



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Estudio funcional de Ypi1, una subunidad  
reguladora esencial de la proteína fosfatasa  
Glc7**

**TESIS DOCTORAL**

**MARÍA ISABEL MARQUINA RODRÍGUEZ**

**JULIO 2010**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA**



***Para empezar un gran proyecto,  
hace falta valentía.  
Para terminar un gran proyecto,  
hace falta perseverancia.***



**A mis padres.** Por permitirme  
y alentarme a descubrir mi propio  
camino.



# **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA**

## **Facultad de Veterinaria**

### **Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**

Memoria presentada por la licenciada en Biología **María Isabel Marquina Rodríguez** para optar el grado de Doctor en Bioquímica y Biología Molecular.

Este trabajo se realizó bajo la dirección de los doctores **Joaquin Ariño Carmona** y **Antonio Casamayor Gracia** en la Unidad de Veterinaria del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Barcelona.

.....  
**Dr. Joaquin Ariño Carmona**

.....  
**Dr. Antonio Casamayor Gracia**

.....  
**María Isabel Marquina Rodríguez**

Julio de 2010  
Bellaterra, Cerdanola del Vallés  
BARCELONA



## AGRADECIMIENTOS

Y yo que pensaba que lo más duro había terminado...y aquí me teneis. Llevo días pensando en los agradecimientos, dando vueltas en la cabeza el qué, cómo y a quiénes incluir en este apartado. Se me pasan por la mente muchísimos momentos llenos de anécdotas y personas a quienes no me gustaría dejar de lado ya que gracias a ellos ha sido posible la culminación de la etapa más intensa de mi vida.

Ante todo, mi más sincera gratitud y consideración al Dr. Joaquín Ariño Carmona por haberme brindado la oportunidad de realizar los estudios de Doctorado. Gracias por haberme brindado su valiosa orientación con mucho profesionalismo y calidad humana y sobre todo por el tiempo y la paciencia que me ha dedicado.

Al Dr. Antonio Casamayor Gracia, por soportarme durante todos estos años. Porque este trabajo no habría sido posible sin su apoyo incondicional y sus sabios consejos. Se ha implicado tanto en la realización de esta tesis. que siento que la ha vivido como suya.

A Ivan, por cogerme de la mano y aleccionarme desde el primer día. A él le debo la fase inicial de mi trabajo. Gracias por enseñarme a hacer las cosas bien. Con paciencia y empeño logró que cimentara las bases de mi carrera investigadora. Su capacidad de trabajo y sus amplios conocimientos son un ejemplo a seguir y una motivación para continuar en este campo de la investigación.

A toda la gente del laboratorio que han sabido estar en los momentos difíciles pero también en los momentos más gratos de este intenso período de realización de la tesis. A María, Asier, Carlos, Jofre, Dani. Gracias por haber estado dispuestos a ayudarme cuando los he necesitado y por los buenos y no tan buenos momentos que hemos compartido. A Lina que, por estar en el mismo laboratorio hemos compartido muchísimas más cosas. Gracias por tus consejos, por estar allí en las tardes interminables de trabajo en el laboratorio y por tu apoyo moral en momentos difíciles

A María Jesús, Anna Vilalta y Montse por la eficiente ayuda técnica prestada. Gracias por hacer más fácil la realización de este trabajo. Gracias María Jesús por deleitarnos con tu vasto repertorio de repostería.

A los que ya no forman parte del laboratorio Laia, Amparo, Raquel, Loli, Martí y Ernesto por los buenos momentos compartidos.

A los que forman parte del servicio de secuenciación. A la Dra. Anna Barceló, Roger y Xavi por los innumerables momentos compartidos.

También quiero agradecer al grupo de los "Fátimos" porque con ellos hemos convivido en el mismo pasillo durante los primeros años. Al grupo de la Dra. Anna Bassols por su apoyo y vivencias compartidas. A Néstor y a Josep que, con sus irreverencias, hicieron más llevaderos los interminables itinerarios de trabajo.

A nuestras administrativas Rosa, Ester, Silvia, Montse, Gloria y Mercedes. Gracias por facilitarnos los pesados trámites burocráticos

A toda la gente del Departamento de Psicobiología, mi tercera casa. Gracias por apoyarme y facilitarme las cosas durante el último año de trabajo experimental y sobre todo durante la redacción de la tesis. A las integrantes del club de los viernes Elena y Cristina. A Elena por compartir las arduas mañanas de trabajo y los momentos de relax. Siempre estuvo dispuesta a escucharme y ser mi paño de lágrimas en los momentos difíciles. Gracias por tu amistad y tu apoyo incondicional. A Cristina por las deliciosas chocolatinas y por los momentos compartidos.

A Sandra y Johanna, mis compañeras de piso. Gracias por animarme siempre y vivir conmigo esta aventura. A Carolina, por su amistad y estar siempre dispuesta a escucharme. Gracias por los momentos que hemos compartido.

A toda mi familia. En especial a mis padres, porque a ellos les debo todo lo que soy. Gracias por vuestros sabios consejos y apoyo incondicional en la cristalización de este gran proyecto. A mis hermanos Mauro, Alan, Wilmer, Brenda, Jacqueline, Nelly y Elizabeth, por su constante apoyo moral y gran hermandad que seguiremos forjando siempre.

A Jholan por darme todo su amor, comprensión y paciencia. Con sus cuidados y mimos hizo más llevadera la dura e intensa etapa de la redacción de la tesis. Gracias por formar parte de mi día a día y compartir este proyecto de vida que hemos iniciado juntos.



## ABREVIATURAS

<b>APC</b>	<u>A</u> naphase <u>P</u> romoting <u>C</u> omplex
<b>ATP</b>	<u>A</u> denosine <u>T</u> ri <u>P</u> hosphate
<b>BLAST</b>	<u>B</u> est <u>L</u> ocal <u>A</u> lignment <u>S</u> earch <u>T</u> ool
<b>BSA</b>	<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin
<b>cAMP</b>	cyclic <u>A</u> denosine <u>M</u> ono <u>P</u> hosphate
<b>CDK</b>	<u>C</u> yclin <u>D</u> ependent Protein <u>K</u> inase
<b>CDRE</b>	<u>C</u> alcineurin- <u>d</u> ependent <u>R</u> esponse <u>E</u> lements
<b>CFW</b>	<u>C</u> alco <u>F</u> luor <u>W</u> hite
<b>CKI</b>	<u>C</u> yclin Dependent Protein <u>K</u> inase <u>I</u> nhibitor
<b>CKS</b>	<u>C</u> yclin Dependent <u>K</u> inase <u>S</u> ubunit
<b>CM</b>	<u>C</u> omplete <u>M</u> edium
<b>CPF</b>	<u>C</u> leavage and <u>P</u> olyadenilation <u>F</u> actor
<b>DAPI</b>	4,6- <u>d</u> iamidino-2-phenyl <u>i</u> ndole
<b>DARP32</b>	<u>D</u> opamine and cAMP- <u>R</u> egulated <u>P</u> hosphoprotein
<b>DIC</b>	<u>D</u> ifferential <u>I</u> nterference <u>C</u> ontrast Image
<b>DMSO</b>	( <u>D</u> imethyl <u>S</u> ulfoxide)
<b>DNA</b>	<u>D</u> eoxyribo <u>N</u> ucleic <u>A</u> cid
<b>5-FOA</b>	5- <u>F</u> luoroorotic <u>A</u> cid
<b>GADD34</b>	<u>G</u> rowth <u>A</u> rrest and <u>D</u> NA <u>D</u> amage-Inducible Protein
<b>LRRs</b>	<u>L</u> eucine- <u>R</u> ich <u>R</u> epeats <u>S</u> equence
<b>MAP</b>	<u>M</u> itogen- <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein
<b>MAPK</b>	<u>M</u> itogen- <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inase
<b>MAPKKK</b>	<u>M</u> itogen- <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inase- <u>K</u> inase- <u>K</u> inase
<b>MBF</b>	Swi6- <u>M</u> bp1 <u>B</u> inding <u>F</u> actor
<b>MEN</b>	<u>M</u> itotic <u>E</u> xit <u>N</u> etwork
<b>MT</b>	<u>M</u> icro <u>T</u> ubule
<b>M</b>	Molaridad
<b>NIPP1</b>	<u>N</u> uclear <u>I</u> nhibitor of <u>P</u> rotein <u>P</u> hosphatase 1
<b>NPC</b>	<u>N</u> uclear <u>P</u> ore <u>C</u> omplexes
<b>NSL</b>	<u>N</u> uclear <u>L</u> ocalization <u>S</u> equence
<b>ONPG</b>	<u>O</u> - <u>n</u> itrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

<b>PBD</b>	<u>P</u> olo <u>B</u> ox- <u>D</u> omain
<b>PBS</b>	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline
<b>PHP</b>	<u>P</u> rotein <u>H</u> istidine <u>P</u> hosphatases
<b>PPP</b>	<u>P</u> hospho <u>P</u> rotein <u>P</u> hosphatases
<b>PPM</b>	<u>M</u> etal-ion-dependent <u>P</u> rotein <u>P</u> hosphatases
<b>PTP</b>	<u>P</u> rotein <u>T</u> yrosine <u>P</u> hosphatases
<b>RNA</b>	<u>R</u> ibo <u>N</u> ucleic <u>A</u> cid
<b>RPA</b>	<u>R</u> eplication <u>P</u> rotein <u>A</u>
<b>SBF</b>	<u>S</u> wi4- <u>S</u> wi6 <u>B</u> inding <u>F</u> actor
<b>SCF</b>	<u>S</u> kp1/ <u>C</u> ul1/ <u>E</u> -box Protein
<b>SC</b>	<u>S</u> ynthetic <u>M</u> edium
<b>SDS</b>	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate
<b>SDS-PAGE</b>	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate- <u>P</u> oli <u>A</u> crilamide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis
<b>Ser/Thr</b>	<u>S</u> erin/ <u>T</u> hreonin
<b>SNARE</b>	<u>S</u> oluble <u>N</u> SF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) <u>A</u> ttachment <u>R</u> eceptor
<b>SPB</b>	<u>S</u> pindle <u>P</u> ole <u>B</u> ody
<b>SSC</b>	<u>S</u> aline <u>S</u> odium <u>C</u> itrate
<b>ssDNA</b>	single-stranded <u>D</u> eoxyribo <u>N</u> ucleic <u>A</u> cid
<b>TMA</b>	<u>T</u> etra <u>M</u> ethyl <u>A</u> mmonium
<b>TOR</b>	<u>T</u> arget of <u>R</u> apamycin
<b>TRP</b>	<u>T</u> etratrico <u>P</u> eptide <u>R</u> epeats
<b>YPD</b>	<u>Y</u> east extract- <u>P</u> eptone- <u>D</u> extrose

# INDICE

<b>1. PRESENTACIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
2.1. FOSFORILACIÓN REVERSIBLE DE PROTEÍNAS.....	7
2.1.1. Importancia de la fosforilación reversible de proteínas.....	7
2.1.2. Proteínas Quinasas.....	9
2.1.3. Proteínas Fosfatasas.....	11
2.2. SER/THR FOSFATASAS.....	13
2.2.1. La Ser/Thr fosfatasa de tipo 1.....	13
2.2.2. Mecanismos de interacción de PP1c con subunidades reguladoras. Motivos de unión.....	17
2.3. GLC7, LA SER/THR FOSFATASA DE TIPO-1 DE <i>S. cerevisiae</i> .....	20
2.3.1. Las proteínas Ypi1 y Sds22 como subunidades reguladoras esenciales de Glc7.....	24
2.3.1.1. Ypi1.....	24
2.3.1.2. Sds22.....	28
2.4. FUNCIONES DE Glc7.....	29
2.4.1. Papel de Glc7 en la regulación de la homeostasis iónica.....	30
2.4.2. Papel de Glc7 en la integridad de la pared celular.....	34
2.4.3. Papel de Glc7 en la regulación del ciclo celular.....	36
2.5. EL CICLO CELULAR DE <i>S.cerevisiae</i> .....	37
2.5.1. Mecanismos de control del ciclo celular de <i>S. cerevisiae</i> .....	39
2.5.1.1. Regulación transcripcional de ciclinas.....	40
2.5.1.2. Degradación e inhibición de ciclinas.....	41
2.5.1.3. Regulación de Cdc28 por fosforilación.....	43
2.5.2. Control de la mitosis.....	44
2.5.3. Vías de señalización que regulan el ciclo celular. Sistemas de vigilancia o <i>checkpoints</i> .....	46
2.5.4. Activación de los <i>checkpoints</i> que regulan la mitosis en <i>S. cerevisiae</i> .....	48
2.5.4.1. <i>Checkpoint</i> de fase S.....	49
2.5.4.2. <i>Checkpoint</i> del <i>spindle</i> mitótico.....	51
2.5.4.3. <i>Checkpoint</i> de la morfogénesis.....	56

2.5.5. Papel de Glc7 en mitosis.....	56
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>61</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
4.1. CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO.....	67
4.2. PLÁSMIDOS.....	67
4.3. TÉCNICAS DE DNA RECOMBINANTE.....	69
4.3.1. Transformaciones de células de <i>E. coli</i> y <i>S. cerevisiae</i> .....	70
4.3.2. Verificación de transformantes resistentes a G418.....	70
4.3.3. Esporulación de diploides.....	71
4.3.4. Selección de haploides.....	71
4.4. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES CONDICIONALES <i>ypi1</i> .....	71
4.4.1. Creación de un degrón.....	72
4.4.2. Obtención de un mutante condicional <i>ypi1</i> regulable por doxiciclina usando el promotor <i>tetO</i> presente en el plásmido pCM182.....	72
4.4.3. Obtención del mutante condicional <i>ypi1</i> por sustitución cromosómica de su promotor.....	73
4.5. CASETES DE DELECCIÓN E INTERRUPCIÓN DE GENES.....	76
4.6. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.....	79
4.7. BÚSQUEDA DE GENES EN MULTICOPIA SUPRESORES DE LA LEATALIDAD PROVOCADA POR LA FALTA DE <i>YPI1</i> .....	80
4.7.1. Aislamiento de clones que muestran capacidad para suprimir el fenotipo de letalidad provocado por la falta de Ypi1.....	80
4.7.2. Identificación de los ORFs responsables de suprimir el fenotipo de letalidad provocado por la falta de Ypi1.....	82
4.8. ESTUDIO DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL RESULTANTE DE LA MUTACIÓN CONDICIONAL DE <i>YPI1</i> .....	82
4.8.1. Obtención de muestras para extraer RNA.....	82
4.8.2. Extracción de RNA total.....	83
4.8.3. Síntesis de cDNA y microchips de DNA.....	83

4.8.4. Análisis global de los cambios en el perfil transcripcional causados como respuesta a la falta de <i>YPI1</i> .....	84
4.9. REVERSE TRANSCRIPTASE- PCR (RT-PCR SEMICUANTITATIVA).....	85
4.10. ENSAYO B-GALACTOSIDASA.....	85
4.11. ANÁLISIS FENOTÍPICO Y OTRAS TÉCNICAS.....	86
4.11.1. Efecto de la disminución condicional de <i>Ypi1</i> en el crecimiento celular.....	86
4.11.2. Efecto de la disminución funcional de <i>Sds22</i> en el crecimiento celular.....	88
4.11.3. Ensayos de sobreexpresión.....	88
4.11.4. Ensayos de sensibilidad.....	88
4.12. CITOMETRÍA DE FLUJO (FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING, FACS).....	89
4.13. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE.....	91
4.13.1. <i>Ypi1</i> .....	91
4.13.2. <i>Pds1</i> .....	91
4.13.3. <i>Cdc11</i> .....	92
4.13.4. <i>Swe1</i> .....	92
4.13.5. <i>Cdc28</i> <sup>Tyr-19</sup> .....	92
4.14. INMUNOBLOT ( <i>WESTERN BLOT</i> ) Y ANTICUERPOS EMPLEADOS.....	93
4.15. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA E INMUNOCITOQUÍMICA.....	94
4.15.1. Técnicas de tinción.....	94
4.15.1.1 Tinción con DAPI.....	94
4.15.1.2. Tinción con Faloidina.....	95
4.15.2. Localización subcelular de proteínas de fusión con GFP y <i>Glc7</i> y <i>EmCitrine</i> .....	95
4.15.3. Localización de <i>Cdc11</i> .....	96
4.15.4. Inmunocitoquímica.....	96
4.15.4.1. Tinción de tubulina.....	96
4.15.4.2. Localización de <i>Pds1</i> .....	97
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>99</b>

5.1. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LA SOBREENPRESIÓN DE <i>YPI1</i> .....	101
5.2. CREACIÓN DE MUTANTES CONDICIONALES <i>YPI1</i> .....	104
5.2.1. Construcción y expresión de una forma rápidamente degradable de la proteína Ypi1 (degrón).....	105
5.2.2. Expresión de Ypi1 desde un plásmido portador del promotor <i>tet-off</i> .....	106
5.2.2.1. Efecto de la depleción de Ypi1 en integridad celular.....	108
5.2.3. Obtención y caracterización de un mutante condicional regulable por doxiciclina mediante el reemplazamiento cromosómico del promotor.....	110
5.3. BÚSQUEDA DE SUPRESORES EN MULTICOPIA DE LA LETALIDAD PROVOCADA POR LA FALTA DE <i>YPI1</i> .....	113
5.4. Ypi1 FORMA UN COMPLEJO HETEROTRIMÉRICO CON Sds22 Y Glc7.....	116
5.5. LAS PROTEÍNAS Ypi1 Y Sds22 REGULAN LA LOCALIZACIÓN Y LA FUNCIÓN NUCLEAR DE LA FOSFATASA Glc7.....	120
5.5.1. Mutaciones en <i>YPI1</i> y <i>SDS22</i> producen fenotipos similares.....	121
5.6. ESTUDIO DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL RESULTANTE DE LA MUTACIÓN CONDICIONAL DE <i>YPI1</i> .....	128
5.6.1. Análisis de complementación de <i>YPI1</i> y <i>CDC26</i> .....	131
5.7. PAPEL DE <i>YPI1</i> EN LA PROGRESIÓN DE LA MITOSIS.....	132
5.7.1. La ausencia de Ypi1 provoca un bloqueo en la transición G2/M caracterizado por una estabilización de los niveles de la segurina Pds1.....	132
5.7.2. El bloqueo en mitosis del mutante condicional <i>tetO<sub>7</sub>:YPI1</i> no es debido a la activación de los <i>checkpoints</i> del <i>spindle</i> y de daño en el DNA.....	134
5.7.3. El bloqueo en mitosis provocado por la ausencia de Ypi1 es debido a la activación del <i>checkpoint</i> de la morfogénesis.....	136
5.7.4. La pérdida de Ypi1 altera la normal acumulación y localización de las septinas.....	142
5.7.5. La sobreexpresión de <i>CDC26</i> recupera el fenotipo de bloqueo en G2/M del mutante <i>ypi1</i> .....	146
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>149</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>153</b>

## 8. ANEXOS

**Tabla 4.** Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas.

**Tabla 5.** Oligonucleótidos usados para la interrupción de genes.

**Tabla 6.** Oligonucleótidos usados para la obtención y verificación de vectores de expresión.

**Tabla 7.** Oligonucleótidos usados para RT-PCR.

**Tabla 8.** Conjunto de genes que en ausencia de *YPI1* presentan unos niveles de expresión disminuídos respecto de la cepa salvaje.

**Tabla 9.** Conjunto de genes que en ausencia de *YPI1* presentan unos niveles de expresión incrementados respecto de la cepa salvaje.

### **Artículo 1:**

#### **Use of Yeast Genetic Tools to Define Biological Roles of Novel Protein Phosphatases**

Joaquin Ariño, Antonio casamayor, Amparo Ruiz, Ivan Muñoz and Maribel Marquina  
Methods Mol Biol. 2007;365:299-307.

### **Artículo 2:**

#### **YPI1 and SDS22 proteins regulate the nuclear localization and function of yeast type 1 phosphatase Glc7.**

Leda Pedelini, Maribel Marquina, Joaquin Ariño, Antonio Casamayor, L. Sanz, Mathieu Bollen, Pascual Sanz and María Adelaida Garcia-Gimeno  
J Biol Chem. 2007 Feb 2;282(5):3282-92.

### **Artículo 3:**

#### **Dissecting the role of the Glc7 phosphatase regulatory subunit Ypi1 in progression through mitosis**

Maribel Marquina, Ethel Queralt, Antonio Casamayor and Joaquín Ariño  
(in process).



# **1. PRESENTACIÓN**







## **1. PRESENTACIÓN**

La fosfo-defosforilación de residuos serina, treonina y tirosina es uno de los mecanismos de regulación de proteínas más extendido en los seres vivos. Este tipo de reacciones es llevado a cabo de una manera estrictamente coordinada por las proteínas quinasas y fosfatasas. El genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* codifica un número más elevado de Ser/Thr quinasas que de fosfatasas. Para llevar a cabo su función biológica, algunas Ser/Thr fosfatasas han desarrollado una estrategia evolutiva basada en la unión a subunidades reguladoras, que determinan su localización subcelular, actividad y/o especificidad de sustrato.

Una de las Ser/Thr más estudiadas en los últimos años es la fosfatasa de tipo 1 (PP1). Esta proteína, muy conservada evolutivamente, es esencial y está involucrada en multitud de procesos biológicos diferentes, desde el metabolismo de carbohidratos hasta la regulación del ciclo celular. Tanto la ausencia como el exceso de actividad PP1 son perjudiciales para la célula, motivo por el cual esta proteína presenta una regulación extremadamente fina, presentando una multitud de subunidades reguladoras que se encargan de modular su actividad. El estudio de la unión entre diferentes subunidades reguladoras y la fosfatasa han permitido profundizar en el conocimiento de la regulación de la fosfatasa PP1. Además, han permitido identificar, entre otras, una zona presente en muchas de estas subunidades reguladoras, denominado motivo RVxF, que es necesario para la unión con la fosfatasa y que interacciona con una región hidrofóbica de PP1 situada lejos del centro catalítico de la enzima. El genoma de la levadura *S. cerevisiae* contiene únicamente un gen, denominado *GLC7*, que codifica la única isoforma catalítica de la PP1 en éste organismo.

En el momento de iniciar este trabajo nuestro grupo de investigación en colaboración con el laboratorio del Dr. Pascual Sanz (IBV, CSIC, Valencia) acababa de caracterizar al primer inhibidor endógeno de la proteína fosfatasa Glc7, denominándola Ypi1 (*Yeast phosphatase inhibitor-1*). Este estudio demostró que esta proteína interactúa físicamente con Glc7 *in vivo* y es capaz de inhibir su actividad fosfatasa *in vitro*. La delección de *YPI1* es letal, lo que indica un papel importante en la biología celular. Por ello nos planteamos estudiar los efectos fenotípicos atribuibles a un incremento de su expresión, así como la creación de mutantes condicionales (basados tanto en el uso de un degrón como en sistemas de expresión del promotor *tetO* regulable por doxiciclina) con el fin de elucidar el mecanismo por el cual Ypi1 estaría

---

## PRESENTACIÓN

regulando algunas de las funciones esenciales de Glc7. Así, observamos que las células que sobreexpresan *YPI1* exhiben un fenotipo consistente con tolerancia salina, probablemente a través de la regulación de la ATPasa de sodio *ENA1*. Además, la disponibilidad de estos mutantes condicionales de *ypi1* ha permitido demostrar que la función que este regulador desempeña sobre la fosfatasa Glc7 está vinculada con el mantenimiento de la integridad de la pared celular.

Por otro lado, la falta de Ypi1 resulta en un dramático bloqueo en la transición G2/M del ciclo celular, con gemas anormalmente alargadas, y spindles mitóticos cortos, aunque las bases moleculares de estos fenotipos no han sido esclarecidas por completo. Nuestros resultados recientes muestran que la ausencia de Ypi1 provoca una estabilización de la securina Pds1, sugiriendo una activación de los *checkpoints* que regulan la transición G2/M. El bloqueo en G2/M, provocado por la falta de Ypi1 aún persiste en células carentes de *MAD1/MAD2* o *RAD9*, a pesar de que estas células carecen de componentes clave en la señalización de los *checkpoints* del *spindle* y de daño en el DNA, respectivamente. En contraste, la delección de *SWE1*, que codifica una proteína quinasa necesaria para la activación del *checkpoint* de la morfogénesis, permite la salida del bloqueo en G2/M del mutante *ypi1* y recupera la morfología normal de las células, aunque éstas no son capaces de sobrevivir. La ausencia de Ypi1 provoca una estabilización de Swe1, que conlleva una persistente fosforilación de la proteína quinasa Cdc28 en la Tyr19, inhibiendo su actividad y bloqueando la progresión del ciclo celular. Esta secuencia de eventos son los responsables de inducir una activación del *checkpoint* de la morfogénesis. Además, hemos observado que la ausencia de Ypi1 provoca un ensamblaje defectuoso del anillo de septinas en el cuello de la gema, pudiendo ser ésta la causa del bloqueo característico en G2/M descrito en estas células.

Finalmente, no se descarta la posibilidad de que la falta de Ypi1 podría involucrar la activación de *checkpoints* adicionales, ya que la estabilización de la securina Pds1 aún se observa en células *tetO<sub>7</sub>:YPI1 swe1*, a pesar que éstas progresan a través de la mitosis. Por otro lado, la falta de Ypi1 provoca una fuerte disminución en la expresión de *CDC26*, que codifica una subunidad del APC/C. Células carentes de *CDC26* sufren un bloqueo en G2/M, con *spindles* anormalmente cortos, fenotipo idéntico al observado en ausencia de *YPI1*. La sobreexpresión de *CDC26* permite que células carentes de Ypi1 progresen a través de la mitosis, aunque no corrige el fenotipo de letalidad, dejando abierta la posibilidad que Ypi1 podría modular la función de Glc7 sobre el APC.

## **2. INTRODUCCIÓN**



## **2. INTRODUCCION**

### **2.1. FOSFORILACION REVERSIBLE DE PROTEÍNAS**

#### **2.1.1. Importancia de la fosforilación reversible de proteínas**

La fosforilación es una modificación covalente que sufren las proteínas como un proceso posterior a la traducción. Aunque fue descubierta hace casi un centenar de años atrás, la idea de que podría tener un importante papel en la estructura y funcionalidad de las proteínas empezó a surgir desde 1956 cuando Krebs y Fischer demostraron la participación directa de la fosforilación reversible de proteínas en la vía metabólica del glucógeno de un sistema eucariota (Krebs and Fischer, 1956). Estos autores demostraron que la actividad de la glucógeno fosforilasa, la enzima limitante en la glucogenólisis, está regulada por fosforilación reversible. Durante los siguientes diez años fueron descubiertas dos enzimas adicionales involucradas en el metabolismo del glucógeno, la fosforilasa quinasa y la glucógeno sintasa (Krebs *et al.*, 1959). Posteriormente, este campo de estudio evolucionó rápidamente con el desarrollo de dos importantes descubrimientos, el de la proteína quinasa dependiente de AMPc en músculo de conejo (Walsh *et al.*, 1968) y la observación de que las histonas y otras proteínas nucleares de hígado y timo de rata, sufrían procesos de fosfo-defosforilación (Ord and Stocken, 1966); hecho que extendió la aplicabilidad de este mecanismo a proteínas no enzimáticas. En los últimos años, un gran número de fosfoenzimas y fosfoproteínas han sido caracterizadas en una amplia variedad de sistemas eucariotas desde hongos hasta mamíferos y la fosforilación de proteínas ha sido definitivamente reconocida como el más importante proceso dinámico involucrado en la regulación de una multitud de procesos biológicos como son: el metabolismo, crecimiento y diferenciación celular, transcripción y traducción, motilidad, tráfico de orgánulos, transporte a través de la membrana, respuesta hormonal, contracción muscular, fotosíntesis, respuesta oncogénica viral, aprendizaje y memoria, entre otras (Johnson and Barford, 1993; Johnson and O'Reilly, 1996).

---

## INTRODUCCIÓN

Hoy en día, la fosforilación reversible de proteínas se define como la más común de las modificaciones post-traduccionales que juega un importante rol en todas las vías de transducción de señales conocidas. De hecho, se estima que aproximadamente el 30 % de todas las proteínas eucariotas son susceptibles de ser fosforiladas (Barford *et al.*, 1998).

La fosforilación reversible de proteínas es llevada a cabo por la acción opuesta de las proteínas quinasas (PK) y fosfatasas (PP). La fosforilación catalizada por las PK implica la transferencia de un grupo fosfato desde un nucleósido-trifosfato (usualmente ATP) a la cadena de aminoácidos de determinadas proteínas (Figura 1). Este proceso provoca una variación en la carga neta de la proteína y, como consecuencia de ello, un cambio conformacional de la misma que conlleva una alteración de las propiedades funcionales de la proteína, como: incremento o disminución de su actividad biológica, estabilización o inducción de marcadores responsables de su destrucción, activación o inhibición de su movilización a través de los compartimentos subcelulares y/o iniciación o supresión de las interacciones con otras proteínas (Cohen, 2002).

Las proteínas puede ser fosforiladas en residuos de tirosina, serina, treonina, arginina, lisina, aspartato, glutamato e histidina. En células eucariotas ocurre predominantemente en residuos serina y treonina, y en menor grado en residuos tirosina (Krebs, 1985), aunque también se ha documentado la existencia de una proteína histidina quinasa, denominada p32, que fue aislada de *S. cerevisiae* y es capaz de fosforilar *in vitro* a la histona H4 (Huang *et al.*, 1991). En procariotas, sin embargo, el proceso de fosforilación mejor caracterizado es el que ocurre en residuos de aspartato e histidina (Macek *et al.*, 2007; Macek *et al.*, 2008; Soufi *et al.*, 2008), pero también ocurre en residuos de tirosina, serina y treonina (Olsen *et al.*, 2006).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, como sistema eucariota, se ha convertido en un excelente modelo de estudio del papel que desempeña la fosforilación de proteínas en la regulación celular. Muchos procesos intracelulares que se suscitan en este organismo unicelular eucariota han sido conservados a través de la evolución, mostrando cierto paralelismo con una

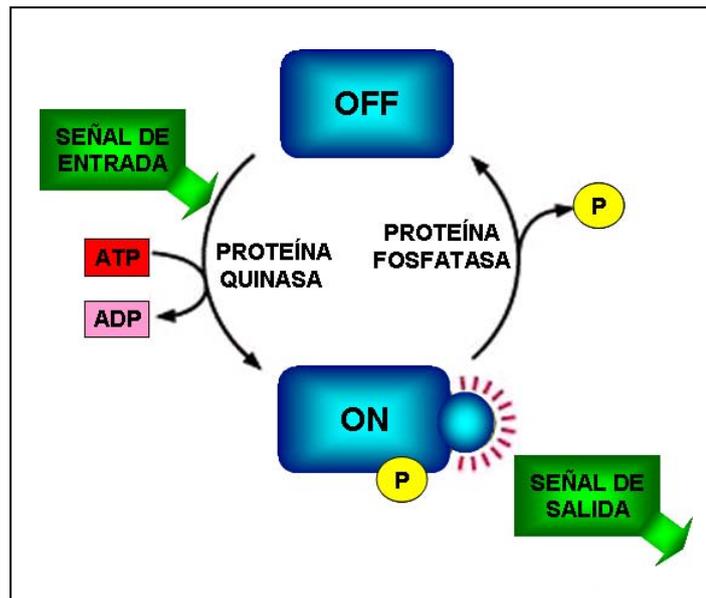


Figura 1: Fosforilación reversible de proteínas

multitud de procesos que se llevan a cabo en eucariotas superiores.

Desde que se completara la secuencia del genoma de la levadura en 1996 (Dujon, 1996; Goffeau *et al.*, 1996), ha sido posible la identificación de todos los genes que codifican las diversas proteínas quinzasas y fosfatasa de este microorganismo, convirtiéndolo en herramienta de referencia fundamental para comprender y comparar los procesos celulares de una gran variedad de organismos multicelulares.

### 2.1.2. Proteínas Quinasas

Las proteínas quinzasas constituyen una de las mayores y más importantes superfamilias de proteínas y son codificadas por cerca del 2 % del genoma en una gran variedad de sistemas eucariotas. Las proteínas quinzasas modifican la actividad, localización y afinidad de una gran parte de proteínas involucradas directamente en procesos celulares, particularmente la transducción de señales. De hecho, 53 distintas subfamilias de proteínas quinzasas están conservadas entre levaduras, nemátodos, insectos y vertebrados, y aproximadamente 91 subfamilias en metazoos (Manning, 2005).

---

## INTRODUCCIÓN

En los sistemas eucariotas las proteínas quinasas han sido clasificadas basándose en su localización, estructura, mecanismo de acción y especificidad de sustrato. Bajo estas premisas, todas las proteínas quinasas de mamífero pertenecen a una sola superfamilia de proteínas homólogas que comprenden tres familias convencionales, definidas por los aminoácidos que fosforilan en la proteína diana: 1) Las tirosin quinasas, que promueven la fosforilación en residuos tirosina, 2) Las Ser/Thr quinasas, que fosforilan residuos serina o treonina y 3) Las quinasas de especificidad dual, que fosforilan a las proteínas diana tanto en residuos serina/treonina como en tirosina (Hanks and Hunter, 1995).

Existe un cuarto grupo de quinasas, las histidin quinasas, que fosforilan residuos de histidina. En procariotas, constituyen el principal sistema de transducción de señales ("*two component system*") (Besant and Attwood, 2005); sin embargo, en eucariotas superiores se conoce poco sobre ellas. Ello es debido a la extrema labilidad de las fosfohistidinas a las condiciones ácidas que se utilizan en el estudio de las Ser/Thr y tirosin quinasas. Al igual que en eucariotas superiores, sólo dos miembros de esta familia de histidin quinasas han sido identificados en levadura (Hunter and Plowman, 1997). Una de éstas es Sln1, una proteína quinasa relacionada con el sistema de transducción de señales ("*two component system*"), comúnmente encontrada en bacterias (Ota and Varshavsky, 1993)

Finalmente, han sido identificadas varias proteínas quinasas, las phosphatidylinositol kinase-related, que difieren estructuralmente de las clásicas familias de quinasas pero funcionan como proteínas quinasas (Hunter, 1995).

El genoma de *S. cerevisiae* codifica aproximadamente 122 proteínas quinasas, de las cuales 115 genes han sido claramente identificadas y constituyen las 3 familias de proteínas quinasas "convencionales" (Hunter and Plowman, 1997). Sin embargo, también existen un número de secuencias relacionadas con las phosphatidylinositol kinase-related, que al igual que su homólogo en mamíferos, también funcionan como proteínas quinasas. Un estudio reciente, sobre la actividad de 119 proteínas quinasas de levadura,

usando tecnología de chips de proteínas, demostró que 27 de ellas eran capaces de fosforilar *in vitro*, residuos de tirosina (Zhu *et al.*, 2000).

**2.1.3. Proteínas Fosfatasa**

Las proteínas fosfatasa, al igual que las quinasas, pertenecen a una importante superfamilia de proteínas que se encuentran estructuralmente definidas por su secuencia de aminoácidos, dominio catalítico y especificidad por sustrato. Estas proteínas, se clasifican en 5 grandes familias: 1) Las Ser/Thr fosfatasa, 2) Las tirosin fosfatasa y las fosfatasa de actividad dual 3) Las fosfatasa de bajo peso molecular, 4) Las histidin fosfatasa y 5) Las fosfatasa D-X-D-X-(T/V) (Tabla 1) (Stark, 2004).

Familia	Especificidad	Número	Nombre
PPP (Phosphoprotein Phosphatases)	Ser/Thr	12	<b>PP1</b> : Glc7 <b>PP2A</b> : Pph21, Pph22 <b>PP2B</b> : Cna1, Cna2 <b>Otras</b> : Ppg1, Pph3, Ppq1, Ppt1, Ppz1, Ppz2, Sit4
PPM (Metal-ion-dependent Protein Phosphatases)	Ser/Thr	7	<b>PP2C</b> : Ptc1, Ptc2, Ptc3, Ptc4,Ptc5, Ptc6, Ptc7
PTP (Protein Tyrosine Phosphatases)	Tirosina y de especificidad dual (Ser/Thr)	12	Cdc14, Mih1, Msg5, Pps1, Ptp1,Ptp2, Ptp3, Sdp1, Siw14, Tep1, Yvh1, Ymr1
Fosfatasa de bajo peso molecular	Tirosina	1	Ltp1
PHP (Protein Histidine phosphatases)	Histidina	?	?
DXDX(T/V)	Ser (Thr?)	3	Fcp1, Psr1, Psr2

**Tabla 1: Clasificación de las proteínas fosfatasa en *S. cerevisiae*** (Actualizado de Stark, 2004)

Las Ser/Thr fosfatasa fueron inicialmente clasificadas de acuerdo a sus propiedades bioquímicas en dos grandes grupos: Las fosfatasa de tipo 1 y las fosfatasa de tipo 2 (Ingebritsen and Cohen, 1983a). Las fosfatasa de tipo 1 desfosforilan preferentemente la subunidad β de la fosforilasa quinasa, son sensibles a la actividad de polipéptidos inhibidores (inhibidor 1 y 2) y dependen

---

## INTRODUCCIÓN

de la presencia de  $Mn^{2+}$  para catalizar *in vitro* la reacción de desfosforilación. Las fosfatasas de tipo 2, por otro lado, actúan sobre la subunidad  $\alpha$  y no responden a estos inhibidores. Éstas a su vez, fueron sub-divididas en tres grupos en función de la necesidad de cationes divalentes: PP2A, que no requieren de iones, PP2B (también denominada Calcineurina) que depende de  $Ca^{2+}$  y calmodulina, y PP2C que dependen de la presencia de  $Mg^{2+}$  para desarrollar plenamente su actividad (Ingebritsen and Cohen, 1983a). Sin embargo, en las pasadas dos décadas, el descubrimiento de diferencias estructurales entre los miembros de esta familia ha permitido la clasificación de las Ser/Thr fosfatasas en dos sub-familias: Las PPP (*PhosphoProtein Phosphatases*) y las PPM (*Metal-ion-dependent Protein Phosphatases*). Las PPP están constituidas por las fosfatasas PP1, PP2A y PP2B y forman el grupo de fosfatasas más ampliamente estudiadas y representadas en los organismos eucariotas, mientras que las PPM comprenden a las fosfatasas PP2C (Cohen and Cohen, 1989).

El genoma de la levadura *S. cerevisiae* codifica un nuevo grupo de proteínas, dentro de la familia de las PPP, formado por una serie de miembros que, a pesar de estar relacionados estructuralmente con las proteínas de tipo 1 y 2A, presentan aspectos diferenciales en cuanto a su función. Este grupo se encuentran formado por las fosfatasas Sit4/Pph1, Pph3, Ppg1, muy similares estructuralmente a PP2A, y las fosfatasas Ppt1, Ppq1/Sal6, Ppz1 y Ppz2, similares a PP1 (Arino, 2002).

Otra gran familia de proteínas fosfatasas son las tirosin fosfatasas y las fosfatasas de actividad dual (PTPs), que constituyen una familia de polipéptidos completamente diferente de las PPP y juegan importantes roles en el control de la actividad de las MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) de levaduras y mamíferos (Hunter, 1995).

Las fosfatasas de bajo peso molecular constituyen un cuarto grupo de enzimas citosólicas de aproximadamente 18 KDa que están ampliamente expresadas en tejidos de mamíferos y se cree que presentan cierta convergencia evolutiva con la familia PTP (Archambault *et al.*, 1998).

Como hemos mencionado anteriormente, en eucariotas, existe muy poca información sobre la fosfo-defosforilación en residuos de histidina, pero su descubrimiento podría tener gran relevancia en el contexto de la transducción de señales neuronales puesto que la única histidin fosfatasa que ha sido caracterizada fue descubierta en grandes cantidades en tejido cerebral y neuronas de mamíferos (Ek *et al.*, 2002; Klumpp *et al.*, 2002). En un esfuerzo por identificar a la histidin fosfatasa de levadura, Kim y colaboradores demostraron que las proteínas fosfatasas de tipo 1, 2A y 2C presentan actividad fosfatasa en residuos Ser/Thr y en residuos histidina, como es el caso de la fosfatasa que defosforila a la Histona 4 (Kim *et al.*, 1993).

Existe un quinto grupo de fosfatasas, las fosfatasas que presentan en su dominio catalítico el motivo D-X-D-X-(T/V). Éstas incluyen a las fosfatasas Fcp1p, Psr1p y Psr2p y constituyen el grupo de fosfatasas más recientemente caracterizadas con representantes tanto en levaduras como en mamíferos, cuya única función conocida es la de defosforilar la región carboxi-terminal de la RNA polimerasa II (Stark, 2004).

En general, existen cuatro veces más proteínas quinasas que fosfatasas (Stark, 2004). El genoma de mamíferos codifica aproximadamente el mismo número de proteínas tirosin quinasas y proteínas tirosin fosfatasas (aproximadamente 100 en cada grupo). Sin embargo, existe una gran diferencia entre el número de proteínas Ser/Thr quinasas (~ 400) y proteínas Ser/Thr fosfatasas (~ 25). Por este motivo, para llevar a cabo su función, las Ser/Thr fosfatasas han desarrollado una estrategia evolutiva basada en la unión a subunidades reguladoras, que determinan la actividad específica de la enzima y la especificidad por el sustrato (Ceulemans *et al.*, 2002a). Así, la misma subunidad catalítica puede unirse a diferentes subunidades reguladores y ejercer un amplio rango de funciones específicas, solventando de esta manera el desequilibrio existente en el número de proteínas quinasas y fosfatasas.

## **2.2. SER/THR FOSFATASAS**

### **2.2.1. La Ser/Thr Fosfatasa de tipo 1**

---

## INTRODUCCIÓN

Dentro de la subfamilia de las fosfatasas PPP, la proteína fosfatasa de tipo 1 (PP1) fue una de las primeras en ser descubierta y estudiada en detalle (Ingebritsen and Cohen, 1983b). Se encuentra ampliamente distribuída a través del vasto mundo eucariota y constituye una de las proteínas más conservadas evolutivamente (Tabla 2).

El número de genes que codifican a la PP1 varían desde 1 en *S. cerevisiae* hasta 8 en *Arabidopsis thaliana*. Un análisis filogenético muestra que la evolución de PP1 incluye tanto eventos de divergencia como de duplicación genética. La duplicación genética parece haber ocurrido como un evento independiente tanto en plantas como en animales lo que sugiere que la diversificación de PP1 podría haber sido de gran importancia en la evolución y desarrollo de estos reinos (Lin *et al.*, 1999).

En mamíferos, la subunidad catalítica de la PP1 (PP1c) está codificada por 4 genes, conocidos con el nombre *PP1 $\alpha$* , *PP1 $\beta$*  (también designada como *PP1 $\delta$* ), *PP1 $\gamma$ 1* y *PP1 $\gamma$ 2*, existiendo un procesamiento diferencial entre estas dos últimas (Cohen and Cohen, 1989; Dombradi *et al.*, 1990). Todas las isoformas son expresadas con ubicuidad, excepto la isoforma *PP1 $\gamma$ 2* que se encuentra enriquecida en los testículos (Andreassen *et al.*, 1998). En humanos existe una variante de *PP1 $\alpha$* , la *PP1 $\alpha$ 2* (Durfee *et al.*, 1993), que es similar a la isoforma *PP1 $\alpha$* , indicando también un *splicing* diferencial entre ellas. En *S. cerevisiae*, en cambio, esta enzima es el producto de un sólo gen, denominado *GLC7/DIS2S1* (Ohkura *et al.*, 1989; Clotet *et al.*, 1991; Feng *et al.*, 1991). Más significativo que el número de isoformas es la presencia, en la mayoría de organismos, de multitud de subunidades reguladoras. En eucariotas superiores se han descrito más de 60 proteínas que de alguna manera pueden interaccionar con la subunidad catalítica de PP1 (Gibbons *et al.*, 2007). Para información más detallada ver lista publicada en la página web <http://pp1signature.pasteur.fr>. En la levadura *S. cerevisiae* existe un número menor, pero igualmente significativo, hasta la actualidad se han descrito más de una veintena de proteínas que interaccionan con Glc7 y las funciones que éstas desempeñan (ver más adelante). PP1 participa en multitud de funciones celulares, desde la regulación del metabolismo del glucógeno, la fisiología muscular, el procesamiento del

Taxón	Número de isoformas	Nombre
<b>PROTISTA</b>		
<i>Paramecium tetraurelia</i>	2	PtPP1-1, PtPP1-2
<i>Trypanosoma brucei</i>	2	TbPP1-1, TbPP1-2
<b>MICOTA O FUNGI</b>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	GLC7
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	2	DIS2, SDS21
<i>Emericella nidulans</i>	1	BimG
<b>PLANTAS</b>		
<b>Algas</b>		
<i>Acetabularia cliftonii</i>	2	AcPP1, AcPP1-2
<i>Gonyaulax polyedra</i>	1	GpPP1
<b>Plantas</b>		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	8	TOPP1, TOPP2, TOPP3, TOPP4, TOPP5, TOPP6, TOPP7, TOPP8
<i>Nicotiana tabacum</i> (tabaco)	3	NPP1, NPP2, NPP3
<i>Medicago varua</i> (alfalfa)	1	PP1Ms
<i>Phaseolus vulgaris</i> (judía)	1	PvPP1
<i>Oryza sativa</i> (arroz)	1	OsPP1
<i>Zea mays</i> (maíz)	1	ZmPP1
<b>ANIMALES</b>		
<b>Nemátodos</b>		
<i>Caenorhabditis elegans</i>	1	CePP1
<b>Insectos</b>		
<i>Drosophila melanogaster</i> (mosca de la fruta)	4	PP1(96A), PP1(87B), PP1(9C), PP1(13C)
<b>Anfibios</b>		
<i>Xenopus laevis</i> (rana)	1	X1PP1 $\gamma$ 1
<b>Aves</b>		
<i>Gallus gallus</i> (pollo)	1	GpPP1 $\beta$
<b>Mamíferos</b>		
<i>Mus musculus</i> (ratón)	2	DIS2M1, DIS2M2
<i>Rattus norvegicus</i> (rata)	3	RnPP1 $\alpha$ , RnPP1 $\beta$ , RnPP1 $\gamma$ 1
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (conejo)	2	OcPP1 $\alpha$ , OcPP1 $\beta$
<i>Homo sapiens</i> (hombre)	3	HsPP1 $\alpha$ , HsPP1 $\beta$ , HsPP1 $\gamma$

**Tabla 2: Número de isoformas de PP1 entre especies de diferentes reinos**

(Adaptado de Lin, *et al*, 1999)

RNA, la síntesis proteica, la transmisión de señales nerviosas, la modulación del aprendizaje y la memoria, hasta la inducción de la apoptosis y el control de diversos *checkpoints* y acontecimientos que se realizan en las diferentes fases del ciclo celular (para una revisión más detallada ver (Ceulemans and Bollen, 2004). Tanto la falta como el exceso de actividad PP1 son perjudiciales para la célula. Por este motivo, y para poder llevar a cabo todas sus funciones, la subunidad catalítica requiere la unión de diferentes proteínas reguladoras, que

---

## INTRODUCCIÓN

son las responsables, no sólo de la localización subcelular del complejo, sino también de la especificidad por el sustrato. Ello ha permitido a algunos autores clasificar estas subunidades en diferentes grupos, atendiendo al tipo de regulación que ejercen sobre la isoforma catalítica. De esta manera, M. Bollen (Bollen, 2001) diferencia entre 1) subunidades moduladoras de la actividad (como los inhibidores 1 y 2, mencionados anteriormente); 2) proteínas *targeting* (que se encargan de la localización de la subunidad catalítica); 3) subunidades sustrato (que, a parte de ser reguladoras serían los sustratos de la fosfatasa) y un cuarto grupo de péptidos de función aún no determinada. Para este autor, la función de la fosfatasa vendría dada en cada momento por la unión de la subunidad catalítica a una subunidad reguladora. La combinación de diferentes proteínas reguladoras, cada una con una capacidad específica de interacción - posiblemente regulable por fosfo-defosforilación, hormonas y metabolitos - con la subunidad catalítica, sería la responsable de la localización subcelular y la función concreta del complejo en cada situación particular.

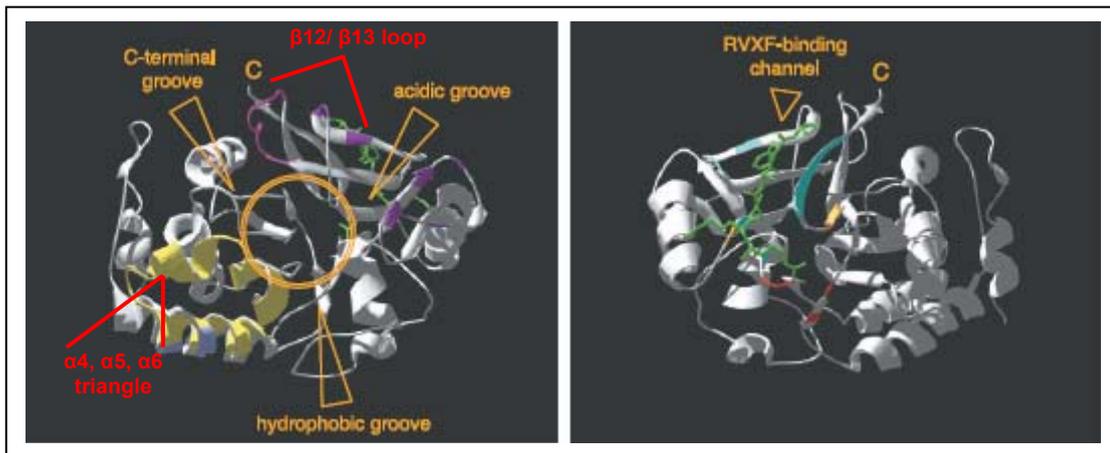
Por ser subunidades moduladoras de la actividad, es importante destacar el caso de los inhibidores 1, 2 y *DARPP-32*. En estos tres casos se trata de proteínas termoestables, que interaccionan físicamente e inhiben a la subunidad catalítica de PP1. Lo más remarcable es que su actividad puede ser modulada por fosfo-defosforilación. De hecho, la fosforilación de la Thr<sup>35</sup> y la Ser<sup>67</sup> del inhibidor-1 y de la Thr<sup>34</sup> de *DARPP-32* (homólogo del I-1 que se encuentra principalmente en tejido cerebral) por la PK dependiente de AMPc (PKA) los convierte en potentes inhibidores de la fosfatasa de tipo 1 (Shenolikar, 1994; Endo *et al.*, 1996). Por el contrario, la asociación del inhibidor-2, defosforilado, con la PP1c da lugar a un complejo inactivo que únicamente puede ser reactivado mediante fosforilación del residuo Thr<sup>72</sup> por la glucógeno sintasa quinasa (GSK3) y/o el residuo Ser<sup>86</sup> por la caseína quinasa II (CKII) (Connor *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000). En estos mecanismos de inhibición podrían intervenir diferentes regiones del inhibidor, que interaccionarían con zonas específicas de la fosfatasa, con una afinidad que se podría ver afectada por la fosforilación de residuos concretos como los que hemos mencionado (Huang *et al.*, 1999).

### 2.2.2. Mecanismos de interacción de PP1c con subunidades reguladoras. Motivos de unión.

Las subunidades catalíticas de PP1 no se encuentran libres en la célula sino que se encuentran asociadas a diferentes proteínas reguladoras formando distintas holoenzimas multiméricas (Ceulemans and Bollen, 2004). El estudio de las proteínas reguladoras  $G_M$ ,  $G_L$  y  $M_{110}$ , involucradas en el metabolismo del glucógeno en mamíferos, demostró que, *in vitro*, la presencia de una subunidad desplazaba a las otras del complejo proteico. Esta evidencia experimental apuntaba a que la unión de éstas a la PP1c era mutuamente exclusiva y que, por tanto, todas estas subunidades interaccionaban de la misma manera con la PP1c a través de secuencias parcial o totalmente superpuestas. La comparación de las secuencias de  $G_M$  y  $G_L$  permitió identificar una zona altamente conservada constituida por 13 aminoácidos de  $G_M$  que era capaz de unirse a la subunidad catalítica (Johnson *et al.*, 1997). La resolución tridimensional del cristal formado por la PP1c unida a un péptido de 13 residuos derivado del complejo  $G_M$  demostró la importancia de una pequeña secuencia en la interacción de  $G_M$  con la subunidad catalítica, que se denominó motivo **RVxF** (Egloff *et al.*, 1997). Esta secuencia, inicialmente de sólo 4 aminoácidos, se acoplaba a un canal hidrofóbico en la superficie de la fosfatasa, situado muy lejos del centro catalítico de la enzima (Figura 2) (Egloff *et al.*, 1997). Estudios realizados en paralelo con bibliotecas de péptidos identificaron las secuencias **VxF** y **VxW** precedidas por residuos básicos (especialmente una arginina o una lisina) como motivo de unión a PP1c (Zhao and Lee, 1997). Multitud de trabajos llevados a cabo, tanto con proteínas de mamíferos como de levaduras han ayudado a definir la secuencia consenso de este importante motivo de unión, que muchas veces se encuentra degenerado, pero que aparece en la mayoría de las subunidades reguladoras conocidas de mamífero (Bollen, 2001) así como de levadura.

Wakula y colaboradores consideran que el motivo **RVxF** estaría formado por la secuencia **[RK]-x<sub>(0-1)</sub>-[VI]-{P}-[FW]**, donde **x** puede estar ausente o ser cualquier residuo y **{P}** denota cualquier residuo excepto prolina (Wakula *et al.*, 2003). Más recientemente, Meiselbach y colaboradores propusieron una región

## INTRODUCCIÓN



**Figura 2: Estructura tridimensional de la PP1 $\gamma$  unida a un péptido conteniendo el motivo RVxF. A)** Vista frontal de PP1 con el sitio catalítico (círculo) y los tres surcos que emanan del dominio catalítico. La región pintada de magenta representa el dominio  $\beta$ 12/  $\beta$ 13 *loop* y la región amarilla el dominio  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 5,  $\alpha$ 6 *triangle*. **B)** Vista dorsal de la misma estructura. Las líneas verdes en forma de espiral representan el péptido conteniendo el motivo **RVxF** (Imagen tomada de Ceulemans and Bollen, 2004)

más restrictiva como motivo de unión a PP1, la secuencia consenso **[HKR][ACHKMNQRSRV][V][CHKNQRST][FW]** donde: las posiciones 1, 2, y 4 estarían formadas, preferentemente, por aminoácidos con carga positiva y/o polares; mientras que las posiciones 3 y 5 estarían formadas, específicamente, por el aminoácido hidrofóbico valina y los aminoácidos aromáticos apolares: fenilalanina o triptófano, respectivamente. Además, consideran que la posición 1 es el punto clave de interacción de PP1 con sus proteínas reguladoras porque la unión en esta posición se realiza a través de puentes salinos y puentes de hidrógeno que proporcionan una estabilidad a la dinámica de la proteína (Meiselbach *et al.*, 2006).

Atendiendo a esta definición, el motivo **RVxF** se encontraría en poco más del 10% de todas las proteínas humanas y en un número similar en otros organismos eucariotas (Cohen, 2002), la mayoría de los cuales, obviamente, no interaccionan con la PP1c. Para poder llevar a cabo su función, es necesario que este residuo quede expuesto en la superficie de la subunidad reguladora. Por lo tanto, para cada proteína concreta que contenga la secuencia consenso, o una variación de ésta, es necesario determinar si ésta juega un rol determinante en la función de la proteína. Con respecto a ello, ha

sido descrito que la sola mutación de residuos hidrofóbicos (**VI**) y/o aromáticos (**FW**) del motivo es suficiente para disminuir o inhibir totalmente la interacción con la enzima (Wu and Tatchell, 2001).

La unión del motivo **RVxF** no está asociada a cambios conformacionales mayores de la subunidad catalítica y tampoco provoca efectos significativos en su actividad (Egloff *et al.*, 1995). Sin embargo, se ha reportado que la asociación de PP1 con algunas subunidades reguladoras requiere contactos adicionales a parte del motivo **RVxF** y que este motivo sirve de anclaje inicial de unión con PP1 y promueve, algunas veces cooperativamente, la unión de sitios secundarios, los cuales frecuentemente se unen con menor afinidad pero afectan su actividad y especificidad por el sustrato (Wakula *et al.*, 2003).

Se ha comprobado que en algunas subunidades reguladoras el motivo **RVxF** va precedido por estructuras denominadas repeticiones de anquirinas que formarían una especie de “mano” con “dedos” y que estarían involucrados en la interacción con la PP1c facilitando la unión mediada por el motivo **RVxF** (Wu and Tatchell, 2001).

Algunos autores apuntan la existencia de un segundo motivo de interacción con PP1 que sería el siguiente: F-x-x-[RK]-x-[RK] (para más información ver la página web: <http://pp1signature.pasteur.fr>). El *loop* β12/ β13 constituye un tercer motivo de interacción de PP1 con sus subunidades reguladoras siendo esencial para la inhibición de PP1 por toxinas (ácido okadaico) y proteínas inhibidoras (Inhibidor-1, DARP32, inhibidor-2 y NIPP1) (Connor *et al.*, 1999). Otro motivo de interacción lo forma la región triangular delimitada por las hélices α4, α5, α6, cerca de la región amino-terminal de PP1, que ha sido identificado como el principal sitio de interacción con Sds22 (Figura 2) (Ceulemans *et al.*, 2002b).

Finalmente, en el inhibidor-2 ha sido identificado un sitio de interacción con PP1 en el dominio conservado amino-terminal K-[GS]-I-L-K, muy cerca del motivo **RVxF** (Huang *et al.*, 1999).

Aunque muy poco estudiadas, estas interacciones adicionales ayudarían no sólo a estabilizar la unión con PP1, mediada por el motivo **RVxF**, sino que

---

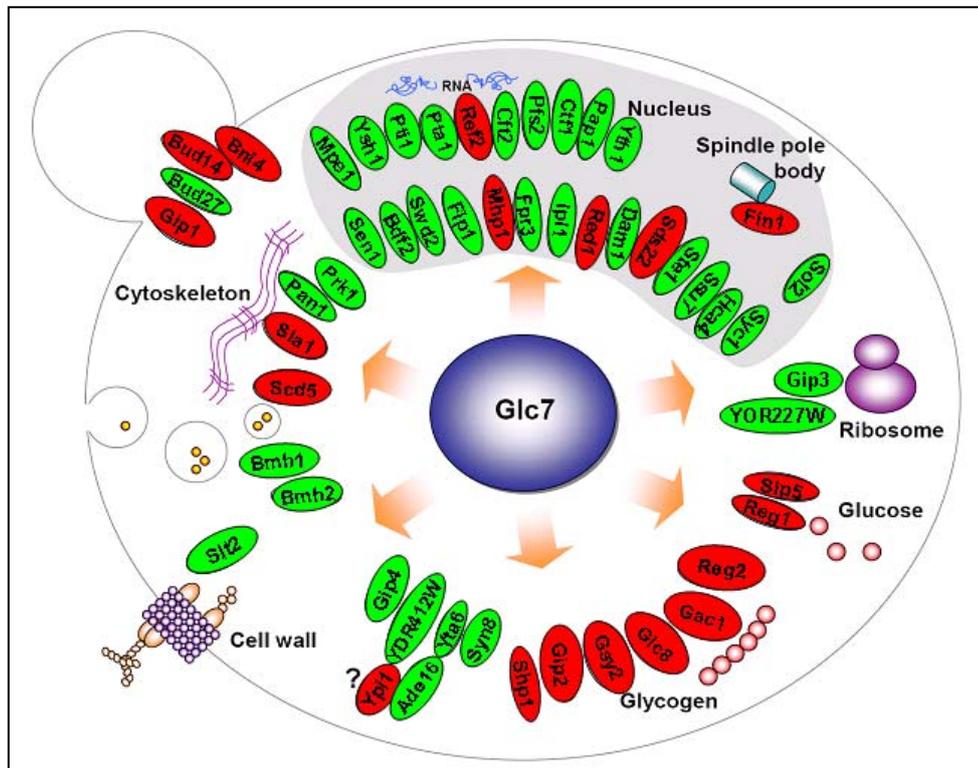
## INTRODUCCIÓN

también podrían modular su actividad y especificidad (Bollen, 2001; Cohen, 2002).

### 2.3. GLC7, LA SER/THR FOSFATASA DE TIPO 1 DE *S. cerevisiae*

A diferencia de lo que ocurre en los mamíferos, el genoma de la levadura contiene únicamente un gen, denominado *GLC7*, que codifica la única isoforma catalítica de la PP1 en éste organismo (Feng *et al.*, 1991; Clotet *et al.*, 1991). Este gen esencial, conocido también con el nombre de *DIS2S1* o *CID1* codifica una proteína de 312 aminoácidos con una masa molecular de 36 KDa, que presenta un alto grado de similitud con las isoformas de mamíferos y que, de forma análoga a lo que pasa en éstas, desarrolla multitud de funciones en la levadura. De la misma manera que su homólogo en mamíferos, la función de Glc7 está regulada por la interacción de la subunidad catalítica con diferentes subunidades reguladoras que afectan su especificidad de sustrato y/o su localización subcelular (Figura 3) (Cohen, 2002). En el momento de iniciar este trabajo, no se conocía ninguna subunidad que actuara como inhibidor de Glc7. El genoma de *S. cerevisiae* codifica una proteína estructuralmente relacionada con el inhibidor-2 de mamíferos, el gen *GLC8* (Tung *et al.*, 1995) que, no obstante, funciona más bien como un activador que como un inhibidor de Glc7 (Nigavekar *et al.*, 2002) mientras que no existe un homólogo del inhibidor-1 en levaduras (Nigavekar *et al.*, 2002). Igual que ocurre en mamíferos, estas subunidades también suelen contener uno (o más) motivos RVxF imprescindibles para la unión con la subunidad catalítica y su mutación tiene efectos drásticos en la función reguladora de la proteína. La tabla 3 muestra una recopilación de todas las proteínas que interaccionan con Glc7.

Glc7 fue identificada inicialmente como un gen relacionado con el metabolismo de carbohidratos, dado el papel que desempeña en el acúmulo de glucógeno intracelular (Ohkura *et al.*, 1989; Clotet *et al.*, 1991; Feng *et al.*, 1991; Hardy and Roach, 1993). Igual como ocurre en mamíferos, la PP1c de levadura es la responsable de activar mediante defosforilación a la glucógeno sintasa, cuya principal isoforma en *S. cerevisiae* es codificada por el gen *GSY2*. Este proceso parece ser regulado por la unión de la fosfatasa a la subunidad



**Figura 3. Interacción de Glc7 con subunidades reguladoras.** Representación esquemática de la interacción de Glc7 con diferentes proteínas y los específicos compartimentos donde fueron localizadas. Las subunidades reguladoras de Glc7 están marcadas de color rojo (actualizado de [www.thebiogrid.org](http://www.thebiogrid.org))

Gac1 que contiene una zona de unión a la glucógeno sintasa además del motivo **RVxF** necesario para la interacción con Glc7 (Wu *et al.*, 2001).

Se han descrito multitud de funciones en las que la defosforilación inducida por Glc7 tiene un papel más o menos relevante. La actividad fosfatasa de Glc7 es importante en el fenómeno de represión por glucosa, proceso regulado por subunidades como Reg1 y Reg2 (Tu and Carlson, 1995; Sanz *et al.*, 2000). Diferentes estudios han puesto en evidencia que Glc7 es imprescindible en la mitosis, concretamente en la progresión del ciclo entre las fases G2 a M (Hisamoto *et al.*, 1994; Bloecher and Tatchell, 1999) pero también durante el desarrollo de la meiosis (Tu *et al.*, 1996). Glc7 desempeña un rol relevante en la regulación del funcionamiento del citoesqueleto. Así, es responsable de la formación del cinetocoro y la falta de actividad PP1 activa el *checkpoint* que controla la formación del *spindle* (cinetocoro/microtúbulos) (Bloecher and Tatchell, 1999), en concreto, los complejos formados por Glc7 y

## INTRODUCCIÓN

**Tabla 3. Proteínas que interactúan con Glc7 y funciones que regulan en la levadura *S. cerevisiae*.** CPF = Cleavage and Polyadenylation Factor, MT = Microtubule, SPB = Spindle Pole Body, SNARE = Soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) Attachment Receptor (información actualizada de [www.thebiogrid.org](http://www.thebiogrid.org)).

FUNCIÓN	PROTEÍNA	GEN	DESCRIPCIÓN
<b>Citoesqueleto y secreción</b>	Sla1	YBL007c	Requerida para el ensamblaje del esqueleto cortical de actina y endocitosis.
	Scd5	YOR329c	Organización cortical de actina y Endocitosis.
<b>Polaridad celular</b>	Bud 14	YAR014c	Selección del sitio de emergencia de la gema, regulador cortical de la proteína dineína.
	Bni4	YNL233w	Requerida para la localización de la quitina sintasa en el cuello de la gema.
<b>Metabolismo del glucógeno</b>	Gac1	YLR258w	Metabolismo del glucógeno. Nexo de unión entre Glc7 y la glucógeno sintasa Gsy2.
	Glc8	YMR311c	Inhibidor/activador de Glc7 involucrado en el metabolismo del glucógeno.
	Shp1	YBL058w	Involucrado en el metabolismo del Glucógeno.
	Gip2	YER054c	Involucrado en el metabolismo del Glucógeno.
	Pig1	YLR273c	Nexo de unión entre Glc7 y la glucógeno sintasa Gsy2.
	Pig2	YIL045w	Nexo de unión entre Glc7 y la glucógeno sintasa Gsy2.
<b>Represión por Glucosa</b>	Reg1	YDR028c	Regulador negativo de genes reprimibles por glucosa.
	Reg2	YBR050c	Involucrado en la regulación de genes reprimibles por glucosa.
	Sip5	YMR140w	Involucrado en la regulación de genes reprimibles por glucosa.
<b>Mitosis y meiosis</b>	Sds22	YKL193c	Desfosforilación de sustratos nucleares requeridos para la segregación de los cromosomas.
	Glc8	YMR311c	inhibidor/activador de Glc7 involucrado en la segregación de los cromosomas.
	Gip1	YBR045c	Formación de la pared de la espora y organización del esqueleto de septinas Requerido para la expresión de genes involucrados en la meiosis tardía.

Continuación de la tabla 3

FUNCION	PROTEÍNA	GEN	DESCRIPCIÓN
	Shp1	YBL058w	Mitosis. Diferenciación en meiosis.
	Red1	YLR263w	Requerida para la segregación de los cromosomas durante la primera división meiótica.
	Mhp1	YJL042w	Proteína asociada a los MT, involucrada en el ensamblaje y estabilización de los MT.
	Fin1	YDR130c	Proteína relacionada con el SPB, forma filamentos específicos del ciclo celular entre la célula madre y la célula hija.
<b>Procesamiento de RNA</b>	Ref2	YDR195w	Subunidad de CPF, requerida para el anclaje del mRNA antes de la poliadenilación.
<b>Función desconocida</b>	Ypi1	YFR003c	Posible inhibidor de Glc7.

las subunidades reguladoras Glc8 y Sds22 modulan la correcta segregación de las cromátidas hermanas que se efectúa en la anafase (Tung *et al.*, 1995; Peggie *et al.*, 2002). Por otro lado, la unión de la proteína Bni4 a Glc7 es responsable de la localización de la quitina sintasa en el cuello de la gema (Kozubowski *et al.*, 2003); el complejo formado por Scd5 y Glc7 es importante para la regulación de la endocitosis y la reorganización del citoesqueleto de actina (Chang *et al.*, 2002); la unión de Gip2 y Glc7 regula la organización de las septinas y la formación de la pared del asca durante el proceso de esporulación (Tachikawa *et al.*, 2001); así mismo, controla el crecimiento filamentoso y polarizado y la respuesta a feromonas mediante su unión a la subunidad conocida como Bud14 (Cullen and Sprague, 2002).

Finalmente, y gracias al estudio del fenotipo de diferentes alelos mutantes de Glc7, se ha puesto de manifiesto que esta proteína también puede participar en el mantenimiento de la integridad celular (Andrews and Stark, 2000) y en la regulación de la homeostasis iónica de la levadura (Williams-Hart *et al.*, 2002), aunque aún no se conocen las subunidades que regulan estas funciones de la fosfatasa.

---

## INTRODUCCIÓN

### 2.3.1. Las proteínas Ypi1 y Sds22 como subunidades reguladoras esenciales de Glc7

#### 2.3.1.1. Ypi1

Hace algunos años, en un cribado realizado mediante la técnica de doble híbrido de una biblioteca de cDNA de cerebro humano se identificó un nuevo inhibidor de PP1, denominado inhibidor-3, que presenta un 21% de identidad con una proteína de levadura de función desconocida hasta ése momento y codificada por el gen *YFR003c* (Zhang *et al.*, 1998). Poco antes, por análisis de doble híbrido se había demostrado que la proteína Yfr003c interactúa con Glc7 (Tu *et al.*, 1996). Por lo tanto, esta proteína podría representar el primer inhibidor endógeno de la actividad fosfatasa de Glc7, razón por la cual nuestro grupo se lanzó a clarificar su función biológica. En el momento de iniciar este trabajo se acababa de caracterizar a Yfr003c como el primer inhibidor endógeno *in vivo* de la fosfatasa Glc7, motivo por el cual se le dió el nombre de Ypi1 (*Yeast Phosphatase Inhibitor-1*) (Garcia-Gimeno *et al.*, 2003). Este estudio confirmó que la proteína es esencial y que interactúa físicamente con Glc7 *in vivo*, además de inhibir su actividad fosfatasa *in vitro*.

