

Tesis Doctoral

Regulación transcripcional de las subunidades de la proteína quinasa A de *Saccharomyces cerevisiae*

Pautasso, María Constanza

2015-07-07

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pautasso, María Constanza. (2015-07-07). Regulación transcripcional de las subunidades de la proteína quinasa A de *Saccharomyces cerevisiae*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Pautasso, María Constanza. "Regulación transcripcional de las subunidades de la proteína quinasa A de *Saccharomyces cerevisiae*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-07-07.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**“Regulación transcripcional de las subunidades de la proteína
quinasa A de *Saccharomyces cerevisiae*”**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

María Constanza Pautasso

Directora: Silvia Graciela Rossi
Consejera de estudios: Elba Vázquez

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología Molecular y Transducción de Señales,
Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2015

RESUMEN

Las células deben mantener un específico y delicado balance de su fisiología interna para el crecimiento y funcionamiento óptimos. El mantenimiento de este balance interno es crítico y variaciones del ambiente pueden resultar en una variedad de perturbaciones celulares que pueden romper el equilibrio interno celular, provocando de esta forma una interrupción de flujos metabólicos, desestabilización de estructuras celulares y perturbación de gradientes químicos, entre otros, que conducen a una inestabilidad general. Las células deben ser capaces de proteger y mantener la homeostasis interna frente a la variabilidad de las condiciones externas. La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ha evolucionado sistemas de sensado y redes de señalización complejas para responder eficientemente a las variaciones repentinas y frecuentes en el ambiente externo, como son fluctuaciones de temperatura, osmolaridad, acidez del ambiente, presencia de tóxicos, y largos períodos de hambreo nutricional. Dichos mecanismos, le permiten controlar la expresión de numerosos genes que están involucrados en la división celular, caminos metabólicos, resistencia a estrés y diferenciación celular.

En *Saccharomyces cerevisiae* una gran variedad de los procesos celulares es controlada por la vía de la proteína kinasa A dependiente de cAMP (PKA), la que consiste en un heterotetrámero formado por dos subunidades catalíticas (C) codificadas por los genes *TPK1*, *TPK2* y *TPK3*, y por dos subunidades regulatorias (R) codificadas por un único gen *BCY1*. Entre los estímulos mejor descritos frente a los que la PKA se activa se encuentra la presencia de fuentes de carbono fermentables en el medio. Por el contrario, tanto para el cambio a metabolismo respiratorio que permite el consumo de fuentes de carbono no fermentables, como para dar una respuesta que permita la adaptación a situaciones de estrés térmico y osmótico, es necesario que la PKA se inactive. La especificidad de la respuesta frente a distintos estímulos es determinada por varios factores como son la concentración local de cAMP, los niveles de expresión de la quinasa y del sustrato, la presencia o ausencia de proteínas de anclaje que limitan la interacción de la quinasa con su sustrato y la secuencia alrededor del sitio de fosforilación de éste. La regulación de los niveles de expresión génica de las subunidades de PKA en *Saccharomyces cerevisiae* ha sido poco estudiada hasta el momento. En este trabajo se buscó caracterizar la actividad transcripcional de los promotores de los genes de las subunidades de PKA en distintas condiciones de crecimiento, así como identificar globalmente vías metabólicas y específicamente proteínas de importancia en la regulación. En primer lugar, mediante la técnica de genes reporteros y la medición de los niveles de mRNA, se determinó que los niveles de actividad de los promotores de los genes de PKA son diferentes a lo largo del crecimiento, ordenándose de mayor a menor de la siguiente forma: *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* y *BCY1*. Empleando mutantes que exhiben una actividad de PKA desregulada o nula, se describió el comportamiento autorregulatorio negativo isoforma-dependiente de la enzima sobre los niveles de expresión de sus propios genes. En condiciones de estrés térmico y salino, sólo el promotor *TPK1* es activado, y mediante el empleo de cepas mutantes de delección de proteínas involucradas en la vía de respuesta al estrés térmico, se determinó que la quinasa Rim15, y no la quinasa Yak1,

interviene en su regulación. Más aún, Msn2/4, Gis1 y Sok2, factores de transcripción rí abajo de ambas quinasas, participan en la activación del promotor *TPK1*, y su reclutamiento fue confirmado por experimentos de ChIP. Por otra parte, el estudio de la respuesta de los promotores al crecimiento en glicerol (metabolismo oxidativo), indicó un marcado incremento de la actividad, respecto al crecimiento en glucosa (metabolismo fermentativo). El uso de mutantes de delección de genes que codifican para proteínas que participan en la transducción de la señal de fuente de carbono permitió identificar al factor de transcripción Mig1 como represor de los promotores *TPK1* y *TPK2*; a Mig2 como represor de los promotores de *TPK2* y *BCY1*, y a Mig3 como represor del promotor de *BCY1*. Se corroboró la presencia de Mig1 en el promotor *TPK1* transcripcionalmente activo mediante ensayos de ChIP. La quinasa Snf1y sus efectores rí abajo, los factores de transcripción Cat8 y Sip4, que cumplen un rol importante en la respuesta al hambreado de glucosa, regulan la actividad de los cuatro promotores en presencia de esta fuente de carbono.

Teniendo en cuenta que la PKA está implicada en numerosas vías de transducción de señales, y habiendo corroborado que las vías de respuesta a estrés y a fuente de carbono regulan la actividad de los promotores de los genes de sus subunidades, se realizó un estudio a nivel genómico a través del empleo de tecnología robótica (técnica *Reporter-Synthetic Genetic Array*), con el objetivo de identificar de forma global nuevos reguladores de la transcripción. Este estudio se llevó a cabo con células crecidas en fuente de carbono fermentable. Este análisis masivo permitió identificar distintas vías que regulan diferencialmente la actividad de los cuatro promotores de las subunidades de PKA. Los reguladores identificados fueron clasificados según la base *Gene Ontology* para determinar el enriquecimiento en distintas categorías. Distintos genes asociados a las categorías de transcripción, función mitocondrial, función vacuolar y metabolismo de fosfato afectan la actividad de los cuatro promotores. A su vez se identificaron también genes pertenecientes a distintas categorías regulatorias que no son compartidas por los promotores, como metabolismo de lípidos, que afecta la transcripción de *TPK1*, *TPK2* y *TPK3*. Fue llamativo además, que dentro de una misma categoría que surgió como reguladora de los cuatro promotores, los genes identificados son diferentes para cada subunidad de PKA. Del análisis surgieron también los metabolitos inositol, polifosfatos de inositol, colina y fosfato como señales que regulan la transcripción de los genes de las subunidades de PKA. De este trabajo se desprende que muchos de los blancos de fosforilación conocidos de PKA que forman parte de estas rutas metabólicas, juegan a su vez un rol en la regulación transcripcional de sus subunidades, sugiriendo la posibilidad de una regulación recíproca en la que PKA coordinaría diferentes vías de señalización y estos procesos a su vez regularían la expresión de la quinasa. Este concepto está además en relación con los resultados de la primera parte del trabajo, que muestran una regulación inhibitoria de los promotores de PKA por la propia actividad de la quinasa.

Como conclusión general se puede afirmar que la regulación diferencial de la expresión de las subunidades que conforman la quinasa dependiente de cAMP juega un rol importante en la determinación de la especificidad de la respuesta en el camino de señalización cAMP-PKA.

TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF PROTEIN KINASE A SUBUNITS FROM *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

Yeast cells must maintain a specific and delicate balance of their internal physiology to the optimal growth and function. Variations in the environment conditions can result in a variety of cellular perturbations that break the cellular internal equilibrium, and the cells use myriad strategies to maintain these internal conditions in the face of variable and often harsh external. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has evolved sensing systems and complex signaling pathways to efficiently respond to drastic and abruptly variations in the external environment, as fluctuations of the temperature, osmolarity, acidity, presence of toxic compounds, and large periods of starvation. When environmental conditions change abruptly, the cell must rapidly adjust its genomic expression program to adapt to the new conditions.

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the cAMP dependent protein kinase A (PKA) controls a wide variety of cellular processes. Yeast PKA consists in a heterotetramer with two catalytic (C) subunits encoded by the *TPK1*, *TPK2* and *TPK3* genes, and a dimer of regulatory (R) subunit encoded by the *BCY1* gene. One of the best described stimuli activating the PKA is the presence of a fermentable carbon source in the growth medium; while it is necessary to inactivate PKA to allow the switch from fermentative to respiratory metabolism to occur, and to respond to heat and osmotic stress. In general, the specificity of the response to numerous stimuli is determined by several factors as the local cAMP concentration, the expression levels of the kinase and its substrates, the presence or absence of scaffold proteins which limit the interaction among the kinase and its substrates, and the sequence around the phosphorylation site in the substrate. Little is known about the expression levels of the genes encoding PKA subunits. The aim of this work was to characterize the regulation of the promoters transcriptional activity of the genes encoding the subunits of PKA in different growth conditions, including different carbon source and stress, as well as the globally identification of novel metabolic pathways and specific proteins that act as regulators of the PKA subunits transcription. As a first step, employing the reporter gene approach and measuring mRNA levels we determined that the expression level of PKA subunit promoters is different during the growth curve, having *TPK1* the highest, then *TPK2* and *TPK3*, and belonging to *BCY1* the lowest one. Taking advantage of mutant strains that exhibit a deregulated activity of PKA, or a null activity of PKA, we described the negative isoform-dependent autoregulatory behavior of the enzyme in the expression regulation of its own genes. In heat and osmotic stress conditions, only *TPK1* promoter is activated. Employing several strains with simple deletions of genes involved in the heat stress response, we determined that the kinase Rim15 and not the kinase Yak1, participates in *TPK1* regulation. Moreover, Msn2, Msn4, Gis1 and Sok2, which are transcription factors downstream of both Rim15 and Yak1 kinases, contribute to the upregulation of *TPK1* promoter, and ChIP assays revealed its

presence on the promoter. On the other hand, the study of the promoters activity in the presence of glycerol as carbon source (respiratory metabolism), showed a marked increment in the promoters activity in comparison with the growth in glucose (fermentative metabolism). Using deletion mutants of proteins involved in the carbon source signal transduction pathway, we identify the Mig1 transcription factor as a repressor of the *TPK1* and *TPK2* promoters; Mig2, as a repressor of *TPK2* and *BCY1* promoters, and Mig3, as a repressor of *BCY1* promoter. By ChIP assays we corroborate the presence of Mig1 on the transcriptionally active *TPK1* promoter. The kinase Snf1, and its downstream effectors, the transcription factors Cat8 and Sip4, all of them having an important role under glucose starvation, regulate the activity of the four PKA subunits promoters in the presence of this carbon source.

Taking into account the implication of PKA in several transduction pathways, and that the heat stress response pathway and the carbon source pathway are implicated in the regulation of the activity of the promoters of the genes encoding PKA subunits, we carried out a genomic study using robotic technology (Reporter-Synthetic Genetic Array technique), with the aim of globally identify novel regulators of the transcription. This study was performed with cells grown in fermentable carbon source. The massive analysis let us discovering distinct pathways that differentially regulate the activity of the four promoters of the PKA subunits. The identified regulators were classified according to Gene Ontology database to determine enrichment in categories. Distinct genes belonging to transcription, mitochondria functioning, vacuolar functioning and phosphate metabolism affected the activity of the four promoters. Besides we identified genes in different regulatory categories which are not shared by the four promoters, as lipid metabolism which affects the *TPK1*, *TPK2* and *TPK3* transcription. Moreover the list of genes belonging to categories regulating the four promoters is not equal. Further characterization of the results pointed to inositol and inositol polyphosphates, choline and phosphate as novel upstream signals that regulate transcription of PKA subunit genes. In general, from this work we conclude that many of the known targets of PKA phosphorylation are associated with the transcriptional regulation of PKA subunits, opening the possibility of a reciprocal regulation in which PKA would be coordinating different metabolic pathways and these processes would in turn, regulate expression of the kinase subunits. This concept is in concordance with the results of the first part of this work that showed an inhibitory regulation of the PKA promoters by its own kinase activity.

The overall conclusion is that the differential expression regulation of the PKA subunits plays an important role in determining the specificity of the response in the cAMP-PKA signaling transduction pathway.

PUBLICACIONES

Esta Tesis dio origen a la siguiente publicación:

Pautasso, C., & Rossi, S. (2014). Transcriptional regulation of the protein kinase A subunits in *Saccharomyces cerevisiae*: Autoregulatory role of the kinase A activity. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1839(4), 275–287.

AGRADECIMIENTOS

Después de tantísimo trabajo, en el momento de empezar a tipear este apartado se me aflojó el cuerpo. El transcurso de esta Tesis fue un período de mucho aprendizaje. Y es mucha la gente que merece que le dé las gracias, porque sin todas esas personas esta Tesis no estaría hoy impresa.

Gracias a...

Silvia Rossi, mi Directora, gracias por confiar en mí y dejarme formar parte de tu equipo de trabajo. Gracias por enseñarme todo lo que sé de ciencia y por guiarme en el desarrollo de mi pensamiento crítico. Gracias por darme el espacio para discutir experimentos y resultados y también cuestiones que no tienen que ver con el mundo científico. Gracias por ser tan, tan honesta, y entregarte con tanta pasión a todo lo que te proponés. Son características tuyas que no paso por alto y me sirven de ejemplo para la vida en general. Gracias por querer que a todos nos vaya mejor, y buscar siempre la forma de resolver el problema más molesto, desde conseguir que nos presten un aparato para un experimento hasta llamar y pedir turnos con médicos. Gracias porque tu interés por los que te rodean se siente, y hace bien trabajar con gente así.

Fiore, que me recibió en su mesada cuando era una pichona y me ayudó a dar mis primeros pasos. Gracias por ser mi primera madre laboratoril, y por querer que ahora empecemos a planear cuestiones experimentales juntas. Sobre todo, gracias por ser mi amiga, mi compañera, mi confidente, muchas veces mi soporte y mi oído fiel cuando te necesito. Gracias por preocuparte mucho por mí. Gracias por levantar los viernes con Pocho La Pantera.

Nico, mi hermano del alma, porque empezamos en el labo juntos, nos recibimos de licenciados el mismo día, empezamos el doctorado juntos, hicimos algún que otro curso juntos (“me voy a tomar agua, ya vuelvo”), y casi nos doctoramos juntos. Gracias por estar siempre disponible y recontra predispuesto a ayudarme. Por las mañanas y tardes bien tarde de compañía, porque sé que aunque te hablara y vos, sumergido en tu pantallita, no me respondieras, me escuchabas. Creo. Te quiero. Eso lo sé.

Pau, sos una genia. Gracias por estar siempre tan atenta a todos, y en particular por ayudame a resolver cuestiones experimentales, por mostrarme otros puntos de vista en el análisis de resultados y por esa pasión que le ponés cuando hablás de ciencia. O de lo que te gusta.

Silvia Moreno, porque tus ganas contagian y tu empuje arrastra. Gracias por guiarnos y querer siempre lo mejor para todos. Gracias por estar siempre dispuesta a discutir experimentos y resultados y por tus aportes desinteresados a esta Tesis. Porque siempre tenés una sonrisa sin importar el escenario y entonces cualquier situación se suaviza. Gracias por tu preocupación y por la alegría que demostrás con los pequeños logros de cada uno.

Vani, por formar parte de un Capítulo de esta Tesis y de un capítulo de mi vida. Sos la mejor jefa que pude haber encontrado en el exterior. Gracias por hacer inolvidable mi estadía en Canadá, desde el entusiasmo en el desarrollo de experimentos con metodologías nuevas, hasta mi primer festejo de cumpleaños fuera del país.

Lucianita, esta chica. Gracias por ser tan súper híper divina. Casi que vos me mimás más a mí que yo a vos. Nunca me voy a olvidar la mano que me diste con los experimentos cuando andaba con las muletas, siempre tan atenta ¡Vamos que vamos a hacer grandes cosas juntas!

Rich, Jime, Enzolón, SolRita, Clari, Adri, Carlita, Pía, Sofi y Majo, gracias muchachos por generar en el labo ese ambiente de alegría que hace más amena la jornada laboral. Gracias al apéndice del labo, **Itlu**, por tus “¡¿¿yy...??!!”, porque cada vez que te veo ya sé que me vas a preguntar por mis lunares. Bueno, acá están, en forma de resultado de esta Tesis!

Paula Gioino y Jime Giudice, por contribuir con buena parte del material bibliográfico que sostiene esta Tesis. Gracias por ese huequito que se hicieron para ayudarme (y por los huequitos que vendrán!).

Mamáááá, para vos un gracias inmenso. Gracias por enseñarme todo lo que sé y hacerme lo que soy. Por mostrarme siempre con tu ejemplo que con esfuerzo los objetivos se alcanzan y por apoyarme siempre en todas mis decisiones. Gracias por dedicarte sobre todas las cosas a tus hijas (y ahora a tus nietos). Y por insistirme siempre en que te cuente de las TPK. Gracias a **Marce** también porque aunque no entiendan nada, me escuchan siempre con interés ¡Y gracias por los almuerzos salvadores cuando no había ni tiempo de cocinar!

Papá, por mostrarme siempre que estás orgulloso de mí. Por querer siempre y empujarme a mejorar como persona y como profesional. Por poner todo de vos para que tus hijas estén bien. Por ser un ejemplo para mí, de tenacidad y sobre todo de esfuerzo y de lucha. Por mostrarme que se puede salir adelante de cualquier situación. Gracias a **Celeste** por tanto cariño, en forma de risas y de delicias engordantes. A mi hermana, **Jime**, por el aguante.

Viby, porque me adoptaste sin dudarle un segundo. Por tu mirada de amor, y tu energía positiva que siempre me llega. Te admiro, sos un ejemplo de luchadora. Tenés mucha fuerza. A **Dai**, mi hermanita, gracias por darme ánimos todo el tiempo, por acompañarme y permitirme acompañarte. Por los abrazos sinceros. Gracias por ser junto a Juli las niñeras de Toto!

Mi **familia** que siempre, pero siempre me preguntan cómo andan los paramecios. Gracias por nunca cansarse de querer saber de una buena vez qué es lo que hago.

Mis amigos de toda la vida, de la infancia, de la secundaria y de la facultad. A **Sil**; a **Lu, Vero, Juan, Facu y Mati**; a **Marie, Leo, Romi, Aili, Pepe, Eve, Fran, Manu, Artu, Juli**, por aguantarse mis faltazos a las reuniones y después mandarme fotos de lo que me perdía. Qué lindo es crecer con ustedes.

A la **Facultad de Ciencias Exactas y Naturales** de la UBA, toda.

Y por último, aunque lucha por los primeros puestos, **Pablo**, porque vos más que nadie sabe lo que este trabajo significó. Por el ánimo, el empuje, el aliento, el entusiasmo, el interés, los consejos, y el aguante que le pusiste estos últimos días previos a la impresión. Me bancaste y te estoy muy agradecida y cada vez más feliz de haberte elegido como compañero de vida. Gracias por el hijo que nos diste. Y gracias **Toto** por enseñarme otra dimensión del amor y por bancarte esta madre científica que te tocó. Los amo. Tenemos una familia hermosa.

Quizás (probablemente) me olvidé de mencionar a alguien. A ese alguien: gracias.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA)	3
Subunidad Catalítica	4
Subunidad Regulatoria	8
Mecanismo de activación y control de la actividad de PKA	10
Localización subcelular de las subunidades de PKA	13
Niveles de expresión de las subunidades de PKA	15
Fases de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y rol de PKA	16
BIBLIOGRAFÍA	20
CAPÍTULO 1	
REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LAS SUBUNIDADES DE LA PROTEÍNA QUINASA A EN ESTRÉS TÉRMICO Y SALINO	27
1. INTRODUCCIÓN	29
1.1. La respuesta a estrés en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
1.2. Estrés térmico	29
1.3. Regulación de la actividad de Msn2/4 y la vía de PKA	32
1.4. La vía de Rim15/Gis1 y su relación con la respuesta a estrés	35
1.5. Estrés salino	36
1.6. Cambios en la estabilidad del mRNA en situaciones de estrés	36
1.7. Niveles de expresión e mRNAs de <i>TPKs</i> y <i>BCY1</i>	38
2. OBJETIVOS	38
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
3.1. La expresión de los genes <i>TPK1</i> , <i>TPK2</i> , <i>TPK3</i> y <i>BCY1</i> es regulada diferencialmente durante el crecimiento en presencia de glucosa como fuente de carbono	39
3.2. La actividad de los promotores de las subunidades de PKA es autorregulada	43
3.3. La expresión de los genes de las subunidades de PKA es regulada diferencialmente durante el estrés térmico y el estrés salino	46
3.4. Msn2/4, Sok2 y Gis1 cooperan en la regulación de la actividad del promotor <i>TPK1</i>	51
4. CONCLUSIONES	58
5. BIBLIOGRAFÍA	64
CAPÍTULO 2	
REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LAS SUBUNIDADES DE LA PROTEÍNA QUINASA A EN FUENTE DE CARBONO NO FERMENTABLE	73

1. INTRODUCCIÓN	75
1.1. Vía de represión por glucosa	76
1.2. Vía de inducción mediada por Snf3/Rgt2	80
Entrecruzamiento entre las vías de represión (mediada por Mig1/Snf1) e inducción (mediada por Snf3/Rgt2) por glucosa, a nivel de la expresión génica	81
1.3. Vía de activación de PKA	81
1.4. Vía de inducción de genes de glucólisis	84
1.5. Activación del metabolismo no fermentativo	84
2. OBJETIVOS	87
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	89
3.1. Los promotores de la subunidades de PKA son más activos en fuente de carbono no fermentable, que en fermentable	89
3.2. Promotor <i>TPK1</i> , crecimiento en glucosa y en glicerol	91
3.3. Regulación del promotor <i>TPK2</i> , <i>TPK3</i> y <i>BCY1</i> en glucosa y en glicerol	96
3.3.1. Regulación del promotor <i>TPK2</i>	96
3.3.2. Regulación del promotor <i>TPK3</i>	98
3.3.3. Regulación del promotor <i>BCY1</i>	100
4. CONCLUSIONES	102
5. BIBLIOGRAFÍA	106

CAPÍTULO 3

IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS REGULADORES TRANSCRIPCIONALES DE LAS SUBUNIDADES DE LA PROTEÍNA QUINASA A MEDIANTE EL USO DE UN SISTEMA DUAL DE PROMOTOR-GEN REPORTERO A GRAN ESCALA (REPORTER-SYNTHETIC GENETIC ARRAY, R-SGA)	113
---	-----

1. INTRODUCCIÓN	115
1.1. Colección de mutantes simples de delección de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	115
1.2. Metodología SGA	116
1.3. Adaptación de la metodología SGA: R-SGA	117
2. OBJETIVOS	119
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1. Construcción del Sistema Repotero y de la colección de mutantes	120
3.2. Validación del análisis genético de R-SGA	120
3.3. Nuevos reguladores transcripcionales de las subunidades de PKA	124
4. CONCLUSIONES	138
5. BIBLIOGRAFÍA	139

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	143
---------------------------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA	149
MATERIALES Y MÉTODOS	151
1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	153
2. Medios y condiciones de crecimiento	154
3. Plásmidos	155
4. Transformación de bacterias <i>E.coli</i> competentes	158
5. Purificación de DNA plasmídico desde <i>E.coli</i>	159
6. Transformación de levaduras	159
7. Purificación de DNA genómico de levaduras	159
8. Electroforesis en geles de agarosa	160
9. Ensayo de medición de actividad β -galactosidasa	160
10. Purificación de RNA total y qRT-PCR	161
11. <i>Western-blot</i>	162
12. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	163
13. Metodología <i>Reporter-Synthetic Genetic Array</i> (R-SGA)	164
14. Análisis de GO	166
BIBLIOGRAFÍA	167
APÉNDICE	169

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

Tanto en organismos multicelulares como en unicelulares la señalización es un mecanismo de comunicación dentro de la célula que regula distintos procesos biológicos tales como la proliferación celular, desarrollo, metabolismo, expresión génica, y otras funciones más especializadas. Dentro de la célula se transmite información de señales externas mediante complejos mecanismos de modificaciones post-traduccionales bien controlados. La fosforilación es una de estas modificaciones y su control está dado por el balance de proteínas quinasas y proteínas fosfatasas. El grado de fosforilación de una proteína puede afectar su actividad enzimática, su localización subcelular, y/o su asociación a otras proteínas. Las quinasas de proteínas tienen un rol central en los caminos de transducción de señales y difieren en la especificidad de sus sustratos. Dado que la fosforilación afecta muchos procesos celulares, su regulación debe ser específica, las quinasas deben actuar sobre un determinado grupo de blancos celulares para asegurar la fidelidad de la señal. Esta especificidad en la respuesta es alcanzada a través de distintos mecanismos, como el ensamblado de complejos que sitúan a la enzima y al sustrato en localizaciones subcelulares determinadas. De esta forma se logra una organización y una regulación espaciotemporal del camino de señalización, que permiten responder específicamente a un estímulo determinado. Uno de estos caminos de señalización es la vía de cAMP-PKA, nuestro objeto de estudio en el modelo *Saccharomyces cerevisiae*.

Proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA)

En la mayoría de los sistemas eucariotas estudiados, la holoenzima PKA es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades catalíticas (C) y dos regulatorias (R) (Figura 1). La subunidad C cataliza la transferencia del grupo fosfato en posición γ del ATP hacia el sustrato, y la subunidad R une las moléculas de cAMP y determina la localización de la holoenzima mediante su interacción con proteínas de anclaje denominadas AKAPs (Pidoux & Tasken, 2010). Estudios bioquímicos han demostrado que en ausencia de cAMP, la subunidad R inhibe la actividad de la subunidad C. El incremento en la concentración intracelular de cAMP en respuesta a un estímulo promueve la disociación de la

holoenzima y la liberación de las subunidades C catalíticamente activas (Johnson, Cameron, Toda, Wigler, & Zoller, 1987).

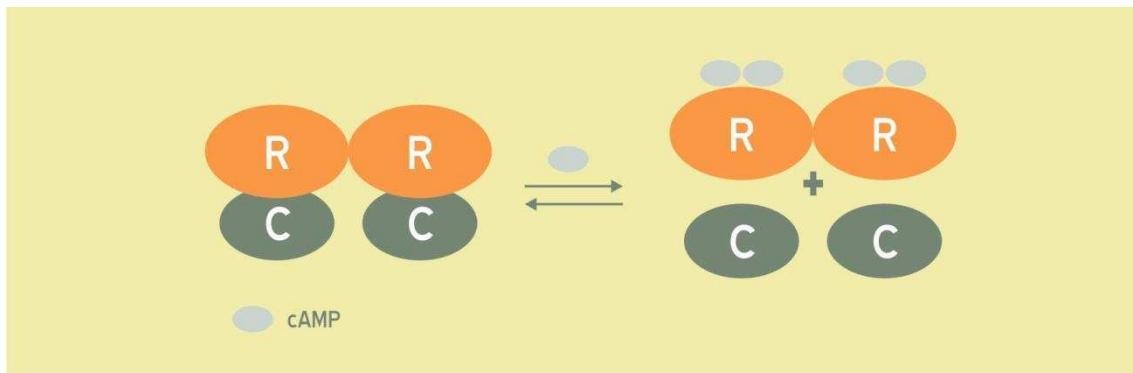


Figura 1. Esquema de la holoenzima y modelo clásico de activación.

Los óvalos naranja representan el dímero de subunidad regulatoria (R), mientras que los óvalos gris oscuro, las subunidades catalíticas. La unión de dos moléculas de cAMP (óvalos gris claro) a cada subunidad R promueve la disociación de la holoenzima y la activación de las subunidades C.

Subunidad Catalítica

La estructura de la subunidad catalítica presenta un core catalítico que es común a todas las proteínas quinasas. En mamíferos, la subunidad C es codificada por los genes $C\alpha$ (Uhler, Carmichael, et al., 1986), $C\beta$ (Uhler, Chriveria, & McKnight, 1986) y $C\gamma$ (Reinton et al., 1998). Adicionalmente se describió la proteína quinasa X (PrKX) codificada por el cromosoma X humano, que forma una holoenzima activada por cAMP exclusivamente con la subunidad RI (Zimmermann et al., 1999). Se han reportado variantes de splicing tanto de $C\alpha$ como de $C\beta$ (Skalhegg & Tasken, 2000).

La estructura de la $C\alpha$ murina fue el primer cristal de proteína quinasa en resolverse. $C\alpha$ es una proteína globular con dos lóbulos y un dominio de libre rotación (loop P) que los conecta (Figura 2). El lóbulo N-terminal pequeño, helicoidal y con sitio de miristoilación, está involucrado en la unión de MgATP, mientras que el lóbulo C-terminal, más grande, es el responsable de la unión del péptido y la catálisis. Ambos, MgATP y péptido se aproximan para la catálisis en la hendidura entre los dos lóbulos (Skalhegg & Tasken, 2000).

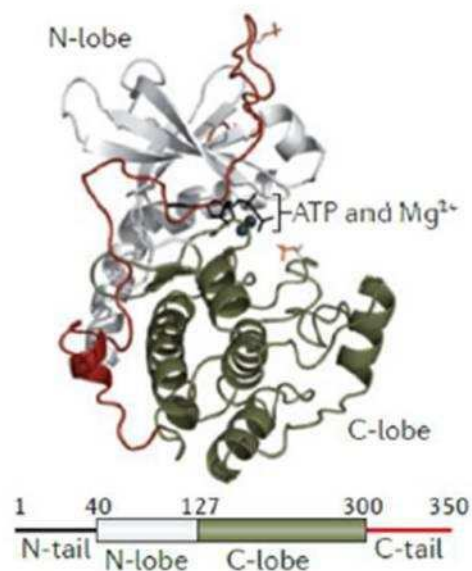


Figura 2. Subunidad C de mamíferos.

Plegamiento de la enzima, donde pueden apreciarse los distintos elementos de estructura secundaria, así como también los lóbulos menor (*N-lobe*) y mayor (*C-lobe*). El esquema en la parte inferior indica la extensión y el código de colores utilizado para cada una de las regiones. También se muestra en el bolsillo catalítico la posición del ATP y del Mg^{2+} , cofactor de la enzima. Figura tomada de Taylor, Ilouz, Zhang, & Kornev, (2012).

En *Saccharomyces cerevisiae*, se han descrito tres isoformas de subunidad C, Tpk1, Tpk2 y Tpk3. Las tres comparten más de un 75% de homología de secuencia en su extremo C-terminal, y un 50% con la subunidad catalítica bovina. Tpk1 y Tpk3 comparten un 88% de identidad en su secuencia aminoacídica del dominio quinasa, mientras que Tpk2 es más divergente (77 y 75% de homología con Tpk1 y Tpk3 respectivamente). Las regiones N-terminal son heterogéneas en longitud (60 a 80 aminoácidos) y además no muestran homología entre ellas. La delección de las tres subunidades C de PKA es letal para las células, siendo la expresión de al menos una necesaria y suficiente para la proliferación celular, lo que indicaría que las Tpk's cumplen una función redundante en el crecimiento celular (Toda, Cameron, Sass, Zoller, & Wigler, 1987). Sin embargo, como se verá más adelante, la redundancia funcional no se cumple en otros procesos fisiológicos. En cuanto a su actividad catalítica, se estableció en nuestro laboratorio que las tres Tpk's presentan actividades específicas similares en la

fosforilación de péptidos y proteínas sustrato *in vitro* (Fiorella Galello, Portela, Moreno, & Rossi, 2010). Por otro lado, se ha reportado previamente que una cepa que expresa *TPK3* como única fuente de actividad quinasa PKA, no muestra diferencias en cuanto al crecimiento respecto a la cepa WT, pero la actividad quinasa que se detecta es tan baja como la que se mide en cepas con alelos mutantes *tpk^w* (con actividad catalítica atenuada) (Mazón, Behrens, Morgado, & Portillo, 1993). Estos resultados indicarían que la baja actividad de Tpk3 *in vivo* no se debería a su actividad catalítica, sino a la acción de otros mecanismos regulatorios. Por ejemplo, se han reportado evidencias acerca de los niveles de expresión y de localización subcelular, que indican que el mRNA de *TPK3* es indetectable en una cepa WT (Mazón et al., 1993), y que Tpk3 es secuestrado en gránulos de ribonucleoproteínas (Tudisca et al., 2010).

La estructura de la subunidad C de PKA consiste en un *core* catalítico de aproximadamente 270 aminoácidos, flanqueado por un extremo N-terminal y uno C-terminal de 40 aminoácidos cada uno. El extremo N-terminal de las subunidades C de *S.cerevisiae* difiere del de mamíferos en la ausencia de grupo miristilo. El análisis de la estructura cristalográfica de la versión de Tpk1 sin el extremo N-terminal (TPK1Δ80) que es activa *in vitro*, indicó que existe alto grado de similitud con la subunidad C de mamíferos, y que los cambios conformacionales que acompañan la unión del ligando y la catálisis están conservados entre las especies (Mashhoon, Carmel, Pflugrath, & Kuret, 2001).

Si bien las tres isoformas de subunidad catalítica son redundantes para procesos como el crecimiento, la respuesta a estrés y el almacenamiento de glucógeno, varias líneas de evidencia sugieren que tienen roles específicos en otras funciones del metabolismo celular. Frente a la privación de nitrógeno, las levaduras cambian su patrón de crecimiento formando cadenas de células elongadas, denominadas pseudohifas, capaces de invadir la superficie de ágar (Gimeno, Ljungdahl, Styles, & Fink, 1992). Se encontró una especialización para cada subunidad Tpk en el desarrollo pseudohifal: Tpk2 cumple un rol activador, mientras que Tpk1 y Tpk3 inhiben el crecimiento filamentoso (X Pan & Heitman, 1999; Robertson & Fink, 1998). La diferencia en las funciones de Tpk1 y Tpk2 se explicaría a partir de sus distintas capacidades de unir a los sustratos, ensayadas *in vivo* por la técnica de doble híbrido, y a sus diferentes localizaciones subcelulares. El mecanismo de interacción proteica mediante el cual actúa Tpk2 incluye la activación del activador transcripcional Flo8, y la

inhibición del represor transcripcional Sfl1, que actúan en la regulación del gen *FLO11* (Xuewen Pan & Heitman, 2002).

En otro trabajo emplearon la técnica de *arrays* para estudiar los perfiles transcripcionales de cepas que expresan una sola subunidad catalítica de PKA, e identificaron distintos blancos de regulación para Tpk1 y Tpk2 (Robertson, Causton, Young, & Fink, 2000). Tpk1 es requerido para la desrepresión de genes de biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada, que parecen tener un rol secundario en el mantenimiento de los niveles de hierro y en la estabilidad del DNA en la mitocondria. Por su parte, Tpk2 reprime la transcripción de genes involucrados en la incorporación de alta afinidad de hierro; proceso que está relacionado con la respiración porque este metal es necesario para la funcionalidad de enzimas respiratorias. De esta forma, inhibiendo la incorporación de hierro, Tpk2 reprimiría el metabolismo respiratorio en fuentes de carbono fermentables. Además, Tpk2 regula específicamente genes relacionados con la homeostasis del agua, y la degradación de trehalosa (Robertson et al., 2000).

El contenido enzimático mitocondrial es controlado específicamente por Tpk3 durante la transición del crecimiento exponencial a la fase estacionaria, conduciendo a alcanzar una tasa de crecimiento menor y óptima (Chevtzoff, Vallortigara, Avéret, Rigoulet, & Devin, 2005). Por otro lado, Tpk3 colabora con la quinasa Snf1 en la regulación del represor transcripcional Rgt1, que se asocia al promotor del gen *HXT2*. La hiperfosforilación de Rgt1 por Tpk3 en presencia de glucosa es un prerrequisito para la disociación del factor de transcripción del DNA (Palomino, Herrero, & Moreno, 2006).

Finalmente, en un estudio a nivel proteómico en el que se expuso un *array* de 4400 proteínas a 87 proteínas quinasas diferentes, se identificaron 256 sustratos de Tpk1, 29 de Tpk2 y 79 de Tpk3. De éstos, sólo 8 fueron fosforilados por las 3 quinasas y 39, por 2 Tpk. Además, se ensayó la fosforilación del *array* por la PKA bovina, y un 86,6% de sustratos de ésta son también blancos de Tpk1 (Ptacek et al., 2005). Sin embargo, en nuestro laboratorio se investigaron los requerimientos de secuencia alrededor del sitio de fosforilación para el reconocimiento de sustratos de Tpk1 y Tpk2 *in vitro*, obteniéndose resultados distintos. Tanto la selectividad de secuencia como la actividad catalítica de estas dos isoformas son similares. De este modo cobra importancia el concepto de la diferente localización subcelular de las subunidades catalíticas, que favorecería la fosforilación específica de sustratos que colocalicen con las distintas isoformas de Tpk (Fiorella Galello et al., 2010).

Todos estos ejemplos muestran que la vía de señalización por cAMP-PKA tiene caminos que son específicamente regulados por alguna de las Tpk's, y no por todas por igual.

La fosforilación de los sustratos por PKA ocurre en un sitio consenso cuya definición se logró a partir de la comparación de los sitios fosforilados en 100 sustratos fisiológicos. La secuencia consenso Arg-Arg-X-Ser fue la más abundante, siendo el 80% de los motivos fosforilados por PKA en los sustratos. Alternativamente, pero con menor prevalencia entre los sustratos, se encuentra el motivo Arg-Arg-X-Thr (Shabb, 2001). Reportes de nuestro laboratorio profundizaron en los requerimientos de secuencia para la fosforilación por PKA en *S.cerevisiae*, corroborando la importancia de las Arg en las posiciones P-3 y P-2 (respecto a P0, el aminoácido fosfoaceptor), lo beneficioso que resulta la presencia de un aminoácido con carga positiva al lado de la posición P0 y lo perjudicial de residuos ácidos en posición P+1 (Fiorella Galello et al., 2010).

Subunidad Regulatoria

La estructura de la subunidad regulatoria de PKA es muy conservada en la mayoría de los organismos (Figura 3, panel superior derecho). Ésta comprende un dominio de dimerización y anclaje (D/D) en el extremo N-terminal (Figura 3, panel superior izquierdo) y dos dominios en tándem de unión a cAMP (CNB) en el extremo C-terminal (Figura 3, panel inferior izquierdo). La región que une el D/D con los CNBs contiene un sitio inhibitorio (IS), que se asemeja a un motivo de reconocimiento de sustrato/pseudosustrato (RRXS/A), y que ancla la hendidura del sitio activo de la subunidad catalítica volviendo a la holoenzima inactiva. Las subunidades RI poseen un residuo de Alanina en el sitio inhibitorio (sitio de pseudosustrato) mientras que las RII poseen uno de Serina, que se autofosforila (sitio de autofosforilación) (Taylor et al., 2008). En mamíferos hay dos clases principales de subunidades R (tipo I y tipo II), y cada una tiene isoformas α y β . Las cuatro isoformas son productos de genes distintos y son funcionalmente no redundantes. RI α y RI β muestran un 81% de homología en sus secuencias de aminoácidos; y RII α y RII β , un 68% de similitud. Se ha demostrado además la expresión de variantes de splicing de la subunidad RI α (Skalhegg & Tasken, 2000).

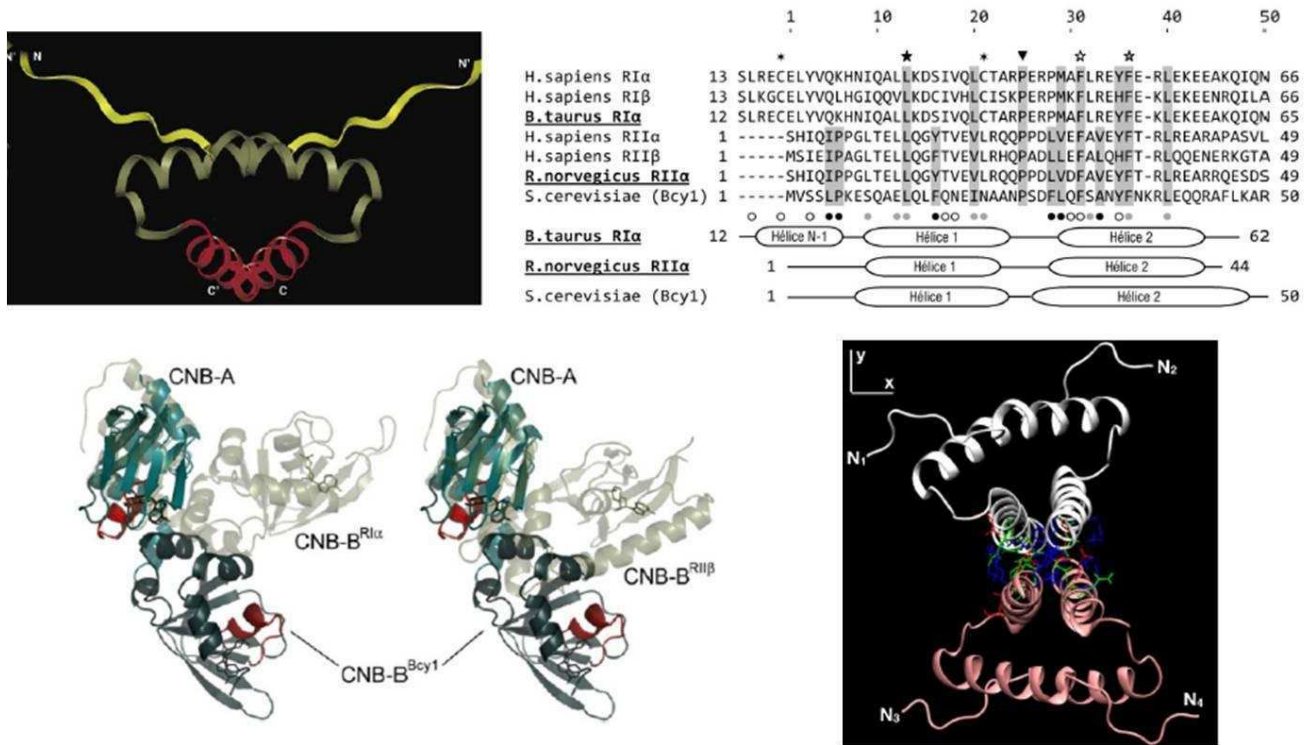


Figura 3. Subunidad R de mamíferos y *Saccharomyces cerevisiae*.

Panel superior izquierdo. Estructura de alta resolución de los dominios D/D de RII α murina. Se indican con código de colores los diferentes elementos: el segmento N-terminal que precede a la hélice 1 en amarillo, la hélice 1 en marrón, y la hélice 2 en rojo. Se indican los extremos N-terminal y C-terminal (que es donde continúa el *linker* en la proteína completa) con o sin primas para identificar a las dos cadenas que conforman el dímero. Figura tomada de Banky et al., (2003).

Panel superior derecho. Alineamiento de secuencias de la región N-terminal de las subunidades R, tomando como miembros representativos del grupo las proteínas humanas, bovinas y murinas; la numeración corresponde a la secuencia de Bcy1. En la parte inferior se representa esquemáticamente la estructura secundaria experimental de los dominios D/D de mamíferos, o bien la predicción para Bcy1; las cajas indican regiones de α -hélice. Figura tomada de Tesis de Nicolás González Bardeci.

Panel inferior izquierdo. Orientación relativa de los CNBs de Bcy1 y de las subunidades R de mamíferos. Se muestran en verde azulado los dos dominios de unión a cAMP de Bcy1, y en marrón grisáceo con transparencia los de las subunidades R de mamíferos: RII α a la izquierda y RII β a la derecha. Figura tomada de Rinaldi et al., (2010).

Panel inferior derecho. Modelo tetramérico de Bcy1 (1-50). Los dos dímeros que constituyen el tetrámero se encuentran coloreados en rosa y blanco, y los extremos N y C terminales de cada una de las cadenas se encuentran indicados con la numeración para cada una de las cadenas en subíndice. Figura tomada de Tesis de Nicolás González Bardeci.

En *S.cerevisiae*, la subunidad reguladora de PKA está codificada por un único gen *BCY1* (Toda, Cameron, Sass, Zoller, Scott, et al., 1987), que presenta un 40% de homología con las secuencias aminoacídicas de las subunidades regulatorias RI y RII bovinas (Figura 3, panel superior derecho). A pesar del elevado porcentaje de similitud, hay una gran divergencia entre éstas en el extremo N-terminal: Bcy1 contiene 47 aminoácidos más que las R bovinas y las secuencias son bien distintas (Johnson et al., 1987). Recientemente se ha resuelto la estructura cristalográfica de una mutante de delección de Bcy1 (168-416), unida a cAMP, y la principal característica que la diferencia de RI y RII de mamíferos es la orientación relativa de los dominios CNB. En suma, Bcy1 parece ser un híbrido entre RI y RII. En cuanto a su secuencia, es similar a RII ya que ambas presentan una Ser fosfoaceptora en el sitio inhibitorio, y estructuralmente se asemeja más a RI α , como surge del análisis del cristal de los dominios de cAMP obtenido en nuestro laboratorio (Figura 3, panel inferior izquierdo) (Rinaldi et al., 2010).

El dominio N-terminal de Bcy1 se ha cristalizado recientemente en nuestro laboratorio y su estructura revela que pese a presentar algunas características típicas de los dominios D/D de las subunidades RII α , contiene elementos distintivos (Tesis de Nicolás González Bardeci). Esta observación es consistente con las diferencias mencionadas en cuanto a la orientación relativa de los dominios de unión a cAMP (Figura 3, panel inferior derecho). En conjunto, estas evidencias demuestran que Bcy1 es una subunidad R con características estructurales únicas.

La delección del gen *BCY1* causa fuertes incrementos en la actividad de PKA, que afectan drásticamente a los blancos de esta enzima; minimizando por ejemplo la tolerancia al estrés y los niveles de almacenamiento de hidratos de carbono (Yamano, Tanaka, Matsumoto, & Toh-e, 1987).

Mecanismo de activación y control de la actividad de PKA

Al igual que en células de mamíferos, el cAMP activa a la PKA por unión a la subunidad reguladora (Figura 4), lo que causa la disociación de las subunidades catalíticas resultando en la activación de la enzima (Vandamme, Castermans, & Thevelein, 2012).

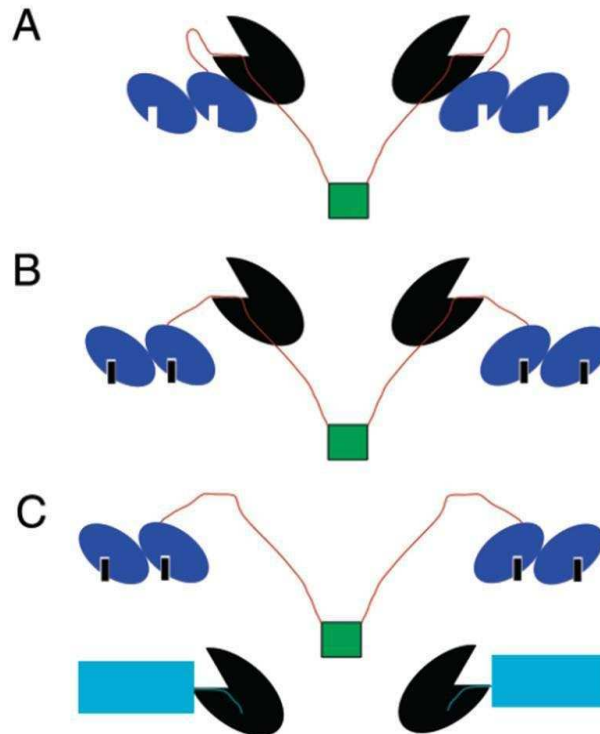


Figura 4. Mecanismo estructural propuesto de la activación de PKA por cAMP.

Las subunidades catalíticas están representadas en forma de "pac-man". Para las subunidades R, las elipses azules representan los subdominios A y B de unión a cAMP, los cuadrados verdes representan los dominios D/D de dimerización y anclaje, y la línea roja es la región linker que incluye la región inhibitoria de pseudosustrato. (A) Conformación de la holoenzima a bajas concentraciones de cAMP. Hay dos sitios de contacto entre R y C, uno es la región inhibitoria de pseudosustrato de R que une a la hendidura del sitio activo de C, y el otro incluye el sitio A de unión a cAMP de R y una región distal de la subunidad C. (B) Conformación de la holoenzima después de la unión de cAMP (representados como rectángulos negros pequeños). La unión de cAMP impide el sitio de contacto periférico, pero la secuencia inhibitoria de pseudosustrato permanece unida a C. Esto disminuye la afinidad entre R y C, de forma que algunas C se disocian pero algunas permanecen unidas a R. (C) Cuando el sustrato (representado como los rectángulos turquesa) establece contacto con los sitios activos de la holoenzima, la secuencia del sustrato compite con la región inhibitoria de pseudosustrato de R por la unión a C, promoviendo la disociación completa de las subunidades R y C. Figura tomada de Vigil, Blumenthal, Brown, Taylor, & Trewella, (2004).

En levaduras existen dos estímulos principales que disparan la síntesis de cAMP, la glucosa extracelular y otros azúcares rápidamente fermentables, y la acidificación intracelular. Del sensado de glucosa se hablará en profundidad en el Capítulo 2 de esta Tesis. La acidificación intracelular tiene efectos dramáticos sobre los blancos de la vía de PKA, resultando por ejemplo en una rápida movilización de trehalosa y glucógeno. La activación de la vía de cAMP/PKA podría ayudar a superar la

escasez de ATP en condiciones de estrés, que se sabe que disminuyen el pH intracelular (J M Thevelein, 1984). Sin embargo, el mecanismo por el cual la acidificación intracelular estimula a la proteína Ras no está claro aún (Vandamme et al., 2012).

Por otro lado, se ha propuesto la existencia de mecanismos alternativos a la síntesis de cAMP que controlan la actividad de PKA. Por ejemplo, las proteínas Gpb1 y Gpb2, que presentan repeticiones de dominios kelch, favorecen la asociación entre las subunidades R y C, lo que indica que su inactivación reduciría la cantidad de cAMP requerida para activar a la enzima. Estas proteínas regulan la actividad de PKA sin que sean necesarios cambios en los niveles de cAMP (Budhwar, Fang, & Hirsch, 2011; Lu & Hirsch, 2005). Asimismo, el hambreado de nutrientes en cultivos con glucosa permitió la identificación de una vía alternativa a la de Ras/cAMP que afecta a los blancos de PKA. Una evidencia que da soporte a esta hipótesis es la activación de la enzima trehalasa (sustrato de PKA), frente a la adición de nutrientes a cultivos fermentables de mutantes de delección de la subunidad regulatoria. Este mecanismo alternativo de activación recibió el nombre de vía *Fermentable Growth Medium* (Conrad et al., 2014; Johan M. Thevelein et al., 2000).

Estudios de estructuras cristalográficas tanto de las subunidades aisladas (Kim, Xuong, & Taylor, 2005) como del complejo holoenzima R:C de mamíferos permitieron postular un mecanismo secuencial dependiente de cAMP de activación de la quinasa (Kim, Cheng, Saldanha, & Taylor, 2007). El primer paso (Figura 4) es la unión de una molécula de cAMP al dominio B; en tanto que el A se encuentra enmascarado por la interacción R/C. Esto genera un cambio conformacional de la subunidad R que disminuye la afinidad por la subunidad C. Luego ocurre la unión de una segunda molécula de cAMP en el dominio A, y la disociación de la subunidad C del sitio de pseudosustrato en R, liberando a la enzima para la fosforilación de sustratos (Kim et al., 2007). En este último paso es importante el sustrato, ya que compite con el pseudosustrato por el sitio catalítico de C (Vigil et al., 2004).

Recientemente en nuestro laboratorio se estableció que en *S.cerevisiae*, al igual que para la PKA de mamíferos, el sustrato juega un rol en la disociación de la holoenzima sensibilizada por cAMP. La concentración local del nucleótido cíclico, así como la del sustrato son por lo tanto factores clave en el mecanismo de activación de la holoenzima PKA (Fiorella Galello et al., 2010).

Se han reportado otros puntos de control de la actividad de PKA en *S.cerevisiae*. Por un lado, PKA es regulada negativamente por la fosforilación del sitio PDK1 en el *loop* de activación de Tpk1,

Tpk2 y Tpk3, por la quinasa Pkh1 (homóloga de PDK1 de mamíferos). Experimentos publicados por nuestro laboratorio indican que la eficiencia de fosforilación de cada Tpk por Pkh1 *in vivo* es diferente (Tpk1>Tpk3>Tpk2) e independiente de la fuente de carbono, lo que sería relevante para establecer propiedades específicas para cada una. A diferencia de lo que ocurre con Tpk1, cuya fosforilación por Pkh1 incrementa su afinidad por Bcy1, la fosforilación de Tpk2 por Pkh1 no se requiere para su interacción con la subunidad regulador, pero sí es necesario que se fosforile en un sitio diferente al PDK1. Por otro lado, la fosforilación de Tpk3 en el sitio PDK1 no es suficiente para mediar la interacción con Bcy1. Ésta y otras evidencias sugerirían que Tpk3 es pobremente regulada por proteínas Pkh y por Bcy1 (Haesendonckx et al., 2012). Asimismo existe un mecanismo de autofosforilación de Tpk1, promovido por la adición de glucosa a cultivos creciendo en glicerol. La autofosforilación de Tpk1 provoca una relocalización de la subunidad en el citoplasma y un incremento en la actividad catalítica de PKA, lo que contribuiría al mantenimiento del crecimiento fermentativo (Solari et al., 2014).

Localización subcelular de las subunidades de PKA

En todas las células vivas operan distintas vías cAMP/PKA paralelas que fosforilan diferentes sustratos en respuesta a estímulos determinados. Un mecanismo que controla la especificidad de la respuesta es la localización subcelular de las proteínas en compartimientos de señalización limitados. En células de mamíferos, la PKA es anclada a través de la interacción de R con proteínas AKAPs (*A-Kinase Anchor Proteins*) en sitios específicos de la célula, en las cercanías del sustrato y de otras enzimas, generando complejos de señalización (Pidoux & Tasken, 2010). El control temporal está dado por la generación de microdomonios de cAMP (Figura 5), debidos al balance de las actividades de adenilato ciclasas (ACs) de membrana y fosfodiesterasas (PDEs) solubles que se asocian con las AKAPs (Baillie, Scott, & Houslay, 2005). Los miembros de la familia de las AKAPs son estructuralmente diversos, y se definen en base a su habilidad para unir a PKA (Pidoux & Tasken, 2010). Tanto la holoenzima de tipo I como la de tipo II (conformadas por RI y RII respectivamente) se encuentran principalmente en citoplasma (Pidoux & Tasken, 2010). Una gran proporción de PKA II se halla anclada en estructuras subcelulares específicas a través de proteínas AKAPs (Barradeau, Imaizumi-Scherrer,

Weiss, & Faust, 2002; Welch, Jones, & Scott, n.d.; Wong & Scott, 2004). Frente a la estimulación con cAMP, las subunidades C libres difunden hacia el núcleo (Mayr & Montminy, 2001).

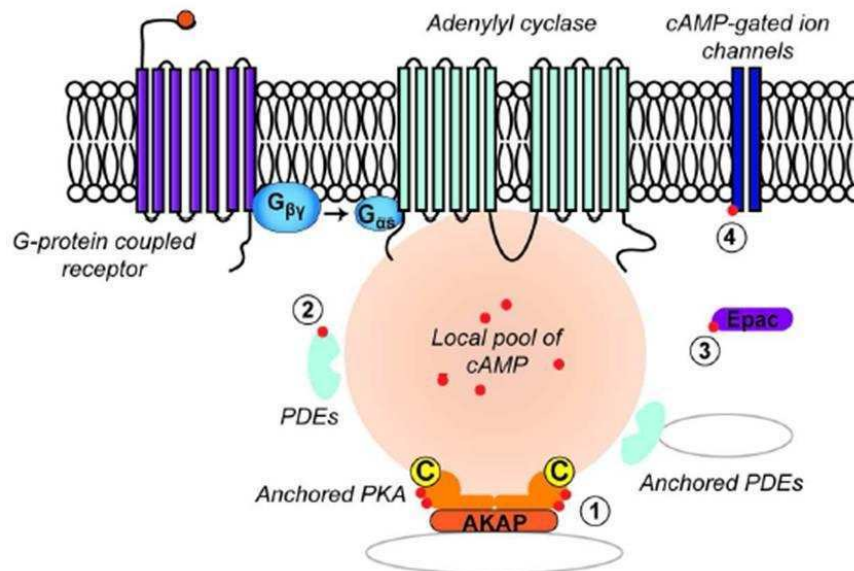


Figura 5. Esquema de la localización de PKA.

Generación de microdominios de cAMP y localización subcelular de PKA de mamíferos mediada por proteínas AKAPs. La unión del ligando a varios GPCRs activa a las ACs próximas, que generan *pools* de cAMP. La concentración local y la distribución del gradiente de cAMP es limitado por PDEs. Este mecanismo sirve para localizar y limitar el ensamblaje e inicio de vías de señalización específicas en áreas definidas de las células donde localizan los sustratos (Pidoux & Tasken, 2010).

Considerando el rol pleiotrópico de la PKA en *S.cerevisiae*, organismo unicelular, y la gran diversidad de sustratos en diferentes sitios subcelulares a los que debe acceder esta quinasa para lograr las distintas respuestas; deben existir mecanismos que aseguren la fosforilación de los sustratos correctos bajo las condiciones apropiadas.

En levaduras, Zds1 fue la primera proteína descrita como putativa AKAP, por surgir como interactora de Bcy1 en un ensayo de doble híbrido (G Griffioen et al., 2001). Más recientemente en nuestro laboratorio se ha reportado una breve lista de proteínas que interactúan con la subunidad reguladora de PKA (F. Galello, Moreno, & Rossi, 2014). Al igual que en el caso de Zds1, la interacción es

por el extremo N-terminal de Bcy1 (F. Galello et al., 2014), dominio que se postula que es responsable de su estructura dimérica y esencial para su localización subcelular (Gerard Griffioen & Thevelein, 2002). Los determinantes químicos y estructurales que median la asociación entre estas proteínas y Bcy1 son diferentes a los de mamíferos, motivo por el cual no se las define como AKAPs (F. Galello et al., 2014). Durante el crecimiento en glucosa, cuando la actividad de PKA es máxima, Bcy1 localiza mayoritariamente en núcleo junto a Tpk2, mientras que Tpk1 y Tpk3 se encuentran en el citoplasma, posiblemente en condiciones de fosforilar sustratos (G. Griffioen et al., 2001; Gerard Griffioen, Anghileri, Imre, Baroni, & Ruis, 2000; Tudisca et al., 2010). En cambio, en un medio con glicerol, todas las subunidades muestran una distribución nucleocitoplasmática (Tudisca et al., 2010). En fase estacionaria, todas las subunidades localizan en citoplasma. La salida de Bcy1 del núcleo es mediada por su fosforilación en el extremo N-terminal, lo que además favorece su interacción con la proteína Zds1 que la retiene en el citoplasma. Yak1, una proteína quinasa que interviene en la respuesta a diversas condiciones de estrés, como el nutricional, participa indirectamente en este proceso (G. Griffioen et al., 2001). Tpk2 y Tpk3 particularmente son secuestrados en gránulos ribonucleoproteicos citoplasmáticos, y se sugirió que tendrían una función regulatoria en la traducción durante esta fase de crecimiento (Tudisca et al., 2010).

Niveles de expresión de las subunidades de PKA

La expresión de las subunidades R y C de mamíferos muestra patrones diferentes en varias células y tejidos, y en distintos estadios de desarrollo y diferenciación. Por ejemplo, se ha reportado que RI α se expresa en corazón y en el sistema nervioso central de ratón, mientras que RI β se restringe a tejidos nerviosos como cordón espinal y cerebro (Cadd & Mcknight, 1989). Más aún, RII α se expresa en corazón y RII β en hígado y en tejido graso; y ambas coexpresan en cerebro (Cummings et al., 1996). Asimismo las subunidades R y C de PKA muestran distintos patrones de expresión durante los estadios de diferenciación de las células germinativas masculinas (Reinton et al., 1998).

En mamíferos los niveles de expresión de las subunidades de PKA están sujetos a regulación por hormonas que actúan vía receptores acoplados a proteína G, señales mitogénicas a través de receptores tirosina kinasa (PTK) y hormonas esteroideas (Skalhegg & Tasken, 2000). Se ha visto además

que la regulación de las subunidades de PKA por cAMP actúa modulando la transcripción de sus genes y la estabilidad de sus mRNAs, así como también alterando la estabilidad proteica de R y C luego de la disociación de la holoenzima (Tasken, Skilheggs, Tasken, Hanssons, & Kiil, 1993).

En cuanto al estudio de las secuencias río arriba de los genes que codifican para R y C en mamíferos, se ha visto que todos menos el promotor de C γ presentan promotores ricos en GC y sin TATA; siendo éstas características de genes altamente regulados y expresados en bajo nivel (Skalhegg & Tasken, 2000). Los genes R1 α y R11 β son regulados por cAMP. El primero a través de un sitio consenso CRE en su región 5', en tanto que el segundo parece poseer regiones de respuesta a cAMP distintas de los clásicos elementos CRE, TRE y AP-2 (Kagawa & Waterman, 1990; Lund, Bakke, Mellgren, Morohashi, & Døskeland, 1997).

En levaduras se ha demostrado que en el crecimiento en glucosa como en glicerol, el nivel proteico de Bcy1 es aproximadamente equivalente a la suma de los niveles de Tpk3, consistente con la estructura tetramérica de la holoenzima con distintas subunidades catalíticas. Por otra parte, en presencia de glicerol la abundancia proteica de Tpk3 es similar a la que presenta en glucosa, mientras que la abundancia de las otras tres subunidades de PKA es mayor en glicerol que en glucosa (Tudisca et al., 2010). En fase estacionaria los niveles proteicos de las Tpk3 aumentan mucho más que el nivel de aumento de Bcy1, sugiriendo que el balance estequiométrico entre las subunidades catalíticas y regulatoria no se mantiene (Tudisca et al., 2010). Esto resulta paradójico teniendo en cuenta la necesidad de una baja actividad PKA para la transición de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio cuando la glucosa se agota en el medio. La inhibición de la actividad de PKA no respondería a una inhibición por Bcy1 solamente, ya que no hay exceso de esta subunidad; ni tampoco a la disminución de cAMP, dado que en fase estacionaria los niveles están poco disminuidos respecto a fase logarítmica. Una posible respuesta a esta paradoja es la diferente localización subcelular de las subunidades, que se describió anteriormente en esta sección (Tudisca et al., 2010).

Fases de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y rol de PKA

El crecimiento y la división celulares se hallan fuertemente regulados en respuesta al ambiente y a la disponibilidad de nutrientes, por esto los organismos constantemente sensan la disponibilidad de

nutrientes del medio y ajustan en función el crecimiento celular (Dechant & Peter, 2008). En este proceso en *Saccharomyces cerevisiae* intervienen vías de señalización como las de TOR y cAMP/PKA, regulando el crecimiento y la progresión del ciclo celular (Zurita-martinez, Cardenas, & Carolina, 2005).

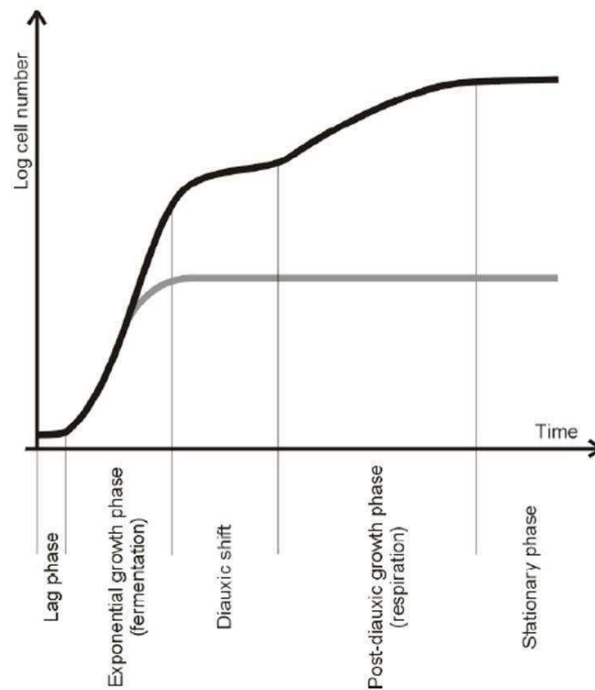


Figura 6. Perfil típico de densidad de un cultivo fermentativo de *S.cerevisiae*.

Línea negra: representación esquemática del aumento en el número de células y en la densidad celular de un cultivo en batch de *S.cerevisiae* inoculado en medio rico, conteniendo un azúcar de rápida fermentación como glucosa, como fuente de carbono. Línea gris: cuando un cultivo de levaduras en crecimiento exponencial es transferido a un medio que contiene glucosa pero al que le faltan otros nutrientes esenciales como nitrógeno o fosfato, las células arrestan el crecimiento y entran en un estado G_0 . Figura tomada de Swinnen et al., (2006).

En un cultivo de levaduras en condiciones aeróbicas con una fuente de carbono fermentable, como la glucosa, se identifican 5 fases a lo largo de su crecimiento (Figura 6), que se diferencian por el estado metabólico de las células (Herman, 2002): fase lag inicial (1), fase exponencial (2), *shift* diáuxico (3), fase post-diáuxica (4) y fase estacionaria (5). Las fases 1 y 3 corresponden a períodos de crecimiento retardado durante el ajuste metabólico a un nuevo sustrato, fuente de carbono fermentable en la primera fase; y no fermentable en la segunda, en la que la curva de DO_{600} vs tiempo

llega a un *plateau*. La fase 2 corresponde al crecimiento exponencial con elevados niveles de actividad fermentativa. En la fase 4 el crecimiento exponencial es mucho más lento, con metabolismo respiratorio. En la fase estacionaria cesa el crecimiento debido a la falta de nutrientes esenciales, pero las células se mantienen viables y se denominan quiescentes. La última fase en el crecimiento de un cultivo es la de muerte celular, en la que se observa una disminución de la viabilidad celular luego de un largo período de hambreado (Lewis, Northcott, Learmonth, Attfield, & Watson, 1993).

El agregado de una fuente de carbono fermentable a un cultivo hambreado, promueve una gran reprogramación metabólica y transcripcional, con activación de genes de biosíntesis ribosomal y aumento en la acumulación de la biomasa. La glucosa es metabolizada a etanol, y a las células en este estadio se las denomina “células reprimidas”, haciendo referencia a la represión de la transcripción de genes del metabolismo respiratorio por vías de transducción de señales activadas por glucosa (Gancedo, 2008). Cuando la glucosa se agota en el medio las células se arrestan en la fase G_1 del ciclo celular, mientras cambian al metabolismo respiratorio para la utilización de fuentes de carbono no fermentables como el etanol o el acetato obtenidos en la fase exponencial (Werner-Washburne, Braun, Johnston, & Singer, 1993). Luego del *shift* diáuxico, las células adquieren algunas de las características de las células quiescentes, y continúan proliferando pero a una velocidad mucho menor. Cuando el cultivo llega a la saturación, las células se encuentran en estado de quiescencia (G_0 , debido a la condensación de los cromosomas), cesa la proliferación, no hay acumulación de biomasa y volumen, disminuyen la tasa de transcripción y de traducción, y además son más termo y osmotolerantes que las células en estado proliferativo (Gray et al., 2004).

El cAMP es un segundo mensajero que transduce, entre otras, la señal de presencia de glucosa en el medio. Es sintetizado por la adenilato ciclasa (Cyr1), enzima que a su vez es estimulada en forma paralela por las proteínas Gpa2 y Ras GTPasa. Gpa2 responde al receptor Gpr1. Los moduladores positivo y negativos por encima de Ras son Cdc25, e Ira1 y 2 respectivamente (Gancedo, 2008). Esta vía de señalización se describe en mayor detalle en el Capítulo 2 de esta Tesis.

Los niveles intracelulares de cAMP no son constantes a lo largo del crecimiento de un cultivo, y estas variaciones son acompañadas de cambios en los niveles de expresión de las proteínas que regulan su síntesis (Mitts, Bradshaw-Rouse, & Heideman, 1991; Russell, Bradshaw-Rouse, Markwardt, & Heideman, 1993). La adición de glucosa a un cultivo desreprimido origina un pico de cAMP (Russell

et al., 1993), cuya dinámica es seguida por la dinámica de actividad catalítica de PKA (Portela & Moreno, 2006). Hacia el *shift* diáuxico, el nivel de cAMP disminuye y PKA se inactiva, requisito para el cambio a metabolismo respiratorio (Park, Grant, & Dawes, 2005). Luego, durante la fase post-diáuxica cuando las células reanuncian el crecimiento, el cAMP vuelve a aumentar, pero a un nivel inferior al observado durante la fase exponencial, y se mantiene constante a lo largo de la fase estacionaria (Russell et al., 1993). Sin embargo, como ya se detalló, trabajos recientes indicarían que el cAMP no es el único regulador de la actividad de PKA.

Mediante el empleo de mutantes de baja o alta actividad PKA se estudió el rol de la holoenzima en las distintas etapas del crecimiento de un cultivo. La vía de PKA actúa como inhibitoria de la entrada al estado de quiescencia (Gray et al., 2004). Una mutante *TPK1bcy1Δ* con actividad de PKA desregulada, muestra un crecimiento acelerado respecto a la cepa WT, pero muere en el *shift* diáuxico sin entrar en fase estacionaria, indicando que es necesaria una disminución en la actividad de la enzima para el cambio de metabolismo fermentativo a oxidativo (Russell et al., 1993; Toda, Cameron, Sass, Zoller, & Wigler, 1987). Por el contrario, una mutante *tpk1^wBCY1* con actividad disminuida de PKA, presenta un crecimiento lento, con transición normal a la fase estacionaria (Cameron, Levin, Zoller, & Wigler, 1988); pero muestra un retraso en reanunciar el crecimiento cuando es transferida a un medio con glucosa, indicando que se requiere la señalización por PKA para la salida del estado de quiescencia (Jiang, Davis, & Broach, 1998).

En resumen, las características descritas suman importancia al estudio individual de cada subunidad de PKA, ya que las diferencias en las afinidades con los sustratos, en las interacciones con proteínas de anclaje, en la localización subcelular contribuyen dando especificidad a los distintos caminos de señalización por la vía de PKA y por lo tanto a la posibilidad de regular diferentes procesos celulares. Un punto más de control de la especificidad es la regulación de los niveles de expresión de los genes *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* y *BCY1*. Poco se ha investigado sobre este tema y es el foco de estudio de esta Tesis.

