,39</b>	<b>3,25</b>
YLR294C		<b>2,27</b>	
YLR312C			<b>3,90</b>
YLR327C	TMA10	<b>2,77</b>	<b>2,67</b>
YLR331C	JIP3	<b>2,89</b>	<b>2,05</b>
YLR350W	ORM2	<b>1,61</b>	<b>2,10</b>
YLR392C	ART10		<b>2,50</b>
YLR414C		<b>3,25</b>	<b>6,25</b>
YLR460C		<b>1,18</b>	<b>6,32</b>
YLL026W	HSP104	<b>1,04</b>	<b>3,69</b>
YLL039C	UBI4	<b>1,71</b>	<b>2,14</b>
YLL056C			<b>4,80</b>
YML118W	NGL3		<b>3,25</b>
YML128C	MSC1	<b>2,91</b>	<b>8,54</b>
YMR008C	PLB1	<b>1,50</b>	<b>2,16</b>
YMR011W	HXT2	<b>9,13</b>	<b>7,44</b>
YMR020W	FMS1	<b>1,43</b>	<b>2,42</b>
YMR030W	RSF1		<b>2,35</b>
YMR081C	ISF1	<b>4,75</b>	<b>3,49</b>
YMR084W			<b>8,43</b>
YMR085W			<b>4,79</b>
YMR090W			<b>4,18</b>
YMR096W	SNZ1	<b>0,63</b>	<b>3,72</b>

<b>GENS INDUÏTS</b>			
<b>ORF</b>	<b>GEN</b>	<b>- valor d'increment</b>	
		<b>8h</b>	<b>24h</b>
YMR105C	PGM2	<b>4,20</b>	<b>3,66</b>
YMR110C	HFD1	<b>1,83</b>	<b>2,33</b>
YMR114C		<b>1,82</b>	<b>2,66</b>
YMR135C	GID8	<b>1,51</b>	<b>2,00</b>
YMR136W	GAT2	<b>2,31</b>	<b>10,53</b>
YMR140W	SIP5		<b>2,07</b>
YMR169C	ALD3		<b>15,20</b>
YMR170C	ALD2	<b>1,46</b>	<b>7,73</b>
YMR180C	CTL1	<b>0,85</b>	<b>2,02</b>
YMR250W	GAD1	<b>2,03</b>	<b>4,59</b>
YMR280C	CAT8		<b>5,48</b>
YMR284W	YKU70		<b>2,11</b>
YMR291W		<b>2,27</b>	<b>1,11</b>
YMR304C-A		<b>1,44</b>	<b>2,39</b>
YMR316C-A		<b>2,62</b>	<b>5,04</b>
YNL013C			<b>4,87</b>
YNL014W	HEF3		<b>2,09</b>
YNL015W	PBI2	<b>1,20</b>	<b>2,41</b>
YNL036W	NCE103	<b>0,85</b>	<b>2,83</b>
YNL077W	APJ1	<b>0,80</b>	<b>3,64</b>
YNL093W	YPT53		<b>6,67</b>
YNL134C		<b>1,60</b>	<b>3,56</b>
YNL144C		<b>2,51</b>	<b>2,16</b>
YNL192W	CHS1	<b>1,81</b>	<b>2,71</b>
YNL195C		<b>1,46</b>	<b>2,51</b>
YNL208W		<b>1,60</b>	<b>2,14</b>
YNL305C		<b>1,65</b>	<b>2,02</b>
YNL331C	AAD14		<b>2,61</b>
YNR002C	ATO2		<b>6,64</b>
YNR059W	MNT4		<b>2,28</b>
YNR064C			<b>3,46</b>
YOL016C	CMK2	<b>2,81</b>	<b>4,38</b>
YOL032W	OPI10	<b>1,07</b>	<b>2,47</b>
YOL052C-A	DDR2		<b>5,39</b>
YOL084W	PHM7		<b>18,34</b>
YOL126C	MDH2	<b>3,49</b>	<b>3,66</b>
YOL143C	RIB4	<b>2,11</b>	<b>1,83</b>

<b>GENS INDUÏTS</b>			
<b>ORF</b>	<b>GEN</b>	<b>- valor d'increment</b>	
		<b>8h</b>	<b>24h</b>
<i>YOL165C</i>	<i>AAD15</i>	<b>1,33</b>	<b>2,21</b>
<i>YOR019W</i>		<b>2,18</b>	
<i>YOR028C</i>	<i>CIN5</i>		<b>5,17</b>
<i>YOR036W</i>	<i>PEP12</i>	<b>2,08</b>	<b>2,39</b>
<i>YOR065W</i>	<i>CYT1</i>	<b>1,41</b>	<b>2,59</b>
<i>YOR120W</i>	<i>GCY1</i>	<b>2,21</b>	<b>5,03</b>
<i>YOR121C</i>			<b>5,74</b>
<i>YOR134W</i>	<i>BAG7</i>		<b>5,73</b>
<i>YOR137C</i>	<i>SIA1</i>	<b>2,35</b>	
<i>YOR162C</i>	<i>YRR1</i>	<b>1,35</b>	<b>2,65</b>
<i>YOR178C</i>	<i>GAC1</i>	<b>3,88</b>	<b>3,52</b>
<i>YOR202W</i>	<i>HIS3</i>	<b>9,34</b>	<b>10,29</b>
<i>YOR208W</i>	<i>PTP2</i>		<b>2,74</b>
<i>YOR220W</i>	<i>RCN2</i>	<b>2,36</b>	<b>3,94</b>
<i>YOR273C</i>	<i>TPO4</i>	<b>3,23</b>	<b>5,80</b>
<i>YOR289W</i>		<b>2,40</b>	<b>1,95</b>
<i>YOR347C</i>	<i>PYK2</i>	<b>2,06</b>	<b>1,03</b>
<i>YOR374W</i>	<i>ALD4</i>	<b>2,06</b>	<b>2,68</b>
<i>YOR385W</i>		<b>2,08</b>	<b>4,08</b>
<i>YOR391C</i>	<i>HSP33</i>		<b>2,18</b>
<i>YPL057C</i>	<i>SUR1</i>	<b>2,95</b>	<b>2,42</b>
<i>YPL061W</i>	<i>ALD6</i>	<b>1,38</b>	<b>3,44</b>
<i>YPL070W</i>	<i>MUK1</i>	<b>1,11</b>	<b>2,60</b>
<i>YPL149W</i>	<i>ATG5</i>	<b>1,48</b>	<b>2,20</b>
<i>YPL186C</i>	<i>UIP4</i>	<b>1,61</b>	<b>2,53</b>
<i>YPL195W</i>	<i>APL5</i>	<b>1,96</b>	<b>2,22</b>
<i>YPL196W</i>	<i>OXR1</i>	<b>1,51</b>	<b>2,24</b>
<i>YPL223C</i>	<i>GRE1</i>		<b>6,23</b>
<i>YPL240C</i>	<i>HSP82</i>	<b>0,66</b>	<b>2,07</b>
<i>YPR001W</i>	<i>CIT3</i>		<b>4,59</b>
<i>YPR005C</i>	<i>HAL1</i>		<b>2,32</b>
<i>YPR030W</i>	<i>CSR2</i>	<b>2,37</b>	<b>6,03</b>
<i>YPR093C</i>	<i>ASR1</i>	<b>1,29</b>	<b>2,18</b>
<i>YPR150W</i>			<b>10,86</b>
<i>YPR154W</i>	<i>PIN3</i>	<b>1,18</b>	<b>2,43</b>

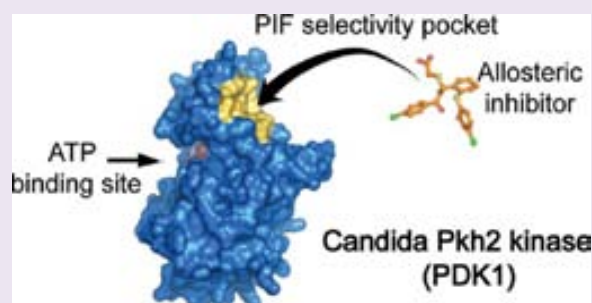
## **ARTICLES**

---

PIF-Pocket as a Target for *C. albicans* Pkh Selective InhibitorsDaniel Pastor-Flores,<sup>†</sup> Jörg O. Schulze,<sup>†</sup> Anna Bahí,<sup>‡,§</sup> Romina Giacometti,<sup>||</sup> Jofre Ferrer-Dalmau,<sup>‡,§</sup> Susana Passeron,<sup>||</sup> Matthias Engel,<sup>⊥</sup> Evelyn Süß,<sup>†</sup> Antonio Casamayor,<sup>\*,‡,§</sup> and Ricardo M. Biondi<sup>\*,†</sup><sup>†</sup>Research Group PhosphoSites, Medizinische Klinik 1, Universitätsklinikum Frankfurt, Theodor-Stern-Kai 7, 60590 Frankfurt, Germany<sup>‡</sup>Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola 08193, Barcelona, Spain<sup>§</sup>Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola 08193, Barcelona, Spain<sup>||</sup>Cátedra de Bioquímica, Facultat de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, C1417DSE Buenos Aires, Argentina<sup>⊥</sup>Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Saarland University, P.O. Box 151150, D-66041 Saarbrücken, Germany

## Supporting Information

**ABSTRACT:** The phosphoinositide-dependent protein kinase 1, PDK1, is a master kinase that phosphorylates the activation loop of up to 23 AGC kinases. *S. cerevisiae* has three PDK1 orthologues, Pkh1–3, which also phosphorylate AGC kinases (e.g., Ypk, Tpk, Pkc1, and Sch9). Pkh1 and 2 are redundant proteins involved in multiple essential cellular functions, including endocytosis and cell wall integrity. Based on similarities with the budding yeast, the Pkh of fungal infectious species was postulated as a novel target for antifungals. Here, we found that depletion of Pkh eventually induces oxidative stress and DNA double-strand breaks, leading to programmed cell death. This finding supports Pkh as an antifungal target since pharmacological inhibition of Pkh would lead to the death of yeast cells, the ultimate goal of antifungals. It was therefore of interest to further investigate the possibility to develop Pkh inhibitors with selectivity for *Candida* Pkh that would not inhibit the human ortholog. Here, we describe *C. albicans* Pkh2 biochemically, structurally and by using chemical probes in comparison to human PDK1. We found that a regulatory site on the *C. albicans* Pkh2 catalytic domain, the PIF-pocket, diverges from human PDK1. Indeed, we identified and characterized PS77, a new small allosteric inhibitor directed to the PIF-pocket, which has increased selectivity for *C. albicans* Pkh2. Together, our results describe novel features of the biology of Pkh and chemical biology approaches that support the validation of Pkh as a drug target for selective antifungals.



## INTRODUCTION

Fungal organisms are responsible for life-threatening systemic infections, especially in immunocompromised patients. Current antifungals most often target features that are present in the infectious organisms but absent in humans (e.g., components of the cell wall and cell membranes). However, it may be possible to target proteins that have related counterparts in the human host, if sufficient specificity for the fungal target can be achieved or if the inhibition of the human counterpart does not produce major side effects. One such example is Pkh, the fungal ortholog of the phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1), which has been postulated as an antifungal drug target.<sup>1</sup> In multicellular organisms, PDK1 phosphorylates the activation loop of the AGC family of protein kinases<sup>2</sup> (named after three representatives of the group, PKA, PKG, and PKC).<sup>3</sup> PDK1 and a subset of AGC kinases contain a regulatory site in the catalytic domain, termed PIF-pocket.<sup>4</sup> The site is used by PDK1 to interact with some substrates and mediates the regulation of the activity of many AGC kinases.<sup>3</sup> Thus, the PIF-pocket mediates the activation by phosphorylation of diverse

AGC kinases<sup>5,6</sup> and also the allosteric inhibition by N-terminal domains.<sup>7–9</sup> Along the years, we and others have developed small molecules directed to the PIF-pocket that either activate or inhibit different AGC kinases (recently reviewed in ref 3). However, we have not yet identified allosteric inhibitors of PDK1 or allosteric molecules targeting the PIF-pocket of any yeast protein kinase.

The genome of the yeast *S. cerevisiae* contains three genes (termed *PKH1–3*) that encode protein kinases whose catalytic domains are approximately 70% identical to human PDK1 and, similar to PDK1, possess a long C-terminal noncatalytic region. *PKH1* and *PKH2* are functionally redundant genes with essential functions because spores deleted for both genes, but not for either single one, are not viable.<sup>10</sup> Most of the data gained about the effects of the lack of Pkh has been obtained by using *PKH2* deleted cells (*pkh2Δ*) carrying a thermolabile

Received: June 21, 2013

Accepted: August 2, 2013

Table 1. Yeast Strains Used in the Present Study

strain	relevant genotype	PKH gene expressed with doxycycline	source/ref.
CML476	<i>MATa ura3-52 leuΔ1 his3Δ200 GAL2 CMVp(tetR'-SSN6)::LEU2 trp1::tTA</i>	<i>PKH1, PKH2, PKH3</i>	36
MB002	<i>MATa CML476 KanMX4-(tetO<sub>7</sub>):PKH2</i>	<i>PKH1, PKH3</i>	present study
MB005	<i>MATa CML476 KanMX4-(tetO<sub>7</sub>):PKH2 pkh1::HIS3</i>	<i>PKH3</i>	present study
SDP7	<i>MATa CML476 KanMX4-(tetO<sub>7</sub>):PKH2 pkh3::nat1</i>	<i>PKH1</i>	present study
SDP8	<i>MATa CML476 KanMX4-(tetO<sub>7</sub>):PKH2 pkh1::HIS3 pkh3::nat1</i>	-	present study
SDP10	<i>MATa ura3-52 leuΔ1 his3Δ200 GAL2 CMVp(tetR'-SSN6)::LEU2 erg6::TRP1</i>	<i>PKH1, PKH2, PKH3</i>	present study
YAB100	<i>MATa CML476 KanMX4-(tetO<sub>7</sub>):PKH2 pkh1::HIS3 mca1::nat1</i>	<i>PKH3</i>	present study
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ met15Δ ura3Δ</i>	<i>PKH1, PKH2, PKH3</i>	37
Y04300	<i>BY4741 pkh3::KanMX4</i>	<i>PKH1, PKH2, PKH3</i>	37
YPP64T	<i>MATa ade2 trp1-901 leu2-3,112 lys2-801am his3Δ200 lys2::(lexAop)4-HIS3 ura3-52::ura3 (lexAop)8-lacZ pdr5::loxP, snq2::loxP, yor1::loxP, pdr1::loxP, pdr3::loxP</i>	<i>PKH1, PKH2, PKH3</i>	present study
YPP66	<i>MATa Gal4-452 Gal80-538 ade2-101 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-901 ura3-52 lys2-801 URA3::UAS<sub>GAL1</sub>-LacZ lys2::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3 cyh<sup>R</sup> pdr5::loxP, snq2::loxP, yor1::loxP, pdr1::loxP, pdr3::loxP</i>	<i>PKH1, PKH2, PKH3</i>	present study

Pkh1 protein (encoded by the *pkh1*<sup>D398G</sup> allele) and incubation at the restrictive temperature (37 °C).<sup>11</sup> Pkh3 is a third and more distantly related protein that was identified as a multicopy suppressor of the growth defect of *pkh1*<sup>D398G</sup> *pkh2Δ* mutant cells at 37 °C.<sup>11</sup> In contrast to what occurs with the *pkh1Δ* *pkh2Δ* inviable cells, the *pkh1Δ* *pkh3Δ* and the *pkh2Δ* *pkh3Δ* double mutant strains grow normally.<sup>12</sup>

Similarly to mammalian PDK1, the yeast Pkh proteins exert pleiotropic effects by phosphorylating the activation loop of diverse AGC protein kinases substrates. This phosphorylation is indispensable for the activity of at least Ypk1, Ypk2, Pkc1, Sch9, Tpk1, and Tpk3 protein kinases.<sup>12,13</sup> Phosphorylation of Pkc1 by Pkh is crucial for maintaining cell wall integrity (CWI) by the activation of the SlT2MAPK signaling cascade<sup>11</sup> and for the regulation of the processing body (P-body).<sup>14</sup> Pkh regulates chronological aging, cell size determination, and nutrient-induced growth resumption by phosphorylation and activation of the protein kinase Sch9.<sup>12,15</sup> Phosphorylation of Ypk by Pkh leads to the activation of its downstream signaling, which regulates endocytosis.<sup>16</sup> Also, through Ypk, Pkh is involved in the maintenance of the asymmetric distribution of aminophospholipids between the two leaflets of the plasma membrane and is involved in important aspects of the heat shock response.<sup>17</sup> Together, Pkh has been shown to have pleiotropic roles in yeast cells.