Un análisis informático de la proteína utilizando un BLAST reveló que, tanto Ypi1 como el inhibidor-3 humano presentan una gran similitud a un grupo de proteínas de pequeño tamaño, ricas en residuos hidrofílicos y poseedoras del característico motivo de unión a PP1 (**VxWF**). El árbol filogenético y el alineamiento de secuencias (creado con el software Genebee, disponible en [www.genebee.msu.su](http://www.genebee.msu.su)) (ver figuras 4A y 4B, respectivamente) muestran como éstas podrían formar una nueva familia de proteínas que se encuentran muy conservadas evolutivamente con homólogos en levaduras, insectos, plantas, helmintos y mamíferos.

Como hemos mencionado anteriormente, el motivo **RVxF** es una región que tiene un papel preponderante en la interacción de la subunidad reguladora y la fosfatasa (Egloff *et al.*, 1997). La región que se muestra en el alineamiento de secuencias (Figura 4B), es una de las más conservadas en todas las proteínas de esta hipotética familia. Precisamente Ypi1 presenta una región compatible con el mencionado motivo: <sup>48</sup>**RHNVRWEE**<sup>55</sup>; regiones similares se



---

## INTRODUCCIÓN

triptófano (**W**) (como es el caso de Ypi1) (Garcia-Gimeno *et al.*, 2003). Se ha demostrado que la mutación del residuo **FW** (habitualmente a una alanina) es capaz de reducir considerablemente, si no de eliminar del todo, la interacción entre la proteína reguladora y la fosfatasa Glc7 (Wu *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2002; Kozubowski *et al.*, 2003; Nedeá *et al.*, 2008). De hecho, una mutación en el triptófano 53 de la proteína Ypi1 no sólo disminuye significativamente su capacidad de unión a Glc7 sino que además genera una pérdida total de su actividad inhibidora sobre esta proteína. Sin embargo, aun se desconoce el mecanismo por el cual Ypi1 inhibe la actividad de Glc7 (Garcia-Gimeno *et al.*, 2003).

El gen *YPI1* codifica una pequeña proteína de 155 aminoácidos con una masa molecular de 18 KDa y muy rica en residuos hidrofílicos (19,4% Asp+Glu; 14,8% Ser+Thr; 16,8 Lys+Arg). Esta proteína, muestra una movilidad aberrante en SDS-PAGE (migra como una proteína de aproximadamente 30 KDa) y es termoestable. Todas estas propiedades son muy similares a las descritas para algunas de las proteínas inhibidoras de PP1c de mamíferos (Cohen, 2002). Las propiedades reguladoras de muchos inhibidores de PP1 están moduladas por fosforilación. Así, el inhibidor-1 y *DARP32* se regulan mediante fosforilación por la proteína quinasa A (PKA). Ypi1 también contiene dos posibles sitios de fosforilación por PKA,  $KKKT_{68}$  y  $KKRS_{131}$  (Zhang *et al.*, 1998), lo que da pie a sospechar una posible regulación de su capacidad inhibitoria por fosforilación. *YPI1* es un gen esencial, lo que sugiere una relevante función en la fisiología de la levadura (Garcia-Gimeno *et al.*, 2003). Desafortunadamente, este hecho impide la realización de ensayos dirigidos a investigar su función por simple delección del gen y la posterior evaluación de los fenotipos asociados. Sin embargo, existen estrategias alternativas que permiten la caracterización funcional mediante la creación de mutantes condicionales o la monitorización de fenotipos por sobreexpresión de la proteína. Así, estudios realizados recientemente, evidencian que la sobreexpresión de *YPI1* agrava el defecto lítico de un mutante *sft2*, rescata el lento crecimiento de un mutante condicional *sit4 tetO::HAL3* en presencia de doxiciclina, mejora el crecimiento de una cepa *sit4* a 37 °C y acelera la salida de un bloqueo en fase G<sub>1</sub> de

células *sit4*. Finalmente, se demostró que las levaduras que sobreexpresan *YPI1* acumulan menos glucógeno intracelular (Garcia-Gimeno *et al.*, 2003). Todas estas observaciones confirman el papel inhibitor de Ypi1 sobre Glc7, afectando el control de la integridad celular, progresión del ciclo celular y metabolismo de glucógeno, entre otros procesos funcionales.

Se ha demostrado que existen interacciones genéticas entre las fosfatasas Ppz y Glc7, las cuales podrían compartir subunidades reguladoras y algunas funciones (Venturi *et al.*, 2000). Ppz1 y Ppz2 son fosfatasas relacionadas con PP1 que están involucradas en tolerancia salina, integridad de pared celular, progresión del ciclo celular y regulación de la traducción de proteínas y, recientemente, también han sido relacionadas con la homeostasis de potasio y la regulación del pH intracelular (Arino, 2002; Yenush *et al.*, 2002). Entre ellas, Ppz1 tiene un papel más relevante que Ppz2 en la regulación de dichas funciones (Arino, 2002). Un análisis de doble híbrido demostró que Ypi1, además de interactuar con Glc7, interactúa también con Ppz1 (Venturi *et al.*, 2000). En este sentido, Ypi1 podría ser también un buen candidato a convertirse en un inhibidor de Ppz1. De esta manera, Ypi1 podría jugar un papel similar a Hal3, un inhibidor específico de Ppz1 (de Nadal *et al.*, 1998), que parece regular todas sus funciones (Arino, 2002).

Finalmente, un análisis a gran escala de interacción proteína-proteína describió que Ypi1 interactúa físicamente con Sds22 (Hazbun *et al.*, 2003). Sds22 es una proteína esencial que también interactúa *in vitro* con Glc7 y media su función durante la mitosis. (Hisamoto *et al.*, 1995; MacKelvie *et al.*, 1995; Hong *et al.*, 2000; Peggie *et al.*, 2002; Hazbun *et al.*, 2003). Además, un estudio realizado en *S. cerevisiae*, aparecido durante el desarrollo de esta tesis, indica que Ypi1 y Sds22 forman un complejo esencial de regulación que gobierna la actividad de Glc7 en el núcleo (Bharucha *et al.*, 2008b). En otro estudio realizado en células de mamífero, Lesage y colaboradores identificaron y caracterizaron un complejo formado entre Sds22, PP1 y el I-3 y propusieron que la activación de este complejo es regulado por fosforilación de Sds22 y/o I-3 (Lesage *et al.*, 2007). Aunque la función que realiza este complejo todavía se desconoce, el hecho que *YPI1*, *SDS22* y *GLC7* sean esenciales y estén

---

## INTRODUCCIÓN

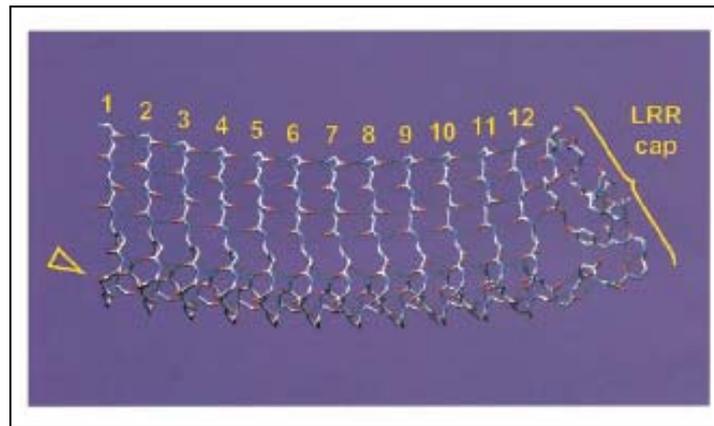
conservados evolutivamente, sugiere que entender el mecanismo de regulación de este complejo en *S. cerevisiae* podría ser relevante en el estudio de la función de PP1 en eucariotas superiores.

### 2.3.1.2. Sds22

*SDS22* fue originalmente descrito como un potente supresor multicopia de la mutación condicional de uno de los 2 genes que codifican la subunidad catalítica de PP1 en *Schizosaccharomyces pombe*, *dis2-11* (Ohkura and Yanagida, 1991). El homólogo de *SDS22* en *S. cerevisiae* fue aislado como un supresor multicopia del mutante *glc7-10*, un alelo de *GLC7* que confiere un fenotipo de parada en mitosis a la temperatura restrictiva (Hisamoto *et al.*, 1995; MacKelvie *et al.*, 1995). En ambas especies de levaduras *SDS22* juega un rol importante en el mantenimiento de la localización normal de PP1 en el núcleo (Peggie *et al.*, 2002). Sds22 es una proteína esencial y se encuentra ampliamente conservada en eucariotas. El homólogo en humanos (hSds22) posee el 46 % de identidad con Sds22 de levadura (Renouf *et al.*, 1995).

Poco se conoce sobre el mecanismo de interacción entre Sds22 y PP1. Sds22 carece del motivo **RVxF**, pero contiene una secuencia de 11 *leucine-rich repeats* (LRRs) como sitio de interacción con PP1 (Ceulemans *et al.*, 1999). Esta secuencia es esencial para la unión con PP1 y adquiere la conformación de una super hélice curvada en el dominio carboxi-terminal conocido como LRR cap (Figura 5). Dado que Sds22 no posee el motivo **RVxF**, la mitad carboxi-terminal de PP1 (incluyendo todos los residuos que contribuyen a la unión con sus subunidades reguladoras en el canal hidrofóbico) no es requerida para la interacción con Sds22. Así, se ha identificado como sitio de interacción entre PP1 y Sds22 el triángulo formado por las hélices  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$ , que se encuentra localizado cerca del sitio catalítico de PP1 (Figura 2) (Ceulemans *et al.*, 2002b). Este hecho abre la posibilidad que el canal de unión **RVxF** quede libre para la interacción con adicionales subunidades que contengan dicho motivo.

En levaduras, Sds22 es una proteína de 40 kDa que, a pesar de carecer de la secuencia clásica de localización nuclear (NLS), se encuentra en el



**Figura 5. Modelo de la estructura tridimensional del sitio de interacción de Sds22 con PP1.** Estructura tridimensional de la superficie cóncava del motivo de unión (LRR) de Sds22 con PP1 en colores Corey-Pauling-Koltun. Cada LRR adopta una estructura en forma de horquilla de pelo que son estabilizados por puentes de hidrógeno (pequeñas líneas de color verde) entre residuos de asparagina y tirosina en la región carboxi-terminal del LRR cap. Los LRR están numerados y la flecha amarilla marca el dominio amino-terminal del esqueleto de asparagina (imagen tomada de Ceulemans et al., 2002)

núcleo. Stone y colaboradores sostienen que la localización nuclear de Sds22 podría ser debida a su interacción con co-transportadores que contienen la secuencia NLS (Stone *et al.*, 1993). Estudios realizados en mutantes *sds22* sensibles a la temperatura demostraron que la pérdida de función de Sds22 puede provocar una parada en la mitad de la mitosis con cromosomas condensados y *spindles* mitóticos cortos. (Ohkura and Yanagida, 1991; Stone *et al.*, 1993; Hisamoto *et al.*, 1995; MacKelvie *et al.*, 1995), fenotipos que pueden ser complementados por la sobreexpresión de PP1. Peggie y colaboradores, utilizando otros mutantes *sds22* sensibles a la temperatura demostraron que la falta de función de Sds22 genera fenotipos tanto de alteración en la correcta segregación cromosómica como de deslocalización de Glc7, sin exhibir una parada en el ciclo celular (Peggie *et al.*, 2002).

#### 2.4. FUNCIONES DE Glc7

La subunidad catalítica de PP1 en *S. cerevisiae* fue inicialmente caracterizada por su importancia en la biosíntesis del glucógeno (Cannon *et al.*, 1994); sin embargo, al igual que su ortólogo en mamíferos, está involucrada en muchos otros procesos que incluyen: represión por glucosa, fusión de vacuolas,

---

## INTRODUCCIÓN

endocitosis, homeostasis iónica, organización de la pared celular, esporulación, mitosis, meiosis, síntesis proteica y terminación de la poliadenilación (Peggie *et al.*, 2002; Williams-Hart *et al.*, 2002); procesos que han sido conservados a lo largo de la evolución de las especies.

### 2.4.1. Papel de Glc7 en la regulación de la homeostasis iónica

El mantenimiento de la homeostasis iónica es de vital importancia para la supervivencia de todo sistema vivo. Es un proceso esencial y estrictamente regulado que involucra numerosos sistemas de transporte, responsables de la regulación del volumen celular, el mantenimiento de la concentración intracelular de iones y metabolitos, el mantenimiento del pH intracelular, la detoxificación y la generación del potencial electroquímico de membrana (Andre, 1995; van der Rest *et al.*, 1995).

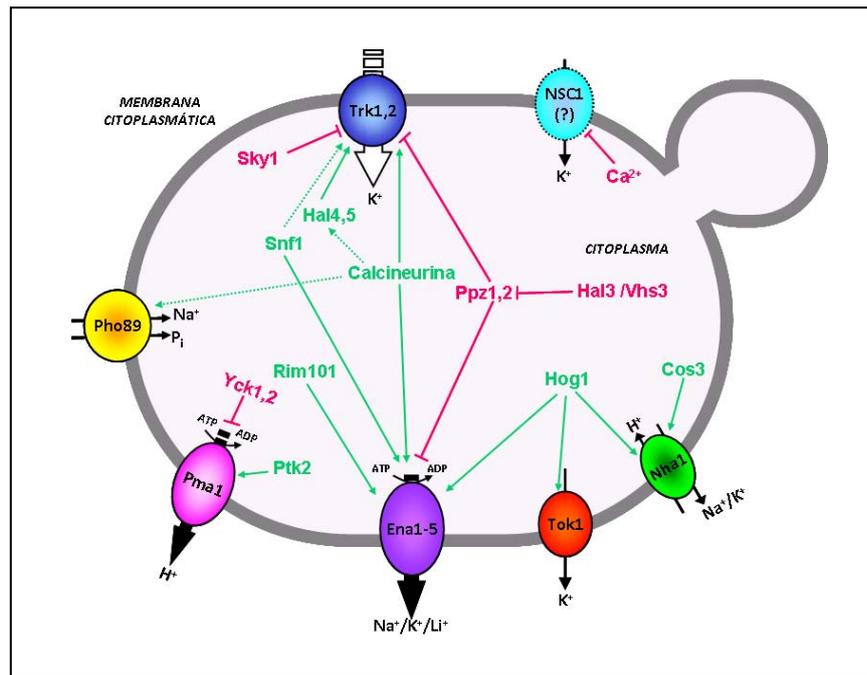
Los iones mono y divalentes, como el sodio, el litio, el potasio, el calcio, el magnesio y el manganeso juegan un papel muy importante en la biología de toda célula eucariota y, por tanto, también en *S. cerevisiae*, aunque la concentración de estos iones en el interior celular ha de ser finamente regulado con tal de evitar un exceso que resulte perjudicial para la célula (Serrano, 1996). La toxicidad depende de cada catión en concreto; mientras el potasio presenta un amplio margen de tolerancia, la concentración intracelular de sodio se ha de mantener lo más baja posible. Ello es debido, en parte, al hecho de que el sodio, y también el litio, pero no el potasio, pueden desplazar al catión magnesio del centro activo de algunas enzimas, como es el caso de la fosfatasa Hal2 (Murguía *et al.*, 1996; Dichtl *et al.*, 1997). Es por este motivo que las células retienen una gran cantidad de potasio en su interior, mientras que expulsan activamente iones de sodio y litio. El acúmulo de este catión y la expulsión activa de protones permite a la célula mantener un potencial de membrana, responsable de funciones tan importantes como el transporte de nutrientes y cationes. El gradiente de iones entre el medio extracelular e intracelular también determina la presión osmótica interna, responsable de la entrada o salida de agua por la membrana citoplasmática y, por tanto,

responsable del tamaño y la turgencia de la célula así como del estado de hidratación de membranas y moléculas (Serrano, 1996).

La levadura es un organismo de vida libre que presenta una rápida adaptación a los diversos cambios en la concentración de sales o de nutrientes que sufre el medio extracelular en el que se encuentra. Para responder a estos cambios ha desarrollado estrategias evolutivas orientadas a la activación de diversos sistemas de transporte, que se encuentran localizados en la membrana citoplasmática y son los responsables de mediar, utilizando diversos mecanismos, el flujo de cationes con diferentes sustratos específicos. Se han descrito más de 200 sistemas de transporte (Van Belle and Andre, 2001), pero únicamente algunos de ellos han sido caracterizados genética y fisiológicamente. Menos conocidas son las vías de transducción de señales involucradas en la activación coordinada de esta multitud de transportadores que, sólo recientemente, han comenzado a ser elucidadas y en las cuales podría jugar un papel preponderante el mecanismo de fosfo-defosforilación. La exposición a elevadas concentraciones de sales da lugar a un estrés salino que la célula es capaz de combatir utilizando tres estrategias diferentes: 1) Expulsar activamente los iones tóxicos, 2) Controlar estrictamente la entrada de cationes y 3) Secuestrar cationes tóxicos en la vacuola (Sychrova, 2004).

En *S. cerevisiae*, estos sistemas de transporte han sido clasificados en dos grupos: los transportadores de la membrana plasmática y los transportadores intracelulares. Los sistemas de transporte localizados en la membrana plasmática han sido ampliamente estudiados y caracterizados. Comprenden a los transportadores de potasio Trk1 y Trk2 (Gaber *et al.*, 1988 ; Ko *et al.*, 1990; Ko and Gaber, 1991), el canal de potasio Tok1 (Miosga *et al.*, 1994; Ketchum *et al.*, 1995) , el simportador de  $P_i$ - $Na^+$  (Pho89) (Martinez and Persson, 1998; Persson *et al.*, 1998); encargados de la entrada de cationes, la ATPasa de  $H^+$  (Pma1) (Ambesi *et al.*, 2000; Morsomme *et al.*, 2000), la ATPasa de  $Na^+$  (Ena1) (Haro *et al.*, 1991; Benito *et al.*, 2002; Ruiz and Arino, 2007) y el antiportador de  $Na^+/H^+$  (Nha1) (Prior *et al.*, 1996; Banuelos *et al.*, 1998); responsables de la salida de cationes (Figura 6). Además de estos 6 transportadores existen otros de menor especificidad como son: el canal de

## INTRODUCCIÓN



**Figura 6. Esquema de la regulación de la homeostasis salina en *S. cerevisiae*.** Se han obviado los elementos vacuolares involucrados en este proceso. Nsc1 ejerce una actividad no selectiva de transporte de potasio mediada por transportadores aun no identificados. Las flechas discontinuas representan vínculos funcionales donde no se ha demostrado una interacción física

cationes, denominado NSC1 (non-specific cation channel) (Bihler *et al.*, 1998), cuya existencia ha sido probada experimentalmente aunque el gen que lo codifica aún no ha sido identificado; y algunas otras proteínas transportadoras no específicas que han sido involucradas en el flujo de sodio y potasio a través de la membrana plasmática (por ejemplo: Pmp3, Qdr2) (Vargas *et al.*, 2007). A diferencia de los transportadores de membrana, los transportadores intracelulares han sido identificados y caracterizados sólo recientemente. Comprenden principalmente: el antiportador vacuolar cation alcalino/ $H^+$  (Vnx1), el antiportador endosomal cation alcalino/ $H^+$  (Nhx1) y el antiportador cation alcalino/ $H^+$  del aparato de Golgi (Kha1) (Wadskog and Adler, 2003; Samarao *et al.*, 2009). Existe también un sistema antiportador de intercambio  $K^+/H^+$  a través de la membrana mitocondrial pero el gen responsable de codificar este transportador aún no ha sido identificado (Nowikovsky *et al.*, 2004; Zotova and Schweyen, 2009).

En *S. cerevisiae* el potencial de membrana es generado principalmente por la ATPasa de H<sup>+</sup> codificada por el gen esencial denominado *PMA1*. Esta proteína de membrana expulsa protones desde el citoplasma al exterior de la célula mediante el consumo de energía en forma de ATP y es la responsable de la regulación del pH intracelular, el transporte de iones y el potencial electroquímico de membrana (Serrano *et al.*, 1991; Serrano *et al.*, 1992). Por este motivo, su actividad está finamente regulada por factores nutricionales, ambientales y por situaciones que implican un estrés celular. Diversas evidencias sugieren que, tanto en plantas como en levaduras, la mitad carboxi-terminal de Pma1 contiene un dominio auto inhibitorio, que ha sido objeto de numerosos estudios mediante mutagénesis, y que la actividad y estabilidad de este dominio está regulada por mecanismos de fosfo-defosforilación (Portillo *et al.*, 1991; Eraso and Portillo, 1994; Portillo, 2000). En este aspecto, se ha descrito que la Ser/Thr quinasa Ptk2 actúa regulando de forma positiva la actividad de Pma1. Así, la delección de *PTK2* produce células hipertolerantes a sodio, litio y cationes como la espermina, higromicina B y TMA (tetrametilamonio), el transporte de las cuales depende del potencial de membrana (Goossens *et al.*, 2000).

Como hemos mencionado anteriormente, una de las funciones de la PP1 de mamífero es el mantenimiento de la homeostasis iónica y la integridad celular. Sin embargo, el papel de Glc7 en el mantenimiento de la homeostasis iónica de *S. cerevisiae* ha sido muy poco estudiado y es prácticamente desconocido. La única evidencia publicada data del año 2002 (Williams-Hart *et al.*, 2002). Este trabajo parte de la observación de que el alelo *glc7-109* (K259A, R260A) presenta un fenotipo de sensibilidad a cationes tóxicos mono y divalentes, a la higromicina B y a pH alcalino que puede ser mejorado, en parte, con la adición de potasio en el medio. De hecho, el mutante *glc7-109* presenta una hiperpolarización de la membrana plasmática, cosa que explicaría la identificación de la bomba de protones *PMA1* como supresor de los defectos fenotípicos de este alelo. Por otro lado, el trabajo que presentamos aquí aporta pruebas adicionales acerca del papel de Glc7 en el mantenimiento de la homeostasis iónica de la levadura *S. cerevisiae*, ya que la sobreexpresión de

---

## INTRODUCCIÓN

*YPI1*, confiere halotolerancia a altas concentraciones de litio, incluso en mutantes nulos para las fosfatasa Ppz1 y Ppz2 (proteínas clave en la tolerancia osmótica y salina de la levadura) (ver resultados).

### 2.4.2. Papel de Glc7 en la integridad de la pared celular

Una de las características de la levadura es la presencia de una pared, necesaria para el mantenimiento de la forma y la integridad física de la célula. Cualquier agresión que comprometa la integridad celular permite la activación de una vía de transducción de señales conocida como vía de integridad de la pared celular, implicada en la detección y transmisión, hacia el interior de la célula, de señales generadas a nivel de la envoltura celular, con la finalidad de activar una serie de respuestas encaminadas al mantenimiento y la construcción de la pared celular.

El genoma de la levadura codifica al menos 4 proteínas, denominadas Mid2, Wsc1, Wsc2 y Wsc3, que se encuentran en la membrana plasmática y que actúan como “sensores” de estrés de la pared celular. Alteraciones en la síntesis o arquitectura de la pared celular conducen a la activación de la proteína intercambiadora de GDP/GTP, Rom2 y de la proteína que une GTP, Rho1. Esta última, a su vez, es capaz de activar a las glucano sintasas, encargadas de la síntesis de  $\beta$ -1,3 glucano (principal componente de la pared celular) e inducir, al mismo tiempo, la actividad de la quinasa Pkc1. Esta quinasa es la responsable de iniciar la cascada de MAP-quinasas, que comienza con Bck1 (una MAPKKK, es decir una MAP-quinasa-quinasa-quinasa) que fosforila Mkk1 y Mkk2, dos quinasa redundantes responsables de la fosforilación dual (en los residuos Thr<sub>190</sub> y Tyr<sub>192</sub>) de la MAPK Slt2, también conocida como Mpk1. La quinasa Slt2 fosforilada (forma activa) es la encargada de entrar en el núcleo y activar a los factores de transcripción Rlm1 y el complejo SBF (Swi4-Swe6), responsables de inducir la expresión de genes necesarios para la reparación y ensamblaje de la pared. Genes como *FKS1*, *FKS2*, *MNN1* y *CSD2*, que codifican enzimas responsables de la síntesis de elementos de pared y son dependientes de Slt2 (Figura 7) (Heinisch *et al.*, 1999; Mager and Siderius, 2002).

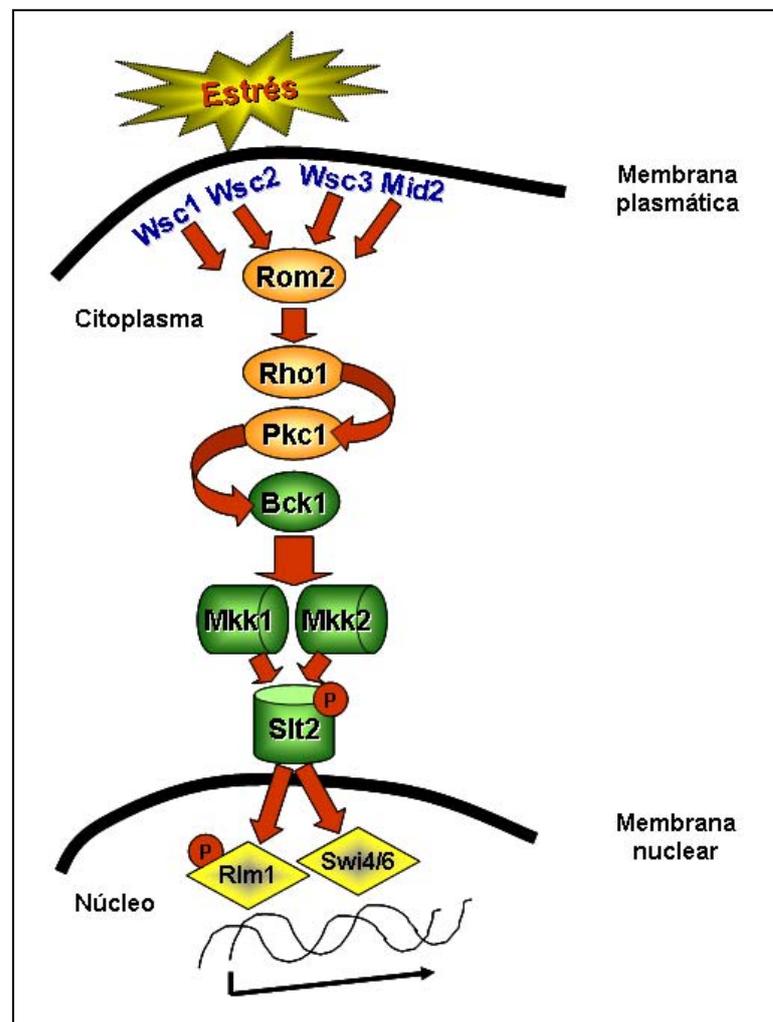


Figura 7. Representación esquemática de la vía de integridad celular en *S. cerevisiae*

Existen una serie de fenotipos asociados a defectos genéticos en esta vía de señalización. Mutaciones en cualquiera de los elementos que forman parte de esta vía, como por ejemplo la delección de la MAPK *SLT2* da lugar a células especialmente sensibles a medios hiposmóticos o a altas temperaturas (37°C o superiores). En estas condiciones las células son propensas a la lisis, defecto que se corrige mediante la adición al medio de un estabilizante osmótico como NaCl (0,5 M) o sorbitol (0,9 - 1 M) (Levin and Errede, 1995). Además, los mutantes *sit2* son particularmente sensibles a algunos compuestos que interfieren con la formación de la pared como la cafeína o el

---

## INTRODUCCIÓN

blanco de calcofluor (CFW), o a drogas, como la estaurosporina, que actúan inhibiendo la actividad de la quinasa Pkc1.

Cdc28 es otra proteína quinasa que induce la vía de la integridad de la pared celular mediante la activación de Pkc1. La actividad de Cdc28 es dependiente de ciclinas y constituye el mayor regulador del ciclo celular de *S. cerevisiae*. Esta quinasa activa el complejo SBF e induce la expresión de genes que codifican enzimas importantes para la reorganización de la pared celular durante la emergencia de la gema (Buehrer and Errede, 1997).

Además de los elementos que forman parte de la vía de señalización de Pkc1, también existen fosfatasa que desarrollan un papel importante en el mantenimiento de la integridad celular. Entre ellas tenemos a las fosfatasa Ppz1 y Ppz2 que regulan la homeostasis del potasio y el pH intracelular de la célula (Yenush *et al.*, 2002), la fosfatasa Sit4 que ejerce un control sobre los sensores de membrana y regula la vía de la integridad celular conjuntamente con la quinasa TOR, otro componente importante en esta vía, que activa a las proteínas Rom1 y Rom2 en respuesta a la disponibilidad de nutrientes (Angeles de la Torre-Ruiz *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2002) y la fosfatasa de tipo 1, Glc7. En este sentido, el estudio de un alelo termosensible de Glc7 (*glc7-10*) ha permitido establecer un vínculo funcional entre esta fosfatasa y la vía de transmisión de señales que controla la integridad celular (Andrews and Stark, 2000). En condiciones restrictivas (altas temperaturas), el mutante *glc7-10* presenta características compatibles con una parada en la transición metafase-anafase del ciclo celular. Estos defectos de crecimiento son suprimidos en medios con una alta osmolaridad, en cambio, son aditivos con la delección de *SLT2* o *BCK2* o la sobreexpresión de una versión no funcional de *PKC1*. Así pues, parece ser que la defosforilación que lleva a cabo la fosfatasa Glc7 también es capaz de promover el mantenimiento de la integridad celular de una forma que depende de la vía de transducción de señales controlada por la quinasa Pkc1 (Andrews and Stark, 2000).

### 2.4.3. Papel de Glc7 en la regulación del ciclo celular

Uno de los objetivos más importantes de la biología es comprender la sucesión de los acontecimientos necesarios para la división celular. La levadura, como cualquier célula eucariota, debe integrar una multitud de señales externas e internas antes de iniciar un nuevo ciclo celular. Una vez iniciado el ciclo, debe controlar estricta y coordinadamente que una serie de sucesos ocurran en un momento específico y de forma secuencial para garantizar la correcta duplicación de todo el material genético y la obtención de dos células hijas. Muchos de estos eventos son controlados por la acción conjunta de proteínas quinasas y fosfatasas.

La importancia del papel que desempeñan las proteínas quinasas en la regulación del ciclo celular ha sido, durante muchos años, ampliamente reconocida y estudiada (Li and Li, 2006). Las aportaciones más relevantes fueron los trabajos realizados por Lee Hartwell, Paul Nurse y Tim Hunt, quienes recibieron el premio Nobel de Medicina y Fisiología en el año 2001, como reconocimiento a sus contribuciones en la comprensión del papel que desempeñan las quinasas en el control del ciclo celular (Hartwell, 2002; Hunt, 2002; Nurse, 2002). En cambio, el papel que desempeñan las proteínas fosfatasas en este campo ha sido apreciado sólo recientemente. En este sentido, se han descrito 4 proteínas fosfatasas involucradas en la regulación de la división celular, las Ser/Thr fosfatasas PP1 y PP2A y las tirosin fosfatasas Mih1 y Cdc14 (Trinkle-Mulcahy and Lamond, 2006).

La relevancia de la función de la fosfatasa PP1 de levadura comenzó a cimentar sus bases gracias al resultado de diversos estudios genéticos en los que se demostró que la pérdida de función de esta fosfatasa causa una parada del ciclo celular en mitosis (Hisamoto *et al.*, 1994; Black *et al.*, 1995; MacKelvie *et al.*, 1995; Andrews and Stark, 2000); desde entonces, numerosos trabajos se han centrado en esclarecer el importante papel que esta fosfatasa desempeña en el control del ciclo celular.

### **2.5. EL CICLO CELULAR DE *S.cerevisiae***

El ciclo celular es la sucesión de eventos por los cuales una célula crece y se divide en dos células hijas que contienen la información y maquinaria

---

## INTRODUCCIÓN

enzimática necesaria para repetir este proceso y, por lo tanto, es la base de la proliferación celular. Conceptualmente, en todo proceso de división celular existen dos tipos de procesos que se deben realizar de forma gradual y coordinada: los procesos periódicos o discontinuos y los procesos continuos. Los procesos periódicos involucran el ciclo cromosómico o de replicación del DNA seguido de la separación física del núcleo y los procesos continuos involucran el ciclo de crecimiento celular donde ocurre la replicación de los demás componentes de la célula y la posterior separación física de las células hijas (Tyson *et al.*, 2002).

En los organismos eucariotas, el ciclo cromosómico ocurre en 2 fases: la fase S (Síntesis de DNA) y la fase M (Mitosis), separadas por dos fases intermedias o *gaps* denominadas G1 y G2 (Tyson *et al.*, 2002). El comienzo y la progresión de estos eventos definen de una manera estrictamente controlada los procesos de síntesis del DNA, división nuclear, formación del Spinde Pole Body (SPB), emergencia de la gema, migración nuclear y, finalmente, la citocinesis (Figura 8) (Tyson and Novak, 2008).

En *S. cerevisiae*, el proceso de división está condicionado por el tamaño de las células (Adams and Pringle, 1984). Durante la fase G1 la célula analiza si las condiciones ambientales son favorables para comenzar el proceso irreversible de división celular, siempre que cuente con el tamaño adecuado para ello. En esta fase el SPB, que constituye el centro de organización de los microtúbulos en levaduras (equivalente a los centrosomas en mamíferos), se orienta hacia el sitio de emergencia de la gema (Sobel, 1997). En la fase G1 tardía, una vez que la célula ha superado el punto crítico de control del ciclo celular (START), se desencadenan todos los pasos siguientes que marcan la progresión del ciclo celular. START es el punto que marca el inicio del proceso de síntesis de DNA en fase S, de la gemación y de la duplicación del SPB (Cross, 1995). En este estadio, la célula puede responder a diversas señales ambientales como aquellas inducidas por feromonas sexuales y, si las condiciones ambientales no son favorables, entrar en un período de quiescencia, induciendo el proceso de esporulación (Cross, 1995).

La mitosis constituye un proceso complejo y estrictamente regulado que

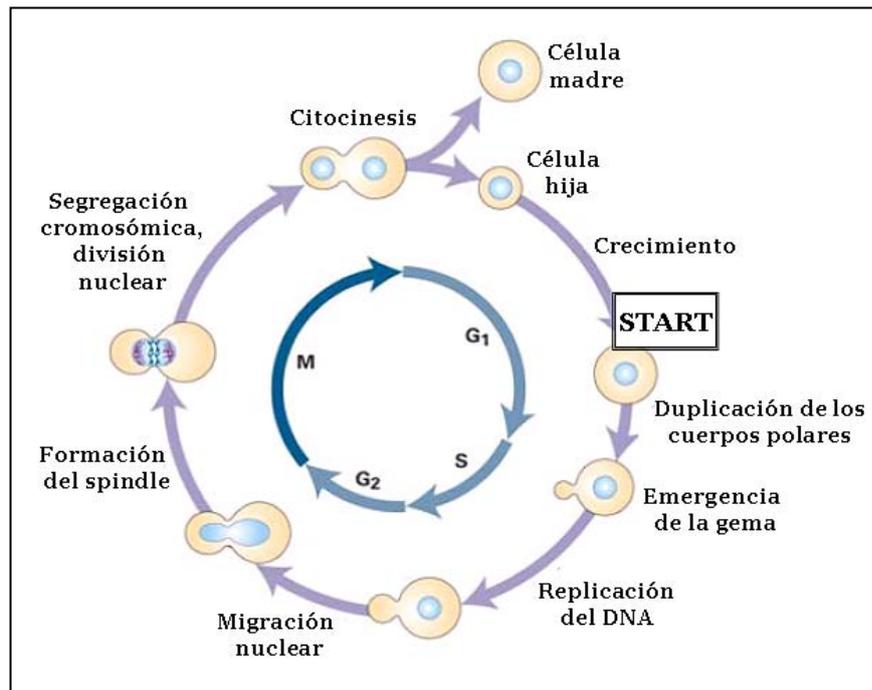


Figura 8. El ciclo celular de *S. cerevisiae*

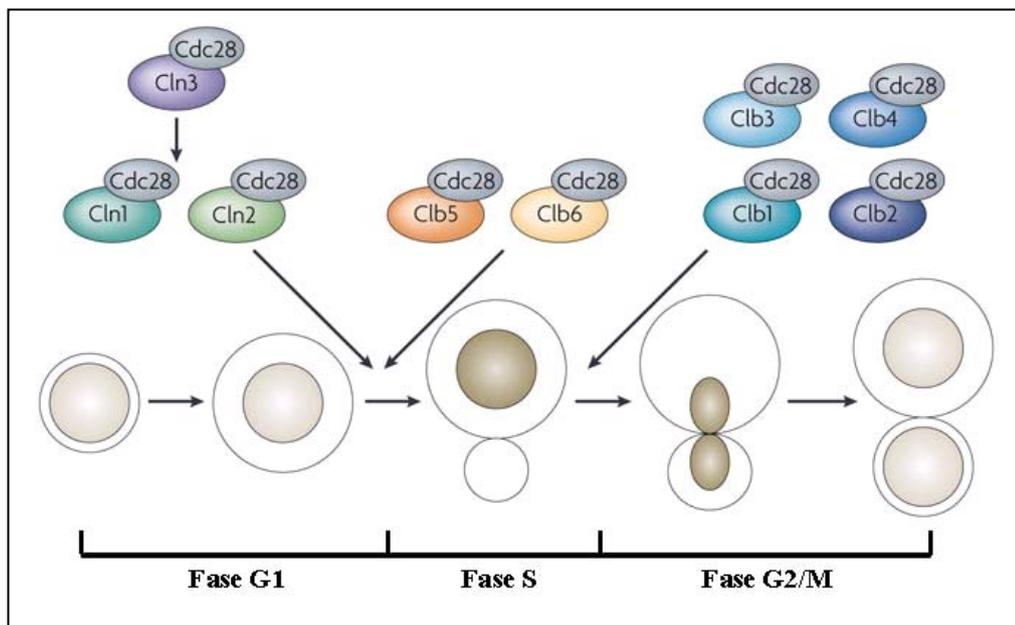
se encuentra particularmente definido por el momento en que la envoltura nuclear se colapsa y se segregan los cromosomas replicados. En los organismos eucariotas este proceso se encuentra subdividido en 4 fases: profase, metafase, anafase y telofase (Alberts *et al.*, 2002). Con el fin de controlar que la alternancia entre estas fases se realice de forma correcta, la célula presenta diversos mecanismos de control que regulan las transiciones entre cada una de ellas.

### 2.5.1. Mecanismos de control del ciclo celular de *S. cerevisiae*

En *S. cerevisiae*, el coordinador central de la maquinaria de regulación del ciclo celular es la quinasa dependiente de ciclinas o CDK codificada por el gen esencial *CDC28* (Mendenhall and Hodge, 1998). A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, Cdc28 es la única de las 5 CDKs presentes en levaduras que se encarga del control del ciclo celular. La expresión de *CDC28* es bastante estable de modo que su actividad está marcada no sólo por procesos de fosfo-defosforilación, sino también por la unión a un tipo de proteínas denominadas ciclinas, las cuales regulan la actividad de Cdc28 y seleccionan,

## INTRODUCCIÓN

al mismo tiempo, las proteínas que las propias Cdks van a fosforilar. Durante la progresión del ciclo celular las ciclinas muestran importantes y características fluctuaciones periódicas en su concentración debido a un proceso programado de síntesis-proteólisis. Este hecho, ha permitido clasificarlas en dos grupos: las ciclinas de G1 (Cln1- Cln3), que se expresan de manera preferente en esta fase, y las ciclinas de tipo B (Clb1 - Clb6), que se expresan en dos oleadas sucesivas desde el inicio de la fase S hasta la fase G2/M (Figura 9) (Nasmyth, 1993).



**Figura 9. Ciclinas del ciclo celular de *S. cerevisiae*.** El ciclo celular está conducido por la quinasa Cdc28 que se asocia a diferentes ciclinas específicas de cada fase del ciclo celular. La unión de las diferentes ciclinas, además de activar a la quinasa le confieren especificidad de sustrato (Adaptado de Bloom and Cross, 2007).

### 2.5.1.1. Regulación transcripcional de ciclinas

Un mecanismo crucial en la especificidad de las ciclinas es la regulación diferencial de sus niveles de transcripción durante el ciclo celular. Así, la transcripción de *CLN3* es detectable durante todo el ciclo celular, pero alcanza sus máximos niveles en la fase tardía de la mitosis y la fase temprana de G1 mientras que, la transcripción de *CLN1*, *CLN2*, *CLB5* y *CLB6* alcanza sus máximos niveles durante las fases G1-S, seguido por la transcripción de *CLB3*,

*CLB4*, *CLB1* y *CLB2* (Bloom and Cross, 2007). Los niveles de ciclinas expresadas en las fases tempranas del ciclo celular se encuentran controlados por los complejos transcripcionales SBF (formado por Swi4 y Swi6) y MBF (formado por Mbp1 y Swi6). La expresión de *CLN1* y *CLN2* ha sido inicialmente atribuida al complejo SBF (Nasmyth and Dirick, 1991; Ogas *et al.*, 1991) y la activación transcripcional de *CLB5* y *CLB6* al complejo MBF (Schwob and Nasmyth, 1993a); sin embargo, evidencias recientes indican que existe un alto grado de coincidencia en la activación de la expresión génica por parte de estos dos factores de transcripción (Bean *et al.*, 2005).

Hacia el final de la telofase, el complejo formado por Cln3-Cdc28 es el responsable de controlar el tamaño de la célula. Cuando ésta ha alcanzado unas proporciones adecuadas, el complejo Cln3-Cdc28 activa los complejos transcripcionales SBF y MBF (Tyers *et al.*, 1993; Stuart and Wittenberg, 1995), dando lugar al START del ciclo celular. La activación de los complejos SBF y MBF inducen la transcripción específica de las ciclinas de fase G1 (*CLN1*, *CLN2*, *CLN3*) (Costanzo *et al.*, 2004). Estas, a su vez, regulan los acontecimientos que se realizarán a continuación, es decir, el inicio de la gemación, la duplicación de los SPB y la expresión de las ciclinas de fase S (*CLB5* y *CLB6*), que son las responsables de asistir la replicación del DNA (Tyers *et al.*, 1993).

En la fase siguiente, conocida como G2, la levadura realiza una segunda fase de crecimiento y se prepara para iniciar la mitosis. De este proceso se encargan las ciclinas de fase M (Clb1, Clb2, Clb3 y Clb4), que promueven la formación del *spindle*, la iniciación de la mitosis y a su vez, actúan como desencadenantes de la expresión de la nueva oleada de ciclinas responsables de dirigir la transición M/G1 y por tanto, la entrada, si es pertinente, a un nuevo ciclo celular (Stark, 2004).

### **2.5.1.2. Degradación e inhibición de ciclinas**

Otro mecanismo clave en la regulación de las ciclinas es el control de sus niveles de degradación. Los niveles de ciclinas son regulados por proteólisis dependiente de ubiquitinación. La sensibilidad de diferentes ciclinas

---

## INTRODUCCIÓN

a diferentes ubiquitin ligasas constituye un importante mecanismo de control de la maquinaria de regulación del ciclo celular. En levaduras, existen dos complejos de proteínas conjugadoras de ubiquitina, conocidos como el APC (Anaphase Promoting Complex) y el SCF (Skp1/Cul1/E-box Protein) (Zachariae and Nasmyth, 1999). Tanto el APC como el SCF requieren de la presencia de proteínas auxiliares cuyo papel consiste en reconocer apropiadamente proteínas sustratos y presentarlos luego a la maquinaria de ubiquitinación. Estas proteínas están representadas por los co-activadores Cdh1, Cdc20 (Schwob and Nasmyth, 1993b; Visintin *et al.*, 1998) y Cdc4, Grr1 (McKinney *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 1996; Drury *et al.*, 1997; Feldman *et al.*, 1997; Li and Johnston, 1997; Skowyra *et al.*, 1997), respectivamente. El SCF está activo en todas las fases del ciclo celular y la degradación de sus proteínas diana parece estar controlada por el nivel de fosforilación de cada una de ellas (Willems *et al.*, 1996); sin embargo, la proteólisis modulada por el APC está controlada por el estado de fosforilación de la maquinaria de ubiquitinación como tal, antes que por las proteínas diana (Kotani *et al.*, 1998).

Existen muchos otros elementos que modulan o actúan de forma paralela a la transcripción específica de genes mediados por los complejos SBF y MBF. Un papel importante juegan, por ejemplo, las proteínas inhibitoras de CDKs conocidas como CKIs (CDK Inhibitory). En levaduras, estas proteínas están codificadas por los genes *FAR1* y *SIC1* y su actividad es imprescindible para regular la actividad de Cdc28 en G1. Los complejos formados por Clb-Cdc28 son inhibidos en la fase temprana de G1 por Sic1 (Schwob and Nasmyth, 1993b), mientras que Far1 inhibe a los complejos Cln-Cdc28 en la fase tardía de G1 en respuesta a feromonas sexuales (Peter *et al.*, 1993). Otro papel importante juegan las proteínas denominadas CKS (Cyclin Dependent Kinase Subunit) cuya interacción y regulación de los complejos ciclina-CDKs es esencial para la viabilidad y la progresión del ciclo celular. Algunos estudios indican que estas pequeñas proteínas son requeridas tanto para el START como para la transición G2-M (Tang and Reed, 1993), mediante la modulación del estado de fosforilación de las CDKs. Recientes trabajos han demostrado que Cks1 es necesaria para la actividad de los complejos Cln-Cdc28 (Reynard

*et al.*, 2000) y juega un papel esencial en la regulación del inicio de la división nuclear y en el *checkpoint* de la morfogénesis de *S. cerevisiae*. Además, el descubrimiento de que la expresión de su ortólogo en mamíferos está asociado con tumores agresivos de mama y que está involucrado en la destrucción, mediante ubiquitinación, de la proteína reguladora del ciclo celular, p27 (Harper, 2001), sugiere que en levaduras podría también tener otros roles.

### 2.5.1.3. Regulación de Cdc28 por fosforilación

La actividad de Cdc28 también es regulada por fosforilación. En *S. cerevisiae*, Cdc28 es activada, por fosforilación, en el residuo Thr<sup>169</sup> del *loop* de activación por la quinasa Cak1 (Kaldis *et al.*, 1996). Los niveles de esta quinasa son constantes en todas las fases del ciclo celular y son necesarios para la activación de los complejos Cln-Cdc28 y Clb-Cdc28. En eucariotas superiores, las fosfatasas PP2A pueden defosforilar este *loop* de activación y, por lo tanto, actúan como inhibidores de las proteínas CDKs *in vitro* (Lee *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1994). Estudios genéticos en *S. cerevisiae* han demostrado que mutantes condicionales de PP2A presentan un retraso en la entrada en mitosis y que PP2A es necesaria para mantener altos niveles de actividad de los complejos Clb-Cdc28 (Lin and Arndt, 1995); aunque no se ha demostrado que PP2A realice esta función *in vivo*.

Una segunda vía de regulación por fosforilación de Cdc28 es el residuo conservado Tyr<sup>19</sup>, muy cerca del sitio de unión a ATP. En *S. cerevisiae* esta regulación es llevada a cabo por las acciones opuestas de la quinasa Swe1 (Booher *et al.*, 1993) y la fosfatasa Mih1 (Russell *et al.*, 1989). Cdc28 y Swe1 se regulan recíprocamente. Los complejos mitóticos Clb-Cdc28 fosforilan a Swe1 facilitando su degradación por el complejo SCF y posiblemente el APC (McMillan *et al.*, 2002; Thornton and Toczyski, 2003). Defectos en la degradación de Swe1 resultan en una prolongada inhibición de Cdc28. Como consecuencia de ello, Cdc28 no puede inducir el cambio de crecimiento apical a isotrópico de la gema, resultando en la formación de gemas alargadas (Pruyne and Bretscher, 2000). Además, estudios de fosforilación *in vitro* han demostrado que Swe1 fosforila e inactiva al complejo Clb2-Cdc28 (Booher *et*

---

## INTRODUCCIÓN

*al.*, 1993). Finalmente, cuando la tirosin fosfatasa Mih1 elimina la fosforilación inhibitoria de Cdc28, Swe1 permanece en un estado hiperfosforilado y se disocia de Clb2-Cdc28, favoreciendo la completa activación del complejo Clb2-Cdc28 (Harvey *et al.*, 2005). La fosforilación de Swe1, por tanto, es importante para su actividad inhibitoria sobre Clb-Cdc28.

### 2.5.2. Control de la mitosis

La progresión de la mitosis es dirigida por el APC, una ubiquitin ligasa que asociada a los co-activadores Cdc20 y Cdh1 regula la transición metafase-anafase ( $APC^{Cdc20}$ ) y la salida de la mitosis ( $APC^{Cdh1}$ ) (Visintin *et al.*, 1997). Además, el  $APC^{Cdc20}$  y el  $APC^{Cdh1}$  son diferencialmente regulados por Cdc28 mediante fosforilación.

Durante la metafase, el APC se une a Cdc20 ( $APC^{Cdc20}$ ) para promover la degradación de la securina Pds1 (Cohen-Fix *et al.*, 1996; Cohen-Fix and Koshland, 1999) y de las ciclinas mitóticas de tipo B (Shirayama *et al.*, 1999; Wasch and Cross, 2002; Peters, 2006). La degradación de Pds1 promueve la entrada en anafase mediante la activación de la separasa Esp1 y la subsecuente separación de las cromátidas hermanas mediante la escisión de Scc1, una de las subunidades de cohesina que las mantienen unidas (Ciosk *et al.*, 1998; Kosco *et al.*, 2001; Agarwal *et al.*, 2003).

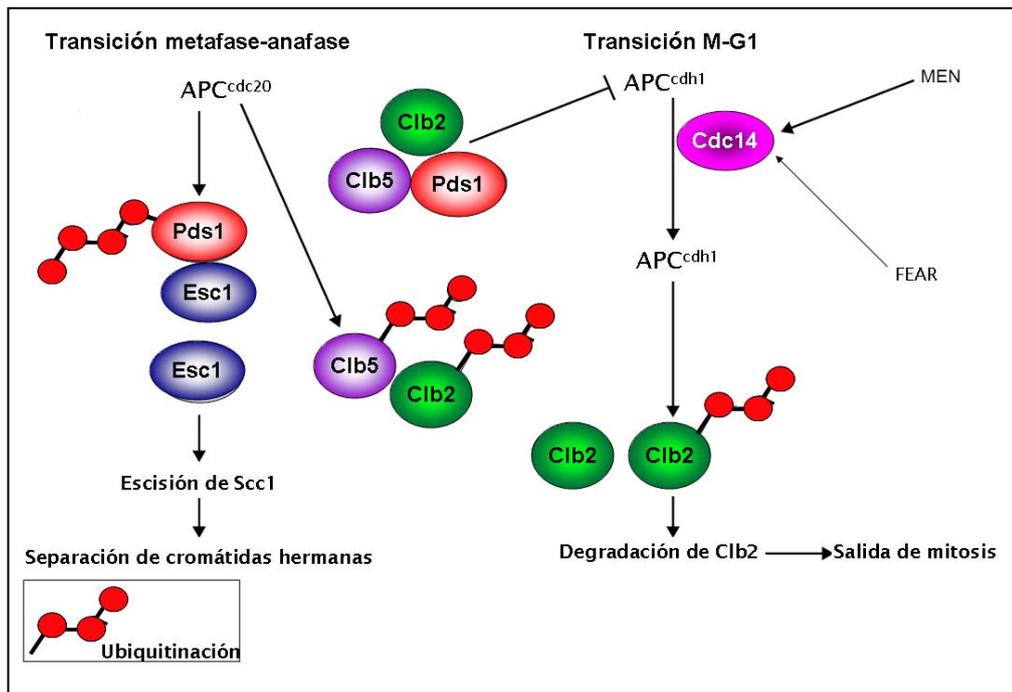
Al final de la mitosis, el APC unido a la proteína adaptadora Cdh1 completa la degradación de las ciclinas de tipo B, incluyendo la principal ciclina mitótica Clb2 (Irniger *et al.*, 1995). A diferencia de lo que ocurre con el  $APC^{Cdc20}$ , el  $APC^{Cdh1}$  es inactivo al principio de la mitosis, debido a la fosforilación de Cdh1 por el complejo CLB-CDK (Visintin *et al.*, 1997; Zachariae *et al.*, 1998a). Además de promover la separación de las cromátidas hermanas, la separasa Esp1 permite la activación de FEAR (*Cdc-Fourteen Early Anafase Release*) (Pereira *et al.*, 2002; Saunders, 2002), uno de los complejos promotores de la salida de la mitosis. Al inicio de la anafase, la activación de Esp1 promueve la inhibición de la fosfatasa  $PP2A^{Cdc55}$ , que facilita la fosforilación de Net1 por el complejo CLB-CDK y la Polo-like quinasa Cdc5, y la posterior liberación de Cdc14 al núcleo. La liberación de Cdc14 al núcleo,

activa al complejo APC<sup>cdh1</sup> (Shirayama *et al.*, 1999; Queralt *et al.*, 2006) que ubiquitina a las ciclinas mitóticas (ciclinas de tipo B) para su destrucción, inactivando todo tipo de actividad CDK en fase M y promoviendo la subsecuente salida de la mitosis (Visintin *et al.*, 1998; Shou *et al.*, 1999). El complejo MEN (*Mitotic Exit Network*) también promueve la liberación de Cdc14 al núcleo (Pereira *et al.*, 2002). Esta vía de señalización es iniciada por la GTPasa Tem1 (Shirayama *et al.*, 1994b), que viene regulada por el factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), Lte1 (Shirayama *et al.*, 1994a) y la activación del complejo con actividad GTPasa (GAP), formado por las proteínas Bub2 y Bfa1 (Geymonat *et al.*, 2002). Tem1-GTP activa una cascada de proteínas quinasas que a su vez activan a la proteína fosfatasa Cdc14 (Bardin *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Mah *et al.*, 2001; Visintin and Amon, 2001; Asakawa and Toh-e, 2002). Una vez liberada al núcleo, Cdc14 permite la defosforilación de Cdh1, con la subsecuente activación del APC<sup>cdh1</sup> y el bloqueo de la citocinesis (Figura 10) (Visintin *et al.*, 1998).

Un estudio realizado por Yeong y colaboradores demostró que la degradación de la ciclina mitótica Clb2 requiere no sólo de Cdh1 sino también de Cdc20. Estos investigadores sostienen que en *S. cerevisiae* la disminución de la actividad de Cdc28 es pre-requisito para la activación del APC<sup>cdh1</sup>. El APC<sup>cdh1</sup> marca posteriormente el *pool* remanente de ciclinas de tipo B para su degradación. La degradación de Clb2, dependiente de Cdc20, es necesaria para disminuir los niveles de Cdc28 y para que la fosfatasa Cdc14 (mediante defosforilación) permita la activación de Cdh1 y la posterior salida de la mitosis (Yeong *et al.*, 2000).

Recientemente, Visintin y colaboradores propusieron que la liberación de Cdc14 al núcleo se produce sólo cuando Cdc14 y Net1 son fosforilados y que dicha liberación es inducida por la actividad de Cdc5. La liberación de Cdc14 por Cdc5 se realiza de dos maneras: 1) fosforilando directamente a Cdc14 (lo cual provoca una liberación transitoria), y 2) activando la vía MEN, que induce la fosforilación de Net1. Estos dos mecanismos son necesarios para mantener a Cdc14 en el núcleo durante la transición anafase-telofase (Visintin *et al.*, 2003).

## INTRODUCCIÓN



**Figura 10. Control de la mitosis en *S. cerevisiae*.** La progresión de la mitosis es dirigida por el APC. El APC asociado a los co-activadores Cdc20 o Cdh1 activa y facilita la degradación de sustratos presentes en la fase temprana y tardía de la mitosis. Durante la transición metafase-anafase los niveles elevados de Pds1 y de las ciclinas mitóticas mantienen en un estado inactivo a Cdh1. La fase temprana de la mitosis es regulada por el APC<sup>cdc20</sup>. Durante la transición metafase-anafase el APC<sup>cdc20</sup> degrada a la segurina Pds1 y a la ciclina de fase S Clb5. La degradación de Pds1 promueve la liberación de la proteasa Esp1, que a su vez, permite la separación de las cromátidas hermanas por escisión de la cohesina Scc1 y la subsecuente entrada en anafase. La degradación de Clb2, dependiente de Cdc20, disminuye los niveles de Cdc28 y promueve la activación de Cdh1 por la fosfatasa Cdc14, cuya actividad es regulada por la vía MEN y FEAR. El APC<sup>cdh1</sup> marca posteriormente el pool remanente de ciclinas de tipo B para su degradación, promoviendo la salida de la mitosis (imagen adaptada de Wassmann and Benezra, 2001).

### 2.5.3. Vías de señalización que regulan el ciclo celular. Sistemas de vigilancia o *checkpoints*

La integridad del genoma es clave en el mantenimiento de la viabilidad celular. Para asegurar el mantenimiento de la estabilidad genómica, las células eucariotas poseen mecanismos moleculares de control que se encargan de detectar lesiones y defectos estructurales así como de coordinar una respuesta global de reparación y parada transitoria del ciclo de división. Estos mecanismos, comúnmente conocidos como sistemas de vigilancia o *checkpoints*, se encuentran presentes en todas las fases del ciclo celular y se

encargan de controlar los pasos críticos de cada una de ellas, asegurándose que el ciclo no progrese a la siguiente fase sin haber completado correctamente la fase anterior (Hartwell and Weinert, 1989). Los *checkpoints*, por tanto, garantizan el mantenimiento de la estabilidad genómica y la viabilidad celular.

Los *checkpoints* se encuentran conservados evolutivamente desde levaduras hasta humanos y siguen la típica estructura de las cascadas de transducción de señales (Elledge, 1996b). Están conformados por elementos sensores que detectan la lesión y transfieren la señal a elementos transductores que, a su vez, transmiten y amplifican la señal a moléculas adaptadoras que, finalmente, activan a diferentes elementos efectores que son los responsables de desencadenar la respuesta global de reparación y parada transitoria del ciclo celular.

Durante la progresión del ciclo celular existen diferentes puntos críticos de control o *checkpoints* que regulan, de una manera estrictamente programada y coordinada, las transiciones de cada uno de los eventos que se realizan en las diferentes fases del ciclo cromosómico (G1-S-G2-M).

El primer punto de control se encuentra situado en el START de la fase G1 y es el encargado de: 1) controlar que la célula tenga el tamaño adecuado para iniciar un nuevo ciclo de síntesis del DNA, 2) que los posibles daños en el DNA que se hayan podido originar en la anterior duplicación hayan sido correctamente reparados, y 3) que las condiciones externas sean las más óptimas para iniciar un nuevo ciclo de división (Elledge, 1996a). Para las levaduras, las condiciones externas favorables son la presencia de ciertos nutrientes en el medio y la ausencia de feromonas sexuales que inician los procesos de conjugación y división meiótica.

El segundo punto de control es el *checkpoint* que opera en fase S y es el encargado de promover la inducción de la transcripción de genes implicados en la reparación del DNA afectado por una lesión o por un estrés replicativo (Lisby *et al.*, 2004), estabilización de las horquillas de replicación dañadas y supresión de su poder hiper-recombinogénico (Lopes *et al.*, 2001), y finalmente,

---

## INTRODUCCIÓN

inhibición de la progresión del ciclo celular para evitar que la célula se divida sin tener todo el DNA correctamente replicado (Hartwell and Kastan, 1994).

El tercer punto de control opera en fase G2 y es el responsable de controlar: 1) que el DNA haya sido completamente replicado en fase S, 2) que cualquier daño en el DNA haya sido reparado, y 3) que la célula tenga el tamaño suficiente para dividirse (Chen *et al.*, 2000; Tyson *et al.*, 2002).

El cuarto punto de control que opera durante la mitosis es el responsable de monitorizar el ensamblaje y posicionamiento del *spindle* y el alineamiento de los cromosomas (Kops *et al.*, 2005). Si existen problemas en estos dos mecanismos, el *checkpoint* de la mitosis bloquea la activación de la vía MEN (Tyson *et al.*, 2002).

Recientemente, han sido identificados adicionales *checkpoints* entre los que se encuentran el *checkpoint* de la morfología de la pared celular y el *checkpoint* de la morfogénesis, que monitorizan la síntesis de la pared celular, la formación de la gema, el tamaño celular, perturbaciones en el esqueleto de actina y posible organización de las septinas (Barral *et al.*, 1999; Harvey and Kellogg, 2003; Lew, 2003; Suzuki *et al.*, 2004).

### **2.5.4. Activación de los *checkpoints* que regulan la mitosis en *S. cerevisiae***

Como hemos mencionado anteriormente, *S. cerevisiae* inicia la replicación del DNA y la formación del *spindle* mitótico de manera simultánea. Para evitar la generación de aneuploidías en las células hijas, es esencial que el *spindle* mitótico no se elongue antes de que la replicación del DNA haya sido completada. El orden de estos eventos es controlado por los *checkpoints* que operan en las transiciones metafase-anafase y mitosis-G1 del ciclo celular (ver figura 10) e incluyen a los *checkpoints* de fase S, del *spindle* y de la morfogénesis. Estos *checkpoints* son los encargados de coordinar que la completa formación de la gema y el comienzo de la mitosis mantengan una relación de dependencia con la repolarización del esqueleto de actina y la culminación de la replicación del DNA (Lew and Reed, 1995; Elledge, 1996a), así como que la separación de las cromátidas hermanas no se realice hasta

que todos los cinetocoros se hayan unido correctamente a los microtúbulos del *spindle* mitótico (Amon, 1999; Musacchio and Salmon, 2007).

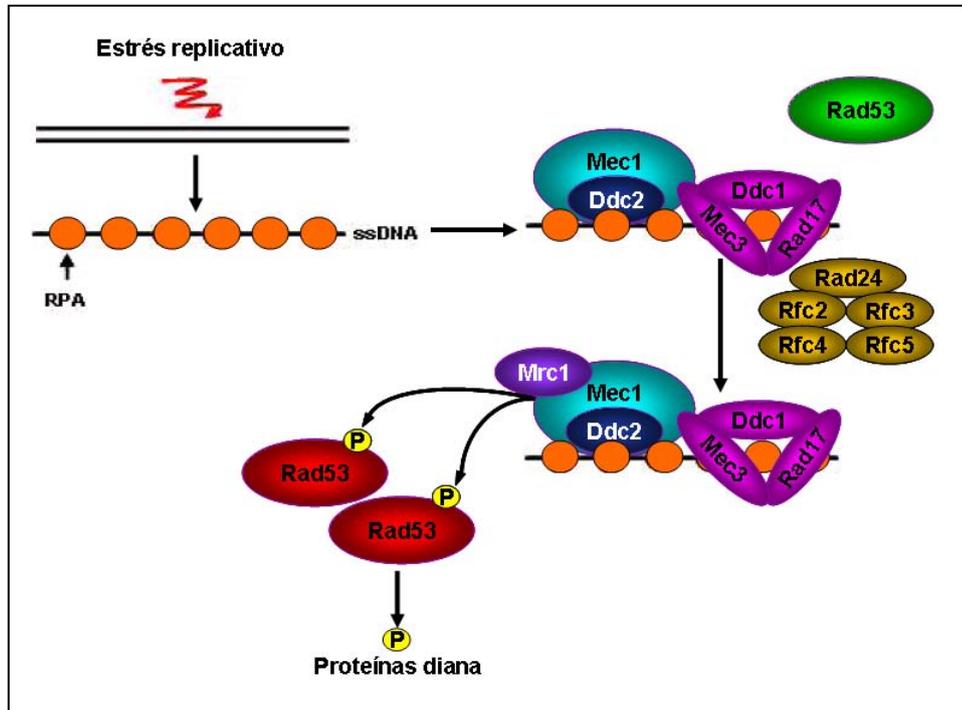
#### **2.5.4.1. Checkpoint de fase S**

En respuesta a un estrés genotóxico, el *checkpoint* de fase S impide la progresión de la transición metafase-anafase (Agarwal *et al.*, 2003) y la salida de la mitosis (Sanchez *et al.*, 1999).

La señal de activación del *checkpoint* de fase S es provocada por la separación de la doble cadena de DNA (ssDNA). El ssDNA, generado como consecuencia de una exposición a un estrés replicativo o a daño en el DNA, es recubierto rápidamente por la proteína de unión al DNA de cadena sencilla, Replication Proteína A (RPA) (Zhou and Elledge, 2000). En el lugar de la lesión la formación del complejo ssDNA-RPA permite el reclutamiento del complejo sensor Rad17-Mec3-Ddc1 (comúnmente denominado complejo 17-3-1) (Kondo *et al.*, 1999; Majka and Burgers, 2003) y del complejo formado por la quinasa transductora de señal Mec1 y Ddc2 (proteína que se asocia físicamente con el dominio amino-terminal de Mec1 en respuesta a estrés del DNA) (Rouse and Jackson, 2000). El complejo 17-3-1 es reclutado al lugar de la lesión gracias a su interacción con un complejo proteico formado por Rad24 y el factor de transcripción RFC (complejo Rad24-RFC) (Green *et al.*, 2000). Una vez localizado en el lugar de la lesión, el complejo 17-3-1 actúa como una plataforma de reclutamiento de proteínas adaptadoras y estimula la actividad de Mec1 (Majka *et al.*, 2006). El complejo Mec1-Ddc2 es reclutado directamente por la unión de Ddc2 con el complejo ssDNA-RPA (Kim and Brill, 2003). Mec1, a la vez, fosforila a los adaptadores Rad9 (adaptador en respuesta a daño en el DNA) o Mrc1 (adaptador en respuesta a estrés replicativo), según sea el caso. Finalmente, estos adaptadores actúan como un andamiaje que permite incrementar la concentración de Rad53 en el lugar de la lesión, facilitando su posterior activación mediante fosforilación por Mec1 (Lee *et al.*, 2003). La fosforilación de Rad53 por Mec1 promueve la homodimerización de Rad53 (Lee *et al.*, 2003) permitiendo su autohiperfosforilación en *trans*, que correlaciona con la forma activa de la

## INTRODUCCIÓN

quinasa efectora (Lopes *et al.*, 2001). Una vez activada, Rad53 difunde la señal mediante la fosforilación de proteínas sustratos, a través de las cuales el *checkpoint* ejerce su respuesta (Figura 11) (Gilbert *et al.*, 2001; Smolka *et al.*, 2005; Sweeney *et al.*, 2005).



**Figura 11. Modelo de activación del *checkpoint* de la fase S en respuesta a estrés replicativo.** El desacoplamiento de la helicasa debido a una parada en la actividad de las DNA polimerasas genera ssDNA, que es protegido por la proteína RPA. El complejo ssDNA-RPA recluta a la quinasa transductora central Mec1 a través de Ddc2. Además, el complejo Rad24-Rfc2-5 recluta en el lugar de la lesión al trímero formado por Rad17-Mec3-Ddc1, necesario para la activación de Mec1 y para el reclutamiento de la proteína adaptadora de señal Mrc1. A través de Mrc1, Mec1 interacciona y pre-activa a Rad53 mediante fosforilación. La fosforilación de Rad53 por Mec1 induce su completa activación mediante auto-hiperfosforilación en *trans*. Rad53 activada difunde la señal a diferentes proteínas sustratos.

Ante un estrés replicativo, el complejo Mec1-Rad53 induce la activación del *checkpoint* de fase S mediante la activación de Dun1, una Ser/Thr quinasa que controla la respuesta transcripcional de Rad53 (Zhou and Elledge, 1993). Dun1 fosforila y estabiliza al complejo Bfa1-Bub2 y como consecuencia de ello, se inhibe la vía MEN y la salida de la mitosis (Pereira *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000). Estudios adicionales indican que Rad53 también es capaz de bloquear

la salida de la mitosis mediante la inhibición de Cdc5, una polo-like quinasa que promueve la activación de la vía MEN (Sanchez *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2001).

Otra vía de respuesta ante un estrés replicativo es el bloqueo en la progresión del ciclo celular en la transición metafase-anafase. Este mecanismo de respuesta se realiza también vía Mec1 pero de manera independiente de Rad53. Cuando la replicación del DNA es afectada, Mec1 induce tanto la parada del ciclo celular mediante la inhibición de la degradación de la segurina Pds1, por el APC<sup>Cdc20</sup> (Yamamoto *et al.*, 1996; Sanchez *et al.*, 1999; Agarwal *et al.*, 2003; Andrews *et al.*, 2005), como la expresión de genes encargados de la maquinaria de reparación del DNA dañado (Smith *et al.*, 2002).