BIBLIOGRAFÍA

- Baillie, G. S., Scott, J. D., & Houslay, M. D. (2005). Compartmentalisation of phosphodiesterases and protein kinase A: Opposites attract. *FEBS Letters*, *579*(15), 3264–3270. doi:10.1016/j.febslet.2005.03.089
- Banky, P., Roy, M., Newlon, M. G., Morikis, D., Haste, N. M., Taylor, S. S., & Jennings, P. A. (2003). Related protein-protein interaction modules present drastically different surface topographies despite a conserved helical platform. *Journal of Molecular Biology*, *330*(5), 1117–29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12860132>
- Barradeau, S., Imaizumi-Scherrer, T., Weiss, M. C., & Faust, D. M. (2002). Intracellular targeting of the type-I alpha regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *12*(6), 235–241.
- Budhwar, R., Fang, G., & Hirsch, J. P. (2011). Kelch repeat proteins control yeast PKA activity in response to nutrient availability. *Cell Cycle*, *10*(May 2015), 767–770. doi:10.4161/cc.10.5.14828
- Cadd, G., & Mcknight, G. S. (1989). Distinct Patterns of CAMP-Dependent Gene Expression in Mouse Brain, *3*, 71–79.
- Cameron, S., Levin, L., Zoller, M., & Wigler, M. (1988). cAMP-independent control of sporulation, glycogen metabolism, and heat shock resistance in *S. cerevisiae*. *Cell*, *53*(4), 555–566. doi:10.1016/0092-8674(88)90572-7
- Chevtzoff, C., Vallortigara, J., Avéret, N., Rigoulet, M., & Devin, A. (2005). The yeast cAMP protein kinase Tpk3p is involved in the regulation of mitochondrial enzymatic content during growth. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1706*(1-2), 117–125. doi:10.1016/j.bbabi.2004.10.001
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H. N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Texeira, M., & Thevelein, J. M. (2014). Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, *38*, 254–299. doi:10.1111/1574-6976.12065
- Cummings, D. E., Brandon, E. P., Planas, J. V., Motamed, K., Idzerda, R. L., & McKnight, G. S. (1996). Genetically lean mice result from targeted disruption of the RII beta subunit of protein kinase A. *Nature*, *382*(6592), 622–6. doi:10.1038/382622a0
- Dechant, R., & Peter, M. (2008). Nutrient signals driving cell growth. *Current Opinion in Cell Biology*, *20*(6), 678–687. doi:10.1016/j.ceb.2008.09.009
- Galello, F., Moreno, S., & Rossi, S. (2014). Interacting proteins of protein kinase A regulatory subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Proteomics*, *109*, 261–275. doi:10.1016/j.jprot.2014.07.008

- Galello, F., Portela, P., Moreno, S., & Rossi, S. (2010). Characterization of substrates that have a differential effect on *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase A holoenzyme activation. *Journal of Biological Chemistry*, 285(39), 29770–29779. doi:10.1074/jbc.M110.120378
- Gancedo, J. M. (2008). The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 673–704. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00117.x
- Gimeno, C. J., Ljungdahl, P. O., Styles, C. a., & Fink, G. R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: Regulation by starvation and RAS. *Cell*, 68(6), 1077–1090. doi:10.1016/0092-8674(92)90079-R
- Gray, J. V, Petsko, G. a, Johnston, G. C., Ringe, D., Singer, R. a, & Werner-washburne, M. (2004). Sleeping Beauty : Quiescence in *Saccharomyces cerevisiae* “ Sleeping Beauty ”: Quiescence in *Saccharomyces cerevisiae* †. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 187–206. doi:10.1128/MMBR.68.2.187
- Griffioen, G., Anghileri, P., Imre, E., Baroni, M. D., & Ruis, H. (2000). Nutritional control of nucleocytoplasmic localization of cAMP-dependent protein kinase catalytic and regulatory subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(2), 1449–1456. doi:10.1074/jbc.275.2.1449
- Griffioen, G., Branduardi, P., Ballarini, a, Anghileri, P., Norbeck, J., Baroni, M. D., & Ruis, H. (2001). Nucleocytoplasmic distribution of budding yeast protein kinase A regulatory subunit Bcy1 requires Zds1 and is regulated by Yak1-dependent phosphorylation of its targeting domain. *Molecular and Cellular Biology*, 21(2), 511–523. doi:10.1128/MCB.21.2.511-523.2001
- Griffioen, G., & Thevelein, J. M. (2002). Molecular mechanisms controlling the localisation of protein kinase A. *Current Genetics*, 41(4), 199–207. doi:10.1007/s00294-002-0308-9
- Haesendonckx, S., Tudisca, V., Voordeckers, K., Moreno, S., Thevelein, J., & Portela, P. (2012). Activation loop of PKA catalytic isoforms is differentially phosphorylated by Pkh protein kinases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 320, 307–320. doi:10.1042/BJ20121061
- Herman, P. K. (2002). Stationary phase in yeast. *Current Opinion in Microbiology*, 5(6), 602–607. doi:10.1016/S1369-5274(02)00377-6
- Jiang, Y., Davis, C., & Broach, J. R. (1998). Efficient transition to growth on fermentable carbon sources in *Saccharomyces cerevisiae* requires signaling through the Ras pathway. *The EMBO Journal*, 17(23), 6942–6951. doi:10.1093/emboj/17.23.6942
- Johnson, K. E., Cameron, S., Toda, T., Wigler, M., & Zoller, M. J. (1987). Expression in *Escherichia coli* of BCY1, the regulatory subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(19), 8636–8642.

- Kagawa, N., & Waterman, M. R. (1990). cAMP-dependent transcription of the human CYP21B (P-450C21) gene requires a Cis-regulatory element distinct from the consensus cAMP-regulatory element. *Journal of Biological Chemistry*, *265*(19), 11299–11305.
- Kim, C., Cheng, C. Y., Saldanha, S. A., & Taylor, S. S. (2007). PKA-I Holoenzyme Structure Reveals a Mechanism for cAMP-Dependent Activation. *Cell*, *130*(6), 1032–1043. doi:10.1016/j.cell.2007.07.018
- Kim, C., Xuong, N.-H., & Taylor, S. S. (2005). Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RIalpha) subunits of PKA. *Science (New York, N.Y.)*, *307*(5710), 690–6. doi:10.1126/science.1104607
- Lewis, J. G., Northcott, C. J., Learmonth, R. P., Attfield, P. V., & Watson, K. (1993). The need for consistent nomenclature and assessment of growth phases in diauxic cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, *139*(4), 835–839. doi:10.1099/00221287-139-4-835
- Lu, A., & Hirsch, J. P. (2005). Cyclic AMP-Independent Regulation of Protein Kinase A Substrate Phosphorylation by Kelch Repeat Proteins Cyclic AMP-Independent Regulation of Protein Kinase A Substrate Phosphorylation by Kelch Repeat Proteins, *4*(11), 1794–1800. doi:10.1128/EC.4.11.1794
- Lund, J., Bakke, M., Mellgren, G., Morohashi, K., & Døskeland, S. O. (1997). Transcriptional regulation of the bovine CYP17 gene by cAMP. *Steroids*, *62*(1), 43–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9029713>
- Mashhoon, N., Carmel, G., Pflugrath, J. W., & Kuret, J. (2001). Structure of the unliganded cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *387*(1), 11–19. doi:10.1006/abbi.2000.2241
- Mayr, B., & Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *2*(8), 599–609. doi:10.1038/35085068
- Mazón, M. J., Behrens, M. M., Morgado, E., & Portillo, F. (1993). Low activity of the yeast cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit Tpk3 is due to the poor expression of the TPK3 gene. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, *213*(1), 501–506. doi:doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb17787.x
- Mitts, M. R., Bradshaw-Rouse, J., & Heideman, W. (1991). Interactions between adenylate cyclase and the yeast GTPase-activating protein IRA1. *Molecular and Cellular Biology*, *11*(9), 4591–4598. doi:10.1128/MCB.11.9.4591.Updated
- Palomino, a., Herrero, P., & Moreno, F. (2006). Tpk3 and Snf1 protein kinases regulate Rgt1 association with *Saccharomyces cerevisiae* HXK2 promoter. *Nucleic Acids Research*, *34*(5), 1427–1438. doi:10.1093/nar/gkl028

- Pan, X., & Heitman, J. (1999). Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, *19*(7), 4874–4887.
- Pan, X., & Heitman, J. (2002). Protein kinase A operates a molecular switch that governs yeast pseudohyphal differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(12), 3981–3993. doi:10.1128/MCB.22.12.3981-3993.2002
- Park, J. I., Grant, C. M., & Dawes, I. W. (2005). The high-affinity cAMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae* is the major determinant of cAMP levels in stationary phase: Involvement of different branches of the Ras-cyclic AMP pathway in stress responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *327*(1), 311–319. doi:10.1016/j.bbrc.2004.12.019
- Pidoux, G., & Tasken, K. (2010). Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. *Journal of Molecular Endocrinology*, *44*(5), 271–284. doi:10.1677/JME-10-0010
- Portela, P., & Moreno, S. (2006). Glucose-dependent activation of protein kinase A activity in *Saccharomyces cerevisiae* and phosphorylation of its TPK1 catalytic subunit. *Cellular Signalling*, *18*(7), 1072–1086. doi:10.1016/j.cellsig.2005.09.001
- Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., ... Snyder, M. (2005). Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature*, *438*(7068), 679–684. doi:10.1038/nature04187
- Reinton, N., Haugen, T. B., Ørstavik, S., Ska, B. S., Hansson, V., Jahnsen, T., & Taske, K. (1998). The Gene Encoding the C g Catalytic Subunit of cAMP-Dependent Protein Kinase Is a Transcribed Retroposon, *297*(49), 290–297.
- Rinaldi, J., Wu, J., Yang, J., Ralston, C. Y., Sankaran, B., Moreno, S., & Taylor, S. S. (2010). Structure of Yeast Regulatory Subunit: A Glimpse into the Evolution of PKA Signaling. *Structure*, *18*(11), 1471–1482. doi:10.1016/j.str.2010.08.013
- Robertson, L. S., Causton, H. C., Young, R. a, & Fink, G. R. (2000). The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(11), 5984–5988. doi:10.1073/pnas.100113397
- Robertson, L. S., & Fink, G. R. (1998). The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(23), 13783–13787. doi:10.1073/pnas.95.23.13783
- Russell, M., Bradshaw-Rouse, J., Markwardt, D., & Heideman, W. (1993). Changes in gene expression in the Ras/adenylate cyclase system of *Saccharomyces cerevisiae*: correlation with cAMP levels and growth arrest. *Molecular Biology of the Cell*, *4*(7), 757–765.

- Shabb, J. B. (2001). Physiological Substrates of cAMP-Dependent Protein Kinase Physiological Substrates of cAMP-Dependent Protein Kinase, *101*(8), 2381–2412. doi:10.1021/cr000236l
- Skalhegg, B. S., & Tasken, K. (2000). Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, *5*, D678–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10922298>
- Solari, C. A., Tudisca, V., Pugliesi, M., Nadra, A. D., Moreno, S., & Portela, P. (2014). Regulation of PKA activity by an autophosphorylation mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical Journal*, *579*, 567–579. doi:10.1042/BJ20140577
- Swinnen, E., Wanke, V., Roosen, J., Smets, B., Dubouloz, F., Pedruzzi, I., ... Winderickx, J. (2006). Rim15 and the crossroads of nutrient signalling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Division*, *1*, 3. doi:10.1186/1747-1028-1-3
- Tasken, K., Skilheggs, S., Tasken, K. A., Hanssons, V., & Kiil, H. (1993). Reciprocal Regulation of mRNA and Protein for Subunits of CAMP-dependent Protein Kinase (R h and Ca) by cAMP in a Neoplastic B Cell Line (Reh)* hormones.
- Taylor, S. S., Ilouz, R., Zhang, P., & Kornev, A. P. (2012). Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *13*(10), 646–58. doi:10.1038/nrm3432
- Taylor, S. S., Kim, C., Cheng, C. Y., Brown, S. H. J., Wu, J., & Kannan, N. (2008). Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: Diverse strategies for drug design. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1784*(1), 16–26. doi:10.1016/j.bbapap.2007.10.002
- Thevelein, J. M. (1984). Cyclic-AMP content and trehalase activation in vegetative cells and ascospores of yeast. *Archives of Microbiology*, *138*(1), 64–67. doi:10.1007/BF00425409
- Thevelein, J. M., Cauwenberg, L., Colombo, S., De Winde, J. H., Donation, M., Dumortier, F., ... Winderickx, J. (2000). Nutrient-induced signal transduction through the protein kinase A pathway and its role in the control of metabolism, stress resistance, and growth in yeast. *Enzyme and Microbial Technology*, *26*(9-10), 819–825. doi:10.1016/S0141-0229(00)00177-0
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Scott, J. D., McMullen, B., ... Wigler, M. (1987). Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, *7*(4), 1371–1377. doi:10.1128/MCB.7.4.1371
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., & Wigler, M. (1987). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell*, *50*(2), 277–287. doi:10.1016/0092-8674(87)90223-6

- Tudisca, V., Recouvreux, V., Moreno, S., Boy-Marcotte, E., Jacquet, M., & Portela, P. (2010). Differential localization to cytoplasm, nucleus or P-bodies of yeast PKA subunits under different growth conditions. *European Journal of Cell Biology*, *89*(4), 339–348. doi:10.1016/j.ejcb.2009.08.005
- Uhler, M. D., Carmichael, D. F., Lee, D. C., Chrivia, J. C., Krebs, E. G., & McKnight, G. S. (1986). Isolation of cDNA clones coding for the catalytic subunit of mouse cAMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(March), 1300–1304.
- Uhler, M. D., Chrivia, J. C., & McKnight, G. S. (1986). Evidence for a second isoform of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, *261*, 15360–15363.
- Vandamme, J., Castermans, D., & Thevelein, J. M. (2012). Molecular mechanisms of feedback inhibition of protein kinase A on intracellular cAMP accumulation. *Cellular Signalling*, *24*(8), 1610–8. doi:10.1016/j.cellsig.2012.04.001
- Vigil, D., Blumenthal, D. K., Brown, S., Taylor, S. S., & Trewella, J. (2004). Differential Effects of Substrate on Type I and Type II PKA Holoenzyme Dissociation. *Biochemistry*, *43*(19), 5629–5636. doi:10.1021/bi0499157
- Welch, E. J., Jones, B. W., & Scott, J. D. (n.d.). Emily J. Welch, Brian W. Jones, and John D. Scott, 86–97.
- Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G. C., & Singer, R. A. (1993). Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, *57*(2), 383–401. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=372915&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Wong, W., & Scott, J. D. (2004). AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *5*(12), 959–970. doi:10.1038/nrm1527
- Yamano, S., Tanaka, K., Matsumoto, K., & Toh-e, A. (1987). Mutant regulatory subunit of 3',5'-cAMP-dependent protein kinase of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *MGG Molecular & General Genetics*, *210*(3), 413–418. doi:10.1007/BF00327191
- Zimmermann, B., Chiorini, J. a, Ma, Y., Kotin, R. M., Herberg, W., & Herberg, F. W. (1999). PROTEIN CHEMISTRY AND STRUCTURE : PrKX Is a Novel Catalytic Subunit of the cAMP-dependent Protein Kinase Regulated by the Regulatory Subunit Type I PrKX Is a Novel Catalytic Subunit of the cAMP-dependent Protein Kinase Regulated by the Regulatory Subunit , *274*(9), 5370–5378. doi:10.1074/jbc.274.9.5370
- Zurita-martinez, S. a, Cardenas, M. E., & Carolina, N. (2005). Tor and Cyclic AMP-Protein Kinase A : Two Parallel Pathways Regulating Expression of Genes Required for Cell Growth. *Eukaryotic Cell*, *4*(1), 63–71. doi:10.1128/EC.4.1.63

CAPÍTULO 1

REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LAS SUBUNIDADES DE LA PROTEÍNA QUINASA A EN ESTRÉS TÉRMICO Y SALINO

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La respuesta a estrés en *Saccharomyces cerevisiae*

Para sobrevivir a condiciones ambientales variables y multiplicarse, las levaduras desarrollaron mecanismos de sensado y señalización que les permiten adaptar rápidamente su fisiología al nuevo ambiente (An Tanghe, 2006). La caracterización de los programas de expresión génica de levaduras mediante estudios genómicos de respuesta a distintas condiciones ambientales reveló que una fracción sustancial de cada respuesta es común a todas las condiciones testeadas. Esta respuesta común fue denominada Respuesta al Estrés Ambiental (ESR), y tiene como fin la protección de características críticas de la homeostasis interna (Gasch et al., 2000). La ESR es transiente, los mayores cambios a nivel transcripcional ocurren inmediatamente luego del estrés (An Tanghe, 2006) e involucran la variación en la expresión de aproximadamente el 10% de los genes de *S.cerevisiae* (Causton et al., 2001; Gasch et al., 2000). La abundancia de mRNAs (que probablemente refleje cambios transcripcionales, aunque también podría incluir diferencias en la estabilidad del mRNA (Castells-Roca et al., 2011)) de aproximadamente 600 genes decrece, en tanto que 300 son inducidos (Causton et al., 2001; Gasch et al., 2000). De los genes que se inducen, sólo del 1-3% son necesarios para sobrevivir al estrés (Dow et al., 2002), mientras que el resto se induce para su rápida activación por modificación post-traducciona en caso de ser requeridos (Hohmann & Mager, 2003). Entre éstos se encuentran los involucrados en el metabolismo de carbohidratos y de ácidos grasos, en el plegamiento y degradación de proteínas, y también en la reparación del daño al DNA (Hahn & Thiele, 2004). Una posible explicación para esto es la protección cruzada que se observó en células expuestas a bajas dosis de un estrés, que se vuelven resistentes a situaciones de estrés distintas posteriores, en dosis que de otra forma serían letales (Berry & Gasch, 2008; Guan, Haroon, Bravo, Will, & Gasch, 2012).

1.2. Estrés térmico

El crecimiento óptimo de *Saccharomyces cerevisiae* es a temperaturas que van de los 25°C a los 30°C. Temperaturas superiores a los 36°C/37°C inician en las células un programa transcripcional

protector conocido como respuesta al *shock* térmico (HSR), que es un subgrupo de la ESR conformado por genes que requieren de Hsf1 y/o Msn2/4 para su activación (Figura 1.1). El estrés térmico altera además otros componentes de la fisiología, incluyendo la composición de la membrana y el flujo de hidratos de carbono (Morano, Grant, & Moye-Rowley, 2012). Se ha establecido cierta división entre las vías de Hsf1 y Msn2/4 en respuesta al *shock* térmico: Hsf1 parece ser principalmente responsable de la producción de chaperonas (genes HSP) en general y también media la inducción de genes relacionados con ubiquitinación de proteínas; mientras que Msn2/4 regularían la expresión de genes involucrados en diferentes vías del metabolismo celular, como *HXK1* (metabolismo de fuentes de carbono), *CTT1* y *SOD2* (detoxificación de especies reactivas de oxígeno). También estimulan la transcripción de genes de chaperonas y genes necesarios para la síntesis y degradación de la trehalosa, un disacárido que se acumula y cumple funciones citoprotectoras (Kano, Bentler, & Mooijaart, 1993).

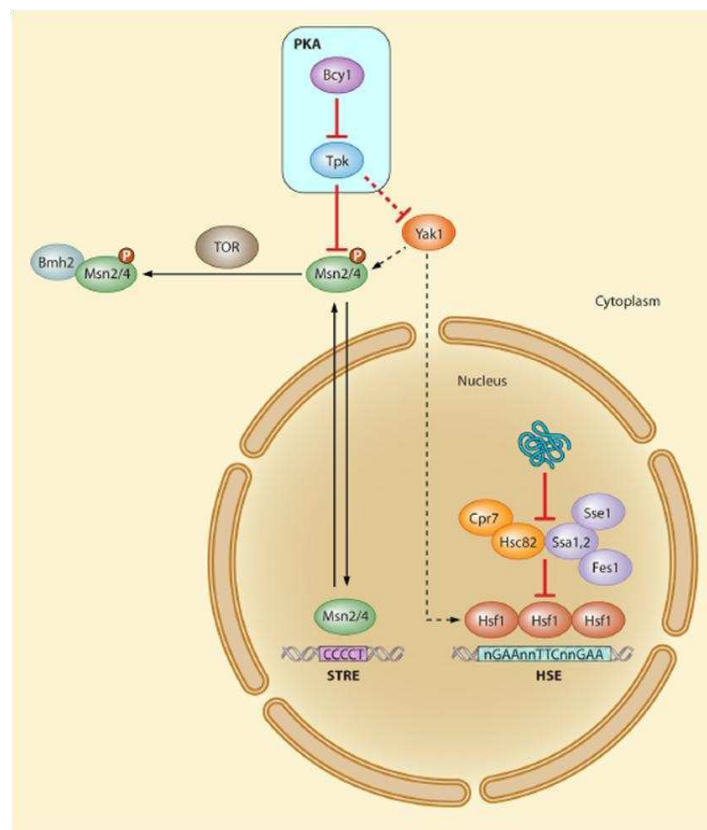


Figura 1.1. Hsf1 y Msn2/4 son los principales moduladores de la respuesta a estrés térmico.
Para más explicaciones ver el texto. Figura tomada de Verghese, Abrams, Wang, & Morano, (2012).

Los genes de respuesta al estrés térmico presentan en sus promotores elementos HSE (*Heat Shock Element*), de secuencia canónica nGAAn (Sorger & Pelham, 1988) y/o STRE (*Stress Responsive Element*), de secuencia CCCCT (Martínez-Pastor et al., 1996), que funcionan de manera redundante. HSE sería principalmente regulado por Hsf1, mientras que Msn2/4 unirían preferencialmente al elemento STRE (Trott & Morano, 2003).

El mecanismo de activación de Msn2/4 por calor, al igual que el de Hsf1, que conduce a la reprogramación transcripcional no se conoce (Thevelein et al., 2000), pero se vio que la hiperfosforilación de las tres proteínas es un paso necesario (Morano et al., 2012). Hsf1 se encuentra constitutivamente asociado a regiones promotoras de genes HSP, consistente con la letalidad de una cepa *hsf1Δ* (Verghese et al., 2012). Ciertas evidencias indican que las quinasas PKA y Yak1 fosforilan a Hsf1, pero su rol en la activación y/o inhibición del factor de transcripción aún no está claro (Ferguson et al., 2005; Lee, Cho, Joo, & Hahn, 2008).

Msn2 y Msn4 presentan un 32% de identidad a nivel de secuencia aminoacídica y un 72% particularmente en el dominio de unión al DNA; y pertenecen a la familia de factores de transcripción que presentan estructuras dedo de zinc (Estruch & Carlson, 1993). Estudios genéticos indicaron que si bien ambos factores muestran redundancia funcional, cumplen también roles no redundantes y específicos en respuesta a diferentes tipos de estrés. Incluso, varios genes precisan de la acción de ambos factores para su inducción, lo que sugiere que pueden actuar cooperativamente, en forma simultánea o secuencial (Berry & Gasch, 2008). Para varios genes, la delección de *MSN2* resulta en una disminución en la inducción frente a la exposición a estrés, mientras que la delección de *MSN4* no influye en el nivel de expresión génica. Sin embargo, dado que en una mutante *msn2Δmsn4Δ* la inducción es más débil que la observada en una *msn2Δ*, Msn4 debe contribuir en el aumento del nivel transcripcional. Esto también indicaría que Msn2 y Msn4 pueden tener diferentes funciones en la célula (Kano et al., 1993). Consistente con esto, la expresión de *MSN2* es constitutiva en tanto que *MSN4* se induce por estrés (Chen et al., 2008; Gasch et al., 2000), lo que sugiere que Msn4 actuaría en el mantenimiento o la amplificación de la inducción génica, mediante un *feedback* positivo (Chen et al., 2008). Asimismo, se vio que el patrón de fosforilación de cada una es distinto, dependiendo del estímulo específico de estrés (Garreau et al., 2000).

1.3. Regulación de la actividad de Msn2/4 y la vía de PKA

Durante el crecimiento exponencial, Msn2 y Msn4 son principalmente citoplasmáticas, mientras que en células estresadas y por hambre de glucosa, se acumulan en el núcleo. Más aún, su distribución se encuentra en relación directa con la concentración de cAMP intracelular y la activación de la vía de cAMP/PKA (Görner et al., 1998, 2002). El empleo de las mutantes con alta y baja actividad de la quinasa permitió evidenciar la regulación negativa de localización nuclear de los factores (Görner et al., 1998), ejercida a través de la fosforilación de una secuencia NLS (*Nuclear Localization Signal*) en el extremo C-terminal. Esta regulación es dependiente de la fuente de carbono y no del estrés (Görner et al., 1998, 2002). Otro dominio presente en el N-terminal de Msn2 también regula su localización subcelular y es controlado tanto por la disponibilidad de glucosa, como por estrés (Görner et al., 2002) y por la vía de señalización en la que participan la quinasa TOR y la fosfatasa PP2A (Mayordomo, Estruch, & Sanz, 2002; Santhanam et al., 2004). La quinasa TOR promueve el secuestro de Msn2 en el citoplasma por las proteínas Bmh1 y Bmh2, miembros de la familia de proteínas 14-3-3, que en humanos funcionan como factores de retención citoplasmáticos de proteínas fosforiladas en residuos de Serina (Beck & Hall, 1999). El dominio N-terminal de Msn2 incluiría una secuencia NES (*Nuclear Export Signal*) (Görner et al., 2002).

Como se mencionó en la Introducción General, mutantes con baja actividad PKA muestran un fenotipo de crecimiento pobre con arresto en G₁, acumulación de hidratos de carbono de reserva y elevada resistencia a estrés. La delección de Msn2/4 en esta mutante mostró el rol inhibitorio de los factores en el crecimiento, ya que la mutante *msn2Δmsn4Δ* con baja actividad PKA logra suprimir los defectos en el crecimiento (Smith, Ward, & Garrett, 1998).

El tráfico núcleo-citoplasmático de Msn2/4 es controlado por fosforilación y desfosforilación de las secuencias NLS y NES por PKA, que en crecimiento exponencial localiza en ambos compartimientos subcelulares (Gerard Griffioen, Anghileri, Imre, Baroni, & Ruis, 2000; Tudisca et al., 2010). El control de las secuencias NLS y NES de Msn2 da lugar a un comportamiento de traslado oscilatorio entre el núcleo y el citoplasma (Jacquet, Renault, Lallet, De Mey, & Goldbeter, 2003), que se atribuyó a oscilaciones en la concentración intracelular de cAMP (Garmendia-Torres, Goldbeter, & Jacquet, 2007), iniciadas por cambios en la vía de cAMP/PKA por estrés, y por un mecanismo de retroalimentación negativo de PKA sobre la síntesis de cAMP (Gonze, Jacquet, & Goldbeter, 2008). Frente a un estrés severo, Msn2

permanece en el núcleo; mientras que Msn4 continúa oscilando entre núcleo y citoplasma; lo que indicaría que ambas proteínas presentan diferencias en su sensibilidad a los niveles de cAMP (Jacquet et al., 2003). El tiempo de permanencia de Msn2 en el núcleo es proporcional a la intensidad del estrés (Jacquet et al., 2003; Medvedik, Lamming, Kim, & Sinclair, 2007), significando otro punto de control de la expresión génica que permitiría una máxima respuesta en los breves instantes en los cuales los factores alcanzan niveles elevados en el núcleo, pudiendo tener efectos letales si se mantuvieran por períodos de tiempo prolongados (Jacquet et al., 2003).

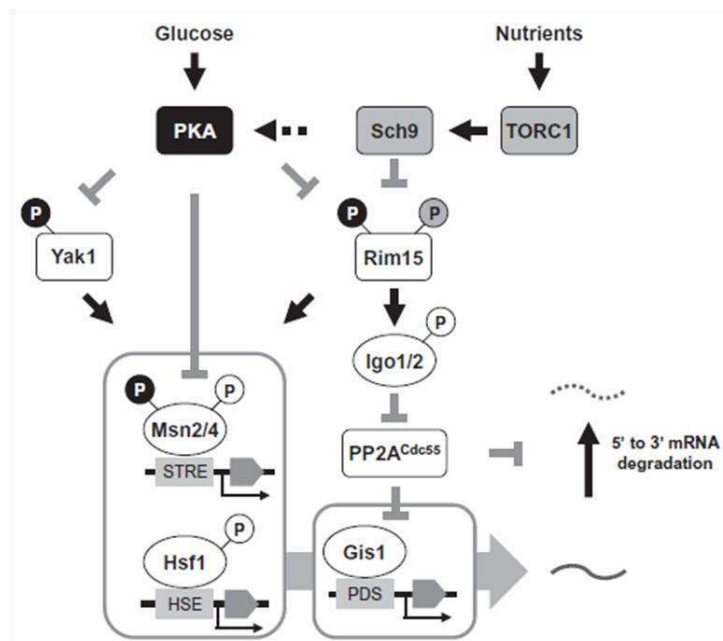


Figura 1.2. Modelo de la regulación de los genes blanco de Hsf1 y Msn2/4 por Yak1 y Rim15.

En elevadas concentraciones de glucosa, PKA inhibe la localización nuclear de Yak1 y Msn2/4, y la actividad quinasa de Rim15 por fosforilación directa. Sch9, una quinasa río abajo de TORC1 fosforila a Rim15, inhibiendo su localización nuclear. TORC1 también controla algunos blancos de PKA por activación de ésta a través de Sch9. Frente al hambre de nutrientes, Yak1 y Rim15 activadas en el núcleo, activan a Hsf1 y Msn2/4 por fosforilación directa. La fosforilación de Igo1/2 por Rim15 inhibe a PP2A^{Cdc55}, activando así a Gis1, que es sustrato de esta fosfatasa (Lee et al., 2013).

La activación de Msn2/4 es regulada en varios niveles, se ha demostrado que sólo su translocación al núcleo no es suficiente para la inducción de la transcripción. La hiperfosforilación y

activación de Msn2/4 se impide por el agregado de cAMP, lo que nuevamente muestra el rol antagónico de PKA en la activación de genes dependientes de STRE (Figura 1.2). La disminución de cAMP promueve la desfosforilación de Msn2/4 en los sitios dependientes de PKA, permitiendo entonces la fosforilación por otras quinasas en otros sitios (Garreau et al., 2000). Otro punto de regulación es la unión a las secuencias STRE de los genes blanco, en la que estaría implicada la quinasa GSK-3, posiblemente mediante la modificación del estado de fosforilación de Msn2, pero no activaría la transcripción (Hirata, Andoh, Asahara, & Kikuchi, 2003). Asimismo se ha demostrado la participación de la quinasa Yak1 en la fosforilación de Msn2 (Lee et al., 2008). Frente a la depleción de glucosa, ambas proteínas translocan al núcleo, donde Yak1 fosforila a Msn2, que se activa por un mecanismo que aún no se conoce (Lee et al., 2008). Este proceso se encuentra bajo el control negativo de PKA en altas concentraciones de glucosa (Görner et al., 1998; Moriya et al., 2001), que fosforila tanto a Yak1 como a Msn2 promoviendo su retención en el citoplasma (Lee et al., 2008; Lee, Paik, Shin, Huh, & Hahn, 2011). Además, la expresión génica de *YAK1* es mediada por Msn2/4, lo que sugiere un potencial *loop* autorregulatorio (Malcher, Schladebeck, & Mösch, 2011).

Una vez unido a los promotores de genes de respuesta a estrés, Msn2 media el ensamblaje del complejo de transcripción, lo que induce su fosforilación por Srb10, un miembro del complejo Mediador (T. I. Erkina, Lavrova, & Erkin, 2009). Esta marcación lo dirige a degradación por el proteasoma, en un mecanismo de control transcripcional destinado a prevenir la excesiva transcripción de genes de respuesta a estrés, que fue denominado modelo de “viuda negra” (Tansey, 2001). La mayor parte del activador transcripcional es degradado, mientras que las moléculas que no estaban unidas al DNA son exportadas al citoplasma por Msn5. Durante la degradación de Msn2 y su exportación nuclear, el complejo de transcripción escapa de los promotores, y vuelve cuando se repite el ciclo. Durante situaciones de estrés, las concentraciones de cAMP disminuyen y se rompe la interacción Msn2-Bmh2 por una fosfatasa desconocida, lo que resulta en una importación sostenida de Msn2 al núcleo y la consecuente activación transcripcional de sus genes blanco (T. I. Erkina et al., 2009).

Se ha descrito un mecanismo de regulación del gen *IME1*, en el que además de Msn2/4 interviene el factor de transcripción Sok2 (Shenhar & Kassir, 2001). Sok2 es regulado por PKA, y tiene un rol dual en la transcripción, como represor o como activador, en dependencia de la fuente de

carbono (Shenhar & Kassir, 2001). Una vez asociado al DNA, Sok2 interacciona a través de su dominio N-terminal con Msn2/4, de forma que en su ausencia, la unión de Msn2/4 al sitio blanco es ineficiente (Shenhar & Kassir, 2001).

1.4. La vía de Rim15/Gis1 y su relación con la respuesta a estrés

Cuando en un cultivo algún nutriente como glucosa, nitrógeno o fosfato escasea, las células entran en un estado G_0 , caracterizado por una reprogramación transcripcional y metabólica. Ciertas situaciones de estrés ambiental conducen a las células a un estado similar a G_0 , en el que se inducen genes de respuesta a estrés y se acumula trehalosa (Conrad et al., 2014). Consistente con esto, las vías de transducción de señales de nutrientes y de estrés convergen en los componentes Msn2/4 (Morano et al., 2012). Recientemente se ha identificado a la quinasa Rim15 como esencial para la correcta entrada al estado de G_0 , integrando señales de diferentes quinasas sensoras de nutrientes (Swinnen et al., 2006). Diversos estudios genéticos permitieron indicar que Rim15, al igual que Yak1, se encuentra inmediatamente bajo el control negativo por fosforilación de PKA y de TORC1 (A Reinders, Bürckert, Boller, Wiemken, & De Virgilio, 1998). Un importante efector río debajo de Rim15 es el factor de transcripción Gis1 (Figura 1.2), que une a los elementos PDS (*Post-Diauxic Shift*) de sus genes blanco, que se desreprimen frente al agotamiento de glucosa (Pedruzzi, Bürckert, Egger, & De Virgilio, 2000). La parte central y conservada del elemento PDS se asemeja mucho al elemento STRE, más aún, Msn2/4 superponen parcialmente sus funciones con Gis1 *in vivo*, y regularían la transcripción de un gran grupo de genes de manera cooperativa (Cameroni, Hulo, Roosen, Winderickx, & De Virgilio, 2004; Pedruzzi et al., 2000; Roosen et al., 2005). Sin embargo, son también capaces de distinguir entre un elemento y el otro, indicando que no son funcionalmente equivalentes (Pedruzzi et al., 2000). Se ha reportado que Msn2, Msn4 y Gis1 median casi completamente los efectos dependientes de Rim15 en la transcripción frente al *shift* diáuxico en respuesta al estrés oxidativo (Cameroni et al., 2004; Zhang, Wu, & Oliver, 2009). Estudios *in vitro* indicaron que Msn2 es sustrato de fosforilación de Rim15, en tanto que Gis1 no lo es, pero es necesaria la actividad quinasa de Rim15 para la transcripción dependiente de Gis1 (Lee et al., 2013). Rim15 y Yak1 fosforilan diferentes sitios de Msn2, indicando que aunque tengan funciones redundantes, alcanzarían diferentes niveles de activación de los factores de transcripción

(Lee et al., 2013). Rim15 promueve también la estabilización de los transcriptos que induce mediante fosforilación de Igo1/Igo2 (dos factores que previenen el *decapping* y la subsecuente degradación 5'-3' del mRNA (Luo, Talarek, & De Virgilio, 2011)); y se ha propuesto que Yak1 tendría una función similar mediante la regulación de Pop2, un componente del complejo deadenilasa Ccr4-Not que promueve el decaimiento del mRNA (Lee et al., 2013). Por último Gis1 regula la expresión de *MSN4* (Zhang et al., 2009).

1.5. Estrés salino

La adición de altas concentraciones de sal al medio no sólo significa para las células un estrés osmótico, sino también un estrés iónico (An Tanghe, 2006). Los sistemas de transporte de membrana como las H⁺-ATPasas, ATPasas exportadoras de Na⁺ (Pmr2/Ena1), los antitransportadores Na⁺/H⁺ (Nha1 y Nhx1), los transportadores de K⁺ (Trk1/2) y varios canales iónicos, son componentes involucrados en la exclusión de NaCl de las células en *S.cerevisiae*, y en el mantenimiento de la relación K⁺/Na⁺ intracelular dentro del rango fisiológico (Kano et al., 1993).

La respuesta transcripcional a la adición de NaCl es similar a la que ocurre por el agregado de una concentración isosmótica de sorbitol, siendo sólo 10 los genes que muestran una inducción diferencial y fuerte por la sal (An Tanghe, 2006).

La vía de señalización que ejerce el mayor control de la reprogramación génica en respuesta al estrés salino, es la de la MAP quinasa Hog1. Varios de los genes que se inducen comparten elementos en sus promotores, lo que indica que factores de transcripción específicos están involucrados en su regulación. Por ejemplo, muchos genes dependientes de Hog1 son también inducidos por Msn2/4.

Por otro lado, se han descrito varias vías de señalización que transmiten la señal específica de Na⁺, que involucran mecanismos específicos de detección. Asimismo, se ha reportado la acumulación de osmoprotectores específicos para contraponer a la deshidratación por estrés hiperosmótico, como el glicerol (Hohmann & Mager, 2003).

1.6. Cambios en la estabilidad del mRNA en situaciones de estrés

La expresión génica cumple un rol central en la adaptación a condiciones ambientales cambiantes (Levy et al., 2007). Para comprender el estado del transcriptoma en una situación

particular, se deben analizar tanto la producción como la degradación de mRNAs. Un aumento en los niveles de mRNA puede alcanzarse con un incremento en la tasa de síntesis o con una disminución en la tasa de degradación. Del mismo modo, una disminución en los niveles de mRNA puede deberse a un aumento en la tasa de degradación o una disminución de la tasa de síntesis (Shalem et al., 2008). Es posible también que se establezcan relaciones más complejas entre la síntesis y la degradación. En el estado de equilibrio (cuando tasa de síntesis = tasa de degradación), la abundancia de mRNAs puede ser calculada como la relación entre la tasa de producción y la tasa de degradación (Pérez-Ortín, Alepuz, & Moreno, 2007).

En la respuesta a estrés salino estudiada por la técnica de *run-on* genómico (GRO) (Romero-Santacreu, Moreno, Pérez-Ortín, & Alepuz, 2009), se determinó que el aumento en la tasa de transcripción y en la estabilidad de los mRNAs inducidos contribuye a alcanzar el nivel de “osmo-mRNAs”. Asimismo, se estableció un aumento en la eficiencia de traducción de estos mRNAs. La estrategia cinética de regular la tasa de transcripción, la estabilidad de mRNAs y la tasa de traducción de un gen específico permite alcanzar un nuevo nivel de abundancia de un modo rápido y transiente, como se requiere en la respuesta a estrés. Por otro lado, los genes reprimidos, como los genes ribosomales, disminuyen su tasa de transcripción, la estabilidad de sus mRNAs y su eficiencia de traducción.

La estabilidad relativa de los genes inducidos por estrés salino cae en el período de adaptación celular al estrés, mientras que la abundancia en el estado de equilibrio (determinada como tasa de síntesis/tasa de degradación) de esos mRNAs cae en la fase posterior, la de recuperación al estrés, lo que indicaría que la regulación de la estabilidad antecede a los cambios en la abundancia en el estado de equilibrio. Los genes que son reprimidos muestran un patrón inverso con la misma diferencia temporal en la regulación (Molin, Jauhainen, Warringer, Nerman, & Sunnerhagen, 2009).

Actualmente, se está estudiando la participación en la regulación de la estabilidad de mRNAs, de factores que actúan en cis y en trans; por ejemplo se han publicado estudios computacionales de identificación de secuencias que hayan sido predichas que afectan la estabilidad de los mRNAs en sus extremos 3' UTR (*Untranslated Region*) (Foat, Houshmandi, Olivas, & Bussemaker, 2005).

1.7. Niveles de expresión de mRNAs de *TPKs* y *BCY1*

Análisis a nivel genómico, utilizando *microarrays* para determinar los niveles de mRNA en respuesta a cambios ambientales revelaron que *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* y *BCY1* están aumentados en condiciones de estrés térmico (Castells-Roca et al, PLoS ONE, 2011; Causton et al, Mol Biol Cell, 2001; Gasch et al, Mol Biol Cell, 2000) y salino (Causton et al, Mol Biol Cell, 2001; Posas et al, J Biol Chem, 2000; Rep et al, J Biol Chem, 2000; Yale and Bohnert, J Biol Chem, 2001). De todas formas, los resultados muestran diferencias entre ellos en los niveles de cambio de expresión de cada subunidad. Existe una aparente paradoja o contradicción: si bien la transcripción de las subunidades de PKA es estimulada durante condiciones de estrés, una mayor actividad PKA conduce a una menor resistencia al estrés. Estas evidencias sugieren que un mecanismo complejo regula la expresión de las subunidades de PKA. A pesar de estos datos, los mecanismos moleculares y los factores de transcripción que modulan la transcripción de *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* y *BCY1* en una condición específica, son desconocidos. Asimismo, tampoco se sabe cómo los niveles resultantes de cada subunidad de PKA contribuyen a la especificidad de la señalización.

2. OBJETIVOS

El objetivo específico de este capítulo es dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en la transcripción de las subunidades de PKA, en condiciones de estrés térmico y salino. Evaluar la participación de las vías de señalización que se activan en respuesta a estas condiciones de estrés, e identificar los miembros involucrados en el control transcripcional de *TPKs* y *BCY1*.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. La expresión de los genes *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* y *BCY1* es regulada diferencialmente durante el crecimiento en presencia de glucosa como fuente de carbono

La expresión de los genes *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* y *BCY1* fue primero estudiada mediante el ensayo de gen reportero, empleando plásmidos en los que la expresión del gen *LacZ* es dirigida por la región promotora de cada uno de estos genes (-800 a +10 con respecto al codón de iniciación ATG), los que se denominan *TPKs-LacZ* y *BCY1-LacZ*. Células WT, transformadas con los plásmidos, fueron crecidas en medio mínimo con glucosa 2% hasta fase logarítmica tardía (OD_{600} 3.5). El nivel de expresión relativo de cada gen es diferente: el promotor *TPK1* presenta el mayor nivel de actividad, seguido por el promotor *TPK2* (Figura 1.4.A). Los promotores *TPK3* y *BCY1* muestran niveles bajos de actividad, siendo el menor el de *BCY1*. Los niveles de mRNA de cada subunidad fueron analizados por PCR cuantitativa

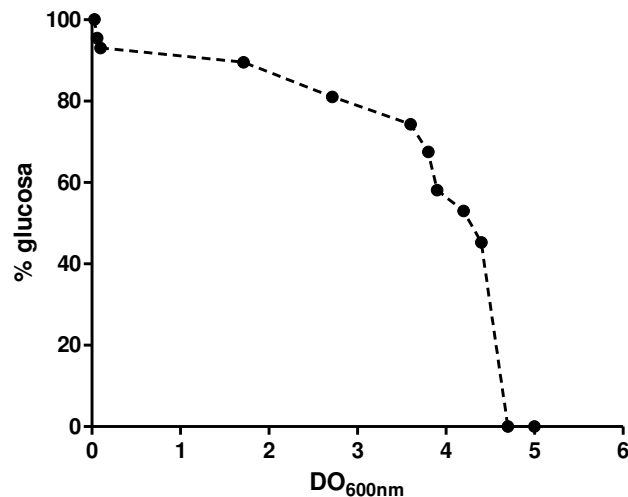


Figura 1.3. Curva de crecimiento y glucosa residual.

Curva de crecimiento de la cepa WT (W303-1A) transformadas con el gen de fusión *TPK1-LacZ* crecida en medio mínimo con glucosa durante 8 días. Se tomaron alícuotas para determinar DO_{600} y la concentración de glucosa. A DO_{600} 3.5, la glucosa residual es de aproximadamente el 60%.

(qRT-PCR), y mostraron niveles concordantes con las actividades de los genes reporteros, excepto el mRNA de *BCY1*, que fue tan abundante como el mRNA de *TPK1* (Figura 1.4.B). Esta discrepancia entre la actividad del promotor, la abundancia del transcripto y el nivel de expresión de la proteína (Tudisca

et al., 2010) puede ser consecuencia de la estabilidad del mRNA y de la extremadamente elevada estabilidad de la proteína Bcy1, o por otro lado, podría ser que parte de la secuencia codificante de *BCY1* fuera requerida para su correcta expresión. En concordancia con los elevados niveles del mRNA de *BCY1*, se ha demostrado que los niveles de la proteína Bcy1, en fase de crecimiento exponencial, son mayores que los niveles de las subunidades catalíticas (Tudisca et al., 2010).

Para determinar si la expresión de los genes que codifican para las subunidades de PKA está diferencialmente regulada durante fases de crecimiento, analizamos las actividades de *TPKs-LacZ* y *BCY1-LacZ* a lo largo de la curva de crecimiento en presencia de glucosa. Como se muestra en las Figuras 1.4.C y D, *TPK1* presenta un aumento en la actividad de su promotor en la fase inicial del crecimiento. Durante la transición del *shift*-diáuxico y el subsiguiente período post-diáuxico el nivel de expresión de *TPK1* no mostró variaciones. Finalmente, cuando las células ingresan en el período de fase estacionaria, se aprecia una leve disminución en la actividad del promotor *TPK1*. El promotor *TPK3* mostró un bajo nivel de expresión a lo largo de la curva de crecimiento en glucosa, con un leve aumento al comienzo de la fase exponencial. Los promotores *TPK2* y *BCY1* presentan un comportamiento similar, exhibiendo un bajo nivel de actividad al comienzo de la fase logarítmica. Desde el *shift*-diáuxico hasta la fase estacionaria, muestran niveles de expresión aproximadamente invariables. Como control, se midieron la densidad de los cultivos y la concentración de la glucosa residual en células WT transformadas con los plásmidos *TPK1-LacZ* o *TPK3-LacZ* (Figura 1.3). A DO_{600} 3.5 la concentración de glucosa es de alrededor del 60% respecto a la inicial, lo que indica que las células no se encuentran en la fase post-diáuxica. Estos resultados señalan que los genes que codifican para las distintas subunidades de PKA se expresan diferencialmente, presentando distintos niveles de actividad de los promotores y distintos patrones de expresión de mRNA a lo largo de la curva de crecimiento, en presencia de glucosa como fuente de carbono. La DO_{600} 3.5 fue seleccionada para llevar a cabo los siguientes experimentos dado que a esa DO_{600} los cuatro promotores mostraban actividades máximas, principalmente *TPK3* y *BCY1* que en otros puntos de la curva tenían actividades muy bajas.

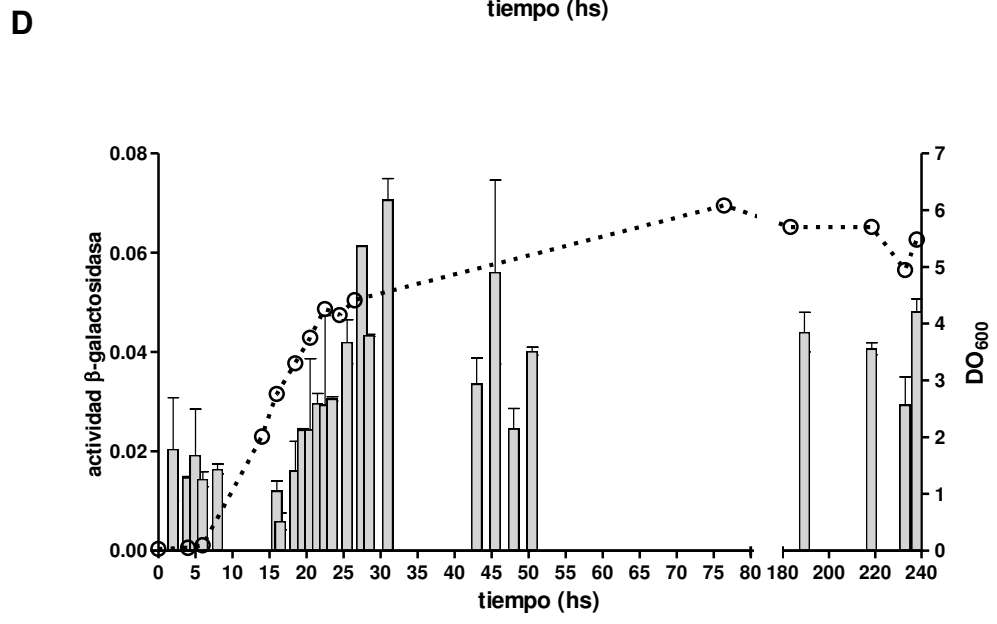
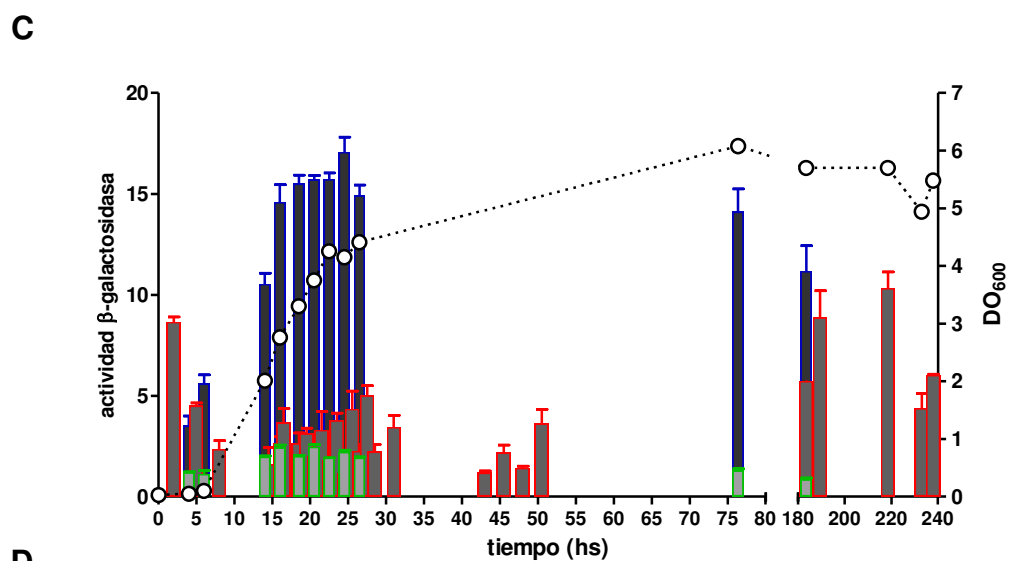
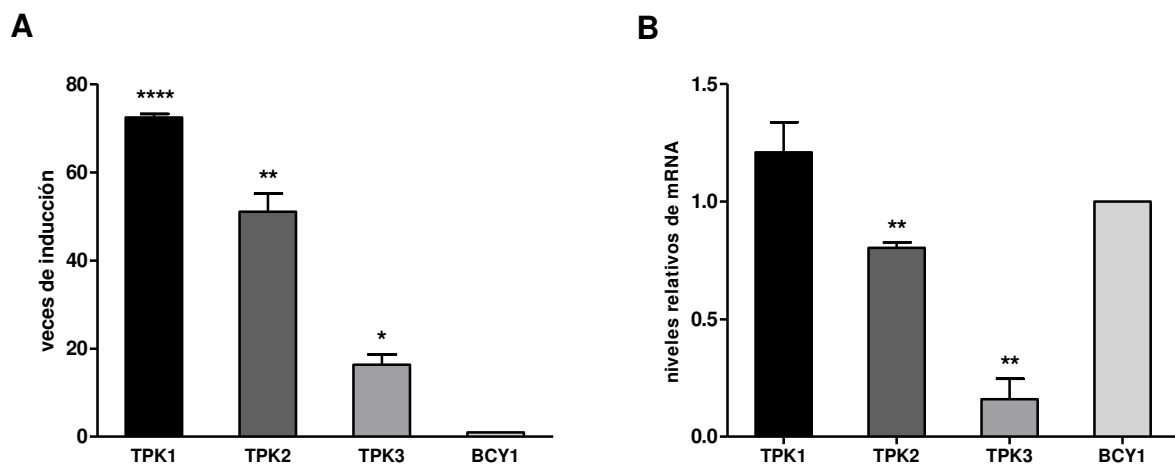


Figura 1.4. Expresión de los genes de fusión *TPKs-LacZ* y *BCY1-LacZ* en células WT durante el crecimiento en medio con glucosa.

La actividad β -galactosidasa se determinó en células WT (W303-1A) transformadas con los genes de fusión *TPKs-LacZ* o *BCY1-LacZ*. Las células fueron crecidas en medio mínimo hasta una DO_{600} 3.5. (A) Actividad β -galactosidasa expresada en Unidades Miller, normalizada al valor de *BCY1*. Los resultados se expresan como el promedio \pm SD de triplicados dentro de un experimento representativo. (B) Niveles endógenos de mRNA de *TPKs* y *BCY1* cuantificados por qRT-PCR y normalizados con los valores de los mRNAs de *TUB1* y *BCY1*; los resultados se expresan como el promedio \pm SD de replicados (n=6) de experimentos independientes. Curva de crecimiento de células WT (W303-1A) transformadas con los plásmidos (C) *TPKs-LacZ* o (D) *BCY1-LacZ*, crecidas en medio mínimo hasta 10 días. En los tiempos indicados en la figura se tomaron alícuotas para la determinación de actividad β -galactosidasa y medición de DO_{600} . El gráfico corresponde a las Unidades Miller mostradas como el promedio \pm SD de triplicados dentro de un experimento representativo. La escala de color correspondiente a *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* y *BCY1* es la misma en los paneles A y B, y cada una presenta una línea de borde coloreada según: azul, *TPK1*; rojo, *TPK2*; verde, *TPK3* y negro, *BCY1*. * $p < 0.05$

3.2. La actividad de los promotores de las subunidades de PKA es autorregulada

Con el objetivo de entender los mecanismos que regulan la expresión de los genes de *TPKs* y *BCY1*, se analizó la posible autorregulación por la propia actividad de PKA. Evaluamos la actividad de cada gen de fusión *TPK-LacZ* y *BCY1-LacZ* en diferentes cepas *TPK1* de levaduras: WT, *tpk1^{w1}BCY1* (cepa que expresa una forma atenuada de Tpk1 y deleciones de los genes *TPK2* y *TPK3*, resultando en una cepa con muy baja actividad de PKA) y *TPK1bcy1 Δ* (cepa con una actividad de PKA desregulada). Los cuatro promotores mostraron una inducción de sus actividades en la cepa *tpk1^{w1}BCY1*, que fue completamente revertida en la cepa *TPK1bcy1 Δ* (Figura 1.5.A). Estos resultados indican que la actividad de PKA promovería la represión de la expresión de sus subunidades. El mRNA de *TPK1* en la cepa *TPK1bcy1 Δ* y los de *BCY1* y *TPK1* en la cepa *tpk1^{w1}BCY1* se analizaron por qRT-PCR. Los niveles concuerdan con las actividades de los promotores (Figura 1.6.A). Análisis de *Western blot* del nivel de proteína Tpk1 en extractos provenientes de las mismas cepas mutantes mostraron que la cantidad de proteína Tpk1 coincide con la actividad del promotor y el nivel de mRNA (Figura 1.6.A *Inset*).

Para determinar si la inhibición por PKA es dependiente de las isoformas de Tpk, estudiamos la actividad de cada promotor en cepas de levaduras que expresan sólo uno de los tres genes de *TPK* (cepas S330, S331 y S332). Como se muestra en la Figura 1.5.B, los promotores presentan un comportamiento diferente en presencia de cada isoforma de Tpk. A partir de los resultados se puede

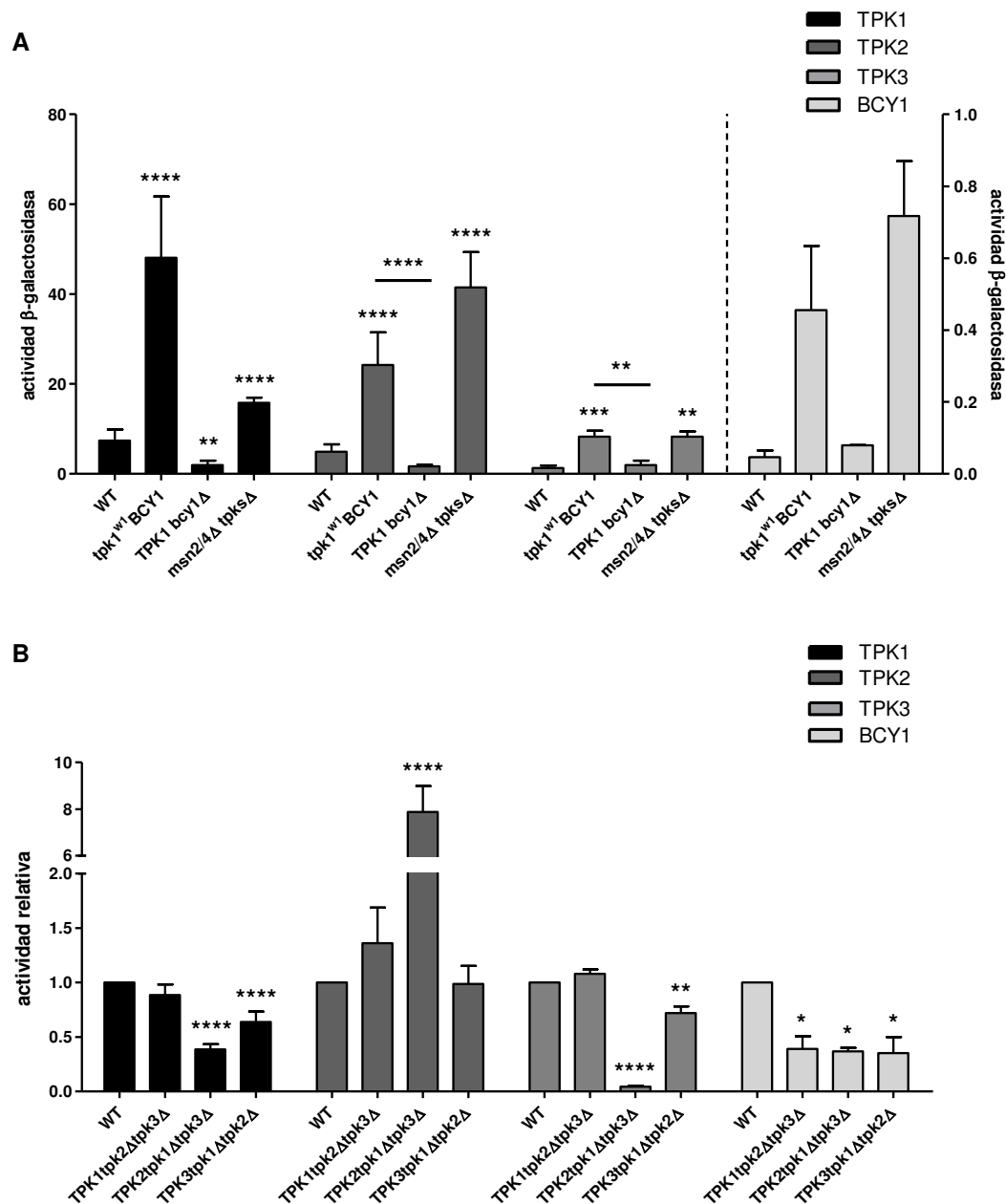


Figura 1.5. La actividad de los promotores de las subunidades de PKA es autorregulada.

(A) Actividad β -galactosidasa fue determinada en las cepas WT SP1 y W303-1A, pero sólo se muestran los valores obtenidos en la cepa W303-1A, y en las cepas *tpk1^{w1}BCY1*, *TPK1 bcy1Δ* y *msn2/4ΔtpksΔ* transformadas con los plásmidos *TPKs-LacZ* o *BCY1-LacZ*. Los resultados mostrados en Unidades Miller se expresan como el promedio \pm SD de duplicados dentro de un experimento representativo. (B) Actividad β -galactosidasa determinada en las cepas WT (W303-1A), *TPK1tpk2Δtpk3Δ* (S331), *TPK2tpk1Δtpk3Δ* (S332) y *TPK3tpk1Δtpk2Δ* (S330) transformadas con los plásmidos *TPKs-LacZ* o *BCY1-LacZ*. Los valores medidos en cada cepa mutante para cada construcción reportera fueron normalizados al valor de cada construcción en la cepa WT. Se muestran los resultados como veces de inducción promedio \pm SD a partir de replicados (n=8) provenientes de experimentos independientes. * $p < 0.05$.

concluir que Tpk1 y Tpk3 tienen un efecto inhibitorio similar en la actividad de los promotores de las tres subunidades catalíticas; y que Tpk2 tiene un efecto inhibitorio más fuerte sobre los promotores Tpk1 y Tpk3, mientras que no inhibiría su propio promotor. El promotor *BCY1*, que es el más inhibido, no mostró diferencias entre los efectos inhibitorios de las distintas Tpk. Se midieron los niveles endógenos de mRNA de *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* y *BCY1* por qRT-PCR en estas cepas mutantes y los resultados son consistentes con las actividades de los promotores (Figura 1.6.A). A pesar de las diferencias halladas entre la actividad del promotor *BCY1* y la abundancia de su mRNA (Figuras 1.4.A y B), los cambios en los niveles de mRNA son similares a aquellos observados para la actividad de la construcción *BCY1-LacZ* en las mismas cepas mutantes. De este modo, se considera que a pesar de la baja actividad de la construcción *BCY1-LacZ*, ésta refleja la actividad endógena.

Para corroborar esta regulación, los reporteros *TPKs-LacZ* y *BCY1-LacZ* fueron ensayados en una cepa sin actividad PKA, y comparado con las actividades en la cepa WT. La delección de los tres genes de *TPKs* es letal, pero una delección concomitante de los genes *MSN2/4* logra suprimir esta letalidad (cepa *msn2/4ΔtpksΔ*) (Smith et al., 1998). En la cepa *msn2/4ΔtpksΔ*, las actividades de los promotores fue mayor que en las cepas WT y *TPK1bcy1Δ*, corroborando el efecto inhibitorio de PKA sobre los promotores (Figura 1.5.A). Estos resultados muestran que el alcance de la inducción es diferente para cada promotor. El promotor *TPK1* alcanzó un nivel de inducción menor en la cepa *msn2/4ΔtpksΔ* que en la cepa *tpk1^{w1}BCY1*. Esta diferencia puede deberse a la falta de Msn2 y Msn4 en la cepa *msn2/4ΔtpksΔ*, que podrían tener un rol en la regulación de *TPK1*. El alcance de la inducción de *TPK2* en la cepa *msn2/4ΔtpksΔ* fue mayor que en la cepa *tpk1^{w1}BCY1*, sugiriendo un rol diferente de Msn2/4 en la regulación de este promotor. Finalmente las actividades de los promotores *BCY1* y *TPK3* inducidas en la cepa *msn2/4ΔtpksΔ* mostraron leves diferencias respecto a la cepa *tpk1^{w1}BCY1*, sugiriendo que Msn2/4 no tendrían ningún rol en la regulación de estos promotores.

En conjunto estos resultados señalan que existe un mecanismo negativo de autorregulación de las actividades de los promotores de las subunidades de PKA que involucra a la vía de señalización de PKA y que es dependiente de la isoforma de Tpk. El rol de los factores de transcripción Msn2/4 se evalúa en la siguiente sección.

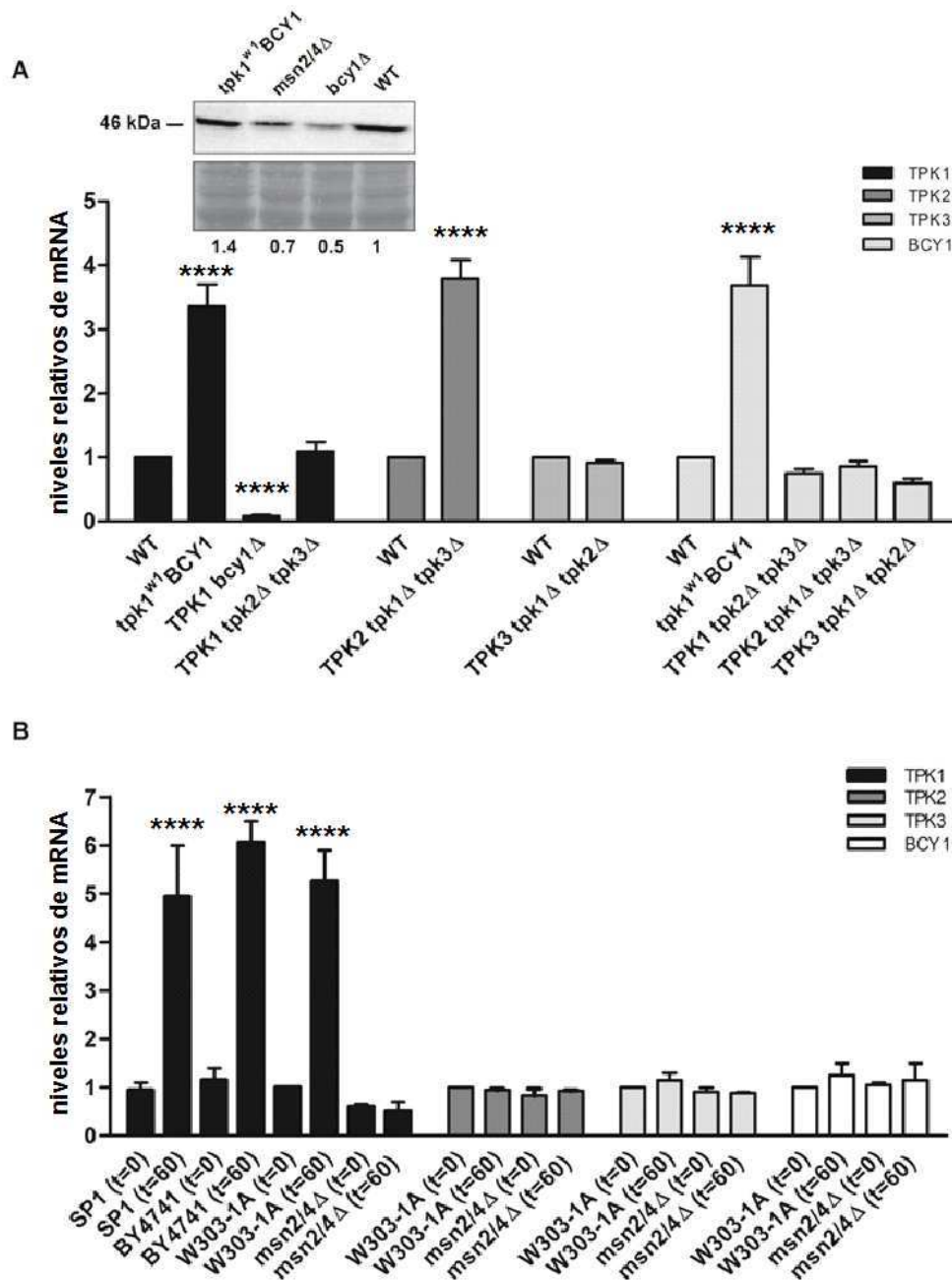


Figura 1.6. Los niveles endógenos de mRNA son autorregulados.

(A) Niveles endógenos de mRNA de *TPKs* y *BCY1* determinados en las cepas WT (W303-1A), *tpk1^{w1}BCY1*, *TPK1bcy1Δ*, *TPK1tpk2Δtpk3Δ* (S331), *TPK2tpk1Δtpk3Δ* (S332) y *TPK3tpk1Δtpk2Δ* (S330) mediante qRT-PCR y normalizados al valor del mRNA de *TUB1*. El nivel de mRNA en la cepa WT fue definido como 1. Los resultados se expresan como el promedio ± SD de replicados (n=6) de experimentos independientes. En el *Inset*, análisis de extractos de las mutantes indicadas por *Western blot*, empleando anticuerpo anti-Tpk1; los número debajo de

cada calle indican la cuantificación normalizada a la banda correspondiente a la cepa WT y al total de proteína sembrada. (B) Niveles endógenos de mRNA de *TPKs* y *BCY1* determinados en las cepas WT (W303-1A) y *msn2/4Δ* en condiciones de estrés térmico por qRT-PCR. El nivel del mRNA de *TPK1* fue también determinado en las cepas WT SP1 y BY4741 como control. Los cultivos de cada cepa de levadura fueron crecidos hasta fase exponencial (OD_{600} 3.5) a 25°C, y luego transferidos a 37°C por 60 min. Los resultados se expresan como el promedio \pm SD de replicados (n=6) de experimentos independientes y los niveles de mRNA de cada subunidad en la cepa WT W303-1A fueron definidos como 1. * $p < 0.05$.

3.3. La expresión de los genes de las subunidades de PKA es regulada diferencialmente durante el estrés térmico y el estrés salino.

Los resultados presentados anteriormente nos permiten seguir estudiando en mayor profundidad la regulación de la expresión de las subunidades de PKA, analizando ahora la participación de distintos factores de transcripción y quinasas de las vías de respuesta a condiciones de estrés.

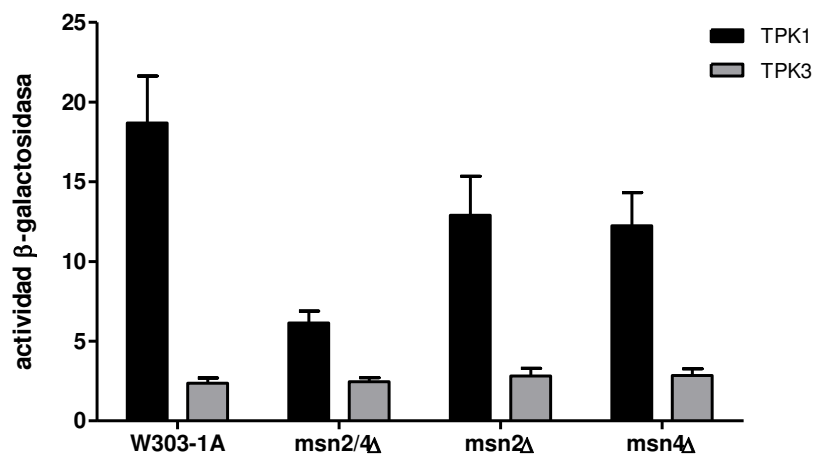


Figura 1.7. Los factores de transcripción Msn2 y Msn4 son redundantes en la regulación de *TPK1*.

La actividad β -galactosidasa determinada en cepas WT, *msn2Δ*, *msn4Δ* y *msn2/4Δ* transformadas con los plásmidos *TPK1-LacZ* o *TPK3-LacZ*. Cultivos de cada cepa fueron crecidos hasta fase exponencial (DO_{600} 3.5) a 30°C. Los resultados se expresan como Unidades Miller y como el promedio \pm SD de duplicados dentro de un experimento representativo.

En *S.cerevisiae*, el *heat shock transcription factor 1* (Hsf1) y los factores de transcripción Msn2/4 son responsables de la mayor parte de la respuesta a estrés térmico (HSR). Sin embargo, en algunos

casos, estos factores no se requieren para la regulación de la expresión génica durante esta condición de estrés. La importación nuclear de Msn2 correlaciona fuertemente con datos de expresión de genes regulados por secuencias STRE (*Stress Responsive Elements*). En situaciones de estrés, Msn2 incrementa su abundancia nuclear, induciendo la expresión de genes inducibles por estrés (Garreau et al., 2000; Görner et al., 1998). La desfosforilación de Msn2 en los sitios blanco de PKA es inducida en situaciones de estrés, y se ha observado una correlación inversa entre la actividad de PKA y la localización nuclear de Msn2 (Garrett & Broach, 1989; Görner et al., 2002; Reiter et al., 2013).