Genome sequencing revealed that *C. albicans* has two Pkh-related ORFs: orf19.5224, encoding a protein (CaPkh2) more similar to Pkh1 and Pkh2 and orf19.1196, which encodes a protein (CaPkh3) more similar to Pkh3. The role of Pkh from *C. albicans*, broadly assumed to be equivalent to the role in *S. cerevisiae*, has not been extensively investigated. However, biochemical and genetic research on *C. albicans* has shown important roles for the Pkh substrates CaPkc1, CaTpk1, and CaSch9. Deletion of *CaPKC1* results in cell lysis in hypotonic conditions and morphological aberrant cells, in agreement with an upstream role in the CWI pathway.<sup>18</sup> Also similarly to *S. cerevisiae*, CaTpk isoforms play important roles in cell growth, yeast to hypha transition,<sup>19,20</sup> stress response, and glycogen storage,<sup>21,22</sup> while CaSch9 is also required for morphogenesis and virulence.<sup>18,23</sup>

Most drug developments directed to protein kinases target the ATP-binding site. Due to the similarity of this site among

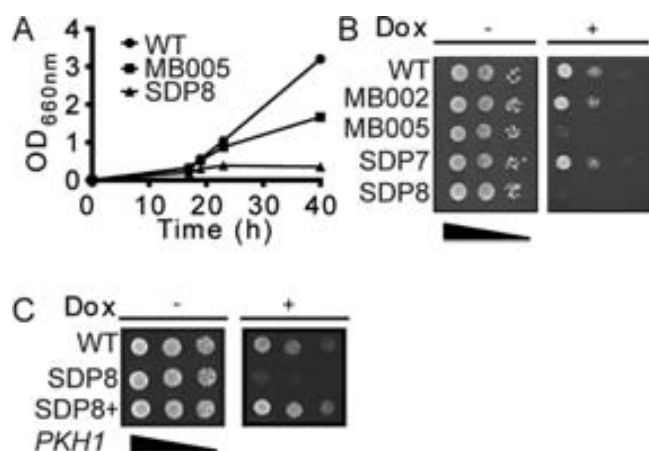
the protein kinases, such compounds are most often unspecific, inhibiting multiple protein kinases. Thus, compounds targeting the ATP-binding site of fungal Pkh are expected to also inhibit human PDK1 and multiple additional human kinases, producing unwanted side effects. Previous work identified protein kinase inhibitors that inhibited the CWI pathway and had antifungal activity against *C. albicans*.<sup>1</sup> The compounds (e.g., KP-372 and UCN-01) are known to inhibit several human protein kinases including PDK1 and may also target other kinases in yeasts. It has been speculated that higher selectivity will be identified by targeting sites different from the ATP-binding site on fungal Pkh.<sup>1</sup> In the present work, we further validate Pkh as an antifungal target and describe differences between the PIF-pocket of Pkh and its human ortholog PDK1. Notably, we describe a novel allosteric small compound, **PS77**, that binds to the PIF-pocket and preferentially inhibits CaPkh over PDK1. Together, our results open the field of drug development of antifungals based on the use of selective, allosteric protein kinase inhibitors.

## RESULTS AND DISCUSSION

It has been previously postulated that the PDK1 ortholog in fungal organisms, Pkh, could be a drug target. However, some questions still remained: what is the effect of Pkh deletion in yeasts in the absence of heat stress? Would Pkh inhibitors be cytostatic or cytotoxic? Would it be possible to develop antifungal kinase inhibitors with selectivity over human kinases? Answers to such questions could support the validation of Pkh as an antifungal drug target and the approach to achieve its selective inhibition in antifungal therapies. In the present work, we analyze the effects of Pkh depletion in yeast cells cultured in the absence of heat stress and further employed a multi-disciplinary approach, including biochemistry, structural biology, and chemical biology methods to answer the above questions.

**Effects Caused by Pkh Depletion in the Absence of Heat Stress.** Growth of yeast cells at stressful temperatures, in combination with a temperature-sensitive allele strategy, has been previously used to investigate the role of Pkh in *S. cerevisiae*. In order to investigate the effect of Pkh inhibition in the absence of heat stress, we prepared *pkh1Δ* and *pkh1Δ*

*pkh3Δ* yeast strains where *PKH2* was controlled by the doxycycline-repressible (*tetO<sub>7</sub>*) promoter (strains MB005 and SDP8; Table 1). Upon repression of *PKH2* transcription by the addition of doxycycline, MB005 cells continued to grow normally for about 20 h at which time the levels of *PKH2* mRNAs measured by RT-PCR decreased 9-fold, concomitant with a decrease in the number of dividing cells. Depletion of Pkh decreased the ability of yeasts to activate the CWI pathway (Supporting Information (SI) Figure 1). After 24 h of incubation with doxycycline, there was a 70% decrease in the number of budding cells of the MB005 strain. In line with this, the yeast growth in liquid media was severely affected in MB005 cells, with complete inhibition of growth in SDP8 cells (Figure 1A). Similarly, the strain depleted of Pkh1 and 2



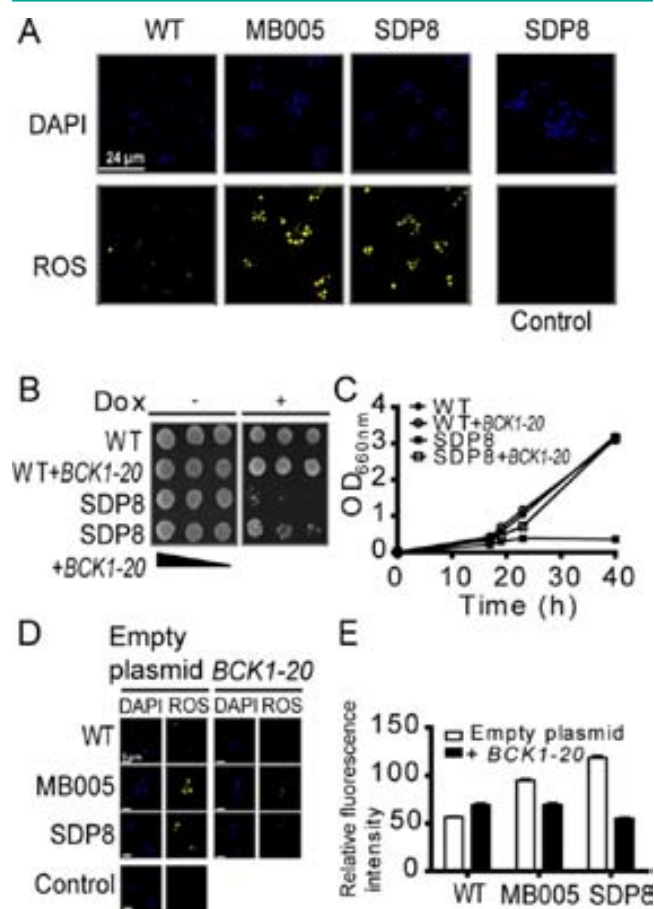
**Figure 1.** *S. cerevisiae* cells lacking *PKH1* and having reduced expression of *PKH2* are not viable. (A) Suspension growth of the indicated yeast strains in the presence of 100 μg/mL doxycycline. (B–C) Serial 1:10 cell dilutions of the indicated strains spotted onto YPD agar plates in presence or absence of 100 μg/mL of doxycycline and incubated at 28 °C for 36 h. (C) Expression of *PKH1* from the pRS316 centromeric plasmid under the control of its own promoter reconstitutes growth of SDP8 in the presence of 100 μg/mL doxycycline.

(MB005) and the strain depleted of the three Pkh isoforms (SDP8) had greatly reduced growth in solid media complemented with doxycycline, whereas strains still expressing normal levels of Pkh1 and Pkh3 (MB002) or Pkh1 (SDP7) were unaffected (Figure 1B). The growth defect in the presence of doxycycline was specifically caused by the depletion of the Pkh proteins, since growth of the SDP8 strain in doxycycline-containing media was reconstituted upon the expression of yeast *PKH1* (Figure 1C). The above data indicated that the yeast cells cannot adapt to growth, even in the absence of heat stress.

We note that our experimental model using the transcriptional repression of *PKH2* does not necessarily inform on the direct effects of the lack of Pkh. Certainly, a subset of the effects may be indirect and could depend on the compensatory mechanisms that may happen when the levels of Pkh are diminished. This is similar to the information that is routinely obtained in higher organisms by knockout or knock-down technologies. At any rate, the results clearly show that the depletion of Pkh is detrimental for the growth of *S. cerevisiae* cells when cultured in optimal conditions in liquid or in solid media and that the lack of Pkh cannot be compensated.

Global expression analyses further indicated that depletion of Pkh up-regulates genes involved in glycogen metabolism, protein folding, and response to oxidative stress (SI Results and SI Figure 2). The data were consistent with the hypothesis that long-term depletion of Pkh may cause oxidative stress, a feature that had not been previously recognized.

**Cells Depleted of Pkh Accumulate Reactive Oxygen Species (ROS).** To test the effect of Pkh depletion on oxidative stress, WT CML476, MB005, and SDP8 cells were treated with doxycycline for 24 h and then incubated with 1,2,3-dihydrorhodamine to monitor the generation of ROS. MB005 and SDP8 cells displayed more intense fluorescent staining than WT CML476 cells indicating higher presence of ROS (Figure 2A). Therefore, we conclude that the long-term depletion of Pkh produced increased levels of ROS in yeast cells. It has been shown that Pkh phosphorylates Pkc1 and that, in turn, Pkc1 phosphorylates and activates Bck1, the MAPKKK of the Slt2-MAPK pathway, thereby activating the CWI pathway. In WT CML476 and SDP8 cells, we then expressed



**Figure 2.** Depletion of Pkh activity induces oxidative stress in *S. cerevisiae*. (A) The depletion of Pkh under doxycycline produces the accumulation of ROS. (B–C) Expression of *BCK1-20* reconstitutes growth of the SDP8 strain in YPD agar (B) and in liquid media (C). (D–E) *BCK1-20* expression reverts the accumulation of ROS in the absence of Pkh. (E) Quantification of ROS by FAC sorting. (A and D) WT CML476 and its derivative strains, MB005 and SDP8, were treated with doxycycline for 24 h and loaded with dihydrorhodamine 123. The fluorescence of a sample of SDP8 cells not treated with DHR123 is also shown as a control (–DHR123). Nuclei were visualized by DAPI staining. Representative fields of the indicated strains are shown. Error bars denote the standard deviations.



the *BCK1-20* allele, which encodes for a constitutively active Bck1 kinase that renders an active Slr2.<sup>24</sup> Activation of the Slr2 pathway by the expression of *BCK1-20* partially rescued the lack of growth of SDP8 cells in the presence of doxycycline in both solid (Figure 2B) and liquid medium (Figure 2C), indicating that the lethality of Pkh-depleted cells was rescued, at least in part, by downstream activation of the CWI pathway.

We next investigated whether the oxidative stress detected in Pkh-depleted cells was also due to Pkc1 downstream effects. Quantification of ROS showed that both MB005 and SDP8 cells carrying the *BCK1-20* allele had a notably decreased quantity of ROS when compared with the same strains harboring the empty plasmid (Figure 2D,E). Taken together, these results indicate that depletion of Pkh causes an increase in ROS and that the downstream activation of the Slr2 MAP kinase pathway partially suppresses both the growth defect and the accumulation of ROS caused by the lack of Pkh.

**Long-Term Depletion of Pkh Induces Programmed Cell Death (PCD).** The presence of ROS could be a signal of apoptotic-like cell death in yeast. We hypothesized that the ROS detected in cells lacking Pkh proteins could be triggering a PCD process. One key feature of apoptosis is the fragmentation of the genomic DNA. Therefore, we examined the occurrence of double-strand DNA breaks in doxycycline-treated WT CML476 and MB005 cells using the TUNEL assay. Indeed, we observed that, after 24 h of incubation in the presence of doxycycline, MB005 cells displayed stronger staining for TUNEL than WT CML476 cells (Figure 3A). This signal of

DNA fragmentation was even more pronounced in SDP8 cells. In both strains, the activation of the Slr2 MAP kinase pathway by the expression of the *BCK1-20* allele vastly decreased the number of double-strand breaks (Figure 3A,B). The above result is in agreement with the hypothesis that the long-term deletion of Pkh induces DNA fragmentation and that this effect is also mediated by the lack of Pkh-dependent activation of the Pkc1 downstream signaling cascade.

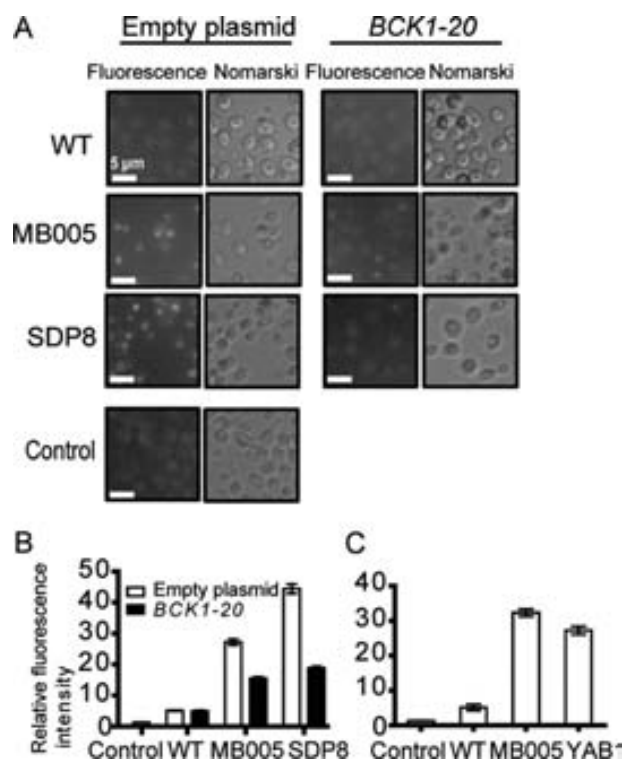
Some of the apoptotic stimuli in yeast, including treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,<sup>25</sup> require the yeast metacaspase Mca1 to trigger the apoptotic process, but other stimuli induce Mca1-independent apoptosis.<sup>26</sup> To investigate the possible role of the yeast metacaspase, we deleted the *MCA1* gene in the MB005 strain, generating the YAB100 strain (Table 1), and measured the DNA double-strand breaks after incubation with doxycycline for 24 h. MB005 cells displayed at least 6-fold more DNA double-strand breaks than WT CML476 cells. Additional disruption of *MCA1* still showed more than 5-fold the signal of WT CML476 cells (Figure 3C). Taken together, these results indicate that the apoptotic process triggered by the lack of Pkh is partially dependent on the activation of the Slr2 MAPK cascade but is not dependent on the Mca1 yeast metacaspase.

The above results indicate that yeast cells cannot cope with the long-term depletion of Pkh, even in optimal growth conditions, and that they die, displaying typical features of PCD. This effect supports the use of fungal Pkh as potential drug targets for antifungals, since one would predict that such drugs would be cytotoxic rather than cytostatic. Most importantly, the finding that depletion of Pkh is lethal and that it is also required for the response of yeasts to stresses suggests that selective drugs targeting fungal Pkh may be combined with other drugs producing cell wall stresses (e.g., echinocandins). While each drug would be effective on its own, we expect that the combination would synergize the effects of the drugs selectively in fungal organisms, by impeding the cellular responses to cell wall stresses, as very recently suggested for *Cryptococcus neoformans*.<sup>27</sup> Today, the combination of modern targeted drugs is a success in the treatment of HIV and HCV, and it is expected that future cancer therapies will involve the use of targeted drugs in personalized combinations. Our work highlights the immense potential for the combination of targeted drugs for the development of efficient antifungals. However, we should stress that the ideal antifungal or anti-infective drugs should have selectivity for the protein kinase from the infective organism over other protein kinases from the human host.

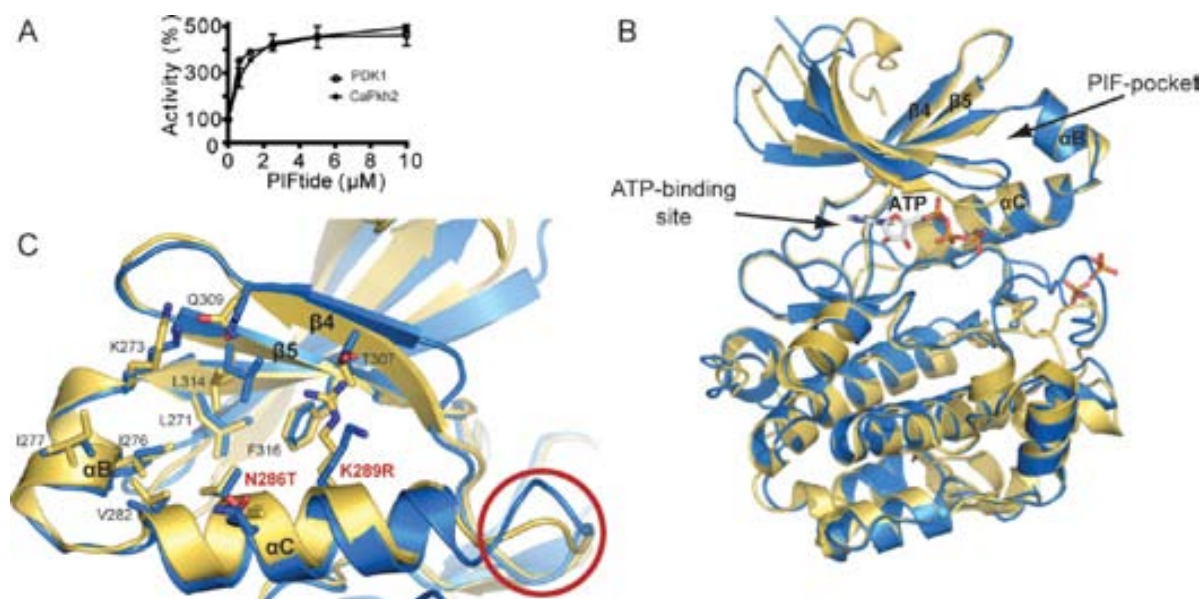
#### Biochemical Similarities and Differences between CaPkh2 and PDK1.