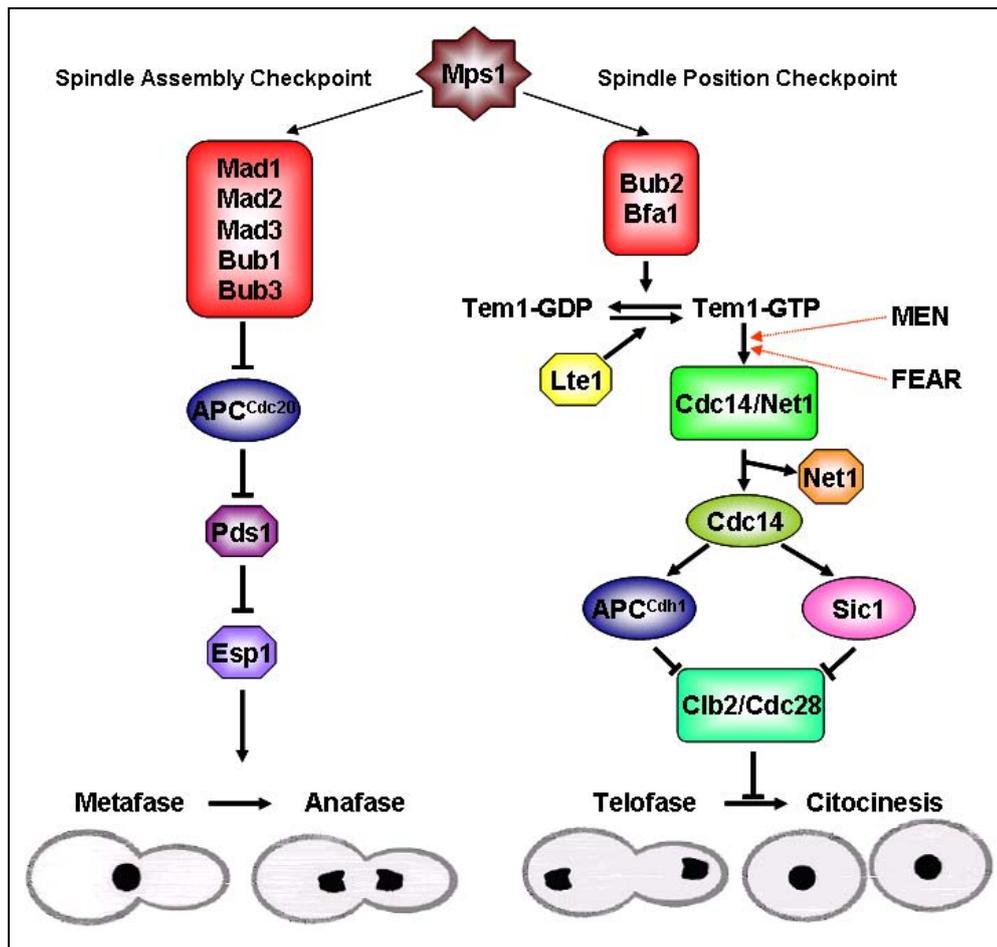
Dado el rol central de las Ser/Thr quinasas en la activación de la respuesta ante un estrés replicativo, deben existir proteínas fosfatasas que estén involucradas en el mecanismo de recuperación y/o adaptación. Estudios recientes indican que este mecanismo de recuperación va siempre acompañado de la inactivación de Rad53 y es llevado a cabo por las Ser/Thr fosfatasas Ptc2 y Ptc3 en *S. cerevisiae*, (Leroy *et al.*, 2003) y las Ser/Thr fosfatasas: PP1, PP2A, PP2C y PP5 en otros organismos eucariotas (den Elzen and O'Connell, 2004; Dozier *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2005; Leung-Pineda *et al.*, 2006; Lavin and Kozlov, 2007; Oliva-Trastoy *et al.*, 2007; Yong *et al.*, 2007).

#### **2.5.4.2. Checkpoint del spindle mitótico**

En *S. cerevisiae*, la transición metafase-anafase está regulada por la bifurcación de dos *checkpoints* que controlan de una manera coordinada y secuencial el ensamblaje y posicionamiento del *spindle* mitótico. Estos *checkpoints* vigilan que la célula no realice la segregación cromosómica hasta que todos los cromosomas hayan sido correctamente bi-orientados y unidos a los microtúbulos (MTs) del *spindle* mitótico. Los principales componentes del *checkpoint* del *spindle* mitótico, Mad1 y Bub2, son activados por la proteína quinasa Mps1 e inducen una parada del ciclo celular en diferentes fases de la mitosis. La vía controlada por Mad2 (*spindle assembly checkpoint*) inhibe la

## INTRODUCCIÓN

transición metafase-anafase mediante el bloqueo de la degradación de Pds1-dependiente del APC<sup>cdc20</sup>; mientras que la vía controlada por Bub2 (*spindle position checkpoint*) inhibe la salida de la mitosis mediante el bloqueo de la degradación de las ciclinas de tipo B dependientes del APC<sup>cdh1</sup>, y el mantenimiento de la actividad CDK. Ambas vías son requeridas para inducir una parada en la mitosis (ver figura 12).



**Figura 12. Bifurcación del *checkpoint* del *spindle* mitótico.** Las proteínas del *checkpoint* del *spindle* mitótico Mad1 y Bub2 son activadas por la proteína quinasa Mps1 e inducen una parada del ciclo celular en diferentes fases de la mitosis. La vía controlada por Mad2 (*spindle assembly*) inhibe la transición metafase-anafase mediante el bloqueo de la degradación de Pds1, dependiente del APC<sup>cdc20</sup>; mientras que la vía controlada por Bub2 (*spindle position*) inhibe la salida de la mitosis mediante el bloqueo de la degradación de las ciclinas de tipo B, dependiente del APC<sup>cdh1</sup>, y el mantenimiento de la actividad CDK. Ambas vías son requeridas para inducir una parada en la mitosis (imagen adaptada de Smith *et al.*, 2002)

El *spindle assembly checkpoint* controla el ensamblaje de los MTs del *spindle* mitótico y retrasa la entrada en anafase cuando los cromosomas duplicados no han sido correctamente unidos al *spindle* mitótico. Para activar esta respuesta, los componentes de este checkpoint deben localizarse de una manera gerárquica en el cinetocoro (complejo multiproteico formado por la unión de los microtúbulos (MT) del *spindle* con el centrómero). La localización de estas proteínas en el cinetocoro parece ser requisito indispensable para su activación y función. Así, las quinasas Ipl1, Mps1 y Bub1 localizan en el cinetocoro cuando se inicia la cascada de señalización, mientras que la quinasa Mad3 y las fosfoproteínas Mad1 y Mad2 una vez iniciada la respuesta (Vigneron et al., 2004).

Uno de los principales motores de este mecanismo de supervivencia es la quinasa Aurora B Ipl1 que promueve la unión bipolar de los microtúbulos con el cinetocoro y resulta esencial para la correcta segregación cromosómica. Ante defectos en la correcta unión cinetocoro-microtúbulos, Ipl1 produce una señal de desestabilización que puede ser captada por la maquinaria Mad1-3/Bub1-3, responsable de desencadenar la respuesta de activación del *checkpoint* del *spindle* mitótico (Biggins and Murray, 2001). Ipl1, por tanto, juega un importante rol como componente sensor de tensión del cinetocoro y constituye uno de los principales motores en la vía de transducción de señales que responde ante defectos en la tensión del sistema cinetocoro-MTs mediante la fosforilación de proteínas del cinetocoro y desestabilización de las interacciones cinetocoro-MTs que no están bajo tensión (Biggins *et al.*, 1999; Pinsky *et al.*, 2009).

Los complejos DAM1 y NDC80 que se localizan en la capa central del cinetocoro juegan un rol esencial como mediadores de la conexión cinetocoro-MT y son regulados por Ipl1 mediante fosforilación. La interacción entre Ndc80 y Dam1 es esencial para la unión de Dam1 con el cinetocoro. Ante la falta de tensión, Ipl1 fosforila Dam1 y hace que la interacción con Ndc80 sea más laxa, activando la vía del *checkpoint* del *spindle*. Aún no ha sido dilucidado el mecanismo por el cual la fosforilación de Dam1 activa esta vía pero se sabe que Dam1 interacciona con los principales componentes de este *checkpoint*

---

## INTRODUCCIÓN

(Mad1-3, Bub1-3 y Mps1). Probablemente Ipl1 actúa modulando la activación de la quinasas Mps1 y Bub1 mediante la fosforilación de Dam1. La activación de estas quinasas promueve el reclutamiento del complejo Mad1-Mad2 en el cinetocoro, mediante la fosforilación de Mad1, evitando que los microtúbulos se unan a él y desencadenando de esta manera la activación del *checkpoint* (Chen *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999). Una vez activado este *checkpoint*, Cdc20 es reclutado en el cinetocoro por el complejo Mad3-Bub3. Mad2 es separada del complejo Mad1-Mad2 mediante fosforilación (aun no se sabe el mecanismo) y se une al complejo Mad3-Bub3-Cdc20 para formar el complejo MCC (Mitotic Checkpoint Complex) (Shah and Cleveland, 2000; Sironi *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2002). Este complejo difunde fuera del cinetocoro para asociarse con el APC y bloquear su actividad, evitando así la degradación de la securina Pds1 y la progresión del ciclo celular a través de la mitosis (Zachariae and Nasmyth, 1999; Zachariae, 2004) (ver figura 12).

Entre las posibles proteínas diana de Ipl1 se encuentran: 1) la proteína específica del centrómero Cse4, que es esencial para la segregación cromosómica (Meluh *et al.*, 1998; Cheeseman *et al.*, 2002b), 2) la proteína de la capa interna del cinetocoro Cbf2/Ndc10, que forma parte del complejo CBF3 y es la responsable, junto con Cse4, de formar un andamiaje que permite la unión del DNA centromérico con el cinetocoro (Hsu *et al.*, 2000; Fraschini *et al.*, 2001; de Wulf *et al.*, 2003), 3) la proteína que se localiza en la capa central del cinetocoro Sli15, que forma parte del complejo quinasa Ipl1-Sli15 y es esencial en la bi-orientación de los cromosomas (Tanaka *et al.*, 2002; Dewar *et al.*, 2004) y 4) las proteínas de la capa externa del cinetocoro Dam1 y Ndc80. Dam1 forma parte del complejo DAM1 y es esencial para el mantenimiento de la unión bipolar de los microtúbulos al cinetocoro (Kang *et al.*, 2001). Ndc80 forma parte del complejo NDC80 y es requerido para la correcta localización y unión del cinetocoro con el complejo DAM1 (Wigge and Kilmartin, 2001). Sin embargo, aún no está clara la importancia de estas proteínas como sustratos *in vitro* e *in vivo* de Ipl1 y su papel en la modulación de la segregación cromosómica. Por ejemplo, en *S. cerevisiae*, la mutación del sitio de fosforilación de la histona H3 por la quinasa Ipl1 no produce efectos ni en el

crecimiento ni en la viabilidad celular (Hsu *et al.*, 2000). Ndc10, Sli15, Ndc80 y Dam1 parecen ser buenas dianas de Ipl1 *in vitro*, pero los sitios específicos de fosforilación de cada una de ellas se desconoce y la importancia funcional de los sitios de fosforilación por Ipl1 aún no ha sido demostrada (Shang *et al.*, 2003).

La Ser/Thr fosfatasa de tipo 1, Glc7 antagoniza la función de Ipl1 mediante la desfosforilación de sus sustratos (Sassoon *et al.*, 1999; Hsu *et al.*, 2000) y/o la regulación directa de su actividad (Murnion *et al.*, 2001). Dado que Ipl1 es importante en la bi-orientación de los cromosomas, Glc7 podría también estar involucrada en este proceso. En este sentido, ha sido demostrado que la falta de función de Glc7 provoca una elevada deficiencia en la segregación cromosómica y activa el *checkpoint* que controla el posicionamiento del *spindle* y la salida de la mitosis (Bloecher and Tatchell, 1999; Sassoon *et al.*, 1999).

**El *spindle position checkpoint*** bloquea la salida de la mitosis retrasando la activación de la vía MEN hasta que los *spindles* mitóticos hayan sido completamente alineados a través de su interacción con los MTs astrales, los cables polarizados de actina y las proteínas corticales, a lo largo del eje central que se forma entre la célula madre e hija. MEN es una vía de transducción de señales que promueve la salida de la mitosis mediante la liberación al núcleo y posterior activación de la fosfatasa Cdc14 durante la anafase. La activación de Cdc14 permite la degradación de las ciclinas mitóticas de tipo B por el complejo APC<sup>cdh1</sup> y la estabilización del inhibidor de Clb-Cdc28 Sic1 (Visintin *et al.*, 1998; Jaspersen *et al.*, 1999). Los componentes de la vía MEN son restringidos al SPB de la célula hija o al córtex de la gema e impiden el inicio de la cascada de señalización de la salida de la mitosis hasta que el núcleo haya entrado en la gema (Bardin *et al.*, 2000). Otro sistema de regulación de la vía MEN es el complejo con actividad GTPasa formado por las quinasas Bub2 y Bfa1. Este complejo se localiza en los SPBs durante la progresión del ciclo celular (Fraschini *et al.*, 1999) e inhibe a la vía MEN en respuesta a defectos en el alineamiento de los *spindles* mitóticos (Alexandru *et al.*, 1999). Por tanto, esta vía estabiliza a los complejos ciclinas-Cdc28 y evita su inhibición por Sic1 hasta que los *spindles* mitóticos sean correctamente

---

## INTRODUCCIÓN

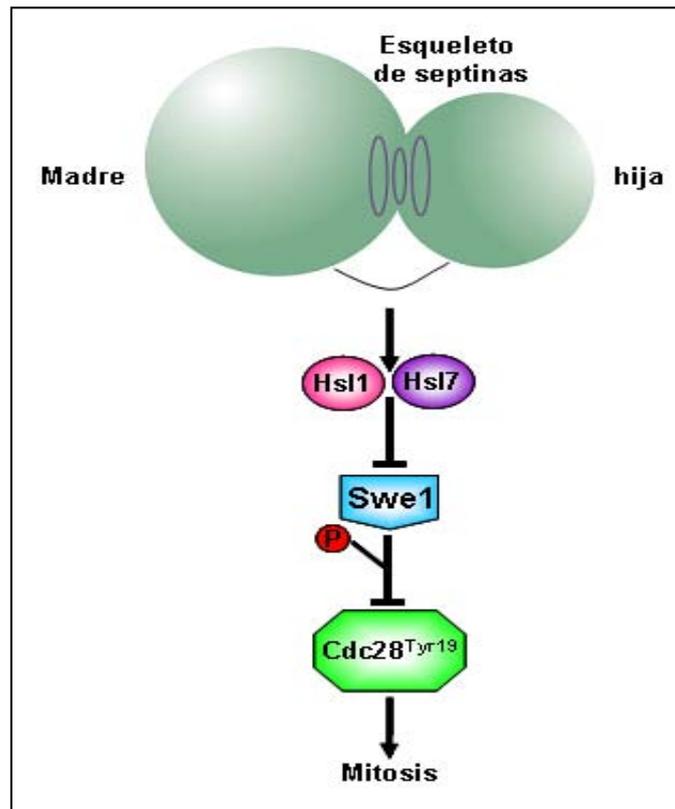
alineados a lo largo del eje central que se forma entre la célula madre e hija (ver figura 12).

### 2.5.4.3. *Checkpoint* de la morfogénesis

*S. cerevisiae* se divide por gemación, un proceso crítico que requiere la coordinación de la morfogénesis celular con la progresión del ciclo celular. Esta coordinación es llevada a cabo por la quinasa dependiente de ciclinas, Cdc28 (Lew, 2003). La actividad de Cdc28 se encuentra determinada por diferentes proteínas reguladoras, incluyendo la proteína quinasa Swe1 que inhibe su actividad mediante fosforilación en el residuo conservado Tyr<sup>19</sup> (Booher *et al.*, 1993). Esta fosforilación es revertida por la fosfatasa Mih1 (Russell *et al.*, 1989). Los niveles de Swe1 son controlados por la vía del *checkpoint* de la morfogénesis (Lew, 2003), que responde a perturbaciones en la organización del citoesqueleto, formación de la gema y tamaño de la célula, resultando en la acumulación de Swe1 y, por ende, retraso en la entrada de la mitosis (Kellogg, 2003; Lew, 2003). La actividad de Swe1 depende de varios factores, incluidas las septinas. Las septinas sirven como andamiaje para reclutar a Swe1 y a las quinasas que la regulan por fosforilación (Barral *et al.*, 1999). Una vez fosforilada, Swe1 es ubiquitinada para su posterior degradación por el complejo SCF y posiblemente también por el APC. (McMillan *et al.*, 2002; Thornton and Toczyski, 2003). Por tanto, la fosforilación de Swe1, evento normal en células con morfogénesis no alterada, es crítica en la regulación de Swe1 y constituye un importante mecanismo de control del ciclo celular que permite prevenir la división nuclear en ausencia de un correcto ensamblaje del esqueleto de actina y septinas en el cuello de la gema (Figura 13).

### 2.5.5. Papel de Glc7 en mitosis

La importancia de la fosforilación de proteínas en la regulación de los eventos mitóticos ha sido ampliamente estudiada y reconocida. Sin embargo, muchos de los trabajos se han centrado en el estudio del papel que desempeñan las proteínas quinasas, antes que en el que realizan las proteínas fosfatasas (Trinkle-Mulcahy and Lamond, 2006). Una de las más reconocidas y



**Figura 13. Modelo que ilustra el checkpoint de la morfogénesis regulado por Swe1.** El checkpoint de la morfogénesis monitoriza defectos en el crecimiento y/o la emergencia de la gema. Alteraciones en la organización del esqueleto de septinas en el cuello de la gema evita la degradación de Swe1 mediada por las proteínas quinasas Hsl1 y Hsl7. Swe1 inhibe la actividad de Cdc28 mediante fosforilación de su sitio activo, bloqueando el ciclo celular en G2/M (imagen adaptada de Hoyt, 2004).

conservadas funciones de PP1 es la defosforilación de sustratos mitóticos, un mecanismo esencial en la progresión del ciclo celular. Ello ha sido demostrado mediante: a) el uso de mutaciones realizadas en PP1 de *Drosophila*, levaduras y otros hongos, que indicaban que la falta de función de PP1 inducía un bloqueo en la mitosis (Doonan and Morris, 1989; Dombradi *et al.*, 1990; Hisamoto *et al.*, 1994; MacKelvie *et al.*, 1995; Andrews and Stark, 2000), y b) mediante la inyección de anticuerpos anti-PP1 en células de mamífero, los cuales inducían una parada en metafase (Fernandez *et al.*, 1992).

El mutante termosensible *glc7-10* genera un fenotipo de parada en mitosis y activa la vía del *checkpoint* del *spindle*, a la temperatura restrictiva de crecimiento. Estas células exhiben bajos niveles en la dinámica del

---

## INTRODUCCIÓN

acoplamiento cinetocoro-microtúbulos y una alta frecuencia de alteraciones en la segregación cromosómica (Bloecher and Tatchell, 1999; Sassoon *et al.*, 1999; Pinsky *et al.*, 2009). Además, mutaciones en *GLC7* que implican una función parcial de la fosfatasa pueden suprimir parcialmente defectos en el crecimiento de mutantes *ipl1* y/o restaurar los niveles normales de fosforilación de algunos sustratos de *Ipl1*, en estos mutantes (Francisco *et al.*, 1994; Hsu *et al.*, 2000; Pinsky *et al.*, 2009).

Durante la progresión del ciclo celular, la actividad de *Glc7* es regulada a través de cambios dinámicos en su localización. Estudios de localización, utilizando la proteína de fusión GFP, demostraron que *Glc7* localiza en el núcleo, predominantemente en el nucleolo, y en el cuello de la gema en forma de anillo (Bloecher and Tatchell, 1999; Sassoon *et al.*, 1999). Ello refuerza el rol de *Glc7* en la selección del sitio de emergencia de la gema, tal como lo demuestra el estudio realizado en el mutante *glc7-129*, que exhibe un fenotipo de patrón de gemación al azar a la temperatura restrictiva de crecimiento (Bloecher and Tatchell, 2000). Al inicio de la anafase, *Glc7* se acumula en los SPBs y permanece allí hasta la citocinesis, momento en el cual se concentra en forma de anillo co-localizado con el anillo de actomiosina que separa la célula madre de la hija (Bloecher and Tatchell, 2000).

Las isoformas de PP1 de mamífero también muestran un patrón dinámico de localización durante la progresión del ciclo celular. Estudios de localización, utilizando la proteína de fusión EYFP, indican que la isoforma *PP1 $\alpha$*  se encuentra asociada al centrosoma (SPBs en levaduras) (Andreassen *et al.*, 1998) así como a los cinetocoros durante la transición metafase-anafase. La isoforma *PP1 $\gamma$*  también se acumula en los centrosomas y el cinetocoro pero, a diferencia de *PP1 $\alpha$* , es reclutada dentro de la cromatina durante la transición metafase-anafase (Trinkle-Mulcahy and Lamond, 2006). El patrón de localización de la isoforma *PP1 $\beta$*  aún no ha sido estudiado en detalle pero los primeros datos apuntan a que se encuentra predominantemente en los cromosomas (Andreassen *et al.*, 1998).

Finalmente, a pesar de la abundancia de *Glc7* en el núcleo y su vinculación en el mecanismo de la bi-orientación de los cromosomas en el

*spindle* mitótico (Bloecher and Tatchell, 1999; Sassoon *et al.*, 1999), aún no ha sido demostrado si Glc7 forma parte de los complejos del cinetocoro. Además, poco se sabe acerca de las subunidades que modulan su localización nuclear o su actividad durante la progresión del ciclo celular, aunque estudios recientes apuntan como principales candidatos a Sds22 (Peggie *et al.*, 2002) e Ypi1 (Bharucha *et al.*, 2008a).



### **3. OBJETIVOS**



### **3. OBJETIVOS**

Ypi1 y Sds22 son las dos únicas subunidades reguladoras esenciales de la proteína fosfatasa de tipo1 de *S. cerevisiae* (Glc7). Dado el escaso conocimiento acerca de su implicación en la regulación de la actividad de Glc7 en la fisiología celular de la levadura, en este trabajo nos hemos planteado como objetivo principal estudiar el papel funcional y los mecanismos de regulación de Ypi1 y Sds22 como subunidades reguladoras esenciales de la fosfatasa Glc7, mediante:

- 1- El estudio fenotípico de la sobreexpresión de Ypi1.
- 2- La creación de mutantes condicionales basados en la expresión regulable del gen *YPI1*.
- 3- La búsqueda de genes supresores en multicopia de la letalidad provocada por la falta de *YPI1*.
- 4- El estudio de los cambios a nivel transcripcional causados por la ausencia de *YPI1*.
- 5- El estudio del papel funcional de Ypi1 y Sds22 mediante ensayos fenotípicos e interacciones genéticas.



## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO

Se utilizó la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* como huésped para la clonación de DNA y su crecimiento se realizó en medio LB (suplementado, cuando era necesario, con 50  $\mu$ g/ml de ampicilina para la selección de los plásmidos), en agitación y a una temperatura constante de 37 °C.

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo están citadas en la tabla 4. Para el crecimiento de las cepas se utilizó medio YPD (*yeast extract-peptone-dextrose*), YPD-G418 (YPD conteniendo 200  $\mu$ g/ml de G418), YPD-NAT (YPD conteniendo 200  $\mu$ g/ml nourseothricina) YPD-Dox (YPD conteniendo diferentes concentraciones de doxiciclina a partir de una solución stock de 5 mg/ml de doxiciclina, diluída en etanol al 50 %), SC (*synthetic medium*) o CM (*complete medium*) (Adams *et al.*, 1997), según los casos. Las levaduras crecieron en medio líquido a una temperatura constante de 28 °C (si no se indica otra cosa) y con una agitación de 230 rpm.

### 4.2. PLÁSMIDOS

Los plásmidos utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

- **pTS842**, plásmido centromérico utilizado como vector del sistema de expresión basado en el uso de un degrón (Bachmair and Varshavsky, 1989).
- **pCM182**, plásmido centromérico utilizado como vector de expresión del sistema *tetO<sub>2</sub>* regulable por doxiciclina (Gari *et al.*, 1997).
- **pCM224**, utilizado para amplificar el promotor *tetO<sub>2</sub>* regulable por doxiciclina (Belli *et al.*, 1998).
- **pCM325**, utilizado para amplificar el promotor *tetO<sub>7</sub>* regulable por doxiciclina (Yen *et al.*, 2003).
- **pAG25**, utilizado para amplificar el casete *nat1* (Goldstein and McCusker, 1999)
- **pWS93** plásmido multicopia con un promotor *ADH1*, utilizado como control en los estudios de sobreexpresión (García-Gimeno *et al.*, 2003).

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

- **pWS93-Ypi1**, **pWS93-Ypi1W53A**, plásmidos multicopia donde Ypi1 y la variante de Ypi1 en el sitio de unión a Glc7 son expresados desde un promotor *ADH1*. Fueron utilizados para los estudios de sobreexpresión (Garcia-Gimeno *et al.*, 2003).
- **pWS93-Sds22**, utilizado para los estudios de sobreexpresión (Pedelini *et al.*, 2007).
- **pWS93-CDC26**, un fragmento de 0,39 kpb que comprende el ORF completo de *CDC26* fue amplificado por PCR utilizando los oligos *CDC26-EcoRI.Up* y *CDC26-BamHI.Do* (ver tabla 6), que contienen una diana artificial de restricción EcoRI y BamHI, respectivamente. El producto obtenido por PCR fue digerido con las enzimas EcoRI/BamHI y clonado *in frame* con la región que codifica las tres copias del epítipo HA, en los mismas dianas de restricción del plásmido pWS93.
- **pWS93-CDC11**, un fragmento de 1,25 kpb que comprende el ORF completo de *CDC11* fue amplificado por PCR utilizando los oligos *SmaI-Up-CDC11* y *Sall.Do-CDC11* (ver tabla 6), que contienen un sitio artificial de restricción SmaI y Sall, respectivamente. El producto obtenido por PCR fue digerido con las enzimas SmaI/Sall y clonado *in frame* en los mismos sitios de restricción del plásmido pWS93.
- **YEplac195**, plásmido episomal utilizado como control en los estudios de sobreexpresión (Gietz and Sugino, 1988).
- **YEplac195-YPI1**, un fragmento de 1,88 kbp que comprende la secuencia desde 0,84 kpb *upstream* del codón de inicio hasta 0,49 kpb *downstream* del codón de terminación de *YPI1* fue digerido con las enzimas EcoRI/KpnI y clonado con las mismas enzimas en el plásmido YEplac195.
- **YEplac195-CDC26**, un fragmento de 1,2 kpb que comprende la secuencia desde 0,38 kpb *upstream* del codón de inicio hasta 0,39 kpb *downstream* del codón de terminación de *CDC26* fue amplificado por PCR utilizando los oligos *CDC26-HindIII.Up* y *CDC26-EcoRI.Do* (ver tabla 6), que contienen una diana artificial de restricción HindIII y EcoRI, respectivamente. El producto obtenido por PCR fue digerido con las enzimas HindIII/EcoRI y clonado en las mismas dianas de restricción del plásmido YEplac195.

- **YEpLac195-GLC7**, un fragmento de 3,7 kpb que comprende la secuencia desde 2,07 kpb *upstream* del codón de inicio hasta 0,15 kpb *downstream* del codón de terminación de *GLC7* fue amplificado por PCR utilizando los oligos Glc7-BamHI.Up y Glc7-PstI.Do (ver tabla 6), que contienen una diana artificial de restricción BamHI y PstI, respectivamente. El producto obtenido por PCR fue digerido con las enzimas BamHI/PstI y clonado en las mismas dianas de restricción del plásmido YEpLac195.
- **YEpLac195-GLC7F256A**, utilizado para fenotipos de sobreexpresión (ver apartado de mutagénesis dirigida).
- **YCpLac33**, plásmido centromérico utilizado como control (Myers *et al.*, 1986; Gietz and Sugino, 1988).
- **YCpLac33-CDC26**, fue construido de la misma manera que el plásmido YEpLac195-CDC26.
- **pAC115**, plásmido centromérico utilizado como vector de expresión de la proteína de fusión Cdc11-GFP desde el promotor endógeno del plásmido (Casamayor and Snyder, 2003).
- **YEp356**, plásmido reporter utilizado para la clonación del promotor de *CDC26* (Myers *et al.*, 1986).
- **pCDC26-LacZ**, la construcción de este plásmido se realizó como sigue: la región -209 a -1 *up-stream* respecto al codón de inicio del gen *CDC26* se amplificó por PCR usando los oligos prom-CDC26-Sall.Up.2 y prom-CDC26-HindIII.Do (ver tabla 6) que contienen una diana artificial de restricción Sall y HindIII, respectivamente. El producto obtenido por PCR fue digerido con las enzimas Sall/HindIII y clonado en las mismas dianas de restricción del plásmido YEp356 (Myers *et al.*, 1986).

#### **4.3. TÉCNICAS DE DNA RECOMBINANTE**

Las reacciones de restricción, ligaciones de DNA y otras técnicas de DNA recombinante fueron llevadas a cabo tal y como se ha descrito en (Sambrook *et al.*, 1989).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de reacción de 50 µl que contenían: 0.5 U de *Expand High Fidelity* DNA polimerasa (Roche), 1x

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

de tampón, 0.2 mM de cada dNTP y 10 ng de DNA molde. Las condiciones de reacción fueron de un ciclo inicial de 2 min a 92 °C para desnaturalizar el DNA molde, seguido de 25 ciclos, en los cuales la desnaturalización se realizó durante 1 min a 92 °C y las condiciones de hibridación y elongación se realizaron según el tamaño del fragmento a amplificar. Para el debrón, utilizando el plásmido pTS842 como molde: 1 min a 57 °C y 1 min a 72 °C, respectivamente. Para el casete *KanMX-tetO<sub>2</sub>*, utilizando el plásmido pCM224 como molde: 30 s a 50 °C y 4 min a 72 °C. Para el casete *KanMX-tetO<sub>7</sub>*, utilizando el plásmido pCM325 como molde: 30 s a 50 °C de hibridación seguido de 2,5 min a 72 °C para la elongación.

### 4.3.1. Transformaciones de células de *E. coli* y *S. cerevisiae*

Las células de *E. coli* fueron transformadas mediante el tratamiento estándar con cloruro cálcico (Sambrook *et al.*, 1989).

Las células de *S. cerevisiae* fueron transformadas siguiendo el método del acetato de litio modificado (Ito *et al.*, 1983). Para las transformaciones heterólogas empleando los casetes *KanMX-tetO*, después de la transformación, las células fueron resuspendidas en 0.5 ml de medio líquido fresco (YPD) e incubadas a 28 °C durante 3 horas, para permitir así que las células adquieran resistencia al antibiótico G418. Posteriormente, las células fueron sembradas en placas de YPD-G418, recientemente preparadas, para la selección de los transformantes resistentes a G418 (Webster and Dickson, 1983).

### 4.3.2. Verificación de transformantes resistentes a G418

La correcta recombinación del casete *KanMX4-tetO* fue verificada por PCR a partir de colonias (Huxley *et al.*, 1990). Para el casete *KanMX4-tetO* se utilizaron como cebadores: uno externo (5') al casete (tetO-Ypi1 comp. 5') y uno interno al mismo (K2 3'), correspondiente al marcador *KanMX4*. Las células se tomaron con una punta estéril y se depositaron en la base de un tubo Eppendorf que se incubó por 90 segundos en el microondas a máxima potencia, manteniendo la tapa del tubo abierta. Inmediatamente, las células

fueron colocadas a -20 °C durante 5 minutos y una vez en hielo, se resuspendieron en 25 µl de reacción de PCR. Finalmente, el DNA amplificado fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa.

#### **4.3.3. Esporulación de diploides**

Los transformantes positivos a la PCR de colonias se seleccionaron en placas de YPD-G418 y se inocularon en 5 ml de medio CM. Se incubaron durante 48 horas a 28 °C. A las 48 horas de incubación, los cultivos se centrifugaron a 1600 xg, se lavaron 2 veces con agua destilada estéril y se resuspendieron en 5 ml de medio de esporulación (Adams *et al.*, 1997), incubándose a 28 °C hasta que más del 50 % de células habían esporulado (4 - 7 días). Posteriormente, las células fueron sometidas a un análisis de *Random Spore* (Adams *et al.*, 1997), con la siguiente modificación: 1 ml de cultivo esporulado se resuspendió en 5 ml de agua estéril y se incubó, a temperatura ambiente y durante toda la noche, con 10 unidades de Zymoliasa-20T (MP Biomedicals, Inc.) y 10 µl de β-mercaptoetanol. Los cultivos así tratados se centrifugaron y las células fueron resuspendidas en 0,2 ml de agua estéril. Desde este paso, se siguió el método descrito (Adams *et al.*, 1997).

#### **4.3.4. Selección de haploides**

Una vez realizado el análisis por *Random Spore* las células fueron plaqueadas en medio YPD-G418 e incubadas a 28 °C durante 48-72 horas. De las colonias crecidas se hicieron réplicas en medio CM carente del marcador de selección del plásmido respectivo. Después de 48 horas de crecimiento se seleccionaron las colonias más pequeñas, como indicativo de haploidía y se sembraron en medio YPD para su posterior análisis de *mating test* según protocolos descritos (Trecó and Winston, 1998).

### **4.4. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES CONDICIONALES *ypl1***

Para ello hemos diseñado tres estrategias alternativas:

**A)** La creación de un degrón, donde la proteína Ypl1, bajo el control del promotor *GAL1*, es expresada de forma regulable y rápidamente degradable,

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

gracias a la fusión *in frame* del gen que codifica la ubiquitina (*Ub*) con el extremo N-terminal de Ypi1 (Bachmair and Varshavsky, 1989).

**B)** La expresión del gen *YPI1* desde un plásmido que contiene elementos del promotor *tetO*, regulable por doxiciclina (Gari *et al.*, 1997).

**C)** La sustitución del promotor nativo del gen *YPI1* por un promotor *tetO* (Belli *et al.*, 1998).

### 4.4.1. Creación de un degrón

Utilizando el plásmido pWS-Ypi1 (Garcia-Gimeno *et al.*, 2003) como molde y los cebadores 5'HindIII-Ypi1 degrón y 3'XbaI-Ypi1 (ver tabla 5), que llevan las dianas HindIII y XbaI, respectivamente; se amplificó mediante PCR, un fragmento de 572 pb que contenía el ORF completo del gen *YPI1* con 3 epítomos HA en la región N-terminal. El producto de PCR, fue analizado por electroforesis en gel de agarosa y purificado siguiendo el protocolo comercial del Kit Agarose Gel Extraction (Roche). Una vez purificado, tanto el fragmento de PCR como el plásmido pTS842 (Bachmair and Varshavsky, 1989) fueron digeridos con las enzimas HindIII y XbaI y posteriormente ligados, dando lugar al plásmido pTS-Ypi1, con el que se transformaron células de *E.coli*. El DNA plasmídico obtenido utilizando el kit High Pure Plasmid Isolation (Roche) fue verificado mediante la presencia de las dianas de restricción HindIII y XbaI y por secuenciación del DNA a partir del oligonucleótido 3' XbaI-Ypi1 degrón, en un secuenciador Applied Biosystems 3100.

La construcción así obtenida, fue introducida en la cepa diploide M5 *yip1::KAN/YPI1* (Garcia-Gimeno *et al.*, 2003), la cual fue posteriormente sometida a esporulación y a análisis de *Random Spore* para obtener la cepa haploide MMR02-1c (ver tabla 4). En la figura 14 se muestra la estrategia de expresión basada en la utilización de un degrón.

### 4.4.2. Construcción de un mutante condicional *yip1* regulable por doxiciclina usando el promotor *tetO* presente en el plásmido pCM182

A partir del plásmido pWS-Ypi1 un fragmento de 603 pb, conteniendo el ORF completo del gen *YPI1* unido a 3 epítomos HA, fue digerido con las

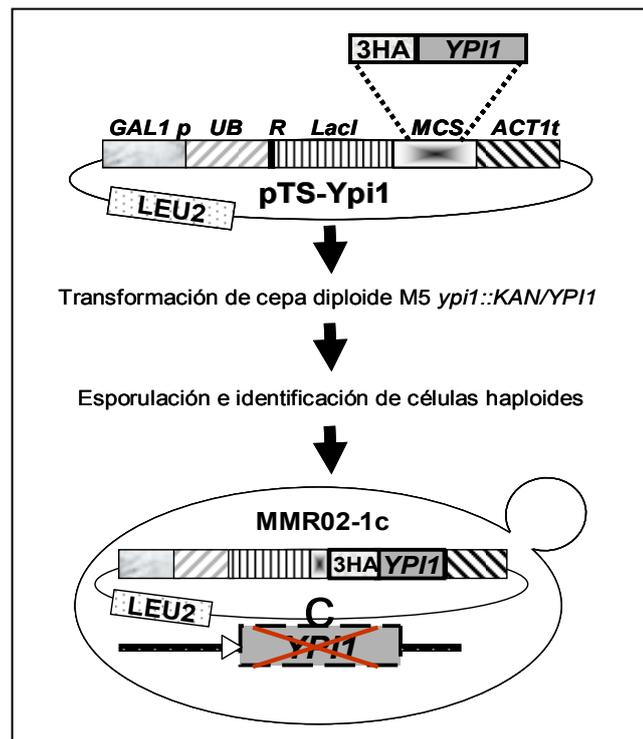


Figura 14. Estrategia de expresión de Ypi1 basada en un degrón

enzimas HindIII/Sall y subclonado en el plásmido pBluescriptSK+ para obtener el plásmido pBluescriptSK-Ypi1. Un fragmento de 637 pb que fue liberado mediante digestión con enzimas NotI/ApaI e insertado en el plásmido pCM182 (Gari *et al.*, 1997), fue digerido con las mismas enzimas de restricción dando lugar al plásmido pCM182-Ypi1. El mismo que fue introducido en la cepa diploide M5 *yip1::KAN/YPI1* (Garcia-Gimeno *et al.*, 2003). Esta cepa fue sometida a esporulación y a análisis de *Random Spore* para obtener la cepa haploide MMR05-5a (ver tabla 4). En la figura 15 se muestra la estrategia de expresión basada en este sistema.

#### 4.4.3. Construcción del mutante condicional *yip1* por sustitución cromosómica de su promotor.

La construcción de este sistema de expresión se realizó bajo dos aproximaciones:

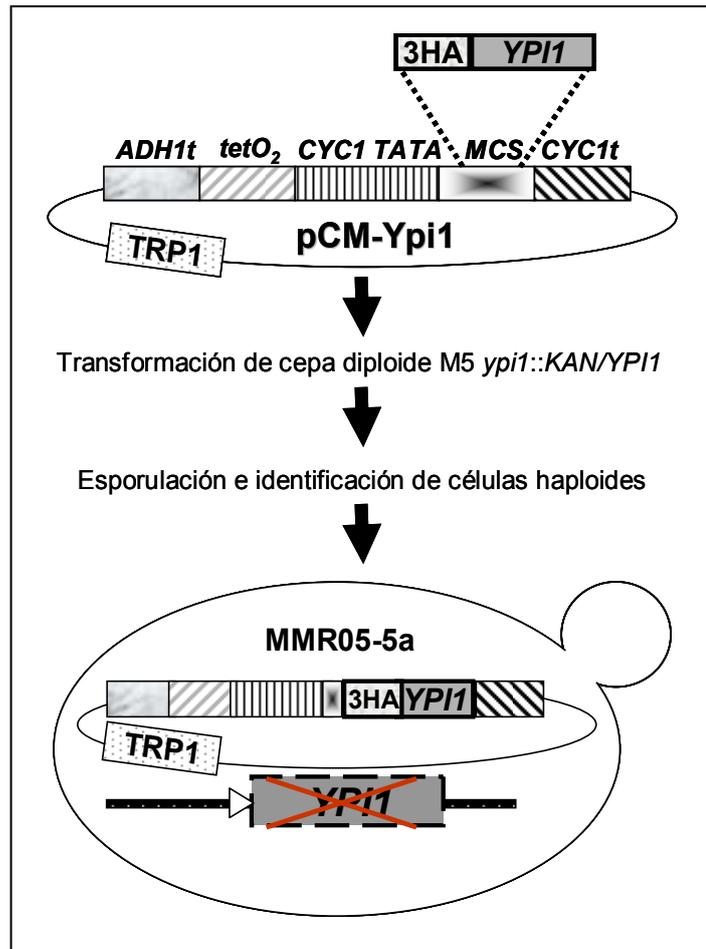


Figura 15. Sistema de expresión de Ypi1 regulable desde un plásmido centromérico que lleva los elementos del promotor *tetO*.

- La sustitución del promotor nativo del gen *YPI1* por el promotor *KanMX-tTA-tetO<sub>2</sub>* derivado del plásmido pCM224.
- Creación del mutante condicional *ypi1* mediante una variante del sistema de expresión *tetO* basado en el plásmido pCM325.

**A) Sustitución del promotor nativo del gen *YPI1* por el promotor *KanMX-tTA-tetO<sub>2</sub>*.**

A partir del plásmido pCM224 (Belli *et al.*, 1998) y mediante los cebadores 5'tetO-Ypi1 (A) y 3'tetO-Ypi1 (ver tabla 5), se generó el fragmento de PCR de 3,8 Kb que contenía el promotor *tetO<sub>2</sub>* con el marcador de selección *KanMX4* y el transactivador tTA. Los oligonucleótidos utilizados como

cebadores contenían en su extremo 3', 19 y 20 nucleótidos homólogos al plásmido pCM224, respectivamente; precedidos de 43 nucleótidos homólogos a la región 5' respecto de la posición -7 del ORF de *YPI1* [oligonucleótido 5'-tetO-Ypi1 (A)] y 42 nucleótidos homólogos al inicio de la región codificante del gen *YPI1* (oligonucleótido 3'tetO-Ypi1). El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa y se purificó siguiendo el protocolo comercial del Kit Agarose Gel Extraction (Roche). El casete de sustitución así obtenido se transformó en la cepa DBY746 y la correcta inserción del casete fue verificada mediante PCR a partir de colonias (ver la figura 16).

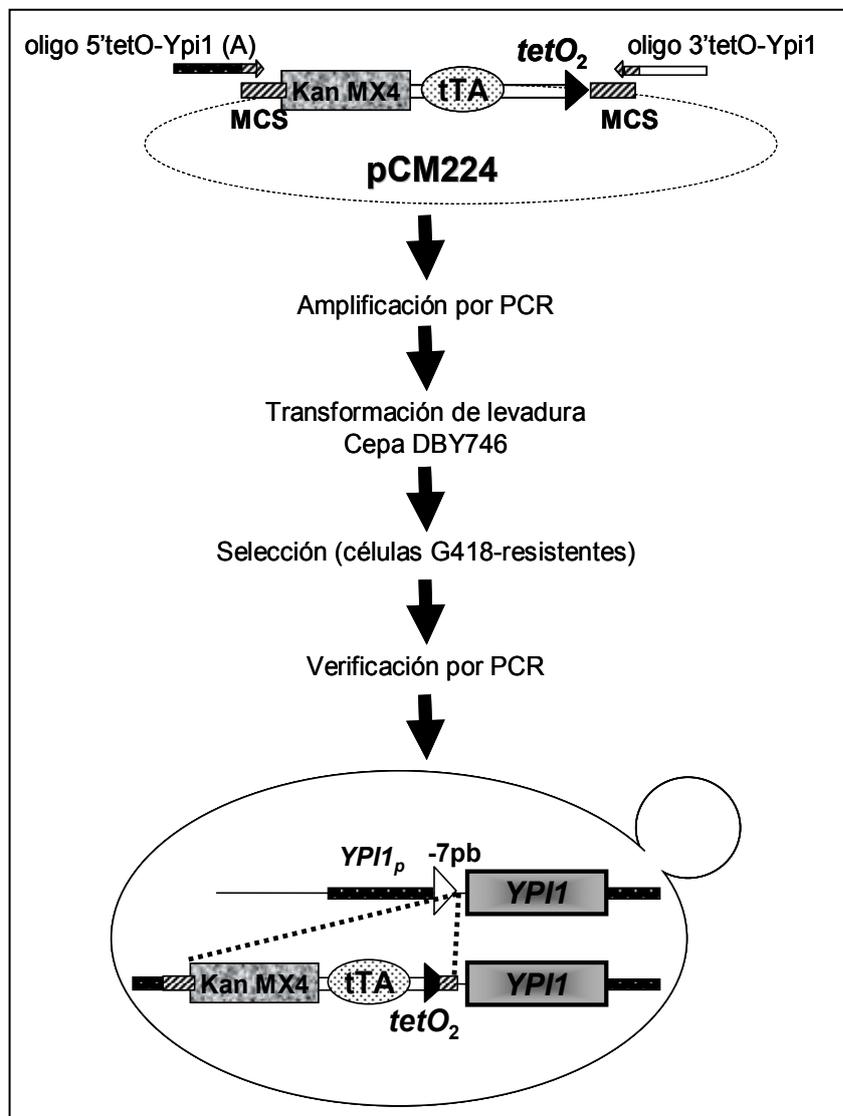


Figura 16. Sistema de expresión de Ypi1, mediante el reemplazamiento del promotor nativo del gen *YPI1* por el casete de expresión *KanMX4-tTA-tetO<sub>2</sub>*

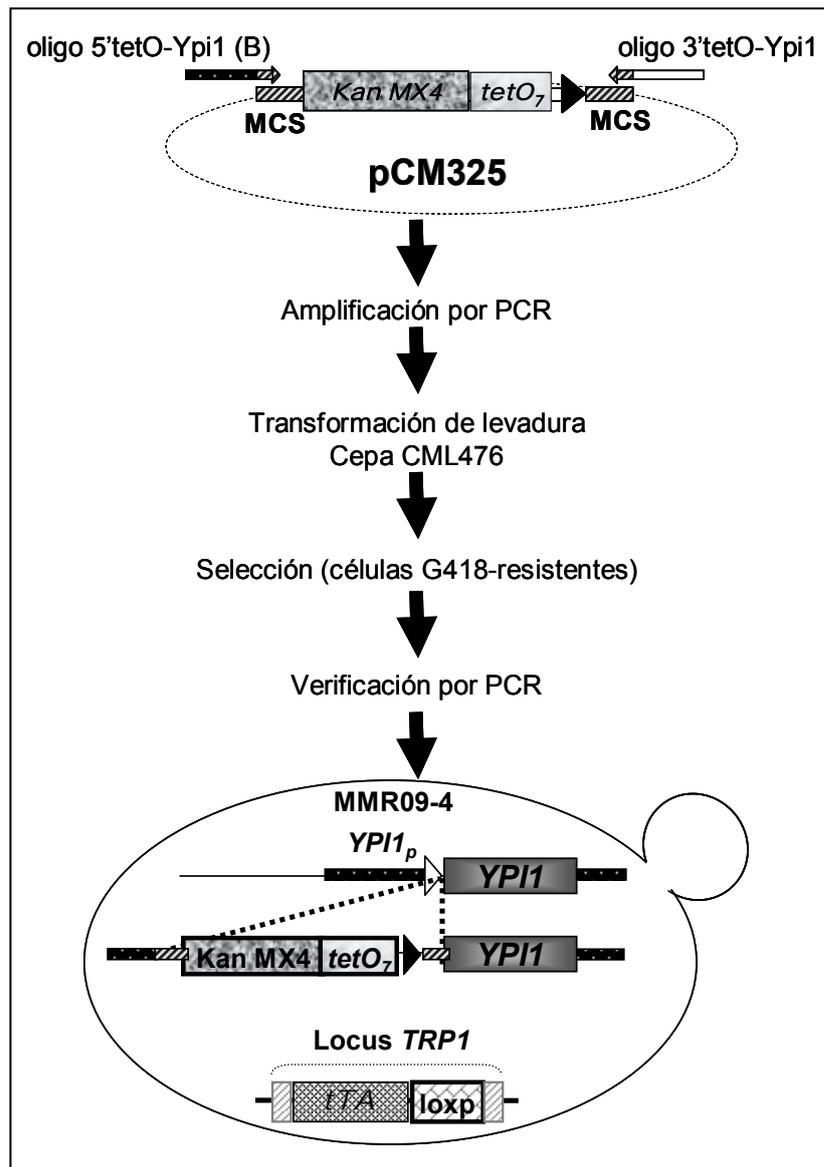
### **B) Creación del mutante condicional *ypl1* mediante una variante del sistema de expresión *tetO*.**

A partir del promotor *tetO* se desarrolló una segunda aproximación del sistema de expresión mediante una variante en la que el transactivador *tTA* se eliminó del casete *KanMX4-tetO<sub>7</sub>* y se integró en el locus *TRP1* del genoma de la levadura, dando lugar a la cepa CML476 (Yen *et al.*, 2003). El nuevo casete generado fue de menor tamaño y ello incrementó la eficiencia de sustitución del promotor. El casete *KanMX4-tetO<sub>7</sub>* se amplificó por PCR, usando como molde el plásmido pCM325 y como cebadores los oligonucleótidos: 3'tetO-Ypi1 y 5'tetO-Ypi1 (B) (ver tabla 5) que contenían en el extremo 3', 19 nucleótidos homólogos al plásmido pCM325, precedidos de 43 nucleótidos homólogos a la región 5' respecto del codón de inicio del gen *YPI1*. El producto de PCR se analizó según se ha descrito en el apartado A. El casete de sustitución se insertó en la cepa CML476 para obtener la cepa MMR09-4 y su correcta integración se verificó mediante PCR (ver figura 17).

#### **4.5. CASETES DE DELECCIÓN E INTERRUPCIÓN DE GENES**

La cepa MMR11-1 se construyó de la siguiente manera: el fragmento de DNA de 2,7 kbp que contiene el casete *GLC7-yEmCitrine::SpHis5MX* y regiones flanqueantes entre 206 nucleótidos *upstream* del codón de inicio y 209 nucleótidos *downstream* del codón de terminación de *GLC7*, se amplificó por PCR a partir de DNA genómico de la cepa KT2422 y utilizando como cebadores los oligonucleótidos Glc7-1256-fw y Glc7-1673-rev (ver tabla 5). El fragmento amplificado se integró en el genoma de la cepa MMR09-4 (*tetO<sub>7</sub>:YPI1*) por recombinación homóloga para obtener la cepa MMR11-1. El mismo casete se introdujo en la cepa SAY302 (*sds22-5*) para generar la cepa MMR13-4 (ver tabla 4).

La cepa MMR23-4 se construyó como sigue: el fragmento de DNA de 1,5 kbp que contiene el casete *mad1::nat1*, se amplificó por PCR utilizando como molde el plásmido pAG25 (Goldstein and McCusker, 1999) y como cebadores los oligonucleótidos *MAD1-del1-For* y *MAD1-del2-Rev*, que contienen regiones flanqueantes entre 153 nucleótidos *upstream* del codón de



**Figura 17. Estrategia de expresión por reemplazamiento del promotor de Ypi1 por el promotor *KanMX4-tetO<sub>7</sub>*.** La cepa CML476, donde el transactivador (tTA) ha sido integrado en el locus del marcador *TRP1*, fue transformada con el casete *KanMX4-TetO<sub>7</sub>* amplificado desde el plásmido pCM325.

inicio y 50 nucleótidos *downstream* del codón de terminación de *MAD1* (ver tabla 5). El fragmento amplificado se integró por recombinación homóloga en el genoma de la cepa CML476 (WT). Los clones que contienen el casete *mad1::nat1* fueron seleccionados por su resistencia al antibiótico nourseothricina (clonNAT, Werner Bioagents). La integración del casete dentro del genoma se verificó por PCR de colonias, usando los oligonucleótidos

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

*MAD1*-For-Comp y 3'-NAT que amplifican, en caso de una correcta integración, un fragmento de DNA de 0,67 kbp. El mismo casete se introdujo en las cepas MMR09-4 (*tetO<sub>7</sub>:YPI1*), SAY306 (WT) y SAY302 (*sds22-5*) para generar las cepas MMR25-7, MMR19-3 y MMR21-1, respectivamente (ver tabla 4).

La cepa MMR24-3 se obtuvo como sigue: el fragmento de DNA de 1,35 kbp que contiene el casete *mad2::nat1*, se amplificó por PCR utilizando como molde el plásmido pAG25 (Goldstein and McCusker, 1999) y como cebadores los oligonucleótidos *MAD2-del1-For* y *MAD2-del2-Rev*, que contienen regiones flanqueantes entre 100 nucleótidos *upstream* del codón de inicio y 44 nucleótidos *downstream* del codón de terminación de *MAD2* (ver tabla 5). El fragmento amplificado se integró por recombinación homóloga en el genoma de la cepa CML476. La selección de los clones positivos se realizó tal y como se describe en el párrafo anterior. La integración del casete dentro del genoma se verificó por PCR de colonias, usando los oligonucleótidos *MAD2-For-Comp* y 3'-NAT que amplifican, en el caso de una correcta integración, un fragmento de DNA de 0,62 kbp. El mismo casete se introdujo en las cepas MMR09-4 (*tetO<sub>7</sub>:YPI1*), SAY306 (WT) y SAY302 (*sds22-5*) para generar las cepas MMR26-2, MMR20-2 y MMR22-2, respectivamente (ver tabla 4).

Las cepas MMR29-4 y MMR33-3 se construyeron como sigue: los fragmentos de DNA de 1,06 kbp y 1,07 kbp que contienen los casetes *swe1::HIS3* y *swe1::TRP1*, con regiones flanqueantes entre 500 nucleótidos *upstream* del codón de inicio y 500 nucleótidos *downstream* del codón de terminación de *SWE1*, se amplificaron por PCR a partir de DNA genómico de las cepas YAC551 y YAC580, utilizando como cebadores los oligonucleótidos For-*SWE1* y Rev-*SWE1* (ver tabla 5). El fragmento amplificado se integró por recombinación homóloga en el genoma de la cepa CML476. La integración de los casetes dentro del genoma se verificó por PCR de colonias, usando los oligonucleótidos 5' *SWE1-Comp1*, 3' *HIS3-Comp*, y 5' *SWE1-Comp*, *TRP1\_3-Comp*, respectivamente, que amplifican fragmentos de DNA de 0,66 kbp y 0,76 kbp. Los mismos casetes se introdujeron en la cepa MMR09-4 (*tetO<sub>7</sub>:YPI1*) para generar las cepas MMR30-2 y MMR34-6, respectivamente (ver tabla 4).

La cepa MMR27-10 se construyó de la siguiente manera: el fragmento de DNA de 3,7 kbp que contiene el casete *PDS1-13Myc:SpHis5* y regiones flanqueantes entre 319 nucleótidos *upstream* y 246 nucleótidos *downstream* del codón de terminación de *PDS1*, se amplificó por PCR a partir de DNA genómico de la cepa 6211 (Longtine *et al.*, 1998) y utilizando como cebadores los oligonucleótidos Up-*PDS1* y Do-*PDS1* (ver tabla 5). El fragmento amplificado se integró en el genoma de la cepa CML476 por recombinación homóloga para generar la cepa MMR27-10. La integración del casete dentro del genoma se verificó por PCR de colonias, usando los oligonucleótidos Up-*PDS1-Comp* y Do-*PDS1*, que amplifican un fragmento de DNA de 0,97 kbp. El mismo casete se introdujo en las cepas MMR09-4 (*tetO<sub>7</sub>:YPI1*), MMR29-4 y MMR30-2 para generar las cepas MMR28-3, MMR35-7 y MMR36-1, respectivamente (ver tabla 4).

La cepa MMR31-1 se obtuvo como sigue: el fragmento de DNA de 1,35 kbp que contiene el casete *rad9::nat1*, se amplificó por PCR a partir del plásmido pAG25 (Goldstein and McCusker, 1999) y utilizando como cebadores los oligonucleótidos Up-Del-*RAD9a* y Dwn-Del-*RAD9a*, que contienen regiones flanqueantes entre 1 nucleótido *downstream* del codón de inicio y 80 nucleótidos *downstream* del codón de terminación de *RAD9* (ver tabla 5). El fragmento amplificado se integró por recombinación homóloga en el genoma de la cepa CML476. La integración del casete dentro del genoma se verificó por PCR de colonias, usando los oligonucleótidos Up.Comp.*RAD9* y 3'-*NAT*, que amplifican un fragmento de DNA de 0,69 kbp. El mismo casete se introdujo en la cepa MMR09-4 (*tetO<sub>7</sub>:YPI1*) para generar la cepa MMR32-12 (ver tabla 4).

#### **4.6. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA**

Para los ensayos de sobreexpresión de *GLC7* se generó una versión mutada de la proteína en el motivo de unión (RVxF) a sus subunidades reguladoras. Para ello, el codón que sintetiza la fenilalanina en la posición 256 de *GLC7* se sustituyó por el codón que sintetiza alanina mediante mutagénesis dirigida y utilizando como cebadores los oligos *GLC7F256A-for* y *GLC7F256A-*

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

Do (ver tabla 6). Las reacciones de PCR se realizaron en 50 µl de volumen de reacción, añadiendo: 0.5 U de *Pfu* DNA polimerasa (Roche), 1x de tampón, 0,2 mM de cada dNTP y 10 ng de DNA plasmídico (YEp-GLC7) como molde. Las condiciones de reacción fueron de un ciclo inicial de 0,5 min a 95 °C para desnaturalizar el DNA molde, seguido de 16 ciclos, en los cuales la desnaturalización se realizó durante 0,5 min a 95 °C y las condiciones de hibridación y elongación durante 1 min a 50 °C y 18 min a 72 °C, respectivamente. Para eliminar el DNA metilado, el producto de PCR se sometió a una restricción con la enzima DpnI durante 4 horas a 37 °C, seguido de una transformación en células de *E.coli*. Una vez recuperado de la bacteria, el plásmido se analizó en gel de agarosa, se purificó y secuenció en un secuenciador Applied Biosystems 3100, en dos reacciones independientes de PCR y utilizando los oligos *GLC7F256A.Comp-Rev 552* y *GLC7F256A.Comp-Rev 1100* (ver tabla 6).

### 4.7. BÚSQUEDA DE GENES EN MULTICOPIA SUPRESORES DE LA LETALIDAD PROVOCADA POR LA FALTA DE YPI1

#### 4.7.1. Aislamiento de clones que muestran capacidad para suprimir el fenotipo de letalidad provocado por la falta de Ypi1

La búsqueda de genes supresores se realizó utilizando dos estrategias diferentes basadas en la represión de la expresión de Ypi1.

##### - Cepas MMR08-1b:

El plásmido YEpLac195-*YPI1*, conteniendo el ORF completo del gen *YPI1*, se introdujo en la cepa diploide *M5ypi1::KAN/YPI1* (Garcia-Gimeno *et al.*, 2003). Esta cepa se sometió a esporulación y a análisis de *Random Spore* para obtener la cepa haploide MMR08-1b, que expresa Ypi1 desde el plásmido YEpLac195-*YPI1* (ver tabla 4).

##### - Cepas MMR09-4:

Cepas donde el promotor nativo del gen *YPI1* fue reemplazado por el sistema de expresión *tetO<sub>7</sub>* (Yen *et al.*, 2003) y la expresión de *YPI1* es fuertemente reprimida por adición de doxiciclina (ver figura 17).

Las cepas MMR08-1b y MMR09-4 se transformaron con bibliotecas genómicas en multicopia construidas en los plásmidos YEp13 (ATCC nº 37415) y YEp24 (facilitada por el Dr. Ramón Serrano), respectivamente. Ambas genotecas habían sido construidas realizando una restricción parcial con la enzima *Sau3A*, teniendo en cuenta que el tamaño de los fragmentos genómicos obtenidos fuese de unos 6 a 7 kpb. Por tanto, para tener representado, con una probabilidad del 99%, todo el genoma de *S. cerevisiae* ( $12 \times 10^6$  pb) se necesitarían del orden de 8,000 clones (Trecó and Winston, 1998). Como controles se utilizaron las mismas cepas transformadas con el plásmido correspondiente sin inserto. Las células transformadas con estos plásmidos fueron seleccionadas por su capacidad de crecer en el medio sintético carente de leucina en el caso de YEp13 y carente de uracilo en el caso de YEp24, en presencia de 100 µg/ml de doxiciclina.

En el caso de las células portadoras del plásmido YEp13, las células que crecieron entre las 72 horas se replicaron en medio sintético carente de leucina y suplementado con 0,1 % de 5-FOA (Burke *et al.*, 2000). El 5-FOA impide el crecimiento de células que expresan el gen *URA3*. Los transformantes MMR08-1b-YEp13, expresan el gen *URA3* desde el plásmido YEpLac195-*YPI1*. Por tanto, la exposición de estas células a medios que contienen 5-FOA provocaría la pérdida del plásmido YEpLac-*YPI1*. De esta manera sería posible la selección de los clones capaces de suprimir el fenotipo de letalidad provocado por la falta de *YPI1*. Las colonias macroscópicas observadas entre las 48 y 120 horas de incubación se consideraron como positivas, ya que la cepa control, portando un plásmido vacío, dejaba de crecer en ese mismo intervalo de tiempo. Para comprobar la pérdida del plásmido YEpLac-*YPI1*, las colonias consideradas positivas se recogieron en 5 ml de medio carente de leucina (para garantizar el mantenimiento del plásmido YEp13), se incubaron durante 24 horas y se sembraron en placas carentes de uracilo.

En el caso de las células transformadas con el plásmido YEp24, las colonias macroscópicas que aparecieron entre las 72 de incubación, se replicaron en placas carentes de uracilo conteniendo 100 µg/ml de doxiciclina y

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

se crecieron durante 72 - 96 horas ya que la cepa control, portando un plásmido vacío, dejaba de crecer en ese mismo intervalo de tiempo.

### **4.7.2. Identificación de los ORFs responsables de suprimir el fenotipo de letalidad provocado por la falta de Ypi1**

Del total de clones seleccionados como posibles supresores de la letalidad provocado por la falta de Ypi1, los clones que contenían el gen *YPI1* se descartaron mediante PCR de colonias (Huxley *et al.*, 1990) empleando oligonucleótidos 5' *ypl1-fw* y 3' *ypl1-rev*, que amplifican la región codificante del gen *YPI1* (ver tabla 5). De los clones negativos para *YPI1* se aisló el DNA plasmídico, que se amplificó en bacteria, se purificó y se realizó un análisis de restricción con la enzima EcoRI, a fin de identificar insertos idénticos. Los clones que evidenciaron una estructura física diferente fueron secuenciados parcialmente, empleando oligonucleótidos específicos de la región cercana a la diana de clonación del vector. La identificación de la región cromosómica correspondiente al inserto se realizó mediante análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990) empleando los recursos habilitados por la base de datos *Saccharomyces Genome Database* (Cherry *et al.*, 1997).

Los clones seleccionados fueron transformados nuevamente en las respectivas cepas para corroborar la supresión de la letalidad de *YPI1* bajo las condiciones ensayadas.

## **4.8. ESTUDIO DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL RESULTANTE DE LA MUTACIÓN CONDICIONAL DE *YPI1***

### **4.8.1. Obtención de muestras para extraer RNA**

El RNA se obtuvo a partir de las cepas CML476 (wt) y MMR09-4 (*tetO<sub>7</sub>:YPI1*). Cultivos creciendo en fase exponencial se diluyeron a una OD<sub>660</sub> de 0,1, en ausencia y presencia de 100 µg/ml, y se tomaron muestras a las 0, 2, 4 y 6 horas en un volumen equivalente a 15 ODs, que se conservaron a - 80 °C hasta su posterior tratamiento.

#### **4.8.2. Extracción de RNA total**

El RNA total fue extraído usando el kit de RiboPure™-Yeast (Ambion) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. La integridad y calidad de los RNAs se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % en condiciones desnaturalizantes. La cuantificación de los RNAs se realizó en un BioPhotometer (Eppendorf) mediante espectrofotometría a 260 nm.

#### **4.8.3. Síntesis de cDNA y microchips de DNA**

El análisis transcripcional se realizó usando microarrays de DNA que contienen fragmentos de 6014 *Open Reading Frames* de *S.cerevisiae* amplificados por PCR (Alberola *et al.*, 2004; Viladevall *et al.*, 2004). El DNA amplificado fue resuspendido en 50% de DMSO y depositado en una superficie de vidrio cubierta de aminosilano (UltraGAPS™; Corning Glass) usando un robot Micro Grid II Spotter (BioRobotics). El cDNA marcado con los fluoróforos Cy3 y Cy5 fue preparado a partir de 8 µg de RNA total, utilizando oligo (dT) como cebador de la transcriptasa inversa mediante el método de marcaje indirecto usando el kit CyScribe post-labeling (GE Healthcare Life). La pre-hibridación, hibridación y lavados de los microchips se realizaron siguiendo las recomendaciones del *Institute for Genomic Research*, con pequeñas modificaciones. La pre-hibridación de los microarrays se hizo en una solución que contiene 5x SSC, 0,1 % de SDS y 1 % de BSA (Sigma A3803) durante 1 hora a 42 °C. Para la hibridación, cada cDNAs marcado con los fluoróforos Cy3 y Cy5 se resuspendió en 35 µl de solución de hibridación (50% de formamida, 5x SSC, 0,1% SDS). Se mezclaron y se añadieron 5 µg de DNA de esperma de salmón antes de proceder a la desnaturalización durante 3 minutos a 95 °C. La hibridación del DNA microarray se realizó en un equipo *ArrayBooster hybridization station* (Sunergia Group) durante 14 horas a 42 °C.

Los lavados de los microarrays se realizaron en tres pasos utilizando cubetas de tinción y agitadores magnéticos. El primer lavado se realizó en una solución de 1x SSC y 0,2 % de SDS a 42 °C. El segundo lavado en una solución de 1x SSC y 0,2 % de SDS y el tercer lavado en una solución de 0,1x de SSC, ambos a temperatura ambiente. Finalmente los microchips se lavaron

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

dos veces en agua MilliQ y se secaron mediante centrifugación durante 1 minuto a 1500 rpm (Centrífuga 5810, Eppendorf)

Para detectar la fluorescencia, los microchips secos se introdujeron en un escaner de fluorescencia, ScanArray 4000 (Packard Instrument Co.), donde las imágenes Cy3 y Cy5 fueron obtenidas con una resolución de 10  $\mu\text{m}$ . Este escaner está dotado de un láser y dos filtros, que permiten detectar la emisión de fluorescencia y genera una imagen virtual indicando la intensidad de fluorescencia en cada punto del microchip, que se midió y procesó usando el programa GenePix Pro 6.0 (Molecular Devices). Los *spots* con un diámetro inferior a 120  $\mu\text{m}$  o con una intensidad de fluorescencia para Cy3 y Cy5 por debajo de 150 unidades no fueron considerados para el análisis posterior.

### **4.8.4. Análisis global de los cambios en el perfil transcripcional causados como respuesta a la falta de *YPI1***

Para eliminar los efectos de las posibles diferencias de incorporación entre los fluorocromos se hicieron réplicas técnicas en las que se realizaba el marcaje recíproco. Puesto que cada gen puede estar más de una vez representado en los microchips, el valor asignado a cada uno de los genes se obtuvo promediando los valores de todos sus *spots* dentro del mismo microchip. El valor definitivo asignado a cada gen se obtuvo promediando los valores procedentes de las dos réplicas técnicas. Sólo fueron tenidos en cuenta aquellos genes para los cuales se disponía de datos en los dos microchips.

Un gen fue considerado inducido o reprimido cuando la razón de mutante condicional *tetO<sub>7</sub>:YPI1* versus la cepa salvaje fue superior a 2,0 o inferior a 0,5, respectivamente. Los genes que presentaron cambios de expresión en el mutante *tetO<sub>7</sub>:YPI1* se seleccionaron para su posterior análisis. El programa GEPAS v3.1 (Montaner *et al.*, 2006) se utilizó para realizar el procesamiento inicial de los datos. Los genes también fueron ordenados por categorías funcionales mediante los clasificadores interactivos FunCat del MIPS (Ruepp *et al.*, 2004) y GO *Saccharomyces Genome Database* (Dwight *et al.*, 2002). El análisis del perfil de expresión de los genes seleccionados se

determinó utilizando los programas Gene Cluster v3.0 y TreeView v.1.1.3, (Eisen *et al.*, 1998)

#### **4.9. REVERSE TRANSCRIPTASE- PCR (RT-PCR SEMICUANTITATIVA)**

Las cepas CML476 y MMR09-4 (ver tabla 4) se crecieron en YPD durante 24 horas, se diluyeron a una OD<sub>660</sub> de 0,1 y se crecieron durante 6 horas en presencia de 100 µg/ml de doxiciclina. Las células se recogieron a las 0, 1, 2, 4 y 6 horas, en un volumen equivalente a 10 ODs<sub>660</sub> (por ejemplo 100 ml a OD<sub>660</sub> de 0,1), se centrifugaron 2 minutos a 4 °C y 1800 xg, se lavaron una vez con agua MilliQ fría y se centrifugaron nuevamente para obtener un pellet de células secas que se congelaron a - 80 °C hasta la extracción del RNA, que se realizó según se detalla en el apartado 4.8.2.

Se usó un µg de RNA para generar el cDNA utilizando el kit de OneStep RT-PCR (Invitrogen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación de *YPI1* y *CDC11* se realizó utilizando los oligos RT\_*YPI1*\_UP, RT\_*YPI1*\_DO y RT\_*CDC11*\_For, RT\_*CDC11*\_Rev, respectivamente (ver tabla 7). La reacción de la transcripción reversa fue de 30 min a 50 °C, seguidos de una incubación a 95 °C durante 15 min (inactivación de la transcriptasa reversa y activación de la Taq polimerasa). Las condiciones de reacción de PCR fueron de 24 ciclos, en los cuales la desnaturalización se realizó durante 45 s a 94 °C y las condiciones de hibridación y elongación se realizaron durante 45 s a 50 °C y 60 s a 72 °C, respectivamente. Finalmente, los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2 %.

#### **4.10. ENSAYO β-GALACTOSIDASA**

Las cepas CML476 y MMR09-4 (ver tabla 4) transformadas con un plásmido que contiene el promotor de *CDC26* y dirige la expresión del gen reporter β-galactosidasa (YE<sub>p356</sub>-Prom *CDC26*) se crecieron en un medio sintético carente de uracilo durante 24 horas, se diluyeron en 3 ml de YPD hasta una OD<sub>660</sub> de 0,4; 0,2; 0,1 y 0,05, en ausencia y presencia de 100 µg/ml de doxiciclina y se crecieron durante 3, 6, 9 y 12 horas, respectivamente.

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar el ensayo  $\beta$ -galactosidasa las células fueron sedimentadas durante 5 minutos a 1800  $\times g$  y resuspendidas en 300  $\mu l$  de buffer Z (60 mM  $Na_2HPO_4$ , 40 mM  $NaH_2PO_4$ , 10 mM KCl, 1 mM  $MgSO_4$ , 35 mM 2-mercaptoetanol). Cien  $\mu l$  de la suspensión de células se diluyeron en tubos de ensayo conteniendo 900  $\mu l$  de buffer Z, donde las células se permeabilizaron por adición de 40  $\mu l$  de cloroformo, 20  $\mu l$  de SDS al 10 %, y agitación durante 15 segundos. Los restantes 200  $\mu l$  de la suspensión de células en buffer Z fueron almacenados a 4 °C. Los 100  $\mu l$  de la suspensión de células se equilibraron colocando los tubos de ensayo a 30 °C en un baño de agua. Transcurridos 15 minutos, se añadió como sustrato 0,2 ml de ONPG para comenzar la reacción enzimática (Reynolds *et al.*, 1997), la cual se evidenció por aparición de un color amarillento en la mezcla, típico del producto formado. La parada de la reacción enzimática se realizó cambiando el pH de la reacción mediante la adición de 500  $\mu l$  de 1 M  $Na_2CO_3$ . La formación del producto se evaluó mediante espectrofotometría a 405 nm, en placas de 96 pocillos y usando el lector de placas iGems Reader MF (Labsystems). La cantidad de células de la suspensión fue monitorizada mediante absorbancia a 620 nm. La actividad  $\beta$ -galactosidasa se expresó en unidades Miller usando la siguiente fórmula:  $[(1000 \times A_{405}) / (\text{tiempo de reacción} \times A_{620})]$ .