Los resultados presentados en la Figura 1.5.A sugieren un rol para Msn2 en la regulación de las actividades de los promotores *TPK1* y *TPK2*. Es por esto que se analizó la participación de Msn2/4 en la regulación de la expresión de las subunidades de PKA en dos condiciones de estrés: térmico y salino. El promotor *TPK1* contiene sitios STRE, documentados experimentalmente (Cameroni et al., 2004). Por otro lado, en el promotor *TPK2* se predice un sitio STRE, y aunque por inspección de secuencias de los promotores *TPK3* y *BCY1* no se predicen, análisis de *microarrays* genómicos sugirieron la participación de Msn2/4 en la regulación de estos tres promotores (Cameroni et al., 2004). Como se muestra en la Figura 1.8.A, frente a la exposición a estrés térmico a 37°C, hay un aumento de 1.5 veces en la actividad del promotor *TPK1*. En cuanto a los promotores *TPK2*, *TPK3* y *BCY1*, ninguno responde al estímulo de estrés por calor (Figuras 1.8.B-D). Los niveles endógenos de mRNA fueron medidos por qRT-PCR a los 60 min de estrés térmico a 37°C, y los resultados concuerdan con los obtenidos de actividad de los promotores (Figura 1.6.B). Tampoco se detectaron cambios a tiempos más cortos que 60 min de este estrés en los niveles de mRNA endógeno de *TPK2*, *TPK3* y *BCY1*. En condiciones de estrés salino (KCl 1M), sólo el promotor *TPK1* aumentó su actividad 1.6 veces (Figura 1.9).

El rol de Msn2/4 en la regulación de la expresión de los genes *TPKs* durante el estrés térmico y el estrés salino fue evaluado en la cepa mutante *msn2/4Δ*, transformada con los vectores *TPKs-LacZ* o *BCY1-LacZ*. *TPK1-lacZ* muestra una disminución en la actividad de 0.5 veces respecto a la cepa WT a t=0 min, y no se detecta incremento con el tiempo de exposición al calor (Figura 1.8.A) o KCl 1M (Figura 1.9). Estos resultados sugieren que la respuesta del promotor *TPK1* a las condiciones de estrés ensayadas es regulada por la actividad de los factores de transcripción Msn2/4. En cuanto a los promotores *TPK2*, *TPK3* y *BCY1*, éstos muestran un comportamiento diferente en ausencia de Msn2/4.

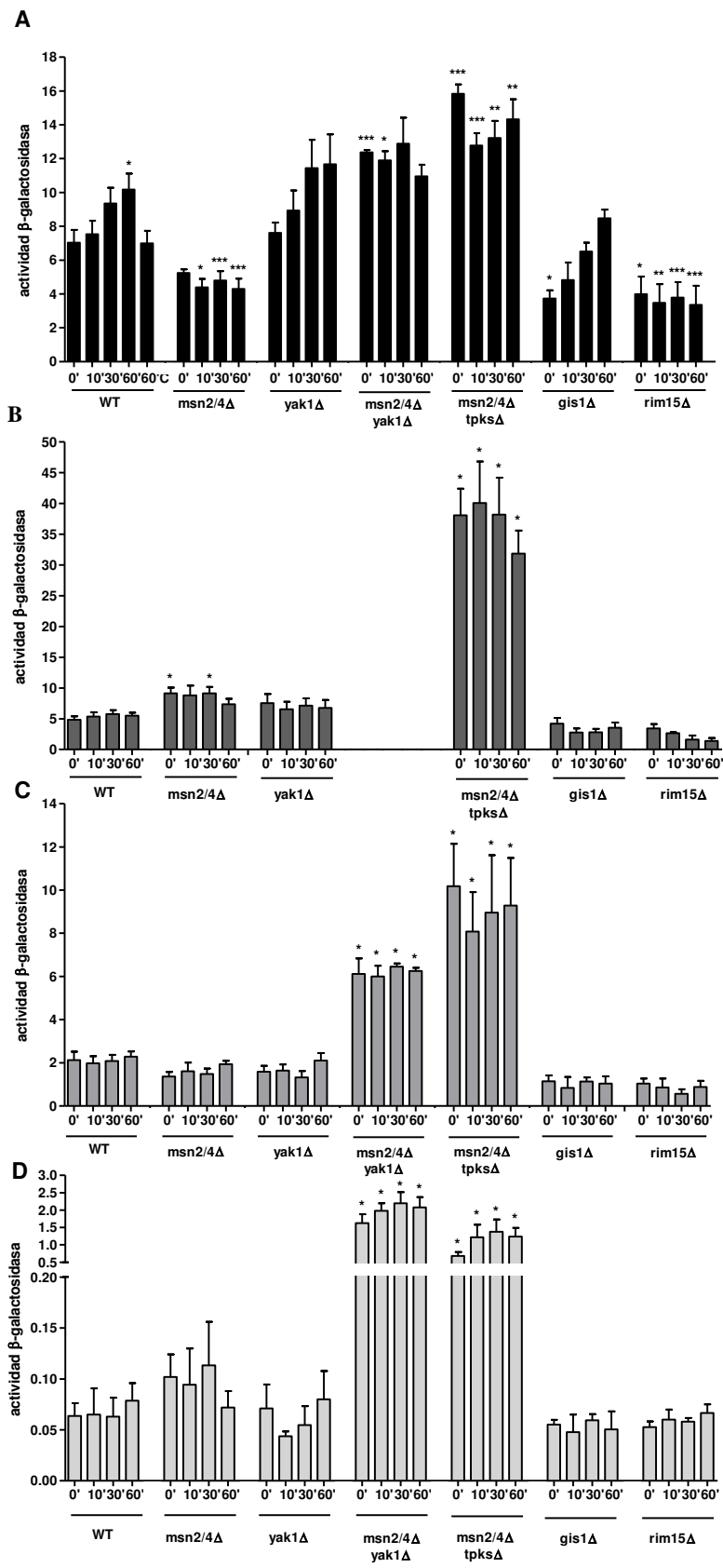


Figura 1.8. Regulación de la actividad de los promotores durante estrés térmico.

La actividad β -galactosidasa determinada en cepas WT (se muestra sólo la actividad medida en W303-1A), *msn2/4 Δ* , *yak1 Δ* , *msn2/4 Δ yak1 Δ* , *msn2/4 Δ tpks Δ* , *gis1 Δ* y *rim15 Δ* , transformadas con los plásmidos *TPKs-LacZ* o *BCY1-LacZ*. Cultivos de cada cepa fueron crecidos hasta fase exponencial (OD_{600} 3.5) a 25°C, y luego transferidos a 37°C por 15, 30 o 60 min. 60 C corresponde al cultivo control crecido a 25°C por 60 min adicionales. Los resultados se expresan como Unidades Miller y como el promedio \pm SD de triplicados dentro de un experimento representativo. Los paneles A, B, C y D corresponden a los análisis de *TPK1-LacZ*, *TPK2-LacZ*, *TPK3-LacZ* y *BCY1-LacZ* respectivamente. * $p < 0.05$.

Durante el tiempo de tratamiento con calor, se observa una leve estimulación del promotor *TPK2*, que es constante. Por su parte, los promotores *TPK3* y *BCY1* no responden al estímulo ante la ausencia de estos factores de transcripción (Figura 1.8.B-D). Las mediciones de mRNA endógeno en las cepas WT y *msn2/4 Δ* por qRT-PCR, en condiciones de estrés térmico (t=60 min) son consistentes con los resultados de actividad de los promotores (Figura 1.6. B).

Se ha descrito que los factores de transcripción Msn2 y Msn4 presentan una función redundante en la regulación de la expresión génica (Schmitt & McEntee, 1996). Sin embargo, un estudio reciente que utiliza la técnica de *microarrays* ha reportado que Msn2 y Msn4 pueden exhibir roles no redundantes en la regulación de la expresión de algunos genes, lo que argumenta contra una función general en la respuesta a estrés (Cameroni et al., 2004). En este sentido se ensayó la redundancia de los factores de transcripción Msn2 y Msn4 en la regulación del promotor *TPK1*. Los resultados indican que *TPK1* presenta una clara disminución en la actividad en la mutante de doble deleción, mientras que las mutantes de simple deleción no muestran diferencias en el nivel de actividad respecto a la cepa WT (Figura 1.7), un patrón esperado para factores con función redundante en la regulación de un gen.

El estrés térmico induce la vía de Hsf1, y la expresión de varios genes inducibles por este estrés es dependiente tanto de Hsf1 como de Msn2/4. El gen *HSF1* es esencial para la viabilidad celular; es por esto que para determinar si la regulación de los genes de las subunidades de PKA es dependiente de la actividad de Hsf1, se empleó una cepa con un alelo condicional de este gen. La cepa YHN1172 expresa un alelo *HSF1* regulado por un sistema inducible de tetraciclina, integrado en un fondo genético *msn2/4 Δ* (Ferguson et al., 2005). La transcripción de *HSF1* es reprimida en presencia de doxiciclina. En esta cepa se estudiaron las actividades de los promotores *TPK1* y *TPK2*, que son

diferencialmente reguladas por Msn2/4. El crecimiento de la misma fue inhibido en placas de medio mínimo con glucosa conteniendo doxiciclina, indicando la depleción de los niveles de Hsf1. La represión de *HSF1* durante 12 h y 24 h de incubación en medio líquido en presencia de doxiciclina no produce ningún cambio en la respuesta transcripcional al estrés térmico de los promotores *TPK1* y *TPK2*, lo que sugiere que Hsf1 no participa de la regulación de los mismos.

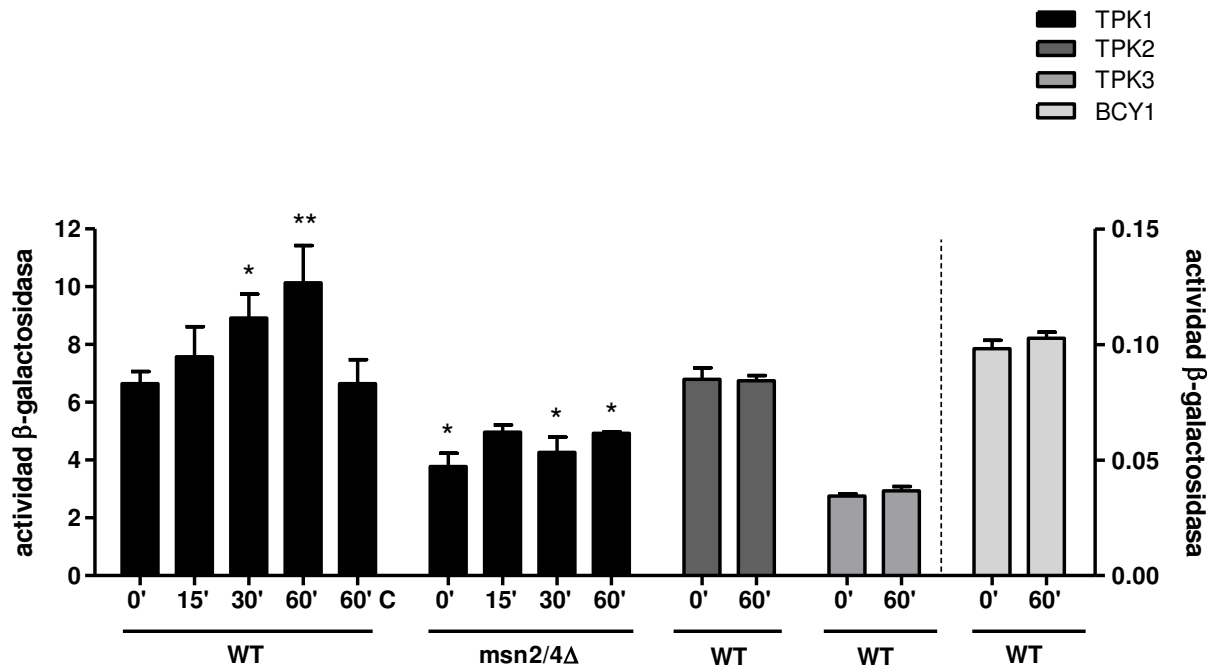


Figura 1.9. La actividad del promotor *TPK1* es regulada durante el estrés salino.

La actividad β-galactosidasa fue determinada en las cepas WT (W303-1A) y *msn2/4Δ* transformadas con el plásmido *TPK1-LacZ*. Los cultivos de cada cepa fueron crecidos hasta fase exponencial (DO_{600} 3.5) a 30°C, y luego transferidos a un medio mínimo con la adición de KCl 1M durante 15, 30 y 60 min. La actividad β-galactosidasa de los genes *TPK2-LacZ*, *TPK3-LacZ* y *BCY1-LacZ* fue ensayada en la cepa WT a 0 y 60 min luego de la adición de KCl 1M. 60' C corresponde a cultivos control que fueron crecidos por 60 min adicionales sin KCl. Los resultados se expresan en Unidades Miller, como el promedio ± SD de replicados (n=6) de ensayos independientes. *p,0.05.

Los factores de transcripción Msn2/4 se encuentran bajo el control de la vía cAMP/PKA, mediada en parte por la proteína quinasa Yak1. Se analizó la actividad de los promotores en mutantes de delección simple *yak1Δ*, o triple *msn2/4Δyak1Δ*. Como se observa en la Figura 1.8, la delección de *YAK1* no tiene ningún efecto en la expresión de *LacZ*, bajo el control de los promotores *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* o *BCY1*. Además, el promotor *TPK1* es aun capaz de responder al estímulo de estrés térmico,

mostrando una leve inducción en la actividad con respecto a la cepa WT. Las deleciones conjuntas de *MSN2/4* y *YAK1* tienen un fuerte efecto inductor, independiente del estímulo de estrés en los promotores *TPK1*, *TPK3* y *BCY1*, con valores similares a aquellos obtenidos en mutantes de baja actividad PKA (cepas *msn2/4ΔtpksΔ* (Figura 1.8) o *tpk1^{w1}BCY1* (Figura 1.5)). No pudo lograrse la transformación de la cepa *msn2/4Δyak1Δ* con el plásmido *TPK2-LacZ*. Se ha reportado que en las cepas *msn2/4Δ* y *msn2/4Δyak1Δ* se observa un incremento en la localización nuclear de Bcy1 (G Griffioen et al., 2001); estas diferencias en la localización nuclear de la subunidad regulatoria podrían implicar diferentes niveles de actividad PKA en el núcleo que a su vez podrían regular la actividad de cada promotor.

El gen *RIM15* codifica para una proteína quinasa que es negativamente regulada por PKA (Anke Reinders, Bürckert, Boller, & Bu, 1998). *Msn2/4* y *Gis1* son factores de transcripción de respuesta a estrés regulados por *Rim15*. Se analizó el efecto de *Rim15* y de *Gis1* en la respuesta al estrés térmico de los promotores *TPKs* y *BCY1*. Como se esperaba, ni *Rim15* ni *Gis1* controlan las actividades de *TPK2-LacZ*, *TPK3-LacZ* o *BCY1-LacZ*, ya que ninguna de estas construcciones es regulada durante situaciones de estrés. Sin embargo, *Rim15* y *Gis1* tienen participación en la regulación del promotor *TPK1*. En las cepas mutantes *gis1Δ* y *rim15Δ*, el promotor *TPK1* muestra una disminución en su actividad en comparación con el nivel alcanzado por la cepa WT. En la cepa *gis1Δ*, a pesar de esta disminución, el promotor es capaz de responder al estímulo de calor (Figura 1.8). Se ha sugerido que *Gis1* y *Msn2/4* no sólo superponen sus funciones transcripcionales *in vivo*, sino que también regulan cooperativamente la transcripción de un gran número de genes durante el *shift*-diáuxico (Zhang et al., 2009). De este modo, durante el estrés térmico en la cepa *gis1Δ*, la respuesta del promotor *TPK1* decrece por la ausencia de *Gis1*, pero se ve aumentada en el tiempo de exposición al estímulo por la presencia de *Msn2/4*. El estudio de la secuencia del promotor *TPK1* apoya esta conclusión, ya que se han predicho tres sitios PDS, superponiéndose dos de ellos con elementos STRE (respondedores a *Msn2/4*) (ver Figura 1.12).

3.4. *Msn2/4*, *Sok2* y *Gis1* cooperan en la regulación de la actividad del promotor *TPK1*

Con el objetivo de corroborar la participación de *Msn2/4* en la regulación dependiente de estrés del promotor *TPK1*, se realizaron experimentos de *ChIP* (*Chromatin Immunoprecipitation*)

empleando una cepa de levadura que expresa una versión del alelo *MSN2* acoplada al epítipo TAP (*Tandem Affinity Purification*), durante el tiempo de exposición al estrés térmico (Figura 1.10.A). Se observa que la abundancia de Msn2 va en decrecimiento desde los 15 min de exposición al estrés. Este comportamiento de disminución en la abundancia de Msn2 frente al estímulo de estrés se ha descrito para algunos promotores de proteínas de respuesta a ese estrés (T. Y. Erkina, Tschetter, & Erkin, 2008), lo que concuerda con los resultados presentados para el promotor *TPK1* (ver Discusión).

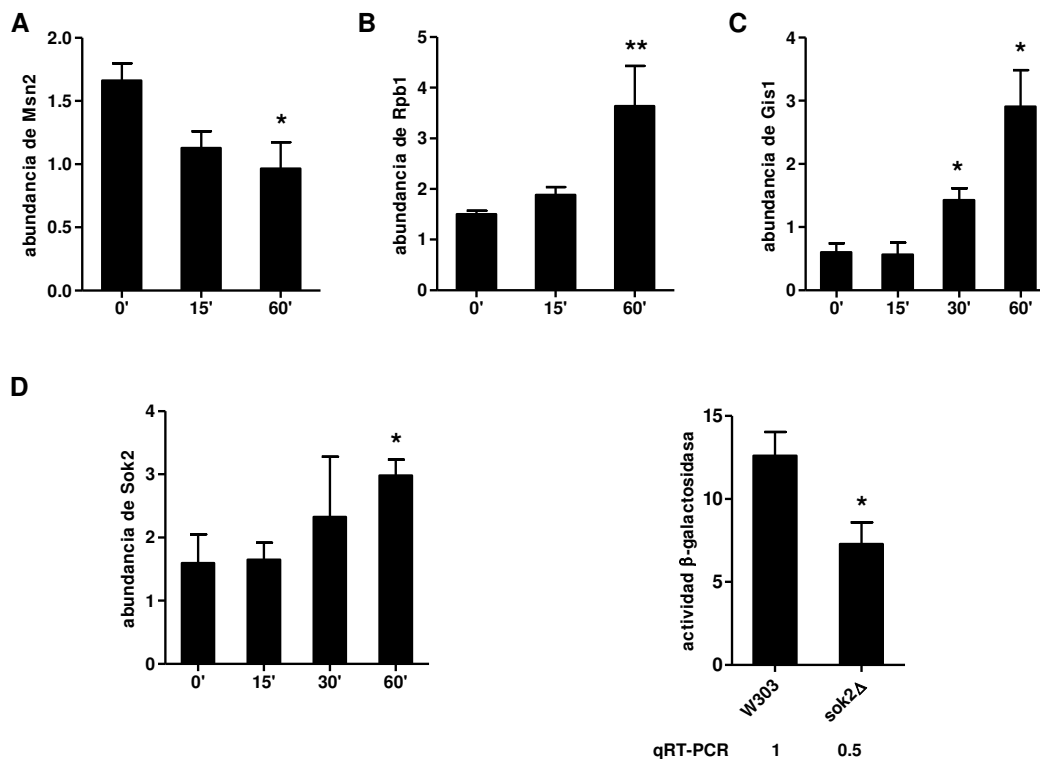


Figura 1.10. Msn2, Sok2 y Gis1 unen al promotor *TPK1*.

Células WT BY4741 expresando las proteínas de fusión (A) Msn2-TAP, (B) Rpb1-TAP, (C) Gis1-TAP o (D, panel izquierdo) Sok2-TAP fueron crecidas en medio mínimo a 25°C, y luego transferidas a 37°C por 15, 30 y 60 min. Ensayos de CHIP fueron realizados empleando IgG-Sepharose. La qPCR se realizó con primers específicos que amplifican la región -399 a -208 del promotor *TPK1*. El DNA del IP (Inmunoprecipitado) fue normalizado al DNA del *Input* y se calculó la relación señal:ruido respecto a los valores inespecíficos obtenidos en la cepa sin el tag. Los resultados se expresan como el promedio \pm SD (n=3). (D, panel derecho) la actividad β -galactosidasa fue determinada en células WT BY4741 y *sok2Δ* transformadas con el gen de fusión *TPK1-LacZ*, a 0 y 60 min luego de estrés térmico a 37°C. Los resultados se expresan en Unidades Miller como el promedio \pm SD de duplicados dentro de un experimento representativo. Los números debajo de las barras representan las cantidades de mRNA que fueron cuantificadas por qRT-PCR, normalizadas a la cepa WT. Los valores representan el promedio de duplicados dentro de un experimento representativo (n=3). *p<0.05.

Se realizaron en paralelo experimentos de CHIP con una cepa que expresa el alelo *RPB1-TAP* (subunidad mayor de la RNA Polimerasa II asociada al epítopo TAP) con el fin de evaluar el reclutamiento de la RNA Pol II al promotor *TPK1*, como una evidencia de la transcripción activa e inducida durante la exposición a 37°C. Como se observa en la Figura 1.10.B, RNA Pol II incrementa su abundancia en el promotor *TPK1*, indicando una fuerte correlación entre la carga de la polimerasa y la pérdida de Msn2. Se evaluó también la unión de *GIS1-TAP* en las mismas condiciones (Figura 1.10.C) mediante experimentos de CHIP, con los mismos *primers* que para Msn2 ya que el fragmento estudiado del promotor *TPK1* posee 3 sitios PDS, dos de los cuales se superponen con sitios STRE. Como se esperaba, hay un incremento en el reclutamiento de Gis1 al promotor *TPK1* durante la exposición al estrés térmico. Además, el reclutamiento de Gis1 y la disminución en la abundancia de Msn2, correlacionan con el reclutamiento de RNA Pol II al promotor *TPK1* y con la actividad del mismo durante el estímulo de calor (Figura 1.8.A). En conjunto estos resultados sugieren que durante la respuesta a estrés térmico el promotor *TPK1* se activa por la acción coordinada de Msn2 y Gis1 en los mismos elementos del DNA.

Los promotores *TPKs* y *BCY1* muestran una gran inhibición en condiciones basales, y sus actividades se ven aumentadas en condiciones en las que la actividad de PKA se ve disminuida. De esta forma se buscaron represores transcripcionales que pudieran contribuir a la inhibición de los promotores. Empleando cepas mutantes de delección simple para ensayos de medición de actividad del reportero β -galactosidasa, se estudió la participación de varios factores descritos como represores transcripcionales, como Rgt1, Sko1 y Adr1, en la regulación del promotor *TPK1*. Ninguno de éstos demostró tener un rol en la regulación de las actividades de los promotores. También se estudió a la proteína Sok2 (Figura 1.10D, panel derecho), que sí resultó presentar un rol en la regulación de *TPK1*, ya que tanto la actividad del promotor como el nivel de mRNA endógeno disminuyen en la cepa *sok2 Δ* , comparados con la cepa WT. Sok2 ha sido reportado tanto como activador como inhibidor transcripcional, y es dependiente para su funcionamiento de la actividad PKA (Shenhar & Kassir, 2001). Se ha demostrado la asociación entre Sok2 y Msn2/4 por la técnica de co-inmunoprecipitación, indicando que Sok2 podría asistir la unión de Msn2/4 al DNA cuando sus elementos correspondientes se encuentran próximos (Shenhar & Kassir, 2001).

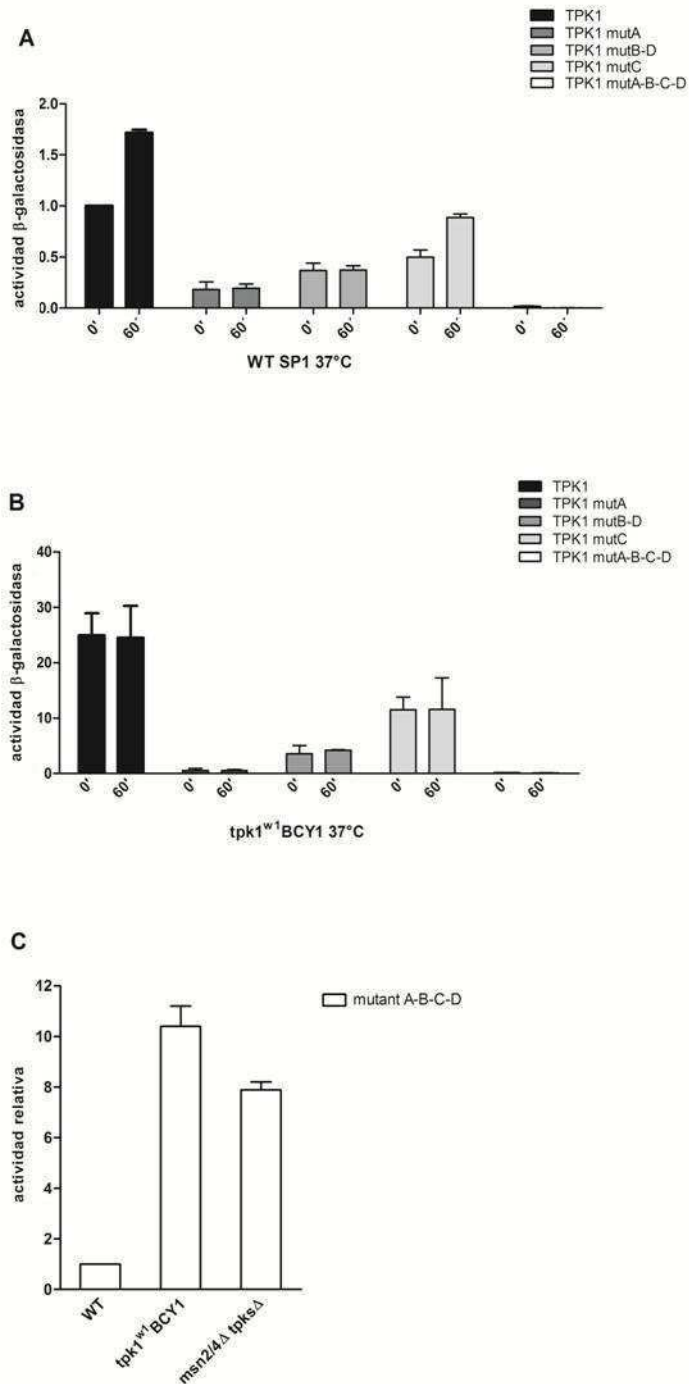


Figura 1.11. Msn2/4, Sok2 y Gis1 regulan la actividad del promotor *TPK1*.

La actividad β -galactosidasa fue determinada en las cepas (A) WT SP1 y (B) *tpk1^{w1}BCY1* transformadas con la versión WT y con construcciones mutantes del gen *TPK1-LacZ*. La construcción mutante A contiene los sitios Sok2 mutados; la mutante B-D, dos sitios STRE/PDS mutados, la mutante C, el sitio Gis1 mutado y la mutante A-B-C-D, todos los sitios mutados. (C) La actividad β -galactosidasa fue determinada en las cepas WT (sólo se

muestra SP1), *msn2/4ΔtpksΔ* y *tpk1^{w1}BCY1* transformadas con la mutante de fusión de *TPK1-LacZ*, A-B-C-D. Cultivos de cada cepa de levadura fueron crecidos hasta fase exponencial (DO_{600} 3.5) a 25°C y luego transferidos a 37°C por 60 min. Los resultados se expresan en Unidades Miller, normalizados a los valores de la fusión *TPK1-lacZ* WT, en la cepa WT a $t=0'$, como el promedio \pm SD de replicados ($n=4$) de ensayos independientes.

Análisis de la secuencia del promotor *TPK1* han permitido identificar la posible presencia de un sitio de unión de Sok2, cercano a uno de los sitios STRE (Figura 1.12). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se realizaron experimentos de CHIP empleando una cepa SOK2-TAP, que fue sometida a estrés térmico a 37°C. Estos experimentos indican la presencia de Sok2 en el promotor *TPK1* antes del estrés, y su posterior reclutamiento en el tiempo del estímulo (Figura 1.10.D, panel izquierdo). Teniendo en cuenta estos resultados, y los antecedentes publicados, se concluye que Sok2 es capaz de asistir la unión de Msn2 en el sitio STRE del promotor *TPK1*, siendo en estas condiciones de crecimiento un activador transcripcional del mismo. Los tres factores de transcripción, Msn2, Gis1 y Sok2 son necesarios para la regulación de la respuesta a estrés térmico del promotor *TPK1*, y se unen a elementos del DNA que se encuentran muy cercanos.

La participación de Msn2, Gis1 y Sok2 en la regulación del promotor *TPK1* se verificó ensayando construcciones reporteras mutantes de sus sitios específicos de unión. Esta serie de ensayos permitió también evaluar el efecto negativo de la actividad PKA sobre la regulación de las actividades de Msn2/4 y Rim15. Se realizaron cuatro construcciones reporteras β -galactosidasa conteniendo mutaciones en los elementos Msn2/4, Gis1 y Sok2, con las que se transformaron las cepas WT, *tpk1^{w1}BCY1* y *msn2/4ΔtpksΔ*, y se ensayaron en condiciones normales de crecimiento y en estrés térmico. La construcción A presenta el sitio Sok2 mutado, la construcción C, el sitio Gis1 mutado, la construcción B-D, posee los dos sitios Msn2/4 (STRE/PDS) mutados y en la construcción A-B-C-D, se mutaron todos los sitios mencionados.

Los plásmidos con las mutaciones fueron transformados en las cepas WT y *tpk1^{w1}BCY1*. Como se muestra en las Figuras 1.11.A y B, la construcción conteniendo todos los sitios mutados presenta una muy baja actividad β -galactosidasa en la cepa WT, tanto antes como después de la exposición al estrés térmico. La mutante A muestra una considerable disminución en la actividad, en las cepas WT y *tpk1^{w1}BCY1*, y pierde la capacidad de activarse frente al estímulo de estrés térmico. La mutante C

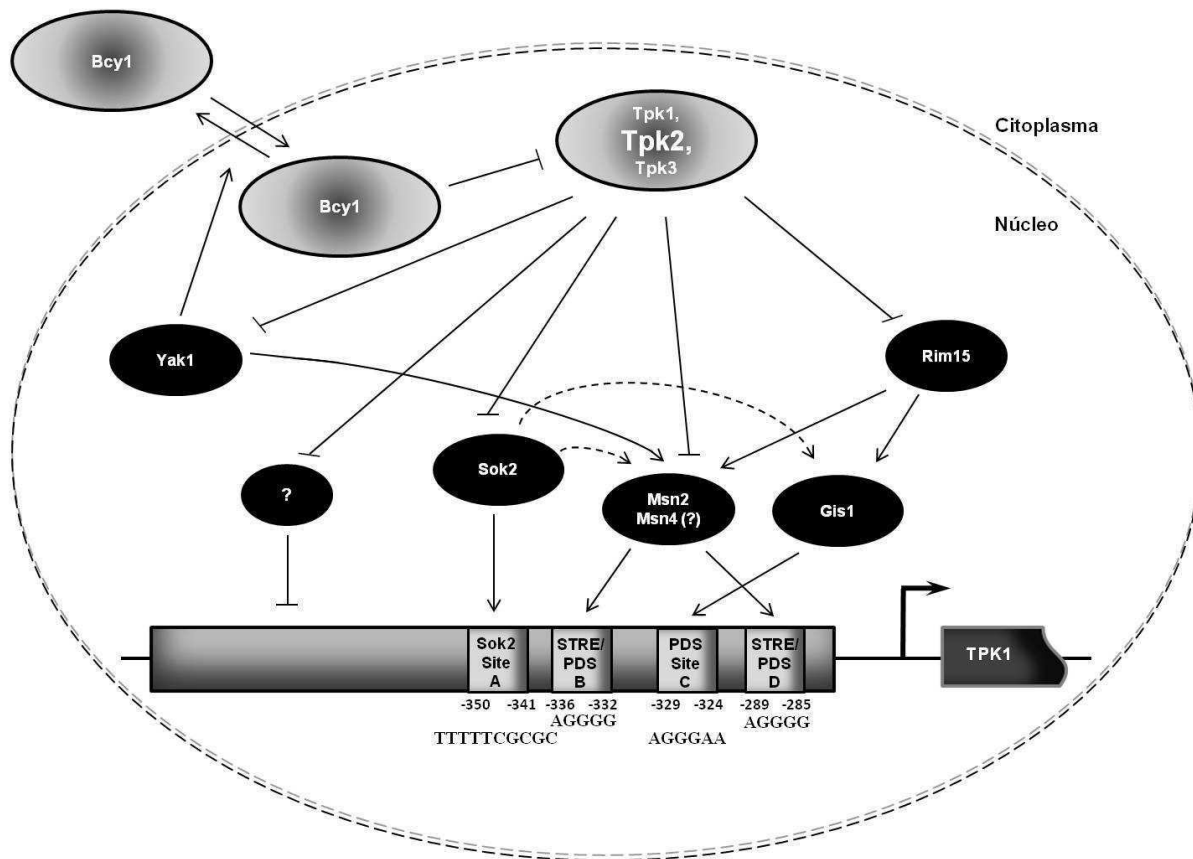


Figura 1.12. Modelo de la regulación del promotor *TPK1* por *Msn2*, *Gis1*, *Sok2* y la actividad de PKA.

El promotor *TPK1* se encuentra bajo la autorregulación dependiente de isoforma, siendo Tpk2 la que presentó el mayor efecto inhibitorio. PKA inhibe a Msn2/4 y Rim15. En células creciendo logarítmicamente en glucosa, Msn2 se encuentra unido basalmente al promotor *TPK1* y su abundancia disminuye frente a la exposición a estrés térmico, en concordancia con el modelo de “viuda negra”. Gis1 comparte con Msn2 los elementos en el promotor *TPK1* y ambos son necesarios para el incremento en la actividad del promotor en respuesta al estrés térmico. Sok2 podría asistir el pegado de Msn2/4 y Gis1 al promotor *TPK1* (línea discontinua). Durante el estrés térmico, Msn2 abandona el promotor y Gis1 es reclutado. La localización núcleo-citoplasmática de Bcy1 es regulada por fosforilación por la quinasa Yak1 (G Griffioen et al., 2001), contribuyendo a la regulación nuclear de la actividad de PKA. A, B, C y D corresponden a los sitios mutados. La secuencia de los elementos se indica debajo.

exhibe una menor disminución en la actividad en ambas cepas, y sólo en la cepa WT puede observarse una respuesta a estrés, lo que corrobora los resultados obtenidos en la cepa *gis1Δ* con la construcción *TPK1-LacZ* WT (Figura 1.8.A). La construcción B-D muestra una menor actividad, intermedia entre los niveles de las construcciones A y C. Este resultado concuerda con los niveles de β-galactosidasa

medidos en la cepa *msn2/4Δ* (Figura 1.8.A). En conjunto, estos resultados indicarían que Sok2 está involucrado en la regulación del promotor *TPK1*, y que modula las actividades de Msn2/4 y Gis1. Finalmente, se analizó la actividad β -galactosidasa en las cepas *msn2/4ΔtpksΔ*, WT y *tpk1^{w1}BCY1*, transformadas con el plásmido conteniendo todos los sitios mutados (A-B-C-D). Aunque ninguno de los factores de transcripción estudiados puede unirse a este promotor mutado, éste mostró un gran aumento en la actividad en las cepas *msn2/4ΔtpksΔ*, y *tpk1^{w1}BCY1*, en comparación a la cepa WT (Figura 1.11.C). Este resultado indicaría la existencia de una vía paralela a la de Rim15 y Msn2/4, que también involucra la actividad de PKA, y regula negativamente la actividad del promotor *TPK1* (Figura 1.12).

4. CONCLUSIONES

En este Capítulo de esta Tesis se investigó la regulación de los promotores de las subunidades de PKA, *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* y *BCY1*. Se ha demostrado que los cuatro comparten una característica en su regulación que es la autorregulación por la actividad PKA (Figura 1.5). Los cuatro promotores exhiben diferentes niveles de aumento en ausencia de la actividad PKA. Además, este mecanismo autorregulatorio es dependiente de la isoforma de Tpk. Tpk2 es la subunidad catalítica que produce el mayor grado de inhibición en los promotores *TPK1* y *TPK3*, y por el contrario causa la menor inhibición en su propio promotor. De los tres promotores de las subunidades catalíticas, *TPK3* es el que presenta el menor nivel de actividad (Figura 1.4). Por su parte, el promotor de la subunidad reguladora *BCY1* muestra el menor nivel de actividad de todas las subunidades de PKA; sin embargo es el que presenta el mayor grado de aumento en ausencia de actividad PKA.

Aunque se hayan observado diferencias claras en el comportamiento individual de cada cepa que expresa una subunidad de Tpk, es muy difícil predecir el comportamiento de las tres subunidades coexpresadas en una cepa WT. Teniendo en cuenta el bajo nivel de inhibición del promotor *TPK2* por la actividad catalítica de Tpk2, evidenciado en la cepa que sólo expresa esta isoforma, podría hipotetizarse que el nivel de expresión de *TPK2* en esta cepa sería mayor que en la cepa WT, de modo de ser mayor su efecto inhibitorio sobre los promotores *TPK1*, *TPK3* y *BCY1*. Al respecto, durante el crecimiento exponencial en glucosa, la localización subcelular de Tpk2 es nuclear, mientras que Tpk1 y Tpk3 muestran un patrón de localización núcleo-citoplasmático (Tudisca et al., 2010) sugiriendo que el estado de inhibición de los promotores podría ser una consecuencia de la localización subcelular de las subunidades.

Se han reportado pocos ejemplos de regulación de la transcripción de las subunidades de PKA. Uno de ellos se ha descrito en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* (Stiefel et al., 2004), y otro emplea como organismo modelo a la levadura *Candida albicans* (Giacometti, Kronberg, Biondi, Hernández, & Passeron, 2012). Los resultados obtenidos en *Schizosaccharomyces pombe* concuerdan con los presentados en esta Tesis, los autores muestran que los genes *CGS1* y *PKA1*, que codifican para las subunidades reguladora y catalítica de PKA respectivamente, son regulados negativamente por la vía de PKA. En ese trabajo también se demuestra que el hambreado de nutrientes activa la vía de la proteína kinasa activada por estrés (SAPK), que a su vez regula positivamente la transcripción de

ambos genes, resultando la regulación de las subunidades de PKA en un mecanismo de señalización cruzado entre estas dos vías antagónicas de señalización. En ese trabajo se muestra que al menos un componente de la vía de MAPK, Sok1, no estaría involucrado en la regulación de los promotores de las subunidades de PKA. En cuanto al segundo antecedente mencionado, en *Candida albicans* se ha descrito un mecanismo de regulación cruzada de la expresión de los genes de Bcy1 y Tpk. Estos resultados indicarían que esta levadura es capaz de compensar niveles elevados de las subunidades Tpk1 y/o Tpk2, con un incremento en los niveles proteicos de Bcy1, y viceversa, sugiriendo un mecanismo regulado por PKA, pero no inhibitorio por la actividad kinasa.

En cuanto a los niveles de mRNA de las subunidades de PKA, éstos correlacionan con los niveles de actividad de los promotores, exceptuando el caso de *BCY1* (Figura 1.4). Diversos reportes de transcriptomas realizados en condiciones normales de crecimiento en glucosa indican que los niveles de expresión *BCY1* se encuentran en el rango de los niveles de *TPKs* (Miller et al., 2011; Miura et al., 2008; Nagalakshmi et al., 2008; Pelechano & Pérez-Ortín, 2010; A Reinders et al., 1998). Esta discrepancia entre el nivel de actividad del promotor *BCY1* y la abundancia del mRNA puede deberse a un alto grado de inestabilidad de este mensajero. Esta diferencia es notoria y sugiere que un mecanismo de regulación a nivel de la estabilidad del mRNA y de su traducción estaría involucrado en la regulación de la expresión de la subunidad regulatoria de PKA. Por otra parte, los niveles de mRNA de *TPK3* concuerdan con los antecedentes reportados, que indican que esta subunidad presenta el menor nivel de expresión respecto a las otras Tpk (Galello, Portela, Moreno, & Rossi, 2010; Mazón, Behrens, Morgado, & Portillo, 1993).

La actividad de los promotores de las subunidades de PKA es diferencialmente regulada durante el crecimiento en glucosa. Los promotores *TPK1* y *BCY1* exhiben un aumento de su actividad en el comienzo de la fase de crecimiento exponencial, siendo éste un comportamiento similar al de promotor *TPK3*, aunque en su caso el incremento es menos pronunciado. Contrariamente, la actividad del promotor *TPK2* es baja en esta primera fase, y luego se aumenta lentamente hacia la fase estacionaria. Estos resultados sugieren que los genes que codifican para cada subunidad de PKA se expresan diferencialmente, y que los promotores presentan diferentes niveles de actividad relativos durante las distintas fases de crecimiento.

El análisis de la expresión de *BCY1* y *TPKs* en relación a las vías de respuesta a estrés estudiadas, indica que en principio, los promotores responden de manera diferencial a la ausencia de los factores de transcripción *Msn2/4* (Figuras 1.8 y 1.9). En este sentido, sólo el promotor *TPK1* es regulado positivamente en condiciones de estrés térmico y salino, efecto que se pierde en la mutante *msn2/4Δ*, indicando un rol clave para estos factores de transcripción en la respuesta a ambas condiciones de estrés. Por su parte, ni *TPK2*, ni *TPK3* ni *BCY1* muestran un cambio en los niveles de actividad de sus promotores frente a estos estímulos. Al respecto, y contrariamente a los resultados presentados en este Capítulo, varios reportes genómicos clasifican a estos tres ORFs como integrantes del grupo de genes regulados positivamente en condiciones de estrés (Castells-Roca et al., 2011; Causton et al., 2001; Gasch et al., 2000; Posas et al., 2000; Rep, Krantz, Thevelein, & Hohmann, 2000; Yale & Bohnert, 2001). Una posible explicación para esta discrepancia es que la respuesta al calor en levaduras involucraría cambios tanto en los niveles de transcripción como en la estabilidad del mRNA (Castells-Roca et al., 2011). *BCY1*, *TPK2* y *TPK3* muestran tasas de transcripción más constantes a 37°C que *TPK1*, que incrementa su actividad hasta 1.5 veces. Sin embargo todas las subunidades muestran un incremento en la abundancia de mRNA, indicando un rol en la estabilidad de esta biomolécula (Castells-Roca et al., 2011).

Se evaluó la participación de *Yak1*, que es la quinasa activadora de *Msn2/4*, en condiciones de estrés. En cepas en las que el gen *YAK1* está delecionado, la actividad del promotor *TPK1* no muestra el comportamiento esperado, que es la disminución de su actividad, pero sí exhibe la respuesta al calor mediada por *Msn2/4*. Este resultado indicaría que la ausencia de *Yak1* no tiene efecto sobre la actividad transcripcional de *Msn2/4*. Se ha reportado que en condiciones de hambreado de glucosa o de estrés por calor, tanto *Yak1* como *Rim15* regularían a *Msn2/4* por fosforilación, pero sus efectos serían diferentes dependiendo del contexto de los promotores blanco (Lee et al., 2013, 2008). En el caso del promotor *TPK1*, en ausencia de *Yak1*, *Rim15* regularía positivamente la actividad de *Msn2/4* frente al tratamiento con calor. Por otro lado, la falta de *Yak1* conduciría a un aumento de la localización nuclear de PKA, como consecuencia del incremento en la localización nuclear de *Bcy1* (ver más adelante). Según los resultados obtenidos en este Capítulo, una menor actividad PKA condice con un promotor *TPK1* activo. Los promotores *TPK2*, *TPK3* y *BCY1* no muestran respuesta frente a la exposición al estrés por calor, en una la cepa *yak1Δ*. Por otro lado, al ensayar una cepa que tiene

delecionados los genes *MSN2/4*, además del gen *YAK1*, sorprendentemente la actividad de los cuatro promotores se induce. Una posible explicación para estas diferencias es que Yak1 afectaría indirectamente la actividad de los promotores. En este sentido, se ha reportado que un sustrato de la quinasa Yak1 es Bcy1, que regula mediante fosforilación su localización (Budhwar, Lu, & Hirsch, 2010; G Griffioen et al., 2001). La localización de Bcy1 es dependiente de la fuente de carbono, y se ha observado que en células creciendo en glucosa es predominantemente nuclear (Gerard Griffioen et al., 2000). Se ha visto que Bcy1 muestra un aumento en la localización nuclear en las cepas *yak1Δ* y *msn2/4Δ*. Esta localización se ve a su vez aumentada en una cepa que presenta la triple mutante de delección *msn2/4Δyak1Δ* (G Griffioen et al., 2001). Los resultados de este Capítulo indican que esta cepa presenta los mayores aumentos en la actividad de los promotores (Figura 1.8). Por el contrario, en una cepa mutante del gen de la adenilato ciclasa, que presenta baja actividad PKA, la localización de Bcy1 es mayoritariamente citoplasmática, en el crecimiento en glucosa (G Griffioen et al., 2001). De esta forma, PKA controla la localización de su subunidad regulatoria Bcy1. En la triple mutante *msn2/4Δyak1Δ*, la actividad de PKA sería inhibida como resultado de una aumentada localización nuclear de Bcy1, lo que conduciría a un mayor nivel de actividad de los promotores.

La Figura 1.2 esquematiza el resumen de los resultados referidos al promotor *TPK1*. Los factores de transcripción Gis1 y Msn2/4 y la quinasa Rim15 están involucrados en la regulación de su actividad. Msn2 regula positivamente al promotor *TPK1*, y aunque la disminución de su abundancia en este promotor no era un resultado esperado para un factor activador de la transcripción, este comportamiento se ha descrito para genes de respuesta al estrés térmico (T. Y. Erkina et al., 2008). Msn2/4, una vez unidos al promotor blanco, son degradados proteolíticamente como consecuencia de la activación de la transcripción en respuesta al estímulo de estrés. Este comportamiento responde al modelo de “viuda negra” de activación de la transcripción, y permite evitar la transcripción innecesaria. En este modelo los factores de transcripción son degradados en los promotores de los genes blanco, una vez iniciada la transcripción (Collins & Tansey, 2006; T. Y. Erkina et al., 2008; Ward & Garrett, 1994).

El factor de transcripción Gis1 y la quinasa Rim15 intervienen en la reprogramación transcripcional del metabolismo durante el *shift*-diáuxico. Se ha reportado que el 95% de los genes dependientes de Gis1 para su activación están incluidos en un subgrupo de genes que también

dependen de Msn2/4, sugiriendo que Gis1 y Msn2/4 no sólo superponen sus funciones *in vivo*, sino que también actúan de manera cooperativa en la regulación de la transcripción de un gran número de genes (Pedruzzi et al., 2000; Roosen et al., 2005; Zhang et al., 2009). Los resultados presentados en este Capítulo sugieren que durante el tratamiento a 37°C, los factores de transcripción Gis1 y Msn2/4 median una respuesta coordinada del promotor *TPK1* (Figuras 1.8 y 1.10).

En este Capítulo se ha demostrado también la participación de Sok2 en la regulación del promotor *TPK1*, como activador transcripcional. Sok2 ha sido descrito como un factor represor general, pero también como un activador leve transcripcional (Shenhar & Kassir, 2001). La actividad represora de Sok2 depende de la fosforilación por PKA (Shenhar & Kassir, 2001). Estudios de la secuencia del promotor *TPK1* demostraron la presencia de algunos sitios STRE, y de al menos un putativo sitio de unión de Sok2 en la cercanía de uno de los anteriores (Figura 1.12). Asimismo se ha evidenciado en los resultados de este Capítulo que Sok2 une al promotor *TPK1* en un sitio que se encuentra cercano al sitio de unión de Msn2/4 (Figura 1.10). Se propone que Sok2 asiste la unión de Msn2/4, y que cuando estos factores liberan el promotor (por degradación proteolítica), en respuesta al estímulo de calor, Sok2 es reclutado junto con Gis1. Sok2 es también necesario para la unión de Gis1 (Figura 1.11). Una cepa mutante *sok2Δ* presenta una mayor capacidad termotolerante y también una incrementada acumulación de glucógeno, siendo éstos fenotipos asociados con una baja actividad PKA (Ward & Garrett, 1994; Ward, Gimeno, Fink, & Garrett, 1995). Estos efectos son consistentes con un modelo en el cual la expresión de *TPK1* y consecuentemente la actividad de PKA son positivamente regulados por Sok2.

Finalmente, además de la vía regulatoria que involucra a Msn2/4, Gis1, Sok2 y Rim15, existiría una vía paralela dependiente de PKA que regula negativamente la actividad del promotor *TPK1*, a través de reguladores que aún no se han podido identificar (Figura 1.12).

En la vía de cAMP-PKA, el cAMP juega un rol crucial como segundo mensajero, con niveles de abundancia estrictamente controlados. Se ha demostrado que la activación de PKA dispara un proceso de retroalimentación negativo a diferentes niveles por acción de la propia actividad PKA (Vandamme, Castermans, & Thevelein, 2012; y referencias allí). PKA regula también su propia localización a través de las actividades de Yak1 y Msn2/4 (G Griffioen et al., 2001). Los resultados descritos en este Capítulo permiten agregar un nuevo nivel de autorregulación de la vía de cAMP-PKA, a través de la

regulación de la expresión de las subunidades de PKA por la propia actividad de esta enzima. La regulación de la expresión de cada subunidad de PKA parece ser otro nivel que controla la especificidad de la señalización por la vía de cAMP-PKA. Aunque el control de la expresión de todas las subunidades es autorregulado por la actividad de PKA, el resultado global es que cada una es expresada diferencialmente durante el crecimiento en glucosa, y frente a la exposición al estrés térmico y salino.

5. BIBLIOGRAFÍA

- An Tanghe, B. P. and J. M. T. (2006). Yeast Responses to Stresses. *BIODIVERSITY AND ECOPHYSIOLOGY OF YEASTS-The Yeast Handbook*, 175–195.
- Beck, T., & Hall, M. N. (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature*, 402(6762), 689–92. doi:10.1038/45287
- Berry, D. B., & Gasch, A. P. (2008). Stress-activated genomic expression changes serve a preparative role for impending stress in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 19(11), 4580–7. doi:10.1091/mbc.E07-07-0680
- Budhwar, R., Lu, A., & Hirsch, J. P. (2010). Nutrient control of yeast PKA activity involves opposing effects on phosphorylation of the Bcy1 regulatory subunit. *Molecular Biology of the Cell*, 21(21), 3749–58. doi:10.1091/mbc.E10-05-0388
- Cameroni, E., Hulo, N., Roosen, J., Winderickx, J., & De Virgilio, C. (2004). The novel yeast PAS kinase Rim15 orchestrates G0-associated antioxidant defense mechanisms. *Cell Cycle*, 3(4), 462–468. doi:10.4161/cc.3.4.791
- Castells-Roca, L., García-Martínez, J., Moreno, J., Herrero, E., Bellí, G., & Pérez-Ortín, J. E. (2011). Heat shock response in yeast involves changes in both transcription rates and mRNA stabilities. *PLoS ONE*, 6(2). doi:10.1371/journal.pone.0017272
- Causton, H. C., Ren, B., Koh, S. S., Harbison, C. T., Kanin, E., Jennings, E. G., ... Young, R. a. (2001). Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*, 12(2), 323–337. doi:10.1074/jbc.272.35.21661
- Chen, D., Wilkinson, C. R. M., Watt, S., Penkett, C. J., Toone, W. M., Jones, N., & Bähler, J. (2008). Multiple pathways differentially regulate global oxidative stress responses in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 19(1), 308–317. doi:10.1091/mbc.E07
- Collins, G. A., & Tansey, W. P. (2006). The proteasome: a utility tool for transcription? *Current Opinion in Genetics & Development*, 16(2), 197–202. doi:10.1016/j.gde.2006.02.009
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H. N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Teixeira, M., & Thevelein, J. M. (2014). Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 38, 254–299. doi:10.1111/1574-6976.12065
- Dow, S., Lucau-danila, A., Anderson, K., Arkin, A. P., Astromoff, A., Bakkoury, M. El, ... Ko, P. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome, 1–5.

- Erkina, T. I., Lavrova, M. V., & Erkin, A. M. (2009). [Alternative ways of stress regulation in cells of *Saccharomyces cerevisiae*: transcriptional activators Msn2 and Msn4]. *Tsitologiya*, *51*(3), 271–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19435282>
- Erkina, T. Y., Tschetter, P. A., & Erkin, A. M. (2008). Different requirements of the SWI/SNF complex for robust nucleosome displacement at promoters of heat shock factor and Msn2- and Msn4-regulated heat shock genes. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(4), 1207–17. doi:10.1128/MCB.01069-07
- Estruch, F., & Carlson, M. (1993). Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, *13*(7), 3872–3881. doi:10.1128/MCB.13.7.3872.Updated
- Ferguson, S. B., Anderson, E. S., Harshaw, R. B., Thate, T., Craig, N. L., & Nelson, H. C. M. (2005). Protein kinase A regulates constitutive expression of small heat-shock genes in an Msn2/4p-independent and Hsf1p-dependent manner in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *169*(3), 1203–1214. doi:10.1534/genetics.104.034256
- Foat, B. C., Houshmandi, S. S., Olivas, W. M., & Bussemaker, H. J. (2005). Profiling condition-specific, genome-wide regulation of mRNA stability in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(49), 17675–80. doi:10.1073/pnas.0503803102
- Galello, F., Portela, P., Moreno, S., & Rossi, S. (2010). Characterization of substrates that have a differential effect on *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase A holoenzyme activation. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(39), 29770–29779. doi:10.1074/jbc.M110.120378
- Garmendia-Torres, C., Goldbeter, A., & Jacquet, M. (2007). Nucleocytoplasmic Oscillations of the Yeast Transcription Factor Msn2: Evidence for Periodic PKA Activation. *Current Biology*, *17*(12), 1044–1049. doi:10.1016/j.cub.2007.05.032
- Garreau, H., Hasan, R. N., Renault, G., Estruch, F., Boy-Marcotte, E., & Jacquet, M. (2000). Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, *146*(9), 2113–2120.
- Garrett, S., & Broach, J. (1989). Loss of Ras activity in *Saccharomyces cerevisiae* is suppressed by disruptions of a new kinase gene, YAK1, whose product may act downstream of the cAMP-dependent protein kinase. *Genes & Development*, *3*(9), 1336–48. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2558053>
- Gasch, P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., ... Brown, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*, *11*(12), 4241–4257. doi:10.1091/mbc.11.12.4241

- Giacometti, R., Kronberg, F., Biondi, R. M., Hernández, A. I., & Passeron, S. (2012). Cross regulation between *Candida albicans* catalytic and regulatory subunits of protein kinase A. *Fungal Genetics and Biology* : *FG & B*, *49*(1), 74–85. doi:10.1016/j.fgb.2011.12.001
- Gonze, D., Jacquet, M., & Goldbeter, A. (2008). Stochastic modelling of nucleocytoplasmic oscillations of the transcription factor Msn2 in yeast. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, *5 Suppl 1*(April), S95–S109. doi:10.1098/rsif.2008.0141.focus
- Görner, W., Durchschlag, E., Martinez-pastor, M. T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., ... Schu, C. (1998). regulated by stress and protein kinase A ? activity Nuclear localization of the C 2 H 2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity *Wolfram Go*, 586–597.
- Görner, W., Durchschlag, E., Wolf, J., Brown, E. L., Ammerer, G., Ruis, H., & Schüller, C. (2002). Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *EMBO Journal*, *21*(1-2), 135–144. doi:10.1093/emboj/21.1.135
- Griffioen, G., Anghileri, P., Imre, E., Baroni, M. D., & Ruis, H. (2000). Nutritional control of nucleocytoplasmic localization of cAMP-dependent protein kinase catalytic and regulatory subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(2), 1449–1456. doi:10.1074/jbc.275.2.1449
- Griffioen, G., Branduardi, P., Ballarini, a, Anghileri, P., Norbeck, J., Baroni, M. D., & Ruis, H. (2001). Nucleocytoplasmic distribution of budding yeast protein kinase A regulatory subunit Bcy1 requires Zds1 and is regulated by Yak1-dependent phosphorylation of its targeting domain. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(2), 511–523. doi:10.1128/MCB.21.2.511-523.2001
- Guan, Q., Haroon, S., Bravo, D. G., Will, J. L., & Gasch, A. P. (2012). Cellular memory of acquired stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *192*(2), 495–505. doi:10.1534/genetics.112.143016
- Hahn, J. S., & Thiele, D. J. (2004). Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* Heat Shock Transcription Factor under Glucose Starvation Conditions by Snf1 Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(7), 5169–5176. doi:10.1074/jbc.M311005200
- Hirata, Y., Andoh, T., Asahara, T., & Kikuchi, A. (2003). Yeast glycogen synthase kinase-3 activates Msn2p-dependent transcription of stress responsive genes. *Molecular Biology of the Cell*, *14*(1), 302–12. doi:10.1091/mbc.E02-05-0247
- Hohmann, S., & Mager, W. H. (Eds.). (2003). *Yeast Stress Responses* (Vol. 1). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/3-540-45611-2
- Jacquet, M., Renault, G., Lallet, S., De Mey, J., & Goldbeter, A. (2003). Oscillatory nucleocytoplasmic shuttling of the general stress response transcriptional activators Msn2 and Msn4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*, *161*(3), 497–505. doi:10.1083/jcb.200303030

- Kano, Y., Bentler, P. M., & Mooijaart, a B. (1993). 1. Introduction, *1*, 187–196.
- Lee, P., Cho, B. R., Joo, H. S., & Hahn, J. S. (2008). Yeast Yak1 kinase, a bridge between PKA and stress-responsive transcription factors, Hsf1 and Msn2/Msn4. *Molecular Microbiology*, *70*(4), 882–895. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06450.x
- Lee, P., Kim, M. S., Paik, S. M., Choi, S. H., Cho, B. R., & Hahn, J. S. (2013). Rim15-dependent activation of Hsf1 and Msn2/4 transcription factors by direct phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, *587*(22), 3648–3655. doi:10.1016/j.febslet.2013.10.004
- Lee, P., Paik, S. M., Shin, C. S., Huh, W. K., & Hahn, J. S. (2011). Regulation of yeast Yak1 kinase by PKA and autophosphorylation-dependent 14-3-3 binding. *Molecular Microbiology*, *79*(3), 633–646. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07471.x
- Levy, S., Ihmels, J., Carmi, M., Weinberger, A., Friedlander, G., & Barkai, N. (2007). Strategy of transcription regulation in the budding yeast. *PLoS One*, *2*(2), e250. doi:10.1371/journal.pone.0000250
- Luo, X., Talarek, N., & De Virgilio, C. (2011). Initiation of the yeast G0 program requires Igo1 and Igo2, which antagonize activation of decapping of specific nutrient-regulated mRNAs. *RNA Biology*, *8*(1), 14–17. doi:10.4161/rna.8.1.13483
- Malcher, M., Schladebeck, S., & Mösch, H. U. (2011). The Yak1 protein kinase lies at the center of a regulatory cascade affecting adhesive growth and stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *187*(3), 717–730. doi:10.1534/genetics.110.125708
- Martínez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, a, Ruis, H., & Estruch, F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *The EMBO Journal*, *15*(9), 2227–2235.
- Mayordomo, I., Estruch, F., & Sanz, P. (2002). Convergence of the target of rapamycin and the Snf1 protein kinase pathways in the regulation of the subcellular localization of Msn2, a transcriptional activator of STRE (stress response element)-regulated genes. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(38), 35650–35656. doi:10.1074/jbc.M204198200
- Mazón, M. J., Behrens, M. M., Morgado, E., & Portillo, F. (1993). Low activity of the yeast cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit Tpk3 is due to the poor expression of the TPK3 gene. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, *213*(1), 501–506. doi:doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb17787.x
- Medvedik, O., Lamming, D. W., Kim, K. D., & Sinclair, D. a. (2007). MSN2 and MSN4 link calorie restriction and TOR to sirtuin-mediated lifespan extension in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biology*, *5*(10), 2330–2341. doi:10.1371/journal.pbio.0050261

- Miller, C., Schwalb, B., Maier, K., Schulz, D., Dümcke, S., Zacher, B., ... Cramer, P. (2011). Dynamic transcriptome analysis measures rates of mRNA synthesis and decay in yeast. *Molecular Systems Biology*, 7, 458. doi:10.1038/msb.2010.112
- Miura, F., Kawaguchi, N., Yoshida, M., Uematsu, C., Kito, K., Sakaki, Y., & Ito, T. (2008). Absolute quantification of the budding yeast transcriptome by means of competitive PCR between genomic and complementary DNAs. *BMC Genomics*, 9, 574. doi:10.1186/1471-2164-9-574
- Molin, C., Jauhainen, A., Warringer, J., Nerman, O., & Sunnerhagen, P. (2009). mRNA stability changes precede changes in steady-state mRNA amounts during hyperosmotic stress. *RNA (New York, N.Y.)*, 15(4), 600–14. doi:10.1261/rna.1403509
- Morano, K. a., Grant, C. M., & Moye-Rowley, W. S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(4), 1157–1195. doi:10.1534/genetics.111.128033
- Moriya, H., Shimizu-Yoshida, Y., Omori, A., Iwashita, S., Katoh, M., & Sakai, A. (2001). Yak1p, a DYRK family kinase, translocates to the nucleus and phosphorylates yeast Pop2p in response to a glucose signal. *Genes and Development*, 15(10), 1217–1228. doi:10.1101/gad.884001
- Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M., & Snyder, M. (2008). The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5881), 1344–9. doi:10.1126/science.1158441
- Pedruzzi, I., Bürckert, N., Egger, P., & De Virgilio, C. (2000). *Saccharomyces cerevisiae* Ras/cAMP pathway controls post-diauxic shift element-dependent transcription through the zinc finger protein Gis1. *The EMBO Journal*, 19(11), 2569–2579. doi:10.1093/emboj/19.11.2569
- Pelechano, V., & Pérez-Ortín, J. E. (2010). There is a steady-state transcriptome in exponentially growing yeast cells. *Yeast (Chichester, England)*, 27(7), 413–22. doi:10.1002/yea.1768
- Pérez-Ortín, J. E., Alepuz, P. M., & Moreno, J. (2007). Genomics and gene transcription kinetics in yeast. *Trends in Genetics : TIG*, 23(5), 250–7. doi:10.1016/j.tig.2007.03.006
- Posas, F., Chambers, J. R., Heyman, J. A., Hoeffler, J. P., de Nadal, E., & Ariño, J. (2000). The transcriptional response of yeast to saline stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(23), 17249–55. doi:10.1074/jbc.M910016199
- Reinders, A., Bürckert, N., Boller, T., & Bu, N. (1998). entry into stationary phase through the Rim15p protein kinase cAMP-dependent protein kinase controls entry into stationary phase through the Rim15p protein kinase, 2943–2955. doi:10.1101/gad.12.18.2943
- Reinders, A., Bürckert, N., Boller, T., Wiemken, A., & De Virgilio, C. (1998). *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent protein kinase controls entry into stationary phase through the Rim15p protein

kinase. *Genes & Development*, 12(18), 2943–55. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=317170&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Reiter, W., Klopff, E., De Wever, V., Anrather, D., Petryshyn, A., Roetzer, A., ... Ammerer, G. (2013). Yeast protein phosphatase 2A-Cdc55 regulates the transcriptional response to hyperosmolarity stress by regulating Msn2 and Msn4 chromatin recruitment. *Molecular and Cellular Biology*, 33(5), 1057–72. doi:10.1128/MCB.00834-12
- Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J. M., & Hohmann, S. (2000). The Transcriptional Response of *Saccharomyces cerevisiae* to, 275(12), 8290–8300.
- Romero-Santacreu, L., Moreno, J., Pérez-Ortín, J. E., & Alepuz, P. (2009). Specific and global regulation of mRNA stability during osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA (New York, N.Y.)*, 15(6), 1110–20. doi:10.1261/rna.1435709
- Roosen, J., Engelen, K., Marchal, K., Mathys, J., Griffioen, G., Cameroni, E., ... Winderickx, J. (2005). PKA and Sch9 control a molecular switch important for the proper adaptation to nutrient availability. *Molecular Microbiology*, 55(3), 862–880. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04429.x
- Santhanam, A., Hartley, A., Düvel, K., James, R., Garrett, S., Du, K., & Broach, J. R. (2004). PP2A Phosphatase Activity Is Required for Stress and Tor Kinase Regulation of Yeast Stress Response Factor Msn2p. *Molecular and Cellular Biology*, 24(12), 5261–5271. doi:10.1128/MCB.24.12.5261-5271.2004
- Schmitt, A. P., & McEntee, K. (1996). Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(12), 5777–82. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=39137&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Shalem, O., Dahan, O., Levo, M., Martinez, M. R., Furman, I., Segal, E., & Pilpel, Y. (2008). Transient transcriptional responses to stress are generated by opposing effects of mRNA production and degradation. *Molecular Systems Biology*, 4, 223. doi:10.1038/msb.2008.59
- Shenhar, G., & Kassir, Y. (2001). A positive regulator of mitosis, Sok2, functions as a negative regulator of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 21(5), 1603–12. doi:10.1128/MCB.21.5.1603-1612.2001
- Smith, A., Ward, M. P., & Garrett, S. (1998). Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO Journal*, 17(13), 3556–3564. doi:10.1093/emboj/17.13.3556

- Sorger, P. K., & Pelham, H. R. (1988). Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell*, *54*(6), 855–864. doi:10.1016/S0092-8674(88)91219-6
- Stiefel, J., Wang, L., Kelly, D. A., Janoo, R. T. K., Seitz, J., Whitehall, S. K., & Hoffman, C. S. (2004). Suppressors of an adenylate cyclase deletion in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell*, *3*(3), 610–9. doi:10.1128/EC.3.3.610-619.2004
- Swinnen, E., Wanke, V., Roosen, J., Smets, B., Dubouloz, F., Pedruzzi, I., ... Winderickx, J. (2006). Rim15 and the crossroads of nutrient signalling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Division*, *1*, 3. doi:10.1186/1747-1028-1-3
- Tansey, W. P. (2001). Transcriptional activation: risky business. *Genes & Development*, *15*(9), 1045–50. doi:10.1101/gad.896501
- Thevelein, J. M., Cauwenberg, L., Colombo, S., De Winde, J. H., Donation, M., Dumortier, F., ... Winderickx, J. (2000). Nutrient-induced signal transduction through the protein kinase A pathway and its role in the control of metabolism, stress resistance, and growth in yeast. *Enzyme and Microbial Technology*, *26*(9-10), 819–825. doi:10.1016/S0141-0229(00)00177-0
- Trott, a, & Morano, K. a. (2003). The yeast response to heat shock. *Topics in Current Genetics, yeast stre*, 71–119.
- Tudisca, V., Recouvreux, V., Moreno, S., Boy-Marcotte, E., Jacquet, M., & Portela, P. (2010). Differential localization to cytoplasm, nucleus or P-bodies of yeast PKA subunits under different growth conditions. *European Journal of Cell Biology*, *89*(4), 339–348. doi:10.1016/j.ejcb.2009.08.005
- Vandamme, J., Castermans, D., & Thevelein, J. M. (2012). Molecular mechanisms of feedback inhibition of protein kinase A on intracellular cAMP accumulation. *Cellular Signalling*, *24*(8), 1610–8. doi:10.1016/j.cellsig.2012.04.001
- Verghese, J., Abrams, J., Wang, Y., & Morano, K. a. (2012). Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Model System. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *76*(2), 115–158. doi:10.1128/MMBR.05018-11
- Ward, M. P., & Garrett, S. (1994). Suppression of a yeast cyclic AMP-dependent protein kinase defect by overexpression of SOK1, a yeast gene exhibiting sequence similarity to a developmentally regulated mouse gene. *Molecular and Cellular Biology*, *14*(9), 5619–27. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=359086&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ward, M. P., Gimeno, C. J., Fink, G. R., & Garrett, S. (1995). SOK2 may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. *Molecular and Cellular Biology*, *15*(12), 6854–63. Retrieved from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=230940&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Yale, J., & Bohnert, H. J. (2001). Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 15996–6007. doi:10.1074/jbc.M008209200

Zhang, N., Wu, J., & Oliver, S. G. (2009). Gis1 is required for transcriptional reprogramming of carbon metabolism and the stress response during Transition into stationary phase in yeast. *Microbiology*, 155(5), 1690–1698. doi:10.1099/mic.0.026377-0

CAPÍTULO 2

REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LAS SUBUNIDADES DE LA PROTEÍNA QUINASA A EN FUENTE DE CARBONO NO FERMENTABLE

1. INTRODUCCIÓN

Las levaduras prefieren la glucosa como fuente de energía y de carbono, frente a otros azúcares, porque puede ser rápidamente convertida a etanol. La glucosa es además una molécula mensajera que transduce la señal de óptimas condiciones de crecimiento a la maquinaria celular (Rolland, Winderickx, & Thevelein, 2002). Para que pueda ejercer la mayoría de sus efectos regulatorios son necesarios su transporte y fosforilación (Rolland, Winderickx, & Thevelein, 2001). Los transportadores de glucosa, se expresan según la cantidad del azúcar disponible en el medio: el

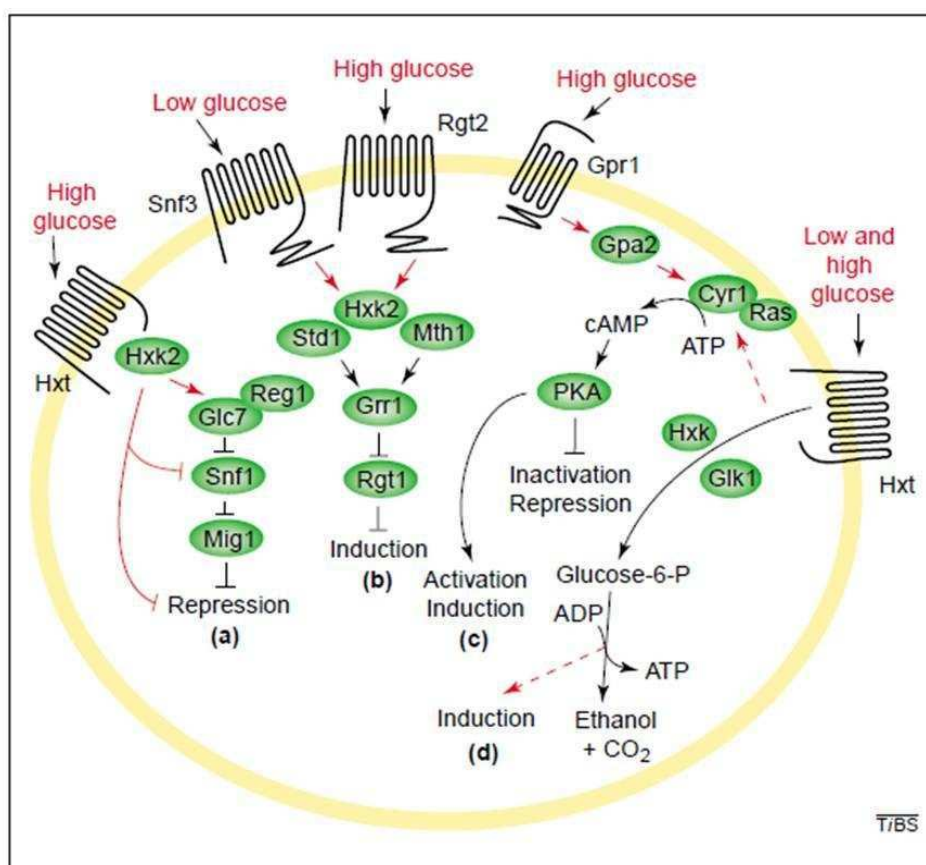


Figura 2.1. Detección de glucosa en levaduras.