*C. albicans* is an obligatory diploid organism, which contains two genes encoding putative orthologs of Pkh proteins (*CaPKH2* and *CaPKH3*). Heterozygous deletion of *CaPKH2* in the CAI4 *C. albicans* strain rendered viable cells. However, the heterozygous cells had a defect in glycogen accumulation, suggesting that the Pkh phosphorylation of Tpk1 and Tpk2, the catalytic subunits of PKA, mediating basic cellular processes including glycogen accumulation,<sup>21</sup> was sensitive to the haploinsufficiency of CaPkh2 (SI Figure 3). Interestingly, we were not able to obtain homozygous null yeast cells, indicating that CaPkh2 could be essential for the viability of this strain. This result reinforced the notion that CaPkh2 could also be essential for *C. albicans* and inhibitors of CaPkh2 could be used as antifungals.

Protein kinase inhibitors to be employed as anti-infectives in humans should have high selectivity and have preference for the



**Figure 3.** Depletion of Pkh causes DNA fragmentation. (A) Double-strand DNA breaks visualized by TUNEL staining. (B and C) Quantification of double-strand DNA breaks by FAC sorting. (B) *BCK1-20* expression reverts DNA fragmentation induced by depletion of Pkh. (C) DNA fragmentation induced by Pkh depletion is not reverted by deletion of the metacaspase gene *MCA1*. The control corresponds to the autofluorescence of MB005 cells containing the empty pRS316 plasmid. Error bars denote the standard deviations.



**Figure 4.** Biochemical and structural characterization of CaPkh2. (A) Activity assay showing that CaPkh2 is activated by PIFtide, similarly as PDK1. (B) Crystal structure of the catalytic domain of CaPkh2 (blue) superimposed on the structure of human PDK1 (yellow) (PDB code 1H1W). The structures are shown in cartoon representation; ATP and the phosphorylations at the activation loops are depicted as sticks. (C) Close-up view of the PIF-pocket with side chains constituting the pocket shown as sticks. The perspective in comparison to part B is rotated by  $\sim 180^\circ$  along a vertical axis. Although the PIF-pocket of CaPkh2 is structurally similar to the PIF-pocket of PDK1, essential residues differ (indicated with red labels), and one additional residue is inserted in the loop C-terminal to helix  $\alpha C$  (red circle).

pathogen over the human ortholog kinase to avoid side effects. To investigate the potential selectivity of the ATP-binding site and the allosteric regulatory PIF-pocket, we expressed GST-CaPkh2 in mammalian cells and N-terminally His-tagged CaPkh2 in insect cells. Both sources of purified CaPkh2 phosphorylated T308tide, a reference polypeptide used as a substrate of PDK1, with a specific activity of  $\sim 3 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ , which was about 2 fold higher than the specific activity of human PDK1 measured under identical conditions. Similarly to PDK1, CaPkh2 was activated  $\sim 3$ – $4$  fold by PIFtide (Figure 4A), a prototype 24 residue polypeptide that binds to the PIF-pocket and activates PDK1.<sup>4,28</sup> It was recently identified that the protein kinase inhibitor KP-372 inhibited the CWI pathway and had antifungal activity.<sup>1</sup> KP-372 was originally identified as a nonselective ATP-binding site inhibitor of the protein kinase PKB (also termed Akt)<sup>29</sup> and later found to inhibit PDK1 activity.<sup>30</sup> However, the direct inhibition of Pkh by KP-372 had not been verified *in vitro*. We therefore tested the relative ability of KP-372 to inhibit PDK1 and CaPkh2 in kinase assays using 100  $\mu\text{M}$  ATP, a relatively low concentration that favors binding of inhibitors to the ATP-binding site. Surprisingly, we observed that KP-372 failed to inhibit PDK1 and CaPkh2 *in vitro*, with 75% remaining activity at 50  $\mu\text{M}$ , whereas, as described, KP-372 indeed inhibited PKB/Akt (SI Figure 4A).

**Crystal Structure of CaPkh2.** To investigate the possible differences between PDK1 and CaPkh2 that could be targeted for the development of selective inhibitors, we attempted to crystallize full-length His-CaPkh2. We solved the crystal structure of CaPkh2 by molecular replacement using the PDK1 structure (PDB ID: 3HRC) and refined the CaPkh2 structure to 3.16 Å resolution. The structure comprises only the catalytic domain (aa 237–510) of CaPkh2 (see SI Results). In the solved structure, the main chain and most side chains can be accurately traced, allowing the comparison of the structures of the catalytic domains of PDK1 and CaPkh2. The structure

shows the typical bilobal protein kinase structure, with the ATP-binding site in the cleft between both lobes (Figure 4B). The protein is phosphorylated at the activation loop, and the structure is in an overall active conformation, similar to the structures of PDK1 in crystal packing I<sup>31</sup> and crystal packing II.<sup>32</sup> However, similar to PDK1 structures in the absence of allosteric compounds, the active site is not in the fully closed-active conformation but in an intermediate conformation (Figure 4C), comparable to the structure of PKA in complex with staurosporine (PDB ID: 1STC). Moreover, the activation loop, which is seven residues longer than in human PDK1, adopts an unusual conformation that would sterically interfere with polypeptide substrate binding when compared to the structure of PKA in complex with PKI (PDB ID: 1ATP).

The ATP-binding site is almost identical between CaPkh2 and PDK1 (SI Results and SI Figure 5). In spite of the general similarities between PDK1 and CaPkh2, significant differences were observed at the allosteric PIF-pocket regulatory site. The PIF-pocket is located between the beta-strands  $\beta 4$  and  $\beta 5$  and helices  $\alpha B$  and  $\alpha C$ . Interestingly, CaPkh2 contains an additional residue in the loop following the regulatory helix  $\alpha C$  (Figure 4C). In addition, some key residues in the helix  $\alpha C$ , corresponding to Thr128 and Arg131 in PDK1, are replaced by Asn and Lys, respectively. Since these residues are constituents of the allosteric PIF-pocket binding site where small compounds bind,<sup>32,33</sup> they could well participate in selective interactions. Together, the crystal structure shows that while the ATP-binding site is almost identical between PDK1 and CaPkh2, the PIF-pocket may provide selectivity for the development of CaPkh2-selective allosteric small compounds.

Mutation of the residue at the center of the hydrophobic PIF-pocket in PDK1, Leu155, to Ser, Asp, or Glu renders proteins that have 3-fold higher specific activity.<sup>4</sup> In sharp contrast, the CaPkh2 mutant equivalent to Leu155Glu (CaPkh2 [Leu314Glu]) had vastly reduced specific activity

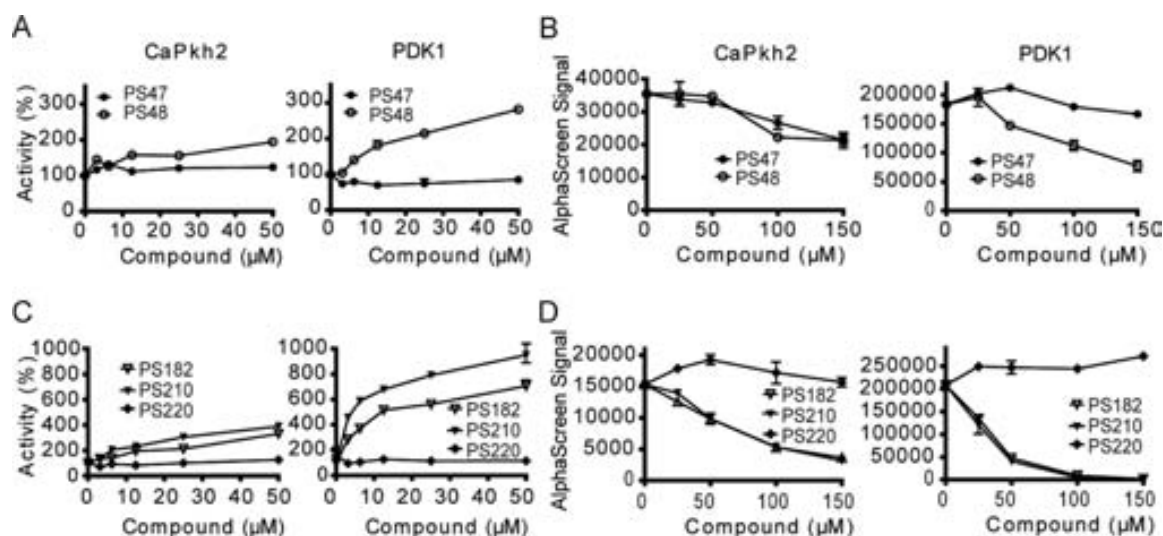
Table 2. Effect of Compounds on PDK1 and CaPkh2<sup>a</sup>

Compound name	Formula	CaPkh2					PDK1				
		Kinase activity			AlphaScreen		Kinase activity			AlphaScreen	
		Activity (%) 50 $\mu$ M	AC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	PIFtide bound (%) 100 $\mu$ M	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Activity (%) 50 $\mu$ M	AC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	PIFtide bound (%) 100 $\mu$ M	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
PS76		96	-	n.e.	89	n.d.	45	-	n.d.	100	n.d.
PS77		3	-	17	5	44	37	-	38	91	n.d.
PS46		209	65	-	44	85	237	38 <sup>b</sup>	-	27	n.d.
PS47		123	n.e.	-	25	n.d.	80	n.e. <sup>c</sup>	-	2	n.d.
PS48		194	48	-	37	n.d.	281	8 <sup>d</sup>	-	39	97
PS182		331	n.d.	-	95	66	706	2 <sup>d</sup>	-	65	26
PS210		389	42	-	98	60	950	4 <sup>d</sup>	-	65	39
PS220		126	n.e.	-	100	n.e.	116	n.e.	-	100	n.e.

<sup>a</sup>n.d. = not determined; n.e. = no effect. <sup>b</sup>Ref 35. <sup>c</sup>Refs 32 and 38. <sup>d</sup>Refs 33 and 39.

(13% of the activity of wild type CaPkh2). Similarly, the mutation of Arg131 to Met renders a mutant PDK1 protein that has 2-fold higher specific activity<sup>34</sup> while the equivalent CaPkh2 mutant (Lys314Glu) had a slightly lower specific activity (63% of the activity of wild type CaPkh2). Together, the structural differences between the PIF-pockets of PDK1 and CaPkh2 and the additional differences in the activities of PDK1 and CaPkh2 proteins mutated at the PIF-pockets, provided a first indication that the PIF-pocket was structurally and functionally different between the human PDK1 and the *C. albicans* ortholog.

**Differences at the PIF-Pocket between PDK1 and CaPkh2.** We then tested small molecules from our PIF-pocket-directed focused library for their ability to affect the activity of CaPkh2 (Table 2). PS48, PS210, and PS182 (Table 2) are *in vitro* activators of PDK1 that have been cocrystallized with PDK1,<sup>32,33</sup> confirming their binding to the PIF-pocket. Interestingly, PS48, PS210, and PS182 had drastically decreased abilities to activate CaPkh2 (Figure 5A and C). In order to further characterize the interaction of small compounds with the PIF-pocket, we established AlphaScreen interaction-displacement assays using His-CaPkh2 or His-



**Figure 5.** Comparison of the PIF-pocket of CaPkh2 and PDK1 using small compounds allosteric activators that bind to the PIF-pocket of PDK1. (A) Effect of related compounds PS47 and PS48 on the activity of CaPkh2 and PDK1. (B) Displacement of PIFtide by PS47 and PS48. (C) Effect of related compounds PS182, PS210, and PS220 on the activity of CaPkh2 and PDK1. (D) Displacement of PIFtide by PS182, PS210, and PS220. The ability of compounds to displace the CaPkh2-PIFtide or PDK1-PIFtide interaction was evaluated using an AlphaScreen interaction–displacement assay. Error bars denote the standard deviations.

PDK1 and the biotinylated polypeptide PIFtide (SI Figure 6). Whereas inactive compounds (e.g., PS47 and PS220) did not displace the PDK1-PIFtide interaction, low-molecular-weight activators readily displaced the PDK1-PIFtide interaction. In comparison, PS48, PS210, and PS182 had decreased abilities to selectively displace the CaPkh2-PIFtide interaction (Figure 5B and D). Together, the data suggest that PS48, PS210, and PS182 had decreased abilities to bind to the PIF-pocket and decreased abilities to fully activate CaPkh2, providing further evidence that the PIF-pocket of CaPkh2 differed from that of PDK1.

**PS77 is a CaPkh2 PIF-Pocket Allosteric Inhibitor with Selectivity over PDK1.** Interestingly, we also identified that the compound 2-(3-(4-chlorophenyl)-1-(2-(4-chlorophenylthio)phenyl)-3-oxopropylthio)acetic acid (PS77; Table 2; see the synthesis and chemical characterization in the SI Data) inhibited CaPkh2 (Figure 6A). PS77 is a variant of PS46, which is a low-molecular-weight PDK1 activator (Table 2; compound 1 in ref 35). Biochemical and mutagenesis experiments showed that PS46 binds to the PIF-pocket,<sup>35</sup> a feature that was confirmed by the crystal structure of the PDK1-ATP-PS46 complex (Valerie Hindie, Pedro M. Alzari, and R.M.B., unpublished). Most interestingly, PS77 specifically inhibited CaPkh2 but had marginal inhibitory effect on PDK1 (Figure 6A). As a control for the specificity, the related compound 1-(4-chlorophenyl)-3-(2-(4-chlorophenylthio)phenyl)prop-2-en-1-one (PS76) did not inhibit CaPkh2. In complete agreement with the inhibition of CaPkh2, PS77 also displaced the interaction between His-CaPkh2 and biotin-PIFtide (Figure 6B) whereas PS76 had no effect on the displacement. In contrast, PS77 had vastly decreased ability to displace PIFtide from PDK1 (Figure 6B). Together, the results provided evidence that PS77 is a selective CaPkh2 allosteric inhibitor that competes with PIFtide for the binding to CaPkh2.

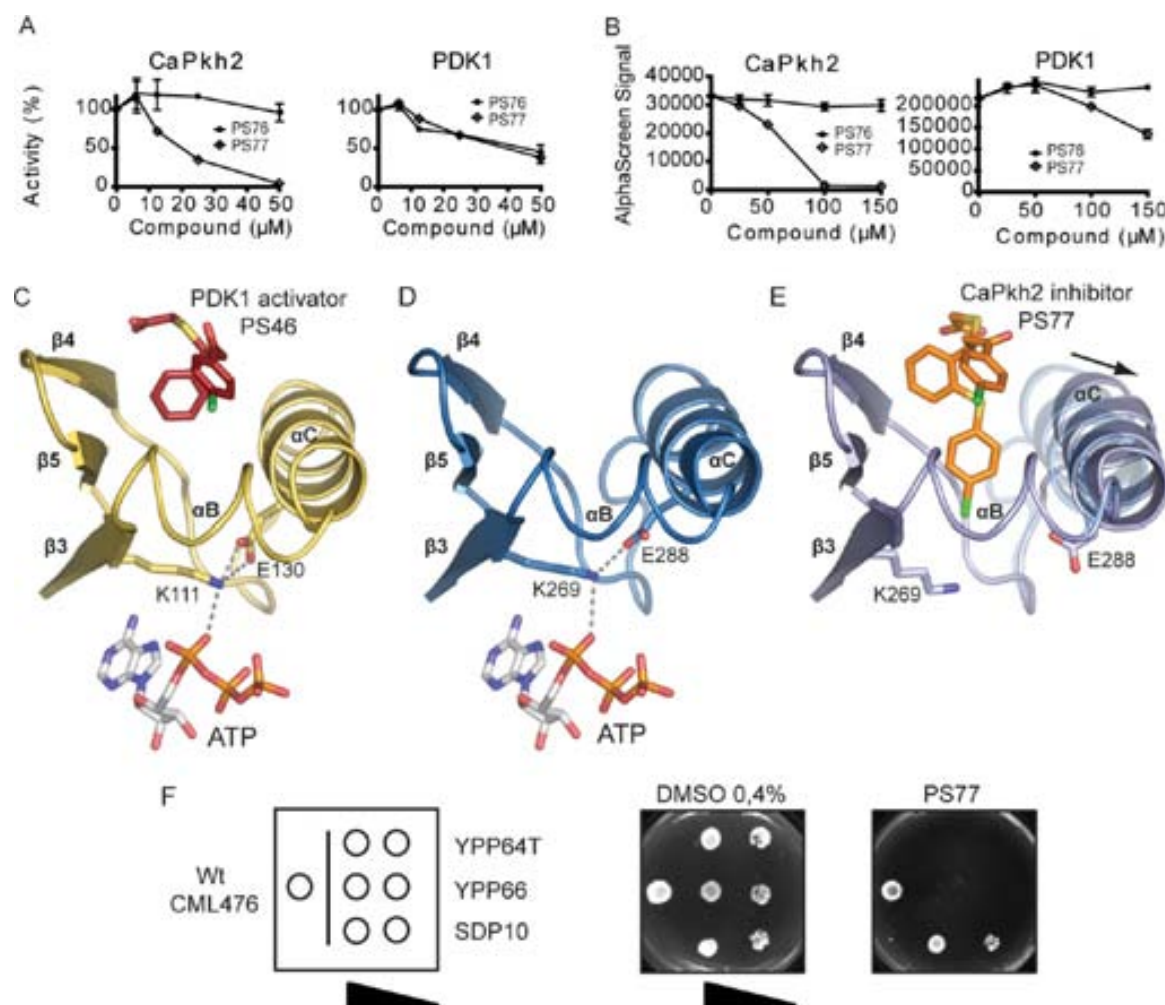
Since we have obtained the crystal structure of diverse allosteric activators and allosteric inhibitors bound to the PIF-pocket, it was of interest to model the binding of PS77 to the PIF-pocket of CaPkh2. Interestingly, PS77 does not fit into the

PIF-pocket in a manner equivalent to compound 1, PS48, or PS210 in the overall active structure of CaPkh2 or PDK1 since there is no apparent space for the diphenyl sulfide system. Since the helix  $\alpha C$  of AGC kinases in solution has a large degree of mobility, we envisage that the 2-phenylthio moiety of PS77 may occupy a novel pocket behind helix  $\alpha C$  (Figure 6C–E).