### 4.11. ANÁLISIS FENOTÍPICO Y OTRAS TÉCNICAS

#### 4.11.1. Efecto de la disminución condicional de Ypi1 en el crecimiento celular

Para evaluar el efecto de la disminución de Ypi1 en el crecimiento celular se utilizaron 3 tipos de mutantes condicionales:

- **MMR02-1c:** Cepa basada en un *degrón*, donde la proteína Ypi1, bajo el control del promotor *GAL*, es expresada de forma regulable y rápidamente degradable, mediante la fusión *in frame* del gen que codifica la ubiquitina (*Ub*) (Bachmair and Varshavsky, 1989).
- **MMR05-5a:** Cepa basada en el sistema *tet-off*, donde el gen *YPI1* es expresado desde un plásmido que contiene elementos del promotor *tetO* regulable por doxiciclina (Gari *et al.*, 1997).

- **MMR09-4:** Cepa basada en el sistema *tet-off*, construída por sustitución del promotor nativo del gen *YPI1* por un promotor *tetO* regulable por doxiciclina (Belli *et al.*, 1998).

**A)** La cepa MMR02-1c (ver tabla 4) se creció en medio CM suplementado con galactosa (CMGal) durante 24 horas. Se diluyó a OD<sub>660</sub> de 0,01 en medio CMGal y medio CM suplementado de glucosa (CMGlu), y se incubó durante 56 horas. Para evitar el efecto de la disminución de nutrientes los cultivos fueron alimentados con medio fresco cada 24 horas. El crecimiento fue monitorizado midiendo la densidad óptica de los cultivos a diferentes intervalos de tiempo.

**B)** La cepa MMR05-5a creciendo en fase exponencial fue diluída a una OD<sub>660</sub> de 0,05 y sembrada en placas de CM, en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de doxiciclina. Los mismos cultivos en fase exponencial fueron diluídos a OD<sub>660</sub> de 0,01 en medio CM en ausencia y presencia de 50 µg/ml de doxiciclina e incubados durante 80 horas, añadiendo la misma cantidad del antibiótico cada 12 horas para remediar su degradación. El crecimiento en placa fue monitorizado a las 48 horas por *drop tests* y el crecimiento en líquido mediante espectrofotometría.

Para verificar la disminución de los niveles de la proteína Ypi1 en las cepas MMR02-1c y MMR05-5a, se realizó un análisis de inmunoblot.

**C)** La cepa MMR09-4 y su correspondiente cepa isogénica salvaje CML476, creciendo en fase exponencial fueron diluídas a una OD<sub>660</sub> de 0,05 y sembrada en placas de YPD en ausencia y presencia de 100 µg/ml de doxiciclina. Los mismos cultivos fueron diluídos a una OD<sub>660</sub> de 0,01 en YPD en ausencia y presencia de 100 µg/ml de doxiciclina y se incubaron durante 40 horas. La monitorización del crecimiento se realizó de la misma manera que la cepa MMR05-5a. Para verificar la disminución transcripcional de *YPI1*, muestras de los cultivos, a los intervalos de tiempo indicados, fueron procesadas para un análisis de RT-PCR.

Para evaluar si la disminución de Ypi1 provoca una alteración en el ciclo celular los cultivos, creciendo en exponencial, fueron diluídos a OD<sub>660</sub> de 0,01 en YPD conteniendo 100 µg/ml de doxiciclina e incubados durante 12 horas;

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

momento en que se sincronizaron en fase G1 mediante adición de 10 µg/ml de α-factor más 100 µg/ml de doxiciclina. Después de 2 horas de incubación, las células se lavaron 3 veces y se resuspendieron en YPD fresco conteniendo 100 µg/ml de doxiciclina y 0,2 M de hidroxurea, para sincronizar a las células en fase S. Se incubaron a 28 °C durante 30 minutos, se volvieron a lavar 3 veces, se resuspendieron en YPD fresco conteniendo 100 µg/ml de doxiciclina y se crecieron durante 4 horas. El mismo protocolo fue usado para las células no tratadas con doxiciclina y para la cepa salvaje CML476. En todos los casos, alícuotas de los cultivos a diferentes tiempos y después de la eliminación de la hidroxurea se fijaron con 3,7 % de formaldehído durante 60 minutos y se conservaron a 4 °C hasta su posterior tratamiento para inmunocitoquímica (alícuotas de cultivos creciendo 2 horas) y tinción con DAPI.

### **4.11.2. Efecto de la disminución funcional de Sds22 en el crecimiento celular**

Las cepas SAY306 (WT) y SAY302 (*sds22-5*) fueron sincronizadas en fase G1 como se indica en el párrafo anterior, excepto que el crecimiento se realizó a 24 °C y sin adición de doxiciclina. Después de los lavados las células se resuspendieron en YPD fresco y los cultivos se dividieron en dos alícuotas, que se incubaron a 24 °C y 37 °C (previo precalentamiento del medio durante 10 minutos), durante 4 horas. Las células recolectadas a diferentes intervalos de tiempo fueron procesadas como se indica en el párrafo anterior.

### **4.11.3. Ensayos de sobreexpresión**

Los ensayos de sobreexpresión fueron monitorizados en placas por “*drop tests*”. Para ello, cultivos saturados, creciendo 48 horas en medio CM se diluyeron a una OD<sub>660</sub> de 0.05. Se realizaron diluciones seriadas (1:5) y 3 µl de cada dilución se depositaron en el medio de cultivo indicado y se incubaron a 28 °C (excepto si se indica otra cosa).

### **4.11.4. Ensayos de sensibilidad**

Los ensayos de sensibilidad a agentes químicos y físicos que dañan la pared celular como el blanco de calcofluor, rojo congo, cafeína y sonicación,

respectivamente, se realizaron siguiendo protocolos descritos previamente en (Ruiz *et al.*, 1999).

Para evaluar la sensibilidad a agentes químicos y físicos que dañan el DNA se utilizó MMS (Sigma M-4016) a una concentración de 0,025 y 0,035 % (V/V), hidroxihurea (Sigma H8627) a una concentración de 0,050 y 0,075M, y la radiación ultravioleta a una potencia de 60 y 80  $\mu$ Julios/m<sup>2</sup>, mediante el uso de un equipo Stratalinker (Statagene).

Para los ensayos de sensibilidad a compuestos que despolimerizan los microtúbulos se utilizó benomil (Sigma 381586), diluído en DMSO y a una concentración de 25 y 30  $\mu$ g/ml.

El análisis de muerte celular se realizó mediante el método de exclusión de azul de Tripano. Las células se expusieron al azul de Tripano (0,2% de concentración final en PBS) y el porcentaje de células muertas, positivas para esta tinción, se determinó por recuento de aproximadamente 500 células (Kucsera *et al.*, 2000).

#### **4.12. CITOMETRÍA DE FLUJO (FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING, FACS)**

##### **A) Obtención de las muestras**

Las diversas cepas que contienen el casete de expresión condicional del gen YPI1 (MMR09-4, MMR29-4, MMR30-1), incluida la cepa isogénica salvaje CML476 (ver tabla 4) se crecieron en YPD hasta la saturación. Los cultivos se diluyeron hasta una OD<sub>660</sub> de 0,01 en YPD conteniendo 100  $\mu$ g/ml de doxiciclina y se incubaron durante 12 horas. Los cultivos se volvieron a diluir hasta una OD<sub>660</sub> de 0,25, en 15 ml de YPD conteniendo 100  $\mu$ g/ml de doxiciclina y se sincronizaron en G1 por adición de 5  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ -factor durante 75 minutos. Se centrifugaron a 1800 xg durante 2 minutos y se lavaron 3 veces con YPD. Se resuspendieron en 15 ml de YPD conteniendo 100  $\mu$ g/ml de doxiciclina y se incubaron durante 4 horas. Las muestras se recogieron cada 25 minutos a partir del momento de la aparición de la gema, que se evidenció por observación al microscopio.

---

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **B) Fijación**

Aproximadamente,  $10^7$  células por muestra se fijaron por resuspensión en 1 ml de etanol al 70 % (v/v) y se conservaron, en esta misma solución, a 4 °C hasta su posterior análisis. Posteriormente, para facilitar la hidrólisis del RNA, las células fijadas se centrifugaron a 1800 xg durante 2 minutos, se lavaron dos veces con 1 ml de 50 mM de Tris-HCl pH 7,8, se resuspendieron en el mismo tampón conteniendo 200 µg/ml de RNasa A y se incubaron durante 2 horas a 37 °C o durante toda la noche a 24 °C.

### **C) Tinción con yoduro de propidio**

Para permeabilizar las células al yoduro de propidio se realizó una digestión parcial durante 30 minutos a 37 °C, en 5 mg/ml de pepsina diluída en 50 mM de HCl. Las células se lavaron en 1 ml de solución tampón de FACS (200 mM Tris-HCl pH 7,8; 211 mM NaCl; 78 mM MgCl<sub>2</sub>) y se resuspendieron en 0,5 ml de tampón de FACS suplementado con 20 µg/ml de yoduro de propidio. En este estado y protegidas de la luz, las células se conservaron a 4 °C hasta su análisis.

### **D) Análisis en el citómetro de flujo**

Antes de iniciar el análisis en el citómetro de flujo, se transfirieron 50 µl de la suspensión de células teñidas con yoduro de propicio en tubos de ensayo conteniendo 1 ml de 50 mM Tris-HCl pH 7,8. La suspensión se sonicó en un Digital Sonifier (Branson) durante 20 segundos y a una intensidad constante de 30W. La sonicación es de vital importancia en esta técnica porque nos asegura que cada lectura corresponda a una única célula, evitando así que 2 células agrupadas con contenido de DNA 1n sean contadas como una sola partícula con contenido de DNA 2n.

Las muestras conteniendo aproximadamente 20,000 células, se analizaron en un FACScan (Becton-Dickinson), donde la lectura de la emisión de fluorescencia del yoduro de propidio se realizó en el canal FL2-H. El contenido relativo de DNA, que indica la proporción de células en G1 (contenido 1n), G2/M (contenido 2n) y S (contenido intermedio), se representó

gráficamente como un histograma del número de eventos (Y) *versus* el canal de emisión de fluorescencia FL2-H (X).

### **4.13. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE**

#### **4.13.1. Ypi1**

Cultivos de las cepas MMR02-1c y MMR05-5a fueron procesados como se detalla en el apartado 4.11.1 (A y B) y los extractos crudos de levaduras fueron preparados como se ha descrito previamente en (Garcia-Gimeno *et al.*, 2003). Los extractos conteniendo 50 µg de proteína se sometieron a electroforesis en geles de poliacríamida al 10 % (P/V) y fueron transferidos a una membrana de PVDF Hybond-P (Amersham Biosciences).

#### **4.13.2. Pds1**

Cultivos de las cepas que expresan la proteína recombinante Pds1-13Myc (MMR27-10, MMR28-3, MMR35-7 y MMR36-1) se crecieron en YPD hasta la saturación, se diluyeron a OD<sub>660</sub> de 0,01 en presencia de 100 µg/ml de doxiciclina y se incubaron durante 12 horas. Las células se sincronizaron en fase G1 por adición de 10 µg/ml de α-factor en presencia de la misma cantidad de doxiciclina fresca y se incubaron durante 2 horas a 30 °C. El α-factor se eliminó mediante 3 lavados con YPD, resuspendiendo las células sincronizadas en 30 ml de YPD conteniendo 100 µg/ml de doxiciclina e incubándolas durante 110 minutos. Muestras de cultivos, en volúmenes equivalentes a 2,5 ODs, se recolectaron a los 0, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 y 110 minutos, los mismos que se centrifugaron a 1800 xg y se congelaron a - 80 °C. Los extractos crudos de los respectivos cultivos se obtuvieron por resuspensión de las células en 150 µl de 2 M de NaOH y 80 µl de β-mercaptoetanol, seguido de una incubación a 4 °C durante 5 minutos. Las células resuspendidas se centrifugaron a 800 xg por 5 minutos a 4 °C, se volvieron a resuspender en 50 µl de buffer de carga SDS-PAGE (125 mM Tris-HCl pH 6,8; 40% glicerol; 8% SDS; 0,2% azul de bromofenol) al 2x conteniendo 1 mM de dithiothreitol (DTT), se hirvieron a 95 °C por 5 minutos y se centrifugaron a 800 xg. Las proteínas

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

presentes en 5-10  $\mu$ l de extractos crudos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 % (P/V) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond C-Extra; Amersham Biosciences).

### 4.13.3. Cdc11

Cultivos de las cepas CML476 y MMR09-4 se crecieron hasta la saturación en YPD, se diluyeron a OD<sub>660</sub> de 0,01 en presencia de 100  $\mu$ g/ml de doxiciclina y se incubaron durante 48 horas, diluyendo hasta una OD<sub>660</sub> 0,01 y añadiendo doxiciclina cada 12 horas. Muestras de los cultivos en un volumen equivalente a una OD se tomaron cada 12 horas, los mismos que se centrifugaron a 1800  $xg$  y se congelaron a -80 °C. La obtención de los extractos crudos y la separación electroforética se realizaron como se detalla en el apartado anterior.

### 4.13.4. Swe1

Cultivos de las cepas CML476 y MMR09-4 se procesaron tal como se detalla en el apartado 4.13.2 de esta sección. Los extractos crudos de levaduras fueron preparados según se ha descrito en (Shulewitz *et al.*, 1999).

### 4.13.5. Cdc28<sup>Tyr-19</sup>

Cultivos de las cepas CML476, MMR09-4 y MMR36-1 se procesaron tal como se detalla en el apartado 4.13.2 de esta sección.

Los extractos proteicos de levaduras se obtuvieron siguiendo el método del ácido tricloroacético (TCA). Las células presentes en 5 ml de cultivo se resuspendieron en 1 ml de TCA al 20%, incubaron a 4 °C durante 30 minutos, centrifugaron 2 minutos a 5000  $xg$  y se lavaron en 1 ml de Tris-Base 1M (sin ajustar el pH). Las células lavadas se resuspendieron en 100  $\mu$ l de buffer de carga SDS-PAGE 2x conteniendo 1 mM de dithiothreitol (DTT) y se hirvieron a 95 °C durante 2 minutos. Se añadió un volumen igual de bolas de vidrio

(Sigma), se hirvió a 95 °C durante 2 minutos, se lisó a 4 °C por agitación vigorosa (3 sesiones de 30 s cada uno, separadas de un minuto en hielo entre cada sesión) en un Fast Prep cell breaker (setting 4.5; Bio 101 Inc., Vista, CA) y se volvió a hervir a 95 °C por 2 minutos. Para recuperar los extractos, se perforó con una pequeña aguja la base de los respectivos microtubos, que se introdujeron en microtubos limpios y se centrifugaron a 800 xg durante 5 minutos. Los extractos así obtenidos se volvieron a centrifugar a 800 xg durante 5 minutos y los respectivos sobrenadantes se transfirieron a microtubos nuevos. La proteína presente en 10-20 µl de extractos se separó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% (P/V) y se transfirió a membranas de nitrocelulosa (Hybond C-Extra; Amersham Biosciences).

#### **4.14. NMUNOBLOT (*WESTERN BLOT*) Y ANTICUERPOS EMPLEADOS**

**Inmunoblot de Ypi1:** Las membranas fueron incubadas por 12 horas con el anticuerpo primario monoclonal anti-HA (Roche Applied Science), a una dilución 1:500 y el anticuerpo secundario horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse Ig G (Amersham Biosciences), a una dilución 1:20000. La proteína fue visualizada mediante el uso de un Hyperfilm™ ECL (Amersham Biosciences) y reactivos de quimioluminiscencia (ECL, Amersham Biosciences).

**Inmunoblot de Pds1:** Las membranas fueron incubadas por 12 horas con el anticuerpo primario anti-c-myc 9E10 (Covance Inc.), a una dilución 1:2000, seguido por el anticuerpo secundario horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse o anti-rabbit IgG (Amersham Biosciences), a una dilución 1:20000.

**Inmunoblot de Cdc11:** Las membranas se incubaron durante 2 horas con el anticuerpo primario anti-Cdc11 (y-415) (sc-7170; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), a una dilución 1:1000, seguido por el anticuerpo secundario horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit Ig G (Amersham Biosciences), a una dilución 1:20000.

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Inmunoblot de Swe1:** Las membranas fueron incubadas por 12 horas con el anticuerpo primario anti-Swe1 (y-311) (sc-7171; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), a una dilución 1:500, seguido por el anticuerpo secundario horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit Ig G (Amersham Biosciences), a una dilución 1:20000.

**Inmunoblot de Cdc28<sup>Tyr19</sup>:** Las membranas fueron incubadas durante 12 horas con el anticuerpo primario anti-phospho-Cdc2 (Tyr<sup>15</sup>) (Cell Signaling Technology), a una dilución 1:500 y siguiendo las recomendaciones de la casa comercial, seguido por el anticuerpo secundario anti-rabbit IgG (Amersham Biosciences), a una dilución 1:20000.

Para realizar el control de carga de las proteínas Pds1, Cdc11, Swe1 y Cdc28<sup>Tyr19</sup> se realizó un *stripping* de las membranas, siguiendo el protocolo de la casa comercial (Hybond C-Extra; Amersham Biosciences), las mismas que se incubaron durante 2 horas con el anticuerpo anti-actin (I-19; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), a una dilución 1:2000, seguidos por el anticuerpo secundario anti-rabbit IgG (Amersham Biosciences), a una dilución 1:20000. Finalmente, las proteínas fueron detectadas usando el kit ECL Western blotting detection (Amersham Biosciences) y el equipo de quimioluminiscencia LAS-3000 (Fuji) en combinación con el programa Multi Gauge, v3.0.

### 4.15. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA E INMUNOCITOQUÍMICA

#### 4.15.1. Técnicas de tinción

##### 4.15.1.1 Tinción con DAPI

Para visualizar la posición y el número de núcleos, las células de levadura, se fijaron con 3,7 % de formaldehído durante 60 minutos, se lavaron y se resuspendieron en 10 µl de PBS. A continuación, se tiñeron con la sonda intercalante de fluorescencia DAPI, a una concentración de 0,1 mg/ml. Para ello, se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 2 veces con PBS y se resuspendieron en 4 µl de solución de montaje (0,1 % de 1,4-fenilendiamine en PBS (P/V), 70 % de glicerol) (Pringle *et al.*, 1991). Las muestras se colocaron en portaobjetos, se cubrieron con cubreobjetos y se

sellaron con esmalte de uñas incoloro. La visualización de las muestras se realizó con el objetivo 100x y utilizando el microscopio óptico de fluorescencia Nikon Eclipse E-800.

#### **4.15.1.2. Tinción con Faloidina**

Para visualizar el esqueleto de actina de las respectivas cepas de levadura, las células contenidas en 100  $\mu$ l de cultivo se fijaron en 4 % de formaldehído durante 10 minutos. Seguidamente, se centrifugaron a 800 xg durante 5 minutos, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 50  $\mu$ l de PBS. Las células resuspendidas, se tiñeron con 5  $\mu$ l de una solución de 6,6  $\mu$ M de Rodamina/Faloidina diluída en metanol (77418-Sigma Aldrich) y se incubaron durante 12 horas en oscuridad. Las células se lavaron 5 veces con PBS y se resuspendieron en 4  $\mu$ l de solución de montaje. La visualización de las muestras se realizó utilizando el mismo sistema detallado en el apartado anterior.

#### **4.15.2. Localización subcelular de proteínas de fusión con GFP y Glc7-yEmCitrine**

La cepa MMR11-1, que expresa la proteína recombinante Glc7-yEmCitrine, fue usada para estudiar la localización subcelular de Glc7 en ausencia de la proteína Ypi1. Las células de levadura se crecieron en YPD hasta la saturación, se diluyeron a  $OD_{660}$  0,01 y se incubaron durante 1 hora. Se añadió doxiciclina (diluída en etanol al 50 %), a una concentración final de 100  $\mu$ g/ml. A los controles se les añadió el mismo volumen del diluyente. Los cultivos se crecieron durante 24 horas a 28 °C y se añadió la misma cantidad de doxiciclina y diluyente cada 12 horas para remediar su posible degradación. Las células se recolectaron después de las 24 de incubación, se centrifugaron a 800 xg, se resuspendieron en PBS y se fijaron con 2 % de formaldehído durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células así fijadas, se lavaron 3 veces con PBS y se conservaron a 4 °C hasta su posterior observación microscópica. De manera similar, la cepa MMR13-4 fue usada para monitorizar la localización de Glc7 en ausencia de la proteína Sds22 funcional. Las células

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

se crecieron en YPD a 26 °C hasta una OD<sub>660</sub> de 0,5, momento en que fueron mantenidas a la misma temperatura o fueron sometidas a un *shift* de temperatura de 26 °C a 37 °C durante 1 hora. Las muestras fueron tomadas y fijadas como se describió para la cepa MMR11-1. La observación microscópica de las muestras se realizó tal como se detalla en el primer apartado de esta sección.

### 4.15.3. Localización de Cdc11

Las cepas CML476 y MMR09-4 se transformaron con el plásmido centromérico pAC115, que expresa la proteína de fusión Cdc11-GFP (Casamayor and Snyder, 2003). Los cultivos se crecieron en presencia de 100 µg/ml de doxiciclina durante 35 horas, fijados con 2 % de formaldehído durante 5 minutos, lavados en PBS y conservados a 4 °C. La localización de las septinas se realizó mediante microscopía de fluorescencia utilizando un filtro GFP.

### 4.15.4. Inmunocitoquímica

La inmunocitoquímica se realizó siguiendo el método de inmunofluorescencia indirecta. Para ello, las células fueron preparadas tal como se ha descrito previamente en (Pringle *et al.*, 1991).

#### 4.15.4.1. Tinción de tubulina

Cultivos de las cepas CML476, MMR09-4 (*TetO<sub>7</sub>:Ypi1*), SAY306 y SAY302 (*sds22-5*) se procesaron como se detalla en el apartado 4.11.1 (C) y 4.11.2. Las células se prepararon para una inmunofluorescencia indirecta y se incubaron con el anticuerpo monoclonal de rata YL1/2 contra la  $\alpha$ -tubulina de levadura (Serotech) (proporcionado por el Dr. Jesús Avila, CBM, Madrid), a una dilución 1:250 durante 12 horas y, posteriormente, con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 goat anti-rat IgG, a una dilución 1:100 (Invitrogen), para marcar los microtúbulos. La captura de las imágenes se realizó mediante la cámara Color View 12 CCD en combinación con el programa de imagen

Analyze v3.0 y adaptada al microscopio óptico de fluorescencia Nikon Eclipse E-800.

#### **4.15.4.2. Localización de Pds1**

Cultivos de las cepas MMR27-10, MMR28-3, MMR35-7 y MMR36-1 se crecieron tal como se detalla en el apartado 4.5.4.2, con la diferencia que los muestreos se realizaron a las 0, 45 y 110 minutos. Las células se prepararon para una inmunocitoquímica indirecta e incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-c-myc 9E10 (Covance) a una dilución 1:500 durante 12 horas seguido de una incubación con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Invitrogen). La captura de las imágenes se realizó mediante la cámara digital Orca-ER C4742-80-12AG (Hamamatsu Photonics) en combinación con el programa de imagen Wasabi v1.5 y adaptada al microscopio óptico de fluorescencia Nikon Eclipse E-800.



## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

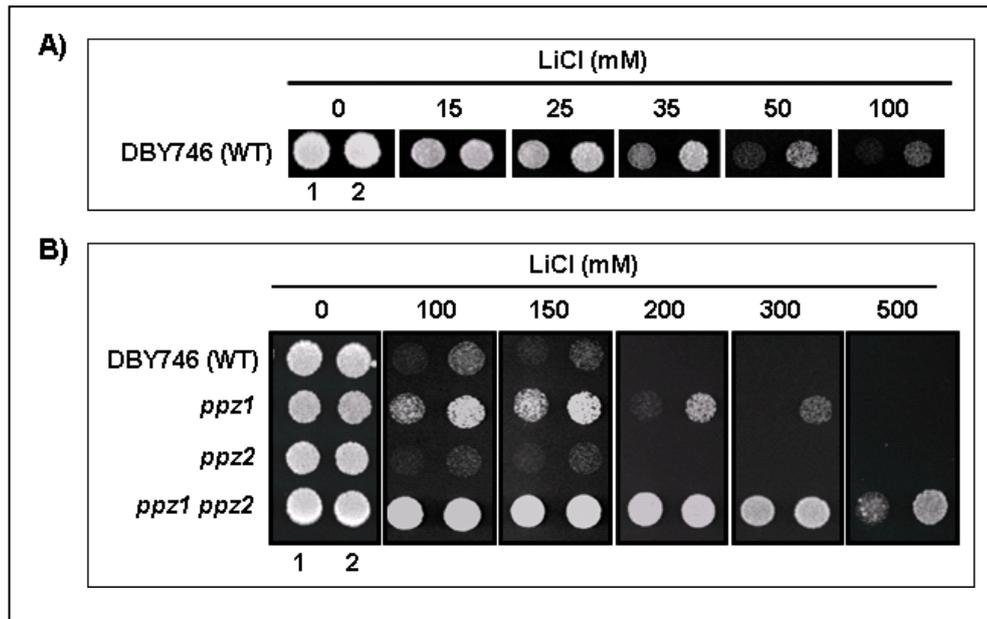
### 5.1. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LA SOBREENPRESIÓN DE *YPI1*

Dado que la presencia de la proteína Ypi1 es esencial para la viabilidad celular, nos planteamos la posibilidad de estudiar los efectos fenotípicos que podría tener la sobreexpresión de Ypi1 en algunos procesos fisiológicos regulados por Glc7. Teníamos evidencias que indicaban que la sobreexpresión de Ypi1 no afecta de forma significativa la tasa de crecimiento de las células salvajes en condiciones normales de incubación. Por el contrario provoca una disminución en el acúmulo de glucógeno, agrava el fenotipo lítico de un mutante *slt2/mpk1*, rescata la letalidad sintética de un mutante *sit4 tetO:HAL3* en presencia de doxiciclina, y mejora el crecimiento a 37 °C y la salida de un bloqueo en fase G<sub>1</sub> de una cepa *sit4* (García-Gimeno *et al.*, 2003). Sin embargo, con la única excepción del efecto sobre la acumulación de glucógeno, estos fenotipos podrían justificarse asumiendo que Ypi1 actuara también como un inhibidor de la fosfatasa Ppz1, una posibilidad que no había sido descartada por completo (García-Gimeno *et al.*, 2003). Dado que, tanto Ppz1 como Glc7 han sido relacionados con fenotipos de tolerancia salina, nos propusimos como objetivo elucidar a través de qué fosfatasa ejecutaba Ypi1 su papel en este aspecto de la biología de la levadura. Para ello, estudiamos el efecto que podría tener la sobreexpresión de *YPI1* en diversos mutantes involucrados en tolerancia salina.

Los resultados obtenidos demuestran que la sobreexpresión de *YPI1* incrementa la tolerancia a cloruro de litio en una cepa salvaje (figura 18A) y que este efecto es más marcado en ausencia de la actividad Ppz (figura 18B). Ello indica que la tolerancia salina otorgada por la sobreexpresión de *YPI1* es independiente de la fosfatasa Ppz, hecho que deja abierta la posibilidad de que dicho efecto sea vehiculado a través de Glc7.

Un estudio realizado sobre el mutante *glc7-109*, indica que su sensibilidad a sal es debida a cambios en el potencial de membrana e involucra a los transportadores de potasio Trk1 y Trk2 y a la principal bomba de protones Pma1 (H<sup>+</sup>ATPasa) como probables candidatos a ser regulados por la fosfatasa

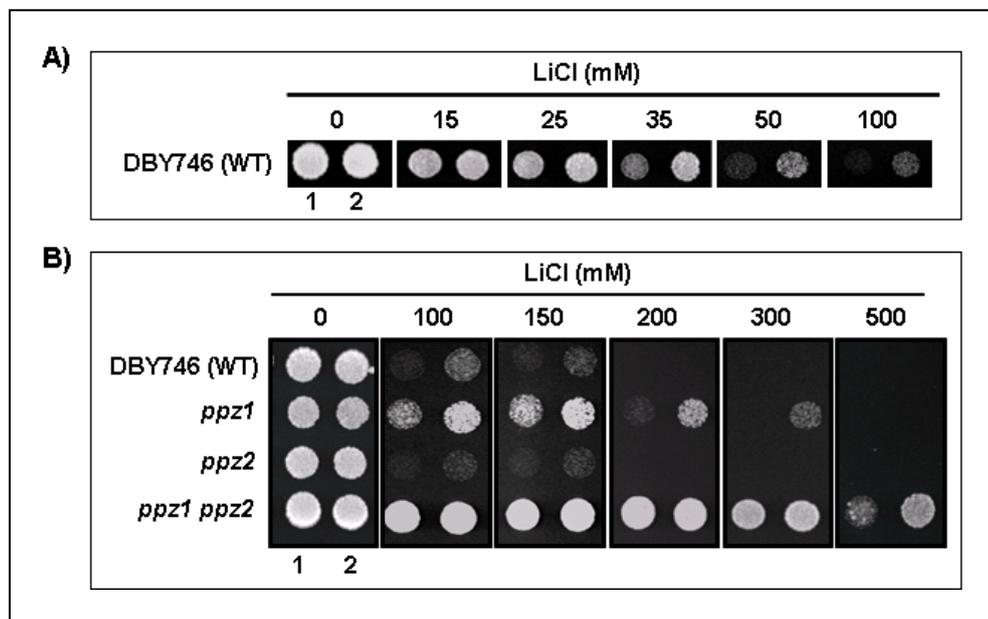
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 18. Efecto de la sobreexpresión de *YPI1* en tolerancia salina. A)** La cepa salvaje DBY746 portadora de los plásmidos pWS93 vacío (1) y pWS93-*YPI1* (2), y se sembraron a una  $OD_{660}$  de 0.05 en placas de YPD conteniendo diferentes concentraciones de cloruro de litio. **B)** Cultivos de las cepas indicadas, se transformaron con los mismos plásmidos y se crecieron en placas de YPD conteniendo diferentes concentraciones de cloruro de litio. El crecimiento fue monitorizado después de 72 horas de incubación a 28 °C.

Glc7 en respuesta a situaciones específicas de stress (Williams-Hart *et al.*, 2002). En este sentido, podríamos pensar que la tolerancia salina otorgada por *YPI1* sería vehiculada a través de estos transportadores, por lo que realizamos ensayos fenotípicos sobre mutantes *trk*. Como podemos ver en la figura 19, la sobreexpresión de *YPI1* aumenta la tolerancia salina de un mutante *trk1* y esta tolerancia se incrementa en un doble mutante *ppz1 trk1* y *ppz1 trk2*, respectivamente. Estos resultados nos permiten concluir que el efecto de halotolerancia de *YPI1* es también independiente de estos transportadores de potasio, quedando abierta la posibilidad de que el papel de Ypi1 en tolerancia salina esté relacionado con el control de la ATPasa de protones. Pma1.

En *S. cerevisiae* la principal bomba de sodio y litio codificada por el gen *ENA1* juega un rol importante en tolerancia salina. Consecuentemente, un mutante *ena1* es altamente sensible a bajas concentraciones de  $Na^+$  y  $Li^+$ . El gen *ENA1* es apenas expresado bajo condiciones normales de crecimiento, pero resulta fuertemente inducido por exposición a altas concentraciones de sal



**Figura 19. La sobreexpresión de *YPI1* incrementa la tolerancia a cloruro de litio en mutantes *trk1*, *trk2* y en un doble mutante *trk1 ppz1*. A y B)** Cultivos de las cepas indicadas, se transformaron con los plásmidos pWS93 vacío (1) y pWS93-*YPI1* (2), y se sembraron a una OD<sub>660</sub> de 0.05 en placas de YPD conteniendo diferentes concentraciones de cloruro de litio. El crecimiento fue monitorizado después de 72 horas de incubación a 28 °C.

y a pH alcalino (Garcia-deblas *et al.*, 1993). La regulación de la expresión de *ENA1* en respuesta a estrés salino o alcalino es mediada por diferentes vías (Marquez and Serrano, 1996). que incluye la vía de la MAPK Hog1, la vía de la calcineurina, la vía TOR, la vía Rim101 y la vía de represión por glucosa regulada por la Ser/Thr proteína kinasa Snf1 (Ruiz and Arino, 2007). La activación de la vía de la calcineurina induce la defosforilación y entrada al núcleo del factor transcripcional Crz1, que se une a secuencias específicas, conocidas como CDREs, en promotores que responden a la calcineurina (Matheos *et al.*, 1997; Stathopoulos and Cyert, 1997; Mendizabal *et al.*, 1998). La mutación en la Arg<sup>260</sup> del mutante *glc7-109* provoca, entre otros, un fenotipo de marcada sensibilidad a sodio y a pH alcalino, fenotipo que es corregido por adición de potasio en el medio (Williams-Hart *et al.*, 2002). Por otra parte, la Arg<sup>260</sup> se encuentra muy cerca de la Phe<sup>256</sup>, un residuo que se localiza en el canal hidrofóbico de Glc7 y hace contacto con el residuo aromático del característico motivo de unión (R/R)(V/I)(X(F/W) a sus subunidades

---

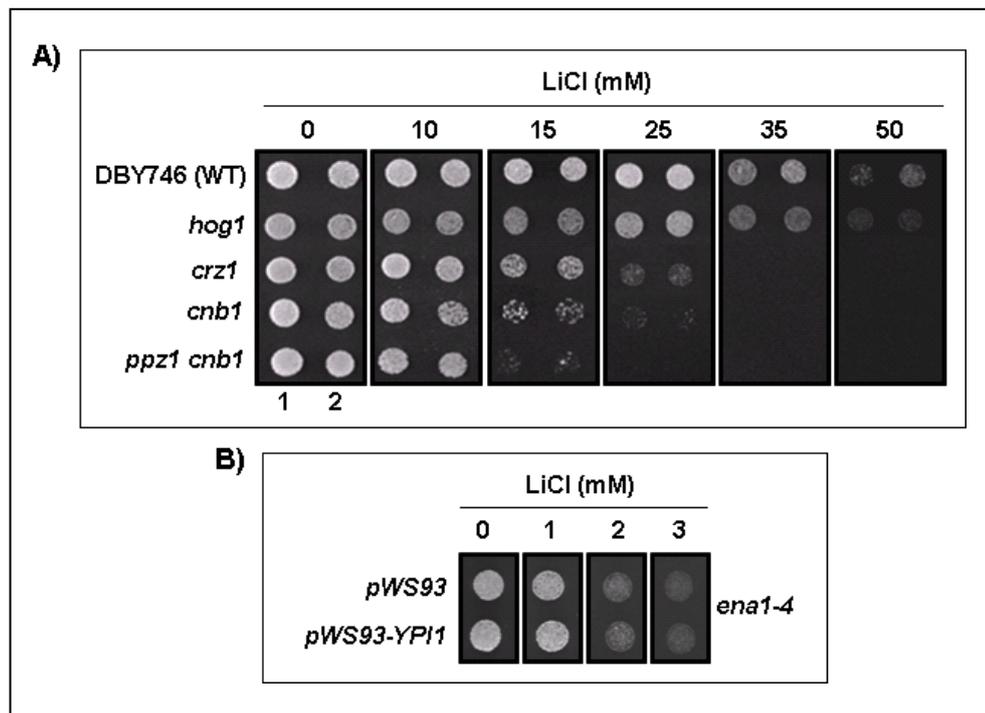
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

reguladoras. En base a ello, nosotros hipotetizamos que el defecto del mutante *glc7-109* en homeostasis iónica podría ser debido a una deficiente interacción de la proteína mutada con alguna subunidad reguladora relevante para la tolerancia salina. En este sentido, no descartamos la posibilidad de que la tolerancia salina otorgada por la sobreexpresión de *YPI1* podría ser debida a la inducción de la expresión de *ENA1* mediante alguna de estas vías.

Así, al realizar un análisis de sobreexpresión de *YPI1* en mutantes *ena1-4*, *cnb1*, *crz1* y *hog1*, encontramos que el fenotipo de tolerancia salina proporcionado por la sobreexpresión de *YPI1* se pierde, lo que demuestra que el papel de Ypi1 en tolerancia salina es dependiente de *ENA1* (ver figuras 20A y B). En concordancia, ensayos de expresión empleando un reporter  $\beta$ -galactosidasa, realizados en nuestro laboratorio, indican que la sobreexpresión de *YPI1* incrementa los niveles de expresión de *ENA1* (datos no mostrados). La posibilidad de que Glc7 pueda controlar la expresión de *ENA1* ha sido reforzada por el resultado de un reciente análisis para evaluar el efecto en tolerancia salina de la mutación de las 18 subunidades reguladoras no esenciales de Glc7 conocidas, en el que se encontró que la delección de *REF2* provoca un fenotipo de sensibilidad a sodio, litio, cationes tóxicos y pH alcalino, y que este fenotipo es debido a un defecto en la inducción de *ENA1* (Ferrer-Dalmau *et al.*, 2010).

### 5.2. CREACIÓN DE MUTANTES CONDICIONALES *ypi1*

El estudio de la función de un gen a partir de su sobreexpresión presenta desventajas evidentes respecto a la delección y no siempre está exento de interferencias o artefactos. Así, el exceso de Ypi1 podría alterar el equilibrio de la interacción entre otras subunidades reguladoras de Glc7 y la subunidad catalítica de la fosfatasa. Por este motivo, optamos por la creación de mutantes condicionales como medio para obtener pruebas concluyentes del papel de esta proteína.



**Figura 20. Fenotipos de sobreexpresión de *YPI1* en mutantes *ena1-4*, *hog1*, *crz1* y *cnb1*.** **A y B)** Cultivos de las cepas indicadas, se transformaron con los plásmidos *pWS93* vacío (1) y *pWS93-YPI1* (2), y se sembraron a una  $OD_{660}$  de 0.05 en placas de YPD conteniendo diferentes concentraciones de cloruro de litio. El crecimiento fue monitorizado después de 72 horas de incubación a 28 °C.

### 5.2.1. Construcción y expresión de una forma rápidamente degradable de la proteína Ypi1 (degrón)

Con la intención de esclarecer el efecto de la depleción endógena de la proteína Ypi1 sobre el crecimiento y la fisiología de la levadura diseñamos una estrategia fundamentada en el sistema de expresión basado en un degrón (Bachmair and Varshavsky, 1989). Para ello, construimos una cepa haploide donde la copia cromosómica del gen *YPI1* fue inactivada por inserción del marcador de selección *KanMX4* y la función esencial de la proteína fue suplementada por el plásmido centromérico *pTS-YPI*, que lleva un sistema condicional de expresión, reprimible por glucosa. En este sistema la proteína recombinante 3xHA-*YPI1*, en su extremo N-terminal, fue fusionada *in frame* con el casete *Ub-R-LacI*, donde Ub es la ubiquitina, R un residuo de arginina y *LacI* representa un segmento de 23 aminoácidos del represor *LacI* de *Escherichia coli*, la presencia del cual permite una rápida degradación de la proteína (ver

---

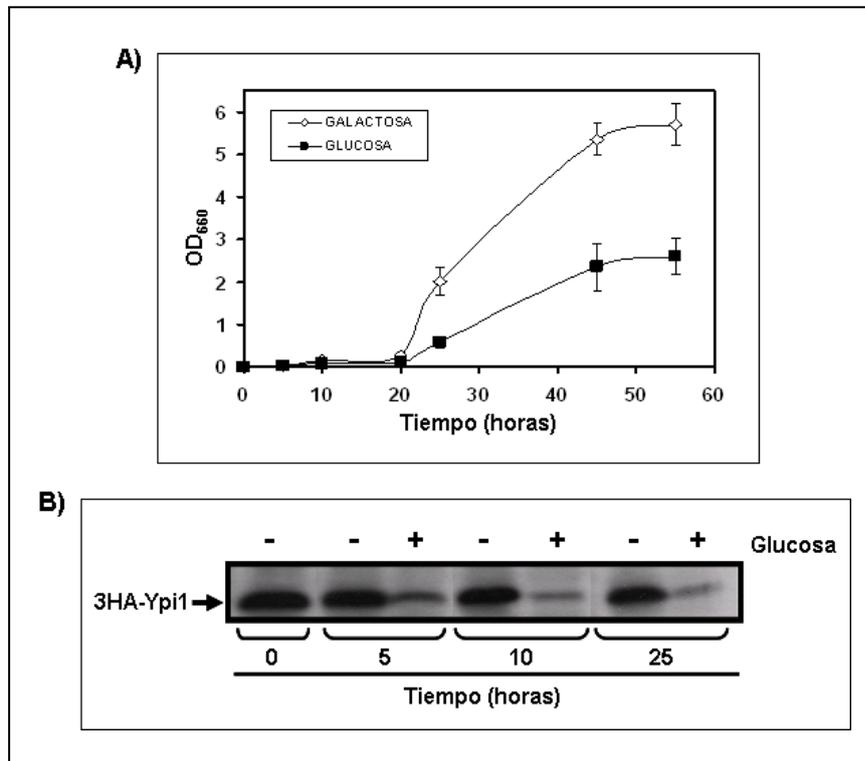
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

figura 14 de materiales y métodos). (Bachmair and Varshavsky, 1989). Esta forma inestable de la proteína Ypi1 (3xHA-YPI1<sup>degrón</sup>) fue expresada desde un promotor regulable por galactosa *GAL1*. Cuando las células son crecidas en galactosa, 3xHA-YPI1<sup>degrón</sup> es expresada y las células son viables; sin embargo, cuando se añade glucosa la expresión de 3xHA-YPI1<sup>degrón</sup> se termina y la proteína es rápidamente degradada.

Como esperábamos, cuando los cultivos creciendo en fase exponencial fueron sembrados desde un medio con galactosa a un medio conteniendo glucosa, la represión transcripcional del gen *YPI1* desde el promotor *GAL1* se dejó notar porque la tasa de crecimiento de la cepa MMR02-1c empezó a disminuir a partir de las 24 horas (ver figura 21A). Sin embargo, en medio sólido el fenotipo no fue muy marcado (datos no mostrados). Para determinar si la disminución del crecimiento de la cepa MMR02-1c estaba correlacionada con la depleción de la proteína Ypi1, realizamos un inmunoblot de los niveles de la proteína siguiendo la transición de galactosa a glucosa. Como mostramos en la figura 21B, los niveles de la proteína presentaron una disminución a las 5 horas de ser transferidos a medio con glucosa, no llegando a desaparecer del todo. Un análisis por microscopía no mostró ninguna alteración morfológica en las células así tratadas.

### 5.2.2. Expresión de *YPI1* desde un plásmido portador del promotor *tetO*

Controlar la expresión de un gen desde promotores tales como *GAL1* involucra cambios en las condiciones de cultivo que pueden generar efectos pleiotrópicos no deseados en el metabolismo de la célula, eclipsando el efecto fenotípico provocado por la inducción o represión del gen estudiado (Gari *et al.*, 1997). Por este motivo, y porque en la anterior estrategia no logramos encontrar ningún fenotipo atribuible a la desaparición parcial de la proteína, decidimos indagar en la búsqueda de nuevas estrategias orientadas a conseguir la expresión condicional de *YPI1*. Para este propósito, el uso de promotores regulables por doxiciclina resulta una interesante opción, puesto que, la doxiciclina no es metabolizada por las células y, a las concentraciones empleadas, no presenta ninguna influencia en el crecimiento celular. Por ello,



**Figura 21. Análisis de la depleción de Ypi1 y su efecto en el crecimiento de *S. cerevisiae*.** **A)** Cultivos en fase exponencial de la cepa MMR02-1c, creciendo en galactosa, fueron diluidos a una OD<sub>660</sub> de 0,01 en medio CMGal (galactosa) y medio CM (glucosa). El crecimiento de las células fue monitorizado hasta las 56 horas. Para evitar el efecto de la depleción de nutrientes, los cultivos fueron resuspendidos en medio fresco cada 24 horas. **B)** A los indicados tiempos y tras el paso de medio CMGal a CM y CMGal, se prepararon extractos crudos de la cepa MMR02-1c. Aproximadamente 50 µg de proteína fue sometida a un inmunoblot con un anticuerpo anti-HA.

construimos una cepa haploide (MMR05-5a) donde la copia cromosómica del gen *YPI1* fue inactivada por inserción del marcador *KanMX4* y la función esencial de la proteína fue suplementada por el plásmido centromérico pCM-*YPI1*, que expresa el *ORF* del gen *YPI1* con 3 epítopos HA. Este sistema contiene un casete en el que la proteína Ypi1 es expresada desde el promotor híbrido *tetO<sub>2</sub>-CYC1TATA* seguida de un terminador *CYC1*. Para verificar y optimizar las condiciones de depleción de la proteína Ypi1, las células fueron sembradas en medio CM carente de triptófano con concentraciones crecientes de doxiciclina, tanto en medio líquido como sólido. De igual manera que en el caso del degrón, la desaparición de la proteína Ypi1 fue analizada por la disminución de la tasa de crecimiento de las células. Así, los resultados

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

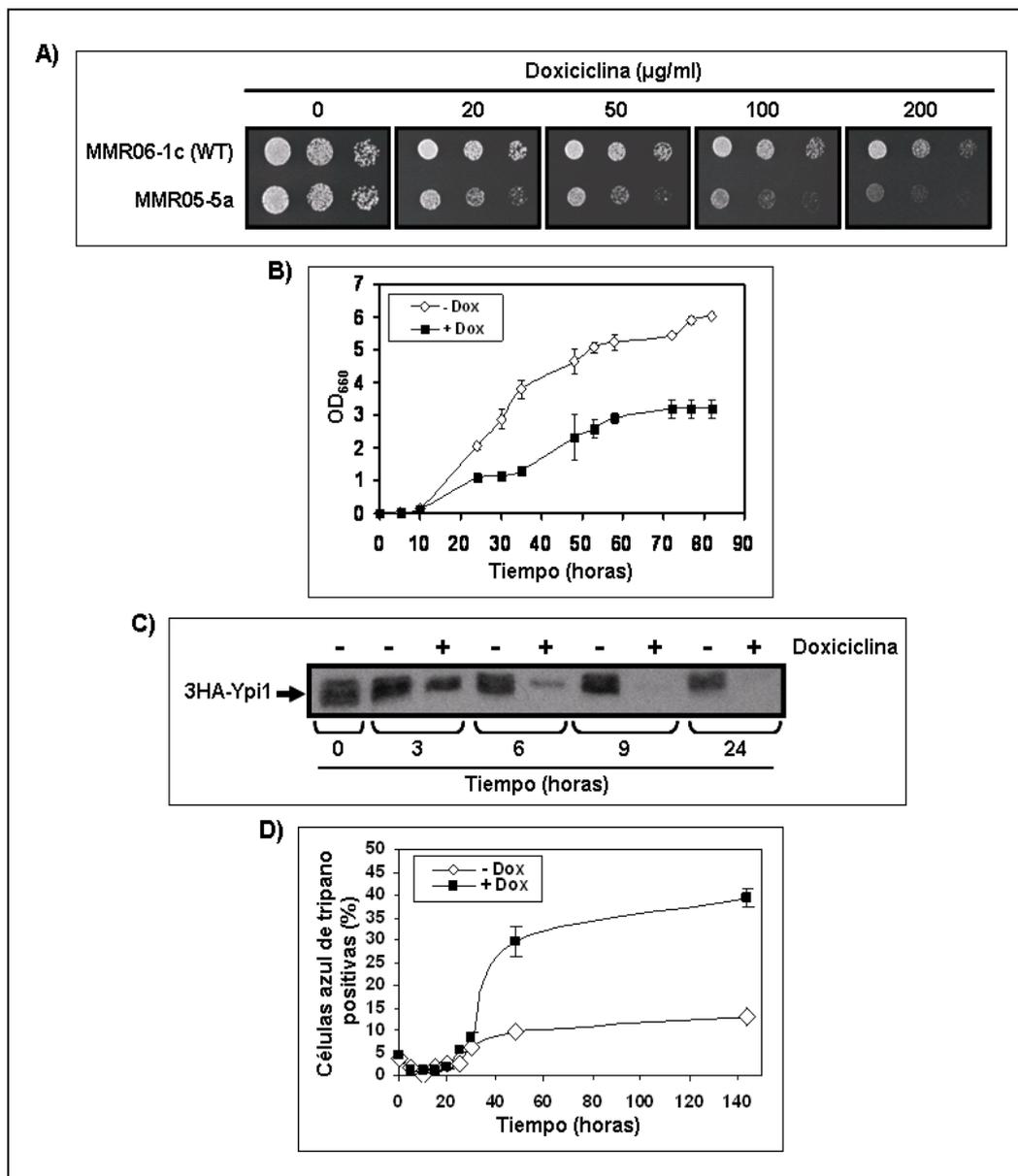
obtenidos indican que una concentración entre 50 y 100 µg/ml de doxiciclina es la óptima para realizar el ensayo de expresión y que una concentración de 200 µg/ml perjudica el crecimiento incluso en una cepa salvaje (ver figura 22 A y B).

Una vez optimizadas las condiciones de expresión, realizamos un inmunoblot para verificar si la disminución del crecimiento estaba asociada a la disminución de la expresión de la proteína. Para ello, la cepa MMR05-5a fue sembrada en medio CM en ausencia y presencia de 50 µg/ml de doxiciclina e incubada durante 25 horas. Tal como se observa en la figura 22 C, los niveles de proteína empiezan a disminuir a partir de las 3 horas, con una desaparición total hacia las 9 horas. Finalmente, ensayos realizados por exclusión de azul tripano, colorante vital que tiñe células muertas, confirmaron que la disminución en la tasa de crecimiento de los mutantes *ypl1* en doxiciclina puede ser atribuible, al menos en parte, a la muerte celular. Como podemos observar en la figura 22 D, el incremento de la muerte celular se inicia hacia las 24 horas, coincidiendo con la disminución de la curva de crecimiento.

Por todo ello, y teniendo en cuenta que este sistema nos permitió la desaparición total de la proteína en células tratadas con doxiciclina, realizamos diferentes ensayos orientados a asociar la depleción de la proteína con algún otro fenotipo relacionado con *Glc7*.

### 5.2.2.1 Efecto de la depleción de Ypl1 en integridad celular.

La vía *PKC1-MPK1* constituye un elemento clave en el mantenimiento de la integridad celular y mutantes en esta vía presentan fenotipos de lisis ante una exposición a altas temperaturas (37 °C), a la cafeína y frente a agentes químicos que dañan la pared celular como el rojo congo o el blanco de calcofluor. Este efecto es corregido por la adición de un estabilizante osmótico, como el sorbitol (Levin and Errede, 1995). En este sentido, un estudio realizado sobre el alelo termosensible *glc7-10* indica que su defecto en el crecimiento, a las condiciones restrictivas de crecimiento, es suprimido en medios de alta osmolaridad y es aditivo con la delección de *SLT2* o *BCK1* o con la sobreexpresión de una versión no funcional de *PKC1* (Andrews and Stark, 2000). En concordancia con ello, la sobreexpresión de *YPI1* tiene un efecto



**Figura 22. Regulación de expresión de Ypi1 a partir de un plásmido portador del promotor *tetO*.** **A)** Diluciones seriadas de la cepa MMR05-5a se sembró en placas de CM en presencia o ausencia de las concentraciones indicadas de doxiciclina. Como control se utilizó la cepa haploide MMR06-1c transformada con el plásmido vacío. El crecimiento fue monitorizado después de 48 horas a 28 °C. **B)** Los cultivos fueron diluidos a una OD<sub>660</sub> de 0,01 en 5 ml de medio CM en ausencia y presencia de 50 µg/ml de doxiciclina durante 80 horas. Se añadió doxiciclina cada 12 horas para remediar la degradación del antibiótico. **C)** 50 µg de proteína total fueron analizados por inmunoblot. **D)** cultivos de la cepa MMR05-5a creciendo en ausencia y presencia de doxiciclina a los tiempos indicados, fueron expuestas a azul de tripano a una concentración final de 0,2 % en PBS y el porcentaje de células muertas (azul de tripano positivas) fue determinada por conteo de al menos 500 células.

negativo en el crecimiento de una cepa *slt2* (Garcia-Gimeno *et al.*, 2003). Por tanto, con el fin de investigar el efecto de la depleción de Ypi1 en el

---

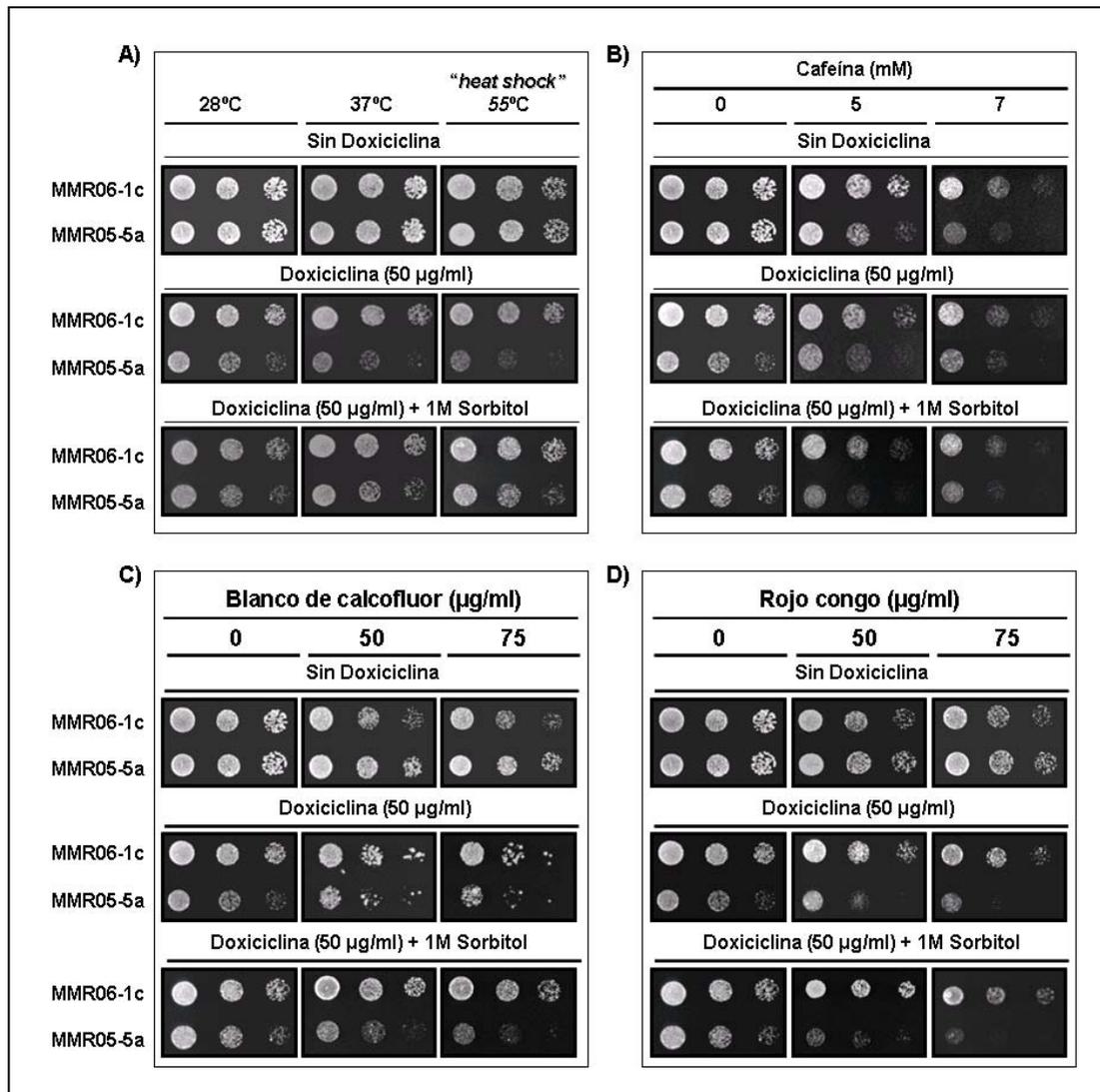
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

mantenimiento de la integridad de la pared celular, realizamos ensayos con el mutante condicional *ypl1* regulable por doxiciclina (cepa MMR05-5a). Para ello, las células fueron sembradas en medio CM en ausencia o presencia de 50 µg/ml de doxiciclina y/o 1M de sorbitol e incubadas a 28 y 37 °C o sometidas a un *heat shock* de 55 °C durante 45 minutos y luego incubadas a 28 °C. Nuestros resultados muestran fenotipos de termosensibilidad del mutante condicional *ypl1* (cepa MMR05-5a) y que dicho efecto es ligeramente corregido por adición de sorbitol (ver figura 23 A). Así mismo, el mutante *ypl1* muestra sensibilidad incrementada a la cafeína, compuesto al que son sensibles muchos mutantes de pared, y a varios agentes que dañan la pared como el blanco de calcofluor y el rojo congo (Figura 23 B-D). Sorprendentemente, en este caso, el efecto no es remediado en presencia del estabilizante osmótico. Sin embargo, la falta de Ypl1 provoca fragilidad de las células ante agresiones físicas. Como mostramos en la figura 24, las células tratadas con doxiciclina son hipersensibles a la sonicación. El mismo ensayo realizado con la cepa salvaje MMR06-1c nos indica que dicho efecto no es debido a la mera presencia de la doxiciclina.

En resumen, los resultados que presentamos aportan evidencias que adjudican a Ypl1 un posible papel en la vía de mantenimiento de la integridad celular.

### **5.2.3. Obtención de un mutante condicional regulable por doxiciclina mediante el reemplazamiento cromosómico del promotor.**

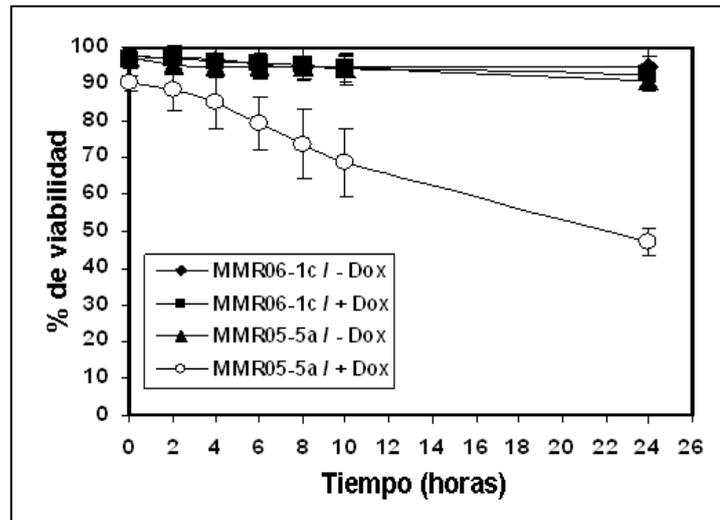
Para este propósito, intentamos reemplazar el promotor nativo del gen *YPI1* por el promotor *tetO<sub>2</sub>* que lleva el marcador de selección KanMX4, el cual confiere resistencia a la geneticina y el transactivador tTA, que actúa como un activador de la expresión de genes bajo el control del *tandem* de secuencias *tetO*, permitiendo el control de la transcripción del gen mediante la adición de doxiciclina en el medio (Belli *et al.*, 1998). Sin embargo, tras múltiples intentos, no conseguimos generar ninguna cepa con la sustitución deseada. Este fracaso no es demasiado sorprendente, ya que han sido descritos numerosos casos en los cuales no se logró la integración del casete, probablemente



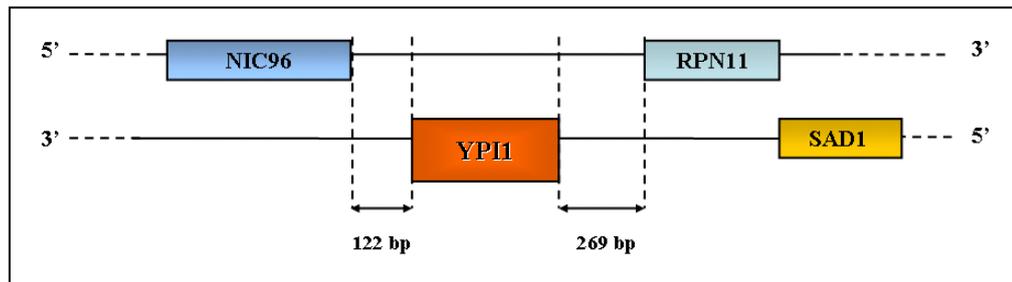
**Figura 23. Sensibilidad del mutante condicional *ypl1* a temperatura, cafeína, blanco de calcofluor y rojo congo.** **A**, las cepas MMR06-1c y MMR05-5a, fueron crecidas en medio CM carente de triptófano y diluciones seriadas fueron sembradas en medio CM en ausencia o presencia de 50 µg/ml de doxiciclina y/o 1M de sorbitol e incubadas a las temperaturas indicadas o sometidas a un *heat shock* a 55°C durante 45 minutos y luego incubadas a 28 °C. El crecimiento fue monitorizado después de 48 horas. **B**, **C**, **D**, bajo las mismas condiciones, las mismas cepas, fueron sembradas en medio CM en ausencia o presencia de 50 µg/ml de doxiciclina con las concentraciones indicadas de cafeína, blanco de calcofluor, rojo congo y sorbitol.

debido al tamaño relativamente grande (3,9 Kb) del casete de inserción con respecto a la corta secuencia del promotor a ser reemplazado y/o la ubicación cromosómica del gen (Arino and Herrero, 2003), como es el caso del gen *YPI1* que se encuentra localizado en la cadena Crick del cromosoma VI y tiene muy cerca a dos genes esenciales (codificados en la cadena Watson) (ver figura 25)

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 24. Sensibilidad del mutante condicional *ypl1* frente a la sonicación.** Las cepas MMR06-1c y MMR05-5a, se sembraron en medio CM hasta alcanzar la fase exponencial y se diluyeron a una OD<sub>660</sub> de 0.01 en 5 ml de YPD, en ausencia o presencia de 50 µg/ml de doxiciclina, y se incubaron a 28 °C. A los tiempos indicados se realizaron muestreos de las células y se sonicaron en hielo, durante 30 segundos, se diluyeron y plaquearon en YPD. La viabilidad de los cultivos se analizó después de 24 horas de incubación por recuento de colonias.



**Figura 25. Esquema de la ubicación del gen *YPI1* en el cromosoma VI de la levadura *S. cerevisiae***

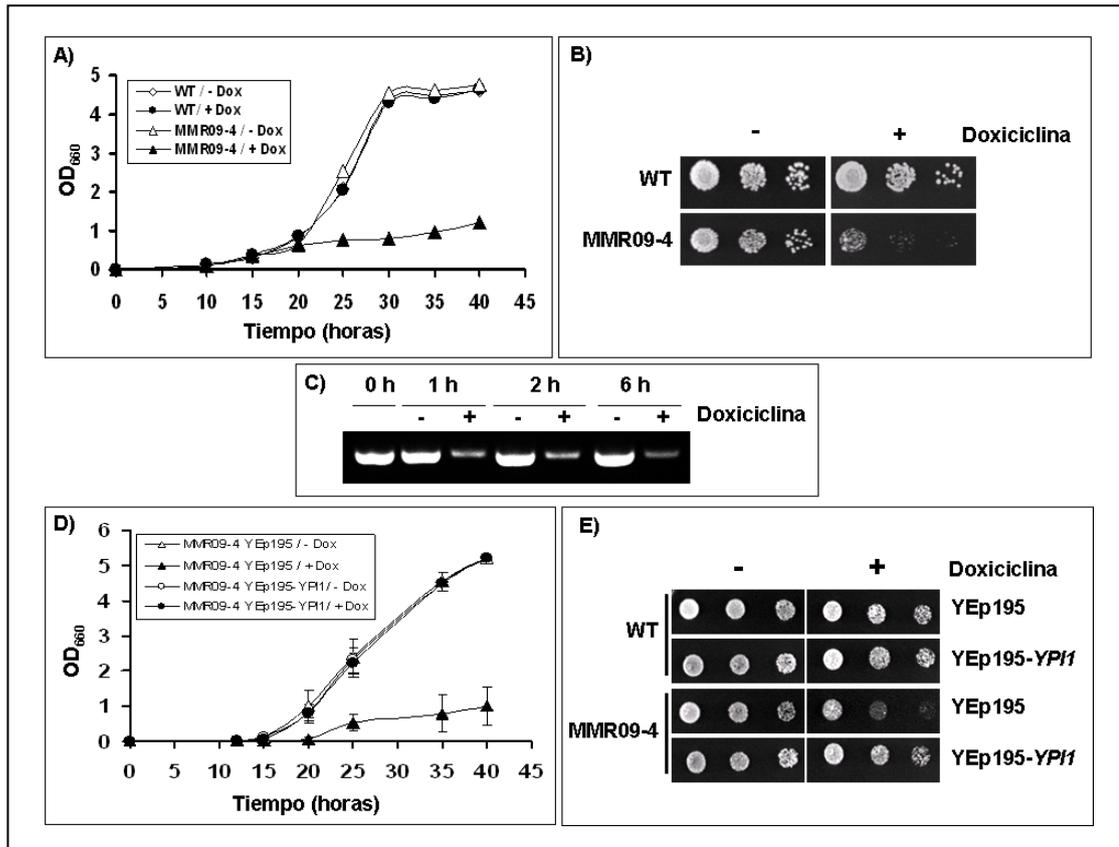
Con la intención de solventar los problemas causados en la integración del promotor *KanMX4-tetO* clásico, en el año 2003 fue propuesta una variante del sistema de reemplazamiento *tetO*, en el cual la integración de la secuencia del transactivador (*tTA*) dentro del genoma de la levadura permitió la obtención de un casete de menor tamaño (Yen *et al.*, 2003). Así, reemplazamos el promotor nativo en la región cromosómica del gen *YPI1* por el nuevo promotor

*tetO* construyendo una cepa haploide (MMR09), donde la proteína Ypi1 fue expresada desde el promotor *KanMX4-tetO<sub>7</sub>*. El efecto en el crecimiento atribuible a la desaparición de Ypi1 se verificó inoculando las células en medio YPD suplementado con 100 µg/ml de doxiciclina. Se analizaron 19 clones, de los cuales 2 de ellos fueron seleccionados por presentar una disminución marcada de su tasa de crecimiento en presencia de doxiciclina, tanto en medio líquido como en medio sólido, siendo designados como cepas MMR09-1 y MMR09-4. Los demás clones presentaron un defecto de crecimiento en medio sólido, pero éste era menos marcado en medio líquido (datos no mostrados). Como podemos observar en la figura 26, la cepa MMR09-4 se caracterizó mediante ensayos fenotípicos, mostrando una marcada disminución de su tasa de crecimiento en medio líquido y en medio sólido no llegó a formar colonias macroscópicas (figura 26 A y B). Así mismo, un análisis de RT-PCR claramente mostró una marcada disminución de los niveles de RNA mensajero de *YPI1* unas horas después de la adición de doxiciclina (figura 26 C). El defecto en el crecimiento fue específicamente debido a la falta de *YPI1* porque la introducción de un plásmido episomal que expresa *YPI1*, desde su propio promotor (YEp195-*YPI1*), rescata completamente el defecto en el crecimiento de la cepa MMR09-4, en presencia de doxiciclina en el medio (figura 26 D y E).

### **5.3. BÚSQUEDA DE SUPRESORES EN MULTICOPIA DE LA LETALIDAD PROVOCADA POR LA FALTA DE *YPI1***

Con la intención de profundizar en el estudio de la función esencial de *YPI1*, realizamos una búsqueda de genes en multicopia que fueran capaces de suprimir la letalidad provocada por la falta de Ypi1. Para ello, se utilizaron dos estrategias diferentes basadas en la represión de la expresión de *YPI1*. 1) un sistema de expresión donde el plásmido YEpLac195-*YPI1*, conteniendo el ORF completo del gen *YPI1*, se introdujo en la cepa diploide M5 *ypi1::KAN/YPI1* (Garcia-Gimeno *et al.*, 2003), la cual se sometió a esporulación y a un análisis de *random spore* para obtener la cepa haploide MMR08-1b, que expresa el gen *YPI1* desde el plásmido YEpLac195-*YPI1*. 2) Otro sistema donde el promotor nativo del gen *YPI1* fue reemplazado por el sistema de expresión *tetO<sub>7</sub>*

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



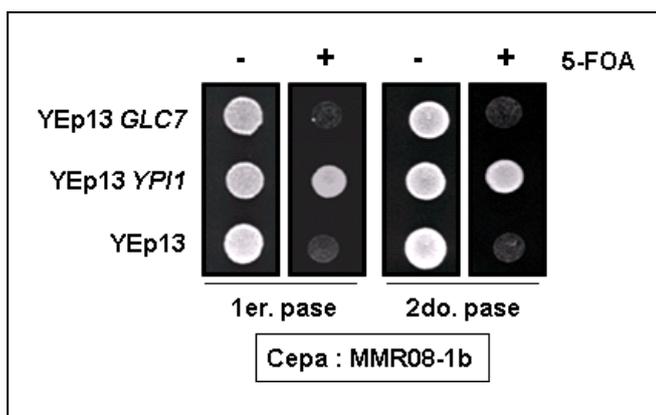
**Figura 26. Caracterización del mutante condicional *ypl1*.** **A.** La cepa salvaje CML476 (WT) y el mutante condicional MMR09-4 (*tetO<sub>7</sub>:YPI1*) creciendo en ausencia (círculos y triángulos blancos, respectivamente) y presencia de 100 µg/ml de doxiciclina (círculos y triángulos negros, respectivamente). La monitorización del crecimiento se realizó durante 40 horas. **B.** Diluciones seriadas de las mismas cepas fueron sembradas en placas de YPD en presencia o ausencia de las concentraciones indicadas de doxiciclina e incubadas durante 48 horas. **C.** Determinación de los niveles de mRNA del gen *YPI1* en la cepa MMR09-4 mediante la técnica semicuantitativa de RT-PCR, después del tratamiento con 100 µg/ml doxiciclina durante los tiempos indicados. **D** y **E.** Las cepas CML476 (WT) y MMR09-4 fueron transformadas con el plásmido episomal YEp195-*YPI1* que expresa el gen *YPI1* desde su propio promotor o con el plásmido vacío YEp195. Los transformantes fueron cultivados en medio líquido y sólido en ausencia (círculos y triángulos blancos) y presencia de 100 µg/ml de doxiciclina (círculos y triángulos negros).