Se muestran 4 vías distintas de señalización. (a) La principal vía catabólica de represión por glucosa es activada por alta glucosa y causa la represión de genes involucrados en, por ejemplo, respiración, gluconeogénesis y metabolismo de fuentes alternativas de carbono. (b) Una segunda vía de señalización controla la inducción de genes de transportadores de hexosas. (c) La síntesis de cAMP activada por glucosa requiere de dos estímulos: la fosforilación de la glucosa por alguna hexokinasa (Glk1, Hxk1 o Hxk2) y la

activación del receptor acoplado a proteína G, Gpr1. El cAMP activa a la proteína quinasa A (PKA), que a su vez activa a enzimas de la glucólisis, e inhibe enzimas de gluconeogénesis. PKA también produce la inducción de genes relacionados con el crecimiento y la represión de genes de estrés. (d) Una cuarta vía es responsable de la inducción de genes glucolíticos por glucosa, por un mecanismo que aún no se conoce. Figura tomada de Rolland et al., (2001).

transportador Hxt1 de baja afinidad, se expresa sólo cuando los niveles de glucosa son elevados; Hxt2 y Hxt4, de alta afinidad, se sintetizan cuando los niveles de glucosa son bajos; y Hxt3, de afinidad intermedia, se expresa en concentraciones de glucosa tanto elevadas como bajas (J. H. Kim, Roy, Jouandot, & Cho, 2013). Los mecanismos de transducción de señalización que se activan en presencia de este azúcar son cuatro, y se mencionan a continuación. (a) vía de represión por glucosa, mediada por hexoquinasas, principalmente Hxk2, (b) vía de inducción de genes *HXT*, controlada por los sensores de glucosa Snf3 y Rgt2, (c) vía que conduce a la síntesis de cAMP y a la activación de PKA, y (d) vía de inducción de genes de glucólisis (Rolland et al., 2001).

1.1. Vía de represión por glucosa

El principal mecanismo de respuesta a la glucosa, denominado vía de represión por glucosa, es mediado por proteínas hexoquinasas que fosforilan a este azúcar en el citoplasma celular iniciando el metabolismo. De las tres hexoquinasas citoplasmáticas, sólo la Hxk2 es necesaria para activar el mecanismo de represión (Rolland et al., 2001, 2002). En este sentido, los transportadores de glucosa (familia Hxt) se requieren únicamente para mantener el nivel intracelular de glucosa fosforilada (Rolland et al., 2001). La activación de esta vía (Figura 2.1.a) conduce a la represión de varios componentes involucrados en el transporte y metabolismo de fuentes alternativas de carbono así como del metabolismo respiratorio, funciones que son dependientes principalmente de la quinasa Snf1 (Conrad et al., 2014).

El principal efector de la vía de represión por glucosa es Mig1 (Figura 2.2), un factor de transcripción con 2 motivos de unión al DNA tipo dedo de Zinc (Ostling, Carlberg, & Ronne, 1996). Su localización subcelular es regulada por glucosa, a través de su fosforilación por la quinasa Snf1 (Papamichos-Chronakis, Gligoris, & Tzamarias, 2004). La represión por Mig1 puede ser directa o indirecta, afectando la transcripción de activadores transcripcionales (Nehlin, Carlberg, & Ronne, 1991). La unión de Mig1 a varios promotores, como *SUC2*, está regulada por Hxk2 y Snf1. En altas concentraciones de glucosa, Mig1, interactúa fuertemente con Hxk2 en el núcleo para establecer el estado de represión transcripcional. El bloqueo de la Ser311 de Mig1 es crítico en la estabilización

del complejo con Hxk2. Snf1 se encontró asociado a Hxk2 tanto en baja como en alta glucosa, sugiriendo que interactúan constitutivamente. De esta forma, Hxk2 actuaría como puente entre

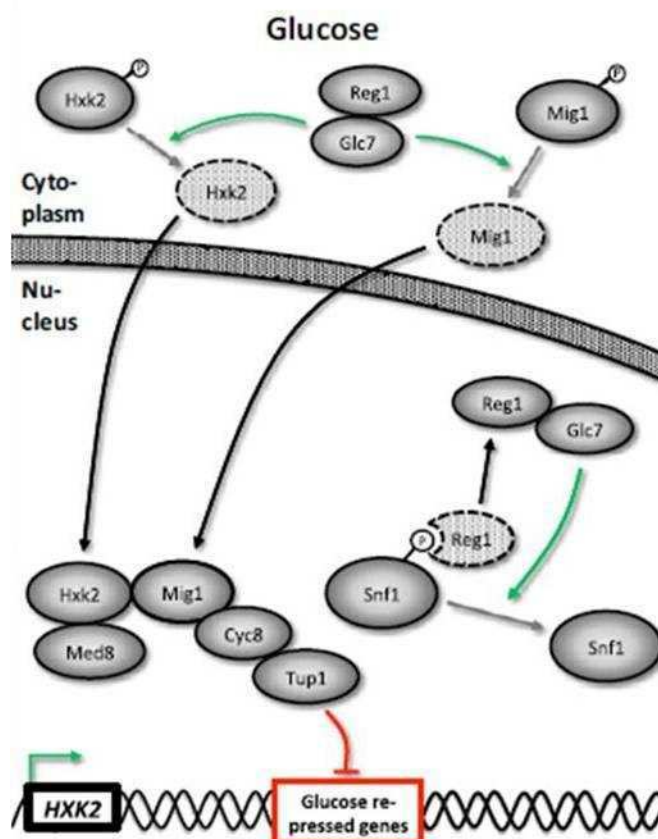


Figura 2.2. Vía de represión por glucosa mediada por Snf1-Hxk2.

Cuando la glucosa está presente en el medio, Mig1 y Hxk2 son desfosforilados por Reg1-Glc7 y translocan al núcleo donde, a través de la interacción con Tup1-Cyc8, reprimen la transcripción de sus genes blanco. Figura tomada de Rødkaer & Faergeman (2014).

Mig1 y Snf1, y sería necesario para impedir la fosforilación inhibitoria de la Ser311 de Mig1 por Snf1 en condiciones de crecimiento de elevada glucosa (Ahuatzi et al., 2007). Cuando la glucosa se agota o en crecimiento en presencia de glicerol, se rompe la interacción Hxk2-Mig1 pero la asociación Hxk2-Snf1 continúa, lo que facilita la fosforilación de la Ser311 de Mig1 por Snf1 y su exportación nuclear. Además Hxk2 es fosforilado en Ser14 por Snf1 y también relocaliza en citoplasma (Fernández-garcía et al., 2012; Peláez, Herrero, & Moreno, 2009). El proceso conduce a la disociación del complejo represor de *SUC2* y a la activación de su transcripción (Figura 2.3) (Ahuatzi et al., 2007; Papamichos-Chronakis et al., 2004).

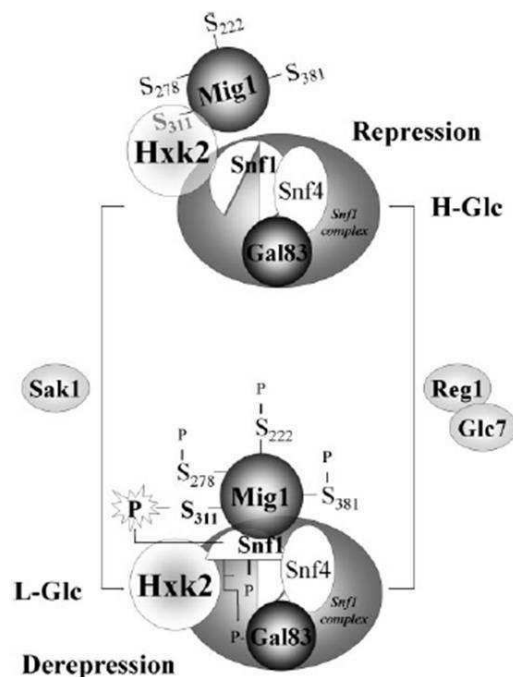


Figura 2.3. Modelo del mecanismo por el que Hxk2 regula la fosforilación de Mig1 en la Ser311 por el complejo Snf1.

En condiciones de elevada glucosa (*H-Glc*), Hxk2 localiza en el núcleo e interactúa con Mig1 y Snf1 (la subunidad catalítica del complejo SNF1). Como producto de la unión de Hxk2 a Mig1, la Ser311 es desfosforilada resultando en el mantenimiento de las condiciones represivas para varios genes regulados por glucosa. En bajas condiciones de glucosa (*L-Glc*), Hxk2 no interactúa con Mig1 pero sí con Snf1. La inhibición de la interacción Hxk2-Mig1 facilita la fosforilación de la Ser311 por Snf1 y tanto Mig1 como Hxk2 son exportados del núcleo. La ausencia del complejo represor activa la transcripción de varios genes regulados por glucosa (Ahuatzi et al., 2007).

En la regulación del gen *GAL1* se ha descrito otro componente importante que interactúa con Mig1, que es el complejo correpresor Ssn6-Tup1 (Papamichos-Chronakis et al., 2004). Durante el crecimiento en glucosa, el gen *GAL1* es ocupado por la variante no fosforilada de Mig1, que interactúa con Ssn6-Tup1. En condiciones de baja concentración de glucosa, Mig1 es fosforilado por Snf1, siendo un prerequisite para su exportación nuclear, pero no suficiente para excluirlo de los promotores blanco. La forma fosforilada de Mig1 unida al promotor de *GAL1* provocaría un cambio conformacional que alteraría la funcionalidad de Ssn6-Tup1, liberando al gen de la represión (Papamichos-Chronakis et al., 2004).

Estos ejemplos demuestran la gran complejidad de la represión mediada por Mig1 y la heterogeneidad en los mecanismos descritos.

En levaduras existen además dos proteínas que presentan más de un 70% de homología en sus motivos de unión al DNA tipo dedos de Zinc con Mig1: Mig2 y Mig3 (Lutfiyya et al., 1998). La localización nuclear de Mig2 es controlada por glucosa, y alterna entre núcleo y mitocondria (Fernández-Cid, Riera, Herrero, & Moreno, 2012); pero no existen evidencias que indiquen una intervención de Snf1 en esta regulación (Westholm et al., 2008). Recientemente se ha señalado que Mig2 es sustrato de Snf1 en el crecimiento en galactosa, y que su fosforilación lo marca para degradación por la vía de proteasoma (Lim et al., 2011). En este sentido, se ha visto que es necesaria su degradación inducida por galactosa para la expresión del gen *GAL1* (Lim et al., 2011). Tanto *MIG2* como *MIG3* son inducidos por glucosa (Kaniak, Xue, Macool, Kim, & Johnston, 2004), y la proteína Mig3 también es blanco de fosforilación de Snf1 (Dubacq, Chevalier, & Mann, 2004). En relación a su actividad como represores transcripcionales, se vio que Mig1 es el principal efector de la vía de represión por glucosa y todos los genes reprimidos por Mig2 son también blanco de Mig1, lo que indica que existe cierto solapamiento. Los genes que son reprimidos solamente por Mig1 están involucrados en transporte (en particular, en transporte de hexosas); aquellos reprimidos por Mig1 y también en cierto grado por Mig2, están relacionados con el metabolismo de hidratos de carbono; y los genes reprimidos redundantemente por Mig1 y Mig2, intervienen en el metabolismo de fosfato y están enriquecidos en el motivo Pho4 (Westholm et al., 2008).

Los genes *HXT*, son reprimidos por Mig1 y Mig2 por un mecanismo dependiente de la concentración de glucosa. En 2% de glucosa, Mig1 es el represor principal, mientras que en 10% de glucosa lo es Mig2. Esto cobra importancia en ambientes naturales de crecimiento de las levaduras, como frutas fermentables y uvas que contienen elevadas concentraciones de glucosa y Mig2 sería muy importante en la regulación génica (Westholm et al., 2008). Contrastando con el extensivo solapamiento funcional de Mig1 y Mig2; Mig3 participaría sólo marginalmente en la regulación de algunos genes reprimidos por glucosa, como *SUC2*, *HXT2*, *SNF3*, *MRK1* y *MTH1* (Kaniak et al., 2004; Lutfiyya et al., 1998; Westholm et al., 2008). Por otro lado, en un trabajo reciente se estudió la capacidad de Mig3 de regular cientos de genes relacionados con procesos de represión catabólicos, como la utilización de fuentes de carbono alternativas y la gluconeogénesis, en una cepa salvaje no de laboratorio. Los autores sugieren que las funciones de Mig3 se fueron perdiendo en las cepas de laboratorio probablemente debido a presiones de selección inadvertidas (Lewis & Gasch, 2012).

1.2. Vía de inducción mediada por Snf3/Rgt2

La vía de inducción de glucosa (Figura 2.1.b) inicia con la detección de este azúcar por los sensores Rgt2 y Snf3. Estas proteínas de membrana son muy similares a transportadores de hexosas en su secuencia aminoacídica primaria, sin embargo son incapaces de transportar glucosa (Ozcan, Leong, & Johnston, 1996). Por el contrario, actúan como sensores que generan una señal intracelular necesaria para la inducción de los genes *HXT* por glucosa, y por ello reciben la denominación de transeptores (Rubio-Texeira, Van Zeebroeck, Voordeckers, & Thevelein, 2010). Snf3 es un sensor de bajas concentraciones de glucosa, mientras que Rgt2 detecta altas concentraciones del azúcar. A través de sus dominios citosólicos interactúan con las proteínas regulatorias Mth1 y Std1. En ausencia de glucosa estas proteínas localizan en el núcleo en complejo con el represor transcripcional Rgt1 (Conrad et al., 2014).

Rgt1 es un represor general de la transcripción, miembro de la familia Gal4 de factores de transcripción (Ozcan & Johnston, 1995; Ozcan et al., 1996). Une al DNA como monómero, pero actúa sinérgicamente sobre múltiples sitios de unión, de manera muy eficiente (Ozcan et al., 1996). En ausencia de glucosa, Rgt1 es fosforilado en niveles basales y se une a la región regulatoria de los genes *HXT* provocando su represión mediante el reclutamiento del complejo correpresor Ssn6-Tup1. Rgt1 logra esto en colaboración con los factores de transcripción Mth1 y Std1, ya que no es capaz de reclutar a Ssn6-Tup1 directamente (J. H. Kim et al., 2013; Ozcan et al., 1996). Cuando la glucosa es sensada por Snf3 y/o Rgt2, éstos estimulan la fosforilación de Mth1 y Std1 por las caseína quinasas de tipo I, Yck1/2, lo que resulta en la ubiquitinación de Mth1 y Std1 mediada por Grr1, y su subsecuente degradación por el proteasoma (Rubio-Texeira et al., 2010). Rgt1 es entonces hiperfosforilado por PKA (Roy, Shin, Cho, & Kim, 2013), en sitios que quedan expuestos una vez que el complejo represor Rgt1-Mth1/Std1-Ssn6-Tup1 se disocia, conduciendo a la desrepresión de los genes *HXT* (J. H. Kim et al., 2013). Por otro lado, se ha propuesto que Rgt1 tendría un rol como activador transcripcional, al menos para el gen *HXT1*, y en condiciones de elevada concentración de glucosa (Jouandot, Roy, & Kim, 2011; Mosley, Lakshmanan, Aryal, & Özcan, 2003; Ozcan & Johnston, 1995; Polish, Kim, & Johnston, 2005). De todas formas prevalece la idea de que Rgt1 actúa mediante un mecanismo indirecto aún no descubierto en la activación de la transcripción de los genes *HXT* en glucosa (J.-H. Kim & Johnston, 2006).

Entrecruzamiento entre las vías de represión (mediada por Mig1/Snf1) e inducción (mediada por Snf3/Rgt2) por glucosa, a nivel de la expresión génica

El punto de unión entre las vías de inducción y de represión por glucosa es el complejo correpresor Ssn6-Tup1. Mig1 y Rgt1 interaccionan con Ssn6-Tup1, y estas asociaciones son reguladas por el mecanismo de la fosforilación de los represores transcripcionales (J. H. Kim et al., 2013). En elevadas concentraciones de glucosa, el represor Mig1 sin fosforilar recluta a Ssn6-Tup1 a sus genes blanco para lograr la represión (Papamichos-Chronakis et al., 2004), mientras que Rgt1 fosforilado se disocia de Ssn6-Tup1 liberando a sus genes blanco para su activación transcripcional (J. H. Kim et al., 2013). De manera inversa, en condiciones de baja glucosa, Ssn6-Tup1 se libera de la interacción con Mig1 fosforilado (Papamichos-Chronakis et al., 2004) y es reclutado por Rgt1 sin fosforilar a los promotores de sus genes blanco para su represión (J. H. Kim et al., 2013) (Figura 2.4).

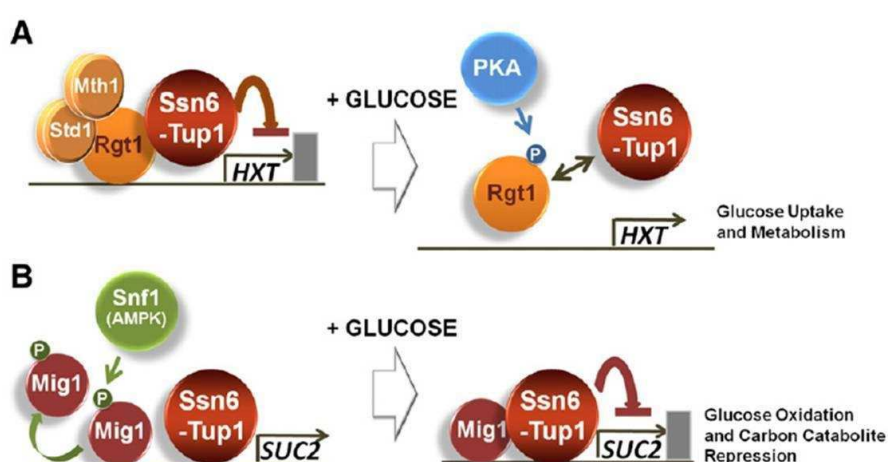


Figura 2.4. Los represores Rgt1 y Mig1, son regulados de manera similar por la disponibilidad de glucosa. Para más explicaciones ver el texto. Figura tomada de J. H. Kim et al., (2013).

Adicionalmente, los genes *SNF3* y *MTH1* son reprimidos por Mig1; *MIG1* es reprimido por Mig2, y *MIG2*, *HXK2* y *STD1* son reprimidos por Rgt1 (Gancedo, 2008; Kaniak et al., 2004; Palomino, Herrero, & Moreno, 2006).

1.3. Vía de activación de PKA

En la activación de la vía de cAMP/PKA (Figura 2.1.c) está involucrado un sistema doble de sensado de glucosa: por un lado, un sistema que detecta la glucosa extracelular, el sistema GPCR

conformado por Gpr1 y su proteína G α asociada, Gpa2; y por el otro, un sistema intracelular dependiente de la incorporación de glucosa y de su fosforilación por hexoquinasas, que activa, de alguna manera desconocida aún, a las proteínas Ras (Figura 2.5) (Rolland et al., 2001). De esta forma, la adenilato ciclasa, AC (codificada por el gen *CYR1*), es controlada por dos proteínas G que media cada una, una rama de la vía de sensado de glucosa (Conrad et al., 2014).

El mecanismo que activa a las proteínas Ras (codificadas por los genes *RAS1* y *RAS2*) es aún desconocido, se propone que un intermediario de la glucólisis funcionaría como activador alostérico (Conrad et al., 2014). Ras1 y Ras2 son dos pequeñas proteínas monoméricas que unen GTP, miembros de la subfamilia de pequeñas GTPasas eucarióticas, involucradas principalmente en transducción de señales. La delección de *RAS1* y *RAS2* es letal para las células, al igual que lo es la delección de AC o de PKA (Thevelein & Winde, 1999). La activación de Ras depende del intercambio de GDP por GTP, por el factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF), codificados por los genes *CDC25* y *SDC25*; y de la regulación de su actividad intrínseca de GTPasa por una GAP (*GTPase Activating Protein*), codificadas por los genes *IRA1* e *IRA2* (Thevelein & Winde, 1999). En su forma activa, Ras-GTP estimula la producción de cAMP por interacción directa con la AC. El nivel de cAMP en levaduras es el resultado del equilibrio entre la síntesis, catalizada por la AC, y su degradación, por fosfodiesterasas de baja y alta afinidad, codificadas por los genes *PDE1* y *PDE2* respectivamente (Busti, Coccetti, Alberghina, & Vanoni, 2010).

El mecanismo de activación del sistema GPCR es inusual porque es dependiente de la incorporación y el metabolismo intracelular de la glucosa. El receptor de membrana Gpr1 es de muy alta especificidad, al ser desafiado con una variedad de azúcares, sólo glucosa y sacarosa fueron capaces de gatillar la activación de la vía cAMP-PKA (Rubio-Teixeira et al., 2010). A diferencia de los genes *RAS* y *CYR1*; las delecciones de *GPR1* y *GPA2* no son letales, y los fenotipos resultantes pueden ser suprimidos por el agregado de cAMP extracelular (Thevelein & Winde, 1999). Gpa2-GTP, la forma activa de la subunidad G α del sistema GPCR, es capaz de interactuar directamente con la AC (Peeters et al., 2006). Esto sumado a la incapacidad de la mutante *gpa2 Δ* de disparar el pico de cAMP inducido por glucosa, y el severo defecto en el crecimiento de la doble mutante *gpa2 Δ ras2 Δ* , permitió proponer que Gpa2 interviene en la regulación de los niveles intracelulares de cAMP, posiblemente como modulador positivo de la AC (Tamaki, 2007). Gpa2 es inhibida por la activación de su actividad GTPasa intrínseca, por acción de la proteína Rgs2 (Conrad et al., 2014).

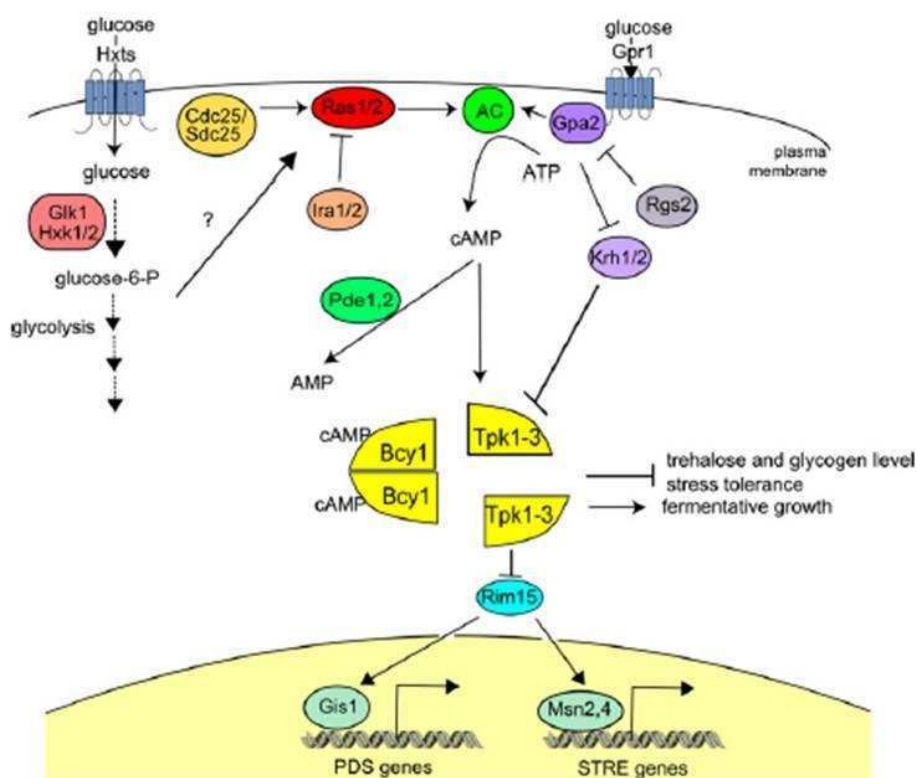


Figura 2.5. Activación de la vía cAMP/PKA por glucosa.

La AC es activada por glucosa a través de dos sistemas acoplados a proteína G. El sistema GPCR (Gpr1-Gpa2-Rgs2) detecta la glucosa extracelular, mientras que el sistema Cdc25/Sdc25-Ras1/2-Ira1/2 detecta la glucosa intracelular a través del catabolismo del azúcar en la glucólisis. Gpr1 y Cdc25/Sdc25 estimulan a los intercambiadores de nucleótidos de guanina, Gpa2 y Ras1/2, respectivamente. Rgs2 e Ira1/2 actúan como GAPs sobre Gpa2 y Ras1/2, respectivamente. El cAMP une a Bcy1, la subunidad reguladora de PKA, causando la disociación de la holoenzima y la activación de las subunidades catalíticas Tpk1-3. Las proteínas Gpb1/2 median una vía independiente de cAMP, disparada por el sistema GPCR para la activación directa de PKA, bajando la afinidad entre las subunidades catalíticas y reguladora (Conrad et al., 2014).

Las proteínas con repeticiones de dominios kelch, Gpb1 (Khr2) y Gpb2 (Khr1) fueron identificadas en experimentos de doble híbrido por su habilidad para unir Gpa2, en un intento de encontrar posibles subunidades Gβ y Gγ del sistema GPCR (Peeters et al., 2006). Análisis de estructura indican que contienen 6 o 7 repeticiones kelch, que se predice que forman estructuras similares a las de las subunidades Gβ (Peeters, Versele, & Thevelein, 2007). Células con deleciones en *GPB1* y *GPB2* muestran un incremento en el crecimiento pseudohifal e invasivo, indicando que estas proteínas son reguladores negativos de la vía de señalización de GPCR (Harashima & Heitman, 2002). Profundizando en el mecanismo se postula que la unión directa de Gpb1 y Gpb2 con las

subunidades catalíticas de PKA estimula su asociación con la subunidad regulatoria, disminuyendo la actividad quinasa de PKA (Peeters et al., 2006, 2007; Vandamme, Castermans, & Thevelein, 2012). Más aún se demostró que Gpb1 y Gpb2 afectan el estado de fosforilación y la abundancia de Bcy1, en respuesta a la disponibilidad de nutrientes. En bajas concentraciones de glucosa, Bcy1 fosforilada en Ser145 por las Tpk, es fosforilada en otro sitio por una quinasa aún no identificada, lo que aumenta su estabilidad y la hace un inhibidor más eficiente de Tpk1, Tpk2 y Tpk3, disminuyendo la señal de la vía. En ausencia de Gpb1 y Gpb2, las Tpk inhiben a la quinasa que fosforila a Bcy1, volviéndola inestable, y por lo tanto se activa la vía de PKA ya que quedan libres las subunidades catalíticas (Budhwar, Fang, & Hirsch, 2011; Budhwar, Lu, & Hirsch, 2010). Finalmente, Gpb1 y Gpb2 estabilizan a las proteínas Ira, afectando la acumulación de cAMP y por lo tanto modulando la vía de esta forma también (Vandamme et al., 2012).

Por último, en el cierre de la señal un loop negativo ocurre sobre la síntesis de cAMP por PKA, evidenciado por un gran incremento en los niveles de cAMP en células que expresan una de las mutantes de Tpk1, Tpk2 y Tpk3 con muy baja actividad quinasa ($tpk1^w$, $tpk2^w$ y $tpk3^w$), y que tienen deletados los genes de las otras subunidades (Mbonyi, van Aelst, Argüelles, Jans, & Thevelein, 1990; Nikawa, Cameron, Toda, Ferguson, & Wigler, 1987). Además PKA activa mediante fosforilación a Pde1 (Ma, Wera, Van Dijck, & Thevelein, 1999), y regula la localización y la concentración de Pde2 (Hu, Liu, Bai, & Zhang, 2010).

1.4. Vía de inducción de genes de glucólisis

Los genes de glucólisis se inducen por una vía en respuesta a glucosa que ha sido poco estudiada (Figura 2.1.d). A través del uso de diferentes mutantes que afectan distintos pasos del catabolismo de la glucosa, se comprobó que la inducción completa de ciertas enzimas glucolíticas requería del metabolismo de la glucosa en distintos puntos de la glucólisis. A partir de este estudio, se propuso que diferentes intermediarios metabólicos de la glucólisis actuarían como mensajeros para la inducción de genes específicos (Rolland et al., 2001).

1.5. Activación del metabolismo no fermentativo

En *S.cerevisiae*, Snf1 responde principalmente a niveles de glucosa en disminución, promoviendo el metabolismo respiratorio, biogénesis de peroxisomas, gluconeogénesis,

acumulación de glucógeno, autofagia, ciclo del glioxilato, y envejecimiento (Figura 2.6). Por otro lado, Snf1 activa reprime también procesos anabólicos, como biosíntesis de ácidos grasos y aminoácidos (Broach, 2012).

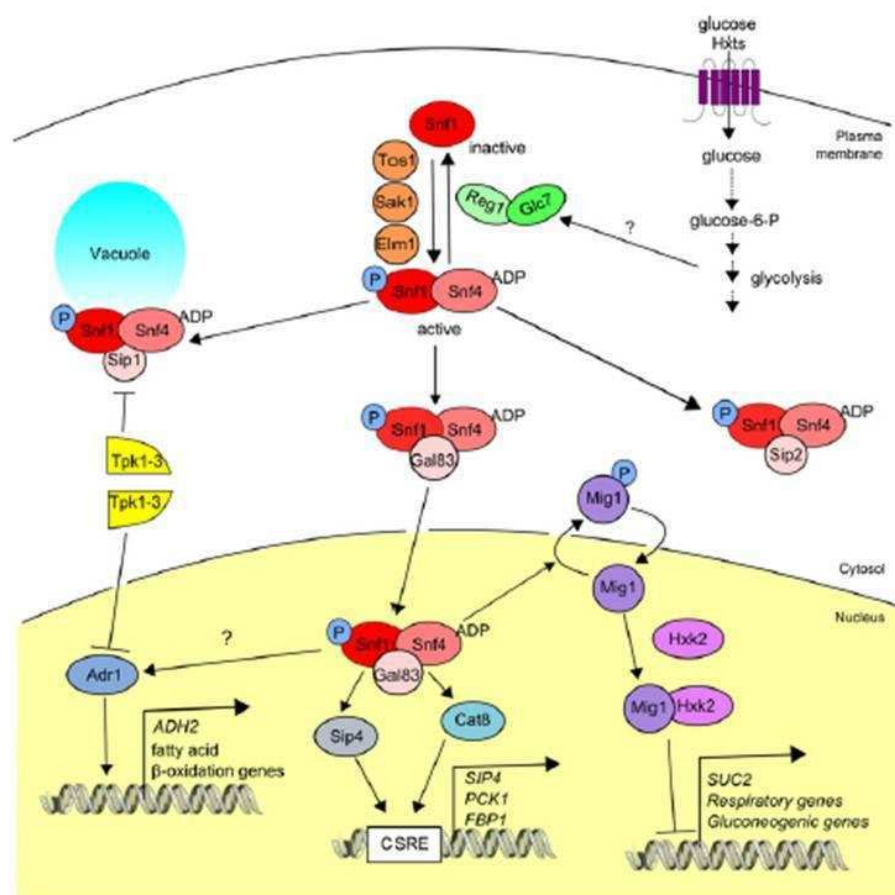


Figura 2.6. La proteína quinasa Snf1 es central en la principal vía de represión por glucosa.

Snf1 se activa en condiciones de baja glucosa por fosforilación de una de 3 quinasas. Transloca al núcleo donde inhibe a Mig1 y activa a Cat8, Adr1 y Sip4, desreprimiendo genes de metabolismo respiratorio. La unión de ADP protege a Snf1 de la desfosforilación por Reg1-Glc7 y la mantiene activa. Figura tomada de Conrad et al. (2014).

Snf1 es miembro de la familia eucariótica de proteínas quinasas activadas por AMP (AMPKs). El complejo SNF1 consiste en un heterotrímero conformado por la subunidad catalítica (α) Snf1, la subunidad regulatoria (γ) Snf4, y una de las 3 subunidades (β) Gal83, Sip1 o Sip2, que funcionan como andamiaje y determinan la localización subcelular (Broach, 2012). De esta forma, existen tres complejos SNF1 alternativos. En su estructura, Snf1 contiene un dominio N-terminal Ser/Thr

quinasa canónico y un dominio C-terminal autoinhibitorio, que en elevadas concentraciones de glucosa interaccionan adquiriendo una conformación estructural que inactiva a la enzima. Cuando el azúcar se agota, Snf4 interactúa con el dominio regulatorio de Snf1, liberando la autoinhibición (Hedbacker & Carlson, 2008). El evento clave en la activación de SNF1 es la fosforilación del residuo Thr210 en el *loop* de activación (*T-loop*) de Snf1 (McCartney & Schmidt, 2001). La fosforilación de Thr210 sumado a una apropiada conformación espacial del complejo SNF1 serían cruciales para su actividad (Momcilovic, Iram, Liu, & Carlson, 2008). En el mecanismo de activación propuesto, la fosforilación en Thr210 de Snf1 promueve la asociación del dominio quinasa con el core del heterotrímero, adoptando una conformación activa. La unión de ligandos de adenilatos con baja energía (AMP/ADP) al sitio activo y/o a Snf4 favorecen la formación de una conformación resistente a la acción de fosfatasas y a la inactivación (Chandrashekarappa, McCartney, & Schmidt, 2013).

Tres quinasas parcialmente redundantes tienen como sustrato a la Thr210 de Snf1 para la activación del complejo SNF1: Sak1, Elm1 y Tos3 (Hong, Leiper, Woods, Carling, & Carlson, 2003). De ellas, Sak1 es la principal activadora del complejo Snf1-Gal83, mientras que las otras dos complementan su función (la delección de los genes *ELM1* y *TOS3* tiene un efecto leve en la activación de Snf1) (Conrad et al., 2014). La acción de las quinasas es contrarrestada por la actividad del complejo fosfatasa PP1, conformado por la subunidad catalítica Glc7 en conjunto con su subunidad regulatoria, Reg1 (Tu & Carlson, 1995). Recientemente se ha reportado que Sit4, una fosfatasa del tipo PP2A también contribuye a la desfosforilación de Snf1 (Ruiz, Xu, & Carlson, 2011).

El mecanismo por el cual la glucosa regula la actividad del complejo SNF1 aún no se conoce en detalle. Se ha reportado un incremento en la fosforilación de la Thr210 de la subunidad catalítica de SNF1 al tiempo que se detecta un incremento en su actividad, cuando la glucosa se agota (McCartney & Schmidt, 2001). Asimismo, no hay evidencias que indiquen ni que las 3 quinasas río arriba ni que la fosfatasa Reg1/Glc7 sean reguladas por glucosa, ya que cuando el azúcar se vuelve limitante, su actividad es aún detectable (Hedbacker & Carlson, 2008; Rubenstein et al., 2008). Entonces, la glucosa podría alterar la actividad de SNF1 modulando la accesibilidad de las fosfatasas al complejo, quizás a través de la disminución de los niveles de ADP o de la regulación de la interacción entre SNF1 y Reg1 (Broach, 2012; Mayer et al., 2011; Rubenstein et al., 2008). En un trabajo reciente se propone la regulación de SNF1 por la vía de cAMP/PKA activada por glucosa: se vio que la inactivación de los genes *IRA1*, *IRA2*, *BCY1* que se relacionan con fenotipos de elevada actividad de PKA, conducen a una disminución en la actividad de Snf1, en condiciones de glucosa limitante (Barrett, Orlova, Maziarz, & Kuchin, 2012).

Las subunidades β regulan la localización de la quinasa en respuesta a la fuente de carbono. En células creciendo en glucosa, Sip1, Sip2 y Gal83 se ubican en el citoplasma. Cuando las células son transferidas a un medio con fuente de carbono no fermentable, las subunidades β tienen una localización subcelular diferente: Gal83 transloca al núcleo, Sip1 se dirige a la vacuola y Sip2 permanece citoplasmático. Snf1 se ubica en el citoplasma en presencia de glucosa, y se vuelve nuclear en fuentes de carbono no fermentables, siendo su relocalización dependiente de Gal83. Esta diferente localización de Sip1, Sip2 y Gal83 apoya la hipótesis de que éstas median interacciones de Snf1 con distintos sustratos específicos, localizados en diferentes compartimientos subcelulares (Vincent, Townley, Kuchin, & Carlson, 2001).

La regulación de los genes target del complejo quinasa SNF1 ocurre a través de la desrepresión de genes inhibidos por Mig1/2, y de la inducción de genes mediante la activación de los factores de transcripción Sip4 y Cat8 (Conrad et al., 2014). Como se ha mencionado, en cantidades limitantes de glucosa, Hxk2 no puede impedir la fosforilación inhibitoria de Mig1 por Snf1, lo que conduce a la disociación del complejo de los promotores blanco y a la desrepresión génica (Ahuatzi et al., 2007; Papamichos-Chronakis et al., 2004). Los factores de transcripción Cat8 y Sip4, son los principales activadores de genes con secuencias CSRE (Carbon Source Responsive Element) en sus promotores (Hedges, Proft, & Entian, 1995; Lesage, Yang, & Carlson, 1996). Sin embargo, Cat8 y Sip4 no contribuyen de igual forma a la activación transcripcional en ausencia de glucosa: se vio que los requerimientos de secuencia son más estrictos para Sip4 que para Cat8 (Roth, Kumme, & Schüller, 2004); y además, la delección de *CAT8* pero no de *SIP4* impide el crecimiento de las levaduras en medios con fuentes de carbono no fermentables (Hedges et al., 1995). Adicionalmente en la cepa mutante *cat8 Δ* se observa una reducción mayor en la expresión de genes dependientes de CSRE, mientras que en la mutante *sip4 Δ* la reducción es despreciable (Hiesinger, Roth, Meissner, & Schüller, 2001), por lo que estos factores de transcripción son parcialmente redundantes en la activación de genes de gluconeogénesis. Por último, la expresión de *CAT8* es reprimida por Mig1 en presencia de glucosa (Hedges et al., 1995) y el gen *SIP4* presenta un sitio CSRE en su promotor, al que se une Cat8, regulando indirectamente los genes dependientes de Sip4 (Haurie et al., 2001).

2. OBJETIVOS

En este Capítulo de esta tesis se estudia si las vías de transducción de señales por fuente de carbono no fermentable (glicerol), regulan la actividad de los promotores de las subunidades de

PKA. Para esto se emplearon las construcciones reporteras descritas en el capítulo precedente, en la realización de ensayos de actividad de gen reportero y qRT-PCR. Se investigó la actividad de los promotores de las subunidades de PKA en mutantes de delección de proteínas que regulan la vía de transducción de la señal de fuentes de carbono en el medio. Para esto, se estudió la respuesta de actividad transcripcional en las cepas *snf1Δ*, *mig1Δ*, *mig2Δ* y adicionalmente *mig3Δ* como representantes de la principal vía de represión por glucosa; en la cepa *rgt1Δ* como miembro de la vía de inducción por glucosa; y en las cepas *tpk1^{w1}BCY1* y *TPK1bcy1Δ*, como indicadoras de la vía de inducción por glucosa mediada por cAMP-PKA. Asimismo se analizaron los niveles de actividad de los promotores *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* y *BCY1* en las cepas que presentan delecionados los factores de transcripción Sip4 y Cat8, (cepas *sip4Δ* y *cat8Δ*), responsables de la activación de genes de metabolismo respiratorio. El estudio se llevó a cabo en dos condiciones de crecimiento, con glucosa o con glicerol como fuentes de carbono.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de este Capítulo están aún en desarrollo, pero resulta interesante mostrar su avance dado que aportan al objetivo general de esta Tesis que está orientada a demostrar la regulación diferencial de las subunidades de la proteína quinasa A, y su relevancia en la especificidad de la señalización de la vía cAMP/PKA. Si bien aún no se ha completado la totalidad de los experimentos planteados, los resultados obtenidos hasta el momento apoyan la hipótesis de una regulación diferencial de los cuatro promotores de las subunidades de PKA, motivo por el cual se ha decidido incluirlos en esta Tesis, en un Capítulo separado de los otros.

3.1. Los promotores de la subunidades de PKA son más activos en fuente de carbono no fermentable, que en fermentable.

Teniendo en cuenta que la actividad de la enzima PKA se detecta en presencia de glucosa; mientras que en células desreprimidas creciendo por respiración o en fuentes de carbono pobres o no fermentables, la vía de PKA se encuentra apagada (Rubio-Teixeira et al., 2010), podría pensarse que sus promotores estarían regulados de forma de dar una mayor respuesta transcripcional cuando un azúcar fermentable es detectado en el medio de crecimiento. Sin embargo, la medición de actividad de genes reporteros demostró lo contrario, es decir, fue mayor la actividad de los promotores de *TPKs* y de *BCY1* cuando cultivos de la cepa WT (BY4741) fueron crecidos en glicerol, respecto al crecimiento en glucosa (Figura 2.7.A). Además el incremento en la actividad en glicerol en relación a la actividad en glucosa es diferente para el promotor de cada subunidad de PKA, siendo 11.2 veces el de *TPK2*, 6 veces el de *TPK1*, 3.6 veces el de *TPK3* y 2.9 veces el de *BCY1*. Los niveles de mRNA fueron medidos para cada subunidad y mostraron un aumento en glicerol de alrededor de 4.5 veces para *TPK1*, 3.8 veces para *TPK2*, 1.8 veces para *TPK3* y 4.8 veces para *BCY1* (Figura 2.7.B); indicando que el estímulo del crecimiento en glicerol provoca un incremento tanto en la actividad de los promotores de PKA como en los niveles de mRNA. Este comportamiento transcripcional que describe un elevado nivel de actividad de los promotores en una situación de estrés nutricional (crecimiento en glicerol) en la que se necesitan niveles bajos de actividad kinasa A; también sucede en una situación similar que es la entrada en fase estacionaria (Aragon et al., 2008; Portela, Van Dijck, Thevelein, & Moreno, 2003; Werner-Washburne, Brown, & Braun, 1991). Se han descrito distintos mecanismos que operan a favor de la disminución de la actividad PKA, que no están relacionados con los niveles de expresión (ver Conclusiones).

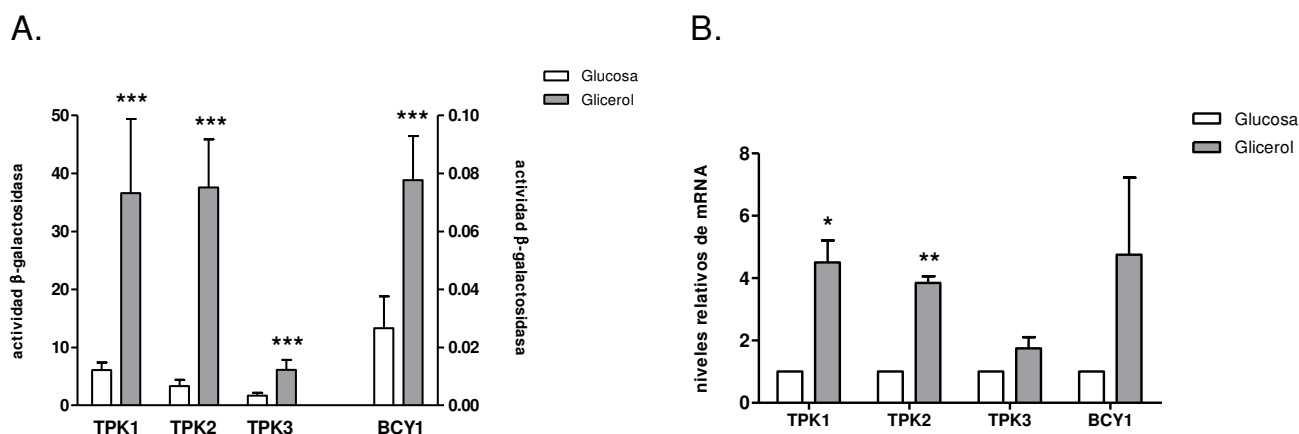


Figura 2.7. Actividad de los promotores de los genes de las subunidades de PKA en el crecimiento en glucosa y en glicerol.

(A) Niveles de actividad β-galactosidasa de las construcciones reporteras transformadas en la cepa WT BY4741. Los cultivos fueron crecidos en medio mínimo con glucosa 2% hasta DO_{600} 3.5, o medio rico con glicerol 2% hasta DO_{600} 2. Los resultados mostrados en Unidades Miller normalizados al valor en glucosa de cada promotor se expresan como el promedio \pm SD de todos los replicados ($n=8$) provenientes de experimentos independientes. (B) Niveles endógenos de mRNA de *TPKs* y *BCY1* cuantificados por qRT-PCR y normalizados a los valores de los mRNAs de *TUB1* y cepa WT BY4741 crecida en glucosa; los resultados se expresan como el promedio \pm SD de triplicados dentro de un experimento representativo.

En función de estos resultados se realizó un análisis *in silico* de los promotores de las subunidades *TPKs* y *BCY1* para investigar potenciales sitios de unión de factores de transcripción (ver Apéndice). En el promotor *TPK1* se predicen los siguientes sitios que no tienen aval experimental, lo que significa que son sólo potenciales: un sitio de unión para Cat8/Sip4 en la posición -701 R, y un sitio para Rgt1 en la posición -713 F. El análisis de la secuencia promotora de *TPK2* arrojó la predicción de 3 sitios de unión para Rgt1 en las posiciones -287 F, -105 F y -580 R; y además se ha documentado la unión de Mig1 (que no tiene sitio predicho), en un trabajo de análisis de *microarrays* de cepas WT en comparación con cepas mutantes de factores de transcripción (Reimand, Vaquerizas, Todd, Vilo, & Luscombe, 2010). En la secuencia del promotor *TPK3* se predicen 5 sitios de unión a Rgt1, ubicados en las posiciones -137 F, 0 R, -307 R, -682 F y -593 F (ver Apéndice). Además se ha reportado la unión de Mig2, mediante la metodología indirecta de *microarray*, comparando una cepa WT con la mutante de delección simple (Westholm et al., 2008). En la región promotora de *BCY1*, el análisis *in silico* sólo predice la presencia de un sitio de unión a Rgt1, en la posición -448 F.

Dadas la divergencia de los datos y la falta de coincidencia entre las predicciones por análisis bioinformáticos y experimentales, se decidió evaluar en todos los promotores la regulación por las vías de represión e inducción por glucosa, que involucran a los factores de transcripción Mig1, Mig2 y Mig3, Rgt1 y a proteínas del metabolismo respiratorio, la quinasa Snf1 y los factores de transcripción Cat8 y Sip4.

3.2. Promotor *TPK1*, crecimiento en glucosa y en glicerol.

Se presentan los resultados correspondientes al promotor *TPK1* separados de los otros tres promotores dado que se ha podido profundizar más en el estudio de su regulación, con experimentos de ChIP que acompañan algunos de los resultados obtenidos con la metodología de gen reportero. En carácter preliminar, se muestran en un ítem diferente los resultados de regulación de los promotores *TPK2*, *TPK3* y *BCY1*.

En el Capítulo 1 se demostró que todos los promotores están reprimidos en el crecimiento en glucosa por la actividad quinasa de PKA, de manera autoinhibitoria e isoforma dependiente. En este Capítulo se profundiza el estudio comparando la regulación en fuentes de carbono fermentable (glucosa) y no fermentable (glicerol), e investigando los componentes regulatorios transcripcionales básicos de la vía de represión por glucosa.

En la Figura 2.8.A se muestran los resultados de los ensayos de gen reportero, correspondientes a las mutantes de delección de proteínas involucradas en la transducción de la señal de glucosa. Los resultados sugieren que Mig1 cumpliría un rol inhibitorio, mientras que Mig2 y Mig3 no intervendrían en la regulación, con lo que las tres proteínas no serían redundantes en el control de *TPK1*. Por otro lado, las mutantes *snf1Δ* y *cat8Δ* muestran una disminución en la actividad del gen reportero, mientras que *sip4Δ* y *rgt1Δ* no presentan variaciones respecto a los niveles en la cepa WT.

Si bien se ha descrito que durante el crecimiento en glucosa la quinasa Snf1 se inactiva por desfosforilación en el residuo Thr210 por la fosfatasa Glc7-Reg1 (Momcilovic et al., 2008), existen otras evidencias que indican que Snf1 puede tener actividad en condiciones de alta glucosa. Se vio que en esta condición, Snf1 es capaz de fosforilar a Mig1, promoviendo su inhibición (Ahuatzi et al., 2007). Por otro lado se ha demostrado que la cepa *snf1Δ* presenta un fenotipo de alta PKA (Thompson-Jaeger, François, Gaughran, & Tatchell, 1991) y otros reportes anteriores postulan también la posible actividad de Snf1 durante el crecimiento en glucosa (Ciriacy, 1977; Denis, 1984).

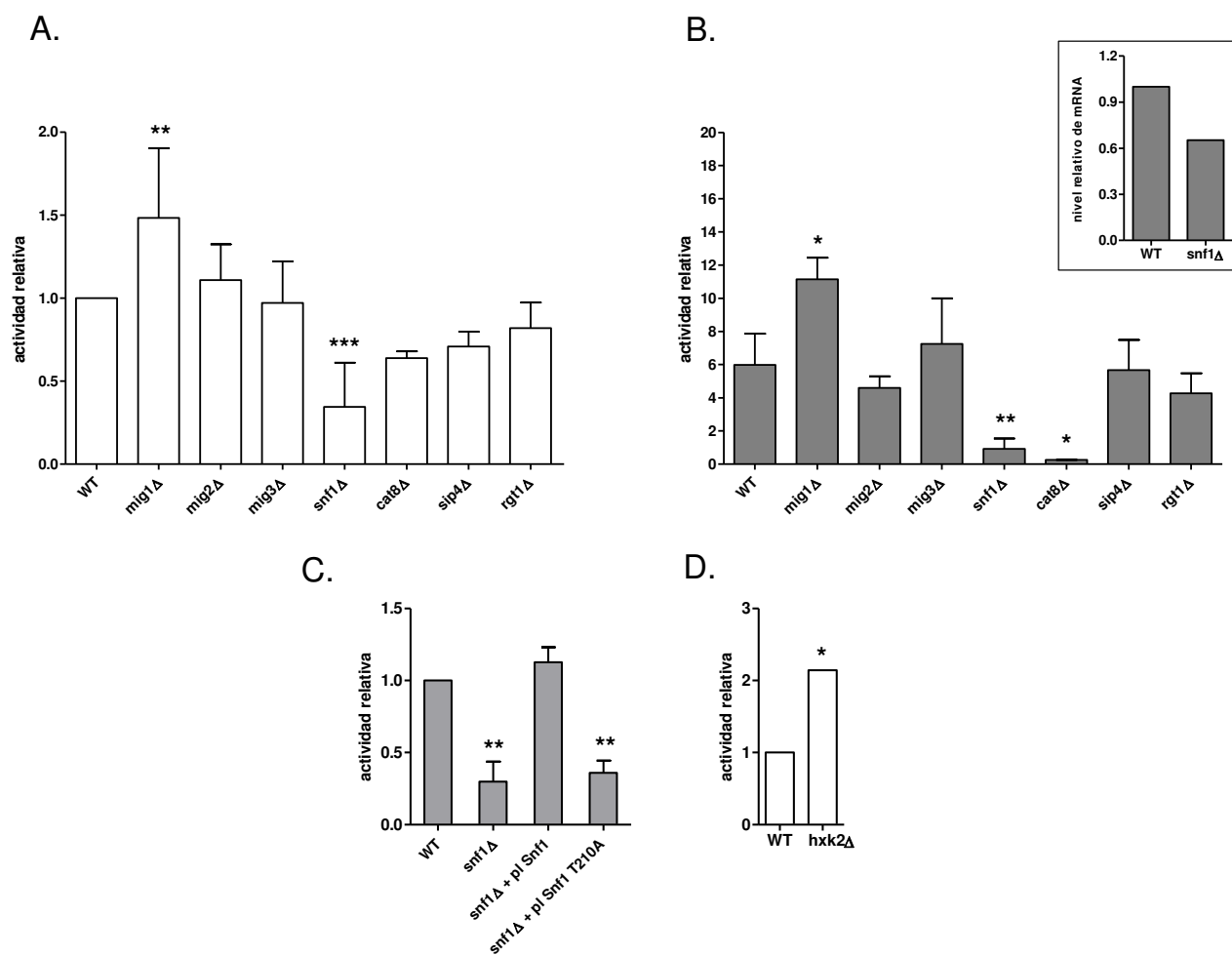


Figura 2.8. El promotor *TPK1* es regulado por la principal vía de represión por glucosa, y por la vía de Snf1 en glicerol.

(A) Niveles de actividad β -galactosidasa de la construcción reportera *TPK1-LacZ* transformada en las cepas WT BY4741, *mig1Δ*, *mig2Δ*, *mig3Δ*, *snf1Δ*, *cat8Δ*, *sip4Δ* y *rgt1Δ*. Los cultivos fueron crecidos en medio mínimo con glucosa 2% hasta DO_{600} 3.5. Los valores medidos en cada cepa mutante fueron normalizados al valor obtenido en la cepa WT. Los resultados mostrados en Unidades Miller se expresan como veces de inducción promedio \pm SD de replicados ($n=6$) provenientes de experimentos independientes. (B) Niveles de actividad β -galactosidasa de la construcción reportera *TPK1-LacZ* transformada en las mismas cepas que en (A). Los cultivos fueron crecidos en o medio rico con glicerol 2% hasta DO_{600} 2. Los valores medidos en cada cepa mutante fueron normalizados al valor obtenido en la cepa WT crecida en glucosa. Los resultados se expresan como en (A). *Inset*, Niveles endógenos de mRNA de *TPK1* en las cepas WT y *snf1Δ* cuantificados por qRT-PCR y normalizados con los valores de los mRNAs de *TUB1* y cepa WT BY4741; los resultados se expresan como el promedio \pm SD de triplicados dentro de un experimento representativo. (C) Niveles de actividad β -galactosidasa de la construcción reportera *TPK1-LacZ* transformada en las cepas WT BY4741, *snf1Δ*, *snf1Δ-pl Snf1* y *snf1Δ-pl Snf1 T210A*. Los cultivos fueron crecidos en medio mínimo con glucosa 2% hasta DO_{600} 3.5. Los valores fueron normalizados al valor obtenido en la cepa WT. Los resultados mostrados en Unidades Miller se expresan como veces de inducción promedio \pm SD de replicados ($n=4$) provenientes de experimentos independientes. (D) Niveles de actividad β -galactosidasa de la construcción reportera *TPK1-LacZ* transformada en las cepas WT BY4741 y *hxx2Δ*. Los cultivos fueron crecidos en medio mínimo con glucosa 2% hasta DO_{600} 3.5. Los valores fueron medidos y expresados igual que en (A). * $p<0.05$.

Los resultados de actividad de los promotores *TPK1* y *TPK3* obtenidos con la cepa *snf1Δ* (Figuras 2.8.A y 2.12.A) crecida en presencia de glucosa indicarían que en esta fuente de carbono la quinasa Snf1 estaría activa, ejerciendo su efecto sobre los promotores mencionados. Teniendo en cuenta estos resultados, se evaluó si para ese efecto es necesario que la quinasa esté activada. Para esto, la cepa *snf1Δ-pTPK1-LacZ* fue transformada a su vez con un plásmido que contiene la versión WT de la quinasa (cepa *snf1Δ-prTPK1+pl Snf1*), u otro que contiene una mutante de Snf1 que no puede ser fosforilada en la Thr210 (cepa *snf1Δ-prTPK1+pl Snf1 T210A*) (Hedbacker, Hong, & Carlson, 2004). El resultado de actividad β-galactosidasa se muestra en la Figura 2.8.C, y como puede observarse, la expresión de la mutante Snf1 T210A no revierte el fenotipo de la cepa *snf1Δ*. Esto demostraría que es necesaria la quinasa Snf1 activa para la inducción del promotor *TPK1* en glucosa.

Como se ha mencionado en la Introducción de este Capítulo, la quinasa Hxk2 forma un complejo proteico junto a Mig1 y Snf1, en condiciones de baja y de elevada glucosa, cumpliendo en esta última condición la función de impedir que Snf1 fosforile e inhiba a Mig1. Por lo tanto, en su ausencia, en una cepa *hxx2Δ*, Snf1 sería capaz de fosforilar a Mig1, inactivándolo (Ahuatzi et al., 2007). Teniendo en cuenta este mecanismo regulatorio, se analizó la participación de Hxk2 en la regulación del promotor de *TPK1*. Los resultados de las Figuras 2.8.A y D muestran que en crecimiento en glucosa, el efecto de las deleciones de Hxk2 y Mig1 es similar, indicando que ambas proteínas actuarían posiblemente en conjunto, en la represión del promotor *TPK1*. La falta de Snf1 produce el resultado opuesto en el promotor *TPK1*, reforzando que la quinasa intervendría en la activación del mismo. Entonces, el complejo Mig1-Hxk2-Snf1 participaría del mecanismo de represión *TPK1* en glucosa. Para confirmar si esta participación es directa se planea realizar experimentos de ChIP estudiando el reclutamiento de Mig1-TAP al promotor *TPK1*, en condiciones de crecimiento represivas en glucosa. Dado que el análisis bioinformático de la secuencia del promotor indicó que no existen sitios predichos de unión de Mig1, se recorrerá toda la secuencia estudiada empleando *primers* superpuestos.

Se ha propuesto que la PKA controlaría negativamente la actividad quinasa de Snf1, a través de la fosforilación y consecuente activación de la fosfatasa Sit4 (Barrett et al., 2012). Esta fosfatasa participa en el proceso de desfosforilación de Snf1 en la Thr210, contribuyendo con la fosfatasa Reg1-Glc7 en su inactivación (Ruiz et al., 2011), y estableciendo una conexión entre las dos vías de señalización (Barrett et al., 2012). Estas evidencias permiten pensar que el efecto autoinhibitorio de PKA sobre la regulación de sus promotores, sugerido en el Capítulo 1, podría ser mediado por la vía

de Snf1, ya que Snf1 activada es necesaria para la inducción del promotor *TPK1* (Figura 2.8.A y C) y su vez PKA inhibe a Snf1, logrando de manera indirecta la inhibición del promotor *TPK1*.

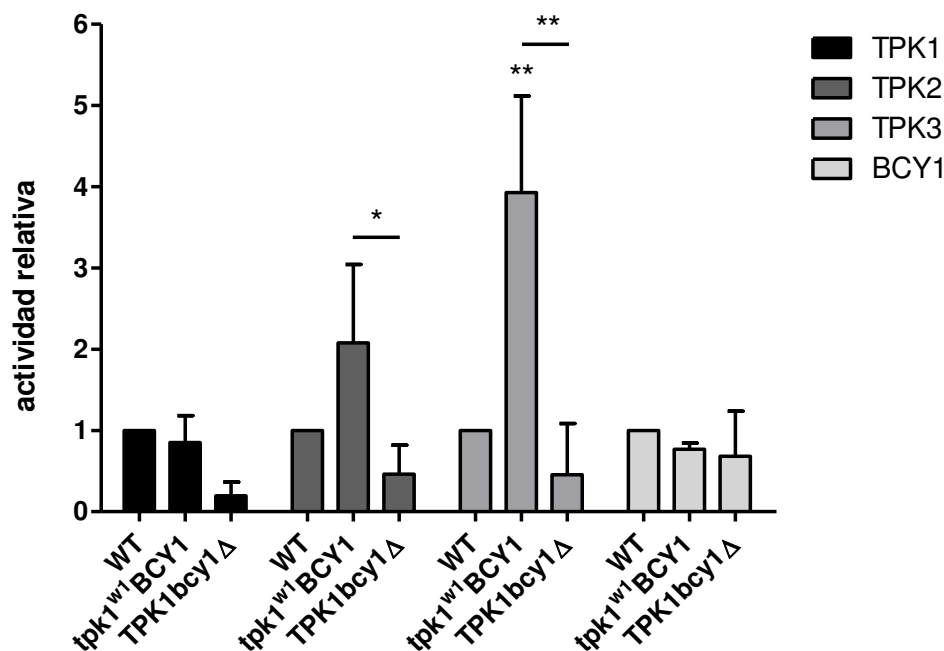


Figura 2.9. La actividad quinasa PKA regula la actividad de los promotores de sus subunidades en el crecimiento en glicerol.

Niveles de actividad β -galactosidasa de las construcciones reporteras *TPKs-LacZ* y *BCY1-LacZ* transformadas en las cepas WT SP1, *tpk1^{w1}BCY1* y *TPK1bcy1Δ*. Los cultivos fueron crecidos en medio rico con glicerol 2% hasta DO_{600} 2. Los valores medidos en cada cepa mutante fueron normalizados al valor obtenido en la cepa WT. Los resultados mostrados en Unidades Miller se expresan como el promedio \pm SD de replicados ($n=6$) provenientes de experimentos independientes. * $p<0.05$.

La quinasa Snf1 fosforila otros factores de transcripción además de Mig1, como Cat8 y Sip4, que son activados. Por esta razón también se analizó el efecto de estos reguladores sobre el promotor *TPK1* para luego poder compararlos con la condición de crecimiento en fuente de carbono no fermentable (Figura 2.8.A). Se observó un leve efecto en la cepa mutante *cat8Δ*, sugiriendo que cumple un rol como activador transcripcional. En su trabajo, Mulet & Portillo, 2005 describen a partir de experimentos genéticos con mutantes de delección, que en glucosa el efecto de Snf1 sobre la transcripción de *TRK1* y *TRK2* podría ser mediado por Sip4. En este caso, dado que la cepa *cat8Δ* muestra la misma tendencia que la cepa *snf1Δ*, es decir, la disminución en la actividad de *TPK1*, Snf1 podría ejercer su efecto regulatorio a través de la fosforilación y consecuente

activación de Cat8. Sin embargo, experimentos de ChIP (Figura 2.10, panel izquierdo) indican que Cat8 no se reclutaría a este promotor en glucosa.

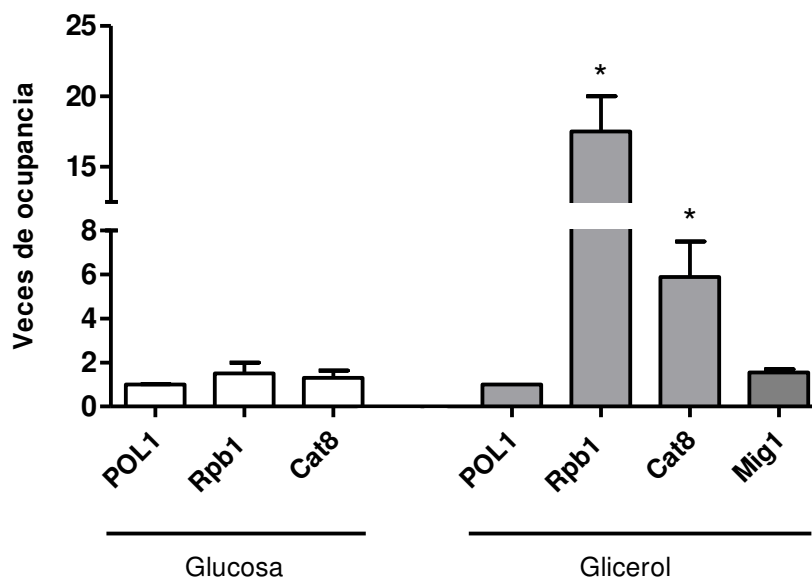


Figura 2.10. Cat8 une al promotor *TPK1* en el crecimiento en glicerol.

Células WT BY4741 expresando las proteínas de fusión Cat8-TAP, Mig1-TAP o Rpb1-TAP fueron crecidas en medio mínimo con glucosa 2% hasta DO_{600} 3.5 o en medio rico con glicerol 2% hasta DO_{600} 2. Ensayos de ChIP fueron realizados empleando IgG-Sepharose. Luego se realizó qPCR con *primers* específicos que recorren el promotor *TPK1*, amplificando fragmentos superpuestos de aproximadamente 150 pb. Se muestran sólo aquellos pares que dieron señal: para Cat8, -696 a -545; para Mig1 y Rpb1, -330 a -109, fragmento que incluye el TSS (*Transcription Start Site*). El DNA del IP (Inmunoprecipitado) fue normalizado al DNA *Input* y se calculó la relación señal:ruido respecto a los valores inespecíficos obtenidos en la cepa sin el *tag*. Los resultados se expresan como veces de ocupancia relativos a la región inespecífica *POL1*, como el promedio \pm SD (n=2). * $p < 0.05$.

En presencia de fuentes de carbono no fermentables es necesario que la actividad quinasa de PKA sea baja, como se discutió anteriormente, para permitir el crecimiento de las levaduras. Los resultados de la Figura 2.8.B indican que existe una regulación opuesta a la esperada, ya que el promotor *TPK1* es inducido en presencia de glicerol. Asimismo, en cepas que tienen la vía de PKA atenuada (mutante *tpk1^{w1}BCY1*), o desregulada (mutante *TPK1bcy1Δ*) se observó un nivel de actividad del promotor semejante o más bajo que el detectado en la cepa WT, respectivamente (Figura 2.9). Se hubiera esperado que en la cepa *tpk1^{w1}BCY1* la actividad del promotor fuera mayor a la que presenta la cepa WT, ya que dada la autorregulación negativa (Capítulo 1), a menor actividad enzimática de PKA, más activos están sus promotores. Una hipótesis que intenta explicar

el resultado obtenido es que la actividad del promotor *TPK1* alcanza su capacidad máxima en el crecimiento en glicerol con la baja actividad catalítica de PKA que las células tienen en esta condición.

Por otra parte, el factor de transcripción Mig1, y no Mig2 ni Mig3, regularía negativamente la actividad del promotor *TPK1* (Figura 2.8.B), siendo éste un resultado inesperado dado que en glicerol Mig1 debería estar inhibido por la fosforilación mediada por Snf1. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que Mig1 y Mig2 tienen una función regulatoria en el citosol durante el hambreado de glucosa (Karunanithi & Cullen, 2012). Trabajos anteriores en los que se emplearon mutantes de delección de Mig1 y construcciones reporteras del gen *SUC2* que incluyen las regiones regulatorias a las que une Mig1, demostraron que en condiciones de bajas concentraciones de glucosa, el sitio de unión de Mig1 puede ser ocupado por otros activadores en su ausencia (Wu & Trumbly, 1998). Para evaluar la posibilidad de que el efecto de inducción del promotor *TPK1* en la cepa *mig1Δ* se deba a que la ausencia del represor permite el acceso de un activador transcripcional, se realizaron ensayos de CHIP de la cepa que expresa la versión TAP de Mig1 crecida en glicerol. La Figura 2.10, panel derecho, muestra que en el crecimiento en fuente de carbono no fermentable, Mig1 no se encuentra unido al promotor *TPK1*. Por lo tanto, el efecto de Mig1 en el control del promotor *TPK1* sería a través de un mecanismo indirecto, que podría involucrar la unión de otro activador transcripcional.

La quinasa Snf1 regula positivamente la actividad del promotor *TPK1*, por medio del factor de transcripción Cat8 y no Sip4, durante el crecimiento en glicerol (Figura 2.8.B). Además, la cepa *snf1Δ* mostró una disminución en los niveles de expresión de mRNA de *TPK1* (Figura 2.8.B *Inset*), corroborando los resultados de actividad de β-galactosidasa. Elementos de unión de Cat8/Sip4 surgen de la predicción realizada y uno de estos sitios se verificó experimentalmente mediante ensayos de CHIP, demostrando la unión de Cat8-TAP al promotor *TPK1* transcripcionalmente activo (Figura 2.10, panel derecho). Por último, si bien se ha predicho un sitio de unión de Rgt1 en el promotor *TPK1* (ver Apéndice), la delección de este factor de transcripción no produjo ningún efecto en los niveles de actividad del gen reportero (Figura 2.8.B) por lo que no sería un regulador en el crecimiento en glicerol.

3.3. Regulación del promotor *TPK2*, *TPK3* y *BCY1* en glucosa y en glicerol

3.3.1. Regulación del promotor *TPK2*

La regulación del promotor *TPK2* (Figura 2.11.A) difiere de la regulación de *TPK1*, tanto en el crecimiento en glucosa como en glicerol. Si bien se ha reportado la unión experimental de Mig1 al promotor *TPK2* en un trabajo genómico que emplea la metodología ChIP on chip (Reimand et al., 2010), los resultados indican que ninguna de las isoformas de Mig tiene un efecto regulatorio sobre este promotor, o bien, las tres son redundantes. En la cepa *sip4Δ* se observa un comportamiento de incremento en la actividad del gen reportero, mientras que la delección de *Cat8* produce el efecto contrario, que es una disminución en la actividad. Estos resultados son llamativos ya que estas proteínas se esperaban inactivas en el crecimiento en glucosa. Se están realizando los ensayos correspondientes para evaluar la participación de *Snf1* en la mediación de los efectos de *Cat8* y *Sip4*

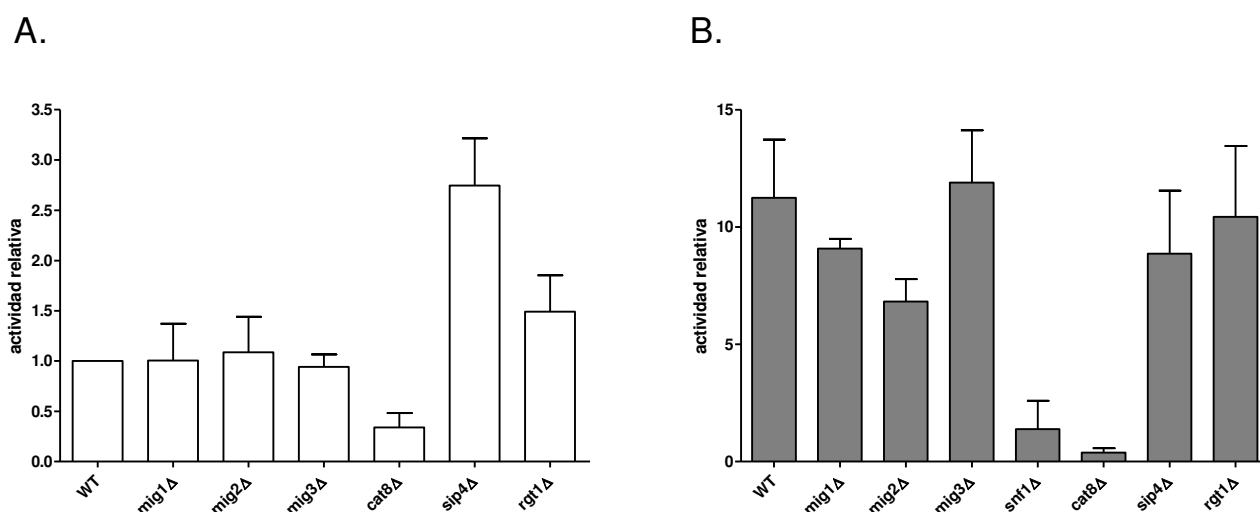


Figura 2.11. El promotor *TPK2* es regulado por la quinasa *Snf1* tanto en glucosa como en glicerol.