Together, the present work sheds light on the potential of CaPkh as an antifungal drug target, the potential to use Pkh inhibitors in combination with drugs producing cell wall stress to synergize effects in fungal infectious organisms, and further provides evidence that the PIF-pocket regulatory site on CaPkh provides the desired selectivity to distinguish CaPkh from PDK1 for selective antifungal drugs. In follow-up experiments we found that compound PS77 was not toxic to wild type *S. cerevisiae* cells or a yeast strain with deletion in *ERG6*, a mutation that often facilitates the permeability of small compounds into yeast cells. However, PS77 was toxic to yeast strains YPP66 and YPP64T ( $EC_{50}$  approximately 5  $\mu M$ ), that had deleted Pdr5, Snq2 and Yor1 ABC transporters and transcription factors Pdr1 and Pdr3 that regulate the expression of ABC transporters (Figure 6F and SI Figure 7A). This indicated that PS77 permeated yeast cells but that it needs to be improved to avoid interaction with yeast ABC transporters. In addition, we found that PS77, at higher concentrations (25  $\mu M$ ), was also toxic to mammalian cells in culture (SI Figure 7B) suggesting that more selective and potent compounds to CaPkh2 may be required to provide a therapeutic window. At any rate, PS77 represents a proof-of-principle that can be considered a starting point for drug development. Similar strategies targeting allosteric sites may be envisaged for other AGC kinases and other organisms producing fungal and parasitic infections.

## METHODS

General materials and methods, the details on the construction of mutated yeast strains, the microarray methods, the determination of Reactive Oxygen Species and DNA double-strand breaks, the *C. albicans* methods, the expression and



**Figure 6.** Novel compound PS77 is a selective allosteric inhibitor of CaPkh2. (A) PS77 selectively inhibits the kinase activity CaPkh2. (B) PS77 selectively displaces the interaction between CaPkh2 and PIFtide. Error bars denote the standard deviations. (C–E) Binding mode of PS46 and schematic representation of the possible binding mode of PS77 to the PIF-pocket of CaPkh2. (C) Binding of activator PS46 (shown as sticks with red carbon atoms) to human PDK1 (yellow cartoon representation). This compound stabilizes the active conformation where the salt-bridge network among Glu130, Lys 111, and the  $\alpha$ -phosphate of ATP is stabilized and primed for catalysis. (D) The crystal structure of CaPkh2 (blue cartoon representation) also revealed an active conformation and the highly conserved salt bridges. (E) Proposed binding mode of inhibitor PS77 to CaPkh2. Compound PS77 was docked manually into the PIF-pocket of CaPkh2 by (1) positioning the 3-(4-chlorophenyl) and 1-phenyl ring systems, similarly to the position of the two ring systems found in PS48, PS182, and PS210 crystal structures in complex with PDK1, and (2) allowing an opening movement of the helix  $\alpha$ -C (translated outward) and positioning the third ring system ((4-chlorophenyl)sulfanyl) in a newly formed deep tunnel, behind helix  $\alpha$ -C. For comparison, the original location of helix  $\alpha$ -C is shown in transparent blue. Consequently, the model shows that Glu288 is moved out of salt-bridging distance with Lys269 and is not hold in position any longer to interact with ATP, suggesting a possible mechanism for the inhibition of CaPkh2 kinase activity. (F) PS77 is toxic to YPP66 and YPP64T yeast strains mutated in ABC transporters. Wild type, SDP10, YPP66, and YPP64T yeast strains were spotted onto YPD agar plates in presence or absence of 50  $\mu\text{M}$  PS77 and incubated at 28  $^{\circ}\text{C}$  for 36 h. SDP10, YPP66, and YPP64T were spotted also at 1:10 dilution.

purification of protein kinases and the synthesis of PS77 are described in the Supporting Information (SI). The peptide used as substrate of PDK1 and Pkh2 was T308tide (KTFCGTPEYLAPEVRR), which is derived from the PDK1 phosphorylation site of PKB $\alpha$ /Akt1.<sup>4</sup> PIFtide (PDK1 Interacting Fragment peptide), which was characterized to bind to the PIF-pocket of PDK1,<sup>4</sup> has the sequence REPRILSEEE-QEMFRDFDYADWC. Biotin-PIFtide used in AlphaScreen assays has the sequence Biotin-REPRILSEEE-QEMFRDFDYADWS.

**Yeast Strains and Culture Conditions.** The *S. cerevisiae* and *C. albicans* yeast strains used in this work are presented in Table 1 and SI Table 3, respectively. The yeast strains YPP66 and YPP64T were kindly provided by Hybrigenics Services

(<http://www.hybrigenics-services.com>). Additional information on the yeast cells is described in the Supporting Information.

**In Vitro Protein Kinase Activity Assays.** PDK1 and CaPkh2 activity assays were performed in a 96 well format essentially as previously described using T308tide as a substrate for PDK1.<sup>4,35</sup> Activity measurements were performed in duplicates or triplicates. Experiments were repeated at least twice. Additional information on the protein kinase activity assays is presented in the Supporting Information.

**Expression, Purification, and Crystallization of CaPkh2.** GST-CaPkh2 and GST-PDK1 were expressed in HEK293 cells using a transient transfection protocol and purified as previously described for GST-PDK1.<sup>4</sup> His-CaPkh2 was expressed in SF9 insect cells using a baculovirus expression

system and purified through consecutive Ni-NTA and gel filtration chromatography. His-CaPkh2 was concentrated to 5.6 mg mL<sup>-1</sup> and used for high throughput screening of crystallization conditions. Diffraction data were collected on BL14.1 operated by the Helmholtz-Zentrum Berlin (HZB) at the BESSY II electron storage ring. The crystal structure was solved by molecular replacement based on human PDK1 (PDB code 3HRC) and refined to 3.16 Å resolution. The details on the purification of GST-CaPkh2 and purification and crystallization of His-CaPkh2 are presented in the Supporting Information.

**His-CaPkh2 and His-PDK1 Interaction with Biotin-PIFtide and Displacement of the Interaction Using AlphaScreen Technology.** The AlphaScreen assay (Perkin-Elmer) was performed according to the manufacturer's protocol in 384-well microtiter plates. The His-CaPkh2 interaction with biotin-PIFtide was evaluated in a similar setup as previously performed with His-PDK1<sup>33</sup> but with variations in the order of addition of the beads and the incubation times. In brief, incubations were performed in white 384-well microtiter plates (Greiner) containing 20 μL of a reaction mix and 5 μL of beads. The reaction mix contained 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 0.01% (v/v) Tween-20, 0.1% (w/v) BSA, 1 mM DMSO, 100 nM His-CaPkh2 or 100 nM His-PDK1, 50 nM Biotin-PIFtide, and the indicated concentrations of unlabeled PIFtide or small compounds. Subsequently, 5 μL of beads solution containing nickel chelate-coated acceptor beads and streptavidin-coated donor beads (20 μg/mL final concentrations) was added to the reaction mix. The reaction mix and the beads were incubated in the dark for 45 min at RT and the emission of light from the acceptor beads was measured in the EnVision reader (Perkin-Elmer) and analyzed using the GraphPad Prism software.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

Additional figures and methods as described in the text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>

### Accession Codes

The coordinates and structure factors of the CaPkh2 crystal structure have been deposited in the RCSB Protein Data Bank (PDB ID 4C0T)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Tel.: +49 69 6301 4591. Fax: +49 69 6301 87689. E-mail: [biondi@med.uni-frankfurt.de](mailto:biondi@med.uni-frankfurt.de) (R.M.B.). Tel.: +34 935811278. Fax: +34 935812011. E-mail: [antonio.casamayor@uab.es](mailto:antonio.casamayor@uab.es) (A.C.).

### Author Contributions

D.P.-F. performed most of the experimental research in the paper including yeast genetics, microarray, protein purification, and biochemistry. A.C. was responsible for the yeast genetics and microarray studies and supervised D.P.-F., A.B., and J.F.-D.; M.E. was responsible for the synthesis of the library of compounds as part of different research projects; R.G. did the *C. albicans* experiments with S.P.; J.O.S. was responsible for the crystallography work and supervised D.P.-F. in the protein purification. R.M.B. was directly responsible for the biochemistry work and supervised D.P.-F. and E.S. R.M.B. was responsible for the overall project involving crystallography,

biochemistry, and synthetic and medicinal chemistry while A.C. was responsible for the yeast genetics and signaling part of the work. R.M.B. and A.C. wrote the manuscript with support from D.P.-F. and J.O.S.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Boleda for his participation in the initial stages of this project and Valerie Hindie and Jean-Christoph Rain (Hybrigenics services) for generous support. We are also grateful to the Servei de Genòmica from the IBB (Universitat Autònoma de Barcelona). We gratefully acknowledge synchrotron beam time at BESSY II, Helmholtz-Zentrum Berlin (HZB), Germany, and the ESFRI INSTRUCT Core Centre Frankfurt at the Max Planck Institute of Biophysics for the use of their high-throughput-crystallization facility. This work was supported by grant no. BFU2009-11593 to A.C. (Ministry of Science and Innovation, Spain, and ERDF) and grant nos. DFG BI1044/8-1, DFG BI 1044/2-3, and BMBF GO-Bio programme to R.M.B.

## ■ REFERENCES

- (1) Baxter, B. K., DiDone, L., Ogu, D., Schor, S., and Krysan, D. J. (2011) Identification, *in vitro* activity, and mode of action of phosphoinositide-dependent-1 kinase inhibitors as antifungal molecules. *ACS Chem. Biol.* 6, 502–510.
- (2) Bayascas, J. R. (2010) PDK1: The major transducer of PI 3-kinase actions. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 346, 9–29.
- (3) Arencibia, J. M., Pastor-Flores, D., Bauer, A. F., Schulze, J. O., and Biondi, R. M. (2013) AGC protein kinases: From structural mechanism of regulation to allosteric drug development for the treatment of human diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1834 (7), 1302–1321.
- (4) Biondi, R. M., Cheung, P. C., Casamayor, A., Deak, M., Currie, R. A., and Alessi, D. R. (2000) Identification of a pocket in the PDK1 kinase domain that interacts with PIF and the C-terminal residues of PKA. *Embo J* 19, 979–988.
- (5) Biondi, R. M., Kieloch, A., Currie, R. A., Deak, M., and Alessi, D. R. (2001) The PIF-binding pocket in PDK1 is essential for activation of S6K and SGK, but not PKB. *EMBO J.* 20, 4380–4390.
- (6) Yang, J., Cron, P., Thompson, V., Good, V. M., Hess, D., Hemmings, B. A., and Barford, D. (2002) Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation. *Mol. Cell* 9, 1227–1240.
- (7) Bauer, A. F., Sonzogni, S., Meyer, L., Zeuzem, S., Piiper, A., Biondi, R. M., and Neimanis, S. (2012) Regulation of protein kinase C-related protein kinase 2 (PRK2) by an intermolecular PRK2-PRK2 interaction mediated by its N-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 287 (24), 20590–602.
- (8) Lopez-Garcia, L. A., Schulze, J. O., Frohner, W., Zhang, H., Suss, E., Weber, N., Navratil, J., Amon, S., Hindie, V., Zeuzem, S., Jorgensen, T. J., Alzari, P. M., Neimanis, S., Engel, M., and Biondi, R. M. (2011) Allosteric regulation of protein kinase PKCzeta by the N-terminal C1 domain and small compounds to the PIF-pocket. *Chem. Biol.* 18, 1463–1473.
- (9) Wu, W. I., Voegtli, W. C., Sturgis, H. L., Dizon, F. P., Vigers, G. P., and Brandhuber, B. J. (2010) Crystal structure of human AKT1 with an allosteric inhibitor reveals a new mode of kinase inhibition. *PLoS One* 5, e12913.
- (10) Casamayor, A., Torrance, P. D., Kobayashi, T., Thorner, J., and Alessi, D. R. (1999) Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Curr. Biol.* 9, 186–197.
- (11) Inagaki, M., Schmelzle, T., Yamaguchi, K., Irie, K., Hall, M. N., and Matsumoto, K. (1999) PDK1 homologs activate the Pkc1-

mitogen-activated protein kinase pathway in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 19, 8344–8352.

(12) Voordeckers, K., Kimpe, M., Haesendonckx, S., Louwet, W., Versele, M., and Thevelein, J. M. (2011) Yeast 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) orthologs Pkh1–3 differentially regulate phosphorylation of protein kinase A (PKA) and the protein kinase B (PKB)/S6K ortholog Sch9. *J. Biol. Chem.* 286, 22017–22027.

(13) Roelants, F. M., Torrance, P. D., and Thorner, J. (2004) Differential roles of PDK1- and PDK2-phosphorylation sites in the yeast AGC kinases Ypk1, Pkc1, and Sch9. *Microbiology* 150, 3289–3304.

(14) Luo, G., Costanzo, M., Boone, C., and Dickson, R. C. (2011) Nutrients and the Pkh1/2 and Pkc1 protein kinases control mRNA decay and P-body assembly in yeast. *J. Biol. Chem.* 286, 8759–8770.

(15) Liu, K., Zhang, X., Lester, R. L., and Dickson, R. C. (2005) The sphingoid long chain base phytosphingosine activates AGC-type protein kinases in *Saccharomyces cerevisiae* including Ypk1, Ypk2, and Sch9. *J. Biol. Chem.* 280, 22679–22687.

(16) Luo, G., Gruhler, A., Liu, Y., Jensen, O. N., and Dickson, R. C. (2008) The sphingolipid long-chain base-Pkh1/2-Ypk1/2 signaling pathway regulates eisosome assembly and turnover. *J. Biol. Chem.* 283, 10433–10444.

(17) Roelants, F. o. M., Baltz, A. G., Trott, A. E., Fereres, S., and Thorner, J. (2010) A protein kinase network regulates the function of aminophospholipid flippases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 34–39.

(18) Paravicini, G., Mendoza, A., Antonsson, B., Cooper, M., Losberger, C., and Payton, M. A. (1996) The *Candida albicans* PKC1 gene encodes a protein kinase C homolog necessary for cellular integrity but not dimorphism. *Yeast* 12, 741–756.

(19) Bockmuhl, D. P., Krishnamurthy, S., Gerads, M., Sonneborn, A., and Ernst, J. F. (2001) Distinct and redundant roles of the two protein kinase A isoforms Tpk1p and Tpk2p in morphogenesis and growth of *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 42, 1243–1257.

(20) Castilla, R., Passeron, S., and Cantore, M. L. (1998) N-acetyl-D-glucosamine induces germination in *Candida albicans* through a mechanism sensitive to inhibitors of cAMP-dependent protein kinase. *Cell Signal* 10, 713–719.

(21) Giacometti, R., Kronberg, F., Biondi, R. M., and Passeron, S. (2009) Catalytic isoforms Tpk1 and Tpk2 of *Candida albicans* PKA have non-redundant roles in stress response and glycogen storage. *Yeast* 26, 273–285.

(22) Giacometti, R., Kronberg, F., Biondi, R. M., and Passeron, S. (2011) *Candida albicans* Tpk1p and Tpk2p isoforms differentially regulate pseudohyphal development, biofilm structure, cell aggregation, and adhesin expression. *Yeast* 28, 293–308.

(23) Stichternoth, C., Fraund, A., Setiadi, E., Giasson, L., Vecchiarelli, A., and Ernst, J. F. (2011) Sch9 kinase integrates hypoxia and CO<sub>2</sub> sensing to suppress hyphal morphogenesis in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 10, 502–511.

(24) Lee, K. S., and 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. *Mol. Cell. Biol.* 12, 172–182.

(25) Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S. J., Wesselborg, S., and Frohlich, K. U. (2002) A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol. Cell* 9, 911–917.

(26) Wilkinson, D., and Ramsdale, M. (2011) Proteases and caspase-like activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1502–1508.

(27) Chabrier-Rosello, Y., Gerik, K. J., Koselny, K., DiDone, L., Lodge, J. K., and Krysan, D. J. (2013) *Cryptococcus neoformans* phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) ortholog is required for stress tolerance and survival in murine phagocytes. *Eukaryot. Cell* 12, 12–22.

(28) Silber, J., Antal, T. L., Gammeltoft, S., and Rasmussen, T. E. (2004) Phosphoinositide-dependent kinase-1 orthologues from five eukaryotes are activated by the hydrophobic motif in AGC kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 823–827.

(29) Mandal, M., Kim, S., Younes, M. N., Jasser, S. A., El-Naggar, A. K., Mills, G. B., and Myers, J. N. (2005) The Akt inhibitor KP372–1 suppresses Akt activity and cell proliferation and induces apoptosis in thyroid cancer cells. *Br. J. Cancer* 92, 1899–1905.