(Yen *et al.*, 2003) y la expresión de *YPI1* es fuertemente reprimida por adición de doxiciclina (cepa MMR09-4). Ambas cepas se transformaron con genotecas plasmídicas basadas en los vectores YEp13 (*LEU2*) y YEp24 (*URA3*), respectivamente.

En el caso de YEp13 se evaluaron aproximadamente 30,000 transformantes, seleccionados por su capacidad de crecer en el medio sintético carente de leucina (marcador auxotrófico del plásmido YEp13). Las células que

crecieron a las 72 horas se replicaron en placas carentes de leucina y suplementadas con 0,1 % de 5-FOA (Burke *et al.*, 2000). El 5-FOA impide el crecimiento de células que expresan el gen *URA3*. Los transformantes expresan el gen *URA3* desde el plásmido YEpLac195-*YPI1*. Por tanto, la exposición de estas células a medios que contienen 5-FOA provocaría la pérdida del plásmido YEpLac195-*YPI1*. De esta manera sería posible la selección de los clones capaces de suprimir el fenotipo de letalidad provocado por la falta de Ypi1. Del total de clones replicados se seleccionaron 155 de ellos por su capacidad de crecer en el medio sintético carente de leucina y suplementado con 0,1 % de 5-FOA, entre las 48 y 120 horas de incubación, que se denominaron, de forma provisional, con el número correspondiente al orden en que fueron aislados, precedidos por una V (de Viable). Estos clones se volvieron a crecer, durante 72 horas, en el mismo medio para corroborar su capacidad de crecimiento en dicho medio. Para descartar los clones que contenían el propio gen *YPI1* se procedió, mediante PCR, a comprobar la presencia de este gen. Del total de clones analizados, 153 fueron descartados porque contenían el gen *YPI1*. El DNA plasmídico de los dos clones restantes (asignados como V6 y V7), que fueron negativos para *YPI1* en la PCR de colonias, se amplificó en la bacteria *E. coli*, se purificó y se realizó un mapeado de las dianas EcoRI presente en los insertos. El análisis indicó que estos clones presentaban las mismas dianas EcoRI. Se escogió uno de los clones (V6) y se secuenciaron los extremos del inserto. Cuando realizamos un análisis BLAST, empleando los recursos habilitados por la base de datos *Saccharomyces Genome Database* (Cherry *et al.*, 1997), verificamos que la región cromosómica del inserto analizado contenía el gen *GLC7*. Sin embargo cuando realizamos los ensayos orientados a corroborar la supresión de la letalidad de *YPI1* mediante la transformación de la cepa MMR08-1b con el plásmido YEp13 que contenía el gen *GLC7* (fragmento correspondiente a las coordenadas 42800-436500) y los subsecuentes pases en el medio sintético carente de leucina y suplementado con 0,1 % de 5-FOA, no obtuvimos el mismo resultado, lo que nos permitió concluir que se trataba de un falso positivo (figura 27).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 27.** La cepa MMR08-1b fue transformada con los plásmidos multicopia YEp13 vacío o portando el gen *YPI1* y la región correspondiente a las coordenadas 428000-436500 que contiene el gen *GLC7*, aislado del clon genómico V6. Se crecieron en medio sintético carente de leucina y suplementado con 0,1 % de 5-FOA en dos pases consecutivos y con períodos de incubación de 72 horas cada uno.

En el caso de YEp24 se evaluaron aproximadamente 15,000 transformantes por su capacidad de crecer en placas conteniendo un medio sintético carente de uracilo (para seleccionar la presencia del plásmido) y suplementado con 100 µg/ml de doxiciclina. Las colonias macroscópicas que aparecieron a las 72 horas de incubación, se replicaron en el mismo medio y un total de 93 clones se seleccionaron por su capacidad de crecer en este medio sintético entre las 72 y 96 horas. El análisis por PCR de estos clones nos indicó que todos contenían el gen *YPI1*.

En resumen, los resultados obtenidas en la búsqueda de genes supresores de la letalidad provocada por la falta de Ypi1, utilizando dos aproximaciones diferentes de represión de la expresión de *YPI1* y bajo las condiciones ensayadas, nos indican que Ypi1 desempeña un papel muy específico en la fisiología de la célula de manera que no existe ninguna proteína capaz de suplir dicha función ni siquiera en sobreexpresión.

### 5.4. Ypi1 FORMA UN COMPLEJO HETEROTRIMÉRICO CON Sds22 Y Glc7

Ha sido descrito que, entre otros procesos fisiológicos, la fosfatasa Glc7 de *S. cerevisiae*, regula la progresión del ciclo celular (Cohen, 2002;

Ceulemans and Bollen, 2004). Esta función es llevada a cabo gracias a su unión con Sds22, una subunidad reguladora esencial que dirige la actividad de de Glc7 hacia sustratos involucrados en la regulación de la mitosis y la segregación cromosómica (Stone *et al.*, 1993; MacKelvie *et al.*, 1995; Peggie *et al.*, 2002; Pinsky *et al.*, 2006).

Sds22, es una subunidad reguladora atípica de Glc7, que carece del característico motivo RVxF presente en muchas subunidades reguladoras de Glc7. Sin embargo, a pesar de la ausencia de este motivo, Sds22 se une a Glc7, y lo hace a través de un dominio central formado por 11 secuencias repetitivas, ricas en leucina (dominio LRR-cap), que interacciona con una región de Glc7 diferente a la usada por el resto de subunidades. De hecho, Sds22 se une a PP1 en un dominio compuesto por las hélices  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$ , que se encuentra localizado lejos del lugar de unión a las demás subunidades reguladoras, compuesto por el canal hidrofóbico, el bucle  $\beta 12$ -  $\beta 13$  y el surco ácido (Ceulemans *et al.*, 2002b). La observación que la mitad C-terminal de PP1, incluyendo todos los residuos que contribuyen a la unión de subunidades en el canal RVxF, no es requerida para la interacción con Sds22 (Wu and Tatchell, 2001; Ceulemans *et al.*, 2002b) abre la posibilidad de que en la holoenzima PP1-Sds22, este canal se encuentra libre para su interacción con adicionales subunidades que contienen el motivo RVxF.

Estudios a gran escala de interacción proteína-proteína encontraron que Sds22 interacciona físicamente con Ypi1 (Hazbun *et al.*, 2003; Krogan *et al.*, 2006), proteína que fue caracterizada como el primer inhibidor endógeno de la fosfatasa Glc7 y que contiene el típico motivo RVxF de unión a la fosfatasa (García-Gimeno *et al.*, 2003). Un estudio de co-inmunoprecipitación, realizado en el laboratorio del Dr. Pascual Sanz, confirmó esta interacción, además de demostrar que Ypi1 interacciona también con Glc7. En este mismo estudio se demostró que la sobreexpresión de Ypi1 incrementa la interacción entre Sds22 y Glc7 y que, a su vez, la sobreexpresión de Sds22 incrementa la interacción entre Ypi1 y Glc7. Estos resultados sugirieron la existencia de un trímero funcional (Sds22-Glc7-Ypi1) y que la sobreexpresión tanto de Ypi1 como de Sds22 podría estabilizar la interacción entre los otros dos componentes (Glc7-

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sds22 o Glc7-Ypi1, respectivamente) y/o desplazar a otras subunidades reguladoras endógenas de sus sitios de unión con Glc7, facilitando la disponibilidad de la fosfatasa para interactuar con el otro componente del complejo ternario. La existencia de este complejo heterotrimérico fue confirmado por ensayos de co-inmunoprecipitación y gel filtración, hecho que podría proporcionar una explicación al aislamiento, en *Schizosaccharomyces pombe*, de un complejo trimerico de 105 kDa conformado por Sds22, Sds21 (PP1) y una fosfoproteína no identificada de 25 kDa (Stone *et al.*, 1993). En este caso, la fosfoproteína no identificada podría ser el ortólogo de Ypi1 en *S. pombe* (GenBank™. Número de acceso CAB11073). En concordancia con ello, en un estudio reciente, realizado mediante ensayos de doble híbrido y *pull-down*, se identificó un complejo heterotrimérico en mamíferos formado por PP1, el inhibidor-3 (ortólogo de Ypi1) y Sds22 (Lesage *et al.*, 2007), que es similar, al complejo formado por Glc7, Ypi1 y Sds22 de *S. cerevisiae*.

Un mapeo de los dominios involucrados en la interacción entre Glc7-Sds22-Ypi1, realizado en colaboración con el laboratorio del Dr Pascual Sanz indicó que el dominio C-terminal de Ypi1 es el responsable de la interacción con Sds22, mientras que el dominio N-terminal, que contiene el motivo (R/K)(V/I)x(F/W) es necesario para la unión con Glc7. Así mismo sugirió que la unión de Sds22 a Ypi1 puede ser independiente de la presencia de Glc7 en el complejo. Esta noción se sustenta en el hallazgo de que el mutante Ypi1W53A, el cual se une pobremente a Glc7 porque tiene alterado el motivo RVxF (García-Gimeno *et al.*, 2003), interactúa con Sds22 con la misma intensidad que la cepa salvaje. Además, se demostró que ambos dominios de interacción de Ypi1 con las otras dos proteínas del complejo son necesarios para su actividad porque la expresión de las formas truncadas en cualquiera de estos dos dominios no rescata el fenotipo de letalidad del mutante *yip1*. En este mismo estudio se demostró que el dominio N-terminal de Sds22 (1-40) es prescindible para la interacción con Glc7 e Ypi1, en concordancia con resultados previos (Ceulemans *et al.*, 2002b) y que el dominio C-terminal, formado en gran parte por el dominio LRR-cap, es necesario, pero no suficiente,

para la interacción con ambas proteínas (Ypi1 y Glc7), probablemente porque el dominio LRR-cap es requerido para el correcto plegamiento de Sds22.

Otro ejemplo donde tres proteínas forman un complejo heterotrimérico de interacción es el formado por el Inhibidor-1, la proteína GADD34 (implicada en el control de la apoptosis, la proliferación y la síntesis de proteínas) y PP1, en el cual GADD34 se une al inhibidor a través de su motivo N-terminal y a PP1 vía el motivo RVxF, localizado en su extremo C-terminal (Connor *et al.*, 2001).

Al igual que Sds22 (Peggie *et al.*, 2002), Ypi1 se localiza en el núcleo y por tanto podría también modular la función de Glc7 en esta región de la célula. El transporte de macromoléculas dentro y fuera del núcleo ocurre a través de los complejos del poro nuclear (NPC). Estos complejos permiten una difusión pasiva de iones y pequeñas proteínas (<40 kDa), pero restringen el pasaje de grandes moléculas, facilitando únicamente el paso de aquellas que contienen una apropiada señal orientadora de localización nuclear (NLS) (Lange *et al.*, 2007). El transporte activo de estas moléculas es facilitado por las carioferinas, las cuales están involucradas en la identificación de señales de localización nuclear (NLS). Cualquier proteína que exponga esta señal de reconocimiento, es transportada inmediatamente a través del poro nuclear (Lange *et al.*, 2007). La clásica secuencia NLS de importación nuclear está conformada por una (monopartita) o dos (bipartita) secuencias de aminoácidos básicos (Lange *et al.*, 2007). Un análisis de la secuencia de aminoácidos de Ypi1 mediante el programa PSORT II (Nakai and Horton, 1999), predice que el dominio C-terminal (residuos 114 a 131) de Ypi1 presenta una secuencia candidata a ser un probable motivo NLS bipartito. Por tanto, nosotros creemos que Ypi1 podría ser la proteína que provee la señal de orientación para la entrada tanto de Sds22 como de Glc7 en el núcleo, ya que ha sido descrito que Sds22 carece de una secuencia definida NLS mono o bipartita (Kalderon *et al.*, 1984; Robbins *et al.*, 1991) y la probable secuencia NLS monopartita de Glc7, localizada en su dominio C-terminal no es esencial ni para su localización ni para su función nuclear (Hong *et al.*, 2000).

### 5.5. LAS PROTEÍNAS Ypi1 Y Sds22 REGULAN LA LOCALIZACIÓN Y LA FUNCIÓN NUCLEAR DE LA FOSFATASA Glc7

Esta parte del trabajo experimental forma parte de una colaboración desarrollada entre nuestro grupo y el del Dr. Pascual Sanz, del Instituto de Biomedicina de Valencia. El equipo de investigación de este laboratorio estaba interesado en investigar proteínas similares a los inhibidores de PP1c de mamíferos que pudiesen actuar sobre Glc7 (homólogo de PP1 en levaduras). Una de estas posibles subunidades reguladoras fue Ypi1, proteína que había sido aislada en diferentes *screens* de doble híbrido por su capacidad de interaccionar con Glc7 (Tu *et al.*, 1996; Uetz *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001), además de haber sido descrita como un posible homólogo estructural del inhibidor-3 de humanos y caracterizada como el primer inhibidor endógeno de la fosfatasa Glc7 (Garcia-Gimeno *et al.*, 2003).

En este estudio se demostró que Ypi1 y Sds22 inhiben, *in vitro*, la actividad de Glc7 y que la combinación de cantidades equimolares de ambas proteínas permiten una completa inhibición de la actividad de Glc7. La capacidad inhibitoria, *in vivo*, de Ypi1 sobre la fosfatasa Glc7 ha sido previamente documentada en un estudio realizado por García-Gimeno y colaboradores, donde se demuestra que la sobreexpresión de Ypi1 reduce los niveles de glucógeno (Garcia-Gimeno *et al.*, 2003).

El papel inhibitorio de Sds22 sobre la actividad de Glc7 ha sido descrito en eucariotas superiores tales como hepatocitos de rata (Dinischiotu *et al.*, 1997) y *Schistosoma mansoni* (Daher *et al.*, 2006). Además, se conoce que en espermatozoides de bovino, Sds22 inhibe la actividad de la isoforma PP1 $\gamma$ 2. En estas células, el papel inhibitorio de Sds22 es controlado por su unión a una proteína desconocida de 17 kDa, con quién forma un complejo inactivo que es incapaz de unirse a PP1. Sólo cuando Sds22 es liberado de este complejo puede unirse e inhibir la actividad de PP1 (Huang *et al.*, 2002; Mishra *et al.*, 2003). Nosotros pensamos que la situación en levaduras es diferente, porque los resultados obtenidos de un ensayo de triple híbrido sugieren que la expresión tanto de Ypi1 como de Sds22 mejora la interacción entre los otros dos componentes de un probable complejo ternario. Además, si la función de

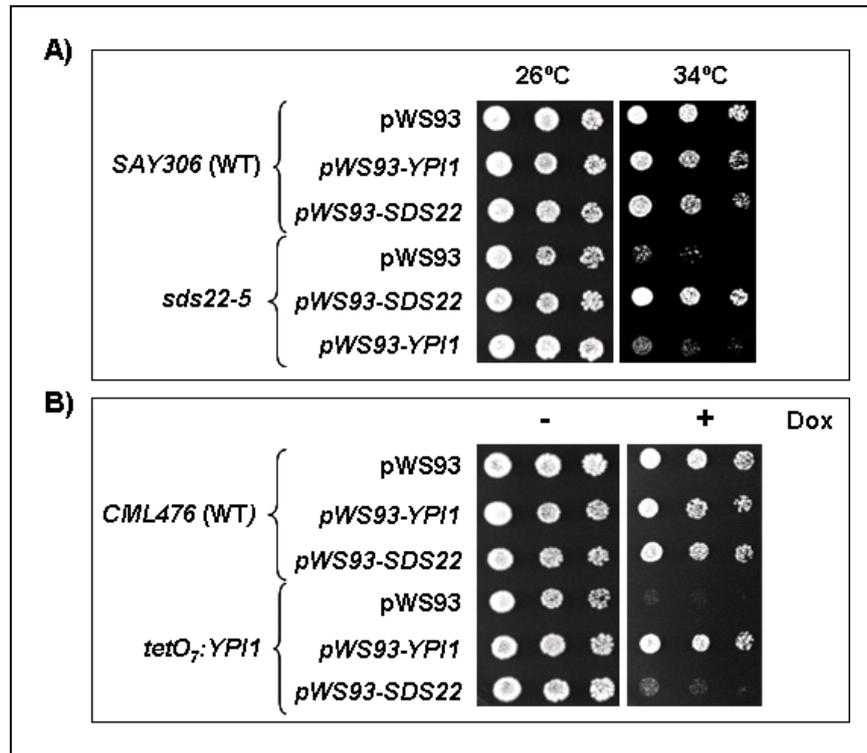
Ypi1 fuese mantener en un estado inactivo a Sds22, en células carentes de Ypi1, Sds22 podría quedar libre para interactuar con PP1 e inhibir su función. Sin embargo, los resultados de ensayos fenotípicos detallados a continuación muestran que la depleción de Ypi1 provoca fenotipos similares a la falta de función de Sds22, indicando que el complejo trimérico formado no es compatible con dicho modelo.

### **5.5.1. Mutaciones en *YPI1* y *SDS22* producen fenotipos similares**

Según los antecedentes mencionados, parece ser que las funciones de Ypi1 y Sds22 podrían estar relacionadas. Para poder estudiar esta posibilidad, decidimos evaluar si la función de Sds22 podría ser reemplazada por la sobreexpresión de *YPI1* y viceversa. Sin embargo, éste no fue el caso, porque la sobreexpresión de *YPI1* no permite rescatar el fenotipo letal de un mutante termosensible *sds22-5* (cepa SAY302), a la temperatura restrictiva, mientras que rescata la letalidad del mutante condicional *tetO<sub>7</sub>:YPI1* en presencia de doxiciclina. Así mismo, la sobreexpresión de *SDS22* no rescata el fenotipo de letalidad de un mutante condicional *tetO<sub>7</sub>:YPI1* (cepa MMR09-4) en presencia de doxiciclina, pero rescata el fenotipo de termosensibilidad del mutante *sd22-5* a la temperatura restrictiva de 34 °C (figura 28 A y B, respectivamente). Por lo tanto, las funciones de Ypi1 y Sds22 no son completamente intercambiables.

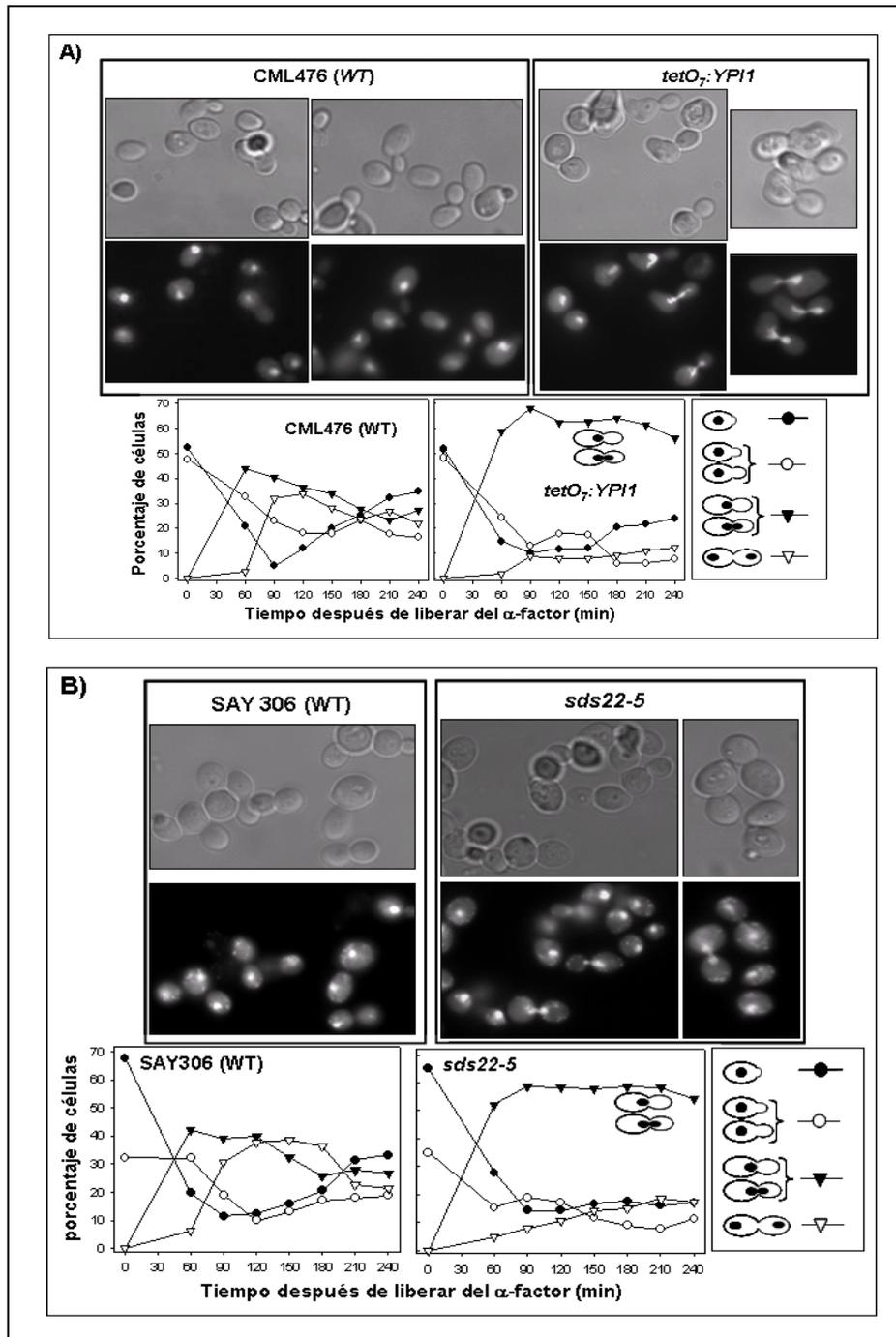
Ha sido descrito que Sds22 es esencial para la progresión del ciclo celular durante la transición metafase-anafase y que células deficientes en Sds22 presentan un bloqueo en la mitad de la mitosis, con cromosomas condensados en el cuello de la gema y *spindles* mitóticos cortos (Stone *et al.*, 1993). Si las funciones de Ypi1 y Sds22 están relacionadas, podríamos pensar que la inactivación de las dos proteínas podría resultar en fenotipos similares. Con la finalidad de probar si la pérdida de función de Ypi1 podría provocar el mismo fenotipo realizamos un test de crecimiento del mutante *tetO<sub>7</sub>:Ypi1*, en medio líquido conteniendo 100 µg/ml de doxiciclina, durante 12 horas. Las células fueron sincronizadas en fase S, en presencia de doxiciclina y la posición y número de núcleos fue monitorizada después de la liberación del bloqueo en fase S. Como se aprecia en la figura 29 el mutante condicional

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 28. Las funciones de YPI1 y SDS22 no son intercambiables. A)** Cultivos de las cepas SAY306 y *sds22-5*, expresando las proteínas Ypi1 y Sds22 desde un plásmido centromérico, se sembraron en medio CM carente de uracilo. Se diluyeron a una OD<sub>660</sub> 0,05, se sembraron en placas CM carentes de uracilo y se incubaron a 26 y 34 °C. **B)** Las cepas CML476 y *tetO<sub>7</sub>:YPI1* expresando las proteínas Ypi1 y Sds22 se sembraron bajo las mismas condiciones utilizadas para el apartado A, con la diferencia que el crecimiento se realizó en ausencia y presencia de 50 µg/ml de doxiciclina y la incubación se realizó a 28 °C. El crecimiento fue monitorizado después de 72 horas de incubación. Como controles, se utilizaron las mismas cepas transformadas con el plásmido vacío pWS93.

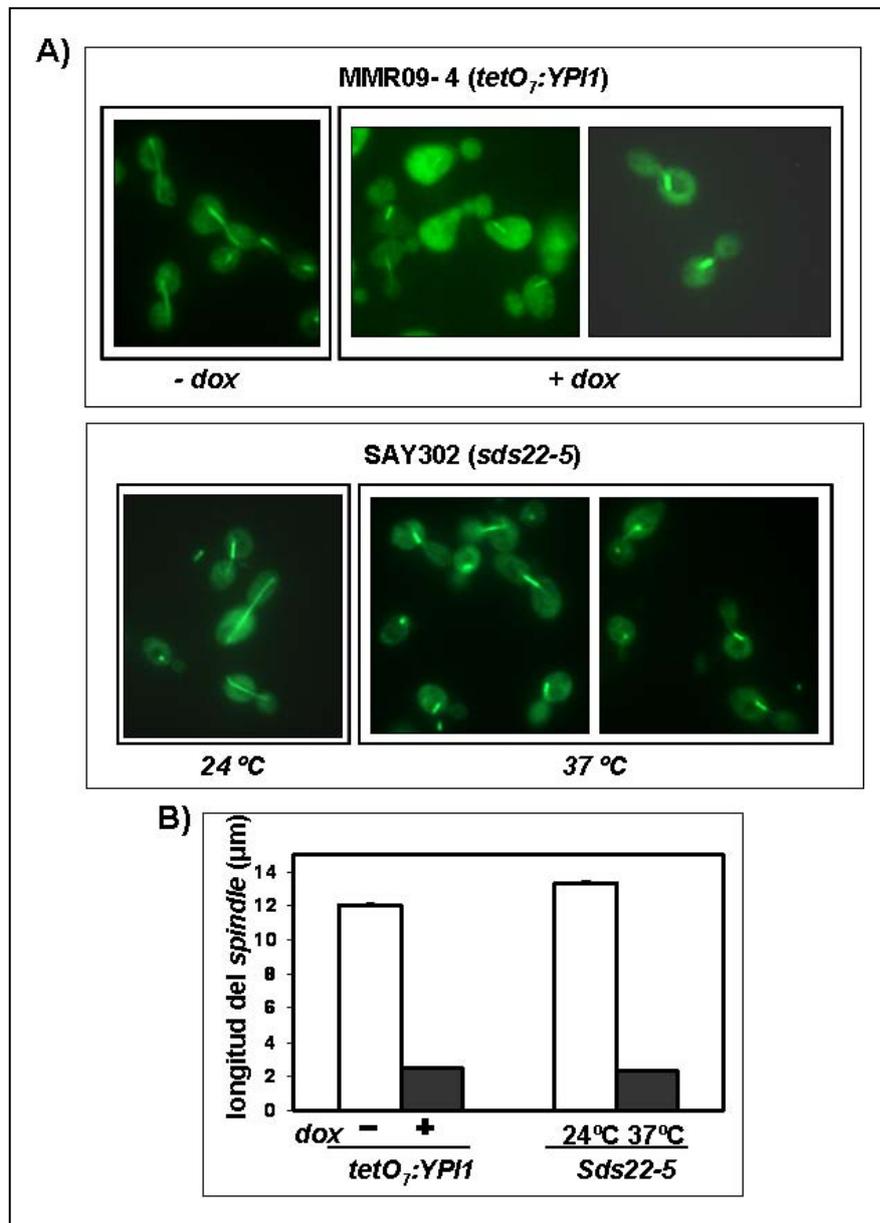
*tetO<sub>7</sub>:Ypi1* (cepa MMR09-4) sufre un severo bloqueo durante la transición metafase-anafase, similar al observado en el alelo termosensible *sds22-5* (cepa SAY302) después de un *shift* a la temperatura no permisiva (de 24 a 37 °C). Además, cuando evaluamos la longitud de los *spindles* mitóticos en células carentes de *yip1*, usando un anticuerpo anti tubulina, observamos que, mientras éstos presentan una longitud entre 12-14 µm en las células de tipo salvaje (indicativo de una segregación cromosómica normal), las células carentes de *yip1* presentan *spindles* mitóticos anormalmente cortos (2-3 µm), similares a los observados en el alelo termosensible *sds22-5*, creciendo a la temperatura restrictiva de 37 °C (Figura 30). Las células de tipo salvaje



**Figura 29. Tinción con DAPI de los mutantes condicionales *tetO<sub>7</sub>:YPI1* y *sds22-5*.**

**A)** Las cepas CML476 y MMR09-4 se sincronizaron con  $\alpha$ -factor e hidroxiurea (ver materiales y métodos) se resuspendieron en YPD conteniendo 100  $\mu$ g/ml de doxiciclina y se crecieron durante 4 horas a 28 °C. **B)** Las cepas SAY306 y SAY302 fueron sincronizadas como se describe en el apartado A (excepto que el crecimiento se realizó a 24 °C). Las células fueron resuspendidas en YPD fresco y crecidas a 37 °C durante 4 horas. En ambos casos los cultivos fueron crecidos a diferentes intervalos de tiempo, fijados con formaldehído al 3,7 % durante 60 minutos y teñidos con DAPI para visualizar el posicionamiento del núcleo. Después de la liberación de la hidroxiurea, en presencia de doxiciclina (A) o del shift de temperatura a 37 °C (B), se contaron un total de 300 células en cada intervalo de tiempo y se clasificaron en cuatro grupos de acuerdo a la posición y número de núcleos (ver leyenda). Los experimentos se realizaron por duplicado con resultados similares. En ambos casos, las micrografías mostradas son ejemplos de los cultivos después de 180 minutos de liberación de la hidroxiurea.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 30. Tinción de tubulina. A)** Las cepas MMR09-4 (*tetO<sub>7</sub>:YPI1*) y SAY302 (*sds22-5*) se sincronizaron tal como se detalla en la leyenda de la figura 29. Después de 120 minutos de liberar a las células del bloqueo en fase S, alícuotas de los respectivos cultivos se procesaron para inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo anti-tubulina. **B)** Datos obtenidos del promedio de la longitud de los spindles mitóticos de 300 células en mitad de la mitosis para cada condición.

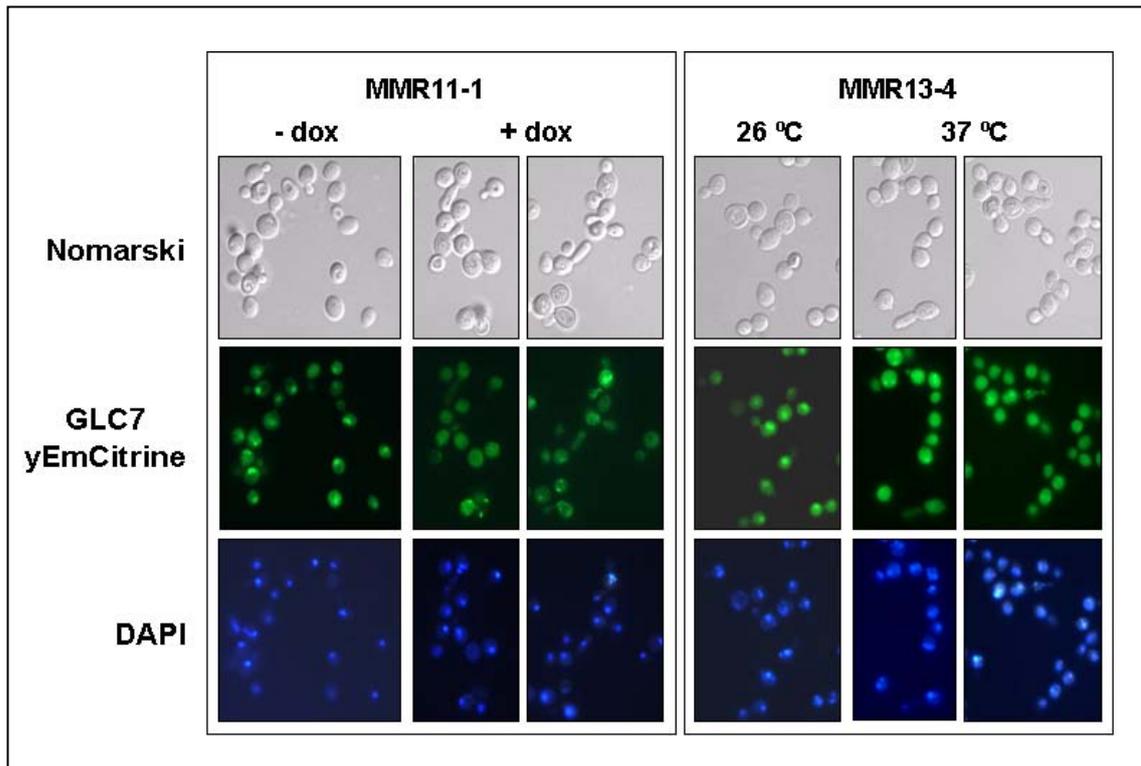
Tratadas con doxiciclina o incubadas a la temperatura restrictiva de 37 °C presentaban *spindles* mitóticos normales (dato no mostrado).

Un estudio realizado por Peggie y colaboradores sugiere que Sds22 juega un papel importante en la localización nuclear de Glc7 (Peggie *et al.*,

2002). Por tanto, decidimos también evaluar el posible rol de Ypi1 en la regulación de este proceso. Para ello, introducimos la proteína de fusión *GLC7-yEmCitrine* en el mutante condicional *tetO<sub>7</sub>:YPI1* (cepa MMR11-1) y examinamos la localización de Glc7 en células creciendo en ausencia y presencia de doxiciclina. Como mostramos en la figura 31, en células que expresan Ypi1, la proteína de fusión Glc7-yEmCitrine presenta una localización estrictamente nuclear. Sin embargo, en células carentes de *yip1*, la fluorescencia de Glc7 fue más difusa, no presentaba una localización nuclear y ocasionalmente se observaba un patrón punteado. Estos datos sugieren que la localización de Glc7 se encuentra alterada en ausencia de Ypi1. Este fenotipo fue muy similar al observado en la cepa MMR13-4, que expresa el casete *GLC7-yEmCitrine* en el mutante termosensible *sds22-5*, creciendo a la temperatura no permisiva (Figura 31). Estos resultados apoyan un estudio previo donde se muestra que el alelo termosensible *sds22-5* presenta defectos en la localización de Glc7 y que la interacción *in vitro* entre Sds22 y Glc7 es reducida a altas temperaturas (Peggie *et al.*, 2002). Todas estas evidencias indican que las funciones de Ypi1 y Sds22 están relacionadas y que ambas proteínas son necesarias para la correcta localización nuclear de Glc7.

Como hemos mencionado anteriormente, ha sido descrito que Glc7 regula la progresión del ciclo celular (Hisamoto *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 2002; Ceulemans and Bollen, 2004). Por tanto, la deslocalización de la fosfatasa podría resultar en una inhibición del ciclo de división. Estudios previos han demostrado que la quinasa Ipl1/Aurora B y la fosfatasa Glc7/PP1 regulan los niveles de fosforilación de sustratos nucleares como la histona H3 y la proteína del cinetocoro Ndc10 (Sassoon *et al.*, 1999; Hsu *et al.*, 2000). Ipl1 es una proteína quinasa que se encuentra localizada en el cinetocoro y es esencial para la correcta segregación cromosómica. Su actividad es antagonizada por la fosfatasa Glc7, mediante el control de los niveles de fosforilación de sustratos en común (Francisco *et al.*, 1994; Cheeseman *et al.*, 2002a; Zhang *et al.*, 2005; Pinsky *et al.*, 2006). En este sentido, la pérdida de función del alelo *glc7-10* (defectivo en defosforilar a Ndc10) (Sassoon *et al.*, 1999) y el alelo termosensible *ipl1-132* (mutante que carece de la actividad quinasa requerida

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 31. La ausencia de Ypi1 y Sds22 afecta la localización nuclear de Glc7.** La cepa MMR11-1 (*tetO<sub>7</sub>:YPI1*), que contiene el casete *GLC7-yEmCitrine*, se creció en ausencia y presencia de 100 µg/ml de doxiciclina tal como se detalla en materiales y métodos. Las células se tomaron después de 25 horas de crecimiento, previa adición de doxiciclina cada 12 horas para remediar una posible degradación de la misma, y se fijaron para su posterior observación con microscopía de fluorescencia. De manera similar, la cepa MMR13-4 (*sds22-5*), conteniendo el mismo casete se creció a 26 °C hasta una OD<sub>660</sub> de 0,5, momento en que se mantuvo a 26 °C o se realizó un *shift* de temperatura a 37 °C durante una hora. La fluorescencia de la proteína recombinante Glc7-yEmCitrine fue detectada mediante el uso de un filtro de isotiocianato de fluoresceína. Las muestras también fueron procesadas para una tinción con DAPI

para la inactivación de la función del cinetocoro *in vitro*) (Biggins *et al.*, 1999), presentan una supresión mutua de ambos fenotipos (Peggie *et al.*, 2002). Por otro lado, Ipl1 no fosforila *in vitro* a Glc7 y la disminución en la actividad de Glc7 no afecta la actividad de Ipl1 (Pinsky *et al.*, 2006). Además, en *S. cerevisiae*, Glc7 no se encuentra fosforilada *in vivo* (Stuart *et al.*, 1994). Estos resultados sugieren que, en *S. cerevisiae*, Ipl1 y Glc7 podrían actuar en común para promover la correcta segregación cromosómica.

Sds22 también ha sido encontrado como un supresor en multicopia del fenotipo de termosensibilidad del mutante *ipl1-321* (Pinsky *et al.*, 2006). Una

probable explicación a estos resultados podría ser que Sds22 actúa como una chaperona cuyo papel consistiría en mantener a Glc7 fuera de las dianas esenciales de Ipl1 (Pinsky *et al.*, 2006). Consistente con ello, en el estudio realizado en colaboración con el laboratorio del Dr. Pascual Sanz hemos encontrado que la sobreexpresión de *YPI1* suprime el fenotipo de termosensibilidad del mutante *ipl1-321*. Estos resultados ratifican el papel inhibitorio de Ypi1 y Sds22 sobre la actividad de la fosfatasa Glc7 y sugieren que la sobreexpresión de ambas proteínas provoca una disminución en la especificidad de la actividad de Glc7 hacia sustratos relacionados con la vía regulada por la quinasa Ipl1.

Si Ypi1 co-transporta Glc7 al núcleo, la ausencia de Ypi1 podría provocar una re-distribución de la fosfatasa en el citoplasma, reduciendo su acceso hacia sustratos nucleares necesarios en la correcta segregación de los cromosomas. Consistente con esta posibilidad, un estudio realizado por Bharucha y colaboradores demostró que la ausencia de *ypl1* provoca una pérdida en la segregación cromosómica (Bharucha *et al.*, 2008a), similar al observado en células carentes de *sds22* (Peggie *et al.*, 2002). Estos autores argumentan que la falta de Ypi1 podría alterar el balance Ipl1/Glc7, puesto que, la ausencia de inhibición de Glc7 podría reforzar la defosforilación de sustratos mitóticos.

La importancia de la inhibición de Glc7 se destaca por la demostración de que la fosforilación inhibitoria de PP1 en *S. pombe* y en humanos es dependiente de las proteínas Cdk (Kwon *et al.*, 1997). La fosforilación de PP1 en la Thr<sup>316</sup> (Yamano *et al.*, 1994) y Thr<sup>320</sup> (Dohadwala *et al.*, 1994), respectivamente, permite una entrada en fase S y puede ser requerida para reforzar la fosforilación de múltiples proteínas que usualmente son necesarias para la mitosis. Dado que Glc7 carece de un sitio de fosforilación por Cdk (Kwon *et al.*, 1997), la inhibición de la fosfatasa por proteínas reguladoras podría jugar un papel relevante durante el ciclo celular, básicamente durante la transición G2/M, donde la regulación de la actividad de Glc7 podría ser dependiente de proteínas que inhiben su actividad más que de la fosforilación de la subunidad catalítica.

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A pesar del conjunto de evidencias que sustentan un papel inhibitorio de Ypi1, ha sido recientemente propuesto que Ypi1 actúa como regulador positivo de la actividad de Glc7 (Bharucha *et al.*, 2008a). En este estudio se demostró que una mutación de Ypi1 en el motivo RVxF de unión a Glc7 (*ypl1W53A*) corrige el defecto en el crecimiento de un mutante *ipl1-2* (mutante que presenta una reducida actividad quinasa sobre la histona H3 *in vivo*) (Peggie *et al.*, 2002). Dado que esta mutación reduce la capacidad de unión entre Ypi1 y Glc7 y/o bloquea la habilidad de Ypi1 de inhibir la actividad de Glc7 *in vitro*, estos autores argumentan que Ypi1 podría actuar como un activador o regulador positivo de la actividad de Glc7. Otra línea de evidencias presentadas por los mencionados autores es que la combinación de mutaciones recesivas entre *GLC7* e *YPI1* y *GLC7* y *SDS22* es incompatible y, en algunos casos, los dobles mutantes son inviables. En relación a estos resultados nosotros planteamos una hipótesis relacionada con la función de orientación que Ypi1 ejerce sobre Glc7. Si *ypl1W53A* se une pobremente a Glc7, menos Glc7 podría ser traslocada al núcleo. Por tanto, una función nuclear de Glc7 disminuída podría ser suficiente para compensar la reducida actividad quinasa de *ipl1-2*.

### 5.6. ESTUDIO DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL RESULTANTE DE LA MUTACIÓN CONDICIONAL DE *YPI1*

Hace algunos años, García-Gimeno y colaboradores caracterizaron a la proteína Ypi1 como el primer inhibidor endógeno de la fosfatasa Glc7, demostrando que realiza una función esencial. Homólogos estructurales de Ypi1 se encuentran en levaduras, plantas y animales, sugiriendo una función muy conservada de la proteína (García-Gimeno *et al.*, 2003). Con la finalidad de obtener información acerca de otras posibles funciones de Ypi1 recurrimos a la tecnología de microarrays de DNA para identificar las alteraciones en el patrón de expresión génica causadas por la ausencia de esta proteína. Para ello, se comparó el perfil de expresión del mutante condicional *tetO<sub>7</sub>:YPI1* (cepa MMR09-4), tratado durante diferentes tiempos con doxiciclina, con el de la correspondiente cepa salvaje también tratada con el antibiótico. Así, se obtuvieron muestras de RNA a partir de cultivos de células *tetO<sub>7</sub>:YPI1* y

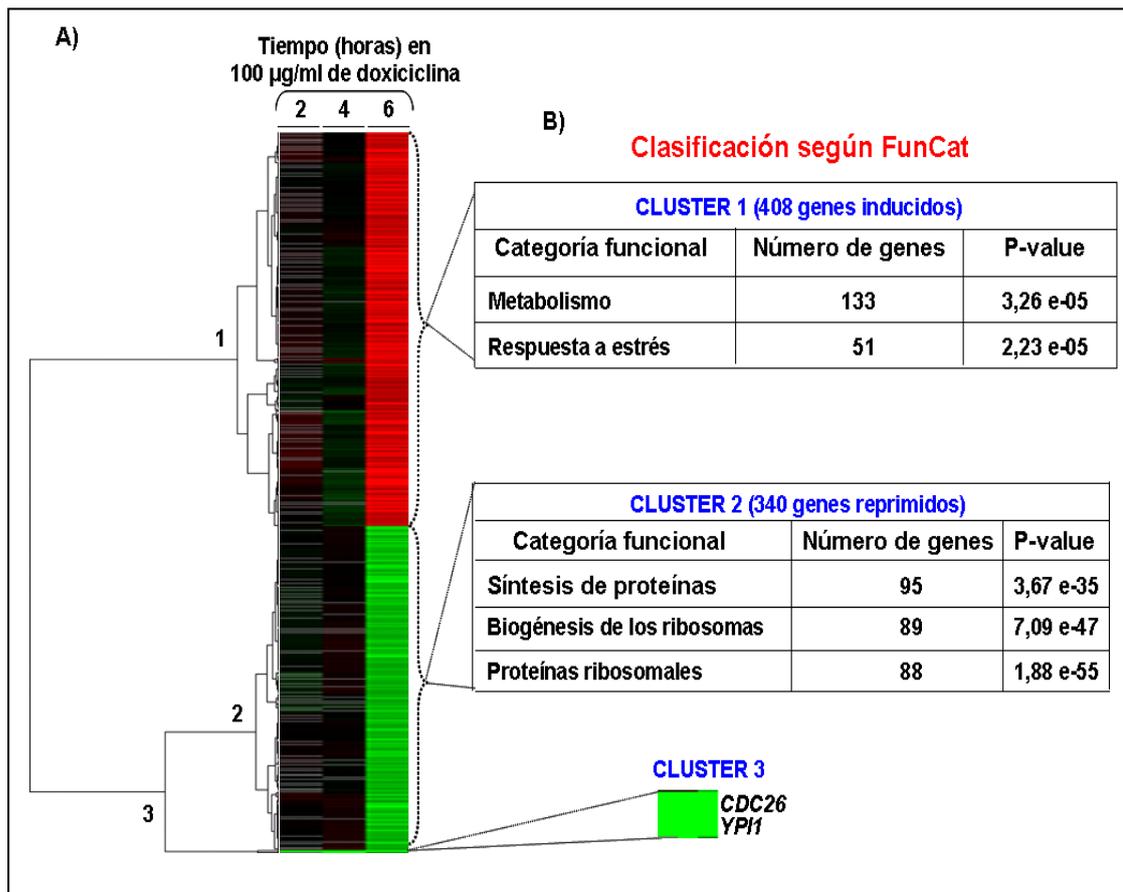
CML476 (wt) tratados durante 2, 4 y 6 horas con 100 µg/ml de doxiciclina. A través de este diseño experimental obtuvimos un valor de expresión para cada uno de los genes en cada tiempo.

Según nuestros datos, la represión de *YPI1* provoca cambios en el patrón transcripcional de 745 genes. De ellos, 337 genes fueron reprimidos mientras que 408 fueron inducidos en al menos uno de los puntos del *timing* de prueba (Tabla 8 y 9 de anexos). Es importante remarcar que los cambios en el patrón de expresión provocados por el silenciamiento progresivo de *ypi1* son graduales, no detectándose variaciones relevantes hasta las 6 horas de tratamiento con doxiciclina, momento en que la expresión de *YPI1* disminuye aproximadamente unas 100 veces.

Entre los genes, cuya expresión se encuentra inducida aparecen 133 implicados en el metabolismo, entre los que destacan 5 genes involucrados en la transferencia de grupos de 1 carbono dependiente de tetrahidrofolato (*SHM1*, *ADE3*, *MET12*, *ADE16* y *ADE1*). Así mismo, encontramos también 51 genes relacionados con la respuesta a estrés, pero sin que sean específicos de ningún estrés en concreto (ver cluster 1 de la figura 32). Por tanto podemos concluir que la falta de Ypi1 podría provocar, directa o indirectamente, un estado general de estrés, concomitante con un incremento en la expresión de genes implicados en la reprogramación metabólica.

Entre los 335 genes, cuya expresión se ve disminuída ante la falta de Ypi1 a las 6 horas de exposición a la doxiciclina, destacan aquellos que han sido involucrados en la síntesis de proteínas ribosomales como son los genes *RPS* y *RPL* (cluster 2 de la figura 32). En *S. cerevisiae* la síntesis de los ribosomas consume una cantidad muy importante de los recursos de la célula y, por consiguiente, está muy regulada. Diversas condiciones nutricionalmente desfavorables así como algunos estreses provocan una disminución en la síntesis de los ribosomas (Mizuta *et al.*, 1991; Rowley *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1999; Belli *et al.*, 2001; Viladevall *et al.*, 2004). Por tanto, la falta de Ypi1 podría imitar una situación de crecimiento adversa, frente a la que la célula responde reduciendo la maquinaria biosintética de los ribosomas. Este hecho podría explicar la tasa de crecimiento muy baja observada en el mutante condicional

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 32. Análisis del perfil de expresión del mutante condicional *tetO<sub>7</sub>:Ypi1*. A)** Clasificación y visualización jerárquica del conjunto de genes agrupados en clusters utilizando los programas Gene Cluster v3.0 y TreeView V1.1.3. **B)** Categorías funcionales de los genes agrupados en cada cluster mediante el clasificador FunCat del MIPS.

*ypi1* en presencia de doxiciclina.

En nuestros experimentos hemos identificado 2 genes cuya expresión se encuentra ya disminuida a las 2 horas de adición de doxiciclina, y sigue decreciendo paulatinamente, al menos, hasta las 6 horas (cluster 3 de la figura 32). Uno de ellos, como era de esperar, es el propio gen *YPI1*, lo que nos indica que el sistema de represión de su expresión ha funcionado correctamente. El otro gen, cuyo patrón de expresión es semejante al de *YPI1*, es *CDC26* (Zachariae *et al.*, 1996; Zachariae *et al.*, 1998b), una ubiquitin ligasa E3 que es importante para el ensamblaje del APC/C, un complejo proteico que regula la progresión del ciclo celular (Thornton *et al.*, 2006). Los mutantes *cdc26* son sensibles a altas temperaturas y presentan un bloqueo en el ciclo

celular en la transición metafase/anafase, *spindles* mitóticos cortos y DNA condensado en el cuello de la gema (Zachariae *et al.*, 1996), fenotipos similares a los provocados por la ausencia de Ypi1. Nuestros resultados parecen indicar que el papel de Ypi1 en ciclo celular podría estar vinculado con la regulación transcripcional de *CDC26*; sin embargo, al realizar una RT-PCR y una Q-RT-PCR del mutante condicional *tetO<sub>7</sub>:Ypi1*, creciendo en doxiciclina a diferentes tiempos, no logramos observar cambios en la expresión de *CDC26* (dato no mostrado).

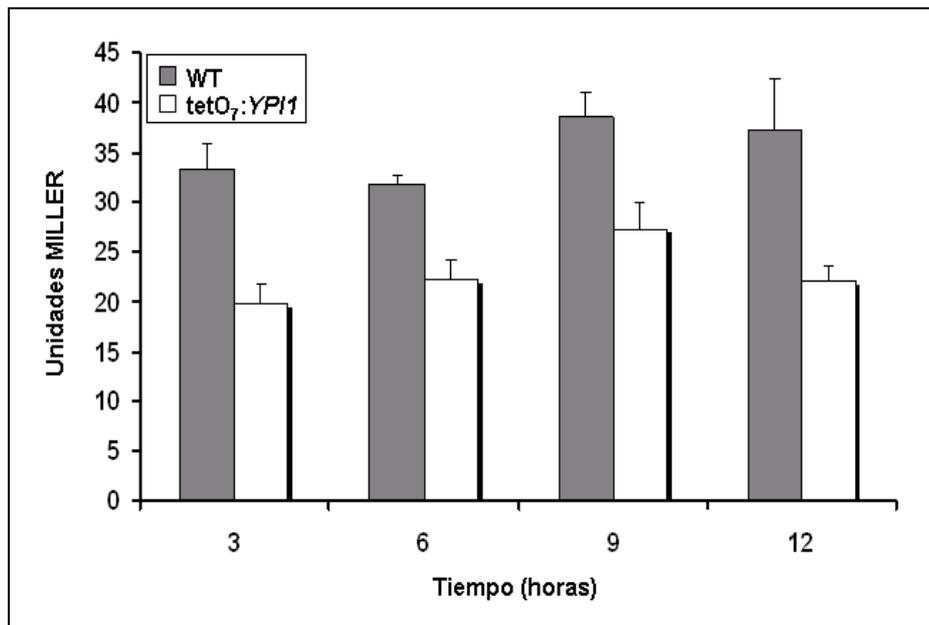
Como alternativa para verificar si *YPI1* podría regular la transcripción de *CDC26* optamos por hacer un análisis del promotor de este gen. Para ello, diseñamos un plásmido en el que el promotor de *CDC26* está fusionado con el reporter  $\beta$ -galactosidasa (*pCDC26-LacZ*). Este sistema se transformó en una cepa salvaje y en el mutante condicional *tetO<sub>7</sub>:Ypi1*. La actividad  $\beta$ -galactosidasa se determinó en células creciendo en presencia de 100  $\mu$ g/ml de doxiciclina, a los tiempos indicados (Figura 33). Los resultados obtenidos muestran un bajo nivel de expresión del gen reporter en ambas cepas. No obstante, la expresión del gen reporter en la cepa *tetO<sub>7</sub>:YPI1* es siempre inferior a la observada en la correspondiente cepa salvaje, aunque esta disminución no llega a ser tan marcada como los valores obtenidos en los ensayos de microarrays de DNA.

Para demostrar que los niveles de la proteína Cdc26 también podrían estar afectados realizamos un inmunoblot a partir de extractos totales de células *tetO<sub>7</sub>:YPI1*, en presencia y ausencia de doxiciclina, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-Cdc26 (yC-20) (sc-6727; Santa Cruz Biotechnology, Inc.); sin embargo, bajo las condiciones ensayadas, no se logró detectar la proteína, probablemente debido a que sus niveles de expresión son muy bajos (dato no mostrado).

### **5.6.1. Análisis de complementación de *YPI1* y *CDC26***

Para dilucidar si la función de Ypi1 y Cdc26 podrían estar relacionadas decidimos clonar el ORF completo de *CDC26* en un plásmido episomal *pWS93*, donde la expresión de *CDC26* es regulada por el promotor constitutivo del

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



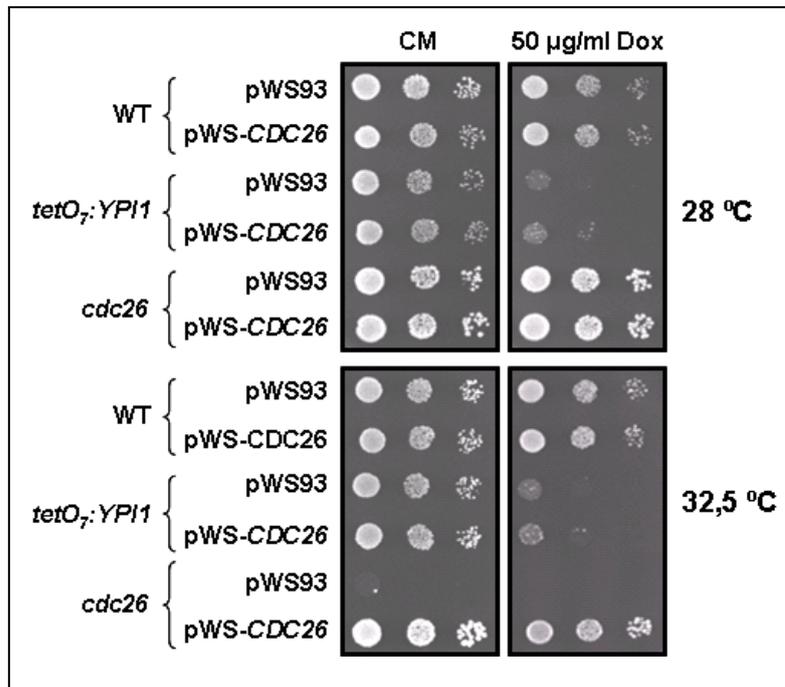
**Figura 33. Ensayo  $\beta$ -galactosidasa del promotor de *CDC26*.** Las cepas salvaje (barras grises) y *tetO<sub>7</sub>:Ypi1* (barras blancas) fueron transformadas con el plásmido reportero *pCDC26-LacZ*. La actividad  $\beta$ -galactosidasa se determinó en células creciendo en presencia de 100 $\mu$ g/ml de doxiciclina a los tiempos indicados.

plásmido (*ADH1*), para obtener el plásmido *pWS93-CDC26*, que fue transformado en una cepa salvaje y en el mutante condicional *tetO<sub>7</sub>:YPI1*. Nuestros resultados, obtenidos de los ensayos fenotípicos en placa, indican que la expresión de *CDC26* no rescata el fenotipo de letalidad del mutante condicional *tetO<sub>7</sub>:YPI1*, en presencia de doxiciclina (Figura 34), aunque si complementa el fenotipo de termosensibilidad del mutante *cdc26*, y, por tanto es funcional. Además, la sobreexpresión de *YPI1* tampoco rescata el fenotipo de sensibilidad del mutante *cdc26* a la temperatura no permisiva (Figura 35), indicando que Ypi1 ejerce otras funciones esenciales.

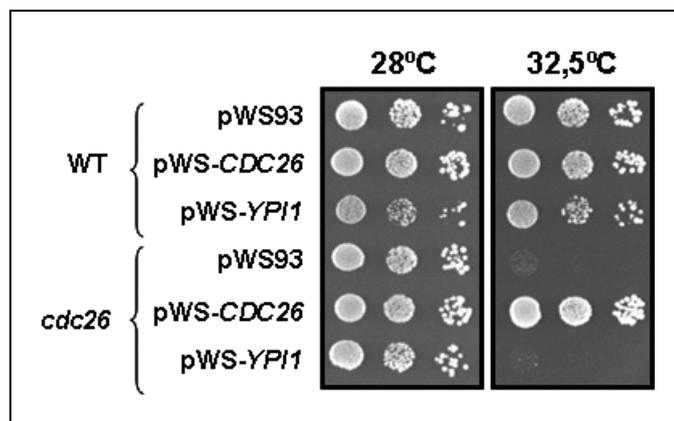
### 5.7. PAPEL DE *YPI1* EN LA PROGRESIÓN DE LA MITOSIS

#### 5.7.1. La ausencia de Ypi1 provoca un bloqueo en la transición G2/M caracterizado por una estabilización de los niveles de la segurina Pds1

Los resultados previamente mostrados indican que células carentes de Ypi1 sufren un bloqueo en la transición G2/M con un acúmulo de núcleos no divididos localizados entre la célula madre e hija, *spindles* mitóticos anormalmente cortos y pérdida en la segregación cromosómica. Con la



**Figura 34.** La sobreexpresión de *CDC26* no complementa el fenotipo de letalidad del mutante condicional *ypi1*. Cultivos de las cepas *wt*, *tetO<sub>7</sub>:Ypi1* y *cdc26*, a una OD<sub>660</sub> 0,05 fueron sembrados en placas CM conteniendo 50 µg/ml de doxiciclina e incubados a 28 y 32,5 °C. El crecimiento fue monitorizado después de 72 horas de incubación. Como controles, se utilizaron las mismas cepas transformadas con el plásmido vacío pWS93.



**Figura 35.** La sobreexpresión de *YPI1* no suprime el fenotipo de termosensibilidad del mutante termosensible *cdc26*. Cultivos de las cepas WT y *cdc26*, a una OD<sub>660</sub> 0,05 fueron sembrados en placas CM e incubados a 28 y 32,5 °C. El crecimiento fue monitorizado después de 72 horas de incubación. Como controles, se utilizaron las mismas cepas transformadas con el plásmido vacío pWS93.

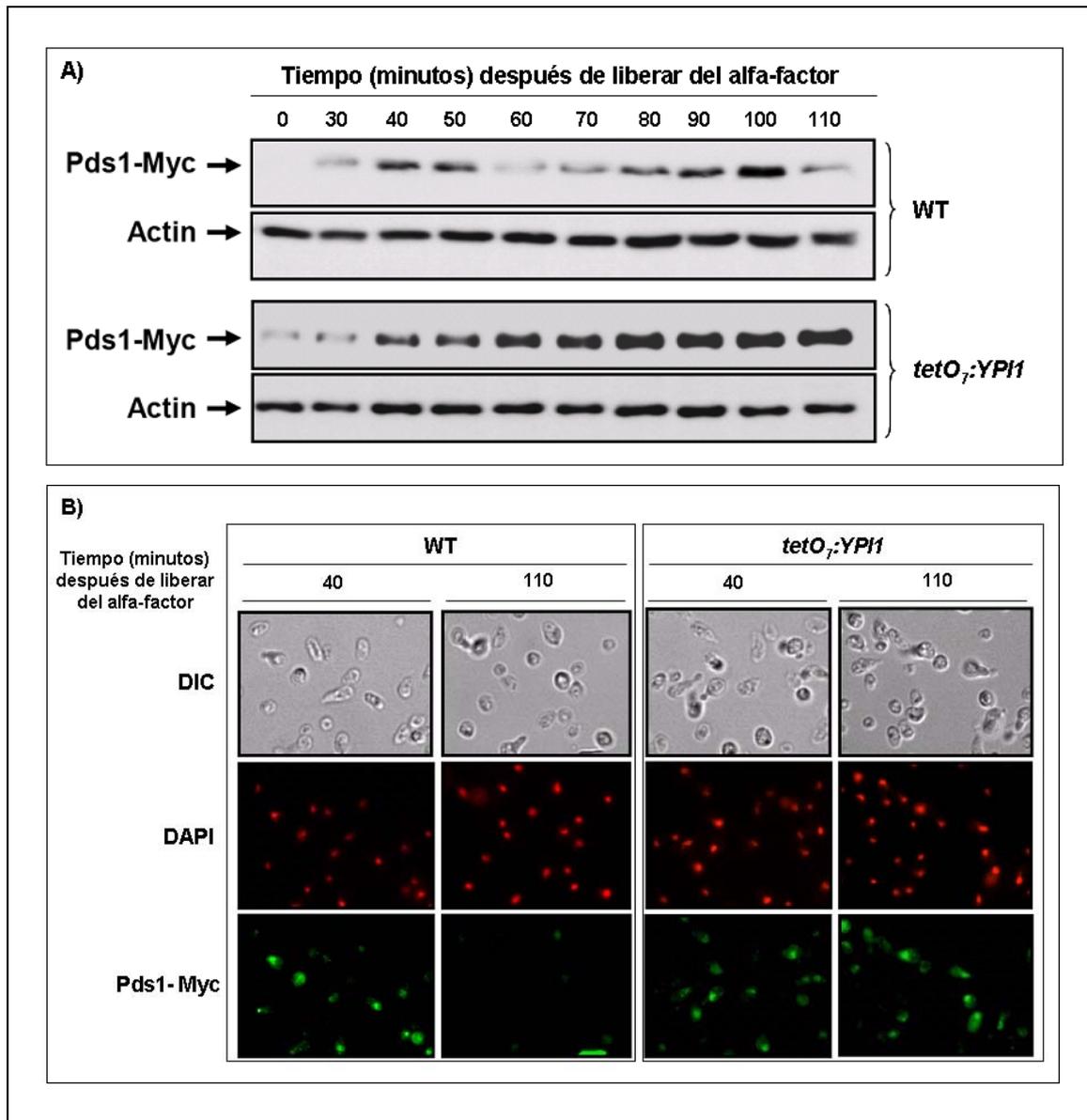
---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

finalidad de determinar si el bloqueo del ciclo celular ocurre antes o después del inicio de la anafase realizamos ensayos orientados a analizar los niveles de la securina Pds1 en células carentes de Ypi1 y en una cepa salvaje (Figura 36A). Para ello, las células se crecieron en presencia de 100 µg/ml de doxiciclina y se sincronizaron con alfa-factor. Después de la liberación del bloqueo con alfa-factor, en células salvajes, observamos cambios cíclicos en los niveles de la securina Pds1, que, como esperábamos se degrada al inicio de la anafase. Por el contrario, en células carentes de Ypi1, la securina empieza a acumularse al igual que la cepa salvaje pero no se degrada. Este resultado fue confirmado por un ensayo de inmunocitoquímica realizado tanto en una cepa salvaje como en el mutante condicional *tetO<sub>7</sub>:YPI1* (Figura 36B); ya que, mientras en la cepa salvaje, Pds1 es indetectable después de 110 minutos de liberación del alfa-factor, en células carentes de Ypi1 la presencia nuclear de la securina es bastante evidente. Nuestros resultados indican que el bloqueo provocado por la ausencia de Ypi1 se realiza antes del inicio de la anafase, ya que dicho bloqueo involucra una estabilización de la securina Pds1, sugiriendo una posible activación de uno de los checkpoints de G2/M.

### **5.7.2. El bloqueo en mitosis del mutante condicional *tetO<sub>7</sub>:YPI1* no es debido a la activación de los *checkpoints* del *spindle* y de daño en el DNA**

Han sido descritos tres diferentes *checkpoints* como los responsables de monitorizar la progresión de la fase G2/M: El *checkpoint* del *spindle* que monitoriza la correcta unión microtúbulos-cinetocoro (Wassmann and Benezra, 2001; De Antoni *et al.*, 2005), el *checkpoint* de daño en DNA, que responde a lesiones en el DNA (Weinert *et al.*, 1994; Toh and Lowndes, 2003) y el *checkpoint* de la morfogénesis que retrasa la progresión de la mitosis ante perturbaciones en la formación de la gema (Lew, 2003). La activación del *checkpoint* del *spindle* provoca un bloqueo en la mitosis. Mad2 es el regulador central de la maquinaria responsable de activar este *checkpoint* y su presencia es requerida para bloquear a las células en la fase G2 del ciclo celular. Para determinar si el bloqueo del ciclo celular provocado por la ausencia de Ypi1 podría ser debido a la activación de este *checkpoint*, deleccionamos *MAD1* y



**Figura 36. La ausencia de Ypi1 provoca un bloqueo en la transición G2/M con estabilización de los niveles de la segurina Pds1. A)** Inmunoblot de de Pds1 durante el ciclo celular. Las cepas MMR27-10 (*YPI1 PDS1-13Myc*) MMR28-3 (*tetO<sub>7</sub>:YPI1 PDS1-13Myc*) se diluyeron en YPD (OD<sub>660</sub> 0,01) conteniendo 100 µg/ml de doxiciclina durante 16 horas y luego se sincronizaron con alfa-factor durante 3 horas. Después de la liberación del alfa-factor, las células fueron procesadas como se detalla en Materiales y Métodos. Para la detección de Pds1 se utilizó un anticuerpo anti-Myc. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo anti-actina como control. **B)** Para identificar la localización de Pds1, cultivos de las mismas cepas se trataron como se detalla anteriormente y se procesaron para inmunofluorescencia, usando un anticuerpo anti-Myc. La posición del núcleo se verificó mediante tinción con DAPI. Las imágenes representan únicamente dos puntos del *timing* ensayado.

---

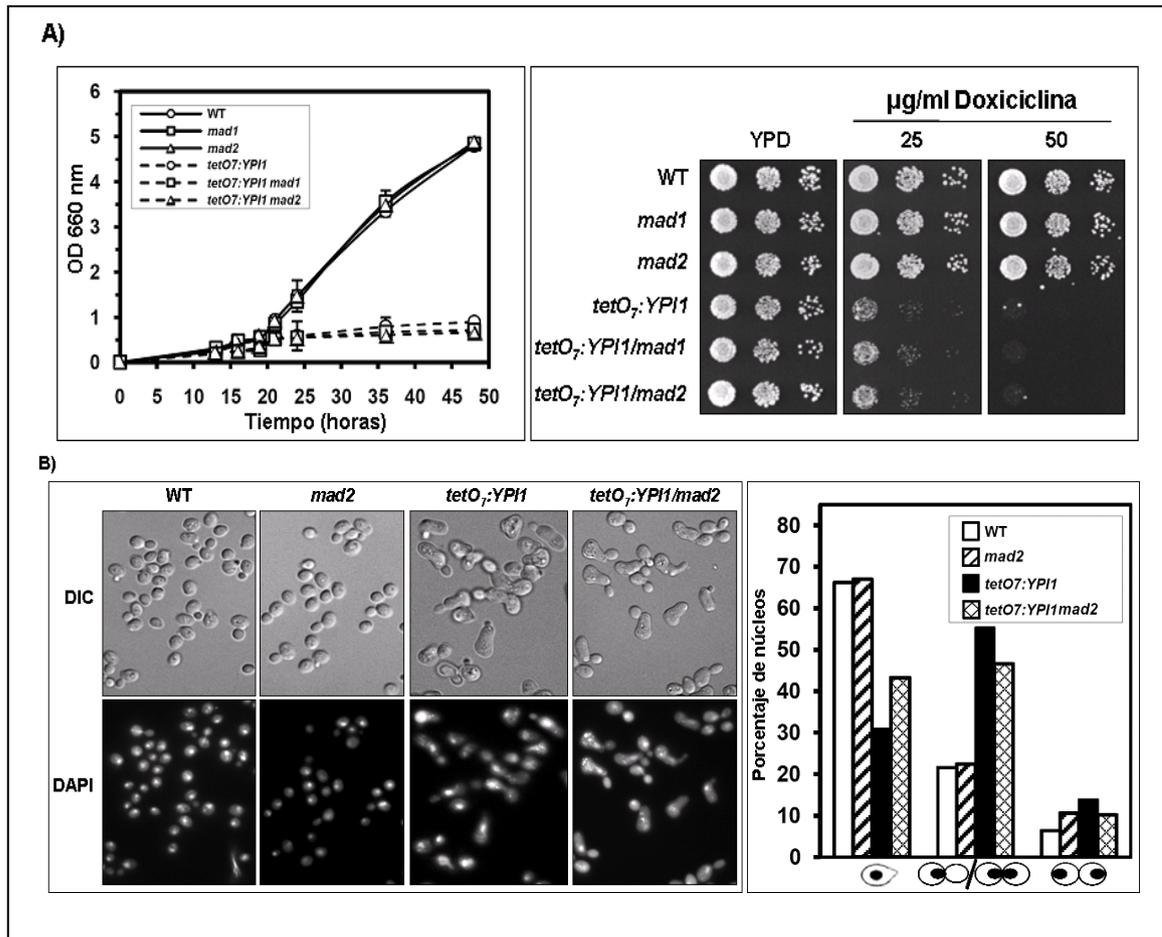
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*MAD2* en la cepa MMR09-4 (*tetO<sub>7</sub>:YPI1*). Como observamos en la figura 37A, la delección de *MAD2* no mejora el crecimiento de la cepa MMR09-4 en presencia de doxiciclina, ni corrige el fenotipo de bloqueo en G2/M (Figura 37B). De una manera similar, la delección de *MAD1*, un componente menos importante de la maquinaria de este checkpoint, no altera el comportamiento de la cepa MMR09-4. Por lo tanto, nuestros resultados no apoyan la hipótesis de que la pérdida de Ypi1 induce la activación del *checkpoint* del *spindle*.