(A) Niveles de actividad β -galactosidasa de la construcción reportera *TPK2-LacZ* transformada en las cepas WT BY4741, *mig1Δ*, *mig2Δ*, *mig3Δ*, *snf1Δ*, *cat8Δ*, *sip4Δ* y *rgt1Δ*. Los cultivos fueron crecidos en medio mínimo con glucosa 2% hasta DO_{600} 3.5. Los valores medidos en cada cepa mutante fueron normalizados al valor obtenido en la cepa WT. Los resultados mostrados en Unidades Miller se expresan como el promedio \pm SD de replicados ($n=6$) provenientes de experimentos independientes. (B) Niveles de actividad β -galactosidasa de la construcción reportera *TPK2-LacZ* transformada en las mismas cepas que en (A). Los cultivos fueron crecidos en medio rico con glicerol 2% hasta DO_{600} 2. Los valores medidos en cada cepa mutante fueron normalizados al valor obtenido en la cepa WT crecida en glucosa. Los resultados mostrados en Unidades Miller se expresan como el promedio \pm SD de replicados ($n=6$) provenientes de experimentos independientes.

sobre el promotor. En el apartado del promotor *TPK1* se han expuesto las últimas evidencias que demuestran que *Snf1* es catalíticamente activa en el crecimiento en glucosa, y en uno de esos

trabajos se propone que el efecto sobre la transcripción de dos genes sería mediado por Sip4 (Ahuatzi et al., 2007; Mulet & Portillo, 2005). Entonces, Snf1 podría modular la activación de Sip4 y Cat8 en glucosa y estos factores de transcripción tendrían un efecto que podría ser directo o indirecto sobre el promotor *TPK2*. Por último, en la cepa *rgt1Δ* se detectó una leve variación en el nivel de actividad, que podría señalar la función de represor de Rgt1, consistente con la predicción de 3 sitios de unión de este factor de transcripción, pero que debe confirmarse.

Durante el crecimiento en glicerol, la cepa *tpk1^{w1}BCY1* con baja actividad quinasa PKA presenta un nivel de actividad del promotor *TPK2* marcadamente superior al nivel de la cepa WT, mientras que en la cepa *TPK1bcy1Δ* el nivel de actividad no varía respecto al de la WT (Figura 2.9). Este comportamiento en glicerol es similar al que estas mutantes presentan en glucosa (Figura 1.5, Capítulo 1). El promotor *TPK2* es el que más veces de inducción muestra en fuente de carbono no fermentable y en condiciones de baja actividad quinasa de PKA, como en la cepa *msn2/4ΔtpksΔ*, comparando con la WT y con los incrementos de los otros promotores de PKA (resultados Capítulo 1 y Figura 2.9). En conjunto estas evidencias indicarían que este promotor, en condiciones normales de crecimiento, está fuertemente inhibido. En las cepas con actividad PKA desregulada *TPK1Δbcy1* la tendencia es similar a la del crecimiento en glucosa, es decir que el promotor se reprime (Figura 2.9).

En cuanto a la vía de activación de genes de metabolismo respiratorio, la vía de Snf1/Cat8 pareciera mediar la regulación de *TPK2* (Figura 2.11.B); dado que en las mutantes simples de delección se detecta una disminución en la actividad del mismo. Esto, sumado a que el nivel de actividad en la cepa *sip4Δ* es similar al de la WT, indicaría que Cat8 y Sip4 no son redundantes en la regulación de *TPK2*. En cuanto a las isoformas de Mig, Mig2 parece ser un activador transcripcional, ya que su delección produce una disminución en la actividad del promotor. Al respecto, en las Conclusiones de este Capítulo se mencionan antecedentes que describen funciones para Mig1 y Mig2 en condiciones de baja glucosa. Por último, Rgt1 no estaría implicado en el control transcripcional de este promotor.

3.3.2. Regulación del promotor *TPK3*

El promotor *TPK3*, que es el más inhibido de los promotores de las subunidades catalíticas de PKA tanto en glucosa como en glicerol, no mostró ningún cambio en los niveles de actividad en las cepas *mig1Δ*, *mig2Δ* y *mig3Δ* en glucosa (Figura 2.12.A). Por lo tanto, o bien ni Mig1, ni Mig2 ni

Mig3 tienen un efecto en la regulación del promotor o bien son redundantes. Estos resultados no concuerdan con datos previos de un trabajo genómico de *microarray* en el que reportan variaciones de mRNA en cepas WT y mutantes de delección de las isoformas de Mig, que indican que en la cepa *mig2Δ* la expresión de *TPK3* se ve alterada (Westholm et al., 2008). La delección de *Snf1* afecta la actividad de *TPK3*, de igual forma que al promotor *TPK1*, ya que el nivel en la cepa mutante de delección es inferior al detectado en la cepa WT. Nuevamente, la quinasa *Snf1* cumpliría un rol indirecto como activador transcripcional (Ahuatzi et al., 2007; Mulet & Portillo, 2005). Contrariamente a la mutante *snf1Δ*, la cepa *cat8Δ* muestra un ligero incremento en la actividad de *TPK3* en glucosa, indicando que *Cat8* actuaría en la represión transcripcional de manera directa o indirecta de *TPK3*. Por último, no se detectaron cambios en los niveles de actividad de β -galactosidasa en la cepa *rgt1Δ*.

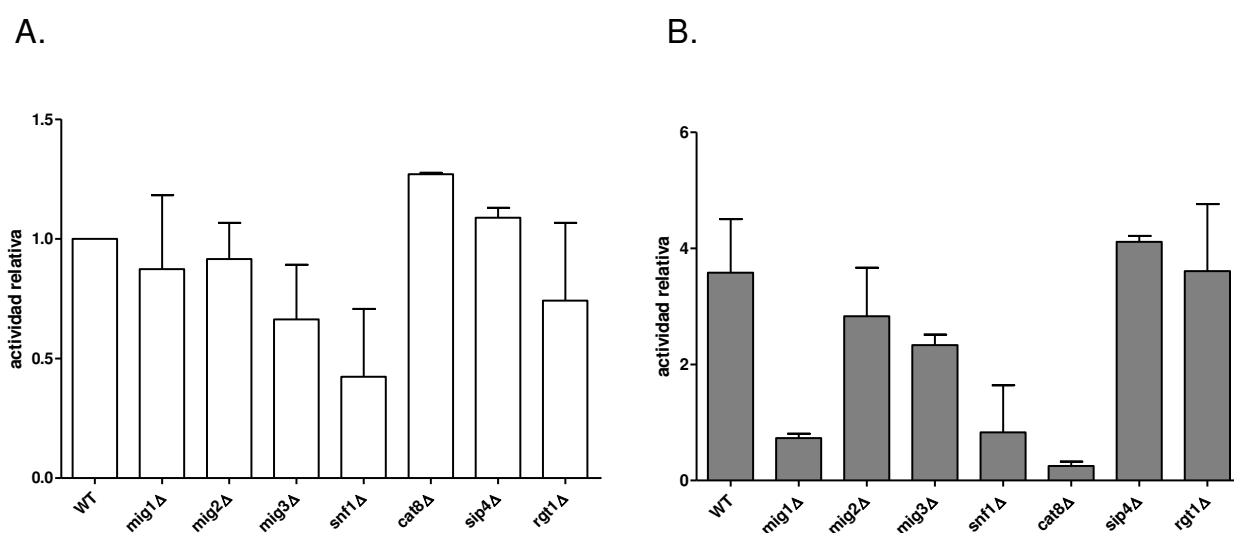


Figura 2.12. El promotor *TPK3* es regulado por la quinasa *Snf1* tanto en glucosa como en glicerol y por *Mig1* en glicerol.

(A) Niveles de actividad β -galactosidasa de la construcción reportera *TPK3-LacZ* transformada en las cepas WT BY4741, *mig1Δ*, *mig2Δ*, *mig3Δ*, *snf1Δ*, *cat8Δ*, *sip4Δ* y *rgt1Δ*. Los cultivos fueron crecidos en medio mínimo con glucosa 2% hasta DO_{600} 3.5. Los valores medidos en cada cepa mutante fueron normalizados al valor obtenido en la cepa WT. Los resultados mostrados en Unidades Miller se expresan como el promedio \pm SD de replicados ($n=6$) provenientes de experimentos independientes. (B) Niveles de actividad β -galactosidasa de la construcción reportera *TPK3-LacZ* transformada en las mismas cepas que en (A). Los cultivos fueron crecidos en medio rico con glicerol 2% hasta DO_{600} 2. Los valores medidos en cada cepa mutante fueron normalizados al valor obtenido en la cepa WT crecida en glucosa. Los resultados mostrados en Unidades Miller se expresan como el promedio \pm SD de replicados ($n=6$) provenientes de experimentos independientes.

En presencia de glicerol, las mutantes de la vía de cAMP/PKA presentaron un comportamiento semejante al del promotor *TPK2* (Figura 2.9); mostrando un incremento en la actividad en la cepa con baja actividad quinasa de PKA y menor actividad del promotor cuando la actividad PKA está desregulada. El promotor *TPK3* presenta un alto nivel de inducción en el crecimiento en glicerol, y se induce aún más en condiciones de baja actividad de PKA (Figura 2.9, cepa *tpk1^{w1}BCY1*), indicando que al igual que el promotor *TPK2*, *TPK3* es fuertemente reprimido en condiciones normales de crecimiento con glucosa. La quinasa Snf1, mediante el factor de transcripción Cat8, activaría la transcripción de *TPK3*, al igual que sucede con los promotores *TPK1* y *TPK2*, según lo indicarían los resultados en las cepas mutantes simples de delección. Además, dado que la cepa *sip4Δ* no muestra cambios en la actividad respecto a la WT, puede decirse que *TPK3* no es un blanco compartido entre Sip4 y Cat8. Por su parte, los factores de transcripción Mig1 y Mig3 cumplirían un rol en la activación de *TPK3*, ya que en las mutantes simples de delección se observó una disminución en los niveles de actividad de β-galactosidasa. En relación a esto, como se explica en el apartado del promotor *TPK1*, se ha descrito recientemente la participación de Mig1 y Mig2 en procesos fisiológicos que se disparan en fuentes de carbono pobres (Karunanithi & Cullen, 2012). Por último, a pesar de contener 5 sitios de unión del factor de transcripción Rgt1, no se detectaron cambios en los niveles de actividad del promotor *TPK3* en la cepa mutante de delección simple, respecto a la cepa WT, por lo que no intervendría en su regulación.

3.3.3. Regulación del promotor *BCY1*

En el caso del promotor *BCY1*, el factor de transcripción Mig3, y no Mig1 ni Mig2, tendría un rol negativo en su regulación (Figura 2.13.A). La mutante *cat8Δ* muestra una disminución en los niveles de β-galactosidasa, indicando que Cat8 promovería la transcripción de *BCY1*, mediante un mecanismo que podría o no depender de la activación por Snf1. Actualmente estamos realizando los experimentos que nos permitan evaluar la participación de la quinasa Snf1 en el control transcripcional de *BCY1*. Según se observa en la Figura 2.13.A, Sip4 no jugaría ningún rol en la regulación de este promotor. Por último, Rgt1 no participaría en el control del promotor *BCY1*.

En el crecimiento en glicerol, se observó que ambas mutantes de actividad PKA mostraron un comportamiento transcripcional del promotor *BCY1* similar al de la cepa WT (Figura 2.13). En este caso, al igual que el promotor *TPK1* pareciera que el promotor *BCY1* alcanza su máxima

activación cuando las células de levaduras crecen en presencia de fuentes de carbono no fermentables.

En cuanto a la vía que conduce a la expresión de genes de metabolismo respiratorio, en la Figura 2.13.B se observa que al igual que para los promotores de las subunidades catalíticas, Cat8 pero no Sip4, sería un activador transcripcional y que por lo tanto, Cat8 y Sip4 no son redundantes para *BCY1*. Actualmente se están realizando los experimentos orientados al estudio de Snf1 como

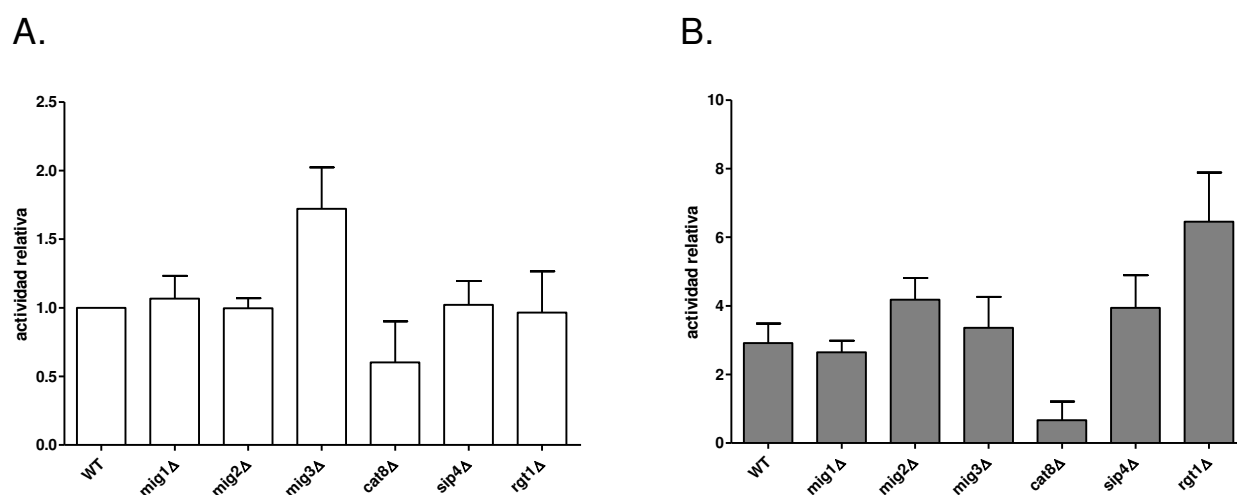


Figura 2.13. El promotor *BCY1* es regulado por Mig3 en glucosa y Rgt1 y Cat8 en glicerol.

(A) Niveles de actividad β -galactosidasa de la construcción reportera *BCY1-LacZ* transformada en las cepas WT BY4741, *mig1Δ*, *mig2Δ*, *mig3Δ*, *cat8Δ*, *sip4Δ* y *rgt1Δ*. Los cultivos fueron crecidos en medio mínimo con glucosa 2% hasta DO₆₀₀ 3.5. Los valores medidos en cada cepa mutante fueron normalizados al valor obtenido en la cepa WT. Los resultados mostrados en Unidades Miller se expresan como el promedio \pm SD de replicados (n=6) provenientes de experimentos independientes. (B) Niveles de actividad β -galactosidasa de la construcción reportera *BCY1-LacZ* transformada en las mismas cepas que en (A). Los cultivos fueron crecidos en medio rico con glicerol 2% hasta DO₆₀₀ 2. Los valores medidos en cada cepa mutante fueron normalizados al valor obtenido en la cepa WT crecida en glucosa. Los resultados mostrados en Unidades Miller se expresan como el promedio \pm SD de replicados (n=6) provenientes de experimentos independientes.

posible mediador de esta respuesta transcripcional en glicerol. Por otra parte en la cepa *mig2Δ* los niveles de actividad del promotor aumentan levemente, por lo que Mig2 sería un represor transcripcional durante el crecimiento en glicerol. Mig2 ha sido relacionado con el crecimiento pseudohifal lo que le adjudica un rol funcional en el crecimiento en fuentes pobres de carbono (Karunanithi & Cullen, 2012). Se detectó también un aumento de la actividad de gen reportero en la mutante *rgt1Δ*; Rgt1 funcionaría entonces como represor transcripcional, con un sitio predicho de unión (ver Apéndice).

4. CONCLUSIONES

Durante el crecimiento de las levaduras en glucosa, se detecta un nivel de actividad de los promotores de las subunidades de PKA que, es menor al que presentan en el crecimiento en glicerol. Este resultado no era esperable ni es consistente con la situación de estrés que significa el crecimiento en una fuente de carbono no fermentable, ya que las células necesitan en esta condición que la actividad catalítica de PKA sea baja, para poder activar metabolismos que de otra forma están inhibidos (Portela et al., 2003; Werner-Washburne et al., 1991). Entonces la célula lograría mediante otros mecanismos superar esta paradoja, por ejemplo, se ha demostrado que en fase estacionaria los niveles de abundancia proteica de Tpk3 y Bcy1 aumentan respecto al crecimiento en fase exponencial, siendo mayor la proporción de subunidades catalíticas versus subunidad regulatoria (Tudisca et al., 2010). En este caso, el mecanismo que conduce a la disminución de la actividad quinasa es la relocalización de Tpk2 y Tpk3 en gránulos citoplasmáticos (ver Introducción General). Este proceso ejemplifica cómo la regulación de la PKA no se resuelve de manera sencilla, quiere decir que frente a la necesidad de una baja actividad de quinasa A (fase estacionaria, crecimiento en glicerol), la célula no responde con una disminución en las abundancias de los mRNAs (Capítulo 1 de esta tesis, y Figura 2.7) y las proteínas de sus subunidades, sino con otros mecanismos más intrincados, como la relocalización (Tudisca et al., 2010). De esta manera, niveles altos de mRNAs podrían servirle a las células para estar preparadas para sintetizar las proteínas inmediatamente luego de la detección de la glucosa en el medio, asegurando una rápida recuperación de la situación de estrés.

En presencia de glucosa como fuente de carbono, el único promotor regulado por un miembro activo de la principal vía de represión es *TPK1*, que es reprimido por Mig1 posiblemente en complejo con Hxk2. Adicionalmente, *BCY1* sería reprimido por Mig3, aunque su papel en esta vía de represión aún no es claro. Por otra parte, *TPK2* podría ser el único promotor regulado negativamente por Rgt1. Los promotores *TPK1*, y *TPK3* comparten la regulación por la quinasa Snf1, siendo necesaria su actividad enzimática al menos para el control del primero. De este modo, se hipotetiza que en el caso del promotor *TPK1* el complejo proteico Hxk2-Mig1-Snf1 opera de forma de reprimir al promotor en condiciones de elevada glucosa, por un mecanismo ya descrito (Ahuatzi et al., 2007). Esta posibilidad se examinará mediante ensayos de ChIP que permitan detectar la unión de Mig1-TAP al promotor *TPK1* transcripcionalmente activo. Asimismo, Snf1 actuaría a través de la activación del factor de transcripción Cat8, promoviendo la inducción del promotor *TPK1*. Este resultado era inesperado dado el estado de inhibición por desfosforilación en

Thr210 de Snf1 en glucosa, pero no es novedoso ya que se ha reportado que Snf1 mantiene su capacidad de fosforilar sustratos en glucosa, como Mig1, y que esto se ve impedido en presencia de la quinasa Hxk2, por la conformación que adquiere el complejo de las 3 proteínas (Ahuatzi et al., 2007; Treitel, Kuchin, & Carlson, 1998). A su vez, otro reporte reciente también adjudica un rol fisiológico a Snf1 en glucosa, ya que indica que es necesaria la presencia de la versión no fosforilada en Thr210 de Snf1 para la expresión de los genes *TRK1* y *TRK2*, ya que esa versión es capaz de revertir los defectos en el crecimiento que se observan en la cepa *snf1Δ*. Esta función es además mediada por Sip4, por un mecanismo que aún no se conoce (Mulet & Portillo, 2005).

Glucosa				Glicerol			
<i>TPK1</i>	<i>TPK2</i>	<i>TPK3</i>	<i>BCY1</i>	<i>TPK1</i>	<i>TPK2</i>	<i>TPK3</i>	<i>BCY1</i>
Mig1				Mig1		Mig1	
Hxk2							
					Mig2		
		Mig3	Mig3			Mig3	
Snf1		Snf1		Snf1	Snf1	Snf1	
Cat8	Cat8			Cat8	Cat8	Cat8	Cat8
	Sip4						
	Rgt1						Rgt1

Tabla 2.1. Resumen de la regulación de los promotores por las vías de transducción de la señal de glucosa. En verde se presentan las proteínas que inducen los promotores, y en rojo, las proteínas que los reprimen.

Cuando las células crecen en una fuente de carbono no fermentable como glicerol, los promotores de todas las subunidades de PKA inducen su actividad. En principio, esta condición de crecimiento conduciría a los promotores *TPK1* y *BCY1* al máximo de actividad, mientras que para *TPK2* y *TPK3*, el nivel alcanzado en glicerol es superado si además las células expresan baja actividad enzimática de PKA. Por otro lado, los tres promotores de las subunidades catalíticas, *TPK1*, *TPK2* y *TPK3*, tienen en común la activación por la vía Snf1/Cat8. Se ha postulado, a partir de ensayos genéticos, que Snf1 y PKA son miembros de vías antagónicas ya que la cepa *snf1Δ* exhibe fenotipos asociados a alta actividad de PKA (Thompson-Jaeger et al., 1991). Más aún, células con deleciones

en los genes *IRA1*, *IRA2* y *BCY1* muestran una menor activación de la vía de Snf1, contrariamente a lo que ocurre en una cepa *gpr1Δ*, lo que indica que PKA podría contribuir a la regulación de Snf1 (Barrett et al., 2012). Se ha propuesto que Sit4, una fosfatasa que contribuye a la inactivación de Snf1 por desfosforilación de la Thr210 (Ruiz et al., 2011), podría ser un sustrato de PKA (Barrett et al., 2012). De esta forma se establecería un *loop* regulatorio en el que Snf1 activa fosforila a Mig1 reprimiéndolo, para inducir los promotores de PKA, y PKA activaría a Sit4 para inhibir a Snf1, reprimiendo indirectamente la transcripción de sus promotores. Aunque queda por determinar si la interacción entre PKA y Sit4 es directa o no, se postula que la vía mediada por Snf1 es la vía regulatoria negativa controlada por PKA propuesta en el Capítulo 1, que reprime al promotor *TPK1* (ver modelo Figura 2.14).

En cuanto a la regulación de los promotores *TPK2*, *TPK3* y *BCY1* por las isoformas Mig, se concluye que el promotor *BCY1* sería regulado negativamente por Mig2, *TPK1* y *TPK3* serían regulados por Mig1, aunque con efectos contrarios sobre cada promotor, y el promotor *TPK3* sería activado por *TPK3*. En relación a esto, se ha reportado que la localización subcelular de Mig1 y Mig2 en hambreado de glucosa es citosólica, y que en esta condición cumplen un rol fisiológico, que es la inducción del crecimiento filamentoso por asociación a las proteínas Msb2 y Opy2 de membrana, y Ste7 y Kss1, principalmente citosólicas (Karunanithi & Cullen, 2012). Finalmente, el promotor *BCY1*, en glicerol, sería el único inhibido por Rgt1.

El conjunto de resultados presentado en este Capítulo, que se resume en la Tabla 2.1, que si bien tiene un carácter de preliminar, refuerza la idea de una regulación diferencial de los promotores de las subunidades de PKA.

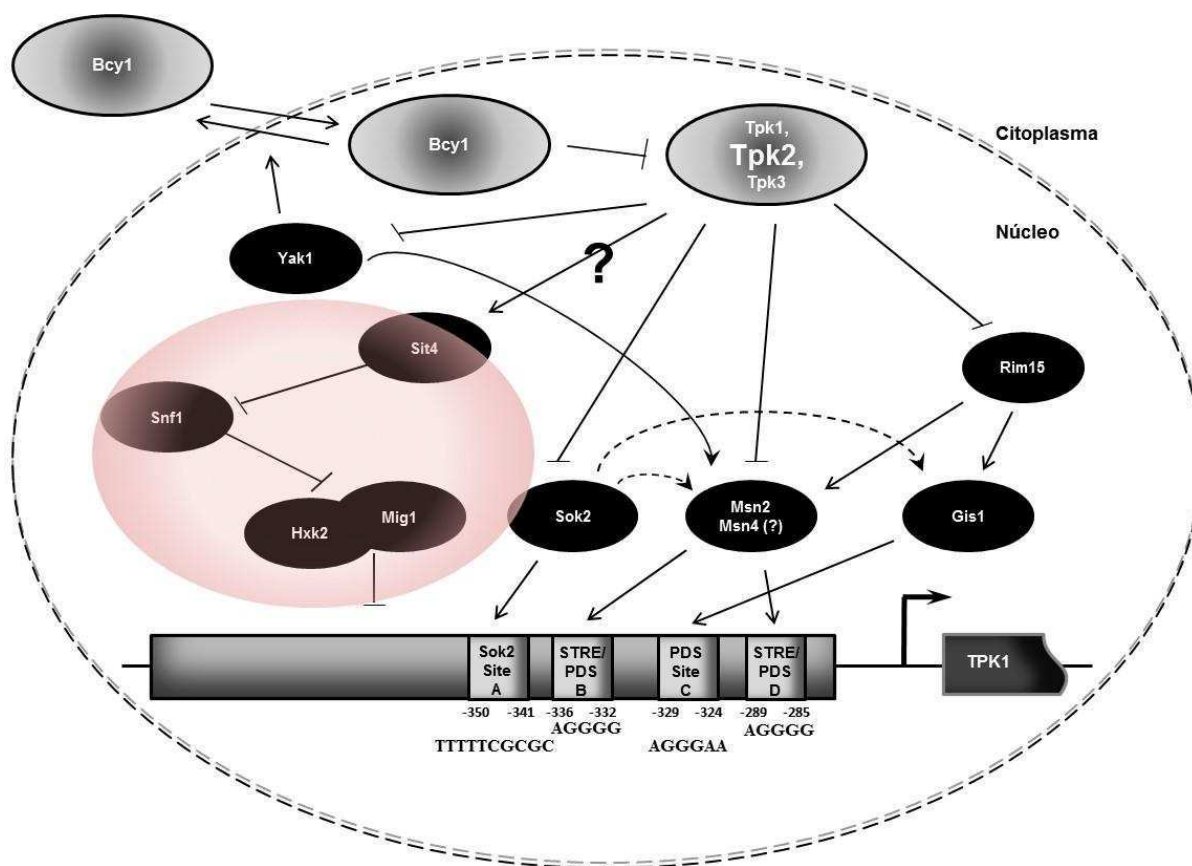


Figura 2.14. Modelo de la integración de los mecanismos regulatorios del promotor *TPK1* en glucosa.

La rama regulatoria controlada negativamente por PKA en el modelo propuesto en el Capítulo 1 es aquí reemplazada como propuesta por la vía controlada por Snf1 (círculo rosa), que funcionaría en crecimiento en glucosa. La fosfatasa Sit4, que es activada por PKA, desfosforila a Snf1, lo que promueve la represión del promotor *TPK1* por el complejo Hxk2-Mig1. En ausencia de esta fuente de carbono, las Tpk se inactivan por unión a Bcy1 (Bcy1 cambia de localización nuclear a citoplasmática junto con Tpk) y Snf1 es desfosforilada por Sit4, por lo tanto fosforila a Hxk2-Mig1 provocando su exportación nuclear y la consecuente inducción de *TPK1*.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Ahuatzi, D., Riera, A., Peláez, R., Herrero, P., Moreno, F., Ahuatz, D., ... Moreno, F. (2007). Hxk2 Regulates the Phosphorylation State of Mig1 and Therefore Its Nucleocytoplasmic Distribution *. doi:10.1074/jbc.M606854200
- Aragon, A. D., Rodriguez, A. L., Meirelles, O., Roy, S., Davidson, G. S., Tapia, P. H., ... Werner-Washburne, M. (2008). Characterization of differentiated quiescent and nonquiescent cells in yeast stationary-phase cultures. *Molecular Biology of the Cell*, 19(3), 1271–80. doi:10.1091/mbc.E07-07-0666
- Barrett, L., Orlova, M., Maziarz, M., & Kuchin, S. (2012). Protein kinase a contributes to the negative control of SNF1 protein kinase in saccharomyces cerevisiae. *Eukaryotic Cell*, 11, 119–128. doi:10.1128/EC.05061-11
- Broach, J. R. (2012). Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics*, 192(September), 73–105. doi:10.1534/genetics.111.135731
- Budhwar, R., Fang, G., & Hirsch, J. P. (2011). Kelch repeat proteins control yeast PKA activity in response to nutrient availability. *Cell Cycle*, 10(May 2015), 767–770. doi:10.4161/cc.10.5.14828
- Budhwar, R., Lu, A., & Hirsch, J. P. (2010). Nutrient control of yeast PKA activity involves opposing effects on phosphorylation of the Bcy1 regulatory subunit. *Molecular Biology of the Cell*, 21(21), 3749–58. doi:10.1091/mbc.E10-05-0388
- Busti, S., Coccetti, P., Alberghina, L., & Vanoni, M. (2010). Glucose signaling-mediated coordination of cell growth and cell cycle in Saccharomyces Cerevisiae. *Sensors*, 10, 6195–6240. doi:10.3390/s100606195
- Chandrashekarappa, D. G., McCartney, R. R., & Schmidt, M. C. (2013). Ligand binding to the AMP-activated protein kinase active site mediates protection of the activation loop from dephosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 288(1), 89–98. doi:10.1074/jbc.M112.422659
- Ciriacy, M. (1977). Isolation and characterization of yeast mutants defective in intermediary carbon metabolism and in carbon catabolite derepression. *Molecular & General Genetics: MGG*, 154(2), 213–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/197391>
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H. N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Teixeira, M., & Thevelein, J. M. (2014). Nutrient sensing and signaling in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Microbiology Reviews*, 38, 254–299. doi:10.1111/1574-6976.12065
- Denis, C. L. (1984). Identification of new genes involved in the regulation of yeast alcohol dehydrogenase II. *Genetics*, 108(4), 833–44. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1224268&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Dubacq, C., Chevalier, A., & Mann, C. (2004). The Protein Kinase Snf1 Is Required for Tolerance to the Ribonucleotide Reductase Inhibitor Hydroxyurea The Protein Kinase Snf1 Is Required for Tolerance to the Ribonucleotide Reductase Inhibitor Hydroxyurea, *24*(6), 2560–2572. doi:10.1128/MCB.24.6.2560
- Fernández-Cid, A., Riera, A., Herrero, P., & Moreno, F. (2012). Glucose levels regulate the nucleomitochondrial distribution of Mig2. *Mitochondrion*, *12*(3), 370–380. doi:10.1016/j.mito.2012.02.001
- Fernández-garcía, P., Peláez, R., Moreno, F., Fernández-garcía, P., Peláez, R., Herrero, P., & Moreno, F. (2012). Phosphorylation of Yeast Hexokinase 2 Regulates Its Nucleocytoplasmic Shuttling *. doi:10.1074/jbc.M112.401679
- Gancedo, J. M. (2008). The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, *32*, 673–704. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00117.x
- Harashima, T., & Heitman, J. (2002). The G α protein Gpa2 controls yeast differentiation by interacting with kelch repeat proteins that mimic G β subunits. *Molecular Cell*, *10*, 163–173. doi:10.1016/S1097-2765(02)00569-5
- Haurie, V., Perrot, M., Mini, T., Jenö, P., Sogliocco, F., & Boucherie, H. (2001). The transcriptional activator Cat8p provides a major contribution to the reprogramming of carbon metabolism during the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(1), 76–85. doi:10.1074/jbc.M008752200
- Hedbacker, K., & Carlson, M. (2008). SNF1/AMPK pathways in yeast. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, *13*, 2408–20. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2685184&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hedbacker, K., Hong, S., & Carlson, M. (2004). Pak1 Protein Kinase Regulates Activation and Nuclear Localization of Snf1-Gal83 Protein Kinase, *24*(18), 8255–8263. doi:10.1128/MCB.24.18.8255
- Hedges, D., Proft, M., & Entian, K. D. (1995). CAT8, a new zinc cluster-encoding gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, *15*(4), 1915–22. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=230417&tool=pmcentrez&render type=abstract>
- Hiesinger, M., Roth, S., Meissner, E., & Schüller, H. J. (2001). Contribution of Cat8 and Sip4 to the transcriptional activation of yeast gluconeogenic genes by carbon source-responsive elements. *Current Genetics*, *39*(2), 68–76. doi:10.1007/s002940000182
- Hong, S.-P., Leiper, F. C., Woods, A., Carling, D., & Carlson, M. (2003). Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(15), 8839–8843. doi:10.1073/pnas.1533136100

- Hu, Y., Liu, E., Bai, X., & Zhang, A. (2010). The localization and concentration of the PDE2-encoded high-affinity cAMP phosphodiesterase is regulated by cAMP-dependent protein kinase A in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, *10*, 177–187. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00598.x
- Jouandot, D., Roy, A., & Kim, J. H. (2011). Functional dissection of the glucose signaling pathways that regulate the yeast glucose transporter gene (HXT) repressor Rgt1. *Journal of Cellular Biochemistry*, *112*(July), 3268–3275. doi:10.1002/jcb.23253
- Kaniak, A., Xue, Z., Macool, D., Kim, J., & Johnston, M. (2004). Regulatory Network Connecting Two Glucose Signal Transduction Pathways in *Saccharomyces cerevisiae* Regulatory Network Connecting Two Glucose Signal Transduction Pathways in *Saccharomyces cerevisiae* †. doi:10.1128/EC.3.1.221
- Karunanithi, S., & Cullen, P. J. (2012). The filamentous growth MAPK pathway responds to glucose starvation through the Mig1/2 transcriptional repressors in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *192*(November), 869–887. doi:10.1534/genetics.112.142661
- Kim, J. H., Roy, A., Jouandot, D., & Cho, K. H. (2013). The glucose signaling network in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1830*, 5204–5210. doi:10.1016/j.bbagen.2013.07.025
- Kim, J.-H., & Johnston, M. (2006). Two glucose-sensing pathways converge on Rgt1 to regulate expression of glucose transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(36), 26144–26149. doi:10.1074/jbc.M603636200
- Lesage, P., Yang, X., & Carlson, M. (1996). Yeast SNF1 protein kinase interacts with SIP4, a C6 zinc cluster transcriptional activator: a new role for SNF1 in the glucose response. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(5), 1921–1928.
- Lewis, J. a, & Gasch, A. P. (2012). Natural variation in the yeast glucose-signaling network reveals a new role for the Mig3p transcription factor. *G3 (Bethesda, Md.)*, *2*(December), 1607–12. doi:10.1534/g3.112.004127
- Lim, M. K., Siew, W. L., Zhao, J., Tay, Y. C., Ang, E., & Lehming, N. (2011). Galactose induction of the GAL1 gene requires conditional degradation of the Mig2 repressor. *The Biochemical Journal*, *435*, 641–649. doi:10.1042/BJ20102034
- Lutfiyya, L. L., Iyer, V. R., DeRisi, J., DeVit, M. J., Brown, P. O., & Johnston, M. (1998). Characterization of three related glucose repressors and genes they regulate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *150*, 1377–1391.
- Ma, P., Wera, S., Van Dijck, P., & Thevelein, J. M. (1999). The PDE1-encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signaling. *Molecular Biology of the Cell*, *10*(January), 91–104.

- Mayer, F. V., Heath, R., Underwood, E., Sanders, M. J., Carmena, D., McCartney, R. R., ... Carling, D. (2011). ADP regulates SNF1, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of AMP-activated protein kinase. *Cell Metabolism*, *14*(5), 707–714. doi:10.1016/j.cmet.2011.09.009
- Mbonyi, K., van Aelst, L., Argüelles, J. C., Jans, a W., & Thevelein, J. M. (1990). Glucose-induced hyperaccumulation of cyclic AMP and defective glucose repression in yeast strains with reduced activity of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Molecular and Cellular Biology*, *10*(9), 4518–4523. doi:10.1128/MCB.10.9.4518.Updated
- McCartney, R. R., & Schmidt, M. C. (2001). Regulation of Snf1 Kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(39), 36460–36466. doi:10.1074/jbc.M104418200
- Momcilovic, M., Iram, S. H., Liu, Y., & Carlson, M. (2008). Roles of the glycogen-binding domain and SNF4 in glucose inhibition of SNF1 protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(28), 19521–19529. doi:10.1074/jbc.M803624200
- Mosley, A. L., Lakshmanan, J., Aryal, B. K., & Özcan, S. (2003). Glucose-mediated phosphorylation converts the transcription factor Rgt1 from a repressor to an activator. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(12), 10322–10327. doi:10.1074/jbc.M212802200
- Mulet, M., & Portillo, F. (2005). A role for the non-phosphorylated form of yeast Snf1 : tolerance to toxic cations and activation of potassium transport, *579*, 512–516. doi:10.1016/j.febslet.2004.12.019
- Nehlin, J. O., Carlberg, M., & Ronne, H. (1991). Control of yeast GAL genes by MIG1 repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. *The EMBO Journal*, *10*(1), 3373–3377.
- Nikawa, J., Cameron, S., Toda, T., Ferguson, K. M., & Wigler, M. (1987). Rigorous feedback control of cAMP levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development*, *1*, 931–937. doi:10.1101/gad.1.9.931
- Ostling, J., Carlberg, M., & Ronne, H. (1996). Functional domains in the Mig1 repressor. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(3), 753–761.
- Ozcan, S., & Johnston, M. (1995). Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. *Molecular and Cellular Biology*, *15*(3), 1564–1572.
- Ozcan, S., Leong, T., & Johnston, M. (1996). Rgt1p of *Saccharomyces cerevisiae*, a key regulator of glucose-induced genes, is both an activator and a repressor of transcription. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(11), 6419–6426.
- Palomino, a., Herrero, P., & Moreno, F. (2006). Tpk3 and Snf1 protein kinases regulate Rgt1 association with *Saccharomyces cerevisiae* HXK2 promoter. *Nucleic Acids Research*, *34*(5), 1427–1438. doi:10.1093/nar/gkl028

- Papamichos-Chronakis, M., Gligoris, T., & Tzamarias, D. (2004). The Snf1 kinase controls glucose repression in yeast by modulating interactions between the Mig1 repressor and the Cyc8-Tup1 co-repressor. *EMBO Reports*, 5(4), 368–372. doi:10.1038/sj.embor.7400120
- Peeters, T., Louwet, W., Geladé, R., Nauwelaers, D., Thevelein, J. M., & Versele, M. (2006). Kelch-repeat proteins interacting with the Galpha protein Gpa2 bypass adenylate cyclase for direct regulation of protein kinase A in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(Track II), 13034–13039. doi:10.1073/pnas.0509644103
- Peeters, T., Versele, M., & Thevelein, J. M. (2007). Directly from G?? to protein kinase A: the kelch repeat protein bypass of adenylate cyclase. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(12), 547–554. doi:10.1016/j.tibs.2007.09.011
- Peláez, R., Herrero, P., & Moreno, F. (2009). Nuclear export of the yeast hexokinase 2 protein requires the Xpo1 (Crm-1)-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 284(31), 20548–20555. doi:10.1074/jbc.M109.013730
- Polish, J. a., Kim, J. H., & Johnston, M. (2005). How the Rgt1 transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by glucose. *Genetics*, 169(February), 583–594. doi:10.1534/genetics.104.034512
- Portela, P., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., & Moreno, S. (2003). Activation state of protein kinase A as measured in permeabilised *Saccharomyces cerevisiae* cells correlates with PKA-controlled phenotypes in vivo. *FEMS Yeast Research*, 3(1), 119–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12702255>
- Reimand, J., Vaquerizas, J. M., Todd, A. E., Vilo, J., & Luscombe, N. M. (2010). Comprehensive reanalysis of transcription factor knockout expression data in *Saccharomyces cerevisiae* reveals many new targets. *Nucleic Acids Research*, 38(14), 4768–4777. doi:10.1093/nar/gkq232
- Rødkaer, S. V, & Faergeman, N. J. (2014). Glucose- and nitrogen sensing and regulatory mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 14(5), 683–96. doi:10.1111/1567-1364.12157
- Rolland, F., Winderickx, J., & Thevelein, J. M. (2001). Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(5), 310–317. doi:10.1016/S0968-0004(01)01805-9
- Rolland, F., Winderickx, J., & Thevelein, J. M. (2002). Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Research*, 2, 183–201. doi:10.1016/S1567-1356(02)00046-6
- Roth, S., Kumme, J., & Schüller, H. J. (2004). Transcriptional activators Cat8 and Sip4 discriminate between sequence variants of the carbon source-responsive promoter element in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 45(3), 121–128. doi:10.1007/s00294-003-0476-2
- Roy, A., Shin, Y. J., Cho, K. H., & Kim, J.-H. (2013). Mth1 regulates the interaction between the Rgt1 repressor and the Ssn6-Tup1 corepressor complex by modulating PKA-dependent

phosphorylation of Rgt1. *Molecular Biology of the Cell*, 24, 1493–503. doi:10.1091/mbc.E13-01-0047

Rubenstein, E. M., McCartney, R. R., Zhang, C., Shokat, K. M., Shirra, M. K., Arndt, K. M., & Schmidt, M. C. (2008). Access denied: Snf1 activation loop phosphorylation is controlled by availability of the phosphorylated threonine 210 to the PP1 phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 283(1), 222–230. doi:10.1074/jbc.M707957200

Rubio-Teixeira, M., Van Zeebroeck, G., Voordeckers, K., & Thevelein, J. M. (2010). Saccharomyces cerevisiae plasma membrane nutrient sensors and their role in PKA signaling. *FEMS Yeast Research*, 10, 134–149. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00587.x

Ruiz, A., Xu, X., & Carlson, M. (2011). Roles of two protein phosphatases, Reg1-Glc7 and Sit4, and glycogen synthesis in regulation of SNF1 protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(16), 6349–6354. doi:10.1073/pnas.1102758108

Tamaki, H. (2007). Glucose-stimulated cAMP-protein kinase A pathway in yeast Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(4), 245–250. doi:10.1263/jbb.104.245

Thevelein, J. M., & Winder, J. H. De. (1999). MicroReview Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP ± protein kinase A pathway in the yeast Saccharomyces cerevisiae, 33, 904–918.

Thompson-Jaeger, S., François, J., Gaughran, J. P., & Tatchell, K. (1991). Deletion of SNF1 affects the nutrient response of yeast and resembles mutations which activate the adenylate cyclase pathway. *Genetics*, 129(3), 697–706. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1204737&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Treitl, M. A., Kuchin, S., & Carlson, M. (1998). Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in Saccharomyces cerevisiae. *Molecular and Cellular Biology*, 18(11), 6273–80. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=109214&tool=pmcentrez&renderertype=abstract>

Tu, J., & Carlson, M. (1995). regulates glucose repression in Saccharomyces cerevisiae, 14(23), 5939–5946.

Tudisca, V., Recouvreur, V., Moreno, S., Boy-Marcotte, E., Jacquet, M., & Portela, P. (2010). Differential localization to cytoplasm, nucleus or P-bodies of yeast PKA subunits under different growth conditions. *European Journal of Cell Biology*, 89(4), 339–348. doi:10.1016/j.ejcb.2009.08.005

Vandamme, J., Castermans, D., & Thevelein, J. M. (2012). Molecular mechanisms of feedback inhibition of protein kinase A on intracellular cAMP accumulation. *Cellular Signalling*, 24(8), 1610–8. doi:10.1016/j.cellsig.2012.04.001

- Vincent, O., Townley, R., Kuchin, S., & Carlson, M. (2001). Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific β subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes and Development*, *15*, 1104–1114. doi:10.1101/gad.879301
- Werner-Washburne, M., Brown, D., & Braun, E. (1991). Bcy1, the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in yeast, is differentially modified in response to the physiological status of the cell. *The Journal of Biological Chemistry*, *266*(29), 19704–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1655793>
- Westholm, J. O., Nordberg, N., Murén, E., Ameer, A., Komorowski, J., & Ronne, H. (2008). Combinatorial control of gene expression by the three yeast repressors Mig1, Mig2 and Mig3. *BMC Genomics*, *9*, 601. doi:10.1186/1471-2164-9-601
- Wu, J., & Trumbly, R. J. (1998). Multiple regulatory proteins mediate repression and activation by interaction with the yeast Mig1 binding site. *Yeast*, *14*(January), 985–1000. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199808)14:11<985::AID-YEA294>3.0.CO;2-C

CAPÍTULO 3

**IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS REGULADORES TRANSCRIPCIONALES DE
LAS SUBUNIDADES DE LA PROTEÍNA QUINASA A MEDIANTE EL USO DE
UN SISTEMA DUAL DE PROMOTOR-GEN REPORTERO A GRAN ESCALA
(*REPORTER-SYNTHETIC GENETIC ARRAY, R-SGA*)**

1. INTRODUCCIÓN

En los capítulos anteriores se detallan estudios destinados a caracterizar la actividad de los promotores de los genes *BCY1* y *TPKs* en condiciones de estrés térmico y salino (Capítulo 1), y en presencia de fuentes de carbono fermentable y no fermentable (Capítulo 2); y hemos demostrado que los promotores de cada isoforma de *TPK* y *BCY1* son regulados diferencialmente. De esta forma, la expresión de cada subunidad de PKA involucra diferentes mecanismos en respuesta al estrés térmico o salino, en tanto que los cuatro promotores comparten un mecanismo regulatorio autoinhibitorio, y son inducidos en presencia de fuentes de carbono no fermentables. El objetivo planteado en este Capítulo es identificar nuevos reguladores transcripcionales de las subunidades de PKA a gran escala, para tener una idea más general de todos los procesos que podrían estar involucrados en la regulación de la expresión de las subunidades de la PKA.

El empleo de *S.cerevisiae* como modelo de estudio ha facilitado el desarrollo de herramientas que permiten estudiar el efecto causado por la delección simple de un gen de manera sistemática, permitiendo la identificación tanto de reguladores directos así como señales río arriba que convergen en el control de un promotor determinado (Kainth et al., 2009). La metodología de R-SGA (*Reporter-Synthetic Genetic Array*), descrita más adelante, combina la técnica de genes reporteros con el uso de una colección de mutantes simples de delección, construyendo una nueva colección en la que se puede analizar fácilmente a nivel genómico las consecuencias que produce deleccionar cada uno de los ORFs de *S.cerevisiae* sobre la regulación del promotor de interés (Kainth & Andrews, 2010).

1.1. Colección de mutantes simples de delección de *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido largamente empleada como primer organismo modelo para explorar la biología eucariótica, dada su sencilla manipulación genética. La utilidad de las levaduras en el estudio de procesos conservados y de rutas metabólicas ha sido asistida en la pasada década por el acceso a importantes recursos genéticos incluyendo una colección completa de mutantes de delección, y colecciones de cepas de levaduras que presentan cada gen fusionado a un

epitope (Kainth et al., 2009). En cuanto a la disrupción génica, ésta representa una herramienta fundamental para los genetistas moleculares, que permite determinar las consecuencias de la pérdida de un gen. En la colección de mutantes de delección, elaborada por un consorcio internacional de laboratorios, cada gen fue reemplazado por un casete de KanMX (resistencia al antibiótico Kanamicina) desde el codón de inicio hasta el de terminación (sin incluir), por recombinación mitótica. El gen de KanMX en cada mutante presenta tanto río arriba como río abajo, una secuencia de 20 nucleótidos que permite la identificación específica de cada mutante de delección (Giaever et al., 2002). De esta manera se generó una colección de mutantes simples de delección para cada uno de los aproximadamente 6000 genes predichos de *S.cerevisiae*, identificando aproximadamente 1000 genes esenciales, y creando aproximadamente 5000 mutantes de delección viables (A. H. Y. Tong & Boone, 2006). Esta caracterización de la colección permitió evaluar la extensiva redundancia que existe en el genoma de la levadura, que balancea las consecuencias de las deleciones simples (Giaever et al., 2002). La posición de cada colonia es conocida, lo que facilita su identificación dentro de la colección (Giaever et al., 2002). La colección está conformada por colonias con genotipo *MATa*, y puede ser cruzada con la cepa de interés (*query*) con genotipo *MATα*, resultando en la formación de diploides. Luego de la esporulación, es posible la selección de las haploides *MATa* porque estas contienen un marcador conformado por el promotor del gen *STE2* dirigiendo la expresión de un marcador de auxotrofia (ver Materiales y Métodos), que sólo se expresa en estas haploides (Giaever et al., 2002).

Esta herramienta permitió por primera vez la realización de estudios sistemáticos a nivel genómico (A. H. Y. Tong & Boone, 2006; A. H. Tong et al., 2001), y promovió el desarrollo de varias técnicas genómicas que son ahora ampliamente utilizadas (Kainth et al., 2009).

1.2. Metodología SGA

Un análisis típico por *Synthetic Genetic Array* (SGA) involucra el cruzamiento de una cepa *query* que contiene la delección del gen de interés, con el *array* de 5000 mutantes viables de delección, y a través de una serie de pasos de réplica en placas con distintos medios selectivos (ver más adelante, adaptación R-SGA), se seleccionan las mutantes dobles de delección, que son evaluadas según sus defectos en el crecimiento (A. H. Y. Tong & Boone, 2006).

La metodología SGA es muy versátil porque cualquier elemento genético (o cualquier número de elementos genéticos) identificable por un marcador de selección puede ser manipulado de forma similar. En este sentido, la metodología SGA automatiza la genética de levaduras en general, ya que alelos específicos de genes, incluyendo mutaciones puntuales o alelos termosensibles, o plásmidos, pueden ser introducidos en cualquier *array* ordenado de cepas de levaduras, proveyendo un abordaje sistemático para diversos análisis (A. H. Y. Tong & Boone, 2006).

1.3. Adaptación de la metodología SGA: R-SGA

Los abordajes que emplean genes reporteros son una poderosa herramienta en el descubrimiento de factores de transcripción y señales río arriba que conducen a la regulación de los promotores. Entre estos se encuentran las proteínas fluorescentes, que han sido modificadas otorgando una gran variedad de colores (Kainth et al., 2009). A partir de la metodología SGA se han realizado varias adaptaciones, entre ellas, el abordaje denominado *Reporter-Synthetic Genetic Array* (R-SGA), que combina un sistema dual de promotor-gen reportero de color con SGA, permitiendo evaluar el efecto de la delección de cada gen sobre el promotor de interés. Comprende la construcción de una cepa *query wild type* conteniendo la construcción integrada promotor control (*ACT1* o *RPL39*) fusionado a la variante tdTomato de dsRed (referido aquí como RFP); así como un plásmido con la construcción promotor de interés fusionado a GFP. La cepa *query* es cruzada con la colección de aproximadamente 4500 mutantes haploides de delección mediante un procedimiento de réplica en placas de medio selectivo, resultando en un *array* de colonias en la que cada mutante de delección presenta las dos construcciones reporteras, *prX-GFP* y *prRPL39-RFP*. De esta manera puede fácilmente examinarse el efecto de cada delección en la actividad del gen reportero, midiendo las intensidades de fluorescencia de GFP y RFP directamente desde las colonias crecidas en placas de ágar. Luego de esta cuantificación de fluorescencia, la intensidad de GFP de cada colonia se relativiza a la señal de RFP de la misma colonia, identificando delecciones que producen una expresión diferencial de GFP (Kainth & Andrews, 2010). Se espera que la delección de un posible activador resulte en una disminución de la relación GFP:RFP, mientras que la delección de un posible represor, produzca un aumento en la relación GFP:RFP (Kainth & Andrews, 2010; Kainth et al., 2009).

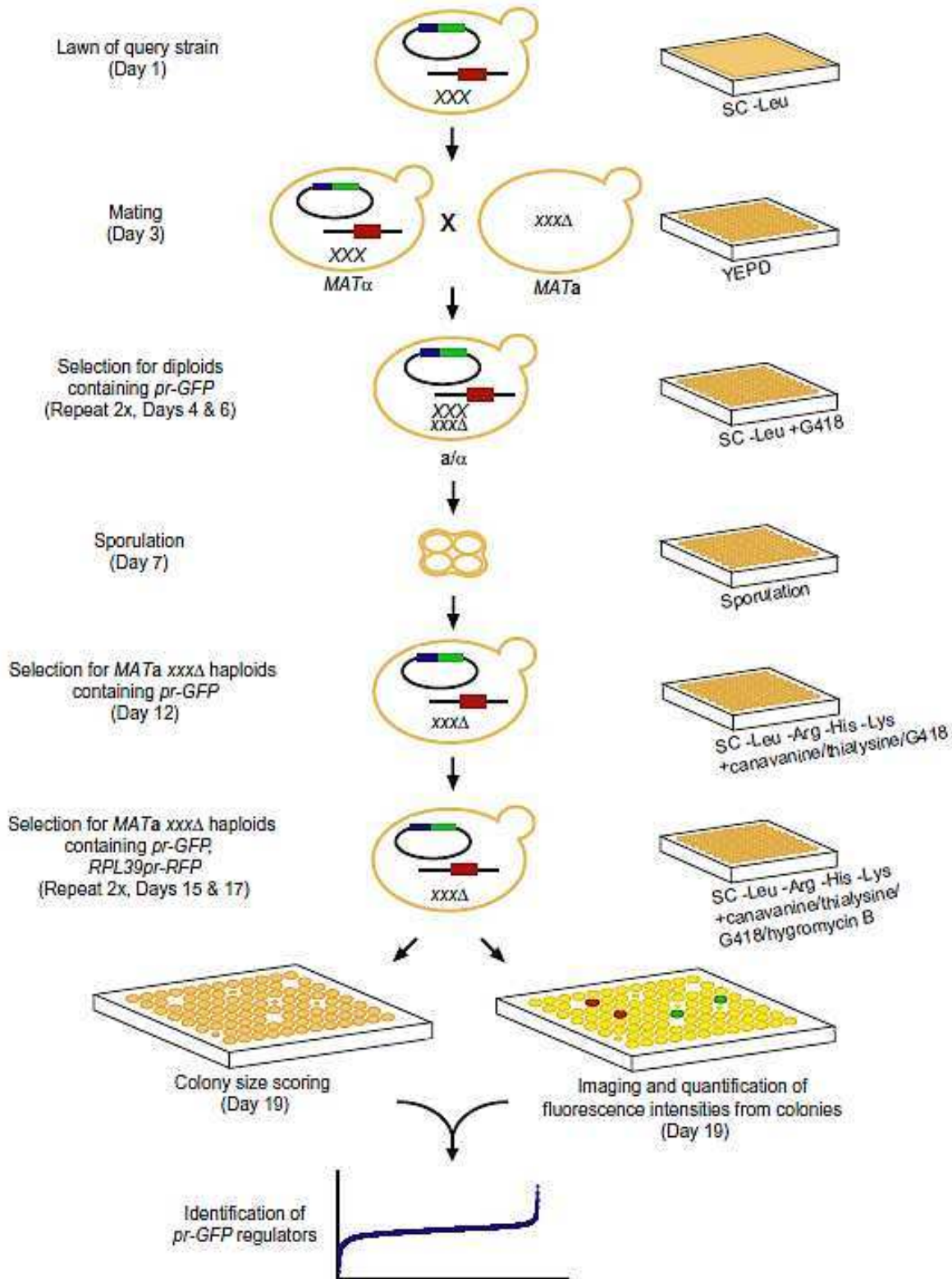


Figura 3.1. Esquema de la metodología de reporteros duales SGA.

Un césped de la cepa *query MAT α* BY4256 conteniendo al plásmido pBA1926-*prX-GFP* con el marcador de auxotrofia *LEU2*, es cruzada con una colección de mutantes de delección *MAT α* haploides, en YPD. Cada mutante lleva la delección de un gen fusionada al marcador de resistencia a Kanamicina (KanMX), que confiere resistencia a G418. Las resultantes diploides *MAT α / α* son repicadas en un medio sin leucina y suplementado con G418 para seleccionar a las células con el plásmido y el gen deleccionado fusionado al marcador *kan^r*, respectivamente. Las diploides son transferidas a un medio de esporulación enriquecido para inducir la esporulación y la formación de una progenie de esporas meióticas haploides. Las esporas son seguidamente transferidas a un medio sin leucina ni arginina, ni histidina, ni lisina, y suplementado con canavanina, tialisina y G418, para seleccionar a las células *MAT α* con el gen deleccionado conteniendo el plásmido *pr-GFP*. La omisión de leucina mantiene la selección del plásmido. La omisión de histidina favorece el crecimiento selectivo de la progenie meiótica *MAT α* , dado que sólo estas células expresan el reportero *prSTE2-his5*. Los marcadores *can1 Δ* y *lyp1 Δ* son de contraselección, dado que las células que expresan los genes *CAN1* y *LYP1* no pueden sobrevivir en presencia de canavanina y tialisina (A. H. Y. Tong & Boone, 2006). Las células son seguidamente repicadas en el mismo medio suplementado con Higromicina B para seleccionar la presencia del reportero control integrado *prRPL39-GFP* fusionado al gen de resistencia a Higromicina B (HphMX) (Goldstein & McCusker, 1999), representado por la caja roja. El resultado es una colección de mutantes de delección de levaduras, cada una conteniendo el reportero *prX-GFP* y el control *prRPL39-RFP*. Las intensidades de fluorescencia son medidas directamente desde las colonias dispuestas en placas de agar usando un *scanning fluorimager*, y las imágenes resultantes son cuantificadas empleando el *software Image Gauge*. Los círculos amarillos representan colonias donde las intensidades de fluorescencia de GFP y RFP son relativamente iguales, como es esperado en mutantes que no afectan la expresión de GFP. Los círculos verdes representan cepas de levaduras que contienen delecciones de putativos represores. Los círculos rojos representan cepas de levaduras conteniendo delecciones de putativos activadores. Las imágenes digitales de las placas finales de selección se examinan para excluir del análisis aquellas cepas que sean enfermas, muertas o que falló el replicado. XXX, alelo *wild type*; *xxx Δ* , delección de un alelo; óvalo negro, plásmido con el marcador *LEU2*; cuadrado azul, promotor; cuadrado verde, GFP; metodología SGA adaptada de (Kainth et al., 2009; A. H. Y. Tong & Boone, 2006).

En la Figura 3.1 se resume la estrategia para producir una colección con ambos genes reporteros en cada mutante de delección. Esta estrategia sigue los pasos básicos del protocolo SGA, con el agregado de modificaciones pertinentes a la adaptación *Reporter-SGA*. Se esquematizan los pasos a seguir tomando como ejemplo una placa, pero estos pasos se llevan a cabo para cada una de las 20 placas que componen la colección de mutantes simples de delección de EUROSCARF.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este capítulo es identificar mediante un abordaje genómico sistemático reguladores directos y señales río arriba, y vías metabólicas que afectan a los promotores de las subunidades de PKA, para tener un entendimiento más amplio del control de la especificidad de la vía cAMP/PKA.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Construcción del Sistema Repotero y de la colección de mutantes

Los fragmentos correspondientes a los promotores de los genes *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* y *BCY1* (-800 a +10 respecto al sitio de inicio de la traducción) fueron amplificados a partir de DNA genómico y clonados en el plásmido pBA1926, río arriba de un casete que consiste en el gen reportero GFP, seguido por la secuencia terminadora de la transcripción de gen *ADH1*. El plásmido pBA1926 es un plásmido centromérico (presenta secuencia CEN), con auxotrofía *LEU2*, derivado del plásmido pRS315 (Sikorski & Hieter, 1989).

Los reporteros resultantes (pBA1926-*prTPK1*, pBA1926-*prTPK2*, pBA1926-*prTPK3* y pBA1926-*prBCY1*; que en general serán denominados *pr-GFP*) se transformaron en la cepa BY4256 (Kainth et al., 2009) apropiada para la aplicación de la metodología R-SGA, que presenta una copia integrada del promotor control RPL39 fusionado a RFP, y marcado con el gen de resistencia a Higromicina B (HphMX).

Se empleó la técnica R-SGA para introducir simultáneamente los genes reporteros GFP y RFP en un *array* de aproximadamente 4500 mutantes simples de delección de levaduras. Como ya se mencionó, esta colección está conformada por cepas en las que cada ORF predicho fue reemplazado por el gen marcador de resistencia al antibiótico Kanamicina, KanMX (disponible en EUROSCARF).

3.2. Validación del análisis genético de R-SGA

Realizamos un estudio genómico funcional de reporteros duales, la técnica R-SGA (Kainth et al., 2009) para analizar la colección viable de delección en busca de mutantes que afecten la transcripción de los promotores de las subunidades de PKA (*prTPK1-GFP*, *prTPK2-GFP*, *prTPK3-GFP* y *prBCY1-GFP*). La expresión diferencial de GFP fue evaluada por medición de las intensidades de fluorescencia (GFP y RFP como control) directamente en las colonias organizadas en placas de agar, obteniendo rápidamente un resultado genómico del efecto de cada mutación en la actividad de los promotores de las subunidades de PKA. El análisis de R-SGA fue realizado con colonias dispuestas en placas de medio mínimo, crecidas por 3 días a 30°C en glucosa como fuente de carbono. Las proporciones GFP:RFP

fueron normalizadas y los valores de \log_2 fueron calculados según se describe en Materiales y Métodos (Figura 3.2).

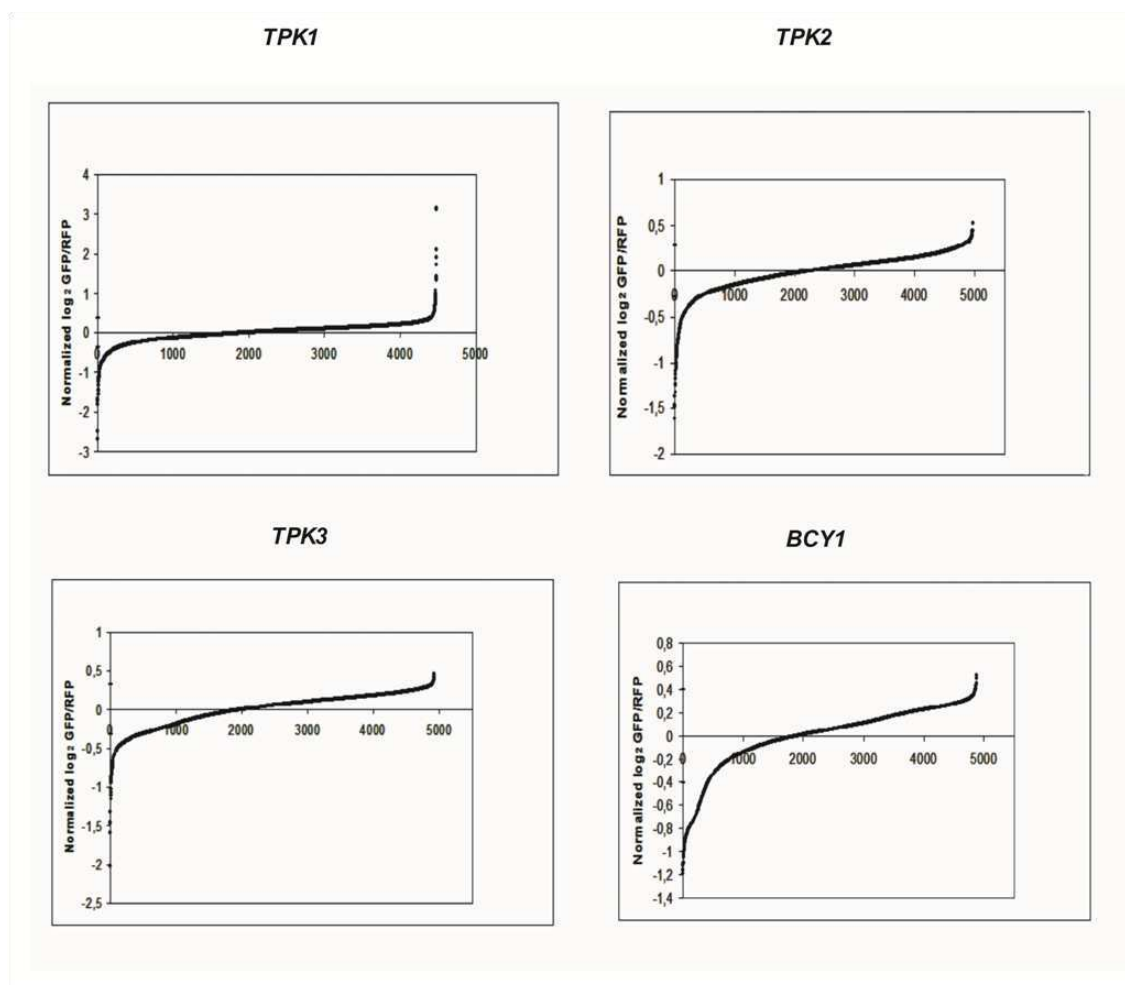


Figura 3.2. Distribución de los valores de \log_2 de las proporciones GFP:RFP del análisis a gran escala de los promotores *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* y *BCY1*.

El eje y representa los \log_2 de las proporciones GFP:RFP medidas en cada mutante de delección, dispuestas en el eje x.

Una disminución en la proporción GFP:RFP corresponde a deleciones de genes que codifican para activadores transcripcionales, mientras que proporciones aumentadas significan deleciones de putativos represores (Kainth et al., 2009). Previo a la realización de los análisis que se describen a

continuación, se descartaron los valores de $\log_2(\text{GFP}:\text{RFP})$ de las colonias enfermas o con crecimiento defectuoso para evitar distorsiones en los resultados (Materiales y Métodos). Los valores de $\log_2(\text{GFP}:\text{RFP})$ correspondientes a cada promotor fueron sometidos al test de Shapiro Wilkins y a la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov (Archivo 10 del Apéndice), indicando en todos los casos el ajuste a la distribución Normal (Materiales y Métodos).

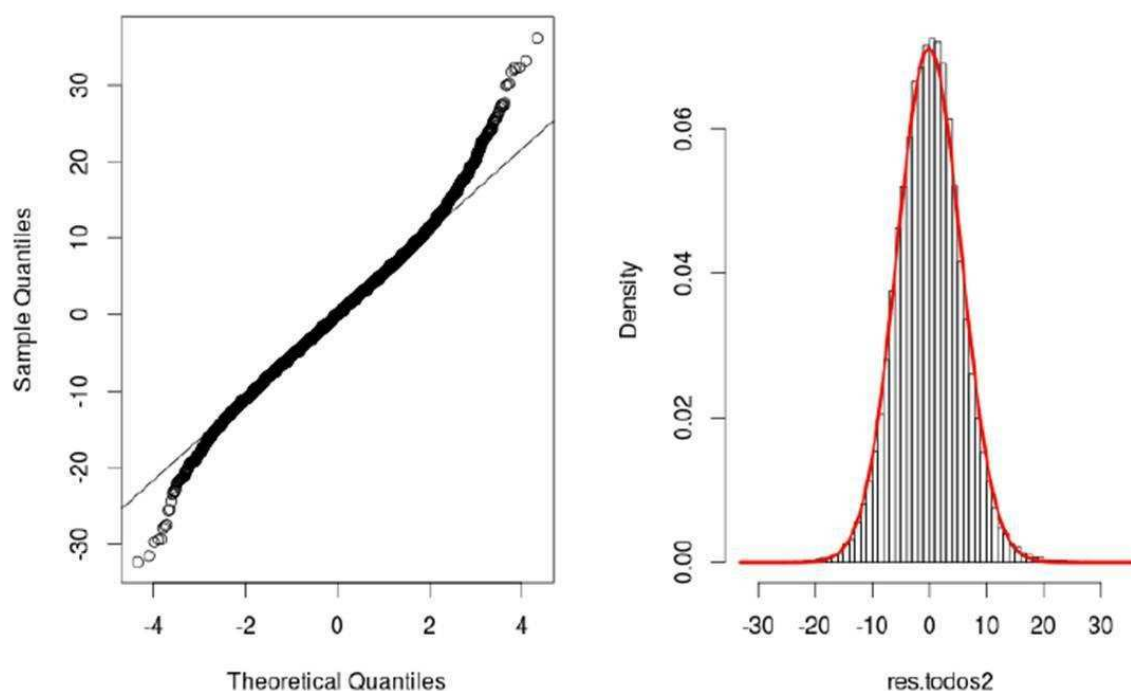


Figura 3.3. Ajuste de residuales del modelo a la distribución normal de los valores de RFP del análisis del promotor *TPK1*.

En el panel de la izquierda se encuentra el gráfico QQ, con una línea demarcando los valores esperados en una distribución Normal. El panel de la derecha muestra un histograma de densidades de probabilidades, con la distribución Normal esperada superpuesta en rojo.

Adicionalmente se evaluó el ajuste a la distribución Normal de los valores de RFP de cada una de las 4 colecciones. En la Figura 3.3 se observa que el ajuste es bueno, con una ligera desviación de unos pocos datos. La normalización de los datos se realizó restando el promedio general de los datos de $\log_2(\text{GFP}:\text{RFP})$ a todos los valores de cada promotor, y se estableció una línea de corte en 1.5 SD

para identificar los putativos reguladores. Se fijó este valor como punto de corte porque permite la inclusión en el análisis de reguladores como Tpk2 en el caso del promotor *TPK1*, que con análisis más restringidos se perdían. Si bien no se sabe mucho acerca de la regulación de los genes de *TPKs* y *BCY1*, los resultados presentados en el Capítulo 1, indican que los promotores de *TPKs* son inhibidos por la actividad de PKA, y que Tpk2 tiene el mayor efecto inhibitorio sobre los promotores *TPK1* y *TPK3* cuando las células crecen en cultivos líquidos (Capítulo 1, Figuras 1.5.A y B). De esta forma, se esperaba que la delección de *TPK2* resultara en un incremento de la expresión de *prTPK1-GFP* y *prTPK3-GFP*. De hecho se encontró que la delección de *TPK2* causa la inducción de la transcripción de *TPK1* (Tabla 9 en Apéndice), lo que indica que Tpk2 es un represor transcripcional de este gen, y fue utilizado como control positivo en el criterio de selección del punto de corte. Del análisis se descartó una lista de 260 ORFs que con frecuencia surgen en este tipo de estudio (Henry Goettert and Brenda Andrews, *personal communication*).