(30) Zeng, Z., Samudio, I. J., Zhang, W., Estrov, Z., Pelicano, H., Harris, D., Frolova, O., Hail, N., Jr., Chen, W., Kornblau, S. M., Huang, P., Lu, Y., Mills, G. B., Andreeff, M., and Konopleva, M. (2006) Simultaneous inhibition of PDK1/AKT and Fms-like tyrosine kinase 3 signaling by a small-molecule KP372–1 induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 66, 3737–3746.

(31) Biondi, R. M., Komander, D., Thomas, C. C., Lizcano, J. M., Deak, M., Alessi, D. R., and van Aalten, D. M. (2002) High resolution crystal structure of the human PDK1 catalytic domain defines the regulatory phosphopeptide docking site. *EMBO J.* 21, 4219–4228.

(32) Hindie, V., Stroba, A., Zhang, H., Lopez-Garcia, L. A., Idrissova, L., Zeuzem, S., Hirschberg, D., Schaeffer, F., Jorgensen, T. J. D., Engel, M., Alzari, P. M., and Biondi, R. M. (2009) Structure and allosteric effects of low molecular weight activators on the protein kinase PDK1. *Nat. Chem. Biol.* 5, 758–764.

(33) Busschots, K., Lopez-Garcia, L. A., Lammi, C., Stroba, A., Zeuzem, S., Piiper, A., Alzari, P. M., Neimanis, S., Arencibia, J. M., Engel, M., Schulze, J. O., and Biondi, R. M. (2012) Substrate-selective inhibition of protein kinase PDK1 by small compounds that bind to the PIF-pocket allosteric docking site. *Chem. Biol.* 19, 1152–1163.

(34) Frodin, M., Antal, T. L., Dummler, B. A., Jensen, C. J., Deak, M., Gammeltoft, S., and Biondi, R. M. (2002) A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation. *EMBO J.* 21, 5396–5407.

(35) Engel, M., Hindie, V., Lopez-Garcia, L. A., Stroba, A., Schaeffer, F., Adrian, I., Imig, J., Idrissova, L., Nastainczyk, W., Zeuzem, S., Alzari, P. M., Hartmann, R. W., Piiper, A., and Biondi, R. M. (2006) Allosteric activation of the protein kinase PDK1 with low molecular weight compounds. *EMBO J.* 25, 5469–5480.

(36) Yen, K., Gitsham, P., Wishart, J., Oliver, S. G., and Zhang, N. (2003) An improved tetO promoter replacement system for regulating the expression of yeast genes. *Yeast* 20, 1255–1262.

(37) Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J. D., Bussey, H., Chu, A. M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S. W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S. H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J. H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Liebundguth, N., Lockhart, D. J., Lucau-Danila, A., Lussier, M., M'Rabet, N., Menard, P., Mittmann, M., Pai, C., Rebischung, C., Revuelta, J. L., Riles, L., Roberts, C. J., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Snyder, M., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R. K., Veronneau, S., Voet, M., Volckaert, G., Ward, T. R., Wysocki, R., Yen, G. S., Yu, K., Zimmermann, K., Philippsen, P., Johnston, M., and Davis, R. W. (1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285, 901–906.

(38) Stroba, A., Schaeffer, F., Hindie, V., Lopez-Garcia, L., Adrian, I., Frohner, W., Hartmann, R. W., Biondi, R. M., and Engel, M. (2009) 3,5-Diphenylpent-2-enoic acids as allosteric activators of the protein kinase PDK1: Structure-activity relationships and thermodynamic characterization of binding as paradigms for PIF-binding pocket-targeting compounds. *J. Med. Chem.* 52, 4683–4693.

(39) Wilhelm, A., Lopez-Garcia, L. A., Busschots, K., Frohner, W., Maurer, F., Boettcher, S., Zhang, H., Schulze, J. O., Biondi, R. M., and Engel, M. (2012) 2-(3-Oxo-1,3-diphenylpropyl)malonic acids as potent allosteric ligands of the PIF pocket of phosphoinositide-dependent kinase-1: Development and prodrug concept. *J. Med. Chem.* 55 (22), 9817–30.

## SUPPORTING INFORMATION

### The PIF-pocket as a target for *C. albicans* Pkh selective inhibitors

Daniel Pastor-Flores,<sup>†</sup> Jörg O. Schulze,<sup>†</sup> Anna Bahí,<sup>§,‡</sup> Romina Giacometti,<sup>¥</sup>  
Jofre Ferrer-Dalmau,<sup>§,‡</sup> Susana Passeron,<sup>¥</sup> Matthias Engel,<sup>#</sup> Evelyn Süß,<sup>†</sup> Antonio  
Casamayor,<sup>§,‡,\*</sup> and Ricardo M. Biondi<sup>†,\*</sup>

<sup>†</sup>Research Group PhosphoSites, Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum Frankfurt, Theodor-Stern-Kai 7, 60590 Frankfurt, Germany.

<sup>§</sup>Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola 08193, Barcelona, Spain.

<sup>‡</sup>Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola 08193, Barcelona, Spain.

<sup>¥</sup>Cátedra de Microbiología, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, C1417DSE Buenos Aires, Argentina.

<sup>#</sup>Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Saarland University, P.O. Box 151150, D-66041 Saarbrücken, Germany



## SUPPLEMENTARY RESULTS AND DISCUSSION

### Characterization of MB005 and SDP8 strains

#### Transcriptional repression of PKH2 decreases the activation of the CWI pathway

It is accepted that Pkh proteins are necessary for Pkc1 activation (1, 2). Therefore, depletion of the Pkh proteins should inhibit the activation of Pkc1 and, consequently, compromise cell wall integrity. In agreement with this hypothesis, we found that MB005 cells were more sensitive than WT CML476 cells to digestion with zymolyase (Supplementary Fig. 1A), a cell wall-degrading enzyme preparation that promotes the activation of the Slit2 MAP kinase pathway (3). Additional deletion of the *PKH3* gene (SDP8 strain) exacerbated cell lysis under the same treatment. This result could indicate that the depletion of Pkh impedes the normal activation of the downstream Slit2 MAPK cascade. To investigate this aspect, that is not possible to address by using the temperature sensitive allele, we tested the phosphorylation state of the MAP kinase Slit2 in SDP8 cells under several known cell wall stress conditions in the presence and absence of doxycycline. Both, alkali and heat stresses (4, 5) provoked a notable increase of Slit2 phosphorylation in doxycycline-treated CML476 WT cells when compared with the same unstressed cells (Supplementary Fig. 1B). Notably, the phosphorylation of Slit2 was drastically reduced when doxycycline-treated SDP8 cells were stressed in the same way, indicating that Slit2 phosphorylation was dependent on the presence of Pkh (Supplementary Fig. 1B). Similar decrease of Slit2 phosphorylation was also detected when doxycycline-treated MB005 cells subjected to the same stresses (data not shown). SDP8 cells, when treated with low concentrations of doxycycline, were also sensitive to incubation at 37 °C (Supplementary Fig. 1C). Furthermore, the growth defects of many CWI-related mutants can be remediated by adding an osmotic stabilizer, such as 1 M sorbitol, to the growth medium. Addition of 1 M sorbitol, however, did not recover the growth of MB005 or SDP8 mutant cell in the presence of doxycycline (Supplementary Fig. 1D) indicating that the growth defect of Pkh-deficient cells was not due to osmotically induced cell lysis. These results could indicate that the depletion of Pkh impedes the normal activation of the downstream Slit2

MAPK cascade and confirm the role of Pkh in the CWI pathway for the proper response to cell wall stressors.

### **Microarray analysis of Pkh-depleted yeast cells**

To gain further insight into the cellular roles of the Pkh kinases we employed DNA microarray technology to study the global transcriptional changes resulting from the middle and long-term depletion of Pkh. For this study we compared the expression pattern of SDP8 cells with that of WT CML476 cells, both incubated in the presence of doxycycline for 8 and 24 h. Depletion of Pkh provoked the down-regulation of the mRNA levels corresponding to ribosomal protein encoding genes, the upregulation of genes involved in the metabolism of energy reserves such as glycogen and trehalose and the upregulation at 24 h of families of genes involved in the stress response, the unfolded protein response, the related category of protein folding and stabilization and the response to oxidative stress (Supplementary Fig. 2). Thus, the long-term depletion of Pkh proteins by transcriptional repression of *PKH2* in the *pkh1Δ pkh3Δ* background resulted in a transcriptional response related to that induced by the unfolding protein response and by oxidative stress. These findings suggested that the lack of Pkh eventually promoted oxidative stress and the inappropriate folding of proteins.

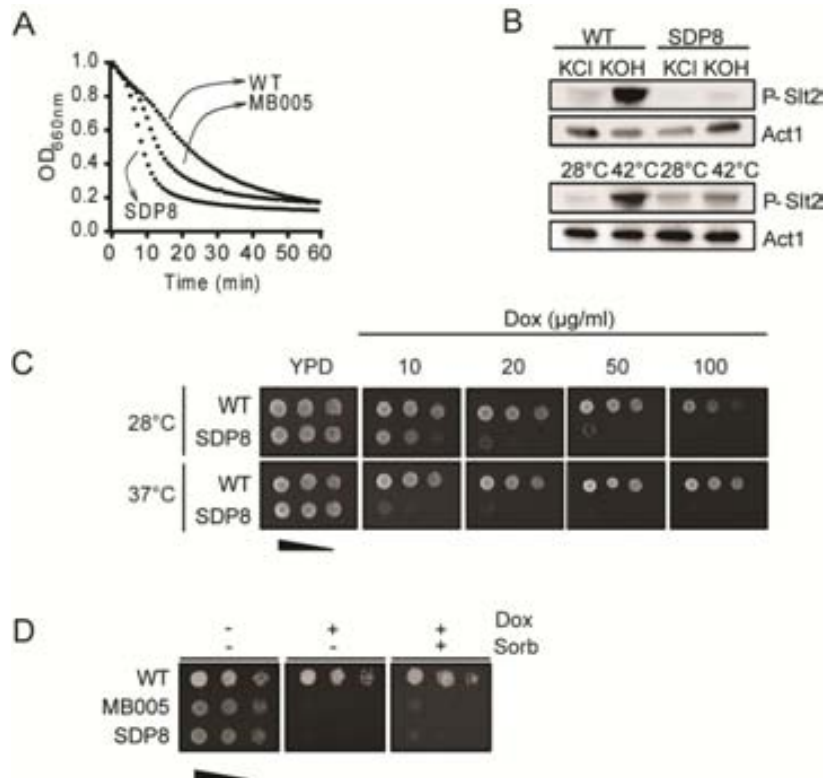
### **Crystal structure of CaPkh2**

It was previously reported that the active sites of PDK1 and Pkh share only 50 % sequence identity (6). In contrast to those estimations, the structure of CaPkh2 shows that the side chains that would be in close proximity to ATP or an ATP-competitive inhibitor like staurosporine are almost identical to those present in PDK1 (Fig. 4C). Although CaPkh2 was crystallized in the presence of ADP, we did not observe electron density for the nucleotide. By contrast, all published crystal structures of PDK1 have been obtained in the presence of ATP or an ATP-competitive inhibitor. Although the CaPkh2 structure features an unoccupied active site, all residues directly participating in the binding of ATP are positioned almost identically. We evaluated whether the differences in the active site may permit a selective inhibition of CaPkh2: There are two conservative substitutions in the outer limits of the ATP-binding site (CaPkh2 Leu292 and Tyr251 that are Met and Phe in PDK1), which are too distant to interfere with the

binding of inhibitors such as staurosporine (PDB ID: 1OKY). Interestingly, one of these residues, Tyr251, is positioned similarly as the equivalent residue in the crystal structure of the PDK1-staurosporine complex. One additional difference is the replacement of PDK1 Val143 by Ile302 in CaPkh2. The CaPkh2 structure shows that the bulkier isoleucine protrudes into the ATP-binding site, where it could sterically clash with the inhibitor UCN-01 based on comparisons with the PDK1/UCN-01 structure (PDB ID: 1OKZ) (Supplementary Fig. 5). UCN-01 is a more selective kinase inhibitor than staurosporine and differs only by the presence of the 7-hydroxyl group (see Supplementary Fig. 4AB). In this manner, UCN01 can potentially clash to some extent with Ile302 in CaPkh2, whereas the smaller staurosporine does not. In agreement with these structural observations, staurosporine inhibits CaPkh2 and PDK1 with equal potency, while UCN-01 has a 4-fold increased  $IC_{50}$  towards CaPkh2 (Supplementary Fig. 4B,C). The data indicate that there is indeed a difference in the ATP-binding pocket. However, since the substitution renders a smaller pocket in CaPkh2 than in human PDK1, this difference cannot be exploited for the development of selective CaPkh2 inhibitors. Together, our results stress the challenge of identifying selective CaPkh2 inhibitors by targeting the ATP-binding pocket.

## SUPPLEMENTARY FIGURES

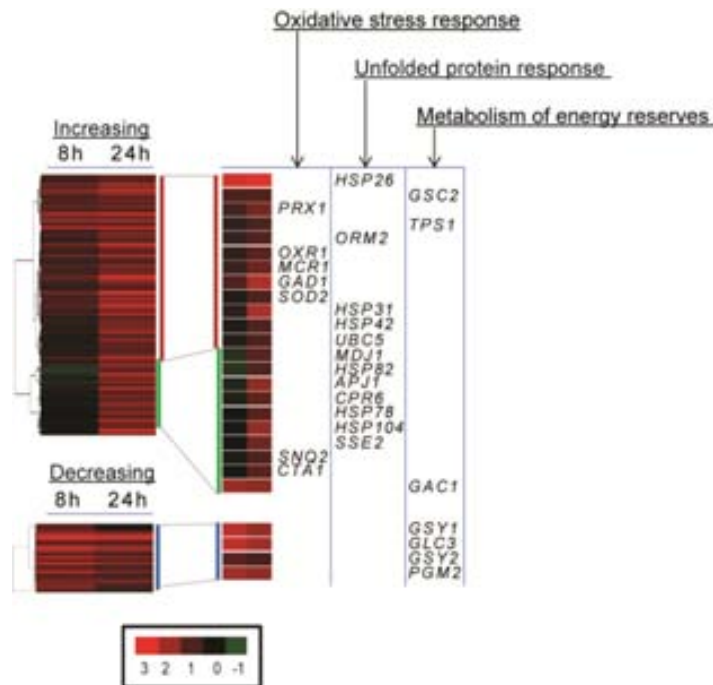
## Supplementary Figure 1



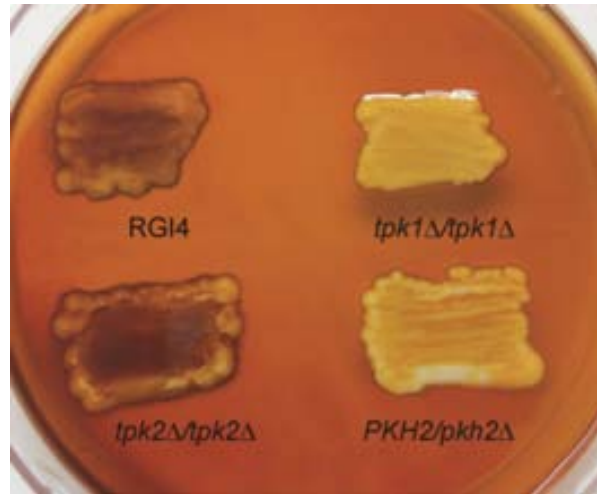
**Supplementary Figure 1.** Depletion of Pkh decreases the ability of yeasts to activate the CWI pathway. A) Cultures of the indicated strains were incubated in the presence of zymolyase and the effect on the cell wall measured by absorbance at 660 nm. B) The activation of the CWI pathway was tested by stimulation of the pathway by KOH and a heat shock and following the phosphorylation of the downstream target, Slt2, by Western-blot; Actin (Act1) was used as a loading control. C) Heat shock decreases viability of SDP8 strain in the presence of doxycycline. WT and SDP8 cells were grown at 28°C until they reached the exponential phase. 10-Fold dilutions of the cultures were prepared, and spotted on YPD medium containing the specified concentrations of doxycycline. Plates were then incubated at 28 °C or 37 °C for 2 days, except those containing 50 and 100 µg/ml of doxycycline (3 days). D) Sorbitol does not recover growth of MB005 and SDP8 strains in the presence of doxycycline. Cultures of WT,

MB005 and SDP8 yeast strains were diluted and spotted in YPD solid medium containing the indicated combinations of 100µg/ml doxycycline (Dox) and 1M sorbitol (Sorb).