Dado que el bloqueo del ciclo celular, provocado por la falta de Ypi1, no es debido a la activación del *checkpoint* del *spindle*, decidimos investigar si es debido a la activación del checkpoint que responde a daños en el DNA. La proteína adaptadora Rad9 es la responsable de amplificar la señal inicial de este *checkpoint*, mediante la fosforilación de importantes quinasas efectoras y es requerida para el bloqueo de algunas fases del ciclo celular, incluyendo la transición G2/M (Toh and Lowndes, 2003). Nosotros deleccionamos *RAD9* en el mutante condicional *tetO<sub>7</sub>:YPI1* y observamos que la pérdida de *RAD9* no corrige el defecto en el crecimiento (Figura 38A) ni el bloqueo de la transición G2/M (Figura 38B) provocado por la falta de Ypi1. Por lo tanto, la parada en mitosis, observada en células carentes de Ypi1, no requiere de Rad9 y parece no ser provocada por la activación del *checkpoint* de daño en el DNA.

### **5.7.3. El bloqueo en mitosis provocado por la ausencia de Ypi1 es debido a la activación del *checkpoint* de la morfogénesis**

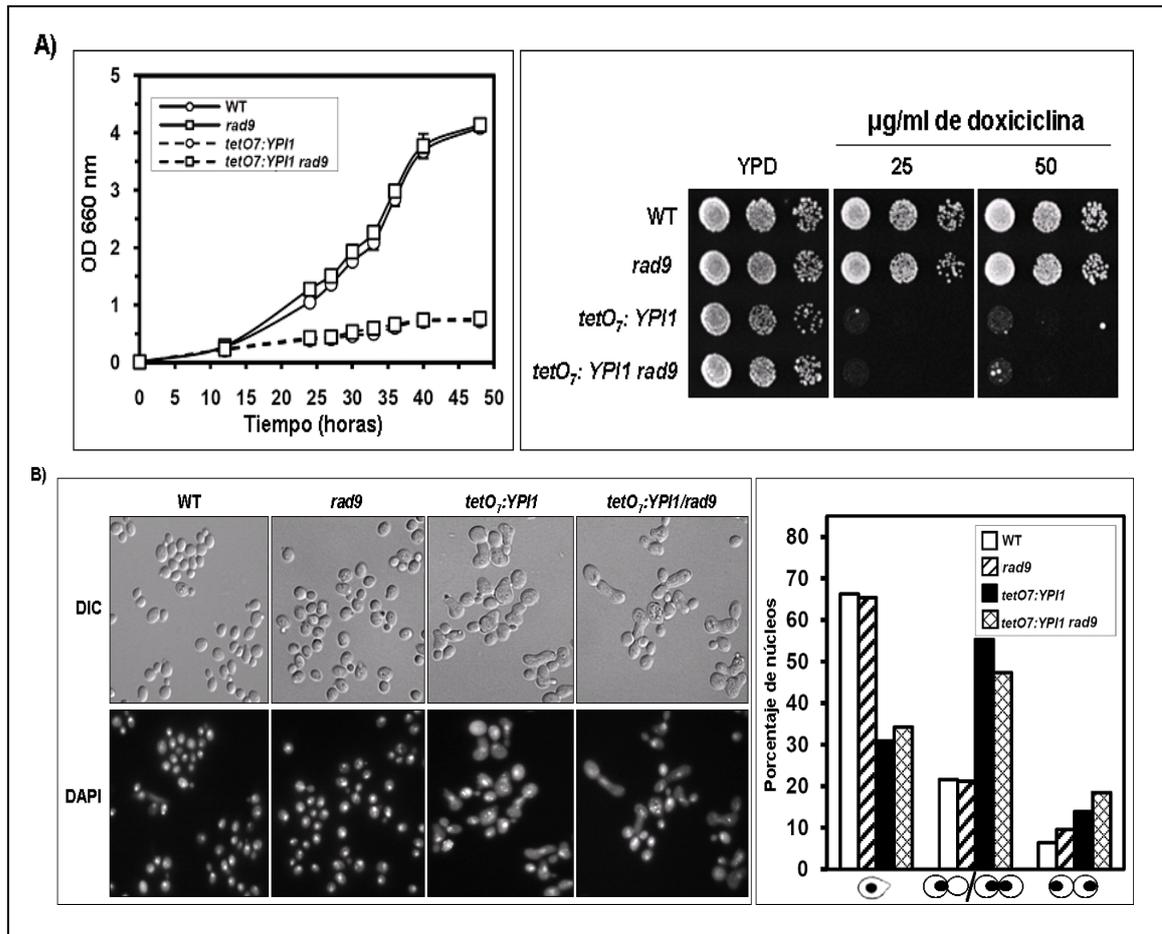
El *checkpoint* de la morfogénesis es otro de los tres mecanismos de supervivencia que controlan la transición G2/M. La proteína quinasa Swe1, constituye el principal regulador de este checkpoint. Para evaluar el posible papel de la activación de Swe1 en el bloqueo mitótico de la cepa MMR09-4 (*tetO<sub>7</sub>:YPI1*), deleccionamos el gen *SWE1* en este fondo genético y monitorizamos el efecto de esta mutación en el crecimiento celular y la progresión del ciclo celular. Como mostramos en la figura 39A, la falta de Swe1 no recupera el defecto en el crecimiento provocado por la ausencia de Ypi1. Sin embargo, un análisis de microscopía indica que la distribución de los núcleos de la cepa MMR34-6 (*tetO<sub>7</sub>:YPI1 swe1*) son muy similares a los



**Figura 37. La delección de *MAD1* o *MAD2* no rescata el defecto de parada en la mitosis provocado por la ausencia de *YPI1*.** **A)** Panel izquierdo. Las cepas CML476 (WT), MMR23-4 (*mad1::nat1*), MMR24-3 (*mad2::nat1*), MMR09-4 (*tetO7:YPI1*), MMR25-7 (*tetO7:YPI1 mad1::nat1*) y MMR26-2 (*tetO7:YPI1 mad2::nat1*) se crecieron en medio líquido en presencia 100 µg/ml de doxiciclina. Muestras de los diferentes cultivos se tomaron a diferentes tiempos y el crecimiento se monitorizó mediante medición a 660 nm de las densidades ópticas de los respectivos cultivos. Panel derecho. Mediante el método del drop test, las cepas indicadas se sembraron en YPD conteniendo las indicadas concentraciones de doxiciclina. **B)** Panel izquierdo. Células de los respectivos cultivos se trataron con 100 µg/ml de doxiciclina y se sincronizaron con 5 µg/ml de alfa-factor. Las células fueron procesadas para microscopía mediante tinción con DAPI después de 3 horas de liberación del alfa-factor. Panel derecho. Alrededor de 300 células de cada condición se clasificaron de acuerdo a la posición y número de núcleos (tal como se muestra en la parte inferior de la gráfica).

observados en una cepa salvaje (Figura 39B). Para corroborar este resultado monitorizamos el contenido de DNA mediante un análisis de citometría de flujo. Como observamos en la figura 39C, mientras que la mayoría de células *tetO7:YPI1* presentan un contenido de DNA de 2n, aún después de 240 minutos tras la liberación del bloqueo en G1, consistente con un bloque en G2/M; las

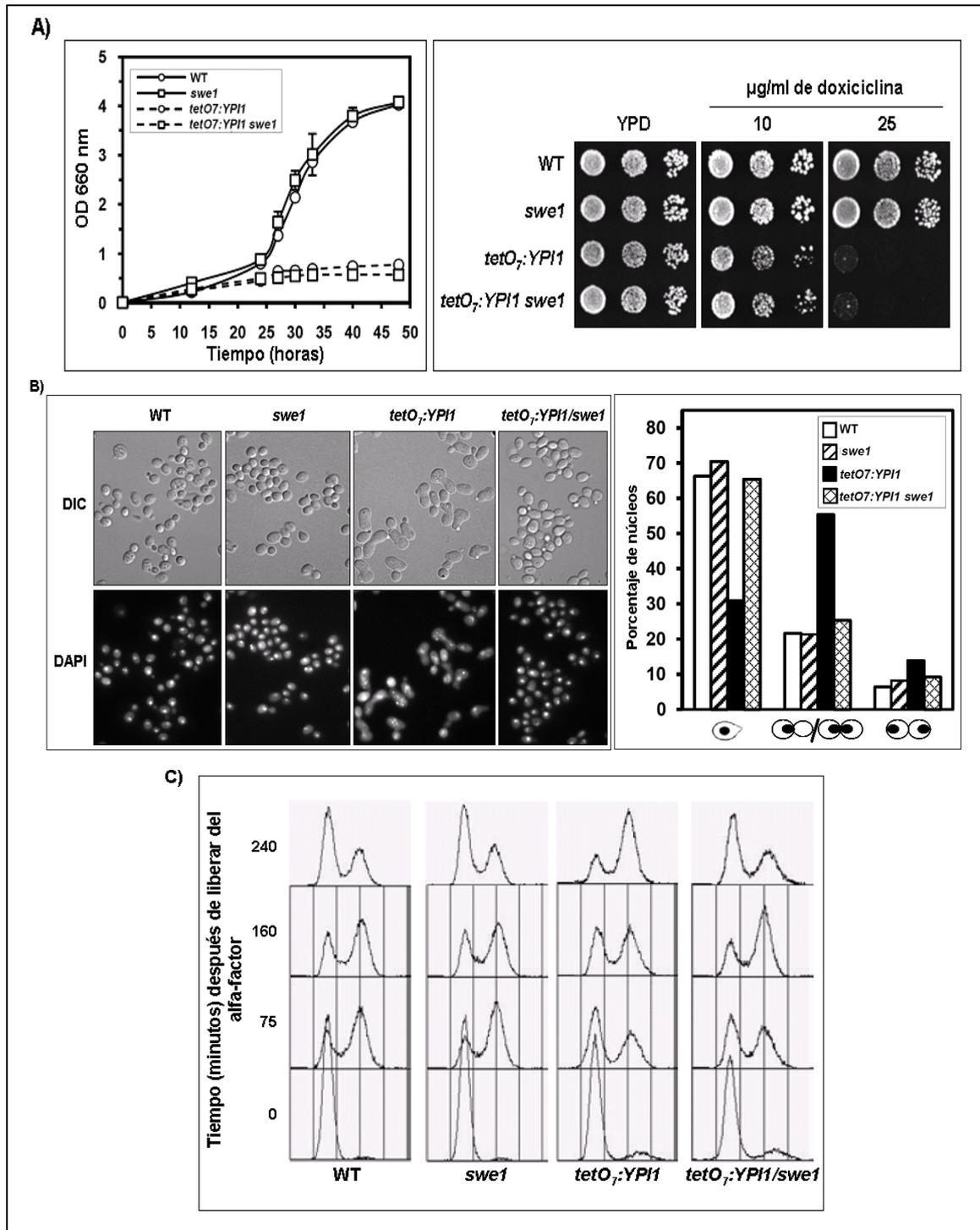
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 38. La ausencia de *rad9* no corrige el defecto de parada en la mitosis provocado por la ausencia de *YPI1*.** **A)** Las cepas CML476 (WT), MMR31-1 (*rad9::nat1*), MMR09-4 (*tetO7:YPI1*) y MMR32-12 (*tetO7:YPI1 rad9::nat1*) se trataron como se indica en la leyenda de los diferentes paneles de la figura 39. **B)** Las cepas indicadas se trataron tal como se detalla en la leyenda de la figura 37.

células salvajes y *swe1* han completado un ciclo y han regresado a la fase G1. Sorprendentemente, la delección de *SWE1* permite que las células *tetO7:YPI1* progresen a través de la mitosis, tal y como lo indica el perfil de la citometría de flujo. Estos resultados indican que el bloqueo mitótico observado en células carentes de *Ypi1* es atribuible a la activación del *checkpoint* de la morfogénesis.

Ante una activación del *checkpoint* de la morfogénesis, *Swe1* inhibe la progresión de la mitosis por inactivación del principal componente regulador del ciclo celular, la quinasa dependiente de ciclinas *Cdc28*, mediante la fosforilación de una tirosina conservada (Y19). Para confirmar la posible



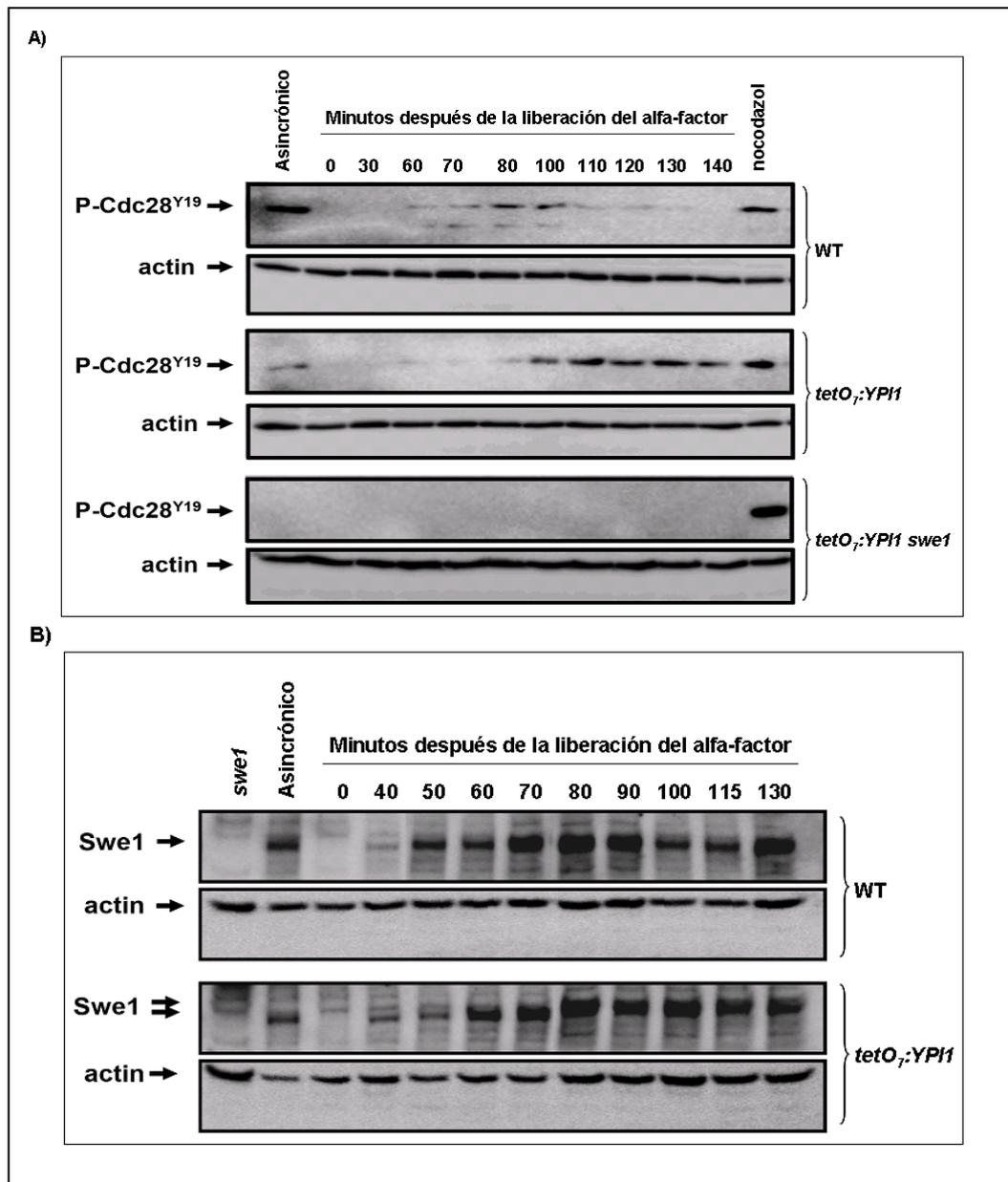
**Figura 39. La ausencia de *SWE1* recupera el defecto de parada en la mitosis provocado por la ausencia de *YPI1*.** **A)** Las cepas CML476 (WT), MMR33-3 (*swe1::TRP1*), MMR09-4 (*tetO7:YPI1*) y MMR34-6 (*tetO7:YPI1 swe1::TRP1*) se trataron como se indica en la leyenda de la figura 39. **B)** Las cepas indicadas se trataron tal como se detalla en la leyenda de la figura 37. **C)** Cultivos de las cepas indicadas, previamente tratadas con doxiciclina y sincronizadas con alfa-factor se lavaron y resuspendieron en 15 ml de YPD conteniendo 100 µg/ml de doxiciclina. Se tiñeron con ioduro de propidio y se procesaron para un análisis de citometría de flujo.

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

activación del *checkpoint* de la morfogénesis en células carentes de Ypi1, realizamos un inmunoblot orientado a monitorizar el estado de fosforilación de Cdc28 en la Tyr19, a través del ciclo celular. Como observamos en la figura 40A, en células salvajes, Cdc28 es fosforilada en la Tyr19 después de la liberación del bloqueo en G1 (80-100 minutos), coincidente con una entrada en G2, y se defosforila al inicio de la anafase (desde los 110 minutos hacia delante). Por el contrario, la fosforilación de la Tyr19 de Cdc28, resulta ligeramente retrasada en la cepa MMR09-4 y no retorna a su estado de defosforilación después de 140 minutos. Como es de esperar, la delección de *SWE1* en la cepa MMR09-4 (cepa MMR34-6) bloquea cualquier forma de fosforilación de Cdc28 en la Tyr19.

Nosotros consideramos la posibilidad de que la acumulación de la forma hiperfosforilada de Cdc28 en la cepa *tetO<sub>7</sub>:YPI1*, podría ser debido a una expresión anormal de Swe1, ya que esta quinasa ejerce una regulación negativa de Cdc28 mediante fosforilación. Para poder confirmar esta hipótesis, monitorizamos los niveles de Swe1 después de la liberación del bloqueo en G1. Como mostramos en la figura 40B, en una cepa salvaje, Swe1 se acumula poco después de la liberación del bloqueo en G1 (40-50 minutos), alcanzando su máximo pico en G2 (70-90 minutos) y declina cuando las células entran en mitosis (110-115 minutos). Por el contrario, en células *tetO<sub>7</sub>:YPI1*, los niveles de Swe1 se mantienen elevados aun después de 130 minutos de liberación del bloqueo en G1. Vale la pena señalar que, en este caso, Swe1 permanece fosforilado, como se deduce por la migración más lenta de esta forma de la proteína. La persistencia de Swe1 en la célula podría explicar la detección de la forma hiperfosforilada de Cdc28 incluso mucho tiempo después de la liberación del bloqueo en G1, ya que se acepta que la estabilidad de Swe1 es crítica para regular su actividad sobre Cdc28 (Sia *et al.*, 1996; Sia *et al.*, 1998). El mantenimiento anormalmente elevado de los niveles de Swe1 en células carentes de Ypi1 explica la observación de que Cdc28 permanezca fosforilada en la Tyr19. La persistente fosforilación de Cdc28 mantiene inactiva a la quinasa y detiene la progresión del ciclo celular. Esta secuencia de eventos son



**Figura 40. Estados de fosforilación de Swe1 y Cdc28 en ausencia de YPI1. A)** Las cepas CML476 (WT) y MMR09-4 (*tetO<sub>7</sub>:YPI1*) se trataron con doxiciclina y se sincronizaron con 5 µg/ml de alfa-factor durante 75 minutos. Las células se liberaron del bloqueo en G1 por resuspensión en 100 µg/ml de doxiciclina. Las muestras se tomaron a los tiempos indicados y se procesaron para inmunoblot. Para detectar los diferentes estados de fosforilación de Cdc28, las membranas se incubaron con el anticuerpo anti Tyr19-Cdc28, que posteriormente se incubaron con el anticuerpo anti-actina. “Nocodazol” indica una muestra de células bloqueadas en G2/M con nocodazol, como control positivo. **B)** Cultivos de las cepas indicadas, se procesaron como se detalla en el apartado A. Las membranas se incubaron con el anticuerpo anti-Swe1 y se volvieron a incubar con el anticuerpo anti-actina. Los extractos proteicos de *swe1* y de un cultivo asincrónico de la cpa salvaje se incluyeron como controles. Nótese que la acumulación de la forma más lenta de migración de Swe1 en la cepa *tetO<sub>7</sub>:YPI1* corresponde a la forma hiperfosforilada de la proteína.

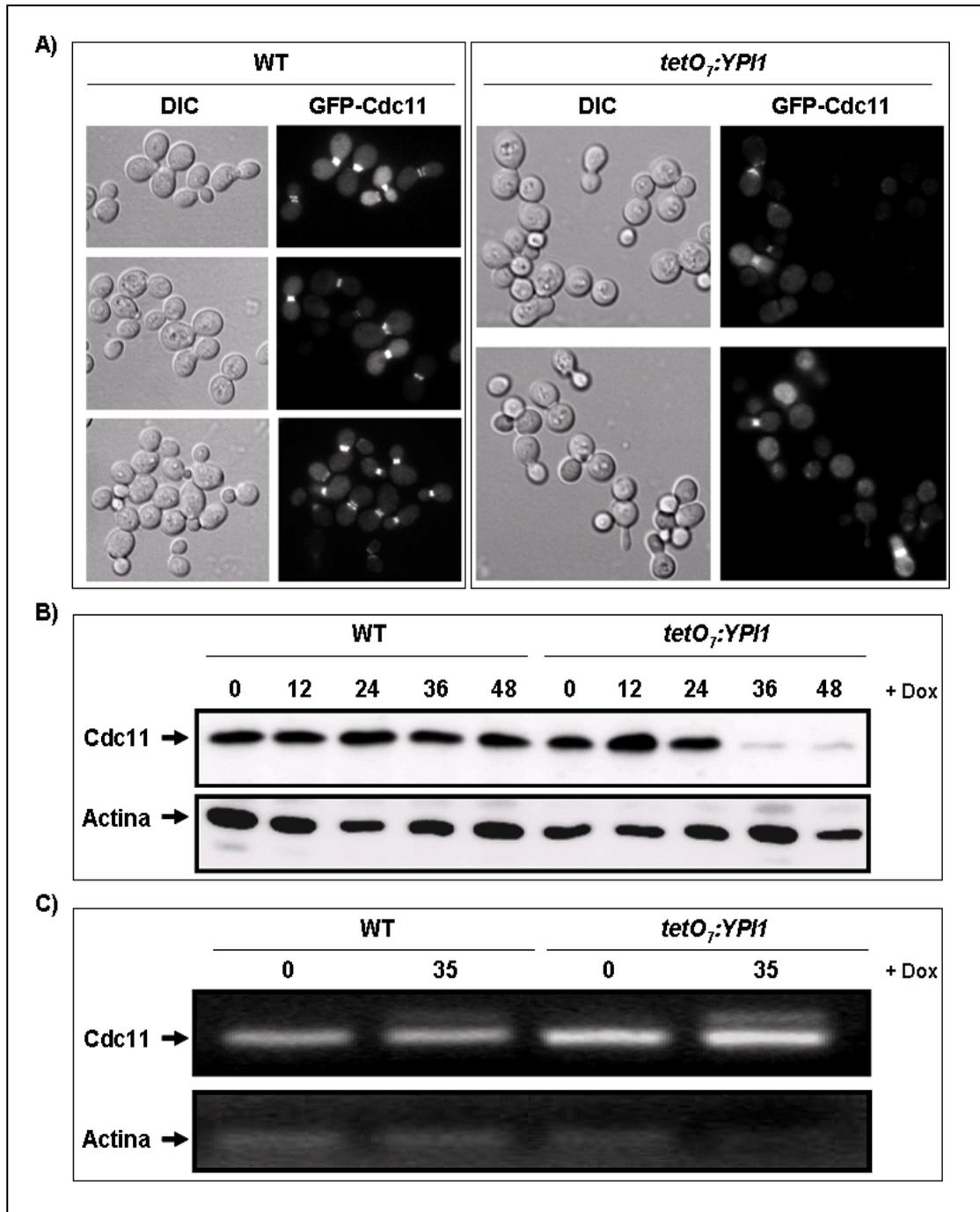
---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

los responsables de inducir una activación del *checkpoint* de la morfogénesis (Keaton and Lew, 2006). En concordancia con ello la depleción de Ypi1 induce alteraciones morfológicas, con elongaciones de las gemas, defecto que es aliviado por la ausencia de Swe1. La ausencia de Swe1 podría impedir la activación de la vía de señalización de Cdc28 sobre el *checkpoint* de la morfogénesis. Además, nosotros observamos que la delección de *SWE1* permite que células deficientes de Ypi1 superen el bloqueo en G2/M (ver figura 39B). Sin embargo, estas células no pueden proliferar porque todavía padecen de los problemas originales que activaron el *checkpoint* de la morfogénesis. Este fenotipo es reminiscente de la situación descrita por Barral y colaboradores (Barral *et al.*, 1999), quienes observaron que, aunque la delección de *SWE1* recupera el defecto morfológico de un mutante temperatura sensible de la septina Cdc12 (*cdc12-1*), el doble mutante *cdc12-1 swe1* no prolifera incluso a la temperatura semi-restrictiva.

### 5.7.4. La ausencia de *YPI1* altera la normal acumulación y localización de las septinas

La activación del *checkpoint* de la morfogénesis puede ser debido a defectos en el esqueleto de actina o en la formación del anillo de septinas. Puesto que el esqueleto de actina no se ve alterado (dato no mostrado), realizamos ensayos de monitorización del estado del anillo de septinas, que nos permitan dilucidar si las anomalías observadas en la fosforilación de la Tyr19 de Cdc28 y la estabilización de Swe1 podrían ser debidas a defectos en su correcto ensamblaje y/o localización. La septina Cdc11 es comúnmente usada para este propósito, ya que juega un papel crítico durante la formación del anillo de septinas (Bertin *et al.*, 2008). Por lo tanto, transformamos las cepas salvaje y *tetO<sub>7</sub>:YPI1* con un plásmido centromérico que expresa una versión de la septina Cdc11 unida a la proteína de fusión GFP. Sorprendentemente, la observación microscópica de células *tetO<sub>7</sub>:YPI1* tratadas con doxiciclina durante 35 horas (Figura 41A), muestra que, en ausencia de Ypi1, Cdc11 es casi indetectable. Esto podría ser debido a diversas razones, tales como un ensamblaje defectuoso, disminución en sus



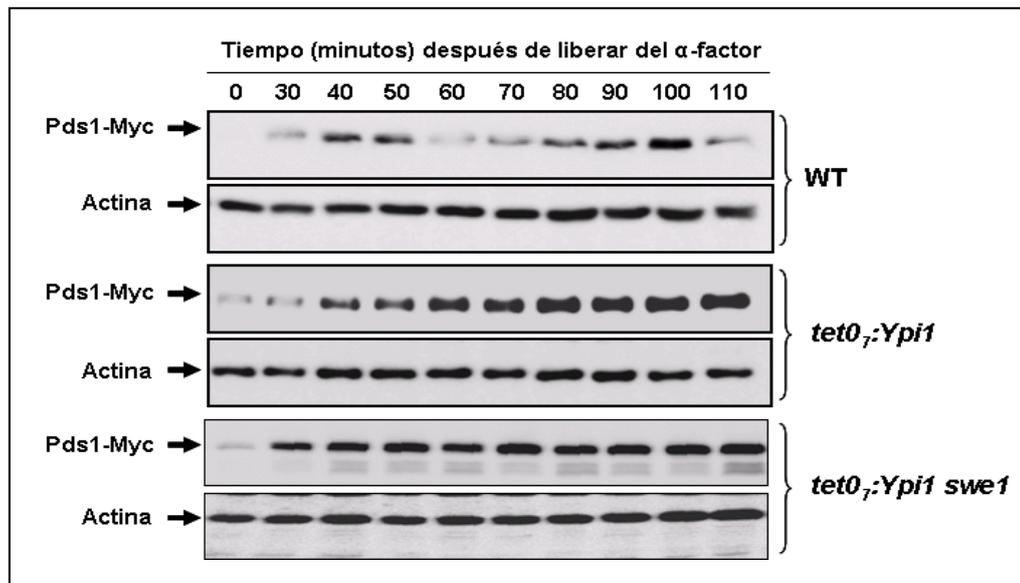
**Figura 41. Ypi1 es necesario para asegurar unos niveles normales y una correcta localización de las septinas. A)** Las cepas CML476 (WT) y MMR09-4 (*tetO<sub>7</sub>:YPI1*) se transformaron con un plásmido centromérico que expresa una versión de la septina Cdc11 unida a la proteína de GFP. Los cultivos se crecieron durante 35 horas en presencia de 100 µg/ml de doxiciclina y la localización de Cdc11 se realizó mediante microscopía de fluorescencia (x1000). **B)** Cultivos de las cepas indicadas, se crecieron en YPD conteniendo 100 µg/ml de doxiciclina. Muestras de los cultivos, a los indicados tiempos, se procesaron para inmunoblot como se describe en Materiales y Métodos. Para el inmunoblot de Cdc11 se utilizó un anticuerpo anti-Cdc11, y las membranas se incubaron posteriormente con el anticuerpo anti-actina como control. **C)** La determinación del RNA total de las cepas indicadas y de la cantidad de mRNA de *CDC11* se realizó tal como se detalla en Materiales y Métodos.

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

niveles de expresión o incremento de su tasa de degradación. Por lo tanto, para distinguir entre estas tres posibilidades, monitorizamos la cantidad de Cdc11 mediante inmunoblot usando anticuerpos específicos para detectar la proteína. Como observamos en la figura 41B, los niveles de Cdc11, en células *tetO<sub>7</sub>:YPI1*, sufren un drástico descenso después de ser tratadas con doxiciclina. Esta pérdida no puede ser atribuible a la diferencia en la expresión del gen, ya que, los niveles de mRNA de *CDC11* no cambian a lo largo del experimento (Figura 41C). Estos resultados refuerzan la noción de que la pérdida de Ypi1 provoca un ensamblaje defectuoso de las septinas y como consecuencia de ello induce su degradación, pudiendo ser ésta la causa del característico bloqueo en G2/M descrito en estas células. El hecho de que la depleción de Cdc11 en células carentes de Ypi1, no sea debida a defectos en la transcripción, sugiere que podría derivar de un problema en la traducción o la estabilidad de la proteína. En este último caso, el defecto podría ser debido a la interrupción del proceso normal de reciclaje o, alternativamente, a la incapacidad en el ensamblaje de estructuras de nivel superior, ya que ha sido demostrado que cualquier defecto en el ensamblaje de las septinas provoca una desestabilización de Cdc11 (Casamayor and Snyder, 2003). Nuestros resultados no son del todo sorprendentes, puesto que ha sido ampliamente documentado que los eventos de fosfo-defosforilación son relevantes en la estabilidad y dinámica de las septinas. Ejemplos de ello lo constituyen la ligasa Siz1, involucrada en la sumoilación de septinas, la cual es fosforilada antes de la anafase, coincidente con la sumoilación y posterior degradación de las septinas (Takahashi *et al.*, 2001; Makhnevych *et al.*, 2007) y Shs1/Set7, una septina cuya dinámica se encuentra bajo el control del complejo formado por Rts1 y la fosfatasa PP2A (Rts1/PP2A) (Dobbelaere *et al.*, 2003).

Finalmente, no se descarta la posibilidad de que la falta de Ypi1 podría involucrar la activación de *checkpoints* adicionales, ya que, la estabilización de la securina Pds1 aún se observa en células *tetO<sub>7</sub>:YPI1 swe1*, a pesar de que éstas progresan a través de la mitosis (Figura 42). Esta observación podría ser compatible con la activación de otros *checkpoints* como resultado de la pérdida de Ypi1. Además, la existencia de *checkpoints* adicionales en los cuales Glc7



**Figura 42.** Inmunoblot de Pds1 durante el ciclo celular. Las cepas MMR27-10 (*YPI1 PDS1-13Myc*), MMR28-3 (*tetO<sub>7</sub>:YPI1 PDS1-13Myc*) y MMR36-1 (*tetO<sub>7</sub>:Ypi1 swe1-PDS1-13Myc*) se diluyeron en YPD ( $OD_{660}$  0,01), conteniendo 100  $\mu$ g/ml de doxiciclina durante 16 horas y luego se sincronizaron con alfa-factor durante 3 horas. Después de la liberación del alfa-factor, las células fueron tomadas y procesadas como se detalla en Materiales y Métodos. Para el inmunoblot de Pds1 se utilizó un anticuerpo anti-Myc, y las membranas se incubaron posteriormente con el anticuerpo anti-actina como control.

estaría participando, podrían explicar las discrepancias observadas con respecto al papel que Ypi1 ejerce sobre la función de Glc7. Un estudio realizado por Bharucha y colaboradores sustenta que el bloqueo en G2/M, provocado por la ausencia de Ypi1, induce una activación del *checkpoint* del *spindle*, ya que, dicho fenotipo es revertido por la delección de *MAD1* (Bharucha *et al.*, 2008a). Aunque, aparentemente contradictorio con nuestros resultados, es importante enfatizar que estos autores usan un sistema de expresión diferente, en el cual la proteína Ypi1 unida al epítipo HA es expresada desde un promotor *GAL1*. Además de las diferencias en la potencia de expresión de los promotores, este sistema involucra cambios en la fuente de carbono, factores que no están presentes en nuestros experimentos. De hecho, nuestros datos no excluyen la activación de checkpoints adicionales.

### 5.7.5. La sobreexpresión de *CDC26* recupera el fenotipo de bloqueo en G2/M del mutante *ypi1*

En *S. cerevisiae*, Cdc26 es una ubiquitina ligasa E3, no esencial que es importante para mantener el correcto ensamblaje del APC/C (Zachariae *et al.*, 1996; Zachariae *et al.*, 1998b). Como hemos mostrado anteriormente, los niveles de expresión de este gen se ven drásticamente disminuidos en ausencia de *YPI1* (ver figura 32). A pesar de que nuestros datos indican que su sobreexpresión no es capaz de evitar el defecto en el crecimiento del mutante *ypi1* (ver figura 34), consideramos la posibilidad de que fuera capaz de suprimir el fenotipo de bloqueo en G2/M que experimenta este mutante (de manera similar a lo que ocurre con la delección de *SWE1*).

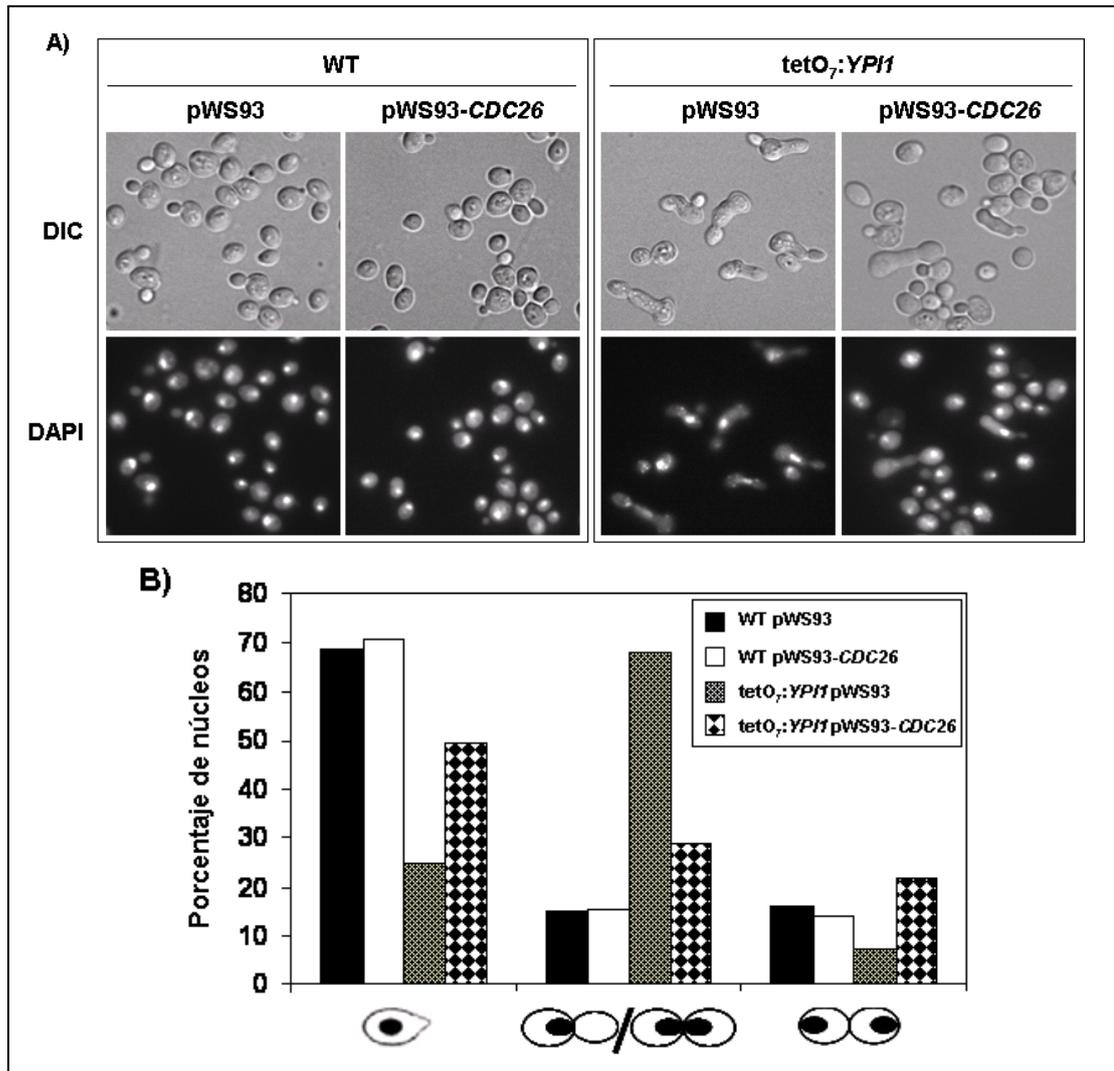
Para evaluar esta posibilidad transformamos el mutante condicional *tetO<sub>7</sub>:YPI1* y la cepa salvaje con los plásmidos pWS93 y pWS93-*CDC26* y realizamos un test de crecimiento en medio líquido, conteniendo 100 µg/ml de doxiciclina, durante 12 horas. Las células fueron sincronizadas en fase G1, en presencia de doxiciclina y la posición y número de núcleos fue monitorizada a las 3 horas después de la liberación del bloqueo en G1. Como se aprecia en la figura 43 A y B, mientras el mutante condicional *tetO<sub>7</sub>:Ypi1* portando el plásmido vacío sufre un severo bloqueo durante la transición metafase-anafase, la sobreexpresión de *CDC26* permite que las células progresen a través de la mitosis. Estos resultados refuerzan la noción que Ypi1 podría estar participando en otros checkpoints y *CDC26* se convertiría en el primer supresor en multicopia del fenotipo de bloqueo en G2/M del mutante *ypi1*.

En *S. cerevisiae*, el APC constituye un gran complejo proteico que puede ser dividido en dos subcomplejos, unidos por las proteínas Apc1, Apc4 y Apc5. El primero, está formado por las proteínas Apc2, Apc11 y Doc1, y es el responsable de reclutar a la enzima conjugadora de ubiquitina E2. Mientras que, el segundo, está formado por las subunidades no esenciales Swm1, Cdc26 y Apc9 (que forman el subcomplejo TRP) y desempeña un papel importante en el reclutamiento de los adaptadores Cdc20 y Cdh1 (Thornton and Toczyski, 2006). Los complejos APC<sup>cdc20</sup> y APC<sup>Cdh1</sup> regulan la transición metafase-anafase y permiten la salida de la mitosis mediante la ubiquitinación de las ciclinas

mitóticas y la securina Pds1 (Zachariae and Nasmyth, 1999). El complejo APC<sup>Cdh1</sup> es regulado negativamente por Cdc28, mediante la fosforilación de Cdh1 (Jaspersen *et al.*, 1999). En cambio, el complejo APC<sup>Cdc20</sup>, es regulado mediante fosforilación de las subunidades que forman parte del subcomplejo TRP (APC) (Rudner and Murray, 2000). Finalmente, ha sido reportado que el APC<sup>Cdc20</sup> es regulado negativamente mediante la fosforilación de Cdc20, en respuesta a daño en el DNA y perturbaciones en el *spindle* (Searle *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2004).

Dado que, los mutantes *cdc26* presentan un fenotipo de bloqueo en el ciclo celular en la transición G2/M, a la temperatura restrictiva, similar al observado en el mutante *ypi1*, nosotros hipotetizamos que Ypi1 podría modular la función de Glc7 sobre el APC. En concordancia con ello, en un estudio realizado por Akiyoshi y colaboradores identificaron a la proteína Fin1 como regulador clave de Glc7 en el silenciamiento del *checkpoint* del *spindle* y sustentan que el complejo formado por Fin1-Glc7 ejerce una función opuesta a la Aurora quinasa Ipl1, involucrada en regulación de la unión cinetocoro-microtúbulos y ayuda a mantener los cromosomas condensados durante la anafase (Cheeseman *et al.*, 2002a). Sin embargo, los estados de fosforilación de Dam1, una proteína del cinetocoro que es sustrato de Ipl1, no se ven afectados por el complejo Fin1-Glc7, sugiriendo que Fin1 únicamente estimula la actividad de Glc7 hacia sustratos específicos del cinetocoro (Akiyoshi *et al.*, 2009). Ello podría explicar porqué Fin1 no es esencial para la viabilidad de la célula y abre la posibilidad de que otras subunidades reguladoras esenciales de Glc7 podrían dirigir la función de la fosfatasa sobre diferentes sustratos de Ipl1.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 45. La sobreexpresión de CDC26 rescata el defecto de bloqueo en G2/M provocado por la ausencia de *YPI1*.** **A)** Las cepas CML476 (WT) y MMR09-4 (*tetO<sub>7</sub>:YPI1*) se transformaron con los plásmidos pWS93 y pWS93-CDC26, se crecieron en medio líquido en presencia 100 µg/ml de doxiciclina durante 12 horas y se sincronizaron con 5 µg/ml de alfa-factor. Las células fueron procesadas para microscopía mediante tinción con DAPI después de 3 horas de liberación del alfa-factor. **B)** Alrededor de 400 células de cada condición se clasificaron de acuerdo a la posición y número de núcleos (tal como se muestra en la parte inferior de la gráfica).

## **6. CONCLUSIONES**



## 6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante el curso de esta tesis doctoral nos han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1. El efecto de halotolerancia producido por la sobreexpresión de *YPI1* es independiente de las fosfatasas Ppz y de los transportadores de potasio Trk1 y Trk2, y podría ser mediado por la ATPasa de sodio *ENA1*.
2. Se han diseñado y puesto a punto diversas estrategias orientadas a la creación de mutantes condicionales de *YPI1* basados tanto en el uso de un Degrón como en sistemas de expresión del promotor *tetO* regulable por doxiciclina. Los mejores resultados se han obtenido mediante el reemplazamiento cromosómico del promotor de *YPI1* por un promotor *tetO<sub>7</sub>*.
3. La disponibilidad de mutantes condicionales *ypi1* ha permitido demostrar que la función que esta subunidad reguladora desempeña sobre la fosfatasa Glc7 está vinculada con el mantenimiento de la integridad de la pared celular y la regulación del ciclo celular.
4. Ypi1 desempeña un papel muy específico en la fisiología de la célula, ya que, según los resultados obtenidos en la búsqueda de genes supresores de la letalidad provocada por la falta de Ypi1, no existe ninguna proteína capaz de suplir dicha función.
5. Ypi1 y Sds22 son importantes para la progresión del ciclo celular. Células carentes de Ypi1 o de Sds22 sufren un retraso en el ciclo celular entre la metafase y la anafase, con un acúmulo de núcleos no divididos localizados entre las células madre e hija y *spindles* mitóticos anormalmente cortos. Además, las funciones de Ypi1 y Sds22 no son redundantes porque la sobreexpresión de una de las subunidades reguladoras no suprime el fenotipo provocado por la ausencia de la otra.
6. La correcta localización de Glc7 en el núcleo, requiere la presencia de sus subunidades reguladoras esenciales Ypi1 y Sds22.
7. La falta de Ypi1 provoca diversos cambios transcripcionales entre los cuales destaca una inhibición rápida y sostenida de los niveles de *CDC26*.

---

## CONCLUSIONES

8. El bloqueo provocado por la ausencia de Ypi1 se realiza antes del inicio de la anafase, ya que dicho bloqueo involucra una estabilización de la securina Pds1, sugiriendo una posible activación de uno de los checkpoints de G2/M.
9. El bloqueo del ciclo celular, provocado por la falta de Ypi1, no es debido a la activación de los *checkpoints* del *spindle* y de daño en el DNA. En cambio, el bloqueo mitótico observado en células carentes de Ypi1 es atribuible a la activación del *checkpoint* de la morfogénesis.
10. La persistente fosforilación de Cdc28 en células carentes de Ypi1 es debida al mantenimiento anormalmente elevado de los niveles de Swe1.
11. Las anomalías observadas en la fosforilación de la Tyr19 de Cdc28 y la estabilización de Swe1, provocadas por la falta de Ypi1, podrían ser atribuidas a defectos en el correcto ensamblaje y localización de las septinas.
12. La sobreexpresión de *CDC26* recupera el fenotipo de bloqueo en G2/M del mutante *ypi1*, pero no rescata el fenotipo de letalidad.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**



## 7. BIBLIOGRAFÍA

Adams, A., Gottschlings, D.E., Kaiser, C.A., and Stearns, T. (1997). *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Adams, A.E., and Pringle, J.R. (1984). Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild-type and morphogenetic-mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 98, 934-945.

Agarwal, R., Tang, Z., Yu, H., and Cohen-Fix, O. (2003). Two distinct pathways for inhibiting pds1 ubiquitination in response to DNA damage. *J Biol Chem* 278, 45027-45033.

Akiyoshi, B., Nelson, C.R., Ranish, J.A., and Biggins, S. (2009). Quantitative proteomic analysis of purified yeast kinetochores identifies a PP1 regulatory subunit. *Genes Dev* 23, 2887-2899.

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 microchips for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: features and uses. *Int Microbiol* 7, 199-206.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and P., W. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 1027-1064.

Alexandru, G., Zachariae, W., Schleiffer, A., and Nasmyth, K. (1999). Sister chromatid separation and chromosome re-duplication are regulated by different mechanisms in response to spindle damage. *Embo J* 18, 2707-2721.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410.

Ambesi, A., Miranda, M., Petrov, V.V., and Slayman, C.W. (2000). Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H(+)-ATPase. *J. Exp. Biol.* 203, 155-160.

Amon, A. (1999). The spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev* 9, 69-75.

Andre, B. (1995). An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11, 1575-1611.

Andreassen, P.R., B., L.F., Villa-Moruzzi, E., and Margolis, R.L. (1998). Differential subcellular localization of protein-phosphatase-1 alpha, gamma1, and delta isoforms during both interphase and mitosis in mammalian cells. *J.Cell Biol* 141, 1207-1215.

Andrews, C.A., Diaz-Martinez, L.A., Gimenez-Abian, J.F., Guacci, V., Vas, A.C., and Clarke, D.J. (2005). Evidence that the yeast spindle assembly checkpoint has a target other than the anaphase promoting complex. *Cell Cycle* 4, 1555-1557.

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Andrews, P.D., and Stark, M.J. (2000). Type 1 protein phosphatase is required for maintenance of cell wall integrity, morphogenesis and cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* *113* ( Pt 3), 507-520.
- Angeles de la Torre-Ruiz, M., Torres, J., Arino, J., and Herrero, E. (2002). Sit4 is required for proper modulation of the biological functions mediated by Pkc1 and the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *277*, 33468-33476.
- Archambault, J., Pan, G., Dahmus, G.K., Cartier, M., Marshall, N., Zhang, S., Dahmus, M.E., and Greenblatt, J. (1998). FCP1, the RAP74-interacting subunit of a human protein phosphatase that dephosphorylates the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II $\alpha$ . *J Biol Chem* *273*, 27593-27601.
- Arino, J. (2002). Novel protein phosphatases in yeast. *Eur J Biochem* *269*, 1072-1077.
- Arino, J., and Herrero, E. (2003). Use of tetracycline-regulatable promoters for functional analysis of protein phosphatases in yeast. *Methods Enzymol* *366*, 347-358.
- Asakawa, K., and Toh-e, A. (2002). A defect of Kap104 alleviates the requirement of mitotic exit network gene functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *162*, 1545-1556.
- Bachmair, A., and Varshavsky, A. (1989). The degradation signal in a short-lived protein. *Cell* *56*, 1019-1032.
- Banuelos, M.A., Sychrova, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J.L., and Potier, S. (1998). The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* *144* ( Pt 10), 2749-2758.
- Bardin, A.J., Visintin, R., and Amon, A. (2000). A mechanism for coupling exit from mitosis to partitioning of the nucleus. *Cell* *102*, 21-31.
- Barford, D., Das, A.K., and Egloff, M.P. (1998). The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* *27*, 133-164.
- Barral, Y., Parra, M., Bidlingmaier, S., and Snyder, M. (1999). Nim1-related kinases coordinate cell cycle progression with the organization of the peripheral cytoskeleton in yeast. *Genes Dev* *13*, 176-187.
- Bean, J.M., Siggia, E.D., and Cross, F.R. (2005). High functional overlap between MluI cell-cycle box binding factor and Swi4/6 cell-cycle box binding factor in the G1/S transcriptional program in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *171*, 49-61.
- Belli, G., Gari, E., Aldea, M., and Herrero, E. (1998). Functional analysis of yeast essential genes using a promoter-substitution cassette and the tetracycline-regulatable dual expression system. *Yeast* *14*, 1127-1138.

- Belli, G., Gari, E., Aldea, M., and Herrero, E. (2001). Osmotic stress causes a G1 cell cycle delay and downregulation of Cln3/Cdc28 activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* *39*, 1022-1035.
- Benito, B., Garciadeblas, B., and Rodriguez-Navarro, A. (2002). Potassium- or sodium-efflux ATPase, a key enzyme in the evolution of fungi. *Microbiology* *148*, 933-941.
- Bertin, A., McMurray, M.A., Grob, P., Park, S.S., Garcia, G., 3rd, Patanwala, I., Ng, H.L., Alber, T., Thorner, J., and Nogales, E. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 8274-8279.
- Besant, P.G., and Attwood, P.V. (2005). Mammalian histidine kinases. *Biochim Biophys Acta* *1754*, 281-290.
- Bharucha, J.P., Larson, J.R., Gao, L., Daves, L.K., and Tatchell, K. (2008a). Ypi1, a positive regulator of nuclear protein phosphatase type 1 activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* *19*, 1032-1045.
- Bharucha, J.P., Larson, J.R., Konopka, J.B., and Tatchell, K. (2008b). *Saccharomyces cerevisiae* Afr1 protein is a protein phosphatase 1/Glc7-targeting subunit that regulates the septin cytoskeleton during mating. *Eukaryot Cell* *7*, 1246-1255.
- Biggins, S., and Murray, A.W. (2001). The budding yeast protein kinase Ipl1/Aurora allows the absence of tension to activate the spindle checkpoint. *Genes Dev* *15*, 3118-3129.
- Biggins, S., Severin, F.F., Bhalla, N., Sassoon, I., Hyman, A.A., and Murray, A.W. (1999). The conserved protein kinase Ipl1 regulates microtubule binding to kinetochores in budding yeast. *Genes Dev* *13*, 532-544.
- Bihler, H., Slayman, C.L., and Bertl, A. (1998). NSC1: a novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* *432*, 59-64.
- Black, S., Andrews, P.D., Sneddon, A.A., and Stark, M.J. (1995). A Regulated *MET3-GLC7* Gene Fusion Provides Evidence of Mitotic Role for *Saccharomyces cerevisiae* Protein Phosphatase 1. *Yeast* *11*, 747-759.
- Bloecher, A., and Tatchell, K. (1999). Defects in *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase type I activate the spindle/kinetochore checkpoint. *Genes Dev* *13*, 517-522.
- Bloecher, A., and Tatchell, K. (2000). Dynamic localization of protein phosphatase type 1 in the mitotic cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* *149*, 125-140.
- Bloom, J., and Cross, F.R. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol* *8*, 149-160.

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Bollen, M. (2001). Combinatorial control of protein phosphatase-1. *Trends Biochem Sci* 26, 426-431.
- Booher, R.N., Deshaies, R., and Kirschner, M.W. (1993). Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34<sup>CDC28</sup> in response to G1 and G2 cyclins. *Embo J* 12, 3417-3426.
- Buehrer, B.M., and Errede, B. (1997). Coordination of the mating and cell integrity mitogen-activated protein kinase pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 17, 6517-6525.
- Burke, D.J., Dawson, D., and Stearns, T. (2000). *Methods in Yeast Genetics*. A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. 2000 Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cannon, J.F., Pringle, J.R., Fiechter, A., and Khalil, M. (1994). Characterization of glycogen-deficient glc mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 136, 485-503.
- Casamayor, A., and Snyder, M. (2003). Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function. *Mol Cell Biol* 23, 2762-2777.
- Ceulemans, H., and Bollen, M. (2004). Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev* 84, 1-39.
- Ceulemans, H., Stalmans, W., and Bollen, M. (2002a). Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution. *Bioessays* 24, 371-381.
- Ceulemans, H., Van Eynde, A., Perez-Callejon, E., Beullens, M., Stalmans, W., and Bollen, M. (1999). Structure and splice products of the human gene encoding sds22, a putative mitotic regulator of protein phosphatase-1. *Eur J Biochem* 262, 36-42.
- Ceulemans, H., Vulsteke, V., De Maeyer, M., Tatchell, K., Stalmans, W., and Bollen, M. (2002b). Binding of the concave surface of the Sds22 superhelix to the alpha 4/alpha 5/alpha 6-triangle of protein phosphatase-1. *J Biol Chem* 277, 47331-47337.
- Ciosk, R., Zachariae, W., Michaelis, C., Shevchenko, A., Mann, M., and Nasmyth, K. (1998). An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell* 93, 1067-1076.
- Clotet, J., Posas, F., Casamayor, A., Schaaff-Gerstenschlager, I., and Arino, J. (1991). The gene DIS2S1 is essential in *Saccharomyces cerevisiae* and is involved in glycogen phosphorylase activation. *Curr Genet* 19, 339-342.
- Cohen-Fix, O., and Koshland, D. (1999). Pds1p of budding yeast has dual roles: inhibition of anaphase initiation and regulation of mitotic exit. *Genes Dev* 13, 1950-1959.
- Cohen-Fix, O., Peters, J.M., Kirschner, M.W., and Koshland, D. (1996). Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev* 10, 3081-3093.

- Cohen, P., and Cohen, P.T. (1989). Protein phosphatases come of age. *J. Biol. Chem.* *264*, 21435-21438.
- Cohen, P.T. (2002). Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* *115*, 241-256.
- Connor, J.H., Frederick, D., Huang, H., Yang, J., Helps, N.R., Cohen, P.T., Nairn, A.C., DePaoli-Roach, A., Tatchell, K., and Shenolikar, S. (2000). Cellular mechanisms regulating protein phosphatase-1. A key functional interaction between inhibitor-2 and the type 1 protein phosphatase catalytic subunit. *J Biol Chem* *275*, 18670-18675.
- Connor, J.H., Kleeman, T., Barik, S., Honkanen, R.E., and Shenolikar, S. (1999). Importance of the beta12-beta13 loop in protein phosphatase-1 catalytic subunit for inhibition by toxins and mammalian protein inhibitors. *J Biol Chem* *274*, 22366-22372.
- Connor, J.H., Weiser, D.C., Li, S., Hallenbeck, J.M., and Shenolikar, S. (2001). Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 assembles a novel signaling complex containing protein phosphatase 1 and inhibitor 1. *Mol Cell Biol* *21*, 6841-6850.
- Costanzo, M., Nishikawa, J.L., Tang, X., Millman, J.S., Schub, O., Breikreuz, K., Dewar, D., Rupes, I., Andrews, B., and Tyers, M. (2004). CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast. *Cell* *117*, 899-913.
- Cross, F.R. (1995). Starting the cell cycle: what's the point? *Curr Opin Cell Biol* *7*, 790-797.
- Cullen, P.J., and Sprague, G.F., Jr. (2002). The Glc7p-interacting protein Bud14p attenuates polarized growth, pheromone response, and filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* *1*, 884-894.
- Chang, J.S., Henry, K., Wolf, B.L., Geli, M., and Lemmon, S.K. (2002). Protein phosphatase-1 binding to scd5p is important for regulation of actin organization and endocytosis in yeast. *J Biol Chem* *277*, 48002-48008.
- Cheeseman, I.M., Anderson, S., Jwa, M., Green, E.M., Kang, J., Yates, J.R., 3rd, Chan, C.S., Drubin, D.G., and Barnes, G. (2002a). Phospho-regulation of kinetochore-microtubule attachments by the Aurora kinase Ipl1p. *Cell* *111*, 163-172.
- Cheeseman, I.M., Drubin, D.G., and Barnes, G. (2002b). Simple centromere, complex kinetochore: linking spindle microtubules and centromeric DNA in budding yeast. *J Cell Biol* *157*, 199-203.
- Chen, K.C., Csikasz-Nagy, A., Gyorffy, B., Val, J., Novak, B., and Tyson, J.J. (2000). Kinetic analysis of a molecular model of the budding yeast cell cycle. *Mol Biol Cell* *11*, 369-391.
- Chen, R.H., Brady, D.M., Smith, D., Murray, A.W., and Hardwick, K.G. (1999). The spindle checkpoint of budding yeast depends on a tight complex between the Mad1 and Mad2 proteins. *Mol Biol Cell* *10*, 2607-2618.

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Chen, R.H., Shevchenko, A., Mann, M., and Murray, A.W. (1998). Spindle checkpoint protein Xmad1 recruits Xmad2 to unattached kinetochores. *J Cell Biol* *143*, 283-295.
- Cherry, J.M., Ball, C., Weng, S., Juvik, G., Schmidt, R., Adler, C., Dunn, B., Dwight, S., Riles, L., Mortimer, R.K., and Botstein, D. (1997). Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* *387*, 67-73.
- Daher, W., Cailliau, K., Takeda, K., Pierrot, C., Khayath, N., Dissous, C., Capron, M., Yanagida, M., Browaeys, E., and Khalife, J. (2006). Characterization of *Schistosoma mansoni* Sds homologue, a leucine-rich repeat protein that interacts with protein phosphatase type 1 and interrupts a G2/M cell-cycle checkpoint. *Biochem J* *395*, 433-441.
- De Antoni, A., Pearson, C.G., Cimini, D., Canman, J.C., Sala, V., Nezi, L., Mapelli, M., Sironi, L., Faretta, M., Salmon, E.D., and Musacchio, A. (2005). The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* *15*, 214-225.
- de Nadal, E., Clotet, J., Posas, F., Serrano, R., Gomez, N., and Arino, J. (1998). The yeast halotolerance determinant Hal3p is an inhibitory subunit of the Ppz1p Ser/Thr protein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 7357-7362.
- de Wulf, P., McAinsh, A.D., and Sorger, P.K. (2003). Hierarchical assembly of the budding yeast kinetochore from multiple subcomplexes. *Genes Dev* *17*, 2902-2921.
- den Elzen, N.R., and O'Connell, M.J. (2004). Recovery from DNA damage checkpoint arrest by PP1-mediated inhibition of Chk1. *Embo J* *23*, 908-918.
- Dewar, H., Tanaka, K., Nasmyth, K., and Tanaka, T.U. (2004). Tension between two kinetochores suffices for their bi-orientation on the mitotic spindle. *Nature* *428*, 93-97.
- Dichtl, B., Stevens, A., and Tollervey, D. (1997). Lithium toxicity in yeast is due to the inhibition of RNA processing enzymes. *Embo J* *16*, 7184-7195.
- Dinischiotu, A., Beullens, M., Stalmans, W., and Bollen, M. (1997). Identification of sds22 as an inhibitory subunit of protein phosphatase-1 in rat liver nuclei. *FEBS Lett* *402*, 141-144.
- Dobbelaere, J., Gentry, M.S., Hallberg, R.L., and Barral, Y. (2003). Phosphorylation-dependent regulation of septin dynamics during the cell cycle. *Dev Cell* *4*, 345-357.
- Dohadwala, M., da Cruz e Silva, E.F., Hall, F.L., Williams, R.T., Carbonaro-Hall, D.A., Nairn, A.C., Greengard, P., and Berndt, N. (1994). Phosphorylation and inactivation of protein phosphatase 1 by cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 6408-6412.
- Dombradi, V., Axton, J.M., Brewis, N.D., da Cruz e Silva, E.F., Alphey, L., and Cohen, P.T. (1990). *Drosophila* contains three genes that encode distinct isoforms of protein phosphatase 1. *Eur J Biochem* *194*, 739-745.

- Doonan, J.H., and Morris, N.R. (1989). The bimG gene of *Aspergillus nidulans*, required for completion of anaphase, encodes a homolog of mammalian phosphoprotein phosphatase 1. *Cell* 57, 987-996.
- Dozier, C., Bonyadi, M., Baricault, L., Tonasso, L., and Darbon, J.M. (2004). Regulation of Chk2 phosphorylation by interaction with protein phosphatase 2A via its B' regulatory subunit. *Biol Cell* 96, 509-517.
- Drury, L.S., Perkins, G., and Diffley, J.F. (1997). The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast. *Embo J* 16, 5966-5976.
- Dujon, B. (1996). The yeast genome project: what did we learn? *Trends Genet* 12, 263-270.
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.L., Yeh, S.H., Yang, Y., Kilburn, A.E., Lee, W.H., and Elledge, S.J. (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev* 7, 555-569.
- Dwight, S.S., Harris, M.A., Dolinski, K., Ball, C.A., Binkley, G., Christie, K.R., Fisk, D.G., Issel-Tarver, L., Schroeder, M., Sherlock, G., Sethuraman, A., Weng, S., Botstein, D., and Cherry, J.M. (2002). *Saccharomyces Genome Database (SGD)* provides secondary gene annotation using the Gene Ontology (GO). *Nucleic Acids Res* 30, 69-72.
- Egloff, M.P., Cohen, P.T., Reinemer, P., and Barford, D. (1995). Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *J Mol Biol* 254, 942-959.
- Egloff, M.P., Johnson, D.F., Moorhead, G., Cohen, P.T., Cohen, P., and Barford, D. (1997). Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *Embo J* 16, 1876-1887.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., and Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14863-14868.
- Ek, P., Pettersson, G., Ek, B., Gong, F., Li, J.P., and Zetterqvist, O. (2002). Identification and characterization of a mammalian 14-kDa phosphohistidine phosphatase. *Eur J Biochem* 269, 5016-5023.
- Elledge, S.J. (1996a). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274, 1664-1672.
- Elledge, S.J. (1996b). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274, 1664-1672.
- Endo, S., Zhou, X., Connor, J., Wang, B., and Shenolikar, S. (1996). Multiple structural elements define the specificity of recombinant human inhibitor-1 as a protein phosphatase-1 inhibitor. *Biochemistry* 35, 5220-5228.

---

## BIBLIOGRAFÍA

Eraso, P., and Portillo, F. (1994). Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane H(+)-ATPase by glucose. Interaction between domains and identification of new regulatory sites. *J Biol Chem* *269*, 10393-10399.

Feldman, R.M., Correll, C.C., Kaplan, K.B., and Deshaies, R.J. (1997). A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* *91*, 221-230.

Feng, Z.H., Wilson, S.E., Peng, Z.Y., Schlender, K.K., Reimann, E.M., and Trumbly, R.J. (1991). The yeast GLC7 gene required for glycogen accumulation encodes a type 1 protein phosphatase. *J Biol Chem* *266*, 23796-23801.

Fernandez, A., Brautigan, D.L., and Lamb, N.J. (1992). Protein phosphatase type 1 in mammalian cell mitosis: chromosomal localization and involvement in mitotic exit. *J Cell Biol* *116*, 1421-1430.

Ferrer-Dalmau, J., Gonzalez, A., Platara, M., Navarrete, C., Martinez, J.L., Barreto, L., Ramos, J., Arino, J., and Casamayor, A. (2010). Ref2, a regulatory subunit of the yeast protein phosphatase 1, is a novel component of cation homeostasis. *Biochem J* *426*, 355-364.

Francisco, L., Wang, W., and Chan, C.S. (1994). Type 1 protein phosphatase acts in opposition to IpL1 protein kinase in regulating yeast chromosome segregation. *Mol Cell Biol* *14*, 4731-4740.

Fraschini, R., Beretta, A., Lucchini, G., and Piatti, S. (2001). Role of the kinetochore protein Ndc10 in mitotic checkpoint activation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* *266*, 115-125.

Fraschini, R., Formenti, E., Lucchini, G., and Piatti, S. (1999). Budding yeast Bub2 is localized at spindle pole bodies and activates the mitotic checkpoint via a different pathway from Mad2. *J Cell Biol* *145*, 979-991.

Gaber, R.F., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1988 ). TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* *8*, 2848-2859.

Garcia-Gimeno, M.A., Munoz, I., Arino, J., and Sanz, P. (2003). Molecular characterization of Ypi1, a novel *Saccharomyces cerevisiae* type 1 protein phosphatase inhibitor. *J Biol Chem* *278*, 47744-47752.

Garciadeblas, B., Rubio, F., Quintero, F.J., Banuelos, M.A., Haro, R., and Rodriguez-Navarro, A. (1993). Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* *236*, 363-368.

Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1997). A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *13*, 837-848.

- Geymonat, M., Spanos, A., Smith, S.J., Wheatley, E., Rittinger, K., Johnston, L.H., and Sedgwick, S.G. (2002). Control of mitotic exit in budding yeast. In vitro regulation of Tem1 GTPase by Bub2 and Bfa1. *J Biol Chem* 277, 28439-28445.
- Gibbons, J.A., Kozubowski, L., Tatchell, K., and Shenolikar, S. (2007). Expression of human protein phosphatase-1 in *Saccharomyces cerevisiae* highlights the role of phosphatase isoforms in regulating eukaryotic functions. *J Biol Chem* 282, 21838-21847.
- Gietz, R.D., and Sugino, A. (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74, 527-534.
- Gilbert, C.S., Green, C.M., and Lowndes, N.F. (2001). Budding yeast Rad9 is an ATP-dependent Rad53 activating machine. *Mol Cell* 8, 129-136.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., and Oliver, S.G. (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274, 546, 563-547.
- Goldstein, A.L., and McCusker, J.H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15, 1541-1553.
- Goossens, A., de La Fuente, N., Forment, J., Serrano, R., and Portillo, F. (2000). Regulation of yeast H(+)-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol Cell Biol* 20, 7654-7661.
- Green, C.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Lowndes, N.F. (2000). A novel Rad24 checkpoint protein complex closely related to replication factor C. *Curr Biol* 10, 39-42.
- Hanks, S.K., and Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J* 9, 576-596.
- Hardy, T.A., and Roach, P.J. (1993). Control of yeast glycogen synthase-2 by COOH-terminal phosphorylation. *J Biol Chem* 268, 23799-23805.
- Haro, R., Garciadeblas, B., and Rodriguez-Navarro, A. (1991). A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett.* 291, 189-191.
- Harper, J.W. (2001). Protein destruction: adapting roles for Cks proteins. *Curr Biol* 11, R431-R435.
- Hartwell, L.H. (2002). Nobel Lecture. Yeast and cancer. *Biosci Rep* 22, 373-394.
- Hartwell, L.H., and Kastan, M.B. (1994). Cell cycle control and cancer. *Science* 266, 1821-1828.
- Hartwell, L.H., and Weinert, T.A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246, 629-634.

---

## BIBLIOGRAFÍA

Harvey, S.L., Charlet, A., Haas, W., Gygi, S.P., and Kellogg, D.R. (2005). Cdk1-dependent regulation of the mitotic inhibitor Wee1. *Cell* *122*, 407-420.

Harvey, S.L., and Kellogg, D.R. (2003). Conservation of mechanisms controlling entry into mitosis: budding yeast wee1 delays entry into mitosis and is required for cell size control. *Curr Biol* *13*, 264-275.

Hazbun, T.R., Malmstrom, L., Anderson, S., Graczyk, B.J., Fox, B., Riffle, M., Sundin, B.A., Aranda, J.D., McDonald, W.H., Chiu, C.H., Snyderman, B.E., Bradley, P., Muller, E.G., Fields, S., Baker, D., Yates, J.R., 3rd, and Davis, T.N. (2003). Assigning function to yeast proteins by integration of technologies. *Mol Cell* *12*, 1353-1365.

Heinisch, J.J., Lorberg, A., Schmitz, H.P., and Jacoby, J.J. (1999). The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* *32*, 671-680.

Hisamoto, N., Frederick, D.L., Sugimoto, K., Tatchell, K., and Matsumoto, K. (1995). The EGP1 gene may be a positive regulator of protein phosphatase type 1 in the growth control of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *15*, 3767-3776.

Hisamoto, N., Sugimoto, K., and Matsumoto, K. (1994). The Glc7 type 1 protein phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for cell cycle progression in G2/M. *Mol Cell Biol* *14*, 3158-3165.

Hong, G., Trumbly, R.J., Reimann, E.M., and Schlender, K.K. (2000). Sds22p is a subunit of a stable isolatable form of protein phosphatase 1 (Glc7p) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* *376*, 288-298.

Hsu, J.Y., Sun, Z.W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D.K., Grushcow, J.M., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Hunt, D.F., Lin, R., Smith, M.M., and Allis, C.D. (2000). Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* *102*, 279-291.