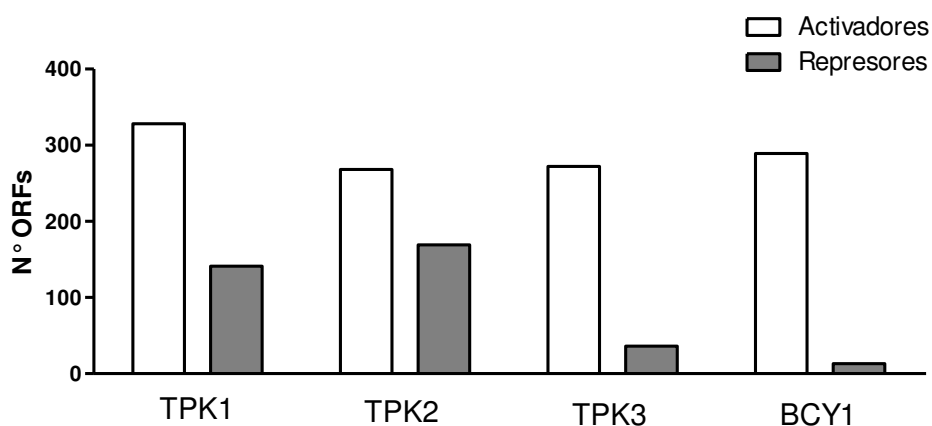


Figura 3.4. Reguladores, activadores o represores

Reguladores identificados en el estudio a escala genómica de placas de medio mínimo con glucosa crecidas durante 3 días a 30°C.

El número de putativos activadores y putativos represores de cada subunidad de PKA se indica en la Figura 3.4. Como puede verse, la cantidad de activadores supera al número de represores,

consistente con un aumento en la actividad de los promotores en la fase logarítmica tardía de crecimiento, como se vio en el Capítulo 1 de esta Tesis.

Las 4 listas generadas de colonias de deleción con valores de $\log_2(\text{GFP}:\text{RFP})$ alejados 1.5 SD del promedio de cada colección *pr-GFP* permitieron la identificación de putativos ORFs represores y activadores transcripcionales. Estas 4 listas se clasificaron en categorías funcionales mediante el *software online* FunSpec <http://funspec.med.utoronto.ca/>, y de la lista de categorías se seleccionaron para continuar con el análisis aquellas con un enriquecimiento con $p < 0.05$. Se tuvo en cuenta la posibilidad de que el análisis con un $p < 0.05$ arrojara falsos positivos, situación que quizás podía evitarse haciendo un análisis más estricto con $p < 0.01$. Sin embargo, la categoría de GO enriquecida en genes de señalización por cAMP y la categoría de MIPS que incluye a Tpk2, como reguladores de *TPK2* y *TPK1* respectivamente, surgieron con un valor $0.01 < p < 0.05$. Con una reducción en la línea de corte al 1%, éstos no habrían sido detectados; entonces, si se redujeran los falsos positivos con una línea de corte más baja, se podrían estar al mismo tiempo descartando verdaderos reguladores. Con este compromiso en cuenta se muestran los reguladores transcripcionales putativos identificados con una línea de corte de $p < 0.05$ en las Tablas 10, 11, 12 y 13 del Apéndice.

En conjunto, los resultados de este estudio son consistentes con resultados previos, dado que se encontraron algunos de los moduladores esperados, lo que valida el uso de esta técnica para la identificación de nuevos reguladores de la expresión de las subunidades de PKA.

3.3. Nuevos reguladores transcripcionales de las subunidades de PKA

Se lograron identificar 469 reguladores transcripcionales putativos para *TPK1*, 437 para *TPK2*, 307 para *TPK3* y 299 para *BCY1* (Tabla 9 del Apéndice). El agrupamiento de los genes identificados según su función en los procesos biológicos en los que intervienen, con un $p < 0.05$, reveló un número discreto de categorías de *Gene Ontology* (GO – *Biological Process*) significativamente enriquecidas para los promotores *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* y *BCY1*, que se muestran en la Figura 3.5 y en las Tablas 10, 11, 12 y 13 del Apéndice. Los resultados indican que varias categorías de GO afectan diferencialmente la expresión de los promotores de *TPKs* y *BCY1*, mientras que otras son comunes a los 4 promotores (Tabla 3.1).

Cluster	TPK1	TPK2	TPK3	BCY1
actin cortical patch localization				
activation of MAPK cascade				
aminoacid metabolism				
cAMP-mediated signaling				
carbohydrate metabolism				
cell redox homeostasis				
cellular bud site selection				
cellular copper ion homeostasis				
cellular ion homeostasis				
cellular response to anoxia				
cleavage of tricistronic rRNA transcript				
COPI coating of Golgi vesicle				
defense response				
DNA process				
endocytosis				
endoplasmic reticulum inheritance				
filamentous growth				
histone modification				
intracellular signal transduction				
intraluminal vesicle formation				
iron assimilation by reduction and transport				
karyogamy				
lipid metabolic process				
meiosis				
metabolic process				
methylation				
microautophagy				
mitochondria process				
mitotic recombination				
mRNA processing				
nucleoside metabolism				
pectin catabolic process				
plasma membrane fusion				
polyphosphate metabolic process				
propionate metabolic process				
protein metabolism				
pyridoxine metabolic process				
rDNA accumulation involved in cell aging				
reactive oxygen species metabolic process				

Cluster	TPK1	TPK2	TPK3	BCY1
regulation of calcium ion-dependent exocytosis				
regulation of cell budding				
regulation of cell polarity				
regulation of nitrogen utilization				
response to DNA damage stimulus				
response to drug				
Rho protein signal transduction				
rRNA (guanine-N7)-methylation				
sporulation				
sulfate assimilation				
transcription				
translation				
transport				
vacuole process				

Tabla 3.1. Las subunidades de PKA son reguladas por distintos procesos biológicos.

Categorías enriquecidas de GO Procesos Biológicos que afectan la transcripción de *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* y *BCY1*, con un valor de $p < 0.05$. En gris se indican las categorías que afectan a cada subunidad de PKA.

Varios procesos biológicos afectan la expresión de cada subunidad de PKA, 26 categorías en total, de las cuales, 7 categorías afectan a las 4, 8 categorías afectan a 3 y 12 categorías son compartidas por 2 de las subunidades (Figura 3.5 y Tabla 3.1). Considerando una línea de corte más rigurosa, de $p < 0.01$, la lista de categorías que regulan los promotores de PKA se reduce de 42 a 9 para *TPK1* (23.4%), de 43 a 18 para *TPK2* (41.8%), de 86 a 19 para *TPK3* (22%) y de 57 a 7 para *BCY1* (12.2%) (Tabla 14 del Apéndice), y se mantienen 3 categorías que regulan las tres *TPKs*, metabolismo de lípidos, procesos mitocondriales, y metabolismo de aminoácidos; y 2 que regulan a las cuatro subunidades, que son transcripción y procesos de la vacuola (Tabla 3.2).

Dos categorías interrelacionadas, metabolismo de lípidos y metabolismo del fosfato fueron enriquecidas diferencialmente en los 4 análisis. Metabolismo de lípidos aparece como modulador sólo de los promotores de *TPKs* y no del promotor *BCY1*, mientras que el metabolismo de fosfato surgió como regulador de los promotores *TPK2*, *TPK3* y *BCY1* (Tabla 3.1 y Figura 3.5).

Cluster	TPK1	TPK2	TPK3	BCY1
aminoacid metabolism				
ascospore wall assembly				
DNA process				
endoplasmic reticulum inheritance				
intraluminal vesicle formation				
iron assimilation by reduction and transport				
lipid metabolic process				
meiosis				
metabolic process				
microautophagy				
mitochondria process				
mitotic recombination				
mRNA 3'-end processing				
NADH oxidation				
propionate metabolic process				
protein metabolism				
response to DNA damage stimulus				
sporulation resulting in formation of a spore				
sulfate assimilation				
transcription				
translation				
transport				
vacuole process				

Tabla 3.2. Las subunidades de PKA son reguladas por distintos procesos biológicos.

Categorías enriquecidas de GO Procesos Biológicos que afectan la transcripción de *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* y *BCY1*, con un valor de $p < 0.01$. En gris se indican las categorías que afectan a cada subunidad de PKA.

Los lípidos son los mayores constituyentes del ensamblaje estructural de las células y son indispensables para el desarrollo, el crecimiento y el mantenimiento del organismo. En *S.cerevisiae*, el metabolismo de lípidos es alterado durante las fases de crecimiento por suplementación con inositol y colina, y su regulación es controlada por mecanismos genéticos y bioquímicos (Carman & Henry, 2007). La regulación de los genes relacionados con la biosíntesis de fosfolípidos en *S.cerevisiae*, a través de secuencias activadoras río arriba que actúan en cis (UAS_{INO}) por suplementación con inositol, es un mecanismo conocido en profundidad. Adicionalmente, se ha propuesto un rol para los polifosfatos de

inositol, productos de la reacción catalizada por la fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (Plc1), en la regulación de la biosíntesis de lípidos (Rupwate, Rupwate, & Rajasekharan, 2012).

Los lípidos han sido considerados durante años como bloques en la construcción de membranas biológicas, sin ninguna otra función específica. Sin embargo, esta idea ha cambiado durante las últimas dos décadas, dado que se ha demostrado que ciertas clases de lípidos están involucrados en procesos de señalización intracelular o trabajan como sensores del estado de las membranas celulares. Entre los lípidos que presentan funciones importantes, el fosfatidilinositol (PI) y sus derivados están involucrados en la transducción de señales intracelulares (Lemmon, 2003), además de su rol en el tráfico vesicular (Odorizzi, Babst, & Emr, 2000).

Saccharomyces cerevisiae, ajusta su composición de lípidos de membrana de acuerdo a la disponibilidad de los fosfolípidos precursores solubles inositol y colina (Henry, Kohlwein, & Carman, 2012). La adición de inositol a la célula que está hambreada de este precursor induce cambios rápidos y profundos en el perfil y en la síntesis de fosfolípidos de membrana y en los esfingolípidos que contienen inositol (Alvarez-Vasquez et al., 2005; Kelley, Bailis, Henry, & Carman, 1988; Loewen et al., 2004). Los niveles de PI aumentan hasta 6 veces, mientras que los de CDP-diacilglicerol y ácido fosfatídico (PA), los precursores intermediarios de PI, son consumidos. Estos cambios en la composición de lípidos de la membrana son sensados por Opi1, que en ausencia de inositol localiza en el Retículo Endoplasmático (RE) por interacción con la proteína asociada a membrana Scs2 y PA (Henry et al., 2012). Después del agregado de inositol, Opi1 se disocia rápidamente del ER, transloca al núcleo, y reprime la expresión de genes estructurales necesarios para la biosíntesis de fosfolípidos. La expresión regulada de esos genes requiere tanto de Ino2 como de Ino4, que se unen como heterodímero al elemento UAS_{INO} presente en los promotores de los genes blanco de Opi1. Opi1 media entonces la represión de los genes que poseen UAS_{INO} a través de la interacción directa con Ino2.

Se ha demostrado que múltiples señales provenientes de RE, producidas por cambios rápidos en el metabolismo de fosfolípidos frente al agregado de inositol, controlan directamente la expresión de genes. Estas señales se pueden agrupar en seis categorías distintas de acuerdo a los perfiles transcripcionales que producen. Una de ellas incluye los genes de biosíntesis de fosfolípidos regulados por Opi1. Algunas de esas categorías incluyen genes que se inducen y otras, genes que se reprimen ante el agregado de inositol. Esto señala que varias vías distintas de señalización originadas en el RE

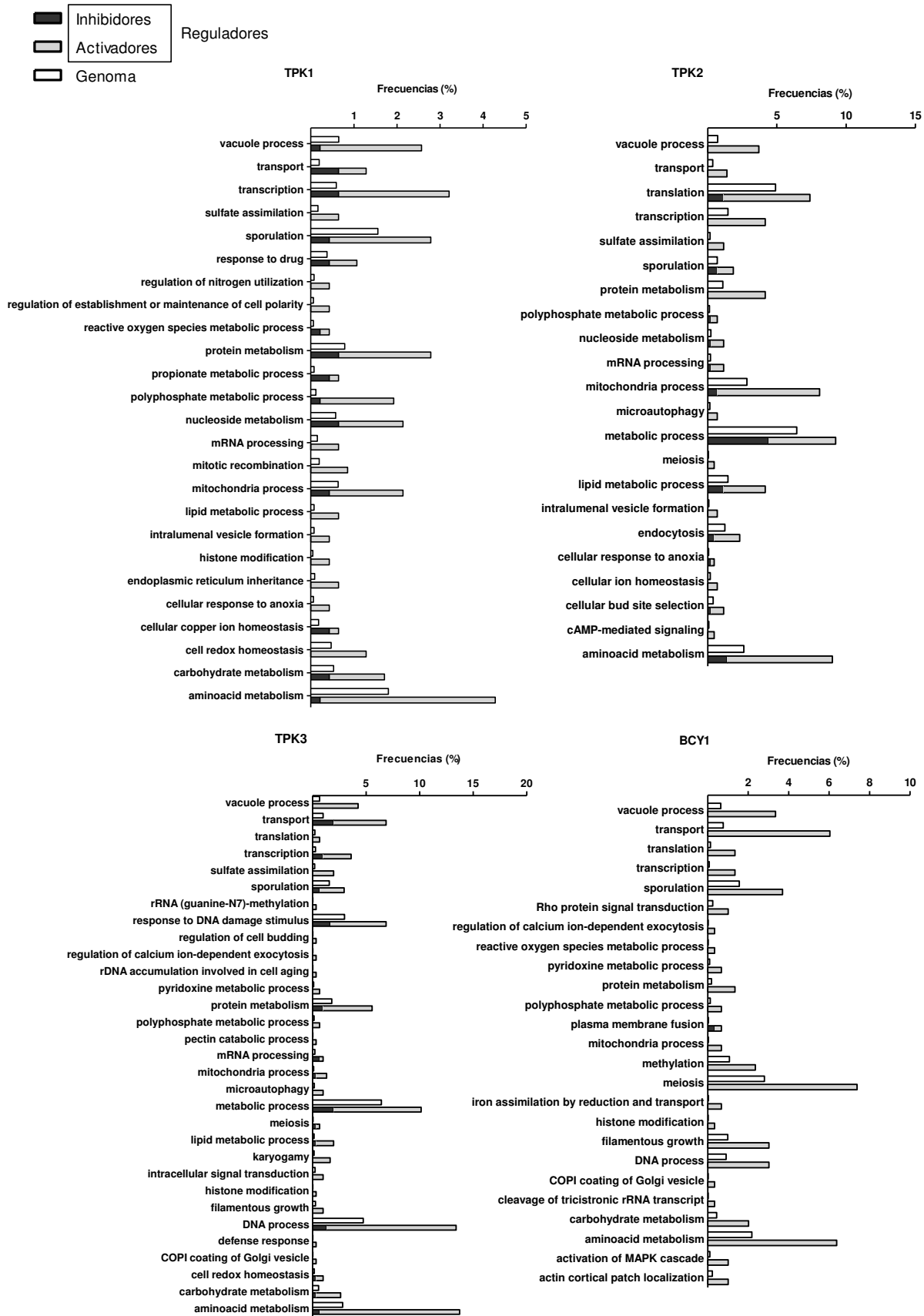


Figura 3.5. Clasificación en categorías funcionales de genes identificados en el análisis a escala genómica como reguladores de los promotores de las subunidades de PKA.

La clasificación se realizó de acuerdo a las anotaciones en la base de datos Funspec (<http://funspec.med.utoronto.ca/>). Las barras negras y blancas representan la fracción de genes del genoma en cada categoría y la fracción de reguladores identificados, respectivamente.

por detección de cambios en la composición de lípidos de membrana, inducidos por la suplementación de inositol, convergen en el núcleo promoviendo cambios en la expresión génica global (Jesch, Liu, Zhao, Wells, & Henry, 2006).

Entre los genes clasificados en la categoría de GO de metabolismo de lípidos y síntesis de fosfolípidos (Tablas 10, 11, 12 y 13 del Apéndice), se incluyen genes que son regulados por inositol y colina, como *INO1*, *CHO2*, *SCS2*, *EKI1* y *FEN1*, y los factores de transcripción *INO2* e *INO4*. También se encuentran genes involucrados en el metabolismo de polifosfatos de inositol, como *PLC1*, y aquellos que codifican para quinasas de inositol, como *ARG82*, *IPK1* y *KCS1*. Esta categoría surgió incluso con una línea de corte más rigurosa, de $p < 0.01$. Además, también se identificaron genes que codifican para las fosfatasas de fosfoinosítidos *SAC1* e *INP51*, así como genes involucrados en el metabolismo de esfingolípidos, como *ISC1* (que codifica para una fosfatasa de fosfoesfingolípidos dependiente de inositol), y *ELO2* y *ELO3* (que codifican para elongasas de ácidos grasos relacionadas con la síntesis de esfingolípidos).

En conjunto estos resultados y las evidencias expuestas apuntan a un posible nuevo rol para inositol como un regulador río arriba de la expresión de los promotores de las subunidades de PKA. Para evaluar esta posibilidad, las actividades de los promotores *TPK1*, *TPK2* y *TPK3* fueron analizadas mediante un ensayo de medición del gen reportero *LacZ*, en cepas WT (BY4741) crecida hasta fase exponencial tardía (DO_{600} 3.5), en medio mínimo con glucosa, y sin o suplementado con inositol 75 μ M y colina 1mM (Figura 3.6 A, panel superior).

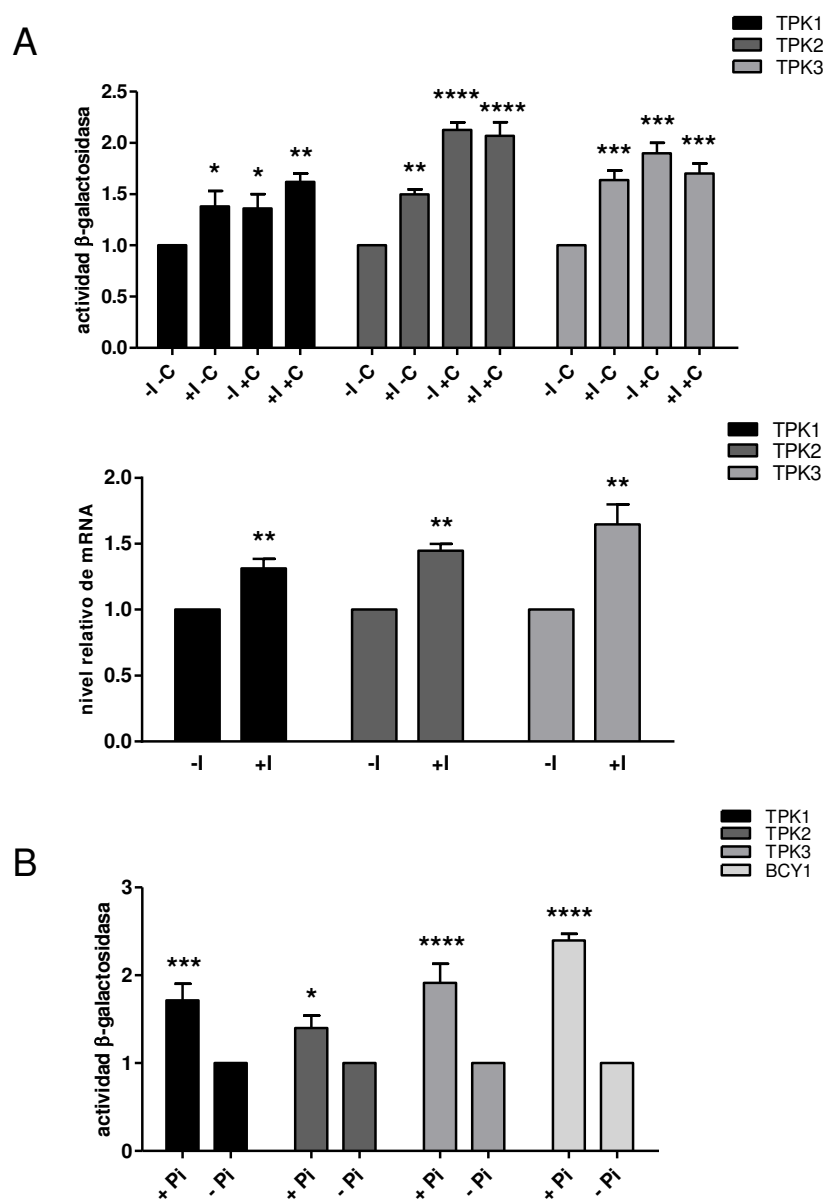


Figura 3.6. La actividad de los promotores de las subunidades de PKA es regulada por inositol y colina.

(A) Panel superior, Actividad β -galactosidasa fue determinada en la cepa WT BY4741 transformada con los plásmidos *TPKs-LacZ*. Las células fueron crecidas hasta una DO_{600} 3.5 en medio mínimo con glucosa, suplementado o no con I (inositol) y C (colina). Los resultados, normalizados a los valores de la condición -I-C para cada promotor y mostrados en Unidades Miller, se expresan como el promedio \pm SD de replicados (n=6) provenientes de experimentos independientes. Panel inferior, niveles endógenos de mRNAs de *TPKs* en la cepa WT BY4741 cuantificados por qRT-PCR y normalizados con los valores de los mRNAs de *TUB1* y la condición -I. Las células fueron crecidas en las condiciones mencionadas. Los resultados se expresan como el promedio \pm SD de triplicados dentro de un experimento representativo. (B) Actividad β -galactosidasa fue medida como en (A) pero en medios con elevada o baja concentración de fosfato (Pi). *p<0.05.

Como se observa en la Figura 3.6.A paneles superior e inferior, tanto la actividad de los tres promotores como la abundancia de los mRNAs son regulados positivamente por la presencia de inositol y colina. Asimismo, la adición de colina a un medio depletado de inositol también activa a los promotores. No se detectan diferencias en medios conteniendo ambos metabolitos. Dado que no se encontró ninguna de las secuencias clásicas UAS_{INO} en ninguno de los promotores analizados, se propone que el efecto del inositol y la colina sobre los promotores de *TPKs* sería indirecto, por modulación de los niveles de lípidos de señalización y de los productos solubles del metabolismo de fosfolípidos como los fosfatos de inositol (Lee, Huang, Quioco, & O'Shea, 2008).

Los promotores de las subunidades de PKA son activados, y no reprimidos por inositol. Más aún, muchos genes involucrados en el metabolismo de fosfolípidos en levaduras no son reprimidos en respuesta a inositol. Por ejemplo el gen *INM1*, que codifica para la fosfatasa de inositol 3-fosfato, los genes *DPP1* y *PAH1*, que codifican para fosfatasas de lípidos, y el gen *PIS1*, que codifica para una sintasa de fosfatidilinositol, son activados en presencia de inositol y en fase estacionaria (Jani & Lopes, 2008; Murray & Greenberg, 1997; Oshiro et al., 2000). Con el objetivo de entender el mecanismo involucrado en la regulación de la expresión de las subunidades de PKA, se evaluó el efecto de la delección de varios genes que funcionan en la detección de inositol/PA (*Ino2*, *Ino4*, *Opi1*, *Scs2* y *Dgk1*, (Henry et al., 2012)) sobre las actividades de los promotores. Se midió la abundancia de los mRNAs de las subunidades catalíticas de PKA en las cepas mutantes de delección de genes que codifican para proteínas de la vía de biosíntesis de fosfolípidos, por qRT-PCR (Figura 3.7). Los resultados indican que *Ino2* e *Ino4* actúan como activadores transcripcionales de los promotores *TPK1* y *TPK2*. Los niveles de mRNA en la cepa *opi1Δ* correlacionan con los de las cepas *ino2Δ* e *ino4Δ*, consistente con la función opuesta de *Opi1* e *Ino2/4* en los procesos fisiológicos de los que participan. El promotor de *TPK3* sólo muestra un efecto en la cepa *ino2Δ*. Se han publicado evidencias que demuestran que inositol puede mediar la regulación de genes de manera independiente de *Ino2*, *Ino4* (Santiago & Mamoun, 2003) e incluso de *Opi1* (Graves & Henry, 2000). El ejemplo de regulación génica que más se asemeja al de los promotores de las subunidades de PKA es el del gen *PIS1*, que es inducido por inositol y requiere de *Ino4* para la activación completa de su promotor. Además, *Ino4*, que es un factor de transcripción de tipo básico hélice-vuelta-hélice, requiere de otro monómero distinto para heterodimerizar, que en el caso del promotor *PIS1* todavía no se ha podido identificar (Jani & Lopes, 2008). Un mecanismo similar

podría actuar en el control del promotor *TPK3*, ya que, según se observa en la Figura 3.7, *Ino2*, y no *Ino4*, afecta su actividad.

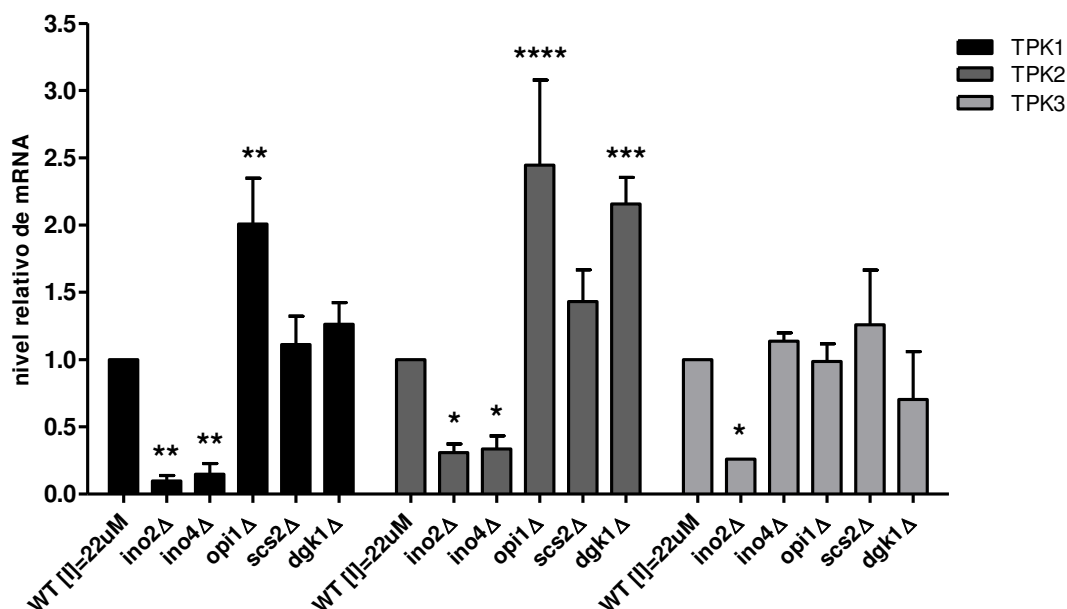


Figura 3.7. Miembros de la vía de biosíntesis de fosfolípidos regulan los niveles de mRNA de *TPK1*, *TPK2* y *TPK3*.

Niveles endógenos de mRNAs de *TPK1*, *TPK2* y *TPK3* en las cepas WT BY4741, *opi1*Δ, *ino2*Δ, *ino4*Δ, *scs2*Δ y *dgk1*Δ cuantificados por qRT-PCR y normalizados con el valor del mRNA de *TUB1*. Las células fueron crecidas hasta DO_{600} 3.5 en medio mínimo con glucosa, suplementado con 22 uM de I para *ino2*Δ e *ino4*Δ. Los resultados se expresan como el promedio \pm SD de triplicados dentro de un experimento representativo. El nivel de mRNA de cada subunidad en la cepa WT se definió como 1. * $p < 0.05$.

Otra categoría de GO que muestra un enriquecimiento significativo es la de metabolismo del fósforo (Pi), que incluye entre otros, a los genes *PHO80*, *PHO81*, *PHO84*, *PHO85* y *PHO87*. Se ha visto que el complejo conformado por las proteínas regulatorias Pho80, Pho81 y la quinasa de ciclinas Pho85 regula la respuesta a la limitación de fósforo (Huang et al., 2007). Al igual que inositol y colina, la presencia de alto fósforo en el medio de crecimiento (KH_2PO_4 7.35 mM) incrementa la actividad de los promotores, comparado con bajas concentraciones de fósforo (KH_2PO_4 0.15 mM) (Figura 3.6 B). De esta forma, la actividad de los promotores es baja cuando el fósforo es limitante. El efecto del fósforo podría estar asociado a su rol regulatorio en el metabolismo del inositol y a la generación de

polifosfatos de inositol, que se sabe que son reguladores de la expresión génica en vías de detección de fosfato (Lee et al., 2008). A su vez, se ha reportado la coordinación entre la biosíntesis de fosfolípidos y la utilización del fosfato a través de las proteínas Ino2/4 y Pho2/4 con dominios bHLH (He, Swaminathan, & Lopes, 2012). De esta forma, la respuesta transcripcional de los promotores de las subunidades de PKA a la presencia de inositol, colina y también Pi, sugiere una posible regulación cruzada entre estas vías.

La represión de genes que contienen secuencias UAS_{INO} es considerada un mecanismo para sintetizar preferencialmente grandes cantidades de PI por inhibición de la actividad de la sintasa de fosfatidilserina (PS) (Kelley et al., 1988). Esto a su vez, conduce a la fosforilación de PI y a la formación de fosfoinosítidos. La ruptura de PI(4,5)P₂ da lugar a un grupo de polifosfatos de inositol que controlan la expresión génica (Banfic, Bedalov, York, & Visnjic, 2013; Galdieri, Chang, Mehrotra, & Vancura, 2013). Varios genes incluidos en la vía de biosíntesis de polifosfatos de inositol han sido identificados en el análisis de R-SGA, indicando la posible importancia de los fosfoinosítidos en la regulación de la actividad de los promotores de PKA. La hidrólisis de PI(4,5)P₂ por Plc1 produce dos segundos mensajeros muy importantes en eucariotas: DAG e IP3 (Carman & Han, 2011; Divecha & Irvine, 1995). Plc1 junto a 4 quinasas de polifosfatos de inositol, Ipk2/Arg82, Ipk1, Kcs1 y Vip1 constituyen una vía de señalización nuclear que afecta el control transcripcional (Odom, Stahlberg, Wentz, & York, 2000), la exportación nuclear (Monserate & York, 2010), la recombinación homóloga del DNA, la muerte celular y la longitud de los telómeros (Banfic et al., 2013). Todos estos genes han sido identificados en el análisis de R-SGA como reguladores de los promotores de las subunidades de PKA (Tablas 10, 11, 12 y 13 del Apéndice). En este momento estamos investigando el impacto de esta vía de señalización de lípidos en la regulación de la expresión de las subunidades de PKA.

La síntesis de fosfolípidos es regulada por el control de la expresión de enzimas o por modulación de las actividades catalíticas de éstas. Entre las proteínas quinasas que ejercen esta modulación sobre proteínas catalíticas y regulatorias de la síntesis de fosfolípidos se encuentran la proteína quinasa A (PKA). Algunas de las enzimas que intervienen en la síntesis de fosfolípidos, que son reguladas por fosforilación por PKA, incluyen a sintasa de PS, sintasa de CTP, quinasa de colina y fosfatasa de PA. El represor transcripcional Opi1 es también regulado por fosforilación por PKA. Por lo tanto, estas evidencias indicarían que las enzimas clave del metabolismo de lípidos son reguladas por

PKA y que la expresión de PKA es regulada por el metabolismo de lípidos, por algún mecanismo que queda por dilucidar. En resumen, los resultados indican el posible funcionamiento de un *loop* regulatorio entre la vía del metabolismo de lípidos y la expresión de las subunidades de PKA.

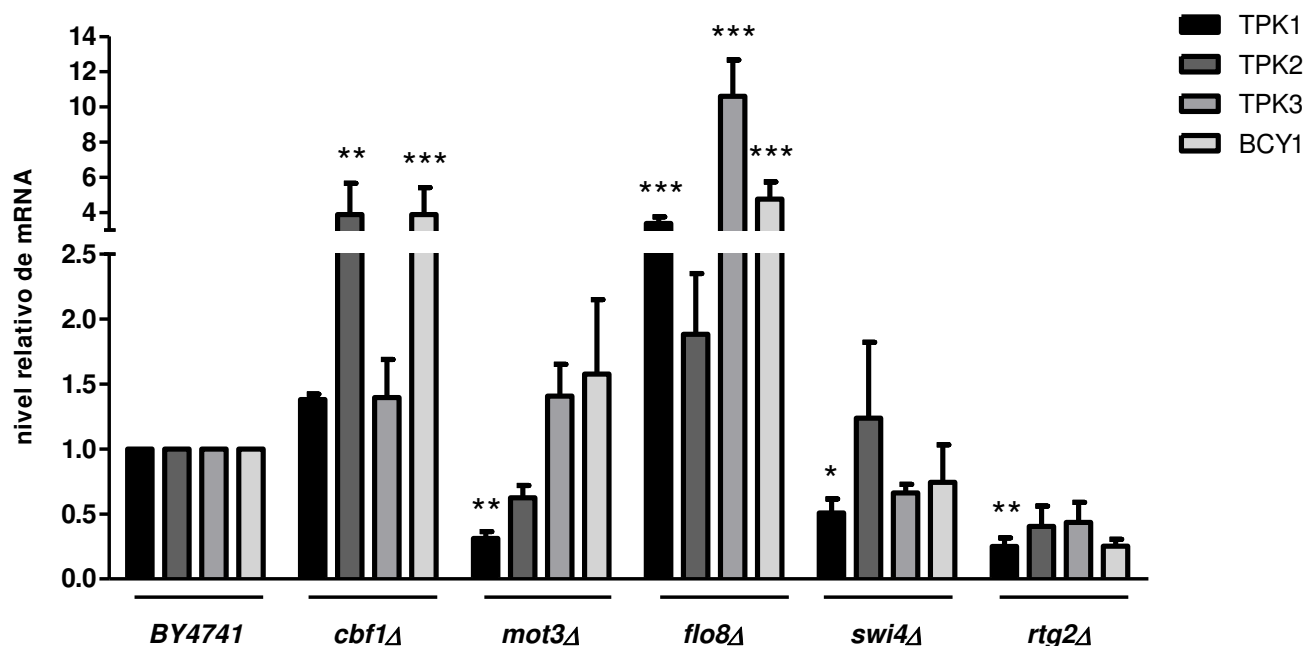


Figura 3.8. Los factores de transcripción Cbf1, Mot3, Flo8, Swi4 y Rtg2 regulan los niveles de mRNA de TPK1, TPK2, TPK3 y BCY1.

Niveles endógenos de mRNAs de *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* y *BCY1* en las cepas WT BY4741, *cbf1*Δ, *mot3*Δ, *flo8*Δ, *swi4*Δ y *rtg2*Δ cuantificados por qRT-PCR y normalizados con el valor del mRNA de *TUB1*. Las células fueron crecidas hasta DO_{600} 3.5 en medio mínimo con glucosa. Los resultados se expresan como el promedio \pm SD de triplicados dentro de un experimento representativo. El nivel de mRNA de cada subunidad en la cepa WT se definió como 1. * $p < 0.05$.

Finalmente se evaluó mediante la abundancia de mRNA en cepas mutantes simples de delección, a un grupo de proteínas con función reguladora de la transcripción (categoría que se espera que surja en análisis de R-SGA), como los factores de transcripción Swi4, Cbf1, Rtg3, Mot3 y Flo8. En la Figura 3.8 se observa el efecto diferencial que produce la ausencia de cada regulador transcripcional sobre los promotores de las subunidades de PKA. Se resalta el caso del factor de transcripción Flo8, ya que ha sido identificado como regulador de los genes *TPK3* y *BCY1* en el análisis de R-SGA, a pesar de que la

colección de mutantes de delección tiene fondo genético BY4741. Se ha indicado que las cepas derivadas de S288c, como BY4741, son incompetentes para el crecimiento filamentosos debido a una mutación en el gen *FLO8* (mutación *flo8-1*) que produce una versión modificada del factor de transcripción que altera la expresión del gen *FLO11* (Liu, Styles, & Fink, 1996). Los resultados del análisis de R-SGA sugieren un rol para la versión truncada de la proteína, que fue confirmado por la medición de los niveles de mRNA en la cepa *flo8Δ* (Figura 3.8). Esta mutante de delección muestra cambios importantes en los niveles de mRNA de *TPKs* y *BCY1*, con los mayores efectos en *TPK3* y *BCY1*. Estos resultados concuerdan con trabajos anteriores en los que mediante estudios de *microarray* detectaron cambios en los niveles de mRNA de *TPKs* y *BCY1* en la cepa *flo8Δ* (Hu, Killion, & Iyer, 2007). Asimismo, se ha reportado recientemente que la región C-terminal de Flo8 contiene un dominio de activación transcripcional que tiene un rol en el control de la transcripción (Kim, Lee, Kang, Oh, & Kim, 2014).

Categorías de GO relacionadas con mitocondria, vacuola, metabolismo de aminoácidos, transporte y esporulación también fueron identificadas como categorías de genes que afectan la expresión de las subunidades de PKA (Figura 3.5 y Tabla 3.1). La vía de cAMP/PKA regula la función mitocondrial, una actividad desregulada de PKA conduce a la producción de mitocondrias productoras de ROS, y a la muerte celular por apoptosis (Aun, Tamm, & Sedman, 2013; Feliciello, Gottesman, & Avvedimento, 2005; Galello, Moreno, & Rossi, 2014). Otros procesos como la progresión de la esporulación, son regulados por una red interconectada de señalización que incluye a la vía Ras/cAMP (Honigberg & Purnapatre, 2003). Si bien el mecanismo regulatorio de la esporulación y el funcionamiento mitocondrial es claro, e involucra la actividad de PKA, aún no se entiende cómo una disfunción de estos procesos conduciría a una expresión desregulada de las subunidades PKA.

En el Capítulo 1 de esta Tesis se presentaron evidencias que indican un incremento en la actividad de los promotores *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* y *BCY1* en fase de crecimiento estacionaria, respecto a exponencial; y en el Capítulo 2 se mostró cómo los promotores se inducen en el crecimiento en presencia de fuentes de carbono no fermentables. De esta forma, durante el metabolismo respiratorio, cuando es necesario un correcto funcionamiento mitocondrial, ocurre la activación de los promotores de PKA. La actividad de los promotores se ve desregulada en las mutantes que producen una mitocondria defectiva, según lo indican los resultados del análisis de R-SGA. Entonces se propone una

regulación recíproca en la que PKA juega un papel fisiológico en la coordinación de la función respiratoria; y el metabolismo respiratorio regula los promotores de PKA.

Otra categoría de GO interesante que surge del análisis de R-SGA es la regulación vacuolar y la acidificación protónica (Figura 3.5 y Tabla 3.1). Se identificaron varias mutantes de delección de genes que codifican para subunidades de la ATPasa de vacuola (Vma2, Vma4, Vma5, Vma7, Vma13, Vma21 y Vma22). La ATPasa-V es una bomba de protones que regula el pH citosólico por bombeo de protones en la vacuola celular. Estudios recientes sugieren el requerimiento de la ATPasa-V para la estimulación de PKA mediada por glucosa, y que el pH citosólico serviría como segundo mensajero en esta vía (Dechant & Peter). Frente a la estimulación de glucosa, se requiere la actividad de la ATPasa-V transduciendo, al menos en parte, la señal de pH para activar completamente a la PKA. Dado que la PKA autorregula la actividad de sus promotores, un malfuncionamiento de la ATPasa-V podría impactar en la actividad de los promotores, por alteración de la actividad quinasa.

En conjunto, los resultados del análisis de R-SGA permitieron la identificación de factores y reguladores de la transcripción, así como de metabolitos como el inositol, la colina y el fosfato, como nuevas señales río arriba que regulan la transcripción de los genes de las subunidades de PKA. Se sugiere también el funcionamiento de un *loop* de regulación en el que PKA controla por fosforilación enzimas involucradas en diversas vías metabólicas, que a su vez controlan el nivel de expresión de las subunidades de PKA, por mecanismos que merecen ser estudiados en profundidad.

4. CONCLUSIONES

La regulación de la expresión de genes eucarióticos es controlada en múltiples niveles, distinguiéndose cada uno por diferentes arreglos espaciotemporales. La combinación de mecanismos regulatorios en varios niveles es central para un patrón de expresión preciso, que es a su vez esencial para el funcionamiento de procesos biológicos críticos. Las proteínas quinasas son sensibles a las perturbaciones ambientales y tienen diferentes funciones en distintas condiciones de crecimiento. Una quinasa tiene varios sustratos y la especificidad de la señal es clave para lograr con exactitud una respuesta apropiada a un estímulo dado. En la vía de cAMP/PKA, la regulación de la especificidad de la señal se logra en distintos niveles, siendo uno la regulación transcripcional de las subunidades de PKA. Los resultados de este capítulo muestran una red integrada de vías comunes e individuales de reguladores de cada subunidad de PKA, apoyando el rol clave de la regulación de la expresión para lograr la especificidad de la señalización por cAMP/PKA en la detección y respuesta de estímulos ambientales.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez-Vasquez, F., Sims, K. J., Cowart, L. A., Okamoto, Y., Voit, E. O., & Hannun, Y. A. (2005). Simulation and validation of modelled sphingolipid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, *433*(7024), 425–30. doi:10.1038/nature03232
- Aun, A., Tamm, T., & Sedman, J. (2013). Dysfunctional mitochondria modulate cAMP-PKA signaling and filamentous and invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *193*(2), 467–81. doi:10.1534/genetics.112.147389
- Banfic, H., Bedalov, A., York, J. D., & Visnjic, D. (2013). Inositol pyrophosphates modulate S phase progression after pheromone-induced arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(3), 1717–25. doi:10.1074/jbc.M112.412288
- Carman, G. M., & Han, G.-S. (2011). Regulation of phospholipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Biochemistry*, *80*, 859–83. doi:10.1146/annurev-biochem-060409-092229
- Carman, G. M., & Henry, S. A. (2007). Phosphatidic acid plays a central role in the transcriptional regulation of glycerophospholipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(52), 37293–7. doi:10.1074/jbc.R700038200
- Dechant, R., & Peter, M. The N-terminal domain of the V-ATPase subunit “a” is regulated by pH in vitro and in vivo. *Channels (Austin, Tex.)*, *5*(1), 4–8. doi:10.1038/emboj.2010.138
- Divecha, N., & Irvine, R. F. (1995). Phospholipid signaling. *Cell*, *80*(2), 269–78. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7834746>
- Feliciello, A., Gottesman, M. E., & Avvedimento, E. V. (2005). cAMP-PKA signaling to the mitochondria: protein scaffolds, mRNA and phosphatases. *Cellular Signalling*, *17*(3), 279–87. doi:10.1016/j.cellsig.2004.09.009
- Galdieri, L., Chang, J., Mehrotra, S., & Vancura, A. (2013). Yeast phospholipase C is required for normal acetyl-CoA homeostasis and global histone acetylation. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(39), 27986–98. doi:10.1074/jbc.M113.492348
- Galello, F., Moreno, S., & Rossi, S. (2014). Interacting proteins of protein kinase A regulatory subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Proteomics*, *109*, 261–275. doi:10.1016/j.jprot.2014.07.008
- Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., ... Johnston, M. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, *418*(6896), 387–91. doi:10.1038/nature00935

- Goldstein, A. L., & McCusker, J. H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, *15*(14), 1541–53. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199910)15:14<1541::AID-YEA476>3.0.CO;2-K
- Graves, J. A., & Henry, S. A. (2000). Regulation of the yeast *INO1* gene. The products of the *INO2*, *INO4* and *OPI1* regulatory genes are not required for repression in response to inositol. *Genetics*, *154*(4), 1485–95. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1461034&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- He, Y., Swaminathan, A., & Lopes, J. M. (2012). Transcription regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *PHO5* gene by the Ino2p and Ino4p basic helix-loop-helix proteins. *Molecular Microbiology*, *83*(2), 395–407. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07941.x
- Henry, S. A., Kohlwein, S. D., & Carman, G. M. (2012). Metabolism and regulation of glycerolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *190*(2), 317–49. doi:10.1534/genetics.111.130286
- Honigberg, S. M., & Purnapatre, K. (2003). Signal pathway integration in the switch from the mitotic cell cycle to meiosis in yeast. *Journal of Cell Science*, *116*(Pt 11), 2137–47. doi:10.1242/jcs.00460
- Hu, Z., Killion, P. J., & Iyer, V. R. (2007). Genetic reconstruction of a functional transcriptional regulatory network. *Nature Genetics*, *39*(5), 683–7. doi:10.1038/ng2012
- Huang, K., Ferrin-O’Connell, I., Zhang, W., Leonard, G. A., O’Shea, E. K., & Quioco, F. A. (2007). Structure of the Pho85-Pho80 CDK-cyclin complex of the phosphate-responsive signal transduction pathway. *Molecular Cell*, *28*(4), 614–23. doi:10.1016/j.molcel.2007.09.013
- Jani, N. M., & Lopes, J. M. (2008). Transcription regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *PIS1* gene by inositol and the pleiotropic regulator, Ume6p. *Molecular Microbiology*, *70*(6), 1529–39. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06506.x
- Jesch, S. A., Liu, P., Zhao, X., Wells, M. T., & Henry, S. A. (2006). Multiple endoplasmic reticulum-to-nucleus signaling pathways coordinate phospholipid metabolism with gene expression by distinct mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(33), 24070–83. doi:10.1074/jbc.M604541200
- Kainth, P., & Andrews, B. Illuminating transcription pathways using fluorescent reporter genes and yeast functional genomics. *Transcription*, *1*(2), 76–80. doi:10.4161/trns.1.2.12328
- Kainth, P., Sassi, H. E., Peña-Castillo, L., Chua, G., Hughes, T. R., & Andrews, B. (2009). Comprehensive genetic analysis of transcription factor pathways using a dual reporter gene system in budding yeast. *Methods (San Diego, Calif.)*, *48*(3), 258–64. doi:10.1016/j.ymeth.2009.02.015

- Kelley, M. J., Bailis, A. M., Henry, S. A., & Carman, G. M. (1988). Regulation of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by inositol. Inositol is an inhibitor of phosphatidylserine synthase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(34), 18078–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2848023>
- Kim, H. Y., Lee, S. B., Kang, H. S., Oh, G. T., & Kim, T. (2014). Two distinct domains of Flo8 activator mediates its role in transcriptional activation and the physical interaction with Mss11. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 449(2), 202–7. doi:10.1016/j.bbrc.2014.04.161
- Lee, Y.-S., Huang, K., Quioco, F. A., & O’Shea, E. K. (2008). Molecular basis of cyclin-CDK-CKI regulation by reversible binding of an inositol pyrophosphate. *Nature Chemical Biology*, 4(1), 25–32. doi:10.1038/nchembio.2007.52
- Lemmon, M. A. (2003). Phosphoinositide recognition domains. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 4(4), 201–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12694559>
- Liu, H., Styles, C. A., & Fink, G. R. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in FLO8, a gene required for filamentous growth. *Genetics*, 144(3), 967–78. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1207636&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Loewen, C. J. R., Gaspar, M. L., Jesch, S. A., Delon, C., Ktistakis, N. T., Henry, S. A., & Levine, T. P. (2004). Phospholipid metabolism regulated by a transcription factor sensing phosphatidic acid. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5677), 1644–7. doi:10.1126/science.1096083
- Monserate, J. P., & York, J. D. (2010). Inositol phosphate synthesis and the nuclear processes they affect. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(3), 365–73. doi:10.1016/j.ceb.2010.03.006
- Murray, M., & Greenberg, M. L. (1997). Regulation of inositol monophosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 25(3), 541–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9302016>
- Odom, A. R., Stahlberg, A., Wenthe, S. R., & York, J. D. (2000). A role for nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in transcriptional control. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5460), 2026–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10720331>
- Odorizzi, G., Babst, M., & Emr, S. D. (2000). Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(5), 229–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10782093>
- Oshiro, J., Rangaswamy, S., Chen, X., Han, G. S., Quinn, J. E., & Carman, G. M. (2000). Regulation of the DPP1-encoded diacylglycerol pyrophosphate (DGPP) phosphatase by inositol and growth phase. Inhibition of DGPP phosphatase activity by CDP-diacylglyceron and activation of

phosphatidylserine synthase activity by DGPP. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(52), 40887–96. doi:10.1074/jbc.M008144200

Rupwate, S. D., Rupwate, P. S., & Rajasekharan, R. (2012). Regulation of lipid biosynthesis by phosphatidylinositol-specific phospholipase C through the transcriptional repression of upstream activating sequence inositol containing genes. *FEBS Letters*, 586(10), 1555–60. doi:10.1016/j.febslet.2012.04.022

Santiago, T. C., & Mamoun, C. Ben. (2003). Genome expression analysis in yeast reveals novel transcriptional regulation by inositol and choline and new regulatory functions for Opi1p, Ino2p, and Ino4p. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38723–30. doi:10.1074/jbc.M303008200

Sikorski, R. S., & Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122(1), 19–27. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1203683&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Tong, A. H., Evangelista, M., Parsons, A. B., Xu, H., Bader, G. D., Pagé, N., ... Boone, C. (2001). Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5550), 2364–8. doi:10.1126/science.1065810

Tong, A. H. Y., & Boone, C. (2006). Synthetic genetic array analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 313, 171–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16118434>

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

El objetivo general de esta Tesis fue evaluar los procesos relacionados con la transcripción de los genes de las subunidades de PKA en *Saccharomyces cerevisiae* como un nivel adicional de regulación de la vía de señalización por esta enzima. Se evaluaron las actividades de los promotores y las abundancias de los mRNAs frente a distintas condiciones de crecimiento, en las que las células deben adaptar su fisiología de manera diferente para poder proliferar. En el Capítulo 1 se ha descrito en primer lugar que la PKA autorregula la actividad de sus promotores de forma negativa, y además en forma dependiente de la isoforma de Tpk. Además se estableció que el único promotor que responde al estrés térmico con una inducción transcripcional es *TPK1*, a través de la vía de señalización de la quinasa Rim15, que activa a los factores de transcripción Gis1, Msn2/4 y Sok2. En el Capítulo 2 se vio que la presencia de fuentes de carbono no fermentables promueve un aumento en la transcripción de las subunidades de PKA, y que distintas vías de señalización operan para lograr este efecto siendo la de Snf1/Cat8-Sip4 común entre los promotores de *TPKs*. Asimismo, integrando resultados de ambos Capítulos y teniendo en cuenta varias evidencias publicadas, se propuso que el *loop* autorregulatorio de PKA sobre la transcripción de sus subunidades (al menos de *TPK1*) podría ser mediado por la vía de Snf1/Mig1 en glucosa. En el Capítulo 3 se estudiaron a gran escala todas las posibles señales regulatorias y vías metabólicas que podrían afectar las actividades de los promotores de PKA. De todas las vías surgidas en el análisis, se profundizó en el estudio de dos muy interrelacionadas, el metabolismo de lípidos y el metabolismo del fosfato. En base a los resultados obtenidos y a otras evidencias ya publicadas se propuso que en la regulación de la transcripción de la proteína quinasa A podrían operar mecanismos autorregulatorios, por los cuales la quinasa afecta sustratos en una vía que a su vez impactan en los niveles de actividad de los promotores de PKA.

Los resultados alcanzados en esta Tesis permitieron el surgimiento de varias líneas de investigación con varios interrogantes, de los cuales actualmente algunos se están intentando responder, y otros que se planea resolver en un futuro. Los principales se detallan a continuación.

En primer lugar es llamativo que frente a las distintas condiciones de estrés a las que fueron expuestas (nutricional, térmico), las células respondan con un incremento en la actividad de los

promotores de PKA y en algunos casos, un aumento en los niveles de abundancia de mRNAs, cuando es sabido que es necesaria la disminución de la actividad de la enzima para dar una respuesta adaptativa. Se propone que los mRNAs están disponibles para que, una vez superado el estrés, las células puedan rápidamente sintetizar las proteínas Tpk y Bcy1, que se necesitan para proliferar. Entonces, ¿qué pasa con estos mRNAs? En particular, dada la disparidad entre el nivel de actividad del promotor *BCY1* y la abundancia de su mRNA, ¿la estabilidad de éste es elevada? ¿Tienen los 4 mRNAs la misma estabilidad en condiciones de estrés que en condiciones normales de crecimiento? Varios estudios a nivel genómico indicaron valores muy variables de las vidas medias de los mRNAs de las subunidades de PKA (Geisberg, Moqtaderi, Fan, Ozsolak, & Struhl, 2014; Grigull, Mnaimneh, Pootoolal, Robinson, & Hughes, 2004; Miller et al., 2011; Wang, Cherry, Botstein, & Li, 2002). Nuestros experimentos preliminares indicaron los siguientes valores en condiciones normales de crecimiento con glucosa: para *TPK1*, 9 min, *TPK2*, 5 min, *BCY1*, 4 min y *TPK3*, 2.5 min, semejantes a los obtenidos por (Miller et al., 2011).

Los objetivos próximos planteados abordarán el estudio de estabilidad de los mRNAs de las subunidades de PKA, en condiciones normales de crecimiento y en estrés térmico; y además el análisis de la distribución o localización subcelular de los mismos, dependiente del estrés, que pudiera también estar contribuyendo a su regulación.

- Se investigarán las estabildades de los mRNAs de *TPKs* y *BCY1* en condiciones normales de crecimiento y de estrés térmico y nutricional, mediante el empleo de la cepa mutante termosensible *rpb1-1 ts* de la subunidad mayor de la RNA pol II, buscando evaluar cómo se altera la especificidad de la señalización por la vía de PKA.

- A partir de resultados preliminares y datos publicados, que indican diferencias en las estabildades de los mRNAs ¿cómo se determinan las tasas de decaimiento? ¿presentan elementos particulares que contribuyan a su estabilidad o a su degradación? La región 5'UTR del mRNA se encuentra río arriba del ORF. En algunos casos contiene elementos cis regulatorios, cuya contribución relativa en la estabilidad del mRNA aún no se ha estudiado. Se propone que mediante la regulación de la traducción del mRNA, podrían afectar su decaimiento (Haimovich, Choder, Singer, & Trcek). La región 3'UTR contiene elementos cis regulatorios asociados con los procesos de estabilidad y de localización subcelular del mRNA (Shalgi, Lapidot, Shamir, & Pilpel, 2005). Entre éstos se encuentran Elementos ricos en AU (ARE), elementos ricos en GU, elementos de respuesta a PUF, sitios de unión a

mRNA y cola poli A. Un análisis bioinformático no mostró ningún elemento regulatorio clásico en la región de aproximadamente 200 bases río abajo del codón de terminación, definida como 3'UTR en cada mRNA por Park, Morris, Battenhouse, & Iyer, (2014). De todas formas se analizará la posible participación de estos extremos en la determinación de las vidas medias de los mRNAs de *TPKs* y *BCY1*.

- ¿Los promotores de los genes de PKA tienen algún rol en la estabilidad de sus mRNAs? Se ha indicado que algunos promotores presentan secuencias cis regulatorias que pueden afectar los eventos de degradación del mRNA, por reclutamiento de proteínas que son depositadas cotranscripcionalmente en los mRNAs y una vez en el citoplasma intervendrían en el decaimiento de los mismos (Trcek, Sato, Singer, & Maquat, 2013). En otro trabajo, se determinó que dos sitios RapBS (elemento de unión a Rap1) en la región UAS, determinan la tasa de decaimiento de los transcritos. Rap1 es un activador transcripcional que en este trabajo recibe la denominación de “sintedegradasa” porque su reclutamiento a los promotores estimula (o reprime) tanto la síntesis como la degradación del mRNA (Bregman et al., 2011). Un análisis bioinformático de las secuencias de los ORFs +/- 1kb de las subunidades de PKA, en busca de elementos cis regulatorios en las regiones promotoras y en los 3'UTR indicó la presencia de elementos RapBS en los promotores *TPK1* y *BCY1*, se planea estudiar la intervención de estos elementos en los promotores en los procesos de decaimiento de estos mRNAs mediante el empleo de construcciones reporteras mutantes.

- ¿Cuáles son los mecanismos citoplasmáticos de degradación de los mRNAs? se han descrito dos mecanismos principales de degradación citoplasmática del mRNA. La mayor parte de los mRNAs son degradados por exonucleasas que actúan a ambos extremos de la molécula. El decaimiento por exonucleasas comienza con el acortamiento de la cola poli A (Tucker et al., 2001), por la acción de varias proteínas entre las que se encuentran algunas integrantes del complejo de transcripción CCR4-NOT. Las ribonucleoproteínas del mRNA (mRNP) determinan qué deadenilasa actuará. Luego actúan las proteínas de *decapping*, Dcp2 o Nudt16, permitiendo entonces la acción de uno de dos complejos que degradarán el cuerpo del mRNA. En el sentido 5' a 3', actúa la exorribonucleasa Xrn1 en el citoplasma, (y Rat1 en el núcleo); y en el sentido 3' a 5', las exonucleasas asociadas al complejo del exosoma. Esta última vía puede ocurrir sin el paso previo de *decapping* (Schoenberg & Maquat, 2012). Para evaluar qué mecanismo está involucrado en el proceso de decaimiento de los mRNAs de *TPKs* y *BCY1*, se emplearán las cepas *ski7Δ* y *xrn1Δ*, comprometiendo la degradación 3' a 5' por el exosoma, y 5' a 3' por

Xrn1 respectivamente (Bregman et al., 2011). Ski7 es un adaptador que une al complejo SKI con el exosoma y es requerido para la actividad de este último (Araki et al., 2001).

- ¿Es la localización de los mRNAs diferente en condiciones normales de crecimiento que en condiciones de estrés? Si es así, ¿es esta localización diferencial un nivel más de regulación de la especificidad de la señal de la vía cAMP-PKA? En un intento de comenzar a resolver este interrogante, se planea identificar distintas proteínas de unión a los mRNAs, mediante la purificación y el análisis de los complejos ribonucleoproteicos. Como se ha mencionado, la región 3'UTR puede determinar la localización de los mRNAs, entonces resulta interesante investigar la presencia de elementos que puedan asociarse a proteínas con distinta localización subcelular en condiciones normales de crecimiento o de estrés, como por ejemplo, en gránulos citoplasmáticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Araki, Y., Takahashi, S., Kobayashi, T., Kajiho, H., Hoshino, S., & Katada, T. (2001). Ski7p G protein interacts with the exosome and the Ski complex for 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *The EMBO Journal*, *20*(17), 4684–93. doi:10.1093/emboj/20.17.4684
- Bregman, A., Avraham-Kelbert, M., Barkai, O., Duek, L., Guterman, A., & Choder, M. (2011). Promoter elements regulate cytoplasmic mRNA decay. *Cell*, *147*(7), 1473–83. doi:10.1016/j.cell.2011.12.005
- Geisberg, J. V, Moqtaderi, Z., Fan, X., Ozsolak, F., & Struhl, K. (2014). Global analysis of mRNA isoform half-lives reveals stabilizing and destabilizing elements in yeast. *Cell*, *156*(4), 812–24. doi:10.1016/j.cell.2013.12.026
- Grigull, J., Mnaimneh, S., Pootoolal, J., Robinson, M. D., & Hughes, T. R. (2004). Genome-wide analysis of mRNA stability using transcription inhibitors and microarrays reveals posttranscriptional control of ribosome biogenesis factors. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(12), 5534–47. doi:10.1128/MCB.24.12.5534-5547.2004
- Haimovich, G., Choder, M., Singer, R. H., & Trcek, T. The fate of the messenger is pre-determined: a new model for regulation of gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1829*(6-7), 643–53. doi:10.1016/j.bbagr.2013.01.004
- Miller, C., Schwalb, B., Maier, K., Schulz, D., Dümcke, S., Zacher, B., ... Cramer, P. (2011). Dynamic transcriptome analysis measures rates of mRNA synthesis and decay in yeast. *Molecular Systems Biology*, *7*, 458. doi:10.1038/msb.2010.112
- Park, D., Morris, A. R., Battenhouse, A., & Iyer, V. R. (2014). Simultaneous mapping of transcript ends at single-nucleotide resolution and identification of widespread promoter-associated non-coding RNA governed by TATA elements. *Nucleic Acids Research*, *42*(6), 3736–49. doi:10.1093/nar/gkt1366
- Schoenberg, D. R., & Maquat, L. E. (2012). Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nature Reviews. Genetics*, *13*(4), 246–59. doi:10.1038/nrg3160
- Shalgi, R., Lapidot, M., Shamir, R., & Pilpel, Y. (2005). A catalog of stability-associated sequence elements in 3' UTRs of yeast mRNAs. *Genome Biology*, *6*(10), R86. doi:10.1186/gb-2005-6-10-r86
- Trcek, T., Sato, H., Singer, R. H., & Maquat, L. E. (2013). Temporal and spatial characterization of nonsense-mediated mRNA decay. *Genes & Development*, *27*(5), 541–51. doi:10.1101/gad.209635.112
- Tucker, M., Valencia-Sanchez, M. A., Staples, R. R., Chen, J., Denis, C. L., & Parker, R. (2001). The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic

mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 104(3), 377–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11239395>

Wang, W., Cherry, J. M., Botstein, D., & Li, H. (2002). A systematic approach to reconstructing transcription networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26), 16893–8. doi:10.1073/pnas.252638199

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas de *S.cerevisiae* empleadas en esta Tesis se indican en la Tabla 1.

Cepa	Genotipo	Referencia
W303 1A (WT)	MAT a, suc2, ade2, can1, his3, leu2, trp1, ura3	(Wallis, Chrebet, Brodsky, Rolfe, & Rothstein, 1989)
S331 (TPK1tpk2Δtpk3Δ)	(W303 1A) Mat a, tpk2::KanR, tpk3::KanR	(Bolte, 2003)
S332 (TPK2tpk1Δtpk3Δ)	(W303 1A) Mat a, tpk1::KanR, tpk3::KanR	(Bolte, 2003)
S330 (TPK3tpk1Δtpk2Δ)	(W303 1A) Mat a, tpk1::KanR, tpk2::KanR	(Bolte, 2003)
JT20454 (msn2/4ΔtpksΔ)	(W303 1A) tpk1::ade8 tpk2::HIS3 tpk3::TRP1 msn2::LEU2 msn4::HIS3	Thevelein, J.
msn2/4Δ	(W303 1A) msn2::LEU2 msn4::HIS3	(Estruch & Carlson, 1993)
msn2/4Δyak1Δ	(W303 1A) msn2::HIS3 msn4::TRP1 yak1::KanMX6	(Lee, Cho, Joo, & Hahn, 2008)
YHN1172	(W303 1A) MATa msn2::loxP msn4::kanMX PtetO2-HSF1, adhP-tetR-VP16, natMX4 adhP-tetR'-SSN6::LEU2	(Ferguson et al., 2005)
BY4741 (WT)	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0	EUROSCARF
rim15Δ	(BY4741) rim15::KanMX4	EUROSCARF
gis1Δ	(BY4741) gis1::KanMX4	EUROSCARF
yak1Δ	(BY4741) yak1::KanMX4	EUROSCARF
sok2Δ	(BY4741) sok2::KanMX4	EUROSCARF
mig1Δ	(BY4741) mig1::KanMX4	EUROSCARF
mig2Δ	(BY4741) mig2::KanMX4	EUROSCARF
mig3Δ	(BY4741) mig3::KanMX4	EUROSCARF
hvk2Δ	(BY4741) hvk2::KanMX4	EUROSCARF
snf1Δ	(BY4741) snf1::KanMX4	EUROSCARF
cat8Δ	(BY4741) cat8::KanMX4	EUROSCARF
sip4Δ	(BY4741) sip4::KanMX4	EUROSCARF
rgt1Δ	(BY4741) rgt1::KanMX4	EUROSCARF
ino2Δ	(BY4741) ino2::KanMX4	EUROSCARF
ino4Δ	(BY4741) ino4::KanMX4	EUROSCARF
opi1Δ	(BY4741) opi1::KanMX4	EUROSCARF
scs2Δ	(BY4741) scs2::KanMX4	EUROSCARF
dgk1Δ	(BY4741) dgk1::KanMX4	EUROSCARF
cbf1Δ	(BY4741) cbf1::KanMX4	EUROSCARF
flo8Δ	(BY4741) flo8::KanMX4	EUROSCARF
swi4Δ	(BY4741) swi4::KanMX4	EUROSCARF

mot3Δ	(BY4741) mot3::KanMX4	EUROSCARF
rtg2Δ	(BY4741) rtg2::KanMX4	EUROSCARF
Msn2-TAP	(BY4741) Msn2-TAP::HIS3MX	Open Biosystems
Gis1-TAP	(BY4741) Gis1-TAP::HIS3MX	Open Biosystems
Sok2-TAP	(BY4741) Sok2-TAP::HIS3MX	Open Biosystems
Rpb1-TAP	(BY4741) Rpb1-TAP::HIS3MX	Open Biosystems
SP1	MAT α, his3, leu2, ura3, trp1, ade8	(Toda, Cameron, Sass, Zoller, & Wigler, 1987)
S18-1D (tpk1 ^{w1} BCY1)	(SP1) tpk1w1 tpk2::HIS3, tpk3::TRP1	(Nikawa, Cameron, Toda, Ferguson, & Wigler, 1987)
133 (TPK1bcy1Δ)	(SP1) tpk2::HIS3, tpk3::TRP1, bcy1::LEU2	(Cameron, Levin, Zoller, & Wigler, 1988)
BY4256	MATα can1Δ::STE2pr-his5 lyp1Δ HO::RPL39pr-tdTomato::hphMX	(Kainth et al., 2009)

Tabla 1: genotipos de las cepas empleadas en este trabajo.

2. Medios y condiciones de crecimiento

Para los experimentos en glucosa, las cepas de levaduras fueron crecidas en medio mínimo sintético (Sherman et al., 1982) conteniendo 0.67% de base nitrogenada sin aminoácidos y 2% de glucosa más los aditivos necesarios para completar los requerimientos auxotróficos y mantener la selección de los plásmidos (SD), y suplementación con 0.15 mg/ml de adenina para las cepas WT W303-1A y mutantes derivadas de ésta. El pH fue ajustado a 6.5 con KOH 4 M. El medio sólido contiene ágar 2%. Los cultivos fueron crecidos hasta una DO_{600} 3.5 a 30°C ($\approx 0.5 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ células/ml). Para los experimentos de estrés térmico (Capítulo 1) las células fueron crecidas a 25°C hasta DO_{600} 3.5, el cultivo se dividió en dos, e instantáneamente se resuspendieron los *pellets* centrifugados en igual volumen de medios precalentados a 37°C o 25°C (control); y se incubaron con agitación a 37°C o 25°C durante los tiempos indicados de colección de muestras. Para los experimentos de estrés salino (Capítulo 1), las células fueron crecidas a 30°C hasta DO_{600} 3.5, el cultivo se dividió en dos, e instantáneamente se resuspendieron los *pellets* centrifugados en igual volumen de medios conteniendo KCl 1M o sin KCl (control); y se incubaron con agitación a 30°C durante los tiempos indicados de colección de muestras. Para los experimentos en medios con glicerol (Capítulo 2), las cepas de levaduras fueron crecidas en medios ricos conteniendo 2% bactopectona, 1% extracto de levadura y 2% glicerol (YPGli) hasta una

DO₆₀₀ 2 a 30°C. En los ensayos para determinar los efectos de inositol y colina (Capítulo 3), las células fueron crecidas exponencialmente a 30°C en medios sin inositol ni colina (Klig & Henry, 1984). Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en medios con inositol 75 µM y/o colina 1 mM. Los ensayos para analizar los efectos del fosfato se realizaron en medios con KH₂PO₄ 0.15 mM (bajo fosfato) y con KH₂PO₄ 7.35 mM (alto fosfato).

Las cepas de bacterias *E.coli* portadoras de los plásmidos fueron crecidas en medio LB-Amp, compuesto por 1% bactopectona, 0.5% extracto de levaduras, 0.5% NaCl y 100 µg/ml Ampicilina para mantener la selección de los plásmidos.

3. Plásmidos

Para la medición de las actividades de los promotores se emplearon plásmidos derivados del YEp357 (Figura 1) (Myers, Tzagoloff, Kinney, & Lusty, 1986). Los genes de fusión *TPK1-LacZ*, *TPK2-LacZ*, *TPK3-LacZ* y *BCY1-LacZ* contienen las regiones 5' regulatorias y nucleótidos de las regiones codificantes de cada gen (posiciones -800 a +10 respecto al codón ATG de iniciación en cada caso).

Los sitios de los factores de transcripción fueron mutagenizados con el kit QuickChange XL de mutagénesis sitio-dirigida en el plásmido *TPK1-LacZ*. La construcción A tiene el sitio Sok2 mutado; la C, el sitio Gis1 mutado; la construcción B-D tiene dos sitios STRE/PDS mutados, y la construcción A-B-C-D, todos los sitios mencionados anteriormente mutados. Todas las mutaciones son puntuales: la secuencia WT del sitio Sok2 (A): **TTTTTCGCGC** fue reemplazada por TTCAGTAACGC; el sitio STRE/PDS (B): **AGGGG**, por AAGAT; el sitio Gis1 (C) **AGGGAA**, por AAGATA y el segundo STRE/PDS (D) **AGGGG** por AAGATG. Los elementos de los factores de transcripción están resaltados en negro.

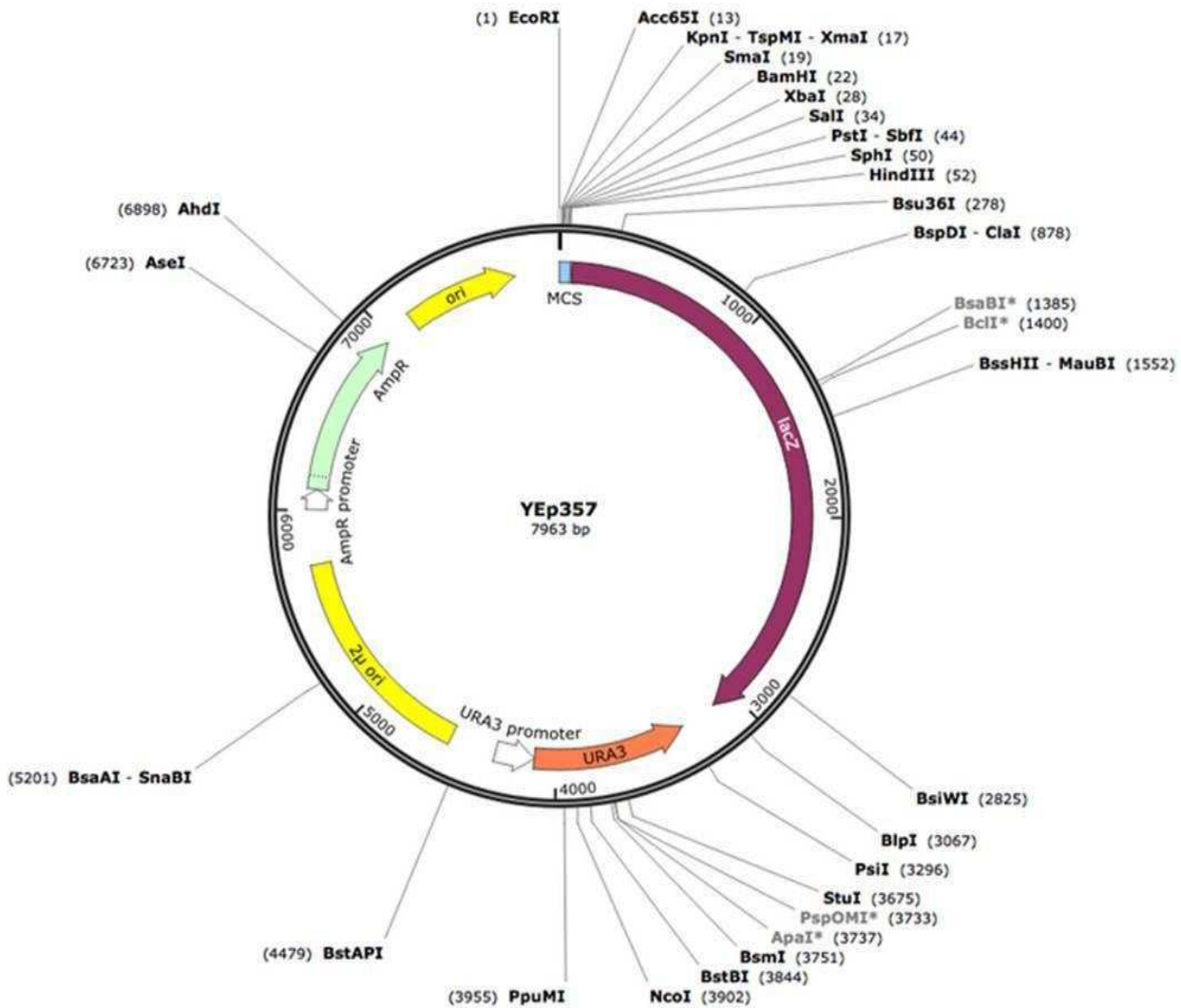


Figura 1: Mapa del plásmido YEp357.