## Supplementary Figure 2

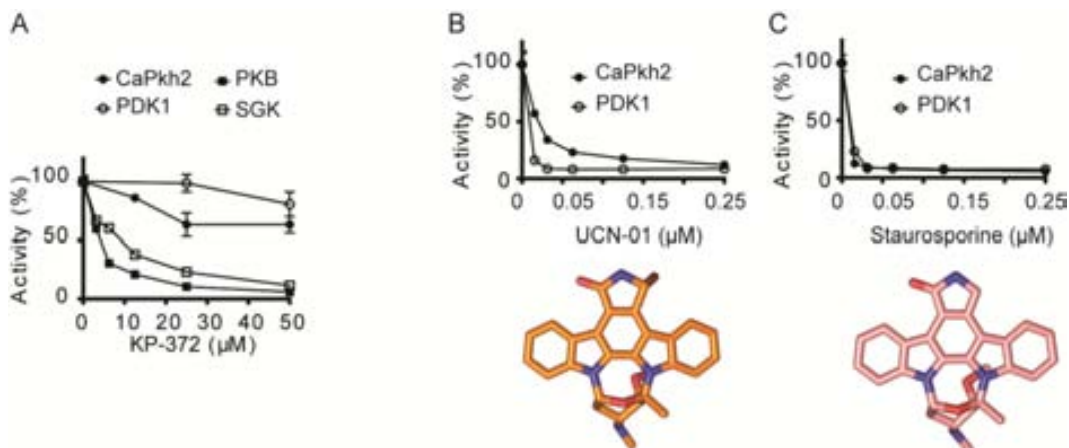


**Supplementary Figure 2.** Clustering of the genes differentially expressed when Pkh is depleted. The expression patterns of SDP8 cells treated with doxycycline for 8 or 24 h were compared with those of equally treated WT CML476 cells. A set of 297 genes that are differentially expressed at 8 h or 24 h were hierarchically clustered (complete linkage clustering, uncentered correlation) using the Cluster software (v. 2.11) (7) and visualized with Java TreeView (v. 1.1.5r2) (8). Representative genes related to the response to oxidative stress, unfolded protein response and metabolism and energy reserves are shown. Classification according to MIPS FunCat (9).

**Supplementary Figure 3**

**Supplementary Figure 3.** *C. albicans* *PKH2* heterozygous mutant strain has decreased ability to accumulate glycogen. *C. albicans* *PKH2/pkh2Δ*, PKA mutants and wild-type control strains were streaked out on YPD plates and incubated at 30 °C for 2 days before treatment with an iodine/iodide solution. As previously described, depletion of TPK1 inhibited glycogen accumulation, whereas depletion of TPK2 did not affect glycogen accumulation (10). Here we show that already the heterozygous deletion of CaPkh2 produced a strong inhibition in glycogen accumulation.

## Supplementary Figure 4

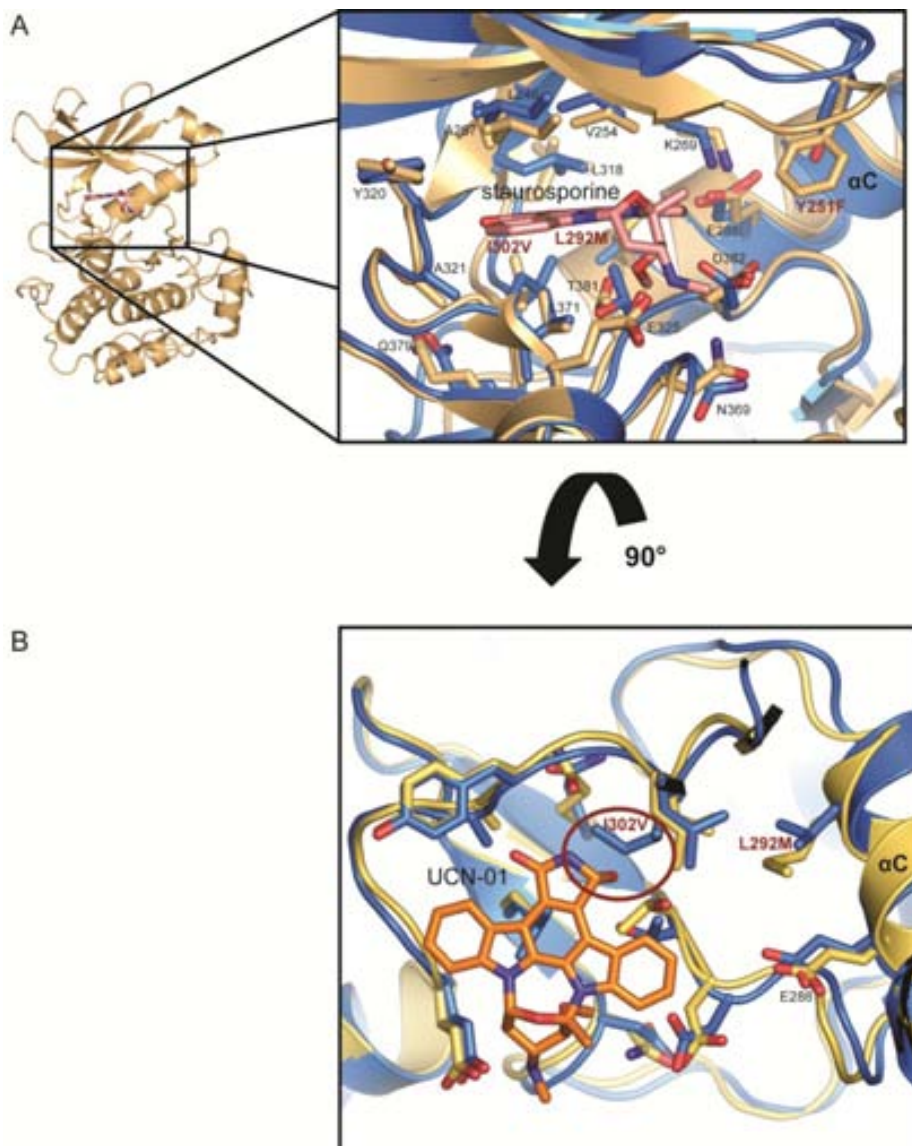


**Supplementary Figure 4.** Effect of ATP-competitive inhibitors KP-372, UCN01 and staurosporine on PDK1 and CaPkh2. Staurosporine is an effective antifungal compound. However, it is very unspecific, inhibits multiple human protein kinases, and therefore cannot be used in human antifungal therapies. KP-372 was identified as an inhibitor of PKB/Akt (11, 12) and later described to inhibit PDK1 (6). UCN01 (7-hydroxystaurosporine) is a more selective PDK1 inhibitor that has antifungal activity (6), although originally described not to affect *C. albicans* at 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (13). A) Effect of KP-372 on PDK1, CaPkh2, PKB/Akt and SGK1. KP-372 inhibited PKB/Akt but not PDK1 or CaPkh2. It was surprising to observe that KP-372 did not affect the activity of PDK1. Since the previous determination of PDK1 inhibition was determined using an indirect assay by measuring the activation of the substrate SGK (12), it was possible that KP-372 actually inhibited SGK. Indeed, we confirmed that KP-372 inhibited both PKB/Akt and SGK, but not PDK1 or CaPkh2. PKB/Akt and SGK are most similar to the yeast protein Ypk. Therefore, it is possible that KP-372 may inhibit different yeast kinases including Ypk, although the identity of the kinase or kinases inhibited by KP-372 in yeast cells remains to be determined. B) Effect of staurosporine on PDK1 and CaPkh2. C) Effect of UCN-01 on PDK1 and CaPkh2. Staurosporine and UCN-01 are shown as stick models. The crystal structure of CaPkh2 provides an explanation for the lower inhibition

of CaPkh2 by UCN-01, due to a sterical clash of the 7-hydroxyl group with Ile302. The results indicate that none of the ATP-competitive inhibitors of PDK1 have preference for CaPkh2 and highlight the challenge of developing inhibitors that preferentially inhibit CaPkh2 over PDK1.

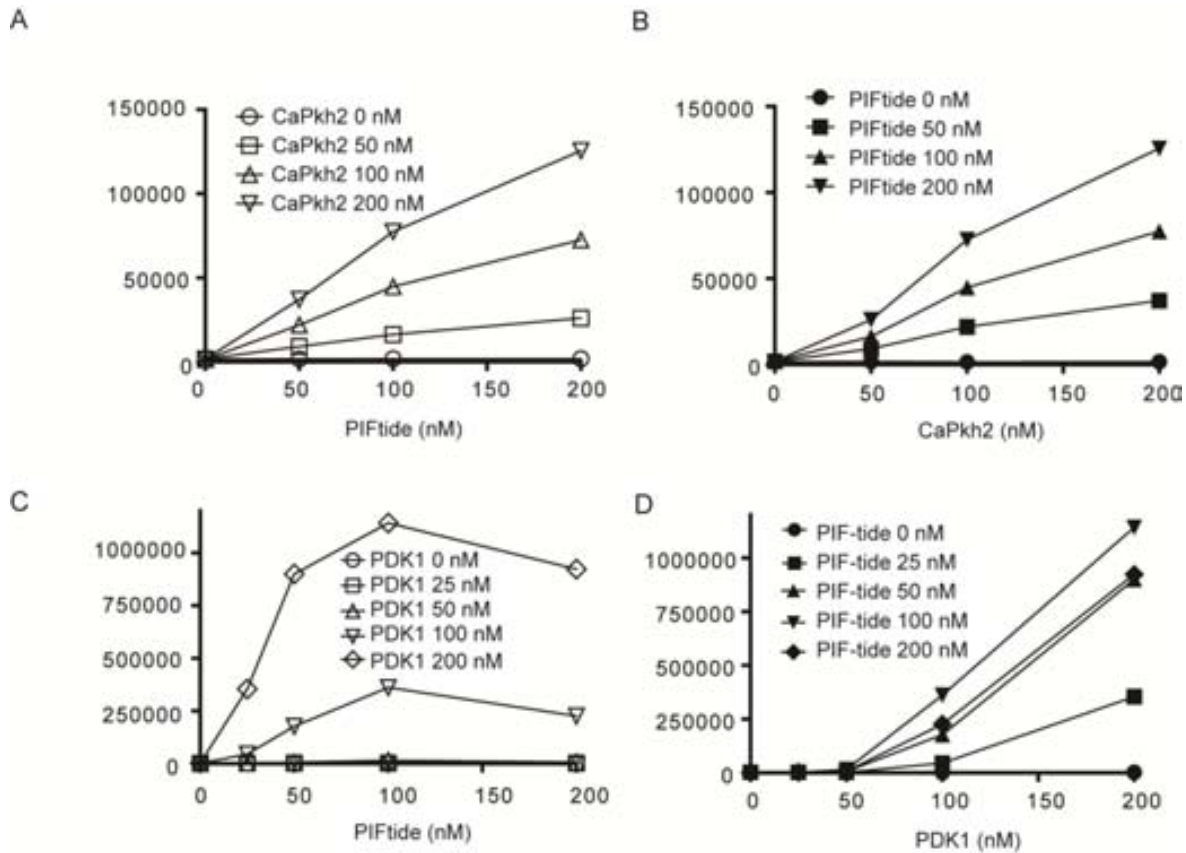


## Supplementary Figure 5



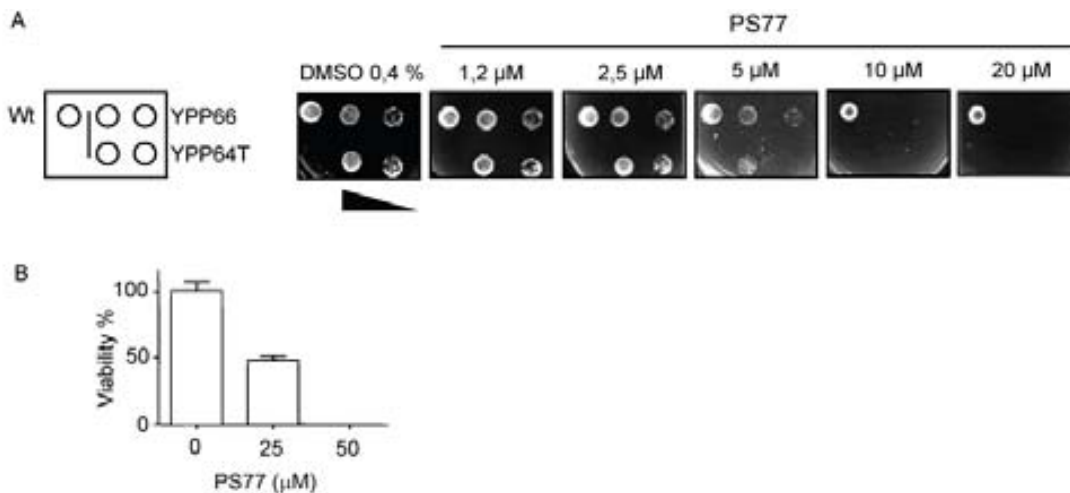
**Supplementary Figure 5.** Comparison of the ATP-binding sites of CaPkh2 and human PDK1. A) The ATP-binding site is highly conserved between CaPkh2 (blue) and human PDK1 (light orange, PDB code 1OKY). Only side chains that may be in direct contact with an ATP-competitive inhibitor are shown as sticks. Non-conserved residues are marked with red labels. Staurosporine is depicted with pink carbon atoms. B) Structural alignment of the CaPkh2 structure with that of UCN-01-bound PDK1 (yellow, PDB code 1OKZ). In comparison to A), the perspective is rotated by  $\sim 90^\circ$  around a horizontal axis. The red circle highlights a predicted steric clash of the 7-hydroxyl group of UCN-01 with Ile302.

## Supplementary Figure 6



**Supplementary Figure 6.** Conditions for measuring the interaction of PDK1 and CaPkh2 with PIFtide using Alphascreen technology. Kinase and PIFtide cross-titrations are performed to identify the conditions to be used for the interaction-displacement assay with compounds. A) His-CaPkh2 and Biotin-PIFtide cross-titration. B) His-PDK1 and Biotin-PIFtide cross-titration.

## Supplementary Figure 7



**Supplementary Figure 7.** Effect of PS77 on yeast strains and a mammalian cell line. A) Wild type, YPP66 and YPP64T yeast strains were spotted onto YPD agar plates in presence or absence of the indicated concentrations of PS77 and incubated at 28°C for 36 h. SDP10, YPP66 and YPP64T were spotted also at 1:10 dilution. The results show that PS77 was toxic to yeast strains YPP66 and YPP64T with  $EC_{50}$  approximately 5  $\mu$ M. B) The effect of PS77 was tested on HepG2 hepatocellular carcinoma cells. HepG2 cells were incubated with PS77 at the indicated concentrations and the viability estimated using the MTT method. About 50% viable cells remained after treatment with 25  $\mu$ M PS77.

**SUPPLEMENTARY TABLE****Supplementary Table 1**

Data collection and refinement statistics. The values in parentheses refer to the shell of highest resolution.

<b><i>Data collection</i></b>	
Unit cell dimensions <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	100.2, 100.2, 60.1
Space group	P4 <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Wavelength	0.91841
Number of unique reflections	5590
Resolution range (Å)	71-3.16 (3.26-3.16)
Completeness of data (%)	99.9 (100)
Redundancy	7.8 (8.0)
<i>R</i> <sub>sym</sub> (%)	17.0 (80.9)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	14.5 (3.0)
<b><i>Refinement</i></b>	
Maximal resolution (Å)	3.16 (3.98-3.16)
No. of atoms: protein, water	2358, 2
Monomers per asymmetric unit	1
<i>R</i> -factor (%)	23.5 (25.4)
<i>R</i> <sub>free</sub> (%)	28.6 (33.5)
Average <i>B</i> -factor (Å <sup>2</sup> )	35.0
R.m.s.d. bond length (Å)	0.003
R.m.s.d. bond angles (°)	0.6
Ramachandran plot <sup>a</sup>	92.0/7.3/0.7

<sup>a</sup> Phenix (36): favored regions/allowed regions/outliers

**Supplementary Table 2.** *S. cerevisiae* primers used in this study

Name	Sense	Nucleotide sequence (from 5' to 3')
OACG304	forward	<u>CGACACATTGTTGATGGAATAATTGGTCCCTAGTTAAACAGCTGAAGCTTCGTACGC</u>
OACG305	reverse	<u>ACGGCCTAGGGCTCATGGAATTATCCTTATCAAATA<b>CAT</b>ATAGGCCACTAGTGGATCTG</u>
OACG300	forward	<u>cgcacgtgtacttgcttgaatactgctactatatacattaagagcttggtgagcgc</u>
OACG301	reverse	<u>tattatgcattacactttccccttcaccatgtcttacatatgcatccgtcgagttcaagag</u>
ODP18	forward	CCTAGCCGTTGCAACTGCTG
ODP19	reverse	GGACGAGGGTATGGACGGTGG
MCA1-nat1_fw1	forward	<u>tctaaactaccaccaagaagaccgactagattacaatcCGTACGCTGCAGGTGCAC</u>
MCA1-nat1_rv1	reverse	<u>cagtctgaatacatctaccaacgtacacattcatatattTCGATGAATTCGAGCTCG</u>

**Supplementary Table 3.** *C. albicans* strains used in this study

Strain	Genotype	Source or reference
CAI4	<i>ura3::λimm434/ura3::λimm434</i>	a
RGI4	Same as CAI4 but <i>RPS10/rps10Δ::Clp10</i>	b
RRD2	Same as CAI4 but <i>PKH2/pkh2Δ::URA3-dpl200</i>	This study
RS1u	<i>tpk1Δ::hisG/tpk1Δ::hisG RPS10/rps10Δ::Clp10</i>	b
RS2u	<i>tpk2Δ::Cat/tpk2Δ::Cat RPS10/rps10Δ::Clp10</i>	b
HPY421	<i>tpk2Δ::hisG / tpk2Δ::hisG::TPK2-dpl200</i> <i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434::URA3</i>	c
HPY321	<i>tpk1Δ::hisG / tpk1Δ::hisG::TPK1-dpl200</i> <i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434::URA3</i>	c

<sup>a</sup> (15)

<sup>b</sup> (10)

<sup>c</sup> (16)

**Supplementary Table 4.** *C. albicans* primers used in this study

Name	Sense	Sequence 5' - 3'
PKH2K05	forward	CTCGATGATATTTATAACAACACTATACTTTAGCACAGGGT ACCAATAACAACAGTGTAGATTTCCCAGTCACGACG
PKH2K03	reverse	CAAAAATTAATGAATTATCAATTGAACTAATGACAAATA CTCCGACTGATGGTACTATGTGGAATTGTGAGCGGA
URA3ver5	forward	TTCCGAGCTTGGCGTAATCAT
PKH2ver3	reverse	CGCGGTGAATGTGATGATGG
RPS10ver	reverse	CCCACACTCATTATATTACTTAT

## SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

### General biochemical materials and methods

Complete protease inhibitor cocktail tablets were from Roche. Protein concentration was estimated using a Coomassie reagent from Perbio. Glutathione sepharose, Ni-NTA sepharose and chromatography columns were from Amersham Pharmacia Biotech. Human embryonic kidney (HEK) 293 cells (ATCC collection) were cultured on 10 cm dishes in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum (Gibco). GST-Pkh2 was expressed by transient transfection of HEK 293 cells using a PEI protocol. Materials for mammalian tissue culture were from Greiner. His-Pkh2 was cloned in pFastBac vector and expressed in insect cells (SF9) using the baculovirus expression system from Invitrogen as recommended by the manufacturer. His-Pkh2 used in crystallography trials was concentrated using Vivaspin concentrators (Vivascience). Molecular biology techniques were performed using standard protocols. Site-directed mutagenesis was performed using a QuikChange (Stratagene) protocol following the instructions provided by the manufacturer. DNA constructs used for transient transfection were purified from bacteria using a Qiagen plasmid Maxi kit according to the manufacturer's protocol. DNA sequences were verified by automatic DNA sequencing (Applied Biosystems 3100 Genetic Analyzer). P-Slt2 was identified using anti-phospho-p42/44 MAPK antibody (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>; Cell Signaling Technology). Actin was used as a loading control using the AC-15 monoclonal antibody (Sigma). Western-blot results were evaluated using horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (BioRad) or anti-mouse IgG (Sigma) as secondary antibodies. Chemiluminescence reagent used was the Luminata Forte Western HRP substrate detection system (Millipore). Chemiluminescence was detected using the LAS-4000 imaging system (Fuji). Commercial small molecular weight compound UCN-01 was from Sigma, KP-372-1 was from Echelon. DNA purifications were performed with Qiagen affinity columns following the manufacturer's recommendations. Bacterial plasmid DNA was isolated by the alkaline lysis method (17) or using the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). *C. albicans* yeast genomic DNA was isolated according to Adams et al. (18). DNA modifying enzymes were used according to the manufacturers' recommendations.