Hu, F., Wang, Y., Liu, D., Li, Y., Qin, J., and Elledge, S.J. (2001). Regulation of the Bub2/Bfa1 GAP complex by Cdc5 and cell cycle checkpoints. *Cell* *107*, 655-665.

Huang, H.B., Horiuchi, A., Watanabe, T., Shih, S.R., Tsay, H.J., Li, H.C., Greengard, P., and Nairn, A.C. (1999). Characterization of the inhibition of protein phosphatase-1 by DARPP-32 and inhibitor-2. *J Biol Chem* *274*, 7870-7878.

Huang, J.M., Wei, Y.F., Kim, Y.H., Osterberg, L., and Matthews, H.R. (1991). Purification of a protein histidine kinase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The first member of this class of protein kinases. *J Biol Chem* *266*, 9023-9031.

Huang, Z., Khatra, B., Bollen, M., Carr, D.W., and Vijayaraghavan, S. (2002). Sperm PP1gamma2 is regulated by a homologue of the yeast protein phosphatase binding protein sds22. *Biol Reprod* *67*, 1936-1942.

- Hunt, T. (2002). Nobel Lecture. Protein synthesis, proteolysis, and cell cycle transitions. *Biosci Rep* 22, 465-486.
- Hunter, T. (1995). Protein Kinases and Phosphatases: The Yin and Yang of Protein Phosphorylation and Signaling. *Cell* 80, 225-236.
- Hunter, T., and Plowman, G.D. (1997). The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci* 22, 18-22.
- Huxley, C., Green, E.D., and Dunham, I. (1990). rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR. *Trends Genet.* 6, 236.
- Ingebritsen, T.S., and Cohen, P. (1983a). The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrate specificities. *Eur J Biochem* 132, 255-261.
- Ingebritsen, T.S., and Cohen, P. (1983b). Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* 221, 331-338.
- Irniger, S.P., S., Michaelis, C., and Nasmyth, K. (1995). Genes involved in sister chromatid separation are needed for B-type cyclin proteolysis in budding yeast. *Cell* 81, 269-277.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., and Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4569-4574.
- Ito, T., Fukuda, Y., Marata, K., and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153, 163-168.
- Jaspersen, S.L., Charles, J.F., and Morgan, D.O. (1999). Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr Biol* 9, 227-236.
- Johnson, D., Cohen, P., Chen, M.X., Chen, Y.H., and Cohen, P.T. (1997). Identification of the regions on the M110 subunit of protein phosphatase 1M that interact with the M21 subunit and with myosin. *Eur J Biochem* 244, 931-939.
- Johnson, L.N., and Barford, D. (1993). The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 22, 199-232.
- Johnson, L.N., and O'Reilly, M. (1996). Control by phosphorylation. *Curr Opin Struct Biol* 6, 762-769.
- Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D., and Smith, A.E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39, 499-509.
- Kaldis, P., Sutton, A., and Solomon, M.J. (1996). The cdk-activating kinase (CAK) from budding yeast. *Cell* 86, 553-564.

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Kang, J., Cheeseman, I.M., Kallstrom, G., Velmurugan, S., Barnes, G., and Chan, C.S. (2001). Functional cooperation of Dam1, Ipl1, and the inner centromere protein (INCENP)-related protein Sli15 during chromosome segregation. *J Cell Biol* 155, 763-774.
- Keaton, M.A., and Lew, D.J. (2006). Eavesdropping on the cytoskeleton: progress and controversy in the yeast morphogenesis checkpoint. *Curr Opin Microbiol* 9, 540-546.
- Kellogg, D.R. (2003). Wee1-dependent mechanism required for coordination of cell growth and cell division. *J. Cell Sci.* 116, 4883-4890.
- Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K., and Goldstein, S.A. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376, 690-695.
- Kim, H.S., and Brill, S.J. (2003). MEC1-dependent phosphorylation of yeast RPA1 in vitro. *DNA Repair (Amst)* 2, 1321-1335.
- Kim, Y., Huang, J., Cohen, P., and Matthews, H.R. (1993). Protein Phosphatases 1, 2A, 2C are protein histidine phosphatases. *J. Biol. Chem.* 268, 18513-18518.
- Klumpp, S., Hermesmeier, J., Selke, D., Baumeister, R., Kellner, R., and Kriegstein, J. (2002). Protein histidine phosphatase: a novel enzyme with potency for neuronal signaling. *J Cereb Blood Flow Metab* 22, 1420-1424.
- Ko, C.H., Buckley, A.M., and Gaber, R.F. (1990). TRK2 is required for low affinity K<sup>+</sup> transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 125, 305-312.
- Ko, C.H., and Gaber, R.F. (1991). TRK1 and TRK2 encode structurally related K<sup>+</sup> transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 11, 4266-4273.
- Kondo, T., Matsumoto, K., and Sugimoto, K. (1999). Role of a complex containing Rad17, Mec3, and Ddc1 in the yeast DNA damage checkpoint pathway. *Mol Cell Biol* 19, 1136-1143.
- Kops, G.J., Weaver, B.A., and Cleveland, D.W. (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat. Rev. Cancer* 5, 773-785.
- Kosco, K.A., Pearson, C.G., Maddox, P.S., Wang, P.J., Adams, I.R., Salmon, E.D., Bloom, K., and Huffaker, T.C. (2001). Control of microtubule dynamics by Stu2p is essential for spindle orientation and metaphase chromosome alignment in yeast. *Mol Biol Cell* 12, 2870-2880.
- Kotani, S., Tugendreich, S., Fujii, M., Jorgensen, P.M., Watanabe, T., Hogg, C., Hieter, P., and Todoroko, K. (1998). PKA and MPF-activated Polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. *Mol Cell* 1, 371-380.
- Kozubowski, L., Panek, H., Rosenthal, A., Bloecher, A., DeMarini, D.J., and Tatchell, K. (2003). A Bni4-Glc7 phosphatase complex that recruits chitin synthase to the site of bud emergence. *Mol Biol Cell* 14, 26-39.

- Krebs, E.G. (1985). The phosphorylation of proteins: a major mechanism for biological regulation. Fourteenth Sir Frederick Gowland Hopkins memorial lecture. *Biochem Soc Trans* 13, 813-820.
- Krebs, E.G., and Fischer, E.H. (1956). The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 20, 150-157.
- Krebs, E.G., Graves, D.J., and Fischer, E.H. (1959). Factors affecting the activity of muscle phosphorylase b kinase. *J Biol Chem* 234, 2867-2873.
- Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A.P., Punna, T., Peregrin-Alvarez, J.M., Shales, M., Zhang, X., Davey, M., Robinson, M.D., Paccanaro, A., Bray, J.E., Sheung, A., Beattie, B., Richards, D.P., Canadien, V., Lalev, A., Mena, F., Wong, P., Starostine, A., Canete, M.M., Vlasblom, J., Wu, S., Orsi, C., Collins, S.R., Chandran, S., Haw, R., Rilstone, J.J., Gandi, K., Thompson, N.J., Musso, G., St Onge, P., Ghanny, S., Lam, M.H., Butland, G., Altaf-Ul, A.M., Kanaya, S., Shilatifard, A., O'Shea, E., Weissman, J.S., Ingles, C.J., Hughes, T.R., Parkinson, J., Gerstein, M., Wodak, S.J., Emili, A., and Greenblatt, J.F. (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440, 637-643.
- Kucsera, J., Yarita, K., and Takeo, K. (2000). Simple detection method for distinguishing dead and living yeast colonies. *J Microbiol Methods* 41, 19-21.
- Kwon, Y.G., Lee, S.Y., Choi, Y., Greengard, P., and Nairn, A.C. (1997). Cell cycle-dependent phosphorylation of mammalian protein phosphatase 1 by cdc2 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2168-2173.
- Lange, A., Mills, R.E., Lange, C.J., Stewart, M., Devine, S.E., and Corbett, A.H. (2007). Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem* 282, 5101-5105.
- Lavin, M.F., and Kozlov, S. (2007). ATM activation and DNA damage response. *Cell Cycle* 6, 931-942.
- Lee, S.E., Frenz, L.M., Wells, N.J., Johnson, A.L., and Johnston, L.H. (2001). Order of function of the budding-yeast mitotic exit-network proteins Tem1, Cdc15, Mob1, Dbf2, and Cdc5. *Curr Biol* 11, 784-788.
- Lee, S.J., Schwartz, M.F., Duong, J.K., and Stern, D.F. (2003). Rad53 phosphorylation site clusters are important for Rad53 regulation and signaling. *Mol Cell Biol* 23, 6300-6314.
- Lee, T.H., Solomon, M.J., Mumby, M.C., and Kirschner, M.W. (1991). INH, a negative regulator of MPF, is a form of protein phosphatase 2A. *Cell* 64, 415-423.
- Lee, T.H., Turck, C., and Kirschner, M.W. (1994). Inhibition of cdc2 activation by INH/Pp2A. *Mol Biol Cell* 5, 323-338.

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Leroy, C., Lee, S.E., Vaze, M.B., Ochsenbien, F., Guerois, R., Haber, J.E., and Marsolier-Kergoat, M.C. (2003). PP2C phosphatases Ptc2 and Ptc3 are required for DNA checkpoint inactivation after a double-strand break. *Mol Cell* *11*, 827-835.
- Lesage, B., Beullens, M., Pedelini, L., Garcia-Gimeno, M.A., Waelkens, E., Sanz, P., and Bollen, M. (2007). A complex of catalytically inactive protein phosphatase-1 sandwiched between Sds22 and inhibitor-3. *Biochemistry* *46*, 8909-8919.
- Leung-Pineda, V., Ryan, C.E., and Piwnica-Worms, H. (2006). Phosphorylation of Chk1 by ATR is antagonized by a Chk1-regulated protein phosphatase 2A circuit. *Mol Cell Biol* *26*, 7529-7538.
- Levin, D.E., and Errede, B. (1995). The proliferation of MAP kinase signaling pathways in yeast. *Curr Opin Cell Biol* *7*, 197-202.
- Lew, D.J. (2003). The morphogenesis checkpoint: how yeast cell watch their figures. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 648-653.
- Lew, D.J., and Reed, S.I. (1995). A cell cycle checkpoint monitors cell morphogenesis in budding yeast. *J Cell Biol* *129*, 739-749.
- Li, B., Nierras, C.R., and Warner, J.R. (1999). Transcriptional Elements Involved in the Repression of Ribosomal Protein Synthesis. *Molecular and Cellular Biology.* *19*, 5393-5404.
- Li, F.N., and Johnston, M. (1997). Grr1 of *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupling glucosa sensing to gene expression and the cell cycle. *Embo J* *16*, 5629-5638.
- Li, J.J., and Li, S.A. (2006). Mitotic kinases: the key to duplication, segregation, and cytokinesis errors, chromosomal instability, and oncogenesis. *Pharmacol Ther* *111*, 974-984.
- Lin, F.C., and Arndt, K.T. (1995). The role of *Saccharomyces cerevisiae* type 2A phosphatase in the actin cytoskeleton and in entry into mitosis. *Embo J* *14*, 2745-2759.
- Lin, Q., Edward, S., Buckler, V., Spencer, V., and Walker, J.C. (1999). Molecular Evolution of Type 1 Serine/Threonine Protein Phosphatases. *Molecular Phylogenetics and Evolution* *12*, 57-66.
- Lisby, M., Barlow, J.H., Burgess, R.C., and Rothstein, R. (2004). Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* *118*, 699-713.
- Longtine, M.S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *14*, 953-961.

- Lopes, M., Cotta-Ramusino, C., Pelliccioli, A., Liberi, G., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., Newlon, C.S., and Foiani, M. (2001). The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature* *412*, 557-561.
- Lu, X., Nannenga, B., and Donehower, L.A. (2005). PPM1D dephosphorylates Chk1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints. *Genes Dev* *19*, 1162-1174.
- Luo, X., Tang, Z., Rizo, J., and Yu, H. (2002). The Mad2 spindle checkpoint protein undergoes similar major conformational changes upon binding to either Mad1 or Cdc20. *Mol Cell* *9*, 59-71.
- Macek, B., Gnad, F., Soufi, B., Kumar, C., Olsen, J.V., Mijakovic, I., and Mann, M. (2008). Phosphoproteome analysis of *E. coli* reveals evolutionary conservation of bacterial Ser/Thr/Tyr phosphorylation. *Mol Cell Proteomics* *7*, 299-307.
- Macek, B., Mijakovic, I., Olsen, J.V., Gnad, F., Kumar, C., Jensen, P.R., and Mann, M. (2007). The serine/threonine/tyrosine phosphoproteome of the model bacterium *Bacillus subtilis*. *Mol Cell Proteomics* *6*, 697-707.
- MacKelvie, S.H., Andrews, P.D., and Stark, M.J. (1995). The *Saccharomyces cerevisiae* gene SDS22 encodes a potential regulator of the mitotic function of yeast type 1 protein phosphatase. *Mol Cell Biol* *15*, 3777-3785.
- Mager, W.H., and Siderius, M. (2002). Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Res* *2*, 251-257.
- Mah, A.S., Jang, J., and Deshaies, R.J. (2001). Protein kinase Cdc15 activates the Dbf2-Mob1 kinase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 7325-7330.
- Majka, J., and Burgers, P.M. (2003). Yeast Rad17/Mec3/Ddc1: a sliding clamp for the DNA damage checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 2249-2254.
- Majka, J., Niedziela-Majka, A., and Burgers, P.M. (2006). The checkpoint clamp activates Mec1 kinase during initiation of the DNA damage checkpoint. *Mol Cell* *24*, 891-901.
- Makhnevych, T., Ptak, C., Lusk, C.P., Aitchison, J.D., and Wozniak, R.W. (2007). The role of karyopherins in the regulated sumoylation of septins. *J Cell Biol* *177*, 39-49.
- Manning, G. (2005). Genomic overview of protein kinases. *WormBook*, 1-19.
- Marquez, J.A., and Serrano, R. (1996). Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene PMR2/ENA1 during salt stress in yeast. *FEBS Lett* *382*, 89-92.
- Martinez, P., and Persson, B.L. (1998). Identification, cloning and characterization of a derepressible Na<sup>+</sup>-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. . Gen. Genet.* *258*, 628-638.

---

## BIBLIOGRAFÍA

Matheos, D.P., Kingsbury, T.J., Ahsan, U.S., and Cunningham, K.W. (1997). Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* *11*, 3445-3458.

McKinney, J.D., Chang, F., Heintz, N., and Cross, F.R. (1993). Negative regulation of FAR1 at the Start of the yeast cell cycle. *Genes Dev* *7*, 833-843.

McMillan, J.N., Theesfeld, C.L., Harrison, J.C., Bardes, E.S., and Lew, D.J. (2002). Determinants of Swe1p degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* *13*, 3560-3575.

Meiselbach, H., Sticht, H., and Enz, R. (2006). Structural analysis of the protein phosphatase 1 docking motif: molecular description of binding specificities identifies interacting proteins. *Chem Biol* *13*, 49-59.

Meluh, P.B., Yang, P., Glowczewski, L., Koshland, D., and Smith, M.M. (1998). Cse4p is a component of the core centromere of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* *94*, 607-613.

Mendenhall, M.D., and Hodge, A.E. (1998). Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* *62*, 1191-1243.

Mendizabal, I., Rios, G., Mulet, J.M., Serrano, R., and de Larrinoa, I.F. (1998). Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Lett* *425*, 323-328.

Miosga, T., Witzel, A., and Zimmermann, F.K. (1994). Sequence and function analysis of a 9.46 kb fragment of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome X. *Yeast* *10*, 965-973.

Mishra, S., Somanath, P.R., Huang, Z., and Vijayaraghavan, S. (2003). Binding and inactivation of the germ cell-specific protein phosphatase PP1gamma2 by sds22 during epididymal sperm maturation. *Biol Reprod* *69*, 1572-1579.

Mizuta, K., Hashimoto, T., Suzuki, K., and Otaka, E. (1991). Yeast ribosomal proteins: XII. YS11 of *Saccharomyces cerevisiae* is a homologue to *E. coli* S4 according to the gene analysis. *Nucleic Acids Res* *19*, 2603-2608.

Montaner, D., Tarraga, J., Huerta-Cepas, J., Burguet, J., Vaquerizas, J.M., Conde, L., Minguéz, P., Vera, J., Mukherjee, S., Valls, J., Pujana, M.A., Alloza, E., Herrero, J., Al-Shahrour, F., and Dopazo, J. (2006). Next station in microarray data analysis: GEPAS. *Nucleic Acids Res* *34*, W486-491.

Morsomme, P., Slayman, C.W., and Goffeau, A. (2000). Mutagenic study of the structure, function and biogenesis of the yeast plasma membrane H(+)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* *1469*, 133-157.

Murguía, J.R., Belles, J.M., and Serrano, R. (1996). The yeast HAL2 nucleotidase is an in vivo target of salt toxicity. *J Biol Chem* *271*, 29029-29033.

- Murnion, M.E., Adams, R.R., Callister, D.M., Allis, C.D., Earnshaw, W.C., and Swedlow, J.R. (2001). Chromatin-associated protein phosphatase 1 regulates aurora-B and histone H3 phosphorylation. *J Biol Chem* 276, 26656-26665.
- Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 379-393.
- Myers, A.M., Tzagoloff, A., Kinney, D.M., and Lusty, C.J. (1986). Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of lacZ fusions. *Gene* 45, 299-310.
- Nakai, K., and Horton, P. (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* 24, 34-36.
- Nasmyth, K. (1993). Control of the yeast cellcycle by Cdc28 protein kinasa. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 166-179.
- Nasmyth, K., and Dirick, L. (1991). The role of SWI4 and SWI6 in the activity of G1 cyclins in yeast. *Cell* 66, 995-1013.
- Nedea, E., Nalbant, D., Xia, D., Theoharis, N.T., Suter, B., Richardson, C.J., Tatchell, K., Kislinger, T., Greenblatt, J.F., and Nagy, P.L. (2008). The Glc7 phosphatase subunit of the cleavage and polyadenylation factor is essential for transcription termination on snoRNA genes. *Mol Cell* 29, 577-587.
- Nigavekar, S.S., Tan, Y.S., and Cannon, J.F. (2002). Glc8 is a glucose-repressible activator of Glc7 protein phosphatase-1. *Arch Biochem Biophys* 404, 71-79.
- Nowikovsky, K., Froschauer, E.M., Zsurka, G., Samaj, J., Reipert, S., Kolisek, M., Wiesenberger, G., and Schweyen, R.J. (2004). The LETM1/YOL027 gene family encodes a factor of the mitochondrial K<sup>+</sup> homeostasis with a potential role in the Wolf-Hirschhorn syndrome. *J. Biol. Chem.* 279, 30307-30315.
- Nurse, P.M. (2002). Nobel Lecture. Cyclin dependent kinases and cell cycle control. *Biosci Rep* 22, 487-499.
- Ogas, J., Andrews, B.J., and Herskowitz, I. (1991). Transcriptional activation of CLN1, CLN2, and a putative new G1 cyclin (HCS26) by SWI4, a positive regulator of G1-specific transcription. *Cell* 66, 1015-1026.
- Ohkura, H., Kinoshita, N., Miyatani, S., Toda, T., and Yanagida, M. (1989). The fission yeast *dis2+* gene required for chromosome disjoining encodes one of two putative type 1 protein phosphatases. *Cell* 57, 997-1007.
- Ohkura, H., and Yanagida, M. (1991). *S. pombe* gene *sds22+* essential for a midmitotic transition encodes a leucine-rich repeat protein that positively modulates protein phosphatase-1. *Cell* 64, 149-157.

---

## BIBLIOGRAFÍA

Oliva-Trastoy, M., Berthonaud, V., Chevalier, A., Ducrot, C., Marsolier-Kergoat, M.C., Mann, C., and Leteurtre, F. (2007). The Wip1 phosphatase (PPM1D) antagonizes activation of the Chk2 tumour suppressor kinase. *Oncogene* 26, 1449-1458.

Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M. (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127, 635-648.

Ord, M.G., and Stocken, L.A. (1966). Metabolic properties of histones from rat liver and thymus gland. *Biochem J* 98, 888-897.

Ota, I.M., and Varshavsky, A. (1993). A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science* 262, 566-569.

Pedelini, L., Marquina, M., Arino, J., Casamayor, A., Sanz, L., Bollen, M., Sanz, P., and Garcia-Gimeno, M.A. (2007). YPI1 and SDS22 proteins regulate the nuclear localization and function of yeast type 1 phosphatase Glc7. *J Biol Chem* 282, 3282-3292.

Peggie, M.W., MacKelvie, S.H., Bloecher, A., Knatko, E.V., Tatchell, K., and Stark, M.J. (2002). Essential functions of Sds22p in chromosome stability and nuclear localization of PP1. *J Cell Sci* 115, 195-206.

Pereira, G., Hofken, T., Grindlay, J., Manson, C., and Schiebel, E. (2000). The Bub2p spindle checkpoint links nuclear migration with mitotic exit. *Mol Cell* 6, 1-10.

Pereira, G., Manson, C., Grindlay, J., and Schiebel, E. (2002). Regulation of the Bfa1p-Bub2p complex at spindle pole bodies by the cell cycle phosphatase Cdc14p. *J Cell Biol* 157, 367-379.

Persson, B.L., Berhe, A., Fristedt, U., Martinez, P., Pattison, J., Petersson, J., and Weinander, R. (1998). Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1365, 23-30.

Peter, M., Gartner, A., Horecka, J., Ammerer, G., and Herskowitz, I. (1993). *FAR1* links the signal transduction pathway to the cell cycle machinery in yeast. *Cell* 73, 747-760.

Peters, J.M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 644-656.

Pinsky, B.A., Kotwaliwale, C.V., Tatsutani, S.Y., Breed, C.A., and Biggins, S. (2006). Glc7/protein phosphatase 1 regulatory subunits can oppose the Ipl1/aurora protein kinase by redistributing Glc7. *Mol Cell Biol* 26, 2648-2660.

Pinsky, B.A., Nelson, C.R., and Biggins, S. (2009). Protein phosphatase 1 regulates exit from the spindle checkpoint in budding yeast. *Curr Biol* 19, 1182-1187.

Portillo, F. (2000). Regulation of plasma membrane H(+)-ATPase in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* 1469, 31-42.

- Portillo, F., Eraso, P., and Serrano, R. (1991). Analysis of the regulatory domain of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by directed mutagenesis and intragenic suppression. *FEBS Lett* 287, 71-74.
- Pringle, J.R., Adams, A.E., Drubin, D.G., and Haarer, B.K. (1991). *Methods in Enzymology*. (Chap, 40: Immunofluorescence methods for Yeast). *Methods Enzymol.* 194, 565-602.
- Prior, C., Potier, S., Souciet, J.L., and Sychrova, H. (1996). Characterization of the NHA1 gene encoding a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 387.
- Pruyne, D., and Bretscher, A. (2000). Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *J Cell Sci* 113 ( Pt 3), 365-375.
- Queralt, E., Lehane, C., Novak, B., and Uhlmann, F. (2006). Downregulation of PP2A(Cdc55) phosphatase by separase initiates mitotic exit in budding yeast. *Cell* 125, 719-732.
- Renouf, S., Beullens, M., Wera, S., Van Eynde, A., Sikela, J., Stalmans, W., and Bollen, M. (1995). Molecular cloning of a human polypeptide related to yeast sds22, a regulator of protein phosphatase-1. *FEBS Lett* 375, 75-78.
- Reynard, G.J., Reynolds, W., Verma, R., and Deshaies, R.J. (2000). Cks1 is required for G1 cyclin-cyclin dependent kinase activity in budding yeast. *Molecular and Cellular Biology* 20, 5858-5864.
- Reynolds, A., Lundblad, V., Dorris, D., and Keaveney, M. (1997). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons.
- Robbins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A., and Dingwall, C. (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64, 615-623.
- Rouse, J., and Jackson, S.P. (2000). LCD1: an essential gene involved in checkpoint control and regulation of the MEC1 signalling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 19, 5801-5812.
- Rowley, A., Johnston, G.C., Butler, B., Werner-Washburne, M., and Singer, R.A. (1993). Heat shock-mediated cell cycle blockage and G1 cyclin expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 13, 1034-1041.
- Rudner, A.D., and Murray, A.W. (2000). Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *J Cell Biol* 149, 1377-1390.
- 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 Res* 32, 5539-5545.

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Ruiz, A., and Arino, J. (2007). Function and regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ENA sodium ATPase system. *Eukaryot Cell* 6, 2175-2183.
- Ruiz, C., Cid, V.J., Lussier, M., Molina, M., and Nombela, C. (1999). A large-scale sonication assay for cell wall mutant analysis in yeast. *Yeast* 15, 1001-1008.
- Russell, P., Moreno, S., and Reed, S.I. (1989). Conservation of mitotic controls in fission and budding yeasts. *Cell* 57, 295-303.
- Samarao, S.S., Teodoro, C.E., Silva, F.E., Ribeiro, C.C., Granato, T.M., Bernardes, N.R., Retamal, C.A., and Facanha, A.R. (2009). V H<sup>+</sup>-ATPase along the yeast secretory pathway: energization of the ER and Golgi membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 303-313.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sanchez, Y., Bachant, J., Wang, H., Hu, F., Liu, D., Tetzlaff, M., and Elledge, S.J. (1999). Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science* 286, 1166-1171.
- Sanz, P., Alms, G.R., Haystead, T.A., and Carlson, M. (2000). Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Mol Cell Biol* 20, 1321-1328.
- Sassoon, I., Severin, F.F., Andrews, P.D., Taba, M.R., Kaplan, K.B., Ashford, A.J., Stark, M.J., Sorger, P.K., and Hyman, A.A. (1999). Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* kinetochores by the type 1 phosphatase Glc7p. *Genes Dev* 13, 545-555.
- Saunders, W.S. (2002). The FEAR factor. *Mol Cell* 9, 207-209.
- Schneider, B.L., Yang, Q.H., and Futcher, A.B. (1996). Linkage of replication to start by the Cdk inhibitor Sic1. *Science* 272, 560-562.
- Schwob, E., and Nasmyth, K. (1993a). CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 7, 1160-1175.
- Schwob, E., and Nasmyth, K. (1993b). Clb5 y Clb6, a new pair of B-Cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes and Development* 7, 1160-1175.
- Searle, J.S., Schollaert, K.L., Wilkins, B.J., and Sanchez, Y. (2004). The DNA damage checkpoint and PKA pathways converge on APC substrates and Cdc20 to regulate mitotic progression. *Nat Cell Biol* 6, 138-145.
- Serrano, R. (1996). Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int. Rev. Cytol.* 165, 1-52.

- Serrano, R., Montesinos, C., Roldan, M., Garrido, G., Ferguson, C., Leonard, K., Monk, B.C., Perlin, D.S., and Weiler, E.W. (1991). Domains of yeast plasma membrane and ATPase-associated glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* *1062*, 157-164.
- Serrano, R., Portillo, F., Monk, B.C., and Palmgren, M.G. (1992). The regulatory domain of fungal and plant plasma membrane H(+)-ATPase. *Acta Physiol Scand Suppl* *607*, 131-136.
- Shah, J.V., and Cleveland, D.W. (2000). Waiting for anaphase: Mad2 and the spindle assembly checkpoint. *Cell* *103*, 997-1000.
- Shang, C., Hazbun, T.R., Cheeseman, I.M., Aranda, J., Fields, S., Drubin, D.G., and Barnes, G. (2003). Kinetochore protein interactions and their regulation by the Aurora kinase Ipl1p. *Mol Biol Cell* *14*, 3342-3355.
- Shenolikar, S. (1994). Protein serine/threonine phosphatases--new avenues for cell regulation. *Annu Rev Cell Biol* *10*, 55-86.
- Shirayama, M., Matsui, Y., Tanaka, K., and Toh-e, A. (1994a). Isolation of a CDC25 family gene, MSI2/LTE1, as a multicopy suppressor of *ira1*. *Yeast* *10*, 451-461.
- Shirayama, M., Matsui, Y., and Toh, E.A. (1994b). The yeast TEM1 gene, which encodes a GTP-binding protein, is involved in termination of M phase. *Mol Cell Biol* *14*, 7476-7482.
- Shirayama, M., Toth, A., Galova, M., and Nasmyth, K. (1999). APC(Cdc20) promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5. *Nature* *402*, 203-207.
- Shou, W., Seol, J.H., Shevchenko, A., Baskerville, C., Moazed, D., Chen, Z.W., Jang, J., Shevchenko, A., Charbonneau, H., and Deshaies, R.J. (1999). Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell* *97*, 233-244.
- Shulewitz, M.J., Inouye, C.J., and Thorner, J. (1999). Hsl7 localizes to a septin ring and serves as an adapter in a regulatory pathway that relieves tyrosine phosphorylation of Cdc28 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *19*, 7123-7137.
- Sia, R.A., Bardes, E.S., and Lew, D.J. (1998). Control of Swe1p degradation by the morphogenesis checkpoint. *Embo J* *17*, 6678-6688.
- Sia, R.A., Herald, H.A., and Lew, D.J. (1996). Cdc28 tyrosine phosphorylation and the morphogenesis checkpoint in budding yeast. *Mol Biol Cell* *7*, 1657-1666.
- Sironi, L., Melixetian, M., Faretta, M., Prosperini, E., Helin, K., and Musacchio, A. (2001). Mad2 binding to Mad1 and Cdc20, rather than oligomerization, is required for the spindle checkpoint. *Embo J* *20*, 6371-6382.

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Skowyra, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J., and Harper, J.W. (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* *91*, 209-219.
- Smith, A.P., Gimenez-Abian, J.F., and Clarke, D.J. (2002). DNA-damage-independent checkpoints: yeast and higher eukaryotes. *Cell Cycle* *1*, 16-33.
- Smolka, M.B., Albuquerque, C.P., Chen, S.H., Schmidt, K.H., Wei, X.X., Kolodner, R.D., and Zhou, H. (2005). Dynamic changes in protein-protein interaction and protein phosphorylation probed with amine-reactive isotope tag. *Mol Cell Proteomics* *4*, 1358-1369.
- Sobel, S.G. (1997). Mini review: mitosis and the spindle pole body in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Exp Zool* *277*, 120-138.
- Soufi, B., Gnad, F., Jensen, P.R., Petranovic, D., Mann, M., Mijakovic, I., and Macek, B. (2008). The Ser/Thr/Tyr phosphoproteome of *Lactococcus lactis* IL1403 reveals multiply phosphorylated proteins. *Proteomics* *8*, 3486-3493.
- Stark, M.J. (2004). Protein phosphorylation and dephosphorylation. In *The Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces cerevisiae* (Dickinson, J.R. and Schweizer, M. eds.). CRC Press LLC, 284-375.
- Stathopoulos, A.M., and Cyert, M.S. (1997). Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev* *11*, 3432-3444.
- Stone, E.M., Yamano, H., Kinoshita, N., and Yanagida, M. (1993). Mitotic regulation of protein phosphatases by the fission yeast sds22 protein. *Curr Biol* *3*, 13-26.
- Stuart, D., and Wittenberg, C. (1995). CLN3, not positive feedback, determines the timing of CLN2 transcription in cycling cells. *Genes Dev* *9*, 2780-2794.
- Stuart, J.S., Frederick, D.L., Varner, C.M., and Tatchell, K. (1994). The mutant type 1 protein phosphatase encoded by *glc7-1* from *Saccharomyces cerevisiae* fails to interact productively with the GAC1-encoded regulatory subunit. *Mol Cell Biol* *14*, 896-905.
- Suzuki, M.R., Igarashi, R., Sekiya, M., Utsugi, T., Morishita, S., Yukawa, M., and Ohya, Y. (2004). Dynactin is involved in a checkpoint monitor cell wall synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Cell Biol* *6*, 861-871.
- Sweeney, F.D., Yang, F., Chi, A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Durocher, D. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 acts as a Mec1 adaptor to allow Rad53 activation. *Curr Biol* *15*, 1364-1375.
- Sychrova, H. (2004). Yeast as a model organism to study transport and homeostasis of alkali metal cations. *Physiol Res* *53 Suppl 1*, S91-98.

- Tachikawa, H., Bloecher, A., Tatchell, K., and Neiman, A.M. (2001). A Gip1p-Glc7p phosphatase complex regulates septin organization and spore wall formation. *J Cell Biol* 155, 797-808.
- Takahashi, Y., Toh-e, A., and Kikuchi, Y. (2001). A novel factor required for the SUMO1/Smt3 conjugation of yeast septins. *Gene* 275, 223-231.
- Tanaka, T.U., Rachidi, N., Janke, C., Pereira, G., Galova, M., Schiebel, E., Stark, M.J., and Nasmyth, K. (2002). Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. *Cell* 108, 317-329.
- Tang, Y., and Reed, S.I. (1993). The Cdk-associated protein Cks1 functions both in G1 and G2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes and Development* 7, 822-832.
- Tang, Z., Shu, H., Oncel, D., Chen, S., and Yu, H. (2004). Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 provides a catalytic mechanism for APC/C inhibition by the spindle checkpoint. *Mol Cell* 16, 387-397.
- Thornton, B.R., Ng, T.M., Matyskiela, M.E., Carroll, C.W., Morgan, D.O., and Toczyski, D.P. (2006). An architectural map of the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* 20, 449-460.
- Thornton, B.R., and Toczyski, D.P. (2003). Securin and B-cyclin/CDK are the only essential targets of the APC. *Nat Cell Biol* 5, 1090-1094.
- Thornton, B.R., and Toczyski, D.P. (2006). Precise destruction: an emerging picture of the APC. *Genes Dev* 20, 3069-3078.
- Toh, G.W., and Lowndes, N.F. (2003). Role of the *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 protein in sensing and responding to DNA damage. *Biochem Soc Trans* 31, 242-246.
- Torres, J., Di Como, C.J., Herrero, E., and De La Torre-Ruiz, M.A. (2002). Regulation of the cell integrity pathway by rapamycin-sensitive TOR function in budding yeast. *J Biol Chem* 277, 43495-43504.
- 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.
- Trinkle-Mulcahy, L., and Lamond, A.I. (2006). Mitotic phosphatases: no longer silent partners. *Curr Opin Cell Biol* 18, 623-631.
- Tu, J., and Carlson, M. (1995). REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 14, 5939-5946.
- Tu, J., Song, W., and Carlson, M. (1996). Protein phosphatase type 1 interacts with proteins required for meiosis and other cellular processes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16, 4199-4206.

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Tung, H.Y., Wang, W., and Chan, C.S. (1995). Regulation of chromosome segregation by Glc8p, a structural homolog of mammalian inhibitor 2 that functions as both an activator and an inhibitor of yeast protein phosphatase 1. *Mol Cell Biol* 15, 6064-6074.
- Tyers, M., Tokiwa, G., and Futcher, B. (1993). Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. *Embo J* 12, 1955-1968.
- Tyson, J.J., Csikasz-Nagy, A., and Novak, B. (2002). The dynamics of cell cycle regulation. *Bioessays* 24, 1095-1109.
- Tyson, J.J., and Novak, B. (2008). Temporal organization of the cell cycle. *Curr Biol* 18, R759-R768.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S., and Rothberg, J.M. (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 403, 623-627.
- Van Belle, D., and Andre, B. (2001). A genomic view of yeast membrane transporters. *Curr Opin Cell Biol* 13, 389-398.
- van der Rest, M.E., Kamminga, A.H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., and Konings, W.N. (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol Rev* 59, 304-322.
- Vargas, R.C., Garcia-Salcedo, R., Tenreiro, S., Teixeira, M.C., Fernandes, A.R., Ramos, J., and Sa-Correia, I. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance transporter Qdr2 is implicated in potassium uptake, providing a physiological advantage to quinidine-stressed cells. *Eukaryot. Cell* 6, 134-142.
- Venturi, G.M., Bloecher, A., Williams-Hart, T., and Tatchell, K. (2000). Genetic interactions between GLC7, PPZ1 and PPZ2 in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 155, 69-83.
- Vigneron, S., Prieto, S., Bernis, C., Labbe, J.C., Castro, A., and Lorca, T. (2004). Kinetochores localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom? *Mol Biol Cell* 15, 4584-4596.
- 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.
- Visintin, R., and Amon, A. (2001). Regulation of the mitotic exit protein kinases Cdc15 and Dbf2. *Mol Biol Cell* 12, 2961-2974.
- Visintin, R., Craig, K., Hwang, E.S., Prinz, S., Tyers, M., and Amon, A. (1998). The fosfatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell* 2, 709-718.

- Visintin, R., Prinz, S., and Amon, A. (1997). CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science* 278, 460-463.
- Visintin, R., Stegmeier, F., and Amon, A. (2003). The role of the polo kinase Cdc5 in controlling Cdc14 localization. *Mol Biol Cell* 14, 4486-4498.
- Wadskog, I., and Adler, L. (2003). Ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* under NaCl stress. In *Yeast Stress Responses* (Hohmann, S. and Mager W.H. eds.). CRC Press LLC, 201-440.
- Wakula, P., Beullens, M., Ceulemans, H., Stalmans, W., and Bollen, M. (2003). Degeneracy and function of the ubiquitous RVXF motif that mediates binding to protein phosphatase-1. *J Biol Chem* 278, 18817-18823.
- Walsh, D.A., Perkins, J.P., and Krebs, E.G. (1968). An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* 243, 3763-3765.
- Wang, Y., Hu, F., and Elledge, S.J. (2000). The Bfa1/Bub2 GAP complex comprises a universal checkpoint required to prevent mitotic exit. *Curr Biol* 10, 1379-1382.
- Wasch, R., and Cross, F.R. (2002). APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit. *Nature* 418, 556-562.
- Wassmann, K., and Benezra, R. (2001). Mitotic checkpoints: from yeast to cancer. *Curr Opin Genet Dev* 11, 83-90.
- Webster, T.D., and 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, 243-252.
- Weinert, T.A., Kiser, G.L., and Hartwell, L.H. (1994). Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. *Genes Dev* 8, 652-665.
- Wigge, P.A., and Kilmartin, J.V. (2001). The Ndc80p complex from *Saccharomyces cerevisiae* contains conserved centromere components and has a function in chromosome segregation. *J Cell Biol* 152, 349-360.
- Willems, A.R., Lanker, S., Patton, E.E., Craig, K., Nason, T.F., Mathias, N., Kobayashi, R., Wittenberg, C., and Tyers, M. (1996). Cdc53 targets phosphorylated G1 cyclins for degradation by the ubiquitin proteolytic pathway. *Cell* 86, 453-463.
- Williams-Hart, T., Wu, X., and Tatchell, K. (2002). Protein phosphatase type 1 regulates ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 160, 1423-1437.
- Wu, X., Hart, H., Cheng, C., Roach, P.J., and Tatchell, K. (2001). Characterization of Gac1p, a regulatory subunit of protein phosphatase type 1 involved in glucogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics* 265, 622-635.

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Wu, X., and Tatchell, K. (2001). Mutations in yeast protein phosphatase type 1 that affect targeting subunit binding. *Biochemistry* *40*, 7410-7420.
- Xu, S., Huang, H.K., Kaiser, P., Latterich, M., and Hunter, T. (2000). Phosphorylation and spindle pole body localization of the Cdc15p mitotic regulatory protein kinase in budding yeast. *Curr Biol* *10*, 329-332.
- Yamamoto, A., Guacci, V., and Koshland, D. (1996). Pds1p is required for faithful execution of anaphase in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* *133*, 85-97.
- Yamano, H., Ishii, K., and Yanagida, M. (1994). Phosphorylation of dis2 protein phosphatase at the C-terminal cdc2 consensus and its potential role in cell cycle regulation. *Embo J* *13*, 5310-5318.
- Yang, J., Hurley, T.D., and DePaoli-Roach, A.A. (2000). Interaction of inhibitor-2 with the catalytic subunit of type 1 protein phosphatase. Identification of a sequence analogous to the consensus type 1 protein phosphatase-binding motif. *J Biol Chem* *275*, 22635-22644.
- 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.
- Yenush, L., Mulet, J.M., Arino, J., and Serrano, R. (2002). The Ppz protein phosphatases are key regulators of K<sup>+</sup> and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *Embo J* *21*, 920-929.
- Yeong, F.M., Lim, H.H., Padmashree, C.G., and Surana, U. (2000). Exit from mitosis in budding yeast: biphasic inactivation of the Cdc28-Clb2 mitotic kinase and the role of Cdc20. *Mol Cell* *5*, 501-511.
- Yong, W., Bao, S., Chen, H., Li, D., Sanchez, E.R., and Shou, W. (2007). Mice lacking protein phosphatase 5 are defective in ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated cell cycle arrest. *J Biol Chem* *282*, 14690-14694.
- Zachariae, W. (2004). Destruction with a box: substrate recognition by the anaphase-promoting complex. *Mol Cell* *13*, 2-3.
- Zachariae, W., and Nasmyth, K. (1999). Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes and Development* *13*, 2039-2058.
- Zachariae, W., Schwab, M., Nasmyth, K., and Seufert, W. (1998a). Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science* *282*, 1721-1724.
- Zachariae, W., Shevchenko, A., Andrews, P.D., Ciosk, R., Galova, M., Stark, M.J., Mann, M., and Nasmyth, K. (1998b). Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins. *Science* *279*, 1216-1219.

- Zachariae, W., Shin, T.H., Galova, M., Obermaier, B., and Nasmyth, K. (1996). Identification of subunits of the anafase-promoting complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 274, 1201-1204.
- Zhang, J., Zhang, L., Zhao, S., and Lee, E.Y. (1998). Identification and characterization of the human HCG V gene product as a novel inhibitor of protein phosphatase-1. *Biochemistry* 37, 16728-16734.
- Zhang, K., Lin, W., Latham, J.A., Riefler, G.M., Schumacher, J.M., Chan, C., Tatchell, K., Hawke, D.H., Kobayashi, R., and Dent, S.Y. (2005). The Set1 methyltransferase opposes Ipl1 aurora kinase functions in chromosome segregation. *Cell* 122, 723-734.
- Zhao, S., and Lee, E.Y. (1997). A protein phosphatase 1-binding motif identified by the panning of a random peptide display library. *J. Biol. Chem.* 272, 28368-28372.
- Zhou, B.B., and Elledge, S.J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433-439.
- Zhou, Z., and Elledge, S.J. (1993). DUN1 encodes a protein kinase that controls the DNA damage response in yeast. *Cell* 75, 1119-1127.
- Zhu, H., Klemic, J.F., Chang, S., Bertone, P., Casamayor, A., Klemic, K.G., Smith, D., Gerstein, M., Reed, M.A., and Snyder, M. (2000). Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nat Genet* 26, 283-289.
- Zotova, L., and Schweyen, R.J. (2009). Novel players in mitochondrial K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. . *FEBS Journal* 276 (Suppl 1), 174.



## **8. ANEXOS**



## 8. ANEXOS

Tabla 4- Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas

Nombre	Genotipo	Fuente o Referencia
M5	<i>MATa/MATa his4/+ leu2/leu2 trp1/trp1 ura3/ura3</i>	Van Heusden <i>et al.</i> , 1993
MMR18	<i>M5yp1::KanMX4/YPI1</i>	García-Gimeno <i>et al.</i> , 2003
MMR06-1c	<i>MATa his4 leu2 trp1 ura3</i>	
MMR02-1c	<i>MMR06-1c ypi1::KanMX4 (pTS-YPI1)</i>	Este trabajo
MMR05-5a	<i>MMR06-1c ypi1::KanMX4 (pCM-YPI1)</i>	Este trabajo
MMR08-1b	<i>MMR06-1c ypi1::KanMX4 (YEp-YPI1)</i>	Este trabajo
CML476	<i>MATa ura3-52 leuΔ1 his3Δ200 GAL2 CMVp(tetR`-SSN6)::LEU2 trp1::tTA</i>	Yen <i>et al.</i> , 2003
MMR09-4	<i>CML476 tetO<sub>7</sub>:YPI1</i>	Este trabajo
MMR11-2	<i>tetO<sub>7</sub>:YPI1 GLC7-yEmCitrine::SpHis5MX</i>	Este trabajo
MMR23-4	<i>CML476 mad1::nat1</i>	Este trabajo
MMR24-3	<i>CML476 mad2::nat1</i>	Este trabajo
MMR25-7	<i>tetO<sub>7</sub>:Ypi1 mad1::nat1</i>	Este trabajo
MMR26-2	<i>teO<sub>7</sub>:Ypi1 mad2::nat1</i>	Este trabajo
6211	<i>MATa bar1::hisg ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3,112, his3-11,15, ura3, GAL+, psi+, ssd1-d2 PDS1-13Myc:SpHis5</i>	Longtine <i>et al.</i> , 1998
MMR27-10	<i>CML476 PDS1-13Myc:SpHis5</i>	Este trabajo
MMR28-3	<i>tetO<sub>7</sub>:YPI1 PDS1-13Myc:SpHis5</i>	Este trabajo
YAC551	<i>MAT α ura3, leu2,his3, lys2, ade2, trp1swe1::HIS3</i>	Barral <i>et al.</i> , 1999
YAC580	<i>MAT a ura3, leu2,his3, lys2, ade2, trp1swe1::TRP1</i>	Barral <i>et al.</i> , 1999
MMR29-4	<i>CML476 swe1::HIS3</i>	Este trabajo
MMR30-2	<i>tetO<sub>7</sub>:YPI1 swe1::HIS3</i>	Este trabajo
MMR31-1	<i>CML476 rad9::nat1</i>	Este trabajo
MMR32-12	<i>tetO<sub>7</sub>:YPI1 rad9::nat1</i>	Este trabajo
MMR33-3	<i>CML476 swe1::TRP1</i>	Este trabajo
MMR34-6	<i>tetO<sub>7</sub>:YPI1 swe1::TRP1</i>	Este trabajo
MMR35-7	<i>CML476 swe1::HIS3 PDS1-13Myc:SpHis5</i>	Este trabajo
MMR36-1	<i>tetO<sub>7</sub>:YPI1 swe1::HIS3 PDS1-13Myc:SpHis5</i>	Este trabajo
SAY302	<i>W303 sds22::TRP1 leu2,3 112::(YlpSds22-5)</i>	Peggie <i>et al.</i> , 2001
SAY304	<i>W303 sds22::TRP1 leu2,3 112::(YlpSds22-6)</i>	Peggie <i>et al.</i> , 2001
SAY306	<i>W303 sds22::TRP1 leu2,3 112::(YlpLMY)</i>	Peggie <i>et al.</i> , 2001
	<b>* W303 MAT α ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 ssd1-d2</b>	
MMR13-4	<i>SAY302 GLC7-yEmCitrine::SpHis5MX</i>	Este trabajo
MMR19-3	<i>SAY306 mad1::nat1</i>	Este trabajo
MMR20-2	<i>SAY306 mad2::nat1</i>	Este trabajo
MMR21-1	<i>SAY302 mad1::nat1</i>	Este trabajo
MMR22-2	<i>SAY302 mad2::nat1</i>	Este trabajo
DBY746	<i>MATα ura3-52 leu2-3, 112 trp1-Δ239 his3-Δ1</i>	D.Botstein
EDN2	<i>DBY746 ppz1::TRP1</i>	Ruiz <i>et al.</i> , 2003
EDN85	<i>DBY746 ppz1::TRP1 ppz2::KanMX4</i>	Ruiz <i>et al.</i> , 2003
mar-55	<i>DBY746 ppz2 ::TRP1</i>	Ruiz <i>et al.</i> , 2003
ESV210	<i>DBY746 trk1::LEU2</i>	
ESV212	<i>DBY746 trk1::LEU2 trk2::HIS3</i>	Ruiz <i>et al.</i> , 2003
mar-58	<i>DBY746 trk1::LEU2 ppz1::TRP1</i>	
mar-36	<i>DBY746 trk2 ::HIS3 ppz1::TRP1</i>	
mar-37	<i>DBY746 trk1::LEU2 trk2::HIS3 ppz1:: TRP1</i>	Ruiz <i>et al.</i> , 2003
mar-15	<i>DBY746 cnb1::KanMX4</i>	Serrano <i>et al.</i> , 2002
EDN92	<i>DBY746 crz1::KanMX4</i>	Serrano <i>et al.</i> , 2002
mar-18	<i>DBY746 crz1::KanMX4 ppz1::URA3</i>	Ruiz <i>et al.</i> , 2003
mar-19	<i>DBY746 cnb1::KanMX4 ppz1::URA3</i>	Ruiz <i>et al.</i> , 2003
RH16.6	<i>DBY746 ena1-4 ::LEU2</i>	Haro <i>et al.</i> , 1991
RSC1	<i>DBY746 hog ::KanMX4</i>	Serrano <i>et al.</i> , 2002
BY4741	<i>MATa his3-1 leu2 met1-5 ura3</i>	Winzeler <i>et al.</i> , 1999
	<i>BY4741 cdc26::KanMX4</i>	Winzeler <i>et al.</i> , 1999



Tabla 5- Oligonucleótidos usados para la interrupción de genes

Oligonucleótido	Secuencia
5' tetO-Ypi1 (A)	CTTATAACTGCCAGGAGTTGCGAGCTAAGTCTTCAATTAAGTCCAGCTGAAGCTTCGTACGC
5' tetO-Ypi1 (B)	CTGCCAGGAGTTGCGAGCTAAGTCTTCAATTAAGTCTATAAGGCAGCTGAAGCTTCGTACGC
3' tetO-Ypi1	CTGTTGTTGTTCTGATCCCATAGCCATTTGATTTCCACTCATATAGGCCACTAGTGGATCTG
tetO-Ypi1 comp. 5'	AGGTCCGAAATCATCAGCG
K2 3'	TCCTTGACAGTCTTGACGTG
5' ypi1-fw	GAGTGAAATCAAATGGCTATG
3' ypi1-rev	TCAGTCCTTCTTTTCTGCTG
5' HindIII-Ypi1 degrón	CCC <b>AAGCTT</b> TATACCCATACGATGTTCCCTGAC
3' XbaI-Ypi1 degrón	GC <b>TCTAGA</b> GACCAAAGCCTCAGTCCTTC
Glc7-1256-fw	GCAGGGCCCATCAAGTTGTGG
Glc7-1673-rev	CGCGGTTTGTGCACTAAAGGG
MAD1-del-1-For	CCATTTTTCCATCTTAAAATCGAGAGGTAATAGTAAATAATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
MAD1-del-2-Rev	CATATTATAAAACCGATTACTATTATCTATTAGAAATGTATATACACTTAATCGATGAATTCG
MAD2-del-1-For	GTATTGAAAACCACTTCAAAGGGGCCAATAGCACATTTAATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
MAD2-del-2-Rev	GAATTCTATTAATATTTATAGCTGACCTGCGCACCAACTTTATGATCGATGAATTCG
MAD1-For-Comp.	GCAGAGATTGTGTAGGAAG
MAD2-For-Comp.	CAAGAATAGAAATCGCCCCG
3'-NAT	GCACTGGATGGGTCTTCAC
Up-PDS1	CCGTTACCGTATGTACCAG
Do-PDS1	CATCAGCCCGCAGCACATT
Up-PDS1-Comp.	CAGTCGTAGTAGGGCCAACC
For-SWE1	CCATCACAATTTGCGACGCG
Rev-SWE1	GGTATTACTACCGGACTGC
5' SWE1-Comp.1	CCACCTCACAGATGCCAAC
3' HIS3-Comp	GCTTGCCAGAGCATGTATC
TRP1_3 -Comp	GCTTGCCAGAGCATGTATC
Up-Del-RAD9a	CAGGCCAGTTAGTTCAATGAAAAGCTCTCCAGATCGAGTCCGTACGCTGCAGGTCGAC
Dwn-Del-RAD9a	CGAACATTAACCACTCCTGGCGTGTGGGAGGATGTTCTTAATCGATGAATTCGAGCTCG
Up.Comp.RAD9	CAGTTCTGATTAACACGCG

\*Las secuencias subrayadas muestran las regiones homólogas a los respectivos plásmidos utilizados para amplificar los casetes.

\*Las secuencias en negrita y cursiva muestran las dianas de restricción de las enzimas HindIII y XbaI.







**Tabla 6- Oligonucleótidos usados para la obtención y verificación de vectores de expresión**

Oligonucleótido	Secuencia
<i>CDC26-EcoR1.Up</i>	G <b><i>GAATTC</i></b> ATGATCAGAAGGGCCCTAC
<i>CDC26-BamH1.Do</i>	CG <b><i>GGATCC</i></b> TATTCTCGCGGATGTAGAAG
<i>Smal-Up-CDC11</i>	TCC <b><i>CCCGGG</i></b> ATGTCGGGAATAATTGACGC
<i>Sall.Do-CDC11</i>	TGCG <b><i>CAGCTG</i></b> TATTCTTCTGTTGATTTTC
<i>CDC26-HindIII.Up</i>	ACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCC <b><i>AAGCTT</i></b> CACGGAAGGCGGGTGTG
<i>CDC26-EcoR1.Do</i>	CCAGTCACACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT <b><i>GAATTC</i></b> GAAGGCGACTCCATTGC
<i>Glc7-BamHI.Up</i>	CG <b><i>GGATCC</i></b> GATGGTGGTTGTAATACGGTC
<i>Glc7-PstI.Do</i>	AAAA <b><i>CTGCAG</i></b> ACGAGTGATGATTGCATCTTCC
<i>GLC7F256A-for</i>	GTGGAAGATGGTTATGAA <b><i>GCC</i></b> TTTAGTAAAAGACAA
<i>GLC7F256A-Do</i>	CACCTTCTACCAATACTT <b><i>CGG</i></b> AAATCATTCTTGT
<i>GLC7F256A.Comp-Rev 552</i>	CGTCCGACCTTTCTCTCG
<i>GLC7F256A.Comp-Rev 1100</i>	CTGTTGGCCTCATCACCC
prom <i>CDC26-Sall.Up.2</i>	GAATTCGAGCTCGGTACCGGGATCCTCTAGA <b><i>GTCGAC</i></b> AAGGCATTTTAATCTCTGGC
prom <i>CDC26-HindIII.Do</i>	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGC <b><i>GGGATC</i></b> CATCAAGTCCGATGTTATTG
<i>YEp356-1.Up-Comprob.</i>	CGTTGGCCGATTCAATCCCG

\*Las secuencias en negrita y cursiva muestran las dianas de restricción de las respectivas enzimas.

\*Las secuencias en rojo indica el sitio de cambio de codón (fenilalanina a alanina).

**Tabla 7- Oligonucleótidos usados para RT-PCR**

Oligonucleótido	Secuencia
<i>RT-Ypi1-Up</i>	GTCCCGAACGGTGAGTGTGG
<i>RT-Ypi1-Do</i>	GCTGTTTTCGCCTGTATTGAG
<i>RT-CDC26-Up</i>	CCCCTACCACCTTGACGC
<i>RT-CDC26-Do</i>	TATTCTCGCGGATGTAG
<i>RT_CDC11_For</i>	TGG GCC AGT CCG GAT CTG
<i>RT_CDC11_Rev</i>	GGT GGC GAA TGT AGT CGG
<i>RT_ACT1_up2</i>	TGCTGTCTTCCCATCTATCG
<i>RT_ACT1_do2</i>	ATTGAGCTTCATCACCAAC







**Tabla 8- Conjunto de genes que en ausencia de *YPI1* presentan unos niveles de expresión disminuídos respecto de la cepa salvaje.** Los datos de expresión corresponden a las 2, 4 y 6 horas de exposición de la cepa MMR09-4 (*tetO<sub>7</sub>:YPI1*) a 100 µg/ml de doxiciclina. La descripción de cada uno de los genes ha sido obtenida de las bases de datos MIPS (Ruepp *et al.*, 2004) y SGD (Dwight *et al.*, 2002).

ORF	Nombre	2h	4h	6h	Descripción
YFR003C	<i>YPI1</i>	0.05	0.02	0.01	PP1 phosphatase inhibitor
YFR036W	<i>CDC26</i>	0.27	0.23	0.12	Subunit of the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome (APC/C), which is a ubiquitin-protein ligase required for degradation of anaphase inhibitors, including mitotic cyclins, during the metaphase/anaphase transition
YJL188C		0.96	1.04	0.25	Dubious open reading frame, unlikely to encode a protein; not conserved in closely related <i>Saccharomyces</i> species; 88% of ORF overlaps the verified gene <i>RPL39</i> ; diploid mutant displays a weak budding pattern phenotype in a systematic assay
YJL189W	<i>RPL39</i>	1.01	1.02	0.28	ribosomal protein L39 (L46) (YL40)
YOL127W	<i>RPL25</i>	0.94	1.14	0.28	ribosomal protein L25 (rpl6L) (YL25)
YFR032C-A	<i>RPL29</i>	1.00	1.16	0.28	ribosomal protein L29 (YL43)
YFL053W	<i>DAK2</i>	1.09	1.19	0.29	dihydroxyacetone kinase
YHR072W-A	<i>NOP10</i>	0.95	1.10	0.29	H/ACA-box snoRNPs component
YOR182C	<i>RPS30B</i>	0.93	1.14	0.29	ribosomal protein S30B
YHR141C	<i>RPL42B</i>	0.98	1.03	0.30	ribosomal protein L42B (YL27) (L41B) (YP44)
YNL162W	<i>RPL42A</i>	1.07	1.15	0.30	ribosomal protein L42A (YL27) (L41A)
YDL184C	<i>RPL41A</i>	0.98	1.03	0.30	ribosomal protein L41A (YL41) (L47A)
YDR425W	<i>SNX41</i>	0.94	1.21	0.31	sorting nexins Snx4p, Snx41p, and Snx42p mediate distinct retrieval pathways from endosomes.
YLR167W	<i>RPS31</i>	0.97	1.13	0.32	ribosomal protein S31 (S37) (YS24) also encodes a ubiquitin protein
YLR333C	<i>RPS25B</i>	0.88	1.06	0.32	ribosomal protein S25B (S31B) (rp45) (YS23)
YDL081C	<i>RPP1A</i>	0.98	1.16	0.33	acidic ribosomal protein P1A (YP1alpha) (A1)
YHR162W		0.93	1.02	0.33	Hypothetical ORF
YMR194W	<i>RPL36A</i>	0.95	1.07	0.33	ribosomal protein L36A (L39) (YL39)
YDR382W	<i>RPP2B</i>	0.94	1.12	0.33	ribosomal protein P2B (YP2beta) (L45)
YJR085C		1.07	0.96	0.33	Hypothetical ORF
YLR264W	<i>RPS28B</i>	1.03	1.10	0.33	ribosomal protein S28B (S33B) (YS27)
YGR050C		0.94	1.03	0.33	Hypothetical ORF
YHR021C	<i>RPS27B</i>	0.93	1.02	0.33	ribosomal protein S27B (rp61) (YS20)
YLR124W			1.05	0.34	Hypothetical ORF
YLR061W	<i>RPL22A</i>	0.86	0.98	0.34	ribosomal protein L22A (L1c) (rp4) (YL31)
YGR027C	<i>RPS25A</i>	0.92	1.01	0.34	ribosomal protein S25A (S31A) (rp45) (YS23)
YDR500C	<i>RPL37B</i>	0.93	1.13	0.34	ribosomal protein L37B (L43) (YL35)
YGL189C	<i>RPS26A</i>	0.97	1.08	0.34	ribosomal protein S26A
YLR217W			1.04	0.35	Hypothetical ORF
YOR149C	<i>SMP3</i>	1.00	1.08	0.35	alpha 1,2 mannosyltransferase
YOR369C	<i>RPS12</i>	0.99	1.13	0.36	ribosomal protein S12
YDL136W	<i>RPL35B</i>	0.93	1.16	0.36	ribosomal protein L35B
YPL192C	<i>PRM3</i>	0.96	1.11	0.36	Pheromone-regulated protein required for karyogamy; localizes to the inner membrane of the nuclear envelope
YBL087C	<i>RPL23A</i>	1.03	1.11	0.36	ribosomal protein L23A (L17aA) (YL32)
YOL039W	<i>RPP2A</i>	0.96	1.00	0.36	60S acidic ribosomal protein P2A (L44) (A2) (YP2alpha)
YER131W	<i>RPS26B</i>	1.03	0.98	0.36	ribosomal protein S26B
YOR040W	<i>GLO4</i>	1.03	1.01	0.37	glyoxylase-II
YGR011C	<i>ADP1</i>		1.00	0.37	Shows homology to ATP-dependent permeases
YDL075W	<i>RPL31A</i>	0.88	1.10	0.37	ribosomal protein L31A (L34A) (YL28)
YPR044C		0.99	1.06	0.37	Hypothetical ORF
YNL259C	<i>ATX1</i>	1.28	1.13	0.37	copper chaperone
YPR166C	<i>MRP2</i>	1.10	1.08	0.37	14 kDa mitochondrial ribosomal protein similar to <i>E. coli</i> S14 protein
YLR269C		1.05	1.09	0.37	Hypothetical ORF
YLR365W		1.04	1.03	0.37	Hypothetical ORF
YLR311C		1.21	1.14	0.37	Hypothetical ORF
YOR102W		0.92	0.94	0.37	Protein required for cell viability
YOR293W	<i>RPS10A</i>	0.94	1.06	0.38	ribosomal protein S10A
YPR043W	<i>RPL43A</i>	0.88	1.10	0.38	ribosomal protein L43A

## ANEXOS

YER072W	<i>VTC1</i>	0.79	0.83	0.38	S. pombe Nrf1p homolog (97% identical in predicted amino acid sequence)
YCL038C	<i>ATG22</i>	0.96	0.96	0.38	Autophagy gene essential for breakdown of autophagic vesicles in the vacuole
YOR277C		1.07	1.06	0.38	Hypothetical ORF
YML009C	<i>MRPL39</i>		1.06	0.38	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YLR230W			1.07	0.39	Protein required for cell viability
YKR057W	<i>RPS21A</i>	0.84	1.12	0.39	ribosomal protein S21A (S26A) (YS25)
YDL125C	<i>HNT1</i>	0.91	1.04	0.39	Adenosine 5'-monophosphoramidase; interacts physically and genetically with Kin28p, a CDK and TFIILK subunit, and genetically with CAK1; member of the histidine triad (HIT) superfamily of nucleotide-binding proteins and similar to Hint
YOL118C			0.92	0.39	Hypothetical ORF
YLR062C		0.97	1.09	0.39	Dubious open reading frame, unlikely to encode a protein; not conserved in closely related Saccharomyces species; 98% of ORF overlaps the verified gene RPL22A; diploid mutant displays a weak budding pattern phenotype in a systematic assay
YDR450W	<i>RPS18A</i>	1.06	1.08	0.39	ribosomal protein S18A
YNL019C		0.92	1.11	0.39	Hypothetical ORF
YPR196W		1.02	1.11	0.39	nuclear protein (putative)
YGL102C			1.04	0.39	Protein required for cell viability
YGR034W	<i>RPL26B</i>	0.95	1.03	0.39	ribosomal protein L26B (L33B) (YL33)
YLR111W		0.87	1.03	0.39	Hypothetical ORF
YLR390W	<i>ECM19</i>	1.00	1.01	0.39	Non-essential protein of unknown function
YDR447C	<i>RPS17B</i>	0.90	1.13	0.39	ribosomal protein S17B (rp51B)
YGL147C	<i>RPL9A</i>		1.10	0.40	ribosomal protein L9A (L8A) (rp24) (YL11)
YNL067W	<i>RPL9B</i>	0.99	1.08	0.40	ribosomal protein L9B (L8B) (rp24) (YL11)
YLR185W	<i>RPL37A</i>	0.96	1.08	0.40	ribosomal protein L37A (L43) (YL35)
YNL070W	<i>TOM7</i>		1.05	0.40	translocase of the outer mitochondrial membrane
YJL136C	<i>RPS21B</i>	0.92	1.05	0.40	ribosomal protein S21B (S26B) (YS25)
YLR415C		1.05	1.07	0.40	Hypothetical ORF
YGL103W	<i>RPL28</i>	0.88	1.07	0.40	ribosomal protein L28 (L29) (rp44) (YL24)
YOR253W	<i>NAT5</i>	0.98	1.07	0.40	N-acetyltransferase
YBL001C	<i>ECM15</i>	0.93	1.15	0.40	Non-essential protein of unknown function, likely exists as tetramer, may be regulated by the binding of small-molecule ligands (possibly sulfate ions), may have a role in yeast cell-wall biogenesis
YDL191W	<i>RPL35A</i>	0.91	1.13	0.40	ribosomal protein L35A
YDR378C	<i>LSM6</i>	0.92	0.98	0.40	snRNP protein
YFL017W-A	<i>SMX2</i>			0.40	snRNP G protein (human Sm-G homolog)
YML024W	<i>RPS17A</i>	0.94	1.07	0.40	ribosomal protein S17A (rp51A)
YOR276W	<i>CAF20</i>	0.94	1.06	0.40	20 kDa protein functionally analogous to mammalian 4E-BPs functional and limited sequence similarity to EAP1
YBR256C	<i>RIB5</i>	1.06	0.90	0.40	Riboflavin biosynthesis
YJL077C	<i>ICS3</i>			0.40	Protein of unknown function
YJR034W	<i>PET191</i>	1.01	1.05	0.40	Protein required for assembly of cytochrome c oxidase
YDL061C	<i>RPS29B</i>	0.94	0.99	0.41	ribosomal protein S29B (S36B) (YS29)
YJL191W	<i>RPS14B</i>	1.00	1.10	0.41	ribosomal protein S14B (rp59B)
YLR388W	<i>RPS29A</i>	0.96	1.07	0.41	ribosomal protein S29A (S36A) (YS29)
YMR294W-A		0.91	1.15	0.41	Hypothetical ORF
YLR232W		1.14	1.13	0.41	Hypothetical ORF
YMR286W	<i>MRPL33</i>		1.01	0.41	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YLL007C		0.93	1.09	0.41	Hypothetical ORF
YNL244C	<i>SUI1</i>	0.97	1.11	0.41	translation initiation factor eIF1
YOR265W	<i>RBL2</i>			0.41	tubulin folding cofactor A
YDR100W	<i>TVP15</i>	0.93	1.10	0.41	integral membrane protein
YIL027C	<i>KRE27</i>	0.92	1.05	0.41	Killer toxin RESistant
YKL006W	<i>RPL14A</i>	0.94	1.06	0.41	ribosomal protein L14A
YLL014W		0.94	1.13	0.41	Hypothetical ORF
YMR233W		1.00	1.10	0.41	Interacts with Top1p in 2-hybrid assay.
YBL092W	<i>RPL32</i>	0.91	1.08	0.41	ribosomal protein L32
YDR259C	<i>YAP6</i>	1.02	1.08	0.41	bZIP protein
YGR243W	<i>FMP43</i>	0.83	1.07	0.42	The authentic, non-tagged protein was localized to mitochondria
YLR159W			1.05	0.42	Note: YLR156W, YLR159W, and YLR161W are identical.
YBR191W	<i>RPL21A</i>	0.90	1.01	0.42	ribosomal protein L21A
YJL045W		1.06	1.08	0.42	Similar to SDH1

YCR020C-a	<i>MAK31</i>	0.98	0.98	0.42	Like Sm protein; member of the Sm protein family, though slightly divergent because Mak31/Lsm9p does not contain a glycine or cysteine at amino acid 107.
YPL047W	<i>SGF11</i>			0.42	Probable 11kDa subunit of the SAGA histone acetyltransferase complex
YHL015W	<i>RPS20</i>		1.00	0.42	ribosomal protein S20
YCR090C			0.92	0.42	Hypothetical ORF
YDR071C	<i>PAA1</i>	0.97	1.01	0.42	It acetylates polyamines such as putrescine, spermidine and spermine
YGL258W		0.96	1.01	0.42	Increased in velum formation in flor strain
YLR043C	<i>TRX1</i>	1.06	1.09	0.42	thioredoxin EC 1.8.4.8
YNL281W	<i>HCH1</i>	1.07	1.00	0.42	Heat shock protein regulator that binds to Hsp90p and may stimulate ATPase activity; originally identified as a high-copy number suppressor of a HSP90 loss-of-function mutation; GFP-fusion protein localizes to the cytoplasm and nucleus
YML108W		1.02	0.98	0.42	defines a new subfamily of the split beta-alpha-beta sandwiches.
YPL038W	<i>MET31</i>	1.10	1.17	0.42	highly homologous to Met32p transcriptional regulator of sulfur amino acid metabolism zinc finger protein
YMR141C		0.81	1.08	0.42	Hypothetical ORF
YPR102C	<i>RPL11A</i>	1.00	1.15	0.42	ribosomal protein L11A (L16A) (rp39A) (YL22)
YGR209C	<i>TRX2</i>	0.90	1.03	0.42	thioredoxin EC 1.8.4.8
YGR085C	<i>RPL11B</i>		1.03	0.42	ribosomal protein L11B (L16B) (rp39B) (YL22)
YLR408C		0.96	1.04	0.42	Hypothetical ORF
YML129C	<i>COX14</i>	0.97	1.03	0.42	mitochondrial membrane protein
YBR252W	<i>DUT1</i>	0.96	1.06	0.43	dUTP pyrophosphatase
YLR008C	<i>PAM18</i>	1.03	1.01	0.43	DnaJ-like protein, cochaperone
YML101C	<i>CUE4</i>	1.03	1.12	0.43	Protein of unknown function; has a CUE domain that binds ubiquitin, which may facilitate intramolecular monoubiquitination
YGL030W	<i>RPL30</i>	0.99	1.05	0.43	ribosomal protein L30 (L32) (rp73) (YL38) large subunit
YNL178W	<i>RPS3</i>	1.04	1.11	0.43	ribosomal protein S3 (rp13) (YS3)
YLR369W	<i>SSQ1</i>		1.08	0.43	HSP70 family chaperone
YDR471W	<i>RPL27B</i>	0.94	1.18	0.43	ribosomal protein L27B
YMR082C		0.90	1.08	0.43	Hypothetical ORF
YJR058C	<i>APS2</i>	1.06	1.01	0.43	clathrin associated protein complex small subunit
YIL148W	<i>RPL40A</i>	0.96	1.08	0.43	ribosomal protein L40A also encodes a ubiquitin protein
YMR057C		0.94	1.02	0.43	Hypothetical ORF
YJL184W	<i>GON7</i>	0.87	0.96	0.43	Protein of unknown function, proposed to be involved in the transfer of mannosylphosphate groups onto N-linked oligosaccharides; also proposed to be involved in responding to osmotic stress
YMR107W	<i>SPG4</i>	1.01	1.07	0.43	Protein required for survival at high temperature during stationary phase
YOL146W	<i>PSF3</i>	1.00	1.04	0.43	a subunit of the GINS complex required for chromosomal DNA replication
YPR009W	<i>SUT2</i>	0.84	0.92	0.43	Involved in sterol uptake; homologous to SUT1
YDR318W	<i>MCM21</i>	0.99	1.13	0.43	Involved in minichromosome maintenance
YPL234C	<i>TFP3</i>	0.99	1.15	0.43	vacuolar ATPase V0 domain subunit c' (17 kDa) vacuolar H(+) ATPase 17 kDa subunit C
YLR037C	<i>DAN2</i>	0.95	1.10	0.43	putative cell wall protein
YPL080C		0.98	1.05	0.43	Hypothetical ORF
YPL079W	<i>RPL21B</i>	0.92	1.13	0.43	ribosomal protein L21B
YMR121C	<i>RPL15B</i>	1.03	1.02	0.43	ribosomal protein L15B (YL10) (L13B) (rp15R)
YHR053C	<i>CUP1-1</i>			0.43	copper binding metallothionein
YDL189W	<i>RBS1</i>		1.14	0.44	R3H-domain protein
YOL150C		1.16	1.03	0.44	Hypothetical ORF
YMR137C	<i>PSO2</i>	1.00	1.02	0.44	interstrand crosslink repair protein
YDR079C-a	<i>TFB5</i>			0.44	Homolog of the Chlamydomonas reinhardtii REX1-S protein which is involved in DNA repair, also has homologs in other organisms including Arabidopsis, Drosophila, mouse, and human
YER146W	<i>LSM5</i>		1.05	0.44	snRNP protein
YLR029C	<i>RPL15A</i>	1.04	0.99	0.44	ribosomal protein L15A (YL10) (rp15R) (L13A)
YDR541C		0.97	1.12	0.44	Hypothetical ORF
YLR200W	<i>YKE2</i>		0.98	0.44	bovine NABC complex component homolog non-native actin binding complex polypeptide 6 prefoldin complex subunit
YKR036C	<i>CAF4</i>	0.95	1.05	0.44	CCR4 transcriptional complex component