Para los experimentos con la metodología R-SGA, se emplearon plásmidos derivados del BA1926, que a su vez es derivado del plásmido pRS315 (Figura 2) (Sikorski & Hieter, 1989). Los genes de fusión *TPK1-GFP*, *TPK2-GPF*, *TPK3-GFP* y *BCY1-GFP* contienen las mismas regiones 5' regulatorias y nucleótidos de las regiones codificantes de cada gen que los plásmidos derivados del YEp357.

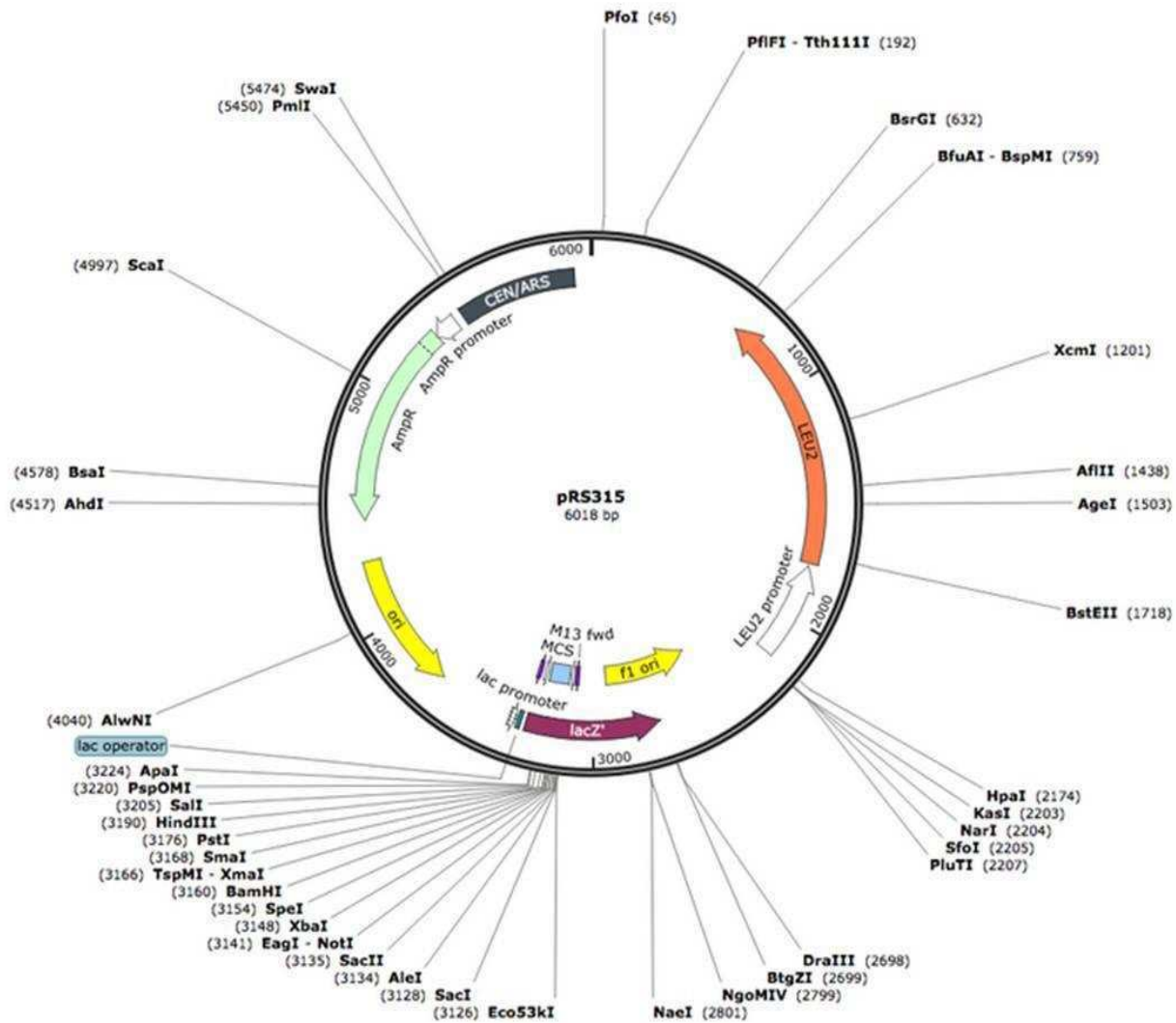


Figura 2: Mapa del plásmido pRS315.

El plásmido pOV84 (Vincent, Townley, Kuchin, & Carlson, 2001) (aquí denominado pl Snf1) contiene la versión WT del gen *SNF1* acoplada a GFP y es derivado del plásmido pRS313 (Figura 3) (Sikorski & Hieter, 1989). El plásmido pKH43 que expresa la versión mutante de Snf1, SNF1-T210A-GFP (aquí denominado pl Snf1 T210A), es derivado del plásmido pOV84 (Hedbacker, Hong, & Carlson, 2004).

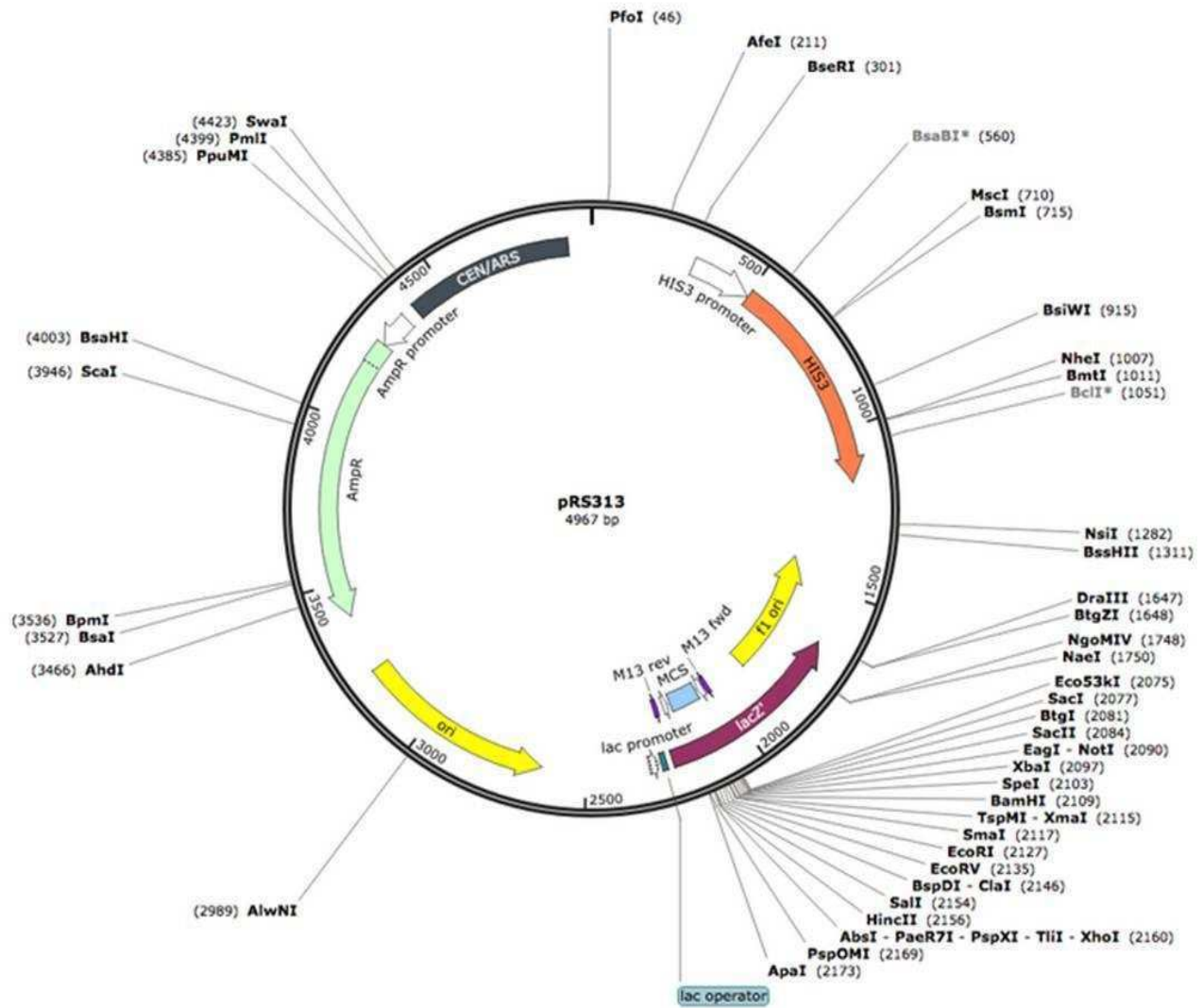


Figura 3: Mapa del plásmido pRS313.

4. Transformación de bacterias *E.coli* competentes

En un tubo estéril se mezclaron 50 μ l de células competentes con 5 μ g de preparación plasmídica y se incubaron 30 min en hielo. El *shock* térmico se realizó a 42°C durante 1 min. Se agregó 1 ml de LB y se incubó durante 30 min/1 hora a 37°C. Se centrifugó y se descartó el sobrenadante dejando una gota. Se sembró en placas de LB-Ampicilina (100 μ g/ml).

5. Purificación de DNA plasmídico desde *E.coli*

Células de *E.coli* fueron crecidas durante una noche a 37°C en 5 ml de medio LB-Ampicilina (100 µg/ml). Las células recuperaron por centrifugación a 5000 rpm, durante 5 min. El *pellet* fue resuspendido en 0.1 ml de Solución 1 con RNasa 0.02 µg/ml (Biodynamics). Luego se agregaron 0.2 ml de Solución 2, se mezcló suavemente por inversión y se dejó en hielo durante 10 min. Se agregaron 0.15 ml de acetato de K 3M pH 5.2, y se realizó el mismo procedimiento que con el agregado de la solución anterior. Se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min, a 4°C, y el sobrenadante se extrajo con un volumen de fenol:cloroformo pH 8. Se recuperó la fase acuosa, a la que se le agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto y se dejó a -20°C durante 30 min. Se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min, a 4°C, y el precipitado obtenido se resuspendió en 50 µl H₂O.

6. Transformación de levaduras

Las cepas de *S.cerevisiae* fueron transformadas según el método de acetato de litio (Ito, Fukuda, Murata, & Kimura, 1983). Las células fueron crecidas exponencialmente en 50 ml de medio YPD (2% bactopectona, 1% extracto de levadura y 2% glucosa) a 30°C con agitación; y cosechadas por centrifugación. El precipitado celular fue lavado con H₂O destilada; y resuspendido en TE/AcLi 0.1M. Luego de incubar a 30°C con agitación durante 30 min; las células fueron centrifugadas y resuspendidas nuevamente en TE/AcLi 0.1M. A 50 µl de resuspensión celular se agregaron 50 µg de DNA ss desnaturalizado y 5 µg de DNA plasmídico; y se incubó a 30°C durante 30 min. El *shock* térmico se realizó a 42°C durante 15 min. Las células fueron lavadas y la siembra se realizó en medio mínimo selectivo.

7. Purificación de DNA genómico de levaduras

Las células fueron crecidas en 30 ml de cultivo durante una noche, a 30°C con agitación. Fueron recuperadas por centrifugación, lavadas con H₂O y luego resuspendidas en 0,15 ml de solución de lisis. Se agregaron 0.2 ml de bolitas de vidrio y se realizó la ruptura en vórtex, durante 3 - 4 min. Se agregó 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1) pH 8, y se realizó otro ciclo de ruptura en vórtex. Se agregaron 0.15 ml de buffer TE, se centrifugó durante 5 min a máxima velocidad y se recuperó la fase acuosa. Luego del agregado de 0.9 ml de etanol 100%, se mezcló por inversión y se realizó otra centrifugación a

máxima velocidad durante 2 min. El sobrenadante fue descartado y el precipitado se resuspendió en 0.3 ml de buffer TE, se agregaron 30 µg de RNasa A (Biodynamics) y se incubó a 37°C durante 10 min. Se realizó una extracción con fenol:cloroformo (1:1) pH 8, y la fase acuosa se precipitó con 1/10 vol de acetato de K 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol 100%. Se realizó una centrifugación a 4°C durante 15 min, a máxima velocidad. El sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó con 0.5 ml de etanol 70%, luego se resuspendió en 0.3 ml de H₂O y se guardó a -20°C.

8. Electroforesis en geles de agarosa

Las muestras de DNA genómico y plasmídico y de RNA fueron corridas en geles de agarosa 1% y 1,2% (en buffer TAE 1X) respectivamente. La electroforesis se realizó a 90 V y en buffer TAE 1X. La tinción se realizó con bromuro de etidio 1 µg/ml en buffer TAE 1X, y se visualizaron las bandas con luz ultravioleta.

9. Ensayo de medición de actividad β-galactosidasa

La determinación de actividad de β-galactosidasa fue realizada según Miller, (1972). Las células fueron crecidas exponencialmente, cosechadas por centrifugación y resuspendidas en 1 ml de buffer Z (60 mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄), y 100 µl fueron llevados a 1 ml con H₂O_d para determinación de A_{600nm}. Del resuspendido, 200 µl para los promotores *TPK1* y *TPK2* y 400 µl para los promotores *TPK3* y *BCY1* fueron llevados a 1 ml con buffer Z. Luego del agregado de 30 µl de cloroformo y 20 µl de SDS 0.1%, se realizó la permeabilización de las células en vórtex. La reacción se inició con el agregado de 200 µl de ONPG 0.4 mg/ml (en buffer Z), incubando a 30°C, momento desde el cual se tomó el tiempo. Para finalizarla, cuando la solución adquirió un color amarillo pálido, se agregaron 0.5 ml de Na₂CO₃ 1M. Luego de centrifugar, se midió en el sobrenadante A_{420nm} y A_{550nm} (debris celular). La actividad de β-galactosidasa se calculó en unidades arbitrarias Miller:

$$U. \text{ Miller} = \frac{(A_{420} - 1,75 \times A_{550}) \times 1000}{A_{600} \times \text{dil} \times \text{vol}_{\text{extracto ensayado}} \text{ (ml)} \times \text{tiempo} \text{ (min)}}$$

A_{600nm}: absorbancia de las suspensiones celulares.

A_{420nm}: absorbancia del producto o-nitrofenol.

$A_{550\text{nm}}$: absorbancia para corregir los resultados por debris celulares.

Los resultados se muestran en las figuras como el promedio \pm SD de duplicados en un experimento representativo de 3 repeticiones, o el promedio \pm SD del total de replicados ($n=4$, $n = 6$ o $n = 8$) de experimentos independientes (2, 3 o 4 experimentos). Se evaluó las actividades de los promotores en las distintas cepas WT, SP1, BY4741 y W303-1A, y los resultados no mostraron diferencias.

10. Purificación de RNA total y qRT-PCR

Las células crecidas exponencialmente a 30°C fueron centrifugadas, lavadas con 1 ml de H₂O_d y resuspendidas en 400 μ l de buffer TES (Tris-HCl 10 mM pH 7.6, EDTA 1 mM, SDS 0.5%). Se agregó 1 volumen de fenol ácido (pH \approx 4), y la mezcla fue incubada a 65°C durante 1 hora, con agitación cada 5 min. Luego fue colocada en hielo durante 5 min, y centrifugada. Se realizaron dos extracciones fenólicas adicionales. Los ácidos nucleicos fueron precipitados con el agregado de 2,5 volúmenes de etanol 100% y 1/10 volumen de acetato de potasio 3M pH 5.2, a -20°C por 10 min. Luego de centrifugar, el precipitado fue lavado con etanol 70% y resuspendido en H₂O previamente tratada con DEPC. El DNA se eliminó por tratamiento con *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega) a 37°C durante 40 min. Posteriormente se realizó una nueva extracción fenólica y se precipitó el RNA. El precipitado obtenido fue guardado en etanol 100% a -80°C.

Para la síntesis de cDNA se tomaron \sim 10 μ g de RNA en suspensión, que fue centrifugado y resuspendido en 5 μ l de H₂O DEPC. Se agregaron 1 μ l de oligo dT 25 ng/ μ l, 1 μ l de dNTPs 10 mM, se incubó 5 min a 65°C y se colocó 1 min en hielo. Se agregaron 4 μ l de buffer 5X de Retrotranscriptasa, 2 μ l de DTT 0.1 M y 6 μ l de H₂O DEPC. Se incubó 1 min a 42°C, se agregó 1 μ l de enzima *SuperScript® II Reverse Transcriptase* (Invitrogen) y se colocó en la termocicladora, 50 min a 42°C y 15 min a 70°C. Se utilizó 1 μ l de cDNA como templado de PCR.

Se realizó el control sin enzima Retrotranscriptasa, para verificar la ausencia de DNA.

Los *primers* empleados se muestran en la tabla 2. La qPCR se realizó con *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) y los productos se visualizaron con SYBR Green (Life Technologies). Los niveles relativos de mRNA de *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* y *BCY1* fueron normalizados al de *TUB1* (gen de α -Tubulina).

El programa de PCR realizado fue el siguiente:

desnaturalización: 3 min a 95°C

1 min a 95°C	}	35 ciclos
30 seg a 55°C		
1 min a 72°C		

elongación final: 7 min a 72°C.

TPK1 Fw	5' CCGAAGCAGCCACATGTCAC 3'
TPK1 Rv	5' GTACTAACGACCTCGGGTGC 3'
TPK2 Fw	5' GCTTGTGGAGCATCCGTTTC 3'
TPK2 Rv	5' CACTAAACCATGGGTGAGC 3'
TPK3 Fw	5' CGTTGGACAAGACATTCTTG 3'
TPK3 Rv	5' GTCGGTTATCTTGATATGGCC 3'
BCY1 Fw	5' CGAACAGGACACTCACCAGC 3'
BCY1 Rv	5' GGTATCCAGTGCATCGGCAAG 3'
TUB1 Fw	5' CAAGGGTTCTTGTTTACCCATTC 3'
TUB1 Rv	5' GATAAGACTGGAGAATATGAAAC 3'

Tabla 2. *primers* empleados en la qPCR.

11. Western-blot

Muestras de preparaciones proteicas (indicado en cada figura) fueron separadas por *SDS-PAGE*, transferidas a membranas de nitrocelulosa, usando *buffer* de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH 8, Glicina 192 mM, metanol 20% (v/v)), durante 90 min a 90 volts. Las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche descremada, 0.05% de Tween 20 en buffer TBS, incubada con el anticuerpo anti-TPK1 (Santa Cruz Biotechnology) 1/200 durante 1 noche a 4°C con agitación. Las membranas fueron lavadas e incubadas con un segundo anticuerpo anti-cabra, anti-conejo o anti ratón conjugado con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) por 1 h a temperatura ambiente. Después de la incubación, las membranas fueron lavadas dos veces con solución de bloqueo y dos veces con 0.05% de Tween 20 en TBS. Las membranas fueron incubadas con el reactivo quimioluminiscente Luminol y las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas y analizadas por imagen digital (Bio- Imaging Analyzer Bas-1800II and Image Gauge 3.12 FUJIFLM).

12. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Los experimentos de Inmunoprecipitación de la cromatina se realizaron según se describe en Kuras & Struhl, (1999), con algunas modificaciones. Células crecidas en 50 ml de medio hasta DO_{600} 3.5, luego de distintos tratamientos, fueron fijadas con formaldehído concentración final 1% durante 20 min a temperatura ambiente, con agitación ocasional. Luego se agregó glicina a una concentración final de 125 mM y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Las células se centrifugaron y se lavaron 2 veces con 50 ml de TBS 1X frío y 1 vez con 5 ml de buffer de lisis FA (HEPES/KOH 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 1%, deoxicolato de sodio 0.1%, SDS 0.1%, PMSF 2 mM). El precipitado se resuspendió en 1 ml de buffer de lisis FA, se agregaron 0.5 ml de bolitas de vidrio (0.5 mm de diámetro, Sigma) y las células se rompieron en vórtex durante 40 min a 4°C. El lisado fue separado de las bolitas de vidrio y la cromatina se obtuvo por centrifugación a durante 5 min a 13.2 rpm. Se realizó un lavado del *pellet* de cromatina con 1 ml de buffer de lisis FA. Nuevamente se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de buffer de lisis FA. Las muestras se sonicaron para obtener fragmentos de ADN con un tamaño promedio de 500 pb (Branson Sonifier, 3 ciclos de 10 seg con amplitud 15%), y se clarificaron por centrifugación 5 min a 13.2 rpm. El sobrenadante se colocó en un tubo conteniendo 30 μ l de resina IgG-Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) previamente lavada con PBS+BSA 5mg/ml, y se incubó durante una noche a 4°C con rotación permanente. En este punto se tomó la muestra Input, 5 μ l que fueron llevados a 100 μ l con buffer TE 1X. Se realizaron lavados de la resina con incubaciones de 5 min a 4°C con rotación constante: 4 con buffer de lisis FA, 4 con buffer de lisis FA/500 mM NaCl, 1 con buffer de lavado (Tris-HCl 10 mM pH 8, LiCl 0.25 mM, EDTA 1 mM, Nonidet P-40 0.5%, deoxicolato de sodio 0.5%), y 1 con buffer TE 1X. Las proteínas unidas a la resina fueron eluidas por adición de buffer de elución (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, SDS 1%), e incubadas con proteinasa K (0.25mg/ml) durante 1 h a 37°C. Las muestras fueron incubadas luego por 5 hs a 65°C para recuperar los fragmentos de ADN, que fueron purificados con el kit QIAquick PCR Purification Kit de Qiagen. La *Real Time*- PCR (qPCR) se realizó con un Opticon Monitor 3 (Bio-Rad), y se muestran los resultados obtenidos con *primers* que amplifican regiones del promotor *TPK1*, correspondientes a los sitios *Msn2/4*, *Sok2*, *Gis1*, y a la región que contiene el TSS. Se utilizó SYBR Green (Life Technologies) para la detección del ADN. Se realizó un control de especificidad con un par de *primers* que amplifican una región del ORF *POL1*, alejada del promotor *TPK1*. El ADN inmunoprecipitado (IP) fue normalizado al

ADN input, y se calculó la relación señal:ruido en comparación con la cepa sin TAP control del ChIP. Las veces de unión se calcularon mediante el método del $\Delta\Delta C_T$ (Livak & Schmittgen, 2001).

El programa de PCR realizado fue el que se detalla en el punto 11.

TPK1- 696Fw	5' GAGCAATGGCTTTGGTAAGGT 3'
TPK1-545Rv	5' TAGGAAGAATGTCAACAAGATG 3'
TPK1-399Fw	5' TTCAACATAGTGTTGTTGTGGTTTT 3'
TPK1-208Rv	5' AAAAATTCTCACGTTTTTCTGG 3'
TPK1-330Fw	5' GAGGGAAGGCGGGATCTGGT 3'
TPK1-109Rv	5' GCCGATTGAAAATGCAAGCAA 3'
POL1+1795Fw	5' CTGCACTGGCAAAACAGAAA 3'
POL1+2004Rv	5' TCTTAAACGACGGCCAATAGA 3'

Tabla 3. *primers* empleados en la qPCR del ChIP.

13. Metodología *Reporter-Synthetic Genetic Array (R-SGA)*

Previo al inicio del protocolo se obtuvo un césped de la cepa *query* BY4256 conteniendo el plásmido prX-GFP (un césped por cada cepa con cada plásmido), una placa de medio mínimo SD leu⁻, con 2 días de crecimiento, y las placas correspondientes a la colección de mutantes de delección, en YPD.

Día 1: Cruzamiento de la cepa *query* BY4256 conteniendo el prX-GFP con las 20 placas que componen la colección de mutantes de delección. Se hace una réplica de la cepa *query* en medio YPD empleando un peine que permite la generación de 768 posiciones con células, y en la misma placa, se replica la placa de la colección que presenta 384 posiciones, por duplicado (el robot pica en la placa de origen, y deposita en la placa destino dos veces, la segunda vez a la derecha y levemente más arriba que la primera). Esto permite realizar un análisis por duplicado de cada cepa mutante de delección. Las placas con medio rico se incuban durante 1 día a 30°C para permitir el *mating*.

Día 2: Las diploides se seleccionan en SD leu⁻ + G418 (200 µg/ml), que selecciona las células que contienen el plásmido y además la delección génica. Las placas se incuban durante 2 días a 30°C.

Día 4: Se repite la selección de diploides para el enriquecimiento en cepas mutantes heterocigotas que contengan el prX-GFP, en medio SD leu⁻ + G418 (200 µg/ml), que se dejan crecer 2 días a 30°C.

Día 6: Las colonias de la segunda selección de diploides se repican a placas con medio de esporulación. Este medio es un medio pobre, al que se le agrega un determinado % de aminoácidos. Esta placa se incubó a 22°C durante 5 días, manteniendo las condiciones de humedad para mejorar la eficiencia del proceso.

Día 11: A continuación se realiza la selección de haploides *MATa*, primero en medio SD leu⁻ arg⁻ his⁻ lys⁻ + G418 (200 µg/ml) + canavanina (50 µg/ml) + tialisina (200 µg/ml). Las placas se incuban durante 3 días a 30°C. La omisión de histidina favorece la selección de haploides *MATa* por expresión del reportero STE2pr-his5. Este reportero tiene el promotor del gen *STE2*, que es inducido en haploides *MATa*, por el factor α liberado por las haploides *MATa*. En este caso la inducción del promotor *STE2* promueve la expresión del gen his5, permitiendo a las haploides *MATa* sobrevivir en un medio depletado de histidina, a diferencia de las haploides *MATa*. La suplementación con canavanina y tialisina permiten la contraselección de heterocigotas que contengan los genes *CAN1* y *LYP1*.

Día 14: Se realiza otra selección de haploides *MATa* en medio SD leu⁻ arg⁻ his⁻ lys⁻ + G418 (200 µg/ml) + canavanina (50 µg/ml) + tialisina (200 µg/ml) + Higromicina B (300 µg/ml). Las placas se crecen a 30°C durante 2 días. La adición de Higromicina B permite la selección del gen reportero control RFP en cepas haploides que contengan el reportero prX-GFP y la delección génica. La omisión de esta droga en el paso anterior favorece la selección en este paso.

Día 16: Por último, se realiza una selección final de haploides *MATa* en medio SD leu⁻ arg⁻ his⁻ lys⁻ + G418 (200 µg/ml) + canavanina (50 µg/ml) + tialisina (200 µg/ml) + Higromicina B (300 µg/ml). Las placas se dejan crecer durante 2 días a 30°C. Este paso facilita un enriquecimiento adicional de las cepas haploides finales.

La manipulación robótica de la colección se realizó con el Biomatrix robot and plate imaging system (S&P Robotics Inc). El tamaño de las colonias fue analizado y las posiciones no presentaron crecimiento o era muy lento fueron eliminadas de análisis subsiguientes. La fluorescencia de las colonias fue medida luego de 3 días de crecimiento en medio mínimo con glucosa usando PharosFX Molecular Imager (Bio-Rad). Los datos fueron analizados con el *software* Array Gauge V1.2. Los valores de log₂(GFP:RFP) de cada colonia en el *array* fueron calculados según (Kainth et al., 2009), y normalizados con el valor promedio correspondiente a cada colección de cada *prX-GFP*. Un gran número de mutantes de delección está representado 2 veces en la colección, y el estudio se realizó por duplicado,

lo que resulta en 4 mediciones para algunas de las mutantes. Los valores de $\log_2(\text{GFP}:\text{RFP})$ fueron transformados a valores Z usando el promedio y el desvío estándar, y se asignaron valores p en base a la distribución Normal de los datos. La normalidad de los datos de $\log_2(\text{GFP}:\text{RFP})$ en cada colección de *prX-GFP* fue evaluada mediante el test de Shapiro Wilkins y a la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov, indicando en todos los casos la distribución Normal de los mismos. Además, se realizó un análisis de normalidad de los datos de RFP de cada colección mediante un ajuste de residuales, que indicó una ligera desviación de unos pocos datos. Se estableció una línea de corte en un desvío estándar de 1.5, es decir, con un valor de $p = 0.01$ o $p = 0.05$. Una lista de 260 mutantes de delección que usualmente surgen en este tipo de estudios (Henry Goettert & Brenda Andrews, *personal communication*), fueron descartados de análisis posteriores.

14. Análisis de GO

La distribución de los reguladores en grupos funcionales se evaluó mediante la medición del enriquecimiento de genes dentro de una misma categoría funcional, según las anotaciones de la base de datos Funspec (<http://funspec.med.utoronto.ca/>). El enriquecimiento de los genes pertenecientes a las categorías de GO Procesos Biológicos, GO Funciones Moleculares y Clasificación Funcional MIPS fue calculado respecto al número total de genes y a los genes pertenecientes a esa categoría. Los valores de p para cada una de las categorías se calcularon mediante la distribución hipergeométrica, considerando categorías significativas con $p < 0.05$ o $p < 0.01$.

BIBLIOGRAFÍA

- Bolte, M. (2003). Synergistic inhibition of APC/C by glucose and activated Ras proteins can be mediated by each of the Tpk1-3 proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, *149*(5), 1205–1216. doi:10.1099/mic.0.26062-0
- Cameron, S., Levin, L., Zoller, M., & Wigler, M. (1988). cAMP-independent control of sporulation, glycogen metabolism, and heat shock resistance in *S. cerevisiae*. *Cell*, *53*(4), 555–566. doi:10.1016/0092-8674(88)90572-7
- Estruch, F., & Carlson, M. (1993). Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, *13*(7), 3872–3881. doi:10.1128/MCB.13.7.3872.Updated
- Ferguson, S. B., Anderson, E. S., Harshaw, R. B., Thate, T., Craig, N. L., & Nelson, H. C. M. (2005). Protein kinase A regulates constitutive expression of small heat-shock genes in an Msn2/4p-independent and Hsf1p-dependent manner in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *169*(3), 1203–1214. doi:10.1534/genetics.104.034256
- Hedbacker, K., Hong, S., & Carlson, M. (2004). Pak1 Protein Kinase Regulates Activation and Nuclear Localization of Snf1-Gal83 Protein Kinase, *24*(18), 8255–8263. doi:10.1128/MCB.24.18.8255
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., & Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology*, *153*(1), 163–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=217353&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Kainth, P., Sassi, H. E., Peña-Castillo, L., Chua, G., Hughes, T. R., & Andrews, B. (2009). Comprehensive genetic analysis of transcription factor pathways using a dual reporter gene system in budding yeast. *Methods (San Diego, Calif.)*, *48*(3), 258–64. doi:10.1016/j.ymeth.2009.02.015
- Klig, L. S., & Henry, S. A. (1984). Isolation of the yeast INO1 gene: located on an autonomously replicating plasmid, the gene is fully regulated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(12), 3816–20. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=345311&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Kuras, L., & Struhl, K. (1999). Binding of TBP to promoters in vivo is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme. *Nature*, *399*(6736), 609–13. doi:10.1038/21239
- Lee, P., Cho, B. R., Joo, H. S., & Hahn, J. S. (2008). Yeast Yak1 kinase, a bridge between PKA and stress-responsive transcription factors, Hsf1 and Msn2/Msn4. *Molecular Microbiology*, *70*(4), 882–895. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06450.x

- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300499192>
- Myers, A. M., Tzagoloff, A., Kinney, D. M., & Lusty, C. J. (1986). Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of lacZ fusions. *Gene*, 45(3), 299–310. doi:10.1016/0378-1119(86)90028-4
- Nikawa, J., Cameron, S., Toda, T., Ferguson, K. M., & Wigler, M. (1987). Rigorous feedback control of cAMP levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development*, 1, 931–937. doi:10.1101/gad.1.9.931
- Sherman, F., Fink, G. R., & Hicks, J. B. (1982). Methods in yeast genetics: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sikorski, R. S., & Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122(1), 19–27. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1203683&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., & Wigler, M. (1987). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell*, 50(2), 277–287. doi:10.1016/0092-8674(87)90223-6
- Vincent, O., Townley, R., Kuchin, S., & Carlson, M. (2001). Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes & Development*, 15(9), 1104–14. doi:10.1101/gad.879301
- Wallis, J. W., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfe, M., & Rothstein, R. (1989). A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell*, 58(2), 409–419. doi:10.1016/0092-8674(89)90855-6

APÉNDICE

1. Secuencias de los promotores de las subunidades de PKA

Código:

Subrayado: secuencias de los *primers* de clonado.

Negrita: codón de inicio de la traducción.

Itálica: nucleótidos correspondientes a la zona codificante.

Secuencia promotor *TPK1*

TGATAATATTCGCTCTTTTACAGGCATTGAGCGCGTTTTGTTACCAACTTTGCAGTCTGGTATCATAAAGTACACCTCTAAG
AAACATACAGGCGAGATGTTCCGAGCAATGGCTTTGGTAAGGTCCTGTGTTATGCTTGCATCCCTCCCATCCTCCTAAGCT
ATATGGAAGTACTGTCTCCGTTAATCCTAGTCTGTTTATGTATATACCGTTCTCAACAAGTATTGTTGCCATCTTGTTGACATT
CTTCCTAAGAATTTACAAGAACCCTCCGCTGGACGGGCCTAAAAACATTTACATACCGGTATACACCACATATTTTTAGTTA
CTTGTTCGAAGCTGTGCTGCTATTCGTTCTTGCAAAGCCAGTGTCTAACGACTTTGCTTATGACATGATTCAACATAGTGTT
GTTGTGGTTTTTTCTACGTAATCATGATGATCTTTTTTTTCGCGCTATTAGGGGGGAGGGAAGGCGGGATCTGGTAAAAGTT
TGACATAATAATCAAGGGGGATATCGTATCCCTTACTTGAAAATTGAAAAATATTCATCTACTATCTCTGGCCAGAAAAAC
GTGAGAATTTTTAGGTGCGAAACATCATAGAAGCTGCGATTGTATCCATCTAAGAGTTTTAATTTGATAAAGCTAAGGAATC
TGACCCCTATACTTTTTTTTTGTTTGGCTTGCTTGCAATTTCAATCGGCTTCAAAGGTAGCACAGAAAGTAGTGTTCTCTTAG
CTTAAGCAGTGCATGAATTATAGCTGATTGTGTGAAAGAATCTTTTTTTGGGT**ATGTCGACTGAAGAA**

Secuencia promotor *TPK2*

ACAACAGCAGCCGAGCAGCAGGTCCAAAGTTCGCAGCCACAACCACAGCCCCAACAGCTACAGCAGCAACCAAATGGCC
AAAGACCAAATTATTATCCTGAACCGTTACTACAGCAGCAACAAAGAGATTCTCAGGAGCAACAGCAGCAAGTTCCGATGG
CTACAACCAGGGCTACTCAGTATCCCCACAAATAAACAGCAATAATTTAATACTAATCAAGCATCTGTACCTCCACAAATG
AGATCTAATCCACAACAGCCGCCTCAAGATAAACAGCTGGCCAGTCAATTTGGTTGTAAGCAACATATATTGCTCAAAACG
CACAAAAATAAACATATGTATATATAGACATACACACACATATATATATATATATTATTATTATTACATATACGTACA
CACAATTCCATATCGAGTTAATATATAAATTCTGGCCTTCTTACCTAAAAAGATGATAGCTAAAAGAACCACTTTTTTTATGC
ATTTTTTTCTTCGGGAAGGAAATTAAGGGGGAGCGGAGCACCTCTTGCCAATTTGTTTTTTTTATGTAATAAAGGGCTA
ACGATCGAAGATCAATCACGAATATTGGACGGTTTTAAAGGAGGGCCTCTGAGAAGACAGCATCAATTCGTATTTTCGATA
ATTAACCTGCCTTATAGTGTCTGATTAGGAAACAATCACGAGACGATAACGACGGAATACCAAGGAAGTTTGTGCAAATAT
ACAGCCGGCACAAACAGCAGCTTCACTCAGGTTAACTCACATACTGTTGAAAATTGTCGGT**ATGGAATTCGTTGCA**

Secuencia promotor *TPK3*

AGGAGGGATAAATATGGCAAATCTATCACTTATTCGTCAACAATATAGTAAATGCCGGCAAATACGGCCTACACAGCGA
AGCTTGACCACATATACTTATATGCCATGGTCCTAATTGAGTTCCTAGGTTTGTACGACGGTGGCCACCGGCCGATCAAC
CGTATCATTACTATTTTTTTCAAGAGGACAACGACTTCATTCTTCAAAAAGTCGTTCCAGGTACGAGTGATTTAGGAAGGTC
TGAAGAAAAGCGACTATGCATTTTTGCAAATTGCGTCAACGTTTCAGATACTCTCTGGTGCGCAAATGCGTTTATTTCAA
GCCAAGTTGCAATCTTTATCAAACTTGATATACATTAATACTCACTAATATATATATATATATATATATATATGTACATATAC
ATATATAGATTTATATGACGTTTCCGACGCATACTGGTGAACCACTTTCTTTTTAGTGAATAGCCTCATTATGCAGTTTCCGGT
ATTTTTTTCCGTTGCTTCAGCTACGGGATTTCTTCGATGCCATTGAAAAATAAAGTTGTGTTCAATGAGAATATGGAAAGAA
AAGACACTTTTTACCAGCTGATCTTAAAAGTTTTGTCTGCTTATTACTTCTATCGGTAAGAACTCGAGTGGACATACGAGA
CACTTTGTGCAGTCGTCGGAGAAAATTTATAGGCGATCACTCTTAAAGCAATAAGAAAGTTTCACGTATATTATTGAATAATA
CATTAAATCATATTGTATATCGGTGGTTGTACAAGGAAAGAGCGAGCCTGCACAAAATGTATGTTGATCCG

Secuencia promotor *BCY1*

GATGACGTGATATCTTTTATGTTGTTTCACGATGTTCTTATTGTATTGTATAATAGTTTCTTCTTAGTAGGAAGATAGAAAAA
GGACAAAGAAGGCAAAGAACCAAATGTCATTTCTAACGACACGGCACGTGATTACTGATCTGATAATAAATGAAACAAGCC
ATACGTGAGAAAGTAAAAAAAAAAGGAGGAGGGAAAAGAATACGAGTGGAAAATATAAAGGACTTTATATACTTTTCAG
ATTAGCCGCCGACGATTTTACTTACTCAGCTTTTTCTATCTTTCAAAACGCTCAAAAGAGGAGCATAACGACTTCGGCGGCTA
ATCTTCACCCAAGAAAAAAAAAAGCGCATGCCACCACGACGAGCGGAAAAAAAAACAAGCACCCAATCACCACCCTTCCTTCTT
TCTTCGTGTTATACCCGCCACTTTTGTCTGCCTGATAATATATTGATTATACTGTGCTCGGATTCCGACCTCTTCTTTGTTGCA
GAAGCCATAAGCTGAACTTATTGCATTTGCTCAAGTGCATTTATTATGGCGCCGCGCCGCTCTCCAAAATTCTTGCCTT
CCTCGTTTTGCTGGCAAGGAGCAAACGAAGAGGAAGGTAGAAAAGAGAAAATTTGAACAAACAGGGAAAAGGGAAAGA
GAAAAGGGACACTTTACGCTTTCCTCGACTAAGTCAAGCGATCGCTATCATCACATCCATTACACGCATTTACGCATACAT
AAATAGGAAGATCATTTACAACAAGCAGATTATTTTCAAAGACAACAGTAAGAATAAACGATGGTATCTTCTTGCC



TÉCNICO LISBOA

NEW





NEW







TÉCNICO LISBOA

NEW



TÉCNICO LISBOA

NEW







TÉCNICO LISBOA

NEW



TÉCNICO LISBOA

NEW







TÉCNICO LISBOA

NEW





NEW





10. Análisis Estadísticos: Capítulo 1

Figura 1.4 A

	BCY1 vs TPK1	BCY1 vs TPK2	BCY1 vs TPK3
Unpaired t test			
P value	< 0.0001	0,0033	0,0111
P value summary	****	**	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Yes	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
t, df	t=113.4 df=2	t=17.30 df=2	t=9.428 df=2

Figura 1.4 B

	BCY1 vs TPK1	BCY1 vs TPK2	BCY1 vs TPK3
Unpaired t test			
P value	0,1412	0,0066	0,0052
P value summary	ns	**	**
Significantly different? (P < 0.05)	No	Yes	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
t, df	t=2.371 df=2	t=12.23 df=2	t=13.79 df=2

Figura 1.5 A

2way ANOVA Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
TPK1				
WT vs. tpk1w1	-35,22	-39.12 to -31.32	Yes	****
WT vs. bcy1Δ	5,345	1.445 to 9.245	Yes	**
WT vs. msn2/4ΔtpksΔ	-8,373	-12.27 to -4.473	Yes	****
TPK2				
WT vs. tpk1w1	-16,21	-20.11 to -12.31	Yes	****
WT vs. bcy1Δ	3,809	-0.09083 to 7.709	No	ns
WT vs. msn2/4ΔtpksΔ	-36,68	-40.58 to -32.78	Yes	****
tpk1w1 vs. bcy1Δ	20,02	15.07 to 24.98	Yes	****
TPK3				
WT vs. tpk1w1	-7,404	-11.30 to -3.504	Yes	****

WT vs. bcy1Δ	-0,8467	-4.747 to 3.053	No	ns
WT vs. msn2/4ΔtpksΔ	-7,180	-11.08 to -3.280	Yes	****
tpk1w1 vs. bcy1Δ	6,558	1.606 to 11.51	Yes	**
BCY1				
WT vs. tpk1w1	-0,3957	-4.296 to 3.504	No	ns
WT vs. bcy1Δ	-0,006040	-3.906 to 3.894	No	ns
WT vs. msn2/4ΔtpksΔ	-0,7197	-4.620 to 3.180	No	ns

Figura 1.5 B

2way ANOVA Dunnett's multiple comparisons test

TPK1

	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
WT vs. TPK1tpk2Δtpk3Δ	0,1135	-0.08078 to 0.3079	No	ns
WT vs. TPK2tpk1Δtpk3Δ	0,6138	0.4339 to 0.7937	Yes	****
WT vs. TPK3tpk1Δtpk2Δ	0,3635	0.1692 to 0.5578	Yes	****

TPK2

WT vs. TPK1tpk2Δtpk3Δ	-0,3621	-0.8709 to 0.1467	No	ns
WT vs. TPK2tpk1Δtpk3Δ	-6,878	-7.447 to -6.309	Yes	****
WT vs. TPK3tpk1Δtpk2Δ	0,01228	-0.4966 to 0.5211	No	ns

TPK3

WT vs. TPK1tpk2Δtpk3Δ	-0,08070	-0.2750 to 0.1136	No	ns
WT vs. TPK2tpk1Δtpk3Δ	0,9556	0.7757 to 1.136	Yes	****
WT vs. TPK3tpk1Δtpk2Δ	0,2809	0.08656 to 0.4752	Yes	**

BCY1

WT vs. TPK1tpk2Δtpk3Δ	0,6107	0.1018 to 1.120	Yes	*
WT vs. TPK2tpk1Δtpk3Δ	0,6323	0.06341 to 1.201	Yes	*
WT vs. TPK3tpk1Δtpk2Δ	0,6476	0.07874 to 1.217	Yes	*

Figura 1.6 A

2way ANOVA Tukey's multiple comparisons test

TPK1

	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
WT vs. tpk1w1	-2,358	-2.766 to -1.950	Yes	****
WT vs. bcy1Δ	0,9136	0.5057 to 1.321	Yes	****
WT vs. TPK1tpk2Δtpk3Δ	-0,09655	-0.5044 to 0.3113	No	ns

TPK2					
WT vs. TPK2tpk1Δtpk3Δ	-2,790	-3.198 to -2.382	Yes	****	
TPK3					
WT vs. TPK3tpk1Δtpk2Δ	0,08000	-0.3279 to 0.4879	No	ns	
BCY1					
WT vs. tpk1w1	-2,688	-3.096 to -2.280	Yes	****	
WT vs. TPK1tpk2Δtpk3Δ	0,2500	-0.1579 to 0.6579	No	ns	
WT vs. TPK2tpk1Δtpk3Δ	0,1400	-0.2679 to 0.5479	No	ns	
WT vs. TPK3tpk1Δtpk2Δ	0,4000	-0.007888 to 0.8079	No	ns	

Figura 1.6 B

2way ANOVA Dunnett's multiple comparisons test

	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
TPK1				
WT W303-1A (t=0) vs. WT W303-1A (t=60)	-4,500	-5.138 to -3.862	Yes	****
WT W303-1A (t=0) vs. BY4741 (t=0)	0,0	-0.6382 to 0.6382	No	ns
WT W303-1A (t=0) vs. BY4741 (t=60)	-5,233	-5.872 to -4.595	Yes	****
WT W303-1A (t=0) vs. SP1(t=0)	0,0	-0.6382 to 0.6382	No	ns
WT W303-1A (t=0) vs. SP1(t=60)	-4,167	-4.805 to -3.528	Yes	****
WT W303-1A (t=0) vs. msn2/4Δ(t=0)	0,4000	-0.2382 to 1.038	No	ns
WT W303-1A (t=0) vs. msn2/4Δ(t=60)	0,6167	-0.02152 to 1.255	No	ns
TPK2				
WT W303-1A (t=0) vs. WT W303-1A (t=60)	0,1333	-0.5049 to 0.7715	No	ns
WT W303-1A (t=0) vs. msn2/4Δ(t=0)	0,2667	-0.3715 to 0.9049	No	ns
WT W303-1A (t=0) vs. msn2/4Δ(t=60)	0,1000	-0.5382 to 0.7382	No	ns
TPK3				
WT W303-1A (t=0) vs. WT W303-1A (t=60)	-0,06667	-0.7049 to 0.5715	No	ns
WT W303-1A (t=0) vs. msn2/4Δ(t=0)	0,1000	-0.5382 to 0.7382	No	ns
WT W303-1A (t=0) vs. msn2/4Δ(t=60)	0,1333	-0.5049 to 0.7715	No	ns
BCY1				
WT W303-1A (t=0) vs. WT W303-1A (t=60)	-0,06667	-0.7049 to 0.5715	No	ns

WT W303-1A (t=0) vs. msn2/4Δ(t=0)	0,1000	-0.5382 to 0.7382	No	ns
WT W303-1A (t=0) vs. msn2/4Δ(t=60)	0,3000	-0.3382 to 0.9382	No	ns

Figura 1.8

TPK1

wt

1way ANOVA Dunnett's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
0 vs 10	-0,4958	0,4220	No	ns
0 vs 30'	-2,326	1,979	No	ns
0 vs 60'	-3,144	2,676	Yes	*
0 vs C	0,03500	0,02580	No	ns

2way ANOVA Bonferroni posttests

wt vs msn2/4Δ

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
0'	-1,790	1,599	P > 0.05	ns
10'	-3,128	2,795	P < 0.05	*
30'	-4,566	4,080	P<0.001	***
60'	-5,887	5,259	P<0.001	***
60'C	-0,1000	0,08934	P > 0.05	ns

wt vs yak1Δ

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
0'	0,5833	0,4549	P > 0.05	ns
10'	1,411	1,188	P > 0.05	ns
30'	2,080	1,752	P > 0.05	ns
60'	1,497	1,261	P > 0.05	ns
60'C	-0,7000	0,6254	P > 0.05	ns

wt vs msn2/4Δyak1Δ

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
0'	5,463	3,829	P<0.001	***
10'	4,382	2,610	P < 0.05	*

30'	3,519	2,096	P > 0.05	ns
60'	0,7855	0,4678	P > 0.05	ns
60°C	-0,1000	0,08934	P > 0.05	ns

wt vs msn2/4ΔtpksΔ

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
0'	8,666	6,074	P<0.001	***
10'	5,249	4,422	P<0.001	***
30'	3,866	3,454	P<0.01	**
60'	4,154	3,499	P<0.01	**
60°C	-0,1000	0,08934	P > 0.05	ns

wt vs gis1Δ

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
0'	-3,304	2,952	P < 0.05	*
10'	-2,701	2,106	P > 0.05	ns
30'	-2,855	2,001	P > 0.05	ns
60'	-1,704	1,194	P > 0.05	ns
60°C	-0,1000	0,08934	P > 0.05	ns

wt vs rim15Δ

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
0'	-3,053	2,969	P < 0.05	*
10'	-4,045	3,154	P<0.01	**
30'	-5,565	4,340	P<0.001	***
60'	-6,822	5,320	P<0.001	***
60°C	-0,1000	0,08934	P > 0.05	ns

TPK2

wt

1way ANOVA Dunnett's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
0 vs 10	-0,4994	0,5522	No	ns
0 vs 30'	-0,9055	1,132	No	ns

0 vs 60'	-0,6557	0,8196	No	ns
----------	---------	--------	----	----

2way ANOVA Bonferroni posttests

wt vs msn2/4Δ

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
0'	-4,28597	4,25045	0,00032727	*
10'	-3,42184	2,17047	0,0490842	ns
30'	-3,38911	2,94567	0,0074771	*
60'	-1,81796	1,8751	0,0741162	ns

wt vs yak1Δ

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
0'	-2,68568	2,02139	0,0568263	ns
10'	-1,18518	0,853094	0,407024	ns
30'	-1,36158	1,09273	0,287502	ns
60'	-1,22594	1,07702	0,295695	ns

wt vs msn2/4ΔtpksΔ

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
0'	-33,2112	10,7087	< 0.0001	*
10'	-34,7068	6,34561	< 0.0001	*
30'	-32,4081	7,16073	< 0.0001	*
60'	-26,3378	9,23244	< 0.0001	*

wt vs gis1Δ

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
0'	0,631312	0,633696	0,53346	ns
10'	2,61496	2,17819	0,0520288	ns
30'	2,96632	2,35854	0,0314002	ns
60'	1,95133	1,89491	0,0763218	ns

wt vs rim15Δ

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
------------	------------	---	---------	---------

0'	0,631312	0,633696	0,53346	ns
10'	2,61496	2,17819	0,0520288	ns
30'	2,96632	2,35854	0,0314002	ns
60'	1,95133	1,89491	0,0763218	ns

TPK3

wt

1way ANOVA Dunnett's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
0 vs 10	0,1401	0,3079	No	ns
0 vs 30'	0,03437	0,07557	No	ns
0 vs 60'	-0,1687	0,3787	No	ns

2way ANOVA Bonferroni posttests

wt vs msn2/4Δ

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
0'	0,758856	19,0	0,373037	ns
10'	0,377771	15,0	0,555754	ns
30'	0,613048	15,0	0,271419	ns
60'	0,351854	16,0	0,458398	ns

wt vs yak1Δ

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
0'	0,537251	0,778752	0,444813	ns
10'	0,34744	0,671719	0,510788	ns
30'	0,762177	1,64755	0,117803	ns
60'	0,188648	0,436407	0,667731	ns

wt vs msn2/4Δyak1Δ

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
0'	-3,98922	3,35257	0,00377595	*
10'	-4,01958	4,69458	0,000419301	*
30'	-4,3639	5,8788	< 0.0001	*
60'	-3,96079	6,07409	< 0.0001	*

wt vs msn2/4ΔtpksΔ

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
0'	-8,05626	6,71896	< 0.0001	*
10'	-6,10125	5,94072	< 0.0001	*
30'	-6,8706	4,21327	0,000659937	*
60'	-6,98828	4,85293	0,000127767	*

wt vs gis1Δ

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
0'	0,983303	1,42535	0,16875	ns
10'	1,1457	1,33671	0,204242	ns
30'	0,955035	1,28486	0,221264	ns
60'	1,2516	1,90295	0,0778158	ns

wt vs rim15Δ

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
0'	1,07713	1,57581	0,130016	ns
10'	1,11864	1,31335	0,211774	ns
30'	1,52292	2,04827	0,0612878	ns
60'	1,40585	2,14349	0,0501212	ns

BCY1**wt****1way ANOVA Dunnett's Multiple Comparison Test**

	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
0' vs 10'	-0,001496	0,05337	No	ns
0' vs 30'	0,0005417	0,02006	No	ns
0' vs 60'	-0,01509	0,5589	No	ns

2way ANOVA Bonferroni posttests**wt vs msn2/4Δ**

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
0'	-0,0383471	1,5698	0,132148	ns

10'	-0,0293078	0,683045	0,503276	ns
30'	-0,0503059	1,19514	0,244756	ns
60'	0,00666523	0,269953	0,789713	ns

wt vs yak1Δ

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
0'	-0,00761741	0,312018	0,758612	ns
10'	0,0211979	0,462379	0,650914	ns
30'	0,00834112	0,268541	0,791336	ns
60'	-0,00141242	0,0440478	0,965351	ns

wt vs msn2/4Δyak1Δ

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
0'	-1,56201	7,49858	< 0.0001	*
10'	-1,91387	15,1337	< 0.0001	*
30'	-2,1362	9,01086	< 0.0001	*
60'	-1,99837	9,0958	< 0.0001	*

wt vs msn2/4ΔtpksΔ

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
0'	-0,615445	7,01729	< 0.0001	*
10'	-1,15367	4,21429	0,000583354	*
30'	-1,31735	4,47868	0,000187376	*
60'	-1,16004	5,56063	< 0.0001	*

wt vs gis1Δ

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
0'	0,00844755	0,376947	0,711865	ns
10'	0,0172082	0,262186	0,797625	ns
30'	0,00360243	0,0712495	0,944207	ns
60'	0,0281492	0,591712	0,563477	ns

wt vs rim15Δ

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
0'	0,0106876	0,335458	0,743071	ns
10'	0,00496921	0,0758805	0,940765	ns
30'	0,00492589	0,0974637	0,92374	ns
60'	0,0122063	0,257675	0,800407	ns

Figura 1.9

wt

1way ANOVA Dunnett's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
0 vs 10'	-0,4424	0,3347	No	ns
0 vs 30'	-3,752	2,838	Yes	*
0 vs 60'	-5,108	3,864	Yes	**
0 vs C	-0,4197	0,3347	No	ns

TPK1 wt vs msn2/4Δ

2way ANOVA Bonferroni posttests

Row Factor	Difference	t	P value	Summary
0'	3,25377	6,01194	0,000535844	*
10'	2,67425	2,2734	0,0571904	
30'	4,65139	4,4113	0,0022525	*
60'	5,20546	3,23996	0,0118783	*

0' vs 60'

Unpaired t test

	TPK2	TPK3	BCY1
P value	0,9213	0,4113	0,4170
P value summary	ns	ns	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No	No	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
t, df	t=0.1117 df=2	t=1.030 df=2	t=1.015 df=2

Figura 1.10

ChIP Msn2

1way ANOVA Dunnett's Multiple Comparison Test

Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
------------	---	------------------------	---------

0 vs 15'	0,5333	2,072	No	ns
0 vs 60'	0,6967	3,026	No	ns
t test	Difference	t	P value	Summary
0 vs 60'	0,696667	2,8295	0,0473692	*

ChIP Gis1

1way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
0 vs 15'	0,03498	0,1075	No	ns
0 vs 30'	-0,8281	2,544	No	ns
0 vs 60'	-2,308	7,091	Yes	**

ChIP Rpb1

1way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
0 vs 15'	-0,3850	0,8244	No	ns
0 vs 60'	-2,140	4,583	Yes	*

ChIP Sok2

1way ANOVA Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary
0 vs 15'	-0,05569	0,09991	No	ns
0 vs 30'	-0,7328	1,315	No	ns
0 vs 60'	-1,384	2,482	No	ns

t test	Difference	t	P value	Summary
0 vs 60'		-1.484	4.471 0,0466	*

TPK1

t test	Difference	t	P value	Summary
wt vs sok2Δ (act β-gal)	5,33037	2,56701	0,0332822	*

11. Análisis Estadísticos: Capítulo 2

Figura 2.7 A

Glucosa vs Glicerol

Unpaired t test

	TPK1	TPK2	TPK3	BCY1
P value	0,0007	P<0.0001	0,0002	0,0005
P value summary	***	***	***	***
Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Yes	Yes	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
t, df	t=4.650 df=11	t=6.937 df=11	t=5.062 df=13	t=5.238 df=9

Figura 2.7 B

Glucosa vs Glicerol

Unpaired t test

	TPK1	TPK2	TPK3	BCY1
P value	0,0198	0,0028	0,0956	0,1654
P value summary	*	**	ns	ns
Significantly different? (P < 0.05)	Yes	Yes	No	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
t, df	t=6.999 df=2	t=18.96 df=2	t=2.998 df=2	t=2.143 df=2

Figura 2.8 A - TPK1

1way ANOVA Dunnett's multiple comparisons test

	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
WT vs mig1Δ	-0,4834	3,671	Yes	**
WT vs mig2Δ	-0,1087	0,8714	No	ns
WT vs mig3Δ	0,02877	0,2306	No	ns
WT vs snf1Δ	0,6552	4,632	Yes	***
WT vs cat8Δ	0,3612	1,978	No	ns
WT vs sip4Δ	0,2919	1,598	No	ns
WT vs rgt1Δ	0,1811	1,280	No	ns

Figura 2.8 B - TPK1

1way ANOVA Dunnett's multiple comparisons test

	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
WT vs mig1Δ	-5,157	3,083	Yes	*

WT vs mig2Δ	1,384	0,9767	No	ns
WT vs mig3Δ	-1,267	0,9970	No	ns
WT vs snf1Δ	5,062	3,984	Yes	**
WT vs cat8Δ	5,734	3,428	Yes	*
WT vs sip4Δ	0,3152	0,1884	No	ns
WT vs rgt1Δ	1,705	1,342	No	ns

Figura 2.8 C - TPK1

1way ANOVA Sidak's multiple comparisons test

	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
wt vs snf1Δ	0,7019	0.3232 to 1.081	Yes	**
wt vs snf1Δ + pl Snf1	-0,1272	-0.5059 to 0.25	No	ns
wt vs snf1Δ + pl Snf1 T210A	0,6404	0.2617 to 1.019	Yes	**

Figura 2.8 D - TPK1

Unpaired t test

	WT vs hxx2Δ
P value	0,0105
P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=9.666 df=2

Figura 2.9

TPK1

2way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary
wt vs tpk1 ^{w1} BCY1	0,1482	0,1898	No	ns
wt vs TPK1bcy1Δ	-0,1304	0,1669	No	ns
tpk1 ^{w1} BCY1 vs TPK1bcy1Δ	-0,2786	0,3567	No	ns

TPK2

2way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary
wt vs tpk1 ^{w1} BCY1	-1,080	2,228	No	ns
wt vs TPK1bcy1Δ	0,5391	1,112	No	ns

tpk1 ^{w1} BCY1 vs TPK1bcy1Δ	1,619	3,340	Yes	*
--------------------------------------	-------	-------	-----	---

TPK3

2way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary
wt vs tpk1 ^{w1} BCY1	-2,620	4,957	Yes	**
wt vs TPK1bcy1Δ	0,3967	0,7506	No	ns
tpk1 ^{w1} BCY1 vs TPK1bcy1Δ	3,016	5,708	Yes	**

BCY1

2way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison Test

	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary
wt vs tpk1 ^{w1} BCY1	0,2311	0,9359	No	ns
wt vs TPK1bcy1Δ	0,1397	0,5660	No	ns
tpk1 ^{w1} BCY1 vs TPK1bcy1Δ	-0,09131	0,3699	No	ns

Figura 2.10

ChIP Cat8

t test

	Difference	t	P value	Summary
Glucosa	0,302547	0,907848	0,459785	ns
Glicerol	5,88181	9,42098	0,0110801	*

ChIP Rpb1

t test

	Difference	t	P value	Summary
Glucosa	0,5	0,9998	0,4227	ns
Glicerol	16,5	6,6	0,0221954	*

ChIP Mig1

t test

	Difference	t	P value	Summary
Glicerol	0,55	3,66667	0,0669922	ns

12. Análisis Estadísticos: Capítulo 3

Figura 3.6 panel superior

2way ANOVA Dunnett's multiple comparisons test

TPK1	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
-I -C vs. +I -C	-0,3794	-0.6545 to -0.1043	Yes	*
-I -C vs. -I +C	-0,3613	-0.6363 to -0.08622	Yes	*
-I -C vs. +I +C	-0,6197	-0.8947 to -0.3446	Yes	**

TPK2	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
-I -C vs. +I -C	-0,4996	-0.7747 to -0.2246	Yes	**
-I -C vs. -I +C	-1,126	-1.401 to -0.8508	Yes	****
-I -C vs. +I +C	-1,071	-1.346 to -0.7955	Yes	****

TPK3	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
-I -C vs. +I -C	-0,6365	-0.9116 to -0.3615	Yes	***
-I -C vs. -I +C	-0,9200	-1.195 to -0.6449	Yes	***
-I -C vs. +I +C	-0,7000	-0.9751 to -0.4249	Yes	***

Figura 3.6 panel inferior

2way ANOVA Sidak's multiple comparisons test

-I vs +I	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
TPK1	-0,6411	-0.8906 to -0.3916	Yes	**
TPK2	-0,5974	-0.8468 to -0.3479	Yes	**
TPK3	-0,6474	-0.8969 to -0.3980	Yes	**

Figura 3.6 C

2way ANOVA Sidak's multiple comparisons test

+ Pi - - Pi	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
TPK1	0,7755	0.4261 to 1.125	Yes	***
TPK2	0,4469	0.09753 to 0.7963	Yes	*
TPK3	0,9862	0.6368 to 1.336	Yes	****
BCY1	1,422	1.072 to 1.771	Yes	****

Figura 3.7

2way ANOVA Dunnett's multiple comparisons test

TPK1	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
WT [I]=22uM vs. ino2Δ	0,8878	0.1963 to 1.579	Yes	**
WT [I]=22uM vs. ino4Δ	0,8746	0.1832 to 1.566	Yes	**
WT [I]=22uM vs. opi1Δ	-0,9361	-1.628 to -0.2447	Yes	**
WT [I]=22uM vs. scs2Δ	-0,07550	-0.7669 to 0.6159	No	ns
WT [I]=22uM vs. dgk1Δ	-0,2709	-0.9624 to 0.4205	No	ns

TPK2	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
WT [I]=22uM vs. ino2Δ	0,7341	0.04266 to 1.426	Yes	*
WT [I]=22uM vs. ino4Δ	0,7363	0.04490 to 1.428	Yes	*
WT [I]=22uM vs. opi1Δ	-1,259	-1.951 to -0.5676	Yes	****
WT [I]=22uM vs. scs2Δ	-0,3237	-1.015 to 0.3677	No	ns
WT [I]=22uM vs. dgk1Δ	-1,200	-1.892 to -0.5086	Yes	***

TPK3	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
WT [I]=22uM vs. ino2Δ	0,7400	0.04856 to 1.431	Yes	*
WT [I]=22uM vs. ino4Δ	-0,1368	-0.8282 to 0.5546	No	ns
WT [I]=22uM vs. opi1Δ	-0,04269	-0.7341 to 0.6487	No	ns
WT [I]=22uM vs. scs2Δ	-0,3331	-1.025 to 0.3584	No	ns
WT [I]=22uM vs. dgk1Δ	0,3525	-0.3390 to 1.044	No	ns

Figura 3.8

2way ANOVA Dunnett's multiple comparisons test

TPK1	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
BY4741 vs. cbf1Δ	-0,4749	-1.902 to 0.9523	No	ns
BY4741 vs. mot3Δ	0,7366	-0.6905 to 2.164	No	ns
BY4741 vs. flo8Δ	-2,429	-3.856 to -1.002	Yes	***
BY4741 vs. swi4Δ	0,5843	-0.8428 to 2.011	No	ns
BY4741 vs. rtg2Δ	0,7717	-0.6554 to 2.199	No	ns

TPK2	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
BY4741 vs. cbf1Δ	-3,510	-4.937 to -2.083	Yes	****
BY4741 vs. mot3Δ	0,4569	-0.9702 to 1.884	No	ns
BY4741 vs. flo8Δ	-1,367	-2.794 to 0.06000	No	ns
BY4741 vs. swi4Δ	-0,4212	-1.848 to 1.006	No	ns
BY4741 vs. rtg2Δ	0,6827	-0.7444 to 2.110	No	ns

TPK3	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
BY4741 vs. cbf1Δ	-0,3979	-1.825 to 1.029	No	ns
BY4741 vs. mot3Δ	-0,3502	-1.777 to 1.077	No	ns
BY4741 vs. flo8Δ	-8,297	-9.724 to -6.870	Yes	****
BY4741 vs. swi4Δ	0,3356	-1.092 to 1.763	No	ns
BY4741 vs. rtg2Δ	0,5260	-0.9012 to 1.953	No	ns

BCY1	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
BY4741 vs. cbf1Δ	-3,366	-4.793 to -1.939	Yes	****
BY4741 vs. mot3Δ	-1,116	-2.543 to 0.3111	No	ns
BY4741 vs. flo8Δ	-4,006	-5.433 to -2.579	Yes	****
BY4741 vs. swi4Δ	0,3288	-1.098 to 1.756	No	ns
BY4741 vs. rtg2Δ	0,7694	-0.6577 to 2.197	No	ns

1way ANOVA Dunnett's Multiple Comparison Test

TPK1	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
BY4741 vs. cbf1Δ	-0,3810	2,277	No	ns
BY4741 vs. mot3Δ	0,6891	4,119	Yes	**
BY4741 vs. flo8Δ	-2,407	14,39	Yes	***
BY4741 vs. swi4Δ	0,4975	2,974	Yes	*
BY4741 vs. rtg2Δ	0,7505	4,486	Yes	**

TPK2	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
BY4741 vs. cbf1Δ	-2,714	3,599	Yes	**
BY4741 vs. mot3Δ	0,3797	0,5036	No	ns
BY4741 vs. flo8Δ	-1,081	1,571	No	ns

BY4741 vs. swi4Δ	-0,2371	0,2937	No	ns
BY4741 vs. rtg2Δ	0,5758	0,7636	No	ns

TPK3

	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
BY4741 vs. cbf1Δ	-0,3979	0,5848	No	ns
BY4741 vs. mot3Δ	-0,3502	0,5147	No	ns
BY4741 vs. flo8Δ	-8,297	12,20	Yes	***
BY4741 vs. swi4Δ	0,3356	0,4932	No	ns
BY4741 vs. rtg2Δ	0,5260	0,7730	No	ns

BCY1

	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
BY4741 vs. cbf1Δ	-3,366	4,813	Yes	***
BY4741 vs. mot3Δ	-1,116	1,596	No	ns
BY4741 vs. flo8Δ	-4,006	5,728	Yes	***
BY4741 vs. swi4Δ	0,3288	0,4703	No	ns
BY4741 vs. rtg2Δ	0,7694	1,100	No	ns

13. Pruebas de Normalidad de los valores de $\log_2(\text{GFP}:\text{RFP})$

Ho: los datos tienen distribución normal
si el estadístico es mayor que el p, no se rechaza la hipótesis

Shapiro-Wilks: sobre valores $\log_2(\text{GFP}:\text{RFP})$

Kolmogorov: sobre valores Z

TPK1

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Columna2	4478	0,36	0,25	0,84	<0,0001

Prueba de bondad de ajuste (Kolmogorov)

Variable	Ajuste	media	varianza	n	Estadístico D	p-valor
Columna1	Normal(0,1)	-4,6E-10	1,00	4478	0,10	<0,0001

TPK2

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Columna1	4908	0,43	0,19	0,96	<0,0001

Prueba de bondad de ajuste (Kolmogorov)

Variable	Ajuste	media	varianza	n	Estadístico D	p-valor
Columna2	Normal(0,1)	2,3E-08	1,00	4908	0,06	<0,0001

TPK3

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Columna1	4911	0,41	0,21	0,93	<0,0001

Prueba de bondad de ajuste (Kolmogorov)

Variable	Ajuste	media	varianza	n	Estadístico D	p-valor
C-6,959491562	Normal(0,1)	-1,6E-09	1,00	4911	0,11	<0,0001

BCY1

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Columna1	4911	0,44	0,27	0,87	<0,0001

Prueba de bondad de ajuste (Kolmogorov)

Variable	Ajuste	media	varianza	n	Estadistico D	p-valor
C-6,959491562	Normal(0,1)	0,01	1,01	4911	0,13	<0,0001