### Construction of mutated *S.cerevisiae* yeast strains

To drive the expression of *PKH2* from the regulatable *tetO<sub>7</sub>* promoter, the region between nucleotide -487 and the initiating codon of the chromosomal *PKH2*-coding region in the CML476 strain (19) was replaced by homologous recombination with a KanMX4-*tetO<sub>7</sub>* cassette, producing the MB002 strain (Table 1). The KanMX4-*tetO<sub>7</sub>* cassette containing long flanking homology regions was PCR-amplified from the pCM325 plasmid (19) with the forward oligonucleotide OACG 304, shown in Supplementary Table 2, in which the underlined sequence corresponds to nucleotides -487 to -446 of the *PKH2* initiator codon; and the reverse oligonucleotide OACG305, which in Table S1 is shown with the underlined sequence beginning at +37 and ending at the ATG start codon of *PKH2* (in bold). Italicized nucleotides in the primers correspond to pCM325 sequences.

To generate the *pkh1Δ::HIS3* mutation, the *HIS3* gene was amplified using the forward oligonucleotide OACG300 and the reverse oligonucleotide OACG301 (Supplementary Table 2) as primers. The underlined sequences correspond to nucleotides -41 to -1 with respect to the *PKH1* initiator codon (OAC300) and to nucleotides 69 to 25 after the *PKH2* stop codon (OAC301). Italicized sequences correspond to the limits of the *HIS3* gene present in the pRS423 plasmid, which was used as a template (20).

The disruption of the coding region of *PKH3* with *nat1* in the MB002 and MB005 strains gave rise to the SDP7 and SDP8 strains, respectively. The KanMX4 cassette from the *pkh3Δ::KanMX4* strain in the BY4741 background, generated in the context of the *Saccharomyces* Genome Deletion Project (21), was replaced by homologous recombination with the 1.2-kbp BamHI/EcoRI restriction fragment from the pAG25 plasmid (22) containing the *natMX4* cassette. The insertion of the cassette in the proper genomic location was verified by PCR and also by the ability of the strains to grow in the presence of nourseothricin but not G418. A genomic region from this new strain, including the full *neoMX4* cassette inserted into the *PKH3* ORF, which comprises nucleotide -512 upstream of the ATG of *PKH3* to nucleotide +400 with respect to the



*PKH3* stop codon, was PCR-amplified with the oligonucleotides ODP18 and ODP19 (Supplementary Table 2) as the forward and reverse primers, respectively. This ~1.5-kbp PCR-amplified fragment was used to disrupt the *PKH3* ORF in the MB002 and MB005 strains, giving rise to the SDP7 and SDP8 strains, respectively. The correct insertion of the cassette was verified by PCR.

The *natMX4* cassette was amplified from pAG25 using the forward MCA1-nat1\_fw1 primer shown in Table S1, in which the underlined sequence corresponds to nucleotides –40 to –1 from the *MCA1* initiator codon, and the reverse primer MCA1-nat1\_rv1, with underlined sequences corresponding to nucleotides +41 to +1 with respect to the *MCA1* stop codon. The italicized nucleotides correspond to the limits of the *natMX4* cassette present in the pAG25 plasmid. To generate the YAB100 strain, the *MCA1* coding region in the MB005 strain was disrupted with the PCR-obtained *natMX4* cassette. Disruption was verified by PCR with appropriate primers.

Depletion of Pkh2. To evaluate the effect of depletion of Pkh2 in cell growth, wild-type CML476 and the conditional *tetO:PKH2*-based derivative strains used in this study were grown overnight in YPD, diluted to an OD<sub>660</sub> of 0.05 in the presence of 100 µg/ml doxycycline, and then, growth was resumed at 28 °C for 8 h. New cultures were then prepared at an initial OD<sub>660</sub> of 0.01 in the presence of 100 µg/ml doxycycline, and growth was monitored at the indicated times.

### **Microarray analysis**

Cultures of the CML476 (WT) and SDP8 strains were grown for 8 h or 24 h in the presence of doxycycline (100 µg/ml). The RNA from the 8 h time point was obtained when the yeast culture had an optical density of 0.55-0.60. For the 24-h time point and heat-shocked cells, the appropriate quantity of cells were collected by centrifugation after 8 h incubation with doxycycline, resuspended in 50 ml of YPD at an optical density of 0.01 and grown for an additional 16 h. At this point, cells at the 24-h time point were collected. For the heat shock experiment the cells were then incubated either at 40 °C or 28 °C for 40 min. Samples were collected by centrifugation for 5 min at 1500 g, washed with cold water, and the dried cell pellet was kept at -80 °C until RNA purification.

### Extraction of RNA and Microarray analysis

Extraction of total RNA and microarray analysis was performed essentially as previously described (23). Total RNA was extracted with a RiboPure™ Yeast (Ambion) kit and treated with DNase to eliminate traces of genomic DNA. RNA quality was assessed by electrophoresis in a denaturing 0.8% agarose gel and quantified by measuring  $A_{260}$  in a BioPhotometer (Eppendorf). For the DNA microarray analysis 8 µg of total RNA was employed for cDNA synthesis and labeling using the indirect labeling kit (CyScribe Post-Labeling kit, GE-Amersham Biosciences) in conjunction with Cy3-dUTP and Cy5-dUTP fluorescent nucleotides. The cDNA obtained was dried and resuspended in the hybridization buffer. The amount of DNA and the labeling efficiency was evaluated with a Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop Technologies). Fluorescently labeled cDNAs were combined and hybridized to yeast genomic microchips constructed in our laboratory by arraying 6014 different PCR-amplified open reading frames (ORFs) from *S. cerevisiae* (24, 25). Pre-hybridization, hybridization and washing conditions were essentially as described previously (26). The slides were scanned with a ScanArray 4000 apparatus (Packard BioChips Technologies), and the output was analyzed using GenePix Pro 6.0 software. Spots with either a diameter smaller than 120 µm or fluorescence intensities for Cy3 (indocarbocyanine) and Cy5 (indodicarbocyanine) lower than 150 units, were not considered for further analysis. Four different microarray experiments were performed, each in duplicate (dyes were swapped to avoid dye-specific bias).

The GEPAS3.0 software, now implemented in the Babelomics tool (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>), was used to pre-process the data (27). The MIPS Functional Catalogue Database (9), available at [http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/search\\_main\\_frame.html](http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/search_main_frame.html), was used for the functional distribution of gene lists.

In the present work we make emphasis on the findings on transcriptional effects on mRNA related to the unfolded protein response, oxidative stress and the requirement of Pkh on the general response to heat shock. A comprehensive description and analysis of the transcriptional results produced by the depletion of Pkh a will be published elsewhere.

**Detection of ROS**

Cultures in YPD medium at OD<sub>660</sub> 0.01 were incubated and grown for 24 h in the presence of doxycycline (100 µg/ml). The cells were then incubated for 1 h with 2.5 µg/ml of the fluorogenic indicator dihydrorhodamine 123 (D1054, Sigma), harvested by centrifugation, resuspended in PBS solution and examined using an Olympus FluoView™ FV1000 confocal. Images were processed with the open-source program ImageJ 1.44p (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). For the evaluation of oxidative stress by flow cytometry, cells from the same treated cultures were fixed with 3.7% (vol/vol) formaldehyde for 30 min and sonicated before analysis. The fluorescence of 10,000 cells included in the SSC-H, FSC-H upper right quadrant was then analyzed using a BD Biosciences FACSCalibur flow cytometer with the FL2 detector. The quantifications by FACs were supported by the staining of at least 200 individual cells of each strain and quantification using the Wasabi image analyzer (data not shown).

**Detection of DNA-double strand breaks**

Cells contained in 50 ml of culture were then washed, resuspended in PBS at OD<sub>660</sub> ≈1 and fixed with 3.7% (vol/vol) formaldehyde for 30 min at room temperature. Fixed cells were washed three times with PBS and resuspended in 2 ml of PBS and incubated with 10 µg/ml RNase A at 30°C for 3 hr. After three washes with PBS, the cell walls of the WT, MB005 and SDP8 strains were digested with 20 mg/ml Zymolyase 20T (Seikagaku Biobusiness) at 37 °C for 55 min, 45 or 20 min, respectively, to reach the same number of spheroplasts for each strain (approximately 80% of the cells). Spheroplast cells were washed three times with PBS containing 1 M sorbitol, incubated for 2 min on ice with permeabilization solution (0.1% Triton X-100 and 0.1% sodium citrate), washed twice with the PBS-sorbitol buffer and then incubated for 60 min at 37 °C with 50 µl of the TUNEL reaction mixture. Spheroplasts were finally rinsed three times with PBS-sorbitol, resuspended in 2 ml of PBS and analyzed using a Becton Dickinson FACSCalibur flow cytometer with the FL1 filter. For microscope visualization, 10 µl of the Zymolyase-digested cell suspension were applied to a microscope slide with Poly-L-lysine-coated slides (Premiere) and allowed to dry for 30 min at 37 °C. The slides were incubated with 10 µl of TUNEL reaction mixture. Finally, the slides were rinsed three times with PBS,

and a coverslip was mounted with a drop of Vectashield antifading agent (Invitrogen). Microscopic observation and processing of images were performed as described for ROS analysis. The percentage of TUNEL-positive nuclei was calculated from the 10,000 counts of FACS and was analyzed with Cyflogic v.1.2.1 (Cyflo Ltd.) software.

### **C. *albicans* methods**

#### **Organisms, strains, media, and culture conditions**

All *C. albicans* strains used in this study are derived from the wild type strain CAI4 (15) and were detailed in Supplementary Table 2.

Yeast cells were cultured at 30°C in YPD (1% yeast extract, 2% peptone, and 2% dextrose) or in SD minimal medium (28). To allow phenotype comparisons all tests were performed with strains carrying the *URA3* gene re-integrated using the Clp10 vector (29) ensuring *URA3* expression at the neutral RPS10 locus. The genotype of all strains was routinely verified by PCR using the *URA3*ver5/*RPS10*ver primers (Supplementary Table 3).

#### **Heterozygous disruption of *C. albicans* *PKH2***

*C. albicans* knockout of the *PKH2* gene (ORF 19.5224) was generated using the PCR-based adaptation (30) of the sequential *URA*-Blaster technique (15) that has been previously described in (10). Specific primers listed in Supplementary Table 4, *PKH2*KO5/*PKH2*KO3, were designed to generate the PCR deletion construct *PKH2*::*URA3*-dpl200. The products of ten PCR reactions were pooled and used to transform CAI4 wild type strain following the protocol described by Wilson and Davis (30). This technique allowed us to obtain strain *PKH2*/pkh2 $\Delta$  (RRD2). *URA* transformants were grown on uridine deficient SD solid medium, and proper genomic insertion of the transforming cassette was determined by a PCR-based analysis of transformed colonies using a set of primers combining a forward oligo internal to the *URA3* cassette (*URA3*ver5) and a reverse one external to the modified region (*PKH2*ver3). From 19 independent isolations, 11 colonies showed heterozygous loss of the *PKH2* allele. All positive clones rendered identical phenotypes in the characterization assays. In order to obtain the homozygous null mutant, the *URA3* marker was recycled by selection on SD medium plus 5-FOA (1 mg/ml) and uridine (50  $\mu$ g/ml), for unknown

reasons, several attempts to delete the remaining *PKH2* allele in the *PKH2/pkh2Δ* strain were unsuccessful.

### **Glycogen content determination**

Qualitative assessment of glycogen content was carried out by the iodine/iodide staining method (31).

### **Expression and purification of CaPkh2 and PDK1**

For the expression and purification of hPDK1 and caPkh2 fused to GST, HEK293 cells were transfected with pEBG2T derived plasmids using a PEI protocol, the cell media exchanged after 20 h and the cells lysed after 20 h in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1% (w/v) Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 50  $\mu$ M sodium fluoride, 5 mM sodium pyrophosphate, 0.27 M sucrose, 0.1%  $\beta$ -mercaptoethanol, and 1 tablet of protease inhibitor cocktail per 50 ml of buffer. Lysates were frozen in liquid nitrogen and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until required. GST-hPDK1 and GST-caPkh2 were purified in a one step-batch protocol. The cleared lysate was incubated with glutathione sepharose, followed by 4 washes with 0.5 M NaCl in lysis buffer, and by 10 washes with a buffer containing 50 mM Tris-HCl, 0.5 mM EGTA and 0.1%  $\beta$ -mercaptoethanol, and eluted with the same buffer containing 50 mM glutathione. GST fusion proteins were aliquoted, snap frozen in liquid nitrogen and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

A synthetic gene for CaPkh2 optimized for expression in mammalian cells was generated (GeneArt, Invitrogen) and cloned into the EcoRI/HindIII sites of the pFastBac vector (Invitrogen). The N-terminally labeled His<sub>6</sub>-fusion protein was produced in Sf9 insect cells using the baculovirus expression technology (Invitrogen). The protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography and subsequent gel-filtration chromatography on a HiLoad 16/60 Superdex 200 pg column (GE Healthcare). The purified protein in 20 mM Tris (pH 7.4), 200 mM NaCl, and 1 mM DTT was concentrated to 5.6 mg/ml using a Vivaspin 20 centrifugal concentrator (Vivascience).

### Crystallization of CaPkh2

His<sub>6</sub>-CaPkh2 was crystallized by the sitting-drop, vapor-diffusion method at 18 °C. 100 nl of protein (containing 10 mM ADP) was added to 100 nl of reservoir solution (100 mM ammonium sulfate, 30 % (w/v) PEG 4000, and 100 mM sodium citrate/ citric acid (pH 5.6)). The crystals grew to a size of 100 μm × 20 μm × 20 μm within two weeks. No additional protectant was needed to be added for cryo-protection. The crystals belong to space group P4<sub>2</sub>2<sub>1</sub>2 with cell constants  $a=b=100.2$  Å and  $c=60.1$  Å. The presence of full-length CaPkh2 was physically impossible as indicated by a theoretical  $V_M$  (32) of 0.69 Å<sup>3</sup>/Da – a density much higher than 100% protein in the unit cell. Western-blot investigation confirmed that the protein partially degraded in the crystallization drop. Later, crystal structure analysis revealed that one molecule of the catalytic domain (aa 233-521, 33.4 kDa) crystallized per asymmetric unit, corresponding to a  $V_M$  of 2.26 Å<sup>3</sup>/Da and a solvent content of 46% (v/v).

### Diffraction data collection and crystal structure determination

Diffraction data were collected on BL14.1 operated by the Helmholtz-Zentrum Berlin (HZB) at the BESSY II electron storage ring (33). Data were processed and scaled using the XDS program package (34). Human PDK1 (PDB ID 3HRC) was used as a model for molecular replacement in Phaser ((35). The Phenix software suite (36) was used for refinement. Coot (14) was used for manual model building and structural analysis and PyMOL (Schrödinger) for molecular depictions.