## ANEXOS

YLR234W	<i>TOP3</i>	0.93	1.09	0.44	DNA topoisomerase III
YDL130W	<i>RPP1B</i>	0.84	1.08	0.44	ribosomal protein P1B (L44') (YP1beta) (Ax)
YDR367W		0.94	1.20	0.44	Protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm in a punctate pattern
YIL052C	<i>RPL34B</i>	0.92	1.01	0.44	ribosomal protein L34B
YHR055C	<i>CUP1-2</i>			0.44	copper binding metallothionein
YHL001W	<i>RPL14B</i>	0.93	1.10	0.44	ribosomal protein L14B
YMR007W		0.97	1.10	0.44	Hypothetical ORF
YDR459C		1.06	1.05	0.44	likely functions in pathway(s) outside Ras
YPR132W	<i>RPS23B</i>	1.01	1.12	0.44	ribosomal protein S23B (S28B) (rp37) (YS14)
YMR122C			1.15	0.44	Hypothetical ORF
YBR047W	<i>FMP23</i>	0.90	0.84	0.44	The authentic, non-tagged protein was localized to the mitochondria
YGL135W	<i>RPL1B</i>		1.09	0.44	ribosomal protein L1B
YMR232W	<i>FUS2</i>	0.97	1.13	0.45	Cytoplasmic protein localized to the shmoo tip; required for the alignment of parental nuclei before nuclear fusion during mating
YDR417C		0.93	1.12	0.45	Hypothetical ORF
YPL037C	<i>EGD1</i>	1.03	1.06	0.45	pol II transcribed genes regulator
YJL190C	<i>RPS22A</i>	0.92	1.13	0.45	ribosomal protein S22A (S24A) (rp50) (YS22)
YJL206C-A				0.45	
YBR262C	<i>FMP51</i>	0.98	1.00	0.45	The authentic, non-tagged protein was localized to the mitochondria
YCR031C	<i>RPS14A</i>	0.94	1.18	0.45	ribosomal protein S14A (rp59A)
YDR400W	<i>URH1</i>	1.02	1.02	0.45	uridine nucleosidase (uridine ribohydrolase); EC 3.2.2.3
YLR255C		0.99	1.08	0.45	Hypothetical ORF
YDR357C		0.96	1.09	0.45	Protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm in a punctate pattern
YEL003W	<i>GIM4</i>		0.88	0.45	bovine prefoldin subunit 2 homolog (putative)
YEL027W	<i>CUP5</i>	1.07	1.07	0.45	17 kDa VO sector subunit dicyclohexylcarbodiimide binding subunit proteolipid vacuolar ATP synthase proteolipid C vacuolar ATPase V0 domain subunit c (dicyclohexylcarbodiimide binding subunit) (17 kDa)
YOR377W	<i>ATF1</i>	0.97	1.15	0.45	alcohol acetyltransferase
YLR282C		0.98	1.09	0.45	Hypothetical ORF
YPL018W	<i>CTF19</i>	0.92	1.11	0.45	kinetochore protein
YDL121C		0.96	1.11	0.45	Hypothetical ORF
YKR032W			1.03	0.45	Hypothetical ORF
YOR020C	<i>HSP10</i>	0.99	1.11	0.45	heat shock protein 10
YCL007C			1.00	0.45	Dubious open reading frame that overlaps YCL005W-A (87%); mutations in YCL007C were thought to confer sensitivity to calcofluor white, but this phenotype was later shown to be due to the defect in YCL005W-A
YLR346C		1.05	1.05	0.45	Protein of unknown function; expression regulated by PDR1
YOR122C	<i>PFY1</i>	1.00	1.06	0.45	profilin
YDR056C		1.00	1.01	0.45	Hypothetical ORF
YLL050C	<i>COF1</i>	0.94	1.15	0.46	actin binding and severing protein cofilin
YIL062C	<i>ARC15</i>	1.00	1.04	0.46	Arp complex subunit
YKR019C	<i>IRS4</i>	1.06	1.05	0.46	Protein involved in rDNA silencing, contains a C-terminal Eps15 homology (EH) domain and a DNA polymerase B signature motif; mutation in IRS4 confers an increase in rDNA silencing
YGR118W	<i>RPS23A</i>	1.00	1.06	0.46	ribosomal protein S23A (S28A) (rp37) (YS14)
YLL017W		1.01	1.08	0.46	Ras guanine nucleotide exchange factor (GEF); in the S288C strain, there is a stop codon between YLL017W and YLL016W, the ORFs that comprise SDC25, while in other strains the stop codon is absent and the ORFs are merged into one longer ORF
YGL054C	<i>ERV14</i>		0.99	0.46	14 kDa protein found on ER-derived vesicles
YDR493W	<i>FMP36</i>			0.46	The authentic, non-tagged protein was localized to the mitochondria
YLR158C	<i>ASP3-3</i>	0.89	1.05	0.46	nitrogen catabolite-regulated cell-wall L-asparaginase II
YOR312C	<i>RPL20B</i>	0.90	1.16	0.46	ribosomal protein L20B (L18B)
YPL148C	<i>PPT2</i>			0.46	phosphopantetheine:protein transferase (PPTase)
YDL244W	<i>THI13</i>	1.00	1.01	0.46	Product of gene unknown
YGL031C	<i>RPL24A</i>	0.98	1.00	0.46	ribosomal protein L24A (rp29) (YL21) (L30A)
YJR063W	<i>RPA12</i>	0.92	1.03	0.46	RNA polymerase I A12.2 subunit

YMR112C	<i>MED11</i>	1.09	1.02	0.46	RNA polymerase II holoenzyme/mediator subunit 14 kDa
YGR087W		1.03	1.00	0.46	Hypothetical ORF
YDR286C				0.46	Hypothetical ORF
YDL062W		0.96	1.09	0.46	Hypothetical ORF
YMR123W	<i>PKR1</i>	0.81	1.07	0.46	<i>Pichia farinosa</i> Killer toxin Resistance
YGR102C			1.06	0.46	Hypothetical ORF
YEL051W	<i>VMA8</i>	1.07	1.02	0.46	V1 catalytic sector D subunit vacuolar H-ATPase
YJR054W		0.91	1.02	0.46	Vacuolar protein of unknown function; potential Cdc28p substrate
YOL014W				0.46	Hypothetical ORF
YIR022W	<i>SEC11</i>		0.98	0.46	signal peptidase subunit
YDR434W	<i>GPI17</i>	0.98	1.03	0.46	GPI transamidase component, human PIG-S homologue
YOL040C	<i>RPS15</i>	0.86	1.10	0.46	ribosomal protein S15 (S21) (rp52) (RIG protein)
YBR189W	<i>RPS9B</i>	0.96	1.11	0.46	ribosomal protein S9B (S13) (rp21) (YS11)
YDL076C	<i>RXT3</i>	0.87	1.08	0.46	Hypothetical ORF
YLR066W	<i>SPC3</i>	0.94	1.00	0.46	signal peptidase subunit
YDL230W	<i>PTP1</i>	1.00	1.12	0.46	phosphotyrosine-specific protein phosphatase
YIL016W	<i>SNL1</i>	0.98	0.96	0.46	18.3 kDa integral membrane protein
YLR040C		0.96	1.16	0.46	Hypothetical ORF
YBL026W	<i>LSM2</i>		1.00	0.47	snRNA-associated protein, Sm class
YDR373W	<i>FRQ1</i>	1.05	0.99	0.47	N-myristoylated calcium-binding protein that may have a role in intracellular signaling through its regulation of the phosphatidylinositol 4-kinase Plk1p; member of the recoverin/frequenin branch of the EF-hand superfamily
YLR331C		0.82	1.08	0.47	Dubious open reading frame, unlikely to encode a protein; not conserved in closely related <i>Saccharomyces</i> species; 98% of ORF overlaps the verified gene MID2
YMR278W		0.96	1.02	0.47	Hypothetical ORF
YDL219W	<i>DTD1</i>	1.03	0.96	0.47	D-Tyr-tRNA(Tyr) deacylase
YDR339C		0.93	1.05	0.47	Protein required for cell viability
YHR026W	<i>PPA1</i>		0.95	0.47	proteolipid vacuolar ATPase V0 domain subunit c"
YAL046C			1.00	0.47	Hypothetical ORF
YML001W	<i>YPT7</i>	1.01	1.01	0.47	GTP-binding protein rab family
YPL081W	<i>RPS9A</i>	0.93	1.14	0.47	ribosomal protein S9A (S13) (rp21) (YS11)
YIL043C	<i>CBR1</i>	0.99	1.00	0.47	cytochrome b reductase
YPR060C	<i>ARO7</i>	1.00	1.10	0.47	chorismate mutase
YDR454C	<i>GUK1</i>	0.93	1.04	0.47	guanylate kinase
YIL069C	<i>RPS24B</i>	0.97	1.03	0.47	ribosomal protein S24B
YLL004W	<i>ORC3</i>	0.95	1.05	0.47	origin recognition complex subunit
YBR106W	<i>PHO88</i>	0.95	1.02	0.47	Probable membrane protein, involved in phosphate transport; pho88 pho86 double null mutant exhibits enhanced synthesis of repressible acid phosphatase at high inorganic phosphate concentrations
YLR141W	<i>RRN5</i>	0.96	1.10	0.47	UAF member (upstream activation factor) along with Rrn9p and Rrn10p transcription factor
YLR143W		1.00	1.07	0.47	Hypothetical ORF
YKR041W			1.26	0.47	Hypothetical ORF
YGR082W	<i>TOM20</i>		0.98	0.47	20 kDa mitochondrial outer membrane protein import receptor
YLR327C		1.01	1.08	0.47	Hypothetical ORF
YLR461W	<i>PAU4</i>	0.93	1.10	0.47	member of the seripauperin protein/gene family (see Gene_class PAU)
YLR260W	<i>LCB5</i>	1.01	1.12	0.47	sphingoid long chain base (LCB) kinase
YKL156W	<i>RPS27A</i>	1.00	1.06	0.47	ribosomal protein S27A (rp61) (YS20)
YMR236W	<i>TAF9</i>	1.01	1.13	0.47	TFIID subunit
YCL035C	<i>GRX1</i>		1.05	0.48	glutaredoxin EC 1.20.4.1
YPL218W	<i>SAR1</i>	0.95	1.01	0.48	ARF family GTP-binding protein
YOL139C	<i>CDC33</i>	1.00	1.06	0.48	mRNA cap binding protein eIF-4E
YOR285W		0.91	1.11	0.48	Hypothetical ORF
YCL033C		1.19	0.99	0.48	Hypothetical ORF
YDR414C	<i>ERD1</i>	0.96	1.03	0.48	Predicted membrane protein required for the retention of luminal endoplasmic reticulum proteins; mutants secrete the endogenous ER protein, BiP (Kar2p)
YDR487C	<i>RIB3</i>	0.89	0.94	0.48	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase
YFR023W	<i>PES4</i>	1.12	1.08	0.48	poly(A) binding protein
YLR157C	<i>ASP3-2</i>	0.95	1.06	0.48	nitrogen catabolite-regulated cell-wall L-asparaginase II
YMR264W	<i>CUE1</i>	1.02	1.08	0.48	Ubc7p binding and recruitment protein
YNR037C	<i>RSM19</i>	1.11	0.93	0.48	mitochondrial ribosome small subunit component
YHR139C	<i>SPS100</i>	1.03	1.11	0.48	sporulation-specific cell wall maturation protein

## ANEXOS

YLR252W		0.98	1.10	0.48	Hypothetical ORF
YPL010W	<i>RET3</i>	1.09	1.05	0.48	vesicle coat component
YPL283C	<i>YRF1-7</i>	0.93	1.10	0.48	Y'-helicase protein 1
YDL008W	<i>APC11</i>	1.01	1.07	0.48	anaphase promoting complex (APC) subunit
YNL339C	<i>YRF1-6</i>	0.99	1.11	0.48	Y'-helicase protein 1
YOR095C	<i>RKI1</i>	0.96	1.08	0.48	ribose-5-phosphate ketol-isomerase
YPL098C			1.00	0.48	Hypothetical ORF
YLR154C	<i>RNH203</i>		1.05	0.48	Ribonuclease H2 subunit, required for RNase H2 activity
YGL072C			1.09	0.48	Hypothetical ORF
YGR148C	<i>RPL24B</i>		1.00	0.48	ribosomal protein L24B (rp29) (YL21) (L30B)
YMR251W-a	<i>HOR7</i>	0.94	1.07	0.48	Protein of unknown function; transcription is induced in response to hyperosmotic stress and repressed by alpha factor
YOR100C	<i>CRC1</i>	0.94	1.08	0.48	carnitine transporter
YAL033W	<i>POP5</i>	0.91	0.96	0.48	Nuclear RNase P subunit RNase MRP subunit
YBR109C	<i>CMD1</i>	1.00	0.95	0.48	calmodulin
YLR117C	<i>CLF1</i>	0.97	0.99	0.48	pre-mRNA splicing factor
YNL301C	<i>RPL18B</i>	0.94	1.12	0.48	ribosomal protein L18B (rp28B)
YDR411C	<i>DFM1</i>	1.01	1.01	0.48	Hypothetical ORF
YGR215W	<i>RSM27</i>	0.92	1.06	0.48	mitochondrial ribosome small subunit component
YLR379W		0.92	1.10	0.48	Protein required for cell viability
YMR095C	<i>SNO1</i>	0.81	0.92	0.48	Protein of unconfirmed function, involved in pyridoxine metabolism; expression is induced during stationary phase; forms a putative glutamine amidotransferase complex with Snz1p, with Sno1p serving as the glutaminase
YDR025W	<i>RPS11A</i>	0.91	1.09	0.48	ribosomal protein S11A (S18A) (rp41A) (YS12)
YKL006C-A	<i>SFT1</i>	0.92	1.05	0.48	v-SNARE
YNL157W		1.00	1.02	0.48	Hypothetical ORF
YDR064W	<i>RPS13</i>	0.87	1.15	0.48	ribosomal protein S13 (S27a) (YS15)
YDR418W	<i>RPL12B</i>	0.97	1.13	0.49	ribosomal protein L12B (L15B) (YL23)
YNL010W		1.05	1.11	0.49	Hypothetical ORF
YJR025C	<i>BNA1</i>	1.00	1.03	0.49	3-hydroxyanthranilic acid dioxygenase
YNL251C	<i>NRD1</i>	0.95	1.06	0.49	RNA-binding protein that interacts with the C-terminal domain of the RNA polymerase II large subunit (Rpo21p), required for transcription termination and 3' end maturation of nonpolyadenylated RNAs
YDL083C	<i>RPS16B</i>	0.89	1.11	0.49	ribosomal protein S16B (rp61R)
YJL192C	<i>SOP4</i>	1.00	1.04	0.49	suppressor of pma1-7
YJL022W				0.49	Hypothetical ORF
YLR289W	<i>GUF1</i>		0.99	0.49	GTPase
YMR035W	<i>IMP2</i>		1.04	0.49	protease
YHR029C		0.93	0.88	0.49	Hypothetical ORF
YKL009W	<i>MRT4</i>	0.96	1.01	0.49	mRna turnover 4
YLR155C	<i>ASP3-1</i>	0.96	1.02	0.49	nitrogen catabolite-regulated cell-wall L-asparaginase II
YLR275W	<i>SMD2</i>	0.91	1.08	0.49	U1 snRNP protein of the Sm class
YMR059W	<i>SEN15</i>	1.01	0.98	0.49	tetrameric tRNA splicing endonuclease 15kDa subunit
YGL263W	<i>COS12</i>		1.11	0.49	Protein of unknown function, member of a family of conserved, often subtelomerically-encoded proteins
YDL098C	<i>SNU23</i>	0.79	1.06	0.49	RNA binding zinc finger protein (putative)
YLR065C		0.90	1.06	0.49	Hypothetical ORF
YNL075W	<i>IMP4</i>	0.99	1.05	0.49	U3 snoRNP protein
YPL220W	<i>RPL1A</i>	0.91	1.13	0.49	ribosomal protein L1A, forms part of the 60S ribosomal subunit
YLR160C	<i>ASP3-4</i>	0.98	1.03	0.49	nitrogen catabolite-regulated cell-wall L-asparaginase II
YJR030C		1.00	1.02	0.49	Hypothetical ORF
YGR137W			0.96	0.49	Hypothetical ORF
YOL159C		0.89	0.97	0.49	Hypothetical ORF
YER092W	<i>IES5</i>	1.00	0.95	0.49	Protein that associates with the INO80 chromatin remodeling complex under low-salt conditions
YLR147C	<i>SMD3</i>		1.08	0.49	core snRNP protein
YMR242C	<i>RPL20A</i>	1.07	1.16	0.49	ribosomal protein L20A (L18A)
YJL106W	<i>IME2</i>		1.09	0.49	Serine/threonine protein kinase involved in activation of meiosis, associates with lme1p and mediates its stability, activates Ndt80p; IME2 expression is positively regulated by lme1p
YJR082C	<i>EAF6</i>			0.49	Esa1p-associated factor, subunit of the NuA4 acetyltransferase complex
YLR038C	<i>COX12</i>	1.06	1.11	0.49	cytochrome c oxidase subunit VIb

YDR209C		1.00	1.01	0.49	Hypothetical ORF
YLR053C			0.95	0.49	Hypothetical ORF
YML073C	<i>RPL6A</i>	0.97	1.10	0.49	ribosomal protein L6A (L17A) (rp18) (YL16)
YOR392W		0.93	1.12	0.49	Hypothetical ORF
YGR078C	<i>PAC10</i>		0.96	0.49	bovine NABC complex component homolog non-native actin binding complex polypeptide 3 prefoldin complex subunit
YIR030C	<i>DCG1</i>		0.98	0.49	Protein of unknown function, expression is sensitive to nitrogen catabolite repression and regulated by Dal80p; contains transmembrane domain
YKL142W	<i>MRP8</i>	0.98	1.09	0.49	ribosomal protein
YBR233W-a	<i>DAD3</i>			0.49	Identified by homology. See FEBS Letters [2000] 487:31-36.
YGR035C		0.91	1.06	0.49	Protein of unknown function, potential Cdc28p substrate; transcription is activated by paralogous transcription factors Yrm1p and Yrr1p along with genes involved in multidrug resistance
YDL032W		1.09	0.94	0.49	Hypothetical ORF
YML026C	<i>RPS18B</i>	0.92	1.04	0.49	ribosomal protein S18B
YIL155C	<i>GUT2</i>		1.07	0.50	glycerol-3-phosphate dehydrogenase
YLR229C	<i>CDC42</i>	1.07	1.00	0.50	Rho subfamily of Ras-like proteins
YOR234C	<i>RPL33B</i>	0.88	1.10	0.50	ribosomal protein L33B (L37B) (rp47) (YL37)
YPL090C	<i>RPS6A</i>	1.03	1.04	0.50	ribosomal protein S6A (S10A) (rp9) (YS4)
YDL157C			0.99	0.50	Hypothetical ORF
YLR076C		1.08	1.10	0.50	Protein required for cell viability
YPR170C		1.10	1.06	0.50	Hypothetical ORF
YOL007C		0.97	1.12	0.50	Appears to be a structural component of the chitin synthase 3 complex
YIR037W	<i>HYR1</i>	1.09	0.97	0.50	glutathione-peroxidase (putative)
YNL302C	<i>RPS19B</i>	0.91	1.12	0.50	ribosomal protein S19B (rp55B) (S16aB) (YS16B)
YOL008W		0.97	1.08	0.50	Hypothetical ORF
YBR268W	<i>MRPL37</i>	0.94	1.05	0.50	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YFR005C	<i>SAD1</i>	0.98	1.06	0.50	Conserved zinc-finger domain protein involved in pre-mRNA splicing, required for assembly of U4 snRNA into the U4/U6 particle
YNL150W		1.02	1.00	0.50	Protein required for cell viability
YLR374C		0.93	1.09	0.50	Hypothetical ORF
YOR338W		0.99	1.12	0.50	Hypothetical ORF







**Tabla 9- Conjunto de genes que en ausencia de *YPI1* presentan unos niveles de expresión incrementados respecto de la cepa salvaje.** Los datos de expresión corresponden a las 2, 4 y 6 horas de exposición de la cepa MMR09-4 (*tetO<sub>7</sub>:YPI1*) a 100 µg/ml de doxiciclina. La descripción de cada uno de los genes ha sido obtenida de las bases de datos MIPS (Ruepp *et al.*, 2004) y SGD (Dwight *et al.*, 2002).

ORF	Nombre	2h	4h	6h	Descripción
YOL041C	<i>NOP12</i>	1.20	0.74	5.43	Nucleolar protein, required for pre-25S rRNA processing; contains an RNA recognition motif (RRM) and has similarity to Nop13p, Nsr1p, and putative orthologs in <i>Drosophila</i> and <i>S. pombe</i>
YAR010C		1.29	0.78	4.91	TyA Gag protein; the main structural constituent of virus-like particles (VLPs)
YGL008C	<i>PMA1</i>	1.41	0.97	4.75	plasma membrane H <sup>+</sup> -ATPase
YJR028W		1.18	0.75	4.55	Ty ORF
YHR042W	<i>NCP1</i>	1.12	0.85	4.45	NADP-cytochrome P450 reductase
YFL032W			0.76	4.35	Hypothetical ORF
YMR287C	<i>MSU1</i>	1.16	0.81	4.34	3'-5' exonuclease complex component
YGL234W	<i>ADE5_7</i>	1.36	0.87	4.31	aminoimidazole ribotide synthetase glycinamide ribotide synthetase
YJR026W		1.18	0.78	4.29	TyA Gag protein; the main structural constituent of virus-like particles (VLPs)
YDR234W	<i>LYS4</i>	1.05	0.88	4.28	homoaconitase
YLL013C	<i>PUF3</i>	1.26	0.87	4.26	member of the PUF protein family, which is named for the founding members, PUmilio and Fbf
YNR044W	<i>AGA1</i>	0.95	1.13	4.14	a-agglutinin anchorage subunit
YCR077C	<i>PAT1</i>		0.97	4.14	Necessary for accurate chromosome transmission during cell; involved in mRNA turnover
YMR153W	<i>NUP53</i>	1.21	0.78	4.04	karyopherin docking complex component of the nuclear pore complex nuclear pore complex subunit
YCL020W		1.15	0.72	4.01	TyA Gag protein; the main structural constituent of virus-like particles (VLPs)
YMR046C		1.12	0.82	3.94	TyA Gag protein; the main structural constituent of virus-like particles (VLPs)
YCL057W	<i>PRD1</i>	1.38	0.80	3.92	Zinc metalloendopeptidase, found in the cytoplasm and intermembrane space of mitochondria
YER151C	<i>UBP3</i>	1.33	0.89	3.92	ubiquitin-specific protease
YIL109C	<i>SEC24</i>		0.84	3.86	vesicle coat component
YNL021W	<i>HDA1</i>	1.01	0.91	3.83	histone deacetylase shares sequence similarity with Rpd3p, Hos1p, Hos2p, and Hos3p
YOR329C	<i>SCD5</i>	1.11	0.90	3.78	Multicopy suppressor of clathrin deficiency and of ts mutants of IPL1
YMR068W	<i>AVO2</i>	1.15	0.80	3.74	Component of a complex containing the Tor2p kinase and other proteins, which may have a role in regulation of cell growth
YML045W		1.09	0.80	3.72	TyB Gag-Pol protein; proteolytically processed to make the Gag, RT, PR, and IN proteins that are required for retrotransposition
YOR204W	<i>DED1</i>	1.08	0.87	3.72	ATP-dependent DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)-box RNA helicase, required for translation initiation of all yeast mRNAs
YML040W		1.16	0.82	3.71	TyA Gag protein; the main structural constituent of virus-like particles (VLPs)
YER125W	<i>RSP5</i>	1.25	0.87	3.69	involved in ubiquitin-mediated protein degradation
YNL045W		1.04	0.87	3.68	Similar to human LTA4 hydrolase but in vivo substrates not yet defined.
YOR140W	<i>SFL1</i>	1.05	1.02	3.67	transcription factor
YGL026C	<i>TRP5</i>	1.21	0.80	3.65	tryptophan synthetase
YER091C	<i>MET6</i>		0.78	3.62	vitamin B12-(cobalamin)-independent isozyme of methionine synthase (also called N5-methyltetrahydrofolate homocysteine methyltransferase or 5-methyltetrahydropteroyl triglutamate homocysteine methyltransferase)
YHR218W		1.33	0.79	3.62	Hypothetical ORF
YER088C	<i>DOT6</i>	1.03	1.15	3.61	Protein of unknown function, involved in telomeric gene silencing and filamentation
YER040W	<i>GLN3</i>	1.13	0.82	3.60	transcriptional activator of nitrogen-regulated genes
YNL103W	<i>MET4</i>			3.59	leucine zipper family transcriptional activator

## ANEXOS

YBR113W				3.59	Hypothetical ORF
YEL060C	<i>PRB1</i>	1.25	0.99	3.59	vacuolar protease B
YOR181W	<i>LAS17</i>	0.87	0.98	3.58	actin assembly factor
YOR133W	<i>EFT1</i>	0.99	0.99	3.53	translation elongation factor 2 (EF-2)
YOR172W	<i>YRM1</i>	1.22	0.92	3.51	zinc finger transcription factor
YMR051C		1.12	0.81	3.49	TyA Gag protein; the main structural constituent of virus-like particles (VLPs)
YBR049C	<i>REB1</i>	1.30	0.97	3.44	RNA polymerase I enhancer binding protein
YOR014W	<i>RTS1</i>	1.18	0.95	3.43	protein phosphatase 2A (PP2A) B-type regulatory subunit
YMR211W	<i>DML1</i>	0.97	0.81	3.42	Protein required for cell viability
YIL047C	<i>SYG1</i>	1.36	0.85	3.42	plasma membrane protein
YGL022W	<i>STT3</i>	1.37	0.86	3.42	integral ER membrane protein oligosaccharyltransferase complex subunit (putative)
YDR187C		1.17		3.42	Protein required for cell viability
YPR181C	<i>SEC23</i>	1.08	0.93	3.40	GTPase activating protein (GAP)
YOL020W	<i>TAT2</i>	0.95	0.93	3.37	tryptophan permease, high affinity
YFR053C	<i>HXK1</i>	1.23	1.15	3.36	hexokinase I (PI) (also called hexokinase A)
YPR074C	<i>TKL1</i>	1.10	0.97	3.32	transketolase 1
YHL028W	<i>WSC4</i>	1.27	1.14	3.32	contains novel cysteine motif integral membrane protein (putative) similar to SLG1 (WSC1), WSC2 and WSC3
YDR129C	<i>SAC6</i>		0.84	3.30	actin filament bundling protein fimbrin homolog
YML027W	<i>YOX1</i>		1.12	3.29	homeobox-domain containing protein
YAL021C	<i>CCR4</i>	1.08	0.99	3.29	carbon catabolite repression; transcriptional regulator for some glucose-repressed genes including ADH2
YOR027W	<i>STI1</i>	1.05	0.79	3.24	heat shock protein also induced by canavanine and entry into stationary phase
YDR166C	<i>SEC5</i>			3.23	exocyst complex 107 kDa component
YGR204W	<i>ADE3</i>	1.00	0.88	3.23	C1-tetrahydrofolate synthase
YGL023C	<i>PIB2</i>	1.21	0.86	3.22	Phosphatidylinositol 3-phosphate binding
YDR385W	<i>EFT2</i>	1.01	0.95	3.21	translation elongation factor 2 (EF-2)
YBR169C	<i>SSE2</i>	1.18	0.97	3.20	HSP70 family SSE1 homolog
YER070W	<i>RNR1</i>		0.95	3.16	ribonucleotide reductase, large (R1) subunit
YHR206W	<i>SKN7</i>	1.06	0.79	3.15	Protein with similarity to DNA-binding region of heat shock transcription factors
YAL023C	<i>PMT2</i>	1.16	0.88	3.13	dolichyl phosphate-D-mannose:protein O-D-mannosyltransferase
YGL120C	<i>PRP43</i>	1.16	0.94	3.12	RNA helicase
YBR202W	<i>CDC47</i>	1.16	0.81	3.10	Component of the hexameric MCM complex, which is important for priming origins of DNA replication in G1 and becomes an active ATP-dependent helicase that promotes DNA melting and elongation when activated by Cdc7p-Dbf4p in S-phase
YNL287W	<i>SEC21</i>	1.26	0.86	3.10	PEST sequence-containing protein non-clathrin coat protein
YAL043C	<i>PTA1</i>	1.13	0.96	3.10	cleavage factor II (CF II) component polyadenylation factor I (PF I)
YLR347C	<i>KAP95</i>		0.89	3.10	karyopherin beta (importin 90) homolog (95 kDa)
YAL005C	<i>SSA1</i>		0.89	3.09	heat shock protein of HSP70 family
YML120C	<i>NDI1</i>	1.07	0.92	3.08	NADH dehydrogenase (ubiquinone)
YJL078C	<i>PRY3</i>		0.85	3.07	Protein of unknown function, has similarity to Pry1p and Pry2p and to the plant PR-1 class of pathogen related proteins
YER103W	<i>SSA4</i>	1.29	0.87	3.07	HSP70 family
YCR065W	<i>HCM1</i>	0.99	0.85	3.07	forkhead protein
YEL013W	<i>VAC8</i>	1.19	0.86	3.07	Phosphorylated vacuolar membrane protein that interacts with Atg13p, required for the cytoplasm-to-vacuole targeting (Cvt) pathway; interacts with Nvj1p to form nucleus-vacuole junctions
YGL137W	<i>SEC27</i>	1.13	0.88	3.07	yeast coatmer beta'-subunit
YDL095W	<i>PMT1</i>	1.09	0.94	3.06	dolichyl phosphate-D-mannose:protein O-D-mannosyltransferase
YPL089C	<i>RLM1</i>	1.07	0.95	3.05	serum response factor-like protein that may function downstream of MPK1 (SLT2) MAP-kinase pathway
YMR205C	<i>PFK2</i>	1.00	0.93	3.04	phosphofructokinase beta subunit
YDR264C	<i>AKR1</i>	1.19	0.84	3.04	ankyrin repeat-containing protein
YNR008W	<i>LRO1</i>		0.67	3.03	phospholipid:diacylglycerol acyltransferase E.C. 2.3.1.158
YIL108W			0.91	3.03	Hypothetical ORF
YEL043W			0.96	3.03	Hypothetical ORF
YLR286C	<i>CTS1</i>	0.90	1.01	3.02	endochitinase

YDR172W	<i>SUP35</i>	1.22	0.90	3.00	translation termination factor eRF3
YCR061W		1.13	0.92	2.99	Protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm in a punctate pattern
YGR200C	<i>ELP2</i>	1.23	1.00	2.99	RNA polymerase II Elongator subunit
YHR219W		1.06	0.91	2.98	Hypothetical ORF
YOR195W	<i>SLK19</i>	1.00	0.97	2.95	leucine zipper (putative)
YPL023C	<i>MET12</i>	1.15	0.89	2.95	methylenetetrahydrofolate reductase (mthfr) (putative)
YNL243W	<i>SLA2</i>	1.22	0.92	2.95	transmembrane protein
YGR087C	<i>PDC6</i>	1.13	0.96	2.95	pyruvate decarboxylase isozyme
YDR238C	<i>SEC26</i>	1.17	0.95	2.94	yeast coatomer subunit
YPL190C	<i>NAB3</i>	1.02	0.91	2.93	polyadenylated RNA binding protein polyadenylated single strand DNA-binding protein
YGR264C	<i>MES1</i>	1.22	0.81	2.93	methionine-tRNA ligase
YEL011W	<i>GLC3</i>	1.31	1.05	2.92	1,4-glucan-6-(1,4-glucano)-transferase
YDL126C	<i>CDC48</i>	1.09	0.79	2.92	Microsomal protein of CDC48/PAS1/SEC18 family of ATPases; full length homology to mammalian protein VCP; involved in secretion, peroxisome formation and gene expression
YBR108W		1.30	1.01	2.92	Hypothetical ORF
YHR182W			0.90	2.91	Protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cell periphery and cytoplasm
YOL152W	<i>FRE7</i>	1.19	1.38	2.89	Putative ferric reductase with similarity to Fre2p; expression induced by low copper levels but not by low iron levels
YMR275C	<i>BUL1</i>	1.08	0.84	2.87	BUL1p is putatively involved in specifying ubiquitination substrates by binding ubiquitin ligase RSP5p under specific conditions
YPL032C	<i>SVL3</i>	1.04	1.06	2.86	Protein of unknown function, mutant phenotype suggests a potential role in vacuolar function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cell periphery, cytoplasm, bud, and bud neck
YFL007W	<i>BLM3</i>	1.05	1.02	2.86	involved in protecting the cell against bleomycin damage
YGR054W		1.05	0.95	2.85	yeast homolog of mammalian eIF2A
YAL016W	<i>TPD3</i>		0.92	2.84	protein phosphatase 2A regulatory subunit A
YBR238C		1.15	0.78	2.84	Hypothetical ORF
YHR161C	<i>YAP1801</i>		0.93	2.84	Yeast Assembly Polypeptide, member of AP180 protein family, binds Pan1p and clathrin
YGR162W	<i>TIF4631</i>	1.15	0.93	2.84	150 kDa subunit Tif4632p and mammalian p220 homolog mRNA cap binding protein eIF-4F
YOL130W	<i>ALR1</i>	1.07	0.97	2.83	Plasma membrane Mg(2+) transporter, expression and turnover are regulated by Mg(2+) concentration; overexpression confers increased tolerance to Al(3+) and Ga(3+) ions
YBL051C	<i>PIN4</i>		0.94	2.82	[PSI+] induction
YIL038C	<i>NOT3</i>	1.30	0.82	2.82	CCR4 transcriptional complex component
YDR144C	<i>MKC7</i>	0.99	0.91	2.81	aspartyl protease related to Yap3p
YJL041W	<i>NSP1</i>	1.07	0.99	2.81	nuclear pore complex subunit
YBR212W	<i>NGR1</i>	1.05	0.90	2.80	glucose-repressible RNA binding protein
YPL093W	<i>NOG1</i>		0.87	2.80	homologs identified in human and Trypanosoma brucei nucleolar G-protein (putative)
YBR177C	<i>EHT1</i>	1.09	0.89	2.80	alcohol acyl transferase
YDR505C	<i>PSP1</i>	1.07	0.98	2.80	high-copy suppressor of cdc17 DNA polymerase alpha mutations
YGR240C	<i>PFK1</i>	1.06	1.00	2.80	phosphofructokinase alpha subunit
YHL049C		1.13	0.83	2.79	Hypothetical ORF
YKR013W	<i>PRY2</i>	1.03	1.15	2.79	Protein of unknown function, has similarity to Pry1p and Pry3p and to the plant PR-1 class of pathogen related proteins
YLL026W	<i>HSP104</i>	1.28	0.88	2.79	heat shock protein 104
YMR309C	<i>NIP1</i>	1.11	0.94	2.79	translation initiation factor eIF3 subunit
YNL268W	<i>LYP1</i>	1.03	0.82	2.79	lysine permease
YGR030C	<i>SYP1</i>	1.07	0.88	2.78	Suppressor of Yeast Profilin deletion
YDR422C	<i>SIP1</i>	1.12	0.91	2.78	protein kinase complex component
YDR221W		1.23	0.78	2.78	Hypothetical ORF
YJL083W			0.87	2.78	Hypothetical ORF
YGR265W		1.21	1.02	2.78	Protein required for cell viability
YNR038W	<i>DBP6</i>	0.98	0.87	2.77	RNA helicase (putative)
YLR134W	<i>PDC5</i>	1.07	1.01	2.77	pyruvate decarboxylase

## ANEXOS

YBR073W	<i>RDH54</i>	1.18	0.91	2.76	helicase (putative) similar to RAD54
YDR211W	<i>GCD6</i>	1.26	0.81	2.75	translation initiation factor eIF-2B epsilon subunit
YOR217W	<i>RFC1</i>	1.14	0.96	2.75	replication factor C subunit 1 similar to human RFC 140 kDa subunit
YPL106C	<i>SSE1</i>	1.03	0.82	2.75	HSP70 family SSA1 SSE2 homolog
YMR006C	<i>PLB2</i>	0.95	0.88	2.75	lysophospholipase phospholipase B
YGL238W	<i>CSE1</i>	1.33	0.83	2.74	Nuclear envelope protein that mediates the nuclear export of importin alpha (Srp1p), homolog of metazoan CAS protein, required for accurate chromosome segregation
YHR092C	<i>HXT4</i>		1.03	2.74	high affinity glucose transporter
YGL167C	<i>PMR1</i>	1.10	0.87	2.73	Ca <sup>2+</sup> ATPase
YDR194C	<i>MSS116</i>	1.12	0.93	2.73	RNA helicase DEAD box
YBR263W	<i>SHM1</i>	1.09	1.07	2.73	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial
YHL040C	<i>ARN1</i>	1.31	0.95	2.73	Transporter, member of the ARN family of transporters that specifically recognize siderophore-iron chelates; responsible for uptake of iron bound to ferrirubin, ferrirhodin, and related siderophores
YOR322C		0.92	0.84	2.72	Hypothetical ORF
YCL037C	<i>SRO9</i>	1.03	0.95	2.72	Associates with translating ribosomes; may function in the cytoplasm to modulate mRNA translation; may be involved in organization of actin filaments
YJR147W	<i>HMS2</i>	1.03	0.89	2.71	heat shock transcription factor homolog
YJR059W	<i>PTK2</i>	0.98	1.00	2.71	Putative serine/threonine protein kinase that enhances spermine uptake
YMR265C		1.02	0.78	2.71	Hypothetical ORF
YPR065W	<i>ROX1</i>	0.99	0.98	2.71	HMG-domain site-specific DNA binding protein.
YPL169C	<i>MEX67</i>	0.98	0.93	2.69	a poly(A)+RNA binding protein
YER017C	<i>AFG3</i>		0.94	2.69	ATP dependent metalloprotease
YDL195W	<i>SEC31</i>	0.93	1.07	2.69	COPII coat of secretory pathway vesicles component (p150)
YCR068W	<i>ATG15</i>	1.20	1.00	2.67	Lipase, required for intravacuolar lysis of autophagic bodies; located in the endoplasmic reticulum membrane and targeted to intravacuolar vesicles during autophagy via the multivesicular body (MVB) pathway
YFL067W			0.91	2.66	Hypothetical ORF
YGR199W	<i>PMT6</i>	1.12	1.02	2.65	dolichyl phosphate-D-mannose:protein O-D-mannosyltransferase
YER144C	<i>UBP5</i>	1.19	0.91	2.65	ubiquitin-specific protease (putative)
YBR133C	<i>HSL7</i>	1.09	0.89	2.64	Has homology to arginine methyltransferases
YIL075C	<i>RPN2</i>		0.91	2.63	involved in tRNA processing and degradation of ubiquitinated proteins
YIL143C	<i>SSL2</i>		0.90	2.62	DNA helicase human XPBC, ERCC3 homolog
YGR186W	<i>TFG1</i>	1.31	0.94	2.61	transcription factor TFIIF large subunit
YKR018C			0.79	2.60	Hypothetical ORF
YOR168W	<i>GLN4</i>	1.11	0.90	2.60	glutamine-tRNA ligase
YHR150W	<i>PEX28</i>		0.94	2.60	peroxin
YOL030W	<i>GAS5</i>	0.96	1.06	2.60	Protein of unknown function, localizes to the cell wall
YCL030C	<i>HIS4</i>		0.84	2.60	histidinol dehydrogenase
YOL067C	<i>RTG1</i>	1.34	0.96	2.59	transcription factor
YBR196C	<i>PGI1</i>	1.11	0.97	2.59	glucose-6-phosphate isomerase
YHR205W	<i>SCH9</i>	1.13	0.97	2.59	cAMP-dependent protein kinase homolog suppressor of cdc25ts
YLR094C	<i>GIS3</i>	0.88	0.94	2.59	GIG3 suppressor
YDL023C		1.21	0.87	2.58	Small hydrophobic protein
YPR105C	<i>COG4</i>	1.08	0.90	2.57	Conserved Oligomeric Golgi complex 4 Complexed with Cog8p
YAL034W-A	<i>MTW1</i>	1.05	0.80	2.57	Mis TWelve like (a Schizosaccharomyces pombe kinetochore protein)
YAL053W		1.17	1.00	2.57	Protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm in a punctate pattern
YIL056W			0.91	2.56	Hypothetical ORF
YHL027W	<i>RIM101</i>	1.26	0.86	2.55	Regulator of IME2 (RIM)Rim101p is similar to the Aspergillus Phenotype-response regulator PacC and the Yarrowia proteinase YIRim1010p; transcriptional activator required for entry into meiosis
YDR395W	<i>SXM1</i>	1.04	0.94	2.55	karyopherin beta family member
YBL011W	<i>SCT1</i>	1.16	0.90	2.55	High copy suppressor of choline-transport mutants
YER089C	<i>PTC2</i>		0.89	2.54	protein phosphatase type 2C

YHR086W	<i>NAM8</i>	0.94	0.94	2.54	RNA-binding protein U1 snRNP protein involved in meiosis-specific splicing of the REC107 transcripts in cooperation with the Mer1 protein
YKL157W	<i>APE2</i>	1.12	0.80	2.53	aminopeptidase yscII
YMR105C	<i>PGM2</i>	1.14	1.20	2.53	phosphoglucomutase
YKL103C	<i>LAP4</i>		1.16	2.52	vacuolar aminopeptidase ysc1
YDR324C	<i>UTP4</i>	0.94	0.81	2.52	U3 snoRNP protein
YKL015W	<i>PUT3</i>	1.11	0.91	2.52	zinc finger transcription factor of the Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster domain type
YPR029C	<i>APL4</i>	1.13	0.85	2.51	clathrin associated protein complex large subunit gamma-adaptin
YJR121W	<i>ATP2</i>		0.89	2.51	F(1)F(0)-ATPase complex beta subunit
YMR016C	<i>SOK2</i>	0.95	1.01	2.51	transcription factor (putative)
YDR436W	<i>PPZ2</i>	1.14	0.89	2.51	serine-threonine phosphatase Z
YGR189C	<i>CRH1</i>		0.98	2.50	cell wall protein
YGR083C	<i>GCD2</i>	1.00	0.96	2.49	71 kDa subunit (delta) translation initiation factor eIF2B subunit translational repressor of GCN4 protein
YER049W		1.23	0.95	2.49	Hypothetical ORF
YNL094W	<i>APP1</i>	0.98	0.93	2.49	Protein of unknown function, interacts with Rvs161p and Rvs167p; computational analysis of protein-protein interactions in large-scale studies suggests a possible role in actin filament organization
YJL079C	<i>PRY1</i>	0.88	1.07	2.49	Protein of unknown function, has similarity to Pry2p and Pry3p and to the plant PR-1 class of pathogen related proteins
YHR098C	<i>SFB3</i>	1.16	0.92	2.49	Member of the Sec24p family; forms a complex, with Sec23p, that is involved in sorting of Pma1p into COPII vesicles; peripheral ER membrane protein; potential Cdc28p substrate
YAL041W	<i>CDC24</i>	1.04	0.86	2.48	guanine nucleotide exchange factor (a.k.a. GDP-release factor) for cdc42
YDR398W	<i>UTP5</i>		0.87	2.48	U3 snoRNP protein
YOR165W	<i>SEY1</i>	1.28	0.90	2.48	Synthetic Enhancement with YOP1
YCR088W	<i>ABP1</i>		1.00	2.48	actin binding protein
YDL037C	<i>BSC1</i>	0.94	0.79	2.48	Bypass of Stop Codon transcript encoded by this ORF shows a high level of stop codon bypass
YGR130C		1.12	0.99	2.48	Protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm in a punctate pattern
YFL041W	<i>FET5</i>	1.29	0.93	2.47	multicopper oxidase type 1 integral membrane protein
YLR206W	<i>ENT2</i>	1.25	0.87	2.47	Epsin-like protein required for endocytosis and actin patch assembly and functionally redundant with Ent1p; contains clathrin-binding motif at C-terminus
YGR138C	<i>TPO2</i>		1.36	2.47	Polyamine transport protein
YGR178C	<i>PBP1</i>	1.27	0.90	2.46	Poly(A)-binding protein binding protein
YPR161C	<i>SGV1</i>	1.04	0.87	2.46	CDC28/cdc2 related protein kinase
YFL031W	<i>HAC1</i>		0.83	2.46	bZIP (basic-leucine zipper) protein
YGR089W	<i>NNF2</i>	1.03	0.86	2.46	Protein that exhibits physical and genetic interactions with Rpb8p, which is a subunit of RNA polymerases I, II, and III; computational analysis of large-scale protein-protein interaction data suggests a role in chromosome segregation
YPL075W	<i>GCR1</i>	1.12	0.83	2.45	trans-acting positive regulator of the enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene families
YER123W	<i>YCK3</i>	1.00	0.86	2.45	casein kinase I homolog
YJR117W	<i>STE24</i>		0.98	2.45	zinc metallo-protease
YPL265W	<i>DIP5</i>	0.97	0.79	2.44	dicarboxylic amino acid permease
YNL023C	<i>FAP1</i>	1.04	0.83	2.44	transcription factor homolog; similarity to Drosophila melanogaster shuttle craft protein; similarity to human NFX1 protein; similarity to human DNA-binding protein tenascin
YOR171C	<i>LCB4</i>	1.21	1.00	2.44	sphingoid long chain base (LCB) kinase
YER069W	<i>ARG5_6</i>		0.74	2.43	acetylglutamate kinase N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase
YHR149C	<i>SKG6</i>		0.91	2.43	Protein of unknown function found in the bud tip and bud neck, potential Cdc28p substrate
YHR108W	<i>GGA2</i>		0.95	2.43	ARF-binding protein
YGL071W	<i>RCS1</i>	1.09	0.92	2.43	binds the consensus site PyPuCACCCPu

## ANEXOS

YGR261C	<i>APL6</i>	1.27	0.80	2.41	clathrin assembly complex beta adaptin component (putative)
YCL025C	<i>AGP1</i>	1.14	0.89	2.41	amino acid permease
YER158C		0.97	1.07	2.41	Protein of unknown function, has similarity to Afr1p; potentially phosphorylated by Cdc28p
YOL076W	<i>MDM20</i>	1.08	0.90	2.41	Subunit of the NatB N-terminal acetyltransferase, which catalyzes acetylation of the amino-terminal methionine residues of all proteins beginning with Met-Asp or Met-Glu and of some proteins beginning with Met-Asn or Met-Met
YDR456W	<i>NHX1</i>		0.92	2.40	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger
YIL046W	<i>MET30</i>	1.18	0.98	2.40	F-box protein
YLR129W	<i>DIP2</i>	1.02	1.11	2.40	U3 snoRNP protein
YDR228C	<i>PCF11</i>		0.89	2.40	cleavage and polyadenylation factor CF I component involved in pre-mRNA 3'-end processing
YIL036W	<i>CST6</i>	1.07	0.89	2.39	basic leucine zipper (bZIP) transcription factor
YFL037W	<i>TUB2</i>		1.04	2.39	beta-tubulin
YHR143W	<i>DSE2</i>	0.88	1.12	2.39	Daughter cell-specific secreted protein with similarity to glucanases, degrades cell wall from the daughter side causing daughter to separate from mother; expression is repressed by cAMP
YNL278W	<i>CAF120</i>	1.14	1.21	2.39	CCR4 Associated Factor 120 kDa
YOR275C	<i>RIM20</i>	1.19	0.88	2.39	Unknown function
YJL212C	<i>OPT1</i>		0.84	2.39	peptide transporter glutathione transporter
YBL045C	<i>COR1</i>		0.99	2.38	coenzyme QH2 cytochrome c reductase 44 kDa core protein subunit
YBR074W			0.92	2.38	Hypothetical ORF
YFR009W	<i>GCN20</i>	1.20	0.94	2.37	ATP-binding cassette (ABC) family
YNL061W	<i>NOP2</i>		0.88	2.37	90 kDa protein homologous to a human proliferation-associated nucleolar protein, p120
YDR432W	<i>NPL3</i>	0.98	0.96	2.37	contains RNA recognition motif nuclear shuttling protein
YFR017C		0.96	0.85	2.37	Hypothetical ORF
YJL159W	<i>HSP150</i>		1.01	2.36	heat shock protein secretory glycoprotein
YLL018C	<i>DPS1</i>	1.04	0.93	2.36	aspartyl-tRNA synthetase
YKL035W	<i>UGP1</i>	1.18	1.10	2.35	uridinephosphoglucose pyrophosphorylase
YEL046C	<i>GLY1</i>	0.97	0.96	2.35	threonine aldolase
YGL056C	<i>SDS23</i>		0.91	2.35	homolog of pombe SDS23; localizes to spindle pole body
YFR037C	<i>RSC8</i>		0.92	2.35	8th largest subunit of RSC. Rsc8p mediates multiple RSC complex interactions, undergoes dimerization via the C-term coiled-coil segment, associates with SWI2/SNF2 ATPase Sth1p, forms a complex with RSC6p.
YOR335C	<i>ALA1</i>	1.11	0.92	2.35	Cytoplasmic alanyl-tRNA synthetase, required for protein synthesis; point mutation ( <i>cdc64-1</i> allele) causes cell cycle arrest at G1; lethality of null mutation is functionally complemented by human homolog
YBR038W	<i>CHS2</i>	1.28	0.93	2.35	chitin synthase 2
YCL040W	<i>GLK1</i>	1.14	1.05	2.35	glucokinase
YJL014W	<i>CCT3</i>	1.06	0.86	2.34	gamma chaperonin subunit
YBR222C	<i>PCS60</i>	1.13	0.94	2.34	Probable AMP-binding protein
YBR086C	<i>IST2</i>	1.08	1.02	2.34	Plasma membrane protein that may be involved in osmotolerance, localizes to the mother cell in small-budded cells and to the bud in medium- and large-budded cells; mRNA is transported to the bud tip by an actomyosin-driven process
YNL190W		1.08	1.04	2.34	Hypothetical ORF
YNL121C	<i>TOM70</i>	1.14	0.87	2.33	70 kDa mitochondrial specialized import receptor of the outer membrane
YDL148C	<i>NOP14</i>	1.05	0.97	2.33	U3 snoRNP protein
YKR093W	<i>PTR2</i>		0.97	2.33	peptide transporter
YDL070W	<i>BDF2</i>	1.13	0.96	2.33	BDF1 homolog bromodomain protein
YMR054W	<i>STV1</i>	1.13	0.96	2.32	110 kDa subunit; not in vacuole membrane vacuolar H-ATPase
YFR021W	<i>ATG18</i>	1.02	0.96	2.32	Required for cytoplasm to vacuole targeting of proaminopeptidase I and starvation induced autophagy (AUT10). Needed for pre-Meiotic Replication (NMR1).
YKL088W			0.98	2.32	Protein required for cell viability
YMR120C	<i>ADE17</i>	1.36	1.06	2.32	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) transformylase/IMP cyclohydrolase
YOR370C	<i>MRS6</i>	1.09	0.89	2.31	rab geranylgeranyltransferase regulatory subunit
YNL039W	<i>BDP1</i>		0.97	2.31	TFIIB 90 kDa subunit

YJL141C	<i>YAK1</i>		0.91	2.30	Serine-threonine protein kinase
YHL047C	<i>ARN2</i>	1.23	0.99	2.30	triacylglycerol C transporter
YLR212C	<i>TUB4</i>		1.00	2.30	gamma tubulin
YHR197W	<i>RIX1</i>	1.05	0.89	2.30	Ribosome export
YNL212W	<i>VID27</i>	1.31	0.95	2.30	Vacuole import and degradation
YDR251W	<i>PAM1</i>	1.20	0.95	2.30	multicopy suppressor of protein phosphatase 2A
YDR143C	<i>SAN1</i>	0.98	1.11	2.30	Protein of unknown function; san1 mutations suppress sir4 and cdc68 mutations, suggesting a potential role in chromatin silencing
YOR233W	<i>KIN4</i>	1.03	0.88	2.30	protein kinase
YDR006C	<i>SOK1</i>	0.93	1.03	2.30	gene dosage suppressors of the conditional growth defect of several temperature-sensitive A kinase mutants
YGL021W	<i>ALK1</i>	1.27	0.87	2.29	haspin
YGL230C		1.01	0.90	2.29	Hypothetical ORF
YPL084W	<i>BRO1</i>	1.14	0.79	2.29	BCK1-like resistance to osmotic shock
YGR124W	<i>ASN2</i>	1.02	0.89	2.29	asparagine synthetase
YPL058C	<i>PDR12</i>	1.21	1.48	2.29	multidrug resistance transporter
YBR289W	<i>SNF5</i>		0.97	2.29	chromatin remodeling Snf/Swi complex subunit
YOR108W	<i>LEU9</i>	1.06	0.88	2.29	alpha-isopropylmalate synthase (2-isopropylmalate synthase)
YHL050C		1.17	0.85	2.28	Protein of unknown function, potential Cdc28p substrate
YJR027W		1.04	0.91	2.28	TyB Gag-Pol protein; proteolytically processed to make the Gag, RT, PR, and IN proteins that are required for retrotransposition
YDR266C		1.01	1.08	2.27	Hypothetical ORF
YDR303C	<i>RSC3</i>	1.00	0.98	2.26	Zinc cluster protein
YHR020W		1.23	0.95	2.25	Protein required for cell viability
YBR132C	<i>AGP2</i>	1.04	0.86	2.25	plasma membrane carnitine transporter
YOR254C	<i>SEC63</i>	1.18	0.84	2.25	Protein involved in protein import into ER
YCL054W	<i>SPB1</i>	1.20	0.93	2.25	methyltransferase (putative)
YBR260C	<i>RGD1</i>	1.02	0.97	2.24	GTPase activating protein (GAP) (putative)
YLR044C	<i>PDC1</i>	1.03	1.05	2.24	pyruvate decarboxylase
YLR120C	<i>YPS1</i>	1.14	0.97	2.24	GPI-anchored aspartic protease
YPL256C	<i>CLN2</i>	1.06	1.04	2.23	G1 cyclin
YGL009C	<i>LEU1</i>	1.29	0.85	2.23	isopropylmalate isomerase
YNL223W	<i>ATG4</i>	1.08	0.92	2.23	anchor protein mediates attachment of autophagosomes to microtubules
YGL245W	<i>GUS1</i>		0.93	2.23	Glutamyl-tRNA synthetase (GluRS), forms a complex with methionyl-tRNA synthetase (Met1p) and Arc1p; complex formation increases the catalytic efficiency of both tRNA synthetases and ensures their correct localization to the cytoplasm
YPR034W	<i>ARP7</i>	1.13	0.95	2.23	actin related protein chromatin remodeling Snf/Swi complex subunit
YKL032C	<i>IXR1</i>	1.04	1.05	2.23	intrastrand crosslink recognition protein
YKL043W	<i>PHD1</i>	0.96	1.00	2.22	transcription factor (putative)
YKL039W	<i>PTM1</i>	1.17	0.89	2.22	membrane protein (putative)
YML127W	<i>RSC9</i>	1.14	1.00	2.22	Remodels the Structure of Chromatin
YBR281C			0.88	2.22	Hypothetical ORF
YAL004W		1.06	0.84	2.22	Hypothetical ORF
YPL221W	<i>BOP1</i>	1.10	0.92	2.21	Protein of unknown function, overproduction suppresses a pam1 slv3 double null mutation
YHR064C	<i>SSZ1</i>	1.02	0.94	2.21	HSP70 family
YBR240C	<i>THI2</i>		1.03	2.21	Transcriptional activator of thiamine biosynthetic genes
YOR256C		1.06	0.92	2.21	Protein required for cell viability
YOR361C	<i>PRT1</i>	0.99	0.91	2.21	translation initiation factor eIF3 subunit
YML057W	<i>CMP2</i>	1.04	0.90	2.21	calcineurin subunit A
YLR005W	<i>SSL1</i>	0.99	1.02	2.20	RNA polymerase transcription factor TFIIH component
YML100W	<i>TSL1</i>	1.05	1.11	2.20	similar to TPS3 gene product trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex 123 kDa regulatory subunit
YHR019C	<i>DED81</i>	1.10	0.93	2.20	asparaginyl-tRNA synthetase
YJL062W	<i>LAS21</i>	0.98	0.90	2.20	major facilitator superfamily (putative) membrane protein (putative)
YKL054C	<i>DEF1</i>		0.95	2.20	Rad26-interacting protein
YNL209W	<i>SSB2</i>	1.03	0.97	2.19	SSB1 homolog heat shock protein of HSP70 family
YMR250W	<i>GAD1</i>	1.20	1.07	2.19	glutamate decarboxylase
YHR188C	<i>GPI16</i>	1.34	0.90	2.19	GPI transamidase component, human PIG-T homologue
YBL099W	<i>ATP1</i>		0.99	2.18	F1F0-ATPase alpha subunit

## ANEXOS

YDR089W		1.07	1.01	2.18	Hypothetical ORF
YGR041W	<i>BUD9</i>		0.88	2.18	Protein involved in bud-site selection; diploid mutants display a unipolar budding pattern instead of the wild-type bipolar pattern, and bud at the distal pole
YKR042W	<i>UTH1</i>	0.88	0.95	2.18	Youth, involved in determining yeast longevity
YIL005W	<i>EPS1</i>	1.07	0.97	2.18	Pdi1p (protein disulfide isomerase)-related protein involved in endoplasmic reticulum retention of resident ER proteins
YML126C	<i>ERG13</i>	0.98	0.99	2.18	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase
YNL059C	<i>ARP5</i>	1.09	1.03	2.18	actin related protein
YJR016C	<i>ILV3</i>	1.01	0.86	2.18	dihydroxyacid dehydratase
YPL126W	<i>NAN1</i>	1.09	0.94	2.18	U3 snoRNP protein
YMR307W	<i>GAS1</i>	1.07	1.00	2.18	cell surface glycoprotein 115-120 kDa
YOR123C	<i>LEO1</i>	1.09	1.01	2.18	member of the RNA polymerase II-associated Paf1 complex
YDR341C		1.06	0.89	2.17	Cytoplasmic arginyl-tRNA synthetase
YGL066W	<i>SGF73</i>	0.93	0.89	2.17	Probable 73KkDa Subunit of SAGA histone acetyltransferase complex
YNL085W	<i>MKT1</i>	1.15	0.95	2.17	retroviral protease signature protein
YNL104C	<i>LEU4</i>	0.94	0.86	2.17	alpha-isopropylmalate synthase (2-isopropylmalate synthase)
YDL040C	<i>NAT1</i>	1.05	0.85	2.16	N-terminal acetyltransferase
YNL091W	<i>NST1</i>	0.91	1.00	2.16	Protein of unknown function, mediates sensitivity to salt stress; interacts physically with the splicing factor Msl1p and also displays genetic interaction with MSL1
YIL015W	<i>BAR1</i>	1.08	0.92	2.16	protease synthesized in a-cells; cleaves and inactivates alpha factor
YDR258C	<i>HSP78</i>	1.07	0.80	2.15	heat shock protein 78
YHR072W	<i>ERG7</i>	1.06	0.88	2.15	2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase
YFR034C	<i>PHO4</i>	1.09	0.91	2.15	myc-family transcription factor
YGL035C	<i>MIG1</i>	0.90	0.83	2.14	C2H2 zinc finger protein that resembles the mammalian Egr and Wilms tumour proteins
YIL153W	<i>RRD1</i>		0.91	2.14	Resistant to Rapamycin Deletion
YCL061C	<i>MRC1</i>	1.08	0.89	2.13	Mediator of the Replication Checkpoint; required for full activation of Rad53p in response to replication stress.
YFL004W	<i>VTC2</i>	1.20	0.89	2.13	polyphosphate synthetase (putative)
YPL240C	<i>HSP82</i>	1.02	0.89	2.13	heat shock protein 90 mammalian Hsp90 homolog
YOR025W	<i>HST3</i>	1.16	0.93	2.13	Homolog of SIR2
YFL022C	<i>FRS2</i>	0.94	0.96	2.11	phenylalanine-tRNA ligase subunit
YGR157W	<i>CHO2</i>	1.24	0.90	2.11	phosphatidyl-ethanolamine N-methyltransferase
YDR283C	<i>GCN2</i>	0.93	1.09	2.11	eukaryotic initiation factor 2 alpha (eIF2-alpha) kinase
YPL105C		0.95	0.96	2.10	Hypothetical ORF
YAL061W			1.02	2.10	putative polyol dehydrogenase
YJL176C	<i>SWI3</i>		1.00	2.10	transcription factor
YLR259C	<i>HSP60</i>	1.01	0.88	2.10	chaperonin groEL homolog
YKL163W	<i>PIR3</i>	1.18	1.00	2.10	Protein containing tandem internal repeats
YNL233W	<i>BNI4</i>	1.04	0.95	2.10	required to link Chs3p and Chs4p to the septins
YOL059W	<i>GPD2</i>	0.91	0.93	2.09	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD+)
YNL289W	<i>PCL1</i>	1.11	1.00	2.09	G1 cyclin associates with PHO85
YMR199W	<i>CLN1</i>	1.06	1.01	2.09	G1 cyclin
YDL182W	<i>LYS20</i>	1.07	0.86	2.09	YDL131W (LYS21) homolog homocitrate synthase
YLL024C	<i>SSA2</i>	1.06	0.94	2.08	HSP70 family
YBR162C	<i>TOS1</i>	0.99	0.95	2.08	Target of SBF
YLR196W	<i>PWP1</i>	0.94	0.97	2.08	periodic tryptophan protein Protein with periodic tryptophan residues that resembles members of beta-transducin superfamily because of presence of WD-40 repeats
YHR028C	<i>DAP2</i>	1.21	0.94	2.08	dipeptidyl aminopeptidase B (DPAP B)
YMR291W		0.97	1.11	2.08	Hypothetical ORF
YBR227C	<i>MCX1</i>	1.29	0.76	2.07	ATP-binding protein similar to ClpX
YBL024W	<i>NCL1</i>	1.19	0.94	2.07	tRNA:m5C-methyltransferase
YDR507C	<i>GIN4</i>	0.98	1.06	2.07	serine/threonine kinase (putative)
YOL115W	<i>TRF4</i>	0.94	1.00	2.07	DNA polymerase sigma
YKR072C	<i>SIS2</i>		0.91	2.07	Involved in cell cycle control and ion homeostasis
YMR015C	<i>ERG5</i>		0.99	2.07	cytochrome P450 involved in C-22 denaturation of the ergosterol side-chain
YEL040W	<i>UTR2</i>		0.98	2.06	(alias: Congo Red Hypersensitivity)
YMR305C	<i>SCW10</i>	0.89	1.05	2.06	soluble cell wall protein
YDR293C	<i>SSD1</i>	1.01	1.04	2.06	Product of gene unknown
YHR016C	<i>YSC84</i>	1.13	0.95	2.06	SH3 domain in C-terminus

YMR304W	<i>UBP15</i>	1.16	0.94	2.05	deubiquitinating enzyme (putative)
YAL038W	<i>CDC19</i>	0.97	0.97	2.05	pyruvate kinase
YER036C	<i>ARB1</i>		1.05	2.05	Hypothetical ORF
YDR081C	<i>PDC2</i>	1.08	0.93	2.05	asparagine and serine-rich protein
YER154W	<i>OXA1</i>	0.96	1.05	2.05	Mediates the export of proteins from the mitochondrial matrix to the intermembrane space.
YCL008C	<i>STP22</i>	0.92	1.03	2.05	putative ubiquitin receptor
YPR175W	<i>DPB2</i>	1.18	0.90	2.04	DNA polymerase epsilon subunit B
YLR089C	<i>ALT1</i>	0.89	0.90	2.04	putative alanine transaminase (glutamyl pyruvic transaminase)
YPR190C	<i>RPC82</i>	1.02	0.94	2.04	82 kDa subunit of RNA polymerase III (C)
YLR028C	<i>ADE16</i>	1.07	0.95	2.04	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) transformylase/IMP cyclohydrolase
YFR051C	<i>RET2</i>	0.94	1.02	2.04	coatamer (COPI) complex delta subunit
YML035C	<i>AMD1</i>	0.95	0.80	2.03	AMP deaminase
YOR092W	<i>ECM3</i>	0.93	0.93	2.03	Non-essential protein of unknown function
YJR065C	<i>ARP3</i>	1.08	1.00	2.03	actin-related gene
YMR135C	<i>GID8</i>	1.08	1.00	2.03	Protein of unknown function, involved in proteasome-dependent catabolite inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase; contains LisH and CTLH domains, like Vid30p
YDR485C	<i>VPS72</i>	0.97	1.05	2.03	Protein of unknown function, component of the Swr1p complex that incorporates Htz1p into chromatin; required for vacuolar protein sorting
YGL110C	<i>CUE3</i>	0.95	0.92	2.02	Protein of unknown function; has a CUE domain that binds ubiquitin, which may facilitate intramolecular monoubiquitination
YKR089C	<i>STC1</i>	1.11	0.97	2.02	Protein of unknown function found in lipid particles; potential Cdc28p substrate
YKL073W	<i>LHS1</i>	1.16	0.92	2.02	Hsp70 family
YLR309C	<i>IMH1</i>		0.94	2.02	Protein involved in vesicular transport, mediates transport between an endosomal compartment and the Golgi, contains a Golgi-localization (GRIP) domain that interacts with activated Arl1p-GTP to localize Imh1p to the Golgi
YOR270C	<i>VPH1</i>	1.08	0.92	2.01	V0 sector subunit essential for vacuolar acidification and vacuolar H-ATPase activity vacuolar ATPase V0 domain subunit a (100 kDa) vacuolar H-ATPase
YGL122C	<i>NAB2</i>	0.96	0.87	2.01	polyadenylated RNA binding protein
YJR091C	<i>JSN1</i>	0.81	1.02	2.01	Member of the Puf family of RNA-binding proteins, interacts with mRNAs encoding membrane-associated proteins; overexpression suppresses a tub2-150 mutation and causes increased sensitivity to benomyl in wild-type cells
YBR275C	<i>RIF1</i>	0.88	1.03	2.01	RAP1-interacting factor
YDR342C	<i>HXT7</i>	0.98	1.04	2.01	hexose transporter
YNL016W	<i>PUB1</i>	0.93	0.96	2.01	poly(A) binding protein
YAR042W	<i>SWH1</i>		1.02	2.01	Similar to mammalian oxysterol-binding protein
YHR117W	<i>TOM71</i>		0.99	2.00	protein translocase 71 kDa component of the outer membrane of mitochondria
YKL005C	<i>BYE1</i>		0.99	2.00	Negative regulator of transcription elongation
YLL034C	<i>RIX7</i>		0.84	2.00	Putative ATPase of the AAA family, required for export of pre-ribosomal large subunits from the nucleus; distributed between the nucleolus, nucleoplasm, and nuclear periphery depending on growth conditions
YER064C			0.94	2.00	mutation leads to reduction of ERG9, CYC1-LacZ, and GCN4-LacZ expression
YKL127W	<i>PGM1</i>	1.11	0.98	2.00	phosphoglucomutase minor isoform
YGR191W	<i>HIP1</i>	1.15	1.00	2.00	histidine permease
YLR390W-A	<i>CCW14</i>	0.90	1.05	2.00	cell wall mannoprotein
YGR259C		0.99	1.06	2.00	Hypothetical ORF
YKL176C	<i>LST4</i>	1.12	0.97	2.00	required for amino acid permease transport from the Golgi to the cell surface. involved in regulated secretion/recycling of nitrogen regulated permeases.