14. Reguladores putativos.

TPK1		TPK2		TPK3		BCY1	
Activadores	Inhibidores	Activadores	Inhibidores	Activadores	Inhibidores	Activadores	Inhibidores
ACO1	ADE6	ADE2	ACB1	ACO1	ADE4	AAC1	ADE4
ADE1	AGP2	ADH3	ACK1	ADH3	AIR1	ABF2	BUD22
ADE2	AIM45	ADK1	ACN9	ADK2	ALP1	ADE17	FLO8
ADO1	ALE1	ADO1	ADE6	AIM25	CKA1	ADH3	KEL1
AHT1	ALG5	AIM25	ADK1	AIM29	CKB2	ADH6	MOT3
AIM46	ALG9	AIM4	AHA1	AIP1	DAL5	ADK2	RSM25
AIP1	ARA2	APS3	AIM7	ALD3	DFG5	AEP1	SNX4
ANP1	ARC18	ARC1	ALT2	APL6	ELP3	AIP1	TMA19
ANS1	ATG19	ARC18	APT2	ARC1	FLO8	ARG7	YHR095w
APL1	BNA1	ARD1	ARO3	ARC18	FPK1	ARG81	YJL135w
ARC1	BTS1	ARG7	ARO4	ARD1	GAD1	ARO1	YJL199c
ARG82	BUD16	ARO1	ASF2	ARG7	GGA2	AST2	YKL044w
ARP8	BUD25	ARO7	ATG20	ARG81	HOT13	ATP25	YKL077w
ATP25	CAF120	ARR3	BAP3	ARG82	KGD2	AVO2	YKL151c
AVT7	CGI121	ATR1	BMH2	ARO1	MOT3	AVT6	YMR018w
BAR1	CLN2	BIO4	BSC2	ARR3	MSB3	BOI2	
BUD19	CPA2	BUD19	BUD9	ATG22	MUS81	BSC6	
BUD20	CPR6	BUD20	CAD1	BCK2	NDE1	BUB2	
BUD27	CUP9	BUD25	CAF16	BIO5	OST3	BUD19	
CBF1	CYC1	BUD28	CLB3	BUD19	OSW5	BUL2	
CCM1	DCW1	BUD7	COS12	BUD23	PIG2	CAX4	
CDA2	DDI3	CCE1	CUL3	BUD25	PPM1	CBF1	
COX15	DDR48	CDA2	CWH41	BUD27	PPQ1	CHD1	
CPR2	DEG1	CIN4	DAP2	BUL2	PUF3	CHO2	
CSN12	ELA1	CNA1	DLD3	CAF130	RAD33	CLN3	
CTK1	ELC1	CNM67	DNF3	CAT2	RPN13	CMK2	
CTK3	EMI5	COS10	DPB4	CDC50	TIR3	CNA1	
CUE3	FEN1	CTK1	EBS1	CIK1	VHS3	COQ3	
CWH36	FRK1	CTK2	ECM18	CIN4	VTS1	COQ5	
DAL2	GEF1	CTK3	EDC3	COS10	YDR509w	COS10	
DBF2	GUP2	CWH36	EKI1	COX15	YEL020c	COX11	
DHH1	HAL1	DAL2	ENT1	CPA2	YIL032c	COX15	
DMC1	HIR3	DID4	FKH1	CPR7	YIM1	CPA2	
DOA4	HNT3	EAP1	FLC3	CSM1	YJL135w	CTF18	
DOC1	HST1	ELP6	FMP52	CTF18	YMR144w	CTK1	
DOT5	HTD2	END3	FZF1	CTK1	YMR147w	CTK3	
EAP1	HUL4	ERG2	GAL3	CTK3	YMR252c	CUE4	
ECM7	ICY2	ERG6	GIN4	CTP1		DAT1	
EDC2	ILM1	FCY22	GLT1	CUE4		DIA1	
EDE1	INO4	FEN1	GRX2	DDI1		DID2	
EFM1	ITT1	FLO1	HBT1	DID2		DLT1	
ELM1	KGD2	FUN12	HIM1	DLT1		DMC1	
ERF2	LEM3	GAS2	HNT1	DMC1		DNF1	
ERG28	MDM12	GET1	HRQ1	DPB3		DOT6	
ERJ5	MGR2	GIM5	IPK1	DSE4		DSE1	

ERP6	MGS1	GIS4	IRC22	EAP1	DYN2
FCY22	MIR1	GND1	ISW1	EAR1	EAR1
FDC1	MLC2	GSH2	IVY1	ECM30	ECM32
FRE7	MUK1	GTR1	KGD2	ECM4	EK11
FUN12	NAM2	GTR2	KSP1	ELP6	ELP6
GAT2	NEJ1	GVP36	LRG1	FAA1	ERC1
GEF1	NTA1	HBS1	LRS4	FCY22	FAA1
GET1	NUP170	HIR2	LYS21	FET3	FAR3
GLO3	PBI2	HIT1	MCX1	FRE4	FAU1
GLY1	PDH1	HMI1	MFB1	FUN12	FET3
GND2	PDR12	HNT3	MFT1	GAS2	FET4
GOS1	PDR16	ICP55	MOT3	GIM5	FKS3
GPG1	PET191	INP51	MRH1	GLC8	FMP10
GRX1	PGU1	IRC19	MSC7	GLO3	FMP21
GRX5	PHM7	KCS1	MTC3	GLY1	FPR3
GTR1	PLB3	KRE6	MTC5	GTR1	FTR1
GTR2	PNG1	LAG1	NDE2	GTR2	GET1
HEM14	PPM1	LEO1	NRP1	HCR1	GLC3
HIT1	PPM2	LEU3	PAU2	HEM14	GLC8
HOP2	PPT2	LEU4	PBP4	HIT1	GLO3
HOT1	PTK2	LIP5	PCT1	HMG2	GRX4
HSE1	RAD26	LSC2	PKH1	HXT17	GTR1
HSP104	RAV1	LTV1	PKH3	ICP55	HAL9
HXK1	REC107	MCT1	PMT6	IES3	HEM14
HXT3	RIM13	MDM10	PNC1	ILV1	HMI1
IDH1	RPL7b	MDM32	PPH21	ISF1	HTL1
IDH2	RPS4a	MDM34	PPM1	IZH4	HXT17
IES3	RRT8	MDY2	PPN1	KAR5	ICP55
ILV1	RSM7	MED2	PST1	KCS1	IES3
IMG2	SAG1	MET1	PTP1	KEM1	ILV1
INP51	SAM3	MET10	PUT2	LEU4	IRC21
IPP1	SAP190	MET14	RAD34	LSC2	ISC10
IRC19	SET6	MET16	RAD61	MAG1	ISF1
IRC4	SGE1	MET18	RAD9	MAL13	ITR2
IRC6	SHU2	MET28	RBG2	MAL31	IZH4
IRE1	SKO1	MET3	RBS1	MAL33	JLP2
ISC1	SOD2	MGM1	RCR2	MAP1	LPD1
ISF1	SRB2	MGM101	RGT2	MCH4	MAG1
IST1	SRL4	MGS1	RNH202	MDM10	MAL33
IST3	STB1	MHR1	RPL12a	MDS3	MAM1
IZH4	SYH1	MIG3	RPL37b	MDY2	MCH4
JHD2	TEA1	MIP1	RPL41a	MED2	MCH5
JLP2	TES1	MON2	RTA1	MET1	MDH2
KCS1	THI21	MRP10	RTN1	MET10	MDM1
KEL1	TOM5	MRP21	RTN2	MET14	MDM34
KEM1	TPK2	MRPL15	RTR2	MET28	MDY2
KRE27	TRE1	MRPL33	SAC7	MET3	MET14
KSP1	ULA1	MRPL35	SAP190	MET5	MET5

LEU4	VTS1	MRPS35	SAS4	MGA1	MET6
LGE1	WAR1	MRPS8	SFA1	MGA2	MGR3
LIA1	XPT1	MSE1	SHM1	MGS1	MHP1
LIP2	YBR204c	MSH2	SLC1	MKS1	MLH2
LST4	YGR069w	MSM1	SLI1	MNT4	MPD2
LYS2	YIG1	MSW1	SNG1	MRPL16	MRH4
MAM33	YJR037w	NAS2	SPO71	MRPL17	MRPL17
MAP1	YLL007c	NAT3	SPR28	MSH2	MRPS8
MDH2	YLR217w	NCR1	SPS2	MSH3	MSB4
MDJ2	YNL013c	NCS2	STF2	MSM1	MTG1
MDM34	YNL028w	NFU1	SWF1	MSN1	MTG2
MDS3	YNL134c	NHX1	TCA17	MUB1	MYO5
MED2	YNL165w	NSR1	TDH3	MVP1	NAB6
MET16	YNL170w	OPT1	THI4	MYO5	NAM7
MET18	YNL193w	PAN6	TIM13	NCS2	NAT4
MET28	YNL320w	PCL7	TMA20	NDI1	NCS2
MET3	YNL338w	PDE2	TPC1	NSR1	NDI1
MET5	YOL024w	PEP12	TRM82	NUP133	NDJ1
MET7	YOL029c	PET123	TVP15	PAI3	NHX1
MIP1	YOL036w	PFD1	UBX5	PEP7	NSR1
MKS1	YOL037c	PGD1	UGA3	PER1	NTA1
MLF3	YOL046c	PHO87	UGA4	PFS1	NUP188
MMT2	YOL047c	PIB2	VBA4	PGD1	ODC1
MPD2	YOL050c	PLC1	VCX1	PGM2	OXA1
MRPL24	YOL057w	POG1	VEL1	PGU1	PDA1
MRPS28	YOL083w	POM33	WSC4	PHO87	PEA2
MRPS35	YOL085c	PPQ1	YBL083c	PIB2	PEP7
MSD1	YOL159c	PPT2	YBR204c	PIH1	PFK27
MSF1	YOX1	PSO2	YDL114w	PKR1	PGM2
MSM1	YPL009c	PTC1	YDL121c	PLC1	PHA2
MTC2	YPL025c	PUS1	YDL129w	PMP1	PHO84
NCR1	YPL035c	QCR8	YDL144c	POL32	PIB2
NHX1	YPL066w	RAD5	YDL157c	POR1	PIH1
NOT3	YPL073c	RAI1	YDL186w	PPA1	PKH2
NUP53	YPL080c	RDS1	YDL199c	PPM2	PKR1
OCT1	YPL107w	REF2	YDL206w	PRM6	PMD1
OSM1	YPL108w	RGC1	YDL242w	PSO2	PML39
PAP2	YPL113c	RPA49	YDR010c	PTR2	POM152
PCI8	YPL114w	RPL13b	YDR015c	RAD4	PPA1
PCL7	YPL162c	RPL1b	YDR018c	RAD5	PRM1
PCL9	YPL191c	RPL21a	YDR029w	RAD50	PRM6
PDE2	YPL205c	RPL22b	YDR042c	RAD51	PTK2
PDR18	YPL216w	RPL23b	YDR056c	RAI1	PTR2
PDX3	YPL225w	RPL2b	YDR095c	RAV1	PUG1
PEP12	YPR003c	RPL34b	YDR112w	REF2	RAD10
PEP7	YPR090w	RPL39	YDR133c	RIF2	RAD24
PES4	YPR098c	RPL7a	YDR134c	RMD9	RAD4

PET130	YPR157w	RPS10b	YDR154c	RPB4	RAD5
PFK2	YPR172w	RPS27b	YDR154c	RPH1	RAD50
PHM8		RRG8	YDR209c	RPL21a	RAD51
PHO85		RRG9	YDR222w	RPL23b	RAI1
PHO87		RSA1	YDR266c	RPL39	RCO1
PIB2		RSM7	YDR278c	RPS19a	REC114
PLC1		RTF1	YDR352w	RPS1a	REF2
PMD1		RTG2	YDR374c	RPS7a	RIM4
PML1		RTR1	YDR387c	RSM7	RIM9
POR1		RUD3	YDR401w	RTF1	RPH1
PPQ1		SAP155	YDR426c	RTG2	RPL23b
PRO1		SCS2	YDR514c	RTG3	RPL24a
PSO2		SCS3	YEL014c	RTR1	RPL39
PUT3		SEC22	YEL023c	SAK1	RPS18b
RAD10		SFP1	YEL025c	SAP155	RPS19a
RAD24		SHP1	YEL047c	SAY1	RPS26b
RAD5		SIP3	YEL059w	SCM4	RPS27b
RAD6		SIR1	YER079w	SCS2	RPS7a
RAI1		SLM4	YGL010w	SCS22	RRI2
RED1		SLX8	YGL230c	SHR5	RSC1
REF2		SNF7	YGL242c	SIR1	RTC1
RPB9		SNF8	YGL260w	SLM4	RTF1
RPL1b		SNT1	YGR001c	SLX8	RTR1
RPL27a		SOH1	YGR021w	SNO1	RVS167
RPL2b		SPE2	YGR131w	SNZ1	SAK1
RPL34b		SPO22	YGR149w	SPG4	SAS2
RPL39		SPT10	YHL017w	SPO21	SCS2
RPL7a		SPT3	YHP1	SPO7	SDC1
RPS14a		SPT4	YKL077w	SPT3	SHC1
RRG1		SRB2	YPS5	SPT4	SHO1
RRG8		SSH1		SRB2	SLX8
RRT13		SSK1		SRB8	SNF7
RRT5		STL1		SST2	SNF8
RSM19		STO1		SSZ1	SNO1
RSM23		SUR1		STE24	SNZ1
RSM24		SUR4		STO1	SOV1
RSN1		SWF1		STV1	SPG4
RTC1		SWI4		SWI4	SPI1
RTF1		SWS2		TFP1	SPO21
RTG2		SYS1		TFP3	SPO22
RTG3		THP1		THI7	SPR6
RVS167		THR4		THR1	SRB2
SAC1		TMA7		TMA7	SRT1
SCS2		TOM70		TRK1	SSA4
SCS3		TOM71		TRM10	SSN2
SCT1		TOR1		TRP2	STB2
SCW4		TRK1		TSR2	STE11

SDC1	TRM10	TUS1	STV1
SEC22	TYR1	TYR1	TMN3
SER1	UBC8	UBP9	TMT1
SER2	UBI4	UBX4	TOS6
SFP1	UBX2	UBX7	TRM10
SGF73	UBX4	UGO1	TRM11
SHP1	VHS1	UMP1	TRP2
SIN4	VMA13	UNG1	TUB3
SKM1	VMA21	VBA1	UBP9
SLA1	VMA22	VBA2	UBX4
SLM4	VMA4	VMA2	URA5
SNF7	VMA5	VMA21	VMA21
SNT1	VMA7	VMA5	VMA22
SOH1	VPH1	VMA7	VPH1
SPE1	VPH2	VPH1	VPS54
SPF1	VPS25	VPS20	VPS55
SPO22	VPS27	VPS55	VPS60
SPO73	VPS28	VTC4	WSC3
SPO74	VPS36	WSC3	YBR209w
SPT10	VPS4	YAF9	YCK3
SPT3	VPS54	YBR209w	YCL001w-a
SPT4	VPS63	YCL001w-a	YDR455c
SRB2	VRP1	YCR025c	YEL045c
SSP1	VTC4	YCR043c	YER077c
STE3	WSC3	YCR049c	YER084w
STL1	YAF9	YCR087w	YER108C
STP2	YBR266c	YCR099c	YER119c-a
SWA2	YBR277c	YCR100c	YER121w
SYC1	YCL001w-a	YDR114c	YER128w
SYG1	YCL074w	YDR417c	YER130c
TDH2	YCL076w	YEL045c	YER135c
TFP3	YCR049c	YER039c-a	YER137c
THO1	YCR102c	YER097w	YER152c
THP1	YDJ1	YER119c-a	YER156c
TMA7	YDR114c	YER128w	YER158c
TMN3	YDR417c	YER152c	YER163c
TOM71	YDR532c	YER156c	YER181c
TPD3	YER119c-a	YGR018c	YER184c
TRK1	YER156c	YGR025w	YER186c
TRK1	YET1	YGR064w	YGK3
TRR2	YGL214w	YGR237c	YGR050c
TSR2	YGL218w	YGR242w	YGR064w
UBP1	YGR018c	YHR039C-B	YGR122w
UBP6	YGR025w	YHR079C-B	YGR210c
UBS1	YGR064w	YHR140w	YHR045w
UGO1	YGR201c	YHR162w	YHR079C-B
UME6	YGR269w	YIL012w	YHR140w

VHS1	YGR272c	YIR016w	YHR162w
VID30	YHR127w	YIR042c	YIL012w
VMA13	YHR130c	YJL007c	YJR061w
VMA21	YIL012w	YJR026w	YKR070w
VMA4	YIL028w	YJR030c	YKU80
VMA7	YIL096c	YJR142w	YLL059c
VPH1	YIR016w	YKR070w	YLR030w
VPS28	YJL007c	YLR030w	YLR031w
VPS4	YJR018w	YLR050c	YLR040c
VPS52	YJR030c	YLR428c	YLR041w
VPS54	YJR087w	YLR446w	YML090w
WSC3	YJR142w	YLR460c	YML119w
YAF9	YLR338w	YML122c	YML122c
YAP1801	YLR446w	YMR052c-a	YMR052c-a
YBL100c	YME1	YMR057c	YMR057c
YBR209w	YML122c	YMR085w	YMR082c
YBR300c	YMR099c	YMR087w	YMR084w
YCL023c	YNL120c	YMR099c	YMR085w
YCR049c	YNL171c	YMR130w	YMR086w
YCR087c-a	YNL226w	YNL120c	YMR087w
YCR087w	YNR073c	YNR061c	YMR090w
YDL073w	YOL087c	YNR073c	YMR099c
YDR114c	YOR364w	YOL013w-a	YMR102c
YDR115w	YPC1	YOL087c	YMR103c
YDR132c	YPR044c	YOL098c	YMR114c
YDR186c	YPR045c	YOL099c	YMR119w-a
YDR455c	YPS6	YOL106w	YMR122c
YDR532c	YPT6	YOL160w	YMR130w
YEL045c	YSC84	YOL162w	YMR181c
YER084w	YTA7	YOR364w	YMR209c
YER119c-a	YUH1	YPS6	YMR279c
YER158c	YVH1	YTA12	YMR315w
YFR054c		YTA7	YMR316c-a
YGL108c		YUH1	YMR316c-b
YGL199c		YVH1	YMR317w
YGL218w		ZEO1	YMR320w
YGP1			YNR071c
YGR011w			YNR073c
YGR064w			YOL013w-a
YGR102c			YOL087c
YGR122w			YOL092w
YGR269w			YOL098c
YGR272c			YOL099c
YGR290w			YOL106w
YHR009c			YOL107w
YHR078w			YOL131w
YHR080c			YSC83
YHR127w			YSC84

YHR138c
YHR159w
YIL059c
YIL086c
YIL096c
YIR042c
YJL016w
YJL017w
YJL021C
YJL022w
YJL027c
YJL028w
YJR008w
YJR087w
YJR098c
YKL107w
YKL131w
YKL177w
YKR070w
YLR125w
YLR287c
YLR334c
YLR446w
YML020w
YML096w
YMR082c
YMR085w
YMR099c
YMR111c
YMR122c
YMR244w
YMR254c
YMR310c
YNL208w
YNR048w
YNR073c
YOL150c
YOR008c-a
YOR135c
YPT11
YPT31
YRA2
YSC84
YUH1
ZAP1

YVH1
ZEO1

15. Lista de ORFs que surgen con frecuencia en los análisis de R-SGA

ACF4	COX10	JJJ1	PAC1	RPN10	VAM7
ADH1	COX12	JNM1	PAH1	RPO41	VIK1
AEP2	COX14	LAS21	PAM17	RPP1B	VIP1
AIM18	COX17	LDB18	PAT1	RPP2B	VMS1
AIM26	COX23	LEA1	PEP8	RPS21B	VPS1
AIM31	COX7	LRP1	PET122	RPS25A	VPS17
AIM38	COX8	LSM1	PET8	RTC6	VPS29
ARP1	CSE2	LSM6	PEX2	RTT103	VPS30
ARP6	CSG2	LSM7	PEX4	SAC3	VPS35
ARV1	CTF8	LTE1	PEX5	SCD6	VPS41
ASC1	CYC2	MAD1	PEX6	SCS7	VPS5
ATG10	CYT1	MAD2	PEX8	SEC66	VPS51
ATG13	CYT2	MAD3	PHO88	SEM1	VPS70
ATG23	DBP7	MCK1	PIN4	SFC1	VPS71
ATG4	DBR1	MED1	PMR1	SGF29	VPS72
ATG7	DST1	MNE1	PSD1	SGN1	WHI2
ATG8	DYN1	MNN10	PSP2	SHE1	YPT7
ATG9	DYN3	MOG1	PTC6	SKN7	YUR1
ATP10	ECM1	MON1	PTH1	SKY1	
ATP23	ECM29	MRP13	PUB1	SLG1	
AVT5	ENT4	MRP49	PUF6	SLM6	
BCS1	EOS1	MRPL1	QCR2	SLX9	
BEM2	FMC1	MRPL39	QCR9	SMI1	
BEM4	GDT1	MRT4	QRI7	SNA3	
BIM1	GIM3	MSC1	RAD23	SPT8	
BMH1	GOS1	MSC6	REI1	SWC3	
BNA2	GYP1	MSS18	RHO5	SWC5	
BRE5	HAP2	MUD2	RIC1	SWM2	
BUD31	HAP3	NBP2	RIF1	SWR1	
CAT5	HAP4	NEM1	ROM2	SXM1	
CBC2	HAP5	NHP10	RPL11B	TCM62	
CBP4	HMF1	NIP100	RPL16A	TLG2	
CBT1	HPM1	NOP12	RPL17B	TMA23	
CCZ1	HSV2	NPR1	RPL19A	TPS2	
CHL1	HTZ1	NPR2	RPL19B	TRS85	
CHS3	HUR1	NPR3	RPL21B	UBA4	
CLA4	IES2	NUM1	RPL22A	UBP3	
CLB2	IES5	NUP2	RPL26B	UBR2	
COA4	IML2	NUT1	RPL2A	UFD2	
COG5	INO1	OLA1	RPL37A	UPF3	
COG6	INP52	OMS1	RPL43A	URM1	
COG7	IRA2	OPI1	RPL43B	VAC8	
COG8	IRS4	OPI11	RPL6B	VAM10	
COQ10	IST2	OPI8	RPL8A	VAM3	
COQ2	JID1	PAA1	RPL9B	VAM6	

16. Definiciones

Número de genes en cada base de datos: 6603

k: número de genes *input* en una categoría dada

f: número total de genes en una categoría dada

Los valores p representan la probabilidad de que la intersección de una lista dada con cualquier categoría funcional ocurra por casualidad. La corrección de Bonferroni divide al valor umbral de p, que se consideraría significativo para un test individual, por el número de tests realizados y por lo tanto representa la falsa significancia debida al testeo múltiple sobre las categorías de una base de datos.

17. Agrupamiento en categorías de los reguladores de *TPK1* con $p < 0,05$

GO Molecular Function

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
transcription regulator activity [GO:0030528]	0.000376916	RTG3 UME6 RPB9 RPL7A RTG2 NOT3 CBF1 YOX1 INO4 RPL7B	10	41
inositol trisphosphate 3-kinase activity [GO:0008440]	0.00482238	KCS1 ARG82	2	2
inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate kinase activity [GO:0000827]	0.00482238	KCS1 ARG82	2	2
isocitrate dehydrogenase (NAD+) activity [GO:0004449]	0.00482238	IDH1 IDH2	2	2
phospholipase C activity [GO:0004629]	0.0137994	ISC1 PLC1	2	3
endopeptidase inhibitor activity [GO:0004866]	0.0137994	YHR138C PBI2	2	3
cyclin-dependent protein kinase activity [GO:0004693]	0.0143569	CTK1 CTK3 PHO85	3	8
5'-3' exonuclease activity [GO:0008409]	0.0263326	KEM1 PSO2	2	4
ubiquitin thiolesterase activity [GO:0004221]	0.0387486	UBP1 DOA4 UBP6 YUH1	4	19
ubiquitin binding [GO:0043130]	0.0403389	SLA1 EDE1 SWA2 CUE3 HSE1 MGS1	6	37
DNA strand annealing activity [GO:0000739]	0.0418862	RAD10 MGS1	2	5
O-acyltransferase activity [GO:0008374]	0.0418862	ALE1 GUP2	2	5
hexokinase activity [GO:0004396]	0.0418862	HXK1 YLR446W	2	5
transcription elongation regulator activity [GO:0003711]	0.0418862	ELA1 ELC1	2	5
inorganic phosphate transmembrane transporter activity [GO:0005315]	0.0418862	PHO87 MIR1	2	5
cofactor binding [GO:0048037]	0.0458263	LYS2 YPL113C PPQ1	3	12
ubiquitin-specific protease activity [GO:0004843]	0.0458656	UBP1 DOA4 UBP6 YUH1	4	20
double-stranded DNA binding [GO:0003690]	0.0471682	THO1 DMC1 HOP2 ACO1 THP1	5	29

GO Biological Process

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
vacuolar acidification [GO:0007035]	0.000262057	RRG1 NHX1 VMA7 DBF2 RAV1 VPH1 VMA4 VMA13	8	26

transcription-coupled nucleotide-excision repair [GO:0006283]	0.000834918 RPB9 SPT4 RAD26 THP1 ELC1	5	12
inositol phosphate biosynthetic process [GO:0032958]	0.00300217 KCS1 ARG82 PLC1	3	5
propionate metabolic process [GO:0019541]	0.00300217 ACO1 PDR12 PDH1	3	5
protein complex localization [GO:0031503]	0.00482238 ATG19 ATG34	2	2
endoplasmic reticulum inheritance [GO:0048309]	0.00569541 SWA2 SCS2 YPT11	3	6
mitochondria-nucleus signaling pathway [GO:0031930]	0.00569541 RTG3 RTG2 MKS1	3	6
cysteine biosynthetic process [GO:0019344]	0.0072802 MET28 MET3 MET5 MET16	4	12
mitotic recombination [GO:0006312]	0.00994702 IRC4 IRC19 RAD10 ARP8	4	13
mitochondrial genome maintenance [GO:0000002]	0.010712 RRG1 KGD2 UGO1 CCM1 ILM1 ACO1 RRG8	7	36
positive regulation of transcription elongation, DNA- dependent [GO:0032786]	0.0137994 CTK1 CTK3	2	3
regulation of protein stability [GO:0031647]	0.0137994 PCL7 PHO85	2	3
histone monoubiquitination [GO:0010390]	0.0137994 RAD6 RTF1	2	3
tricarboxylic acid cycle [GO:0006099]	0.0154956 KGD2 ACO1 IDH1 EMI5 MDH2 IDH2	6	30
cell redox homeostasis [GO:0045454]	0.0181208 GRX1 TRR2 DOT5 POR1 MPD2 GRX5	6	31
de novo' IMP biosynthetic process [GO:0006189]	0.0204396 ADE1 ADE6 ADE2	3	9
sporulation resulting in formation of a cellular spore [GO:0030435]	0.0254942 SPO73 PMD1 DMC1 RAD6 SPO74 MDS3 SSP1 SPO22 IRC19 RED1 CDA2 HST1 EMI5	13	103
negative regulation of gene expression [GO:0010629]	0.0263326 MAP1 SKM1	2	4
cellular response to anoxia [GO:0071454]	0.0263326 OSM1 SNF7	2	4
glycerol transport [GO:0015793]	0.0263326 STL1 GUP2	2	4
threonine catabolic process [GO:0006567]	0.0263326 GLY1 ILV1	2	4
reactive oxygen species metabolic process [GO:0072593]	0.0263326 SOD2 TDH2	2	4
potassium ion transmembrane transport [GO:0071805]	0.0263326 NHX1 TRK1	2	4
regulation of establishment or maintenance of cell polarity [GO:0032878]	0.0263326 PCL9 PHO85	2	4
response to drug [GO:0042493]	0.026468 ELM1 MLF3 PDR16 YNR048W SGE1	5	25

ATP hydrolysis coupled proton transport [GO:0015991]	0.0265471 VMA7 VPH1 VMA4 VMA13	4	17
deadenylation-dependent decapping of nuclear-transcribed mRNA [GO:0000290]	0.0277194 DHH1 EDC2 RAI1	3	10
termination of RNA polymerase II transcription, poly(A)-coupled [GO:0030846]	0.0277194 REF2 RAI1 SYC1	3	10
regulation of transcription involved in G1/S phase of mitotic cell cycle [GO:0000083]	0.0277194 PCL9 HIR3 PHO85	3	10
purine nucleotide biosynthetic process [GO:0006164]	0.0323104 ADE1 ADE6 XPT1 ADE2	4	18
purine base metabolic process [GO:0006144]	0.0361897 DAL2 ADO1 ADE2	3	11
sulfate assimilation [GO:0000103]	0.0361897 MET3 MET5 MET16	3	11
cellular amino acid biosynthetic process [GO:0008652]	0.0381808 LYS2 PRO1 ILV1 SER2 MET28 MET3 CPA2 MET5 YML096W LEU4 SER1 MET16	12	98
protein deubiquitination [GO:0016579]	0.0387486 UBP1 DOA4 UBP6 YUH1	4	19
protein complex assembly [GO:0006461]	0.0413023 COX15 SGF73 SSP1 ATG34 VPH1	5	28
regulation of nitrogen utilization [GO:0006808]	0.0418862 VID30 MKS1	2	5
L-serine biosynthetic process [GO:0006564]	0.0418862 SER2 SER1	2	5
intraluminal vesicle formation [GO:0070676]	0.0418862 SNF7 VPS4	2	5
isocitrate metabolic process [GO:0006102]	0.0418862 IDH1 IDH2	2	5
polyamine transport [GO:0015846]	0.0418862 AGP2 PTK2	2	5
cellular copper ion homeostasis [GO:0006878]	0.0458263 TMN3 GEF1 CUP9	3	12

MIPS Functional Classification (459 categories)

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
polyphosphoinositol mediated signal transduction [30.01.09.11]	0.000262	SLM4 KCS1 ARG82 ISC1 INP51 SAC1 PLC1	7	20
cytoplasmic and nuclear protein degradation [14.13.01]	0.002476	UBP1 DOA4 UBP6 YHR138C BAR1 NTA1 YUH1 MAP1 RIM13 PBI2 PNG1	11	60
regulation by binding / dissociation [18.01.07]	0.003123	YHR138C LIA1 STE3 PBI2 YPT11 TRE1	6	22

transcriptional control [11.02.03.04]	0.01227	RTG3 MED2 KCS1 ARG82 UME6 SPT3 SCS2 GLO3 RTG2 SPT4 DBF2 STP2 SRB2 DOT5 NOT3 MET18 ZAP1 SPT10 CBF1 JHD2 HIR3 PUT3 CTK1 CPR6 SFP1 WAR1 CTK3 GAT2 HOT1 YAF9 SKO1 CAF120 LEM3 YNR048W HST1 INO4 TEA1 PHO85 MUK1 CUP9 TPK2 HAL1	42	426
sulfate assimilation [01.02.03.01]	0.01436	MET3 MET5 MET16	3	8
biosynthesis of glutamate [01.01.03.02.01]	0.017	AVT7 ACO1 IDH1 IDH2	4	15
Transcription [11]	0.01812	TPD3 YCR087C-A THO1 RAD6 IDH1 IDH2	6	31
vacuolar/lysosomal transport [20.09.13]	0.0189	FEN1 PEP7 NHX1 YPT31 PIB2 VMA7 HSE1 APL1 LST4 SNF7 ATG19 PEP12 VPH1 VMA4 VTS1 VPS28 VMA13 VPS4	18	153
development of asco- basidio- or zygosporium [43.01.03.09]	0.02104	SHP1 FEN1 DOA4 ARG82 SPT3 SPO73 PMD1 RAD6 SPO74 MDS3 SSP1 SPO22 IRC19 SNF7 CDA2 RIM13 SIN4 EMI5 ELC1	19	166
regulation of amino acid metabolism [01.01.13]	0.02425	ARG82 UME6 MET28 CBF1 PUT3 SIN4	6	33
mitochondrion [42.16]	0.02628	IMG2 YDR115W RSM24 MRPS28 UGO1 GET1 RSM23 MDM34 MRPS35 RSM7 MRPL24 POR1 MGS1 YPT11 RSM19 MDM12 GRX5 MGR2 AIM45	19	170
degradation of threonine [01.01.06.04.02]	0.02633	GLY1 ILV1	2	4
phosphate transport [20.01.01.07.07]	0.03619	PHO87 MIR1 GTR1	3	11
regulation of directional cell growth [40.01.03.01]	0.04189	KEL1 MLC2	2	5
protease inhibitor [18.02.01.02.03]	0.04189	YHR138C PBI2	2	5
purine nucleotide/nucleoside/nucleobase anabolism [01.03.01.03]	0.04717	ADE1 ADE6 XPT1 ADE2 SER1	5	29
osmotic and salt stress response [32.01.03]	0.04997	AGP2 RVS167 ISC1 ELM1 AIP1 HOT1 GRX5 HAL1	8	59

18. Agrupamiento en categorías de los reguladores de *TPK2* con $p < 0,05$

GO Molecular Function

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase activity [GO:0003849]	0.00423164	ARO4 ARO3	2	2
phosphoprotein phosphatase activity [GO:0004721]	0.00672942	PTC1 PPH21 PTP1 RTR2 RTR1 YVH1 CNA1 PPQ1	8	44
structural constituent of ribosome [GO:0003735]	0.00756864	MRP21 RPL21A MRP10 RPL41A MRPL35 RPL37B RPL12A RPL23B RPL22B RPL7A RPL1B MRPS35 RPS27B RPL2B RPL34B RPL39 RSM7 MRPL15 RPL13B MRPS8 RPS10B MRPL33 SWS2 PET123	24	218
cyclin-dependent protein kinase activity [GO:0004693]	0.0120021	CTK2 CTK1 CTK3	3	8
Y-form DNA binding [GO:0000403]	0.0121462	RAD5 MSH2	2	3
fatty acid elongase activity [GO:0009922]	0.0121462	FEN1 SUR4	2	3
acyltransferase activity [GO:0008415]	0.0131576	SLC1 YDR018C ECM18 SWF1 KGD2 SLI1 ARD1 ARG7 MCT1 NAT3	10	69
N-acetyltransferase activity [GO:0008080]	0.0136126	SLI1 ARD1 SPT10 NAT3	4	15
catalytic activity [GO:0003824]	0.0194395	TYR1 ARO4 SHM1 THR4 YCR102C PTC1 YDL114W HNT1 LYS21 YDL144C SFA1 GLT1 ARO3 ALT2 ARO1 DLD3 FMP52 MET10 CWH41 PNC1 ADE6 TDH3 PCT1 LSC2 GND1 MET1 CDA2 GAS2 ARG7 ADH3 YMR099C DNF3 LEU4 YNR073C GSH2 ADE2 LIP5 HNT3 PDE2 ARO7 MET16	41	455
sphingosine N-acyltransferase activity [GO:0050291]	0.0232481	YPC1 LAG1	2	4
potassium:hydrogen antiporter activity [GO:0015386]	0.0232481	VCX1 NHX1	2	4
RNA polymerase II transcription elongation factor activity [GO:0016944]	0.0233275	RTF1 SPT4 LEO1	3	10
transferase activity [GO:0016740]	0.035873	ARO4 SHM1 FEN1 SLC1 LYS21 KCS1 YDR018C ARO3 ALT2 DPB4 ECM18 SWF1 ARO1 EKI1 KGD2 ADK1 VHS1 IPK1 PPM1 APT2 PKH3 PKH1 GIN4 YGR001C PMT6 PCT1 SLI1 LAG1 ARD1 KSP1 MET3 TOR1 ADO1 MET14 CTK1 TPK3 MET1 GAS2 SUR4 YLR446W ERG6 ARG7 LEU4 RPA49 TRM10 LIP5 MCT1 MIP1 SUR1 PPT2 NAT3	51	611
transmembrane receptor activity [GO:0004888]	0.0370906	WSC4 WSC3	2	5

phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor [GO:0016773]	0.0371439	GAL3 EKI1 TOR1 ADO1 YLR446W	5	29
proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism [GO:0046961]	0.0371439	VMA7 VMA5 VPH1 VMA4 VMA13	5	29

GO Biological Process

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
mitochondrial genome maintenance [GO:0000002]	6,75E+00	MDM10 KGD2 MHR1 THI4 MGM101 CCE1 RRG9 HMI1 MGM1 RRG8	10	36
vacuolar acidification [GO:0007035]	0.000166664	NHX1 VMA7 VMA22 VMA5 VPH2 VPH1 VMA4 VMA13	8	26
cellular amino acid biosynthetic process [GO:0008652]	0.000167388	TYR1 ARO4 THR4 LYS21 GLT1 ARO3 ARO1 MET10 MET28 MET3 MET14 MET1 LEU3 ARG7 LEU4 ARO7 MET16	17	98
ubiquitin-dependent protein catabolic process via the multivesicular body sorting pathway [GO:0043162]	0.000222367	VPS25 DID4 SNF7 VPS36 SNF8 VPS28	6	15
mitochondrion organization [GO:0007005]	0.00023482	MDM10 MFB1 GET1 MDM34 RRG9 MDM32 MGM1 YME1	9	34
positive regulation of transcription elongation, DNA-dependent [GO:0032786]	0.000274374	CTK2 CTK1 CTK3	3	3
sulfate assimilation [GO:0000103]	0.000380711	MET10 MET3 MET14 MET1 MET16	5	11
cysteine biosynthetic process [GO:0019344]	0.000617938	MET10 MET28 MET3 MET14 MET16	5	12
aromatic amino acid family biosynthetic process [GO:0009073]	0.000617938	TYR1 ARO4 ARO3 ARO1 ARO7	5	12
mRNA 3'-end processing [GO:0031124]	0.000950834	FKH1 CTK2 CTK1 CTK3 THP1	5	13
vacuolar proton-transporting V-type ATPase complex assembly [GO:0070072]	0.00104424	VMA21 VMA22 VPH2	3	4
inositol phosphate biosynthetic process [GO:0032958]	0.00248435	KCS1 IPK1 PLC1	3	5
intraluminal vesicle formation [GO:0070676]	0.00248435	DID4 SNF7 VPS4	3	5
ATP hydrolysis coupled proton transport [GO:0015991]	0.00367882	VMA7 VMA5 VPH1 VMA4 VMA13	5	17
protein retention in Golgi apparatus [GO:0045053]	0.00405161	DID4 VPS36 VPS27 VPS4	4	11
positive regulation of translational fidelity [GO:0045903]	0.00472919	CTK2 CTK1 CTK3	3	6

negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter by glucose [GO:0000433]	0.00787851	VPS25 VPS36 SNF8	3	7
ascospore wall assembly [GO:0030476]	0.00884254	VPS54 SPO71 SWF1 SPS2 YVH1 CDA2 GAS2 END3	8	46
methionine metabolic process [GO:0006555]	0.0105132	MET18 MET3 MET14 MET16	4	14
		TYR1 ARO4 THR4 YCR102C SLC1 YDL114W HNT1 LYS21 YDL144C SFA1		
metabolic process [GO:0008152]	0.0107032	GLT1 GAL3 YDR018C ARO3 ARO1 KGD2 FMP52 MET10 CWH41 PNC1 TDH3 LSC2 ARD1 PUT2 MSC7 GND1 SPT10 MET1 ERG6 ARG7 ADH3 DNF3 LEU4 YNR073C LIP5 MCT1 PDE2 ARO7 NAT3 MET16	40	425
polyphosphate metabolic process [GO:0006797]	0.0120021	PPN1 VTC4 VPH1	3	8
fatty acid elongation [GO:0030497]	0.0121462	FEN1 SUR4	2	3
meiotic gene conversion [GO:0006311]	0.0121462	SOH1 MSH2	2	3
methionine biosynthetic process [GO:0009086]	0.013459	MET10 MET28 MET3 MET14 MET1 MET16	6	31
cellular response to anoxia [GO:0071454]	0.0232481	YEL047C SNF7	2	4
potassium ion transmembrane transport [GO:0071805]	0.0232481	NHX1 TRK1	2	4
purine ribonucleoside salvage [GO:0006166]	0.0232481	APT2 ADO1	2	4
microautophagy [GO:0016237]	0.0233275	SLM4 GTR2 VTC4	3	10
cellular bud site selection [GO:0000282]	0.0241235	BUD25 BUD9 BUD20 THP1 BUD7	5	26
mitochondrial translation [GO:0032543]	0.026819	MRP21 MRP10 MRPL35 MRPS35 RSM7 MRPL15 MRPS8 MRPL33 SWS2 MSE1 PET123	11	88
purine base metabolic process [GO:0006144]	0.030556	DAL2 ADO1 ADE2	3	11
phospholipid biosynthetic process [GO:0008654]	0.0306234	SLC1 YDR018C EKI1 SCS2 SCS3 PCT1	6	37
cAMP-mediated signaling [GO:0019933]	0.0370906	YVH1 PDE2	2	5
protein insertion into ER membrane [GO:0045048]	0.0370906	GET1 MDY2	2	5
leucine biosynthetic process [GO:0009098]	0.0370906	LEU3 LEU4	2	5
mitochondrion inheritance [GO:0000001]	0.0371439	MDM10 PTC1 ARC18 MDM32 NAT3	5	29
late endosome to vacuole transport [GO:0045324]	0.0373692	DID4 SNF7 VPS27 VPS4	4	20
positive regulation of transcription from RNA polymerase I promoter [GO:0045943]	0.0388185	CTK2 CTK1 CTK3	3	12
cellular ion homeostasis [GO:0006873]	0.0388185	CNA1 GIS4 MDM32	3	12
endocytosis [GO:0006897]	0.0392489	THR4 ENT1 PKH1 YSC84 INP51 GVP36 VRP1 END3 MON2 COS10	10	82

translation [GO:0006412]	0.0394996	FUN12 MRP21 RPL21A YCL001W-A RPL41A MSW1 RPL37B RPL12A TMA20 RPL23B RPL22B RPL7A RPL1B MSM1 RBG2 RPS27B RPL2B RPL34B RPL39 RSM7 CTK1 HBS1 TMA7 RPL13B MRPS8 RPS10B MRPL33 SWS2 MSE1	29	318
protein targeting to vacuole [GO:0006623]	0.0476926	VPS25 VPS36 MON2 VPS27 SNF8 VPS28	6	41
transcription from RNA polymerase II promoter [GO:0006366]	0.0497452	MED2 SPT3 RTR1 PGD1 SOH1 RTF1 SRB2 MET18 LEO1	9	74
lipid biosynthetic process [GO:0008610]	0.0499822	FEN1 LAG1 SUR4 ERG6 ERG2 MCT1 PPT2	7	52

MIPS Functional Classification (459 categories)

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
sulfate assimilation [01.02.03.01]	5.44e-05	MET10 MET3 MET14 MET1 MET16	5	8
aromate anabolism [01.05.11.04]	0.0002744	ARO4 ARO3 ARO1	3	3
polyphosphoinositol mediated signal transduction [30.01.09.11]	0.001302	SLM4 KCS1 IPK1 INP51 TOR1 PLC1	6	20
vacuolar/lysosomal transport [20.09.13]	0.002067	FEN1 ATG20 VCX1 NHX1 PIB2 VMA7 VPS25 DID4 VMA5 SNF7 VPS36 MON2 VPS27 PEP12 VPH1 VMA4 SNF8 VPS28 VMA13 VPS4	20	153
homeostasis of protons [34.01.01.03]	0.002867	VCX1 NHX1 VMA7 VMA22 VMA5 VPH2 VPH1 VMA4 VMA13	9	47
transcription repression [11.02.03.04.03]	0.008122	MHR1 MIG3 VPS25 VPS36 MOT3 SNF8 MRP21 RPL21A MRP10 RPL41A MRPL35 RPL37B RPL12A RPL23B RPL22B	6	28
ribosomal proteins [12.01.01]	0.009366	RPL7A RPL1B NSR1 MRPS35 RPS27B RPL2B RPL34B RPL39 RSM7 MRPL15 RPL13B MRPS8 RPS10B MRPL33 SWS2 PET123 RSA1	26	246
protein kinase [30.01.05.01]	0.01147	PTP1 SAP155 YVH1 SAP190 CNA1 PPQ1	6	30
metabolism of derivatives of dehydroquinic acid, shikimic acid and chorismic acid [01.20.15]	0.012	ARO4 ARO3 ARO1	3	8
metabolism of the cysteine - aromatic group [01.01.09]	0.01215	ARO4 ARO3	2	3
transcription elongation [11.02.03.01.04]	0.01346	RTF1 SPT4 MFT1 ELP6 THP1 LEO1	6	31
mitochondrion [42.16]	0.0142	MDM10 MRP21 PTC1 MRP10 NDE2 MRPL35 GET1 MDM34 MRPS35 RSM7 MRPL15 MRPS8 MRPL33 RRG9 MGS1 MDM32 PET123 MGM1 YME1	19	170
endocytosis [20.09.18.09.01]	0.0361	THR4 ENT1 PKH1 YSC84 INP51 VRP1 END3 COS10	8	59

development of asco- basidio- or zygospor [43.01.03.09]	0.04144	SHP1 FEN1 LRG1 PST1 BMH2 SPO71 SPR28 SPT3 SPS2 SPO22 YVH1 IRC19 UBI4 SNF7 CDA2 CNM67 SPE2	17	166
metabolism of methionine [01.01.06.05]	0.04387	MET18 MET3 MET1 MET16	4	21

19. Agrupamiento en categorías de los reguladores de *TPK3* con $p < 0,05$

GO Molecular Function

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
Y-form DNA binding [GO:0000403]	9,38E-01	MSH3 RAD5 MSH2	3	3
basic amino acid transmembrane transporter activity [GO:0015174]	0.0016927	VBA2 VBA1 ALP1	3	6
double-strand/single-strand DNA junction binding [GO:0000406]	0.00207143	MSH3 MSH2	2	2
sulfite reductase (NADPH) activity [GO:0004783]	0.00207143	MET10 MET5	2	2
dipeptide transporter activity [GO:0042936]	0.00207143	DAL5 PTR2	2	2
inositol trisphosphate 3-kinase activity [GO:0008440]	0.00207143	KCS1 ARG82	2	2
inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate kinase activity [GO:0000827]	0.00207143	KCS1 ARG82	2	2
NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity [GO:0008137]	0.00602664	NDI1 NDE1	2	3
transmembrane transporter activity [GO:0022857]	0.00602664	BIO5 YOL162W	2	3
proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism [GO:0046961]	0.00917674	VMA2 VMA7 VMA5 STV1 VPH1	5	29
5'-3' exonuclease activity [GO:0008409]	0.0116907	KEM1 PSO2	2	4
DNA insertion or deletion binding [GO:0032135]	0.0116907	MSH3 MSH2	2	4
protein phosphatase inhibitor activity [GO:0004864]	0.0116907	GLC8 VHS3	2	4
RNA polymerase II transcription cofactor activity [GO:0001104]	0.0136975	SRB8 MED2 PGD1 SRB2	4	21
single-stranded DNA binding [GO:0003697]	0.0139248	RAD51 DMC1 NSR1 RPB4 ACO1	5	32
catalytic activity [GO:0003824]	0.0150303	TYR1 ARO1 MUS81 YEL020C GLY1 ILV1 MAG1 YER152C MET10 LSC2 RPB4 CPA2 MET5 MET1 YKR070W GAS2 YLR460C ARG7 ADH3 SNZ1 YMR099C YMR130W YIM1 DFG5 GAD1 LEU4 YNR073C YOL098C VHS3 FAA1 ELP3	31	455
loop DNA binding [GO:0000404]	0.0189006	MSH3 MSH2	2	5
metalloexopeptidase activity [GO:0008235]	0.0189006	ICP55 MAP1	2	5
ubiquitin binding [GO:0043130]	0.0250705	DDI1 GGA2 RPN13 MGS1 YOL087C	5	37

adenylate kinase activity [GO:0004017]	0.0275045 ADK2 RAD50	2	6
four-way junction DNA binding [GO:0000400]	0.0275045 RAD5 MSH2	2	6
enzyme activator activity [GO:0008047]	0.0283855 ARC1 GLC8 MGS1	3	15
N-acetyltransferase activity [GO:0008080]	0.0283855 ARD1 YIR042C ELP3	3	15
	MAL33 ARO1 ARG82 PEP7 MUS81 ICP55 SLX8 GLO3 RTR1 RPH1 PIB2 RAI1		
metal ion binding [GO:0046872]	0.0407778 SPT4 MAL13 AIR1 HIT1 CPA2 STE24 MET5 HOT13 RAD5 MAP1 ACO1 ARG81 FET3 MOT3 ADH3 YTA12 MUB1 PGM2 PSO2 ADE4 MGS1 RAD50 FRE4 YOL098C IZH4 ELP3 PPQ1	39	647
double-stranded DNA binding [GO:0003690]	0.040928 DPB3 DMC1 ACO1 RAD50	4	29
inositol hexakisphosphate kinase activity [GO:0000828]	0.0455853 KCS1	1	1
3-dehydroquinate dehydratase activity [GO:0003855]	0.0455853 ARO1	1	1
3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase activity [GO:0003866]	0.0455853 ARO1	1	1
shikimate 5-dehydrogenase activity [GO:0004764]	0.0455853 ARO1	1	1
shikimate kinase activity [GO:0004765]	0.0455853 ARO1	1	1
3-dehydroquinate synthase activity [GO:0003856]	0.0455853 ARO1	1	1
dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase activity [GO:0004149]	0.0455853 KGD2	1	1
inositol trisphosphate 6-kinase activity [GO:0000823]	0.0455853 ARG82	1	1
inositol tetrakisphosphate 3-kinase activity [GO:0000824]	0.0455853 ARG82	1	1
inositol tetrakisphosphate 6-kinase activity [GO:0000825]	0.0455853 ARG82	1	1
phosphatidylinositol 3-kinase activity [GO:0035004]	0.0455853 ARG82	1	1
protein C-terminal leucine carboxyl O-methyltransferase activity [GO:0018423]	0.0455853 PPM1	1	1
threonine aldolase activity [GO:0004793]	0.0455853 GLY1	1	1
L-allo-threonine aldolase activity [GO:0008732]	0.0455853 GLY1	1	1
oxygen-dependent protoporphyrinogen oxidase activity [GO:0004729]	0.0455853 HEM14	1	1

FFAT motif binding [GO:0033149]	0.0455853	SCS2	1	1
CTD phosphatase activity [GO:0008420]	0.0455853	RTR1	1	1
alkylbase DNA N-glycosylase activity [GO:0003905]	0.0455853	MAG1	1	1
histone demethylase activity (H3-K9 specific) [GO:0032454]	0.0455853	RPH1	1	1
nucleoside triphosphate adenylate kinase activity [GO:0046899]	0.0455853	ADK2	1	1
inositol heptakisphosphate 5-kinase activity [GO:0033200]	0.0455853	KCS1	1	1
citrate transmembrane transporter activity [GO:0015137]	0.0455853	PHO87	1	1
oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors [GO:0016903]	0.0455853	MET10	1	1
deoxyribonuclease activity [GO:0004536]	0.0455853	KEM1	1	1
antimonite transmembrane transporter activity [GO:0015104]	0.0455853	ARR3	1	1
steryl deacetylase activity [GO:0034084]	0.0455853	SAY1	1	1
homoserine kinase activity [GO:0004413]	0.0455853	THR1	1	1
polyphosphate kinase activity [GO:0008976]	0.0455853	VTC4	1	1
sulfate adenyltransferase (ATP) activity [GO:0004781]	0.0455853	MET3	1	1
prephenate dehydrogenase activity [GO:0008977]	0.0455853	TYR1	1	1
allantoate transmembrane transporter activity [GO:0015124]	0.0455853	DAL5	1	1
polygalacturonase activity [GO:0004650]	0.0455853	PGU1	1	1
adenylsulfate kinase activity [GO:0004020]	0.0455853	MET14	1	1
eukaryotic initiation factor 4E binding [GO:0008190]	0.0455853	EAP1	1	1
uroporphyrin-III C-methyltransferase activity [GO:0004851]	0.0455853	MET1	1	1
tripeptide transporter activity [GO:0042937]	0.0455853	PTR2	1	1
uracil DNA N-glycosylase activity [GO:0004844]	0.0455853	UNG1	1	1

glutamate N-acetyltransferase activity [GO:0004358]	0.0455853 ARG7	1	1
glucose-6-phosphate 1-epimerase activity [GO:0047938]	0.0455853 YMR099C	1	1
aspartic-type endopeptidase inhibitor activity [GO:0019828]	0.0455853 PAI3	1	1
glutamate decarboxylase activity [GO:0004351]	0.0455853 GAD1	1	1
prephenate dehydrogenase (NADP+) activity [GO:0004665]	0.0455853 TYR1	1	1
mannitol dehydrogenase activity [GO:0046029]	0.0455853 YNR073C	1	1
phosphatidylinositol phospholipase C activity [GO:0004435]	0.0455853 PLC1	1	1
arsenite transmembrane transporter activity [GO:0015105]	0.0455853 ARR3	1	1
bile acid:sodium symporter activity [GO:0008508]	0.0455853 ARR3	1	1
transcription cofactor activity [GO:0003712]	0.0483395 SPT3 ARG81	2	8
cyclin-dependent protein kinase activity [GO:0004693]	0.0483395 CTK1 CTK3	2	8

GO Biological Process

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
sulfate assimilation [GO:0000103]	7,01E+00	MET10 MET3 MET5 MET14 MET1	5	11
cysteine biosynthetic process [GO:0019344]	0.000115752	MET10 MET28 MET3 MET5 MET14	5	12
cellular amino acid biosynthetic process [GO:0008652]	0.00012612	TYR1 ARO1 ILV1 TRP2 MET10 THR1 MET28 MET3 CPA2 MET5 MET14 MET1 ARG7 LEU4	14	98
response to DNA damage stimulus [GO:0006974]	0.000227396	UMP1 MSH3 MUS81 BUD25 RAD51 SLX8 MAG1 RAD4 CKA1 RPB4 CTK1 RAD5 RAD33 UNG1 CTK3 PSO2 YIM1 YAF9 RAD50 MSH2 CKB2	21	197
ATP hydrolysis coupled proton transport [GO:0015991]	0.000748843	VMA2 VMA7 VMA5 STV1 VPH1	5	17
inositol phosphate biosynthetic process [GO:0032958]	0.000875877	KCS1 ARG82 PLC1	3	5
vacuolar acidification [GO:0007035]	0.000906329	VMA2 VMA7 RAV1 VMA5 STV1 VPH1	6	26

mitochondria-nucleus signaling pathway [GO:0031930]	0.0016927 RTG3 RTG2 MKS1	3	6
regulation of transcription from RNA polymerase I promoter [GO:0006356]	0.0016927 SPT4 CKA1 CKB2	3	6
dipeptide transport [GO:0042938]	0.00207143 DAL5 PTR2	2	2
methionine biosynthetic process [GO:0009086]	0.00239205 MET10 MET28 MET3 MET5 MET14 MET1	6	31
basic amino acid transport [GO:0015802]	0.00286258 VBA2 VBA1 ALP1	3	7
base-excision repair [GO:0006284]	0.00498369 MAG1 POL32 UNG1 RAD50	4	16
metabolic process [GO:0008152]	0.00587486 TYR1 BUD23 ARO1 KGD2 YEL020C ILV1 MET10 LSC2 ARD1 YIR042C CPA2 MET5 PGU1 MET1 YKR070W ACO1 YLR460C UNG1 ARG7 ADH3 SNZ1 YMR130W YIM1 ALD3 DFG5 ADE4 LEU4 DSE4 YNR073C FAA1 ELP3	31	425
positive regulation of transcription elongation, DNA-dependent [GO:0032786]	0.00602664 CTK1 CTK3	2	3
meiotic joint molecule formation [GO:0000709]	0.00602664 RAD51 DMC1	2	3
microautophagy [GO:0016237]	0.00886138 SLM4 GTR2 VTC4	3	10
NADH oxidation [GO:0006116]	0.00886138 NDI1 ADH3 NDE1	3	10
DNA repair [GO:0006281]	0.00906237 MSH3 MUS81 RAD51 SLX8 MAG1 RAD4 RPH1 RPB4 RAD5 RAD33 UNG1 PSO2 YAF9 MGS1 RAD50 MSH2	16	183
vacuolar proton-transporting V-type ATPase complex assembly [GO:0070072]	0.0116907 VMA21 PKR1	2	4
removal of nonhomologous ends [GO:0000735]	0.0116907 MSH3 MSH2	2	4
regulation of transcription from RNA polymerase III promoter [GO:0006359]	0.0116907 CKA1 CKB2	2	4
threonine catabolic process [GO:0006567]	0.0116907 GLY1 ILV1	2	4
maltose metabolic process [GO:0000023]	0.0117784 MAL33 MAL31 MAL13	3	11
aromatic amino acid family biosynthetic process [GO:0009073]	0.0151824 TYR1 ARO1 TRP2	3	12
DNA metabolic process [GO:0006259]	0.0190825 MUS81 RAD51 DMC1	3	13
methionine metabolic process [GO:0006555]	0.0234834 THR1 MET3 MET14	3	14
nuclear-transcribed mRNA catabolic process [GO:0000956]	0.0234834 KEM1 PUF3 VTS1	3	14
protein import into mitochondrial intermembrane space [GO:0045041]	0.0275045 HOT13 YTA12	2	6

positive regulation of translational fidelity [GO:0045903]	0.0275045 CTK1 CTK3	2	6
pyridoxine metabolic process [GO:0008614]	0.0275045 SNO1 SNZ1	2	6
intracellular signal transduction [GO:0035556]	0.0283855 RTG2 SST2 PLC1	3	15
mismatch repair [GO:0006298]	0.0286409 DPB3 MSH3 POL32 MSH2	4	26
karyogamy involved in conjugation with cellular fusion [GO:0000742]	0.0337859 KEM1 KAR5 CIK1	3	16
protein complex assembly [GO:0006461]	0.0365485 COX15 YTA12 OST3 VPH1	4	28
ubiquitin-dependent protein catabolic process [GO:0006511]	0.0367361 UMP1 UBX7 UBP9 DDI1 YUH1 RPN13 UBX4	7	69
proton transport [GO:0015992]	0.037229 VMA2 VMA7 VMA5 STV1 VPH1	5	41
arginine metabolic process [GO:0006525]	0.0373612 ARG82 ARG81	2	7
protein urmylation [GO:0032447]	0.0373612 ELP6 NCS2	2	7
protein stabilization [GO:0050821]	0.0373612 ARG82 ICP55	2	7
protein targeting to vacuole involved in ubiquitin- dependent protein catabolic process via the multivesicular body sorting pathway [GO:0043328]	0.0373612 GGA2 EAR1	2	7
cellular process [GO:0009987]	0.0373612 ICP55 MAP1	2	7
filamentous growth [GO:0030447]	0.0396785 UGO1 KEM1 MGA1	3	17
cellular carbohydrate metabolic process [GO:0044262]	0.0396785 MAL33 MAL13 YMR099C	3	17
sporulation resulting in formation of a cellular spore [GO:0030435]	0.0445785 SPO7 UBX7 DMC1 RMD9 MDS3 PFS1 UBX4 OSW5 SPO21	9	103
regulation of arginine metabolic process [GO:0000821]	0.0455853 ARG82	1	1
regulation of DNA repair [GO:0006282]	0.0455853 MGS1	1	1
negative regulation of endodeoxyribonuclease activity [GO:0032078]	0.0455853 RAD50	1	1
strand invasion [GO:0042148]	0.0455853 RAD51	1	1
rRNA (guanine-N7)-methylation [GO:0070476]	0.0455853 BUD23	1	1
negative regulation of transcription factor import into nucleus [GO:0042992]	0.0455853 SCS2	1	1

regulation of intracellular lipid transport [GO:0032377]	0.0455853 SCS2	1	1
COPI coating of Golgi vesicle [GO:0048205]	0.0455853 GLO3	1	1
positive regulation of gene expression [GO:0010628]	0.0455853 BCK2	1	1
citrate transport [GO:0015746]	0.0455853 PHO87	1	1
alpha-glucoside transport [GO:0000017]	0.0455853 MAL31	1	1
positive regulation of ligase activity [GO:0051351]	0.0455853 ARC1	1	1
tyrosine metabolic process [GO:0006570]	0.0455853 TYR1	1	1
histone modification [GO:0016570]	0.0455853 RTF1	1	1
extrachromosomal rDNA circle accumulation involved in replicative cell aging [GO:0001310]	0.0455853 RTG2	1	1
tyrosine biosynthetic process [GO:0006571]	0.0455853 TYR1	1	1
sterol deacetylation [GO:0034210]	0.0455853 SAY1	1	1
positive regulation of isoprenoid metabolic process [GO:0045828]	0.0455853 YTA7	1	1
isoleucine metabolic process [GO:0006549]	0.0455853 THR1	1	1
negative regulation of ribosomal protein gene transcription from RNA polymerase II promoter in response to chemical stimulus [GO:0010689]	0.0455853 SRB2	1	1
negative regulation of ribosomal protein gene transcription from RNA polymerase II promoter in response to nutrient levels [GO:0010691]	0.0455853 SRB2	1	1
regulation of sulfur metabolic process [GO:0042762]	0.0455853 MET28	1	1
sulfur amino acid biosynthetic process [GO:0000097]	0.0455853 MET28	1	1
positive regulation of phospholipid translocation [GO:0061092]	0.0455853 FPK1	1	1
recruitment of 3'-end processing factors to RNA polymerase II holoenzyme complex [GO:0034402]	0.0455853 RPB4	1	1
early endosome to late endosome transport [GO:0045022]	0.0455853 RAV1	1	1
antimonite transport [GO:0015699]	0.0455853 ARR3	1	1

allantoate transport [GO:0015719]	0.0455853 DAL5	1	1
pectin catabolic process [GO:0045490]	0.0455853 PGU1	1	1
tripeptide transport [GO:0042939]	0.0455853 PTR2	1	1
mitochondrion localization [GO:0051646]	0.0455853 PUF3	1	1
negative regulation of calcium ion-dependent exocytosis [GO:0045955]	0.0455853 ARG81	1	1
mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone [GO:0006120]	0.0455853 NDI1	1	1
regulation of cell budding [GO:0007116]	0.0455853 MUB1	1	1
glutamate metabolic process [GO:0006536]	0.0455853 GAD1	1	1
glutamate catabolic process [GO:0006538]	0.0455853 GAD1	1	1
defense response [GO:0006952]	0.0455853 MGS1	1	1
chromatin silencing at telomere [GO:0006348]	0.0473732 SCS22 DPB3 SCS2 IES3 GTR1 YAF9	6	58
polyphosphate metabolic process [GO:0006797]	0.0483395 VTC4 VPH1	2	8
carboxylic acid metabolic process [GO:0019752]	0.0483395 GAD1 LEU4	2	8
meiotic mismatch repair [GO:0000710]	0.0483395 MSH3 MSH2	2	8
karyogamy [GO:0000741]	0.0483395 KEM1 KAR5	2	8

MIPS Functional Classification (459 categories)

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
sulfate assimilation [01.02.03.01]	9,53E-03	MET10 MET3 MET5 MET14 MET1	5	8
metabolism of arginine [01.01.03.05]	5,91E-02	VBA2 ARG82 ARG81 VBA1	4	6
cytoplasmic and nuclear protein degradation [14.13.01]	0.001432	UBP9 YTA7 YPS6 YUH1 STE24 MAP1 SST2 BUL2 PAI3	9	60
DNA damage response [32.01.09]	0.002426	MSH3 RAD51 MAG1 RAD4 CKA1 RIF2 PSO2 RAD50 MSH2 CKB2	10	77
vacuolar/lysosomal transport [20.09.13]	0.004013	VMA2 ATG22 PEP7 DDI1 PIB2 VMA7 VPS55 VMA5 DID2 MVP1 STV1 VPS20 VBA1 VPH1 VTS1	15	153
homeostasis of protons [34.01.01.03]	0.00499	VMA2 PMP1 VMA7 RAV1 VMA5 STV1 VPH1	7	47
G1/S transition of mitotic cell cycle [10.03.01.01.03]	0.006005	SWI4 BCK2 SAP155 CKA1 CKB2 VHS3	6	37
metabolism of histidine [01.01.09.07]	0.006027	VBA2 VBA1	2	3
metabolism of lysine [01.01.06.06]	0.006027	VBA2 VBA1	2	3

metabolism of nonprotein amino acids [01.20.17.01]	0.008861 CAT2 ARG7 ALD3	3	10
cell-cell adhesion [34.07.01]	0.008861 FLO8 CKA1 CKB2	3	10
polyphosphoinositol mediated signal transduction [30.01.09.11]	0.01149 SLM4 KCS1 ARG82 PLC1	4	20
degradation of threonine [01.01.06.04.02]	0.01169 GLY1 ILV1	2	4
CELL CYCLE AND DNA PROCESSING [10]	0.01169 SNZ1 SHR5	2	4
somatic / mitotic recombination [10.01.05.03.03]	0.0137 MSH3 RAD51 RAD50 MSH2 RTG3 MAL33 SRB8 CDC50 MED2 KCS1 ARG82 SPT3 FLO8 SWI4 SCS2 GLO3	4	21
transcriptional control [11.02.03.04]	0.0186 PGD1 RTG2 SPT4 CAF130 MGA1 MAL13 SRB2 CPR7 CTK1 SIR1 HCR1 SST2 ARG81 CTK3 ELP6 YAF9 ELP3	29	426
budding, cell polarity and filament formation [43.01.03.05]	0.02685 BUD23 CSM1 CDC50 SPT3 FLO8 BUD27 SAP155 KEM1 MGA1 PFS1 CKA1 AIR1 PGU1 AIP1 MUB1 MYO5 DFG5 NCS2 MSB3 MSN1 CKB2 PLC1	22	312
metabolism of porphyrins [01.20.19.01]	0.02839 HEM14 MET1 FET3	3	15
DNA repair [10.01.05.01]	0.02905 DPB3 MSH3 MUS81 RAD51 MAG1 RAD4 RPH1 POL32 RAD5 UNG1 PSO2 RAD50 MSH2	13	159
transport ATPases [20.03.22]	0.03239 VMA2 PMP1 VMA7 VMA5 STV1 VPH1	6	53
stress response [32.01]	0.03316 KCS1 DDI1 NSR1 MGA1 TIR3 RPB4 HIT1 SNO1 SNZ1 ALD3 PAI3 ZEO1 VHS3	13	162
cation transport (H ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , NH ₄ ⁺ , etc.) [20.01.01.01]	0.03429 VMA2 PMP1 VMA7 TRK1 VMA5 STV1 VPH1	7	68
proton driven antiporter [20.03.02.03.01]	0.03736 VBA2 VBA1	2	7
biosynthesis of homocysteine [01.01.06.05.01.01]	0.03736 MET10 MET5	2	7
transcription activation [11.02.03.04.01]	0.04075 MET28 MGA2 MOT3 IZH4 MSN1	5	42
metabolism of cobalamins [01.20.19.05]	0.04559 MET1	1	1
metabolism of isoleucine [01.01.11.02]	0.04559 THR1	1	1
regulation of sulphur metabolism [01.02.07.03]	0.04559 MET28	1	1
conjunction of sulfate [01.02.03.04]	0.04559 MET3	1	1
regulation of phosphate metabolism [01.04.04]	0.04605 PIG2 GTR1 VHS3	3	18
metabolism of serine [01.01.09.02]	0.04834 ILV1 THR1	2	8

20. Agrupamiento en categorías de los reguladores de *BCY1* con $p < 0,05$

GO Molecular Function

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
iron ion transmembrane transporter activity [GO:0005381]	0.00161229	FTR1 FET3 FET4	3	6
damaged DNA binding [GO:0003684]	0.0108496	RAD51 RAD4 RAD10 YKU80 MAL33 PEP7 MET6 AST2 SLX8 GLO3 YER130C YER137C RPH1 YER184C PIB2	4	20
zinc ion binding [GO:0008270]	0.0132961	RAD5 ARG81 PML39 MOT3 RCO1 NAM7 ADH3 ADH6 RAD50 HAL9 YOL098C RTC1	23	314
adenylate kinase activity [GO:0004017]	0.0266516	ADK2 RAD50	2	6
telomeric DNA binding [GO:0042162]	0.0323638	YKU80 RAD50 NDJ1	3	16
monocarboxylic acid transmembrane transporter activity [GO:0008028]	0.036221	MCH4 MCH5	2	7
DNA-dependent ATPase activity [GO:0008094]	0.0388438	RAD51 DMC1 RSC1 RAD5	4	29
methyltransferase activity [GO:0008168]	0.0388767	MET6 TMT1 CHO2 COQ5 TRM10 COQ3 TRM11	7	71
3-demethylubiquinone-9 3-O-methyltransferase activity [GO:0008689]	0.0448281	COQ3	1	1
hexaprenyldihydroxybenzoate methyltransferase activity [GO:0004395]	0.0448281	COQ3	1	1
3-dehydroquinate dehydratase activity [GO:0003855]	0.0448281	ARO1	1	1
3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase activity [GO:0003866]	0.0448281	ARO1	1	1
shikimate 5-dehydrogenase activity [GO:0004764]	0.0448281	ARO1	1	1
shikimate kinase activity [GO:0004765]	0.0448281	ARO1	1	1
3-dehydroquinate synthase activity [GO:0003856]	0.0448281	ARO1	1	1
1,4-alpha-glucan branching enzyme activity [GO:0003844]	0.0448281	GLC3	1	1
oxygen-dependent protoporphyrinogen oxidase activity [GO:0004729]	0.0448281	HEM14	1	1

5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase activity [GO:0003871]	0.0448281 MET6	1	1
FFAT motif binding [GO:0033149]	0.0448281 SCS2	1	1
CTD phosphatase activity [GO:0008420]	0.0448281 RTR1	1	1
alkylbase DNA N-glycosylase activity [GO:0003905]	0.0448281 MAG1	1	1
histone demethylase activity (H3-K9 specific) [GO:0032454]	0.0448281 RPH1	1	1
nucleoside triphosphate adenylate kinase activity [GO:0046899]	0.0448281 ADK2	1	1
trans-aconitate 3-methyltransferase activity [GO:0046547]	0.0448281 TMT1	1	1
5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase activity [GO:0030272]	0.0448281 FAU1	1	1
pyruvate dehydrogenase activity [GO:0004738]	0.0448281 LPD1	1	1
dolichyldiphosphatase activity [GO:0047874]	0.0448281 CAX4	1	1
phosphatidylethanolamine N-methyltransferase activity [GO:0004608]	0.0448281 CHO2	1	1
protein N-terminal asparagine amidohydrolase activity [GO:0008418]	0.0448281 NTA1	1	1
adenylylsulfate kinase activity [GO:0004020]	0.0448281 MET14	1	1
tripeptide transporter activity [GO:0042937]	0.0448281 PTR2	1	1
2-hexaprenyl-6-methoxy-1,4-benzoquinone methyltransferase activity [GO:0043334]	0.0448281 COQ5	1	1
glutamate N-acetyltransferase activity [GO:0004358]	0.0448281 ARG7	1	1
glucose-6-phosphate 1-epimerase activity [GO:0047938]	0.0448281 YMR099C	1	1
borate efflux transmembrane transporter activity [GO:0080139]	0.0448281 YMR279C	1	1
hydroxymethylfurfural reductase (NADPH) activity [GO:0033845]	0.0448281 ADH6	1	1
prephenate dehydratase activity [GO:0004664]	0.0448281 PHA2	1	1

mannitol dehydrogenase activity [GO:0046029]	0.0448281 YNR073C	1	1
2-polyprenyl-6-methoxy-1,4-benzoquinone methyltransferase activity [GO:0008425]	0.0448281 COQ3	1	1
riboflavin transporter activity [GO:0032217]	0.0448281 MCH5	1	1
cyclin-dependent protein kinase activity [GO:0004693]	0.0468876 CTK1 CTK3	2	8
transferase activity, transferring alkyl or aryl (other than methyl) groups [GO:0016765]	0.0468876 ARO1 SRT1	2	8
transporter activity [GO:0005215]	0.0478889 AVT6 PTR2 PHO84 AAC1 HXT17 ITR2 MCH4 ODC1	8	90

GO Biological Process

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
vacuolar proton-transporting V-type ATPase complex assembly [GO:0070072]	0.000344976	VMA21 VMA22 PKR1	3	4
iron assimilation by reduction and transport [GO:0033215]	0.00200307	FTR1 FET3	2	2
reciprocal meiotic recombination [GO:0007131]	0.00455296	RAD51 RAD24 DMC1 RIM