### Protein kinase activity measurements

In brief, PDK1 activity assay was performed at room temperature (22°C) in a 20 μl mix containing 50 mM Tris pH 7.5, 0.05 mg/ml BSA, 0.1% β-mercaptoethanol, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 μM [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]ATP (5-50 cpm/pmol), 0.003% Brij, 150-500 ng PDK1 or CaPkh2, and T308tide (from 0.1 to 1 mM). After a 15 min preincubation, the kinase reaction was initiated by the addition of the ATP-Mg mixture. The reaction was stopped by the addition of 5 μl phosphoric acid (final concentration 0.01 %). The PDK1 activity assay was performed in a 96 well format and 4 μl aliquots spotted on p81 phosphocellulose papers (Whatmann) using ep motion 5070 (Eppendorf), washed in 0.01% phosphoric

acid, dried, and then exposed and analysed using PhosphorImager technology (FLA-9000 Starion, Fujifilm). The specific activity of CaPkh2 and PDK1 was estimated using 100  $\mu$ M T308tide.

PKB/Akt and SGK were expressed from pEBG2T vectors as GST fusion proteins and purified as described above for PKD1 and CaPkh2. PKB/Akt and SGK1 constructs employed were GST-PKB $\alpha$ /Akt-1 [473Asp] GST-SGK1 [422Asp], having an Asp residue in place of the HM phosphorylation site. The activity assay was performed as described for PDK1 and CaPkh but using KK-Crosstide (KKGRPRTSSFAEG) as substrate of the reaction.

### Cell viability (MTT assay)

The effect of PS77 on the viability of mammalian cells was tested on the HepG2 hepatocellular carcinoma cell line. The cells were incubated with different concentrations of PS77 for 24h. Subsequently, 0.5 mg/ml MTT was added to the cells and incubated for 2 h. The medium was then carefully removed and the formazan crystals dissolved in DMSO. Absorbance was quantified at 595 nm using an EnVision plate reader.

### General chemical methods

Solvents and reagents were obtained from commercial suppliers and used as received.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on a Bruker AM500 FT spectrometer. Chemical shifts are referenced to the residual protonated solvent signals of the solvent. Infrared spectra were recorded in a Bruker FTIR Spectrometer Vektor 33 in the 400–4000  $\text{cm}^{-1}$  spectral region; the absorbing peaks are given in wave numbers ( $1/\text{cm}$ ). The purities of the tested compounds **PS76** and **PS77** were determined by HPLC coupled with mass spectrometry and were higher than 96% in both cases. Mass spectrometric analysis (HPLC-ESI-MS) was performed on a TSQ quantum (Thermo Electron Corporation) instrument equipped with an ESI source and a triple quadrupole mass detector (Thermo Finnigan, San Jose, CA). The MS detection was carried out at a spray voltage of 4.2 kV, a nitrogen sheath gas pressure of  $4.0 \times 10^5$  Pa, an auxiliary gas pressure of  $1.0 \times 10^5$  Pa, a capillary temperature of 400  $^\circ\text{C}$ , capillary voltage of 35 V and source CID of 10 V. All samples were injected by auto sampler (Surveyor®, Thermo Finnigan) with an

injection volume of 10  $\mu\text{L}$ . A reversed phase C18 NUCLEODUR® 100-3 (125 x 3 mm) column (Macherey-Nagel) was used as stationary phase. The solvent system consisted of water containing 0.1 % TFA (A) and 0.1 % TFA in acetonitril (B). HPLC-Method: the flow rate was 400  $\mu\text{L}/\text{min}$ . The percentage of B started at an initial 5 %, was increased to 100 % during 16 min, kept at 100 % for 2 min and flushed back to 5 % within 2 min. All masses were reported as protonated parent ions. Melting points (mp) were determined in open capillaries on a Mettler FP1 melting point apparatus and are uncorrected. Previously characterized compounds directed to the PIF-pocket were **PS46** (37), **PS47** and **PS48** (38, 39), **PS182**, **PS210** and **PS220** (40, 41). The malonic acid derivatives were synthesized following procedures previously described (42, 43).

### Synthesis and characterization of **PS76** and **PS77**

*1-(4-chlorophenyl)-3-(2-(4-chlorophenylthio)phenyl)prop-2-en-1-one* (**PS76**). 300 mg (1.2 mmol) of 2-[(4-Chlorophenyl)thio]benzaldehyde were dissolved in 10 mL of 95% ethanol, and 8 mL of a 3N sodium hydroxide in water (12 mmol) was added. 0.15 mL. Then (1.47 mmol) 4-Chloroacetophenone were added and the mixture stirred for 1.5 h at room temperature (RT). The solid chalcone product was filtered and washed with 70% ice-cold ethanol in water followed by water. After drying, the chalcone was purified further by flash chromatography on silica gel, using n-hexane/ ethylacetate (2:1, v/v) as a mobile phase, finally yielding of **PS76** as a light yellow solid; TLC (n-hexane:ethylacetate, 2:1 v/v):  $R_f = 0.45$ ; yield 444 mg (1.15 mmol, 96%); mp: 124-125  $^{\circ}\text{C}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 6.57 (d,  $J = 12.6$  Hz, 1H), 7.08 (m, 3H), 7.15 (m, 3H), 7.22 (m, 6H), 7.63 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H),  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 92.6 (s), 103.4 (s), 127.0 (s), 128.2 (s), 129.9 (d), 130.2 (s), 130.9 (d), 131.2 (s), 131.9 (d), 132.8 (d), 133.5 (s), 138.4 (s), 143.9 (s), 148.3 (s), 160.4 (s), 172.8 (s), 219.8 (s); IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1461, 1477, 1595, 1655, 2960; MS (+ESI):  $m/z = 386.19$  [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], calc.: 386.01.

*2-(3-(4-chlorophenyl)-1-(2-(4-chlorophenylthio)phenyl)-3-oxopropylthio)acetic acid* (**PS77**). 200 mg (0.52 mmol) of **PS76** were dissolved in 8 mL acetonitrile, and 0.105 mL of triethylamine (0.75 mmol) followed by 0.043 mL of fresh thioglycolic acid (0.62 mmol) were added to the solution at RT. After stirring at RT for 2h, the solvent was removed by rotary evaporation and the crude product re-dissolved in ethylacetate. The organic layer



was washed three times with 1 N HCl, dried over MgSO<sub>4</sub> and the ethylacetate removed by rotary evaporation. The crude product, appearing as a slightly yellow oil was purified over a silica gel flash column using n-hexane/ ethylacetate/ formic acid (73:24:3 v/v/v) as a mobile phase. Fractions containing the desired compound were pooled and the mobile phase removed by rotary evaporation, after which **PS77** was obtained as a yellow oil; TLC (n-hexane: ethylacetate: formic acid, 73:24:3 v/v/v): R<sub>f</sub> = 0.38; yield 186 mg (0.38 mmol, 73%); <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 2.03 (m, 1H), 3.17 (q, J = 15.7 Hz, 2H), 3.32 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.19 (m, 5H), 7.32 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.39 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 8.6 Hz, 2H); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 26.2 (s), 33.6 (s), 46.4 (s), 127.0 (s), 127.8 (s), 128.3 (s), 128.4 (d), 128.5 (s), 128.9 (d), 129.4 (d), 129.5 (d), 131.3 (s), 134.0 (s), 134.4 (s), 135.1 (s), 139.9 (s), 142.1 (s), 195.3 (s), 203.5 (s); IR (cm<sup>-1</sup>): 1401, 1475, 1588, 1708, 2363, 2926; MS (+ESI): m/z = 478.05 [M+H<sup>+</sup>], calc.: 478.00.

## Supplementary References

1. Inagaki, M., Schmelzle, T., Yamaguchi, K., Irie, K., Hall, M. N., and Matsumoto, K. (1999) PDK1 Homologs Activate the Pkc1-Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Yeast, *Molecular and Cellular Biology* 19, 8344-8352.
2. Friant, S., Lombardi, R., Schmelzle, T., Hall, M. N., and Riezman, H. (2001) Sphingoid base signaling via Pkh kinases is required for endocytosis in yeast, *20*, 6783-6792.
3. de Nobel, H., Ruiz, C., Martin, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M., and Klis, F. M. (2000) Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slit2/Mpk1 MAP kinase and in an Slit2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance, *Microbiology-Uk* 146, 2121-2132.
4. Cid, V. J., Duran, A., del Rey, F., Snyder, M. P., Nombela, C., and Sanchez, M. (1995) Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiol.Rev.* 59, 345-386.
5. Serrano, R., Martin, H., Casamayor, A., and Arino, J. (2006) Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Slit2 MAPK pathway, *J.Biol.Chem.* 281, 39785-39795.
6. Baxter, B. K., DiDone, L., Ogu, D., Schor, S., and Krysan, D. J. (2011) Identification, in vitro activity and mode of action of phosphoinositide-dependent-1 kinase inhibitors as antifungal molecules, *ACS Chem Biol* 6, 502-510.

7. Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., and Botstein, D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 14863-14868.
8. Saldanha, A. J. (2004) Java Treeview--extensible visualization of microarray data, *Bioinformatics*. 20, 3246-3248.
9. Ruepp, A., Zollner, A., Maier, D., Albermann, K., Hani, J., Mokrejs, M., Tetko, I., Guldener, U., Mannhaupt, G., Munsterkotter, M., and Mewes, H. W. (2004) The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes, *Nucleic Acids Research* 32, 5539-5545.
10. Giacometti, R., Kronberg, F., Biondi, R. M., and Passeron, S. (2009) Catalytic isoforms Tpk1 and Tpk2 of *Candida albicans* PKA have non-redundant roles in stress response and glycogen storage, *Yeast* 26, 273-285.
11. Mandal, M., Kim, S., Younes, M. N., Jasser, S. A., El-Naggar, A. K., Mills, G. B., and Myers, J. N. (2005) The Akt inhibitor KP372-1 suppresses Akt activity and cell proliferation and induces apoptosis in thyroid cancer cells, *Br J Cancer* 92, 1899-1905.
12. Zeng, Z., Samudio, I. J., Zhang, W., Estrov, Z., Pelicano, H., Harris, D., Frolova, O., Hail, N., Jr., Chen, W., Kornblau, S. M., Huang, P., Lu, Y., Mills, G. B., Andreeff, M., and Konopleva, M. (2006) Simultaneous inhibition of PDK1/AKT and Fms-like tyrosine kinase 3 signaling by a small-molecule KP372-1 induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in acute myelogenous leukemia, *Cancer Res* 66, 3737-3746.
13. Takahashi, I., Saitoh, Y., Yoshida, M., Sano, H., Nakano, H., Morimoto, M., and Tamaoki, T. (1989) UCN-01 and UCN-02, new selective inhibitors of protein kinase C. II. Purification, physico-chemical properties, structural determination and biological activities, *J Antibiot (Tokyo)* 42, 571-576.
14. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 486-501.
15. Fonzi, W. A., and Irwin, M. Y. (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*, *Genetics* 134, 717-728.
16. Park, H., Myers, C. L., Sheppard, D. C., Phan, Q. T., Sanchez, A. A., J, E. E., and Filler, S. G. (2005) Role of the fungal Ras-protein kinase A pathway in governing epithelial cell interactions during oropharyngeal candidiasis, *Cell Microbiol* 7, 499-510.
17. Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
18. Adams, A., Gottschling, D., Kaiser, C., and Steams, T. (1997) Techniques and Methods in Yeast Genetics, ed. M. M. Dickerson, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press, 99-102.
19. Yen, K., Gitsham, P., Wishart, J., Oliver, S. G., and Zhang, N. (2003) An improved tetO promoter replacement system for regulating the expression of yeast genes, *Yeast* 20, 1255-1262.
20. Christianson, T. W., Sikorski, R. S., Dante, M., Shero, J. H., and Hieter, P. (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors, *Gene* 110, 119-122.
21. Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J. D., Bussey, H., Chu, A. M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S. W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S. H.,

- Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J. H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Liebundguth, N., Lockhart, D. J., Lucau-Danila, A., Lussier, M., M'Rabet, N., Menard, P., Mittmann, M., Pai, C., Rebischung, C., Revuelta, J. L., Riles, L., Roberts, C. J., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Snyder, M., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R. K., Veronneau, S., Voet, M., Volckaert, G., Ward, T. R., Wysocki, R., Yen, G. S., Yu, K., Zimmermann, K., Philippsen, P., Johnston, M., and Davis, R. W. (1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis, *Science* 285, 901-906.
22. Goldstein, A. L., and McCusker, J. H. (1999) Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 15, 1541-1553.
  23. Gonzalez, A., Ruiz, A., Serrano, R., Arino, J., and Casamayor, A. (2006) Transcriptional profiling of the protein phosphatase 2C family in yeast provides insights into the unique functional roles of Ptc1, *J.Biol.Chem.* 281, 35057-35069.
  24. Viladevall, L., Serrano, R., Ruiz, A., Domenech, G., Giraldo, J., Barcelo, A., and Arino, J. (2004) Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae* *J.Biol.Chem.* 279, 43614-43624.
  25. Alberola, T. M., Garcia-Martinez, J., Antunez, O., Viladevall, L., Barcelo, A., Arino, J., and Perez-Ortin, J. E. (2004) A new set of DNA macrochips for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: features and uses., *International Microbiology* 7, 199-206.
  26. Hegde, P., Qi, R., Abernathy, K., Gay, C., Dharap, S., Gaspard, R., Hughes, J. E., Snesrud, E., Lee, N., and Quackenbush, J. (2000) A concise guide to cDNA microarray analysis., *BioTechniques* 29, 548-556.
  27. Herrero, J., Al Shahrour, F., Diaz-Uriarte, R., Mateos, A., Vaquerizas, J. M., Santoyo, J., and Dopazo, J. (2003) GEPAS: A web-based resource for microarray gene expression data analysis, *Nucleic Acids Res.* 31, 3461-3467.
  28. Sherman, F., Fink, G., and Hicks, J. (1986) *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
  29. Murad, A. M., Lee, P. R., Broadbent, I. D., Barelle, C. J., and Brown, A. J. (2000) Clp10, an efficient and convenient integrating vector for *Candida albicans*, *Yeast* 16, 325-327.
  30. Wilson, R. B., Davis, D., and Mitchell, A. P. (1999) Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions, *J Bacteriol* 181, 1868-1874.
  31. Toda, T., Uno, I., Ishikawa, T., Powers, S., Kataoka, T., Broek, D., Cameron, S., Broach, J., Matsumoto, K., and Wigler, M. (1985) In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase, *Cell* 40, 27-36.
  32. Matthews, B. W. (1968) Solvent content of protein crystals, *J Mol Biol* 33, 491-497.
  33. Mueller, U., Darowski, N., Fuchs, M. R., Forster, R., Hellmig, M., Paithankar, K. S., Puhlinger, S., Steffien, M., Zocher, G., and Weiss, M. S. (2012) Facilities for macromolecular crystallography at the Helmholtz-Zentrum Berlin, *J Synchrotron Radiat* 19, 442-449.
  34. Kabsch, W. (2010) Xds, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 125-132.
  35. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J. (2007) Phaser crystallographic software, *J Appl Crystallogr* 40, 658-674.

36. Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., and Zwart, P. H. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 213-221.
37. Engel, M., Hindie, V., Lopez-Garcia, L. A., Stroba, A., Schaeffer, F., Adrian, I., Imig, J., Idrissova, L., Nastainczyk, W., Zeuzem, S., Alzari, P. M., Hartmann, R. W., Piiper, A., and Biondi, R. M. (2006) Allosteric activation of the protein kinase PDK1 with low molecular weight compounds, *Embo J* 25, 5469-5480.
38. Hindie, V., Stroba, A., Zhang, H., Lopez-Garcia, L. A., Idrissova, L., Zeuzem, S., Hirschberg, D., Schaeffer, F., Jorgensen, T. J. D., Engel, M., Alzari, P. M., and Biondi, R. M. (2009) Structure and allosteric effects of low molecular weight activators on the protein kinase PDK1, *Nat. Chem. Biol.* 5, 758-764.
39. Stroba, A., Schaeffer, F., Hindie, V., Lopez-Garcia, L., Adrian, I., Frohner, W., Hartmann, R. W., Biondi, R. M., and Engel, M. (2009) 3,5-Diphenylpent-2-enoic acids as allosteric activators of the protein kinase PDK1: structure-activity relationships and thermodynamic characterization of binding as paradigms for PIF-binding pocket-targeting compounds, *J Med Chem* 52, 4683-4693.
40. Busschots, K., Lopez-Garcia, L. A., Lammi, C., Stroba, A., Zeuzem, S., Piiper, A., Alzari, P. M., Neimanis, S., Arencibia, J. M., Engel, M., Schulze, J. O., and Biondi, R. M. (2012) Substrate-Selective Inhibition of Protein Kinase PDK1 by Small Compounds that Bind to the PIF-Pocket Allosteric Docking Site, *Chem Biol* 19, 1152-1163.
41. Wilhelm, A., Lopez-Garcia, L. A., Busschots, K., Frohner, W., Maurer, F., Boettcher, S., Zhang, H., Schulze, J. O., Biondi, R. M., and Engel, M. (2012) 2-(3-Oxo-1,3-diphenylpropyl)malonic Acids as Potent Allosteric Ligands of the PIF Pocket of Phosphoinositide-Dependent Kinase-1: Development and Prodrug Concept, *J Med Chem*.
42. Kohler, E. P. (1912) Unsaturated  $\delta$ -Ketonic Acids, *American Chemical Journal*, 474-502.
43. Davey, W., and Gwilt, J. R. (1957) Chalcones and Related Compounds .2. Addition of Thiols and Esters to the Chalcone System, *Journal of the Chemical Society*, 1015-1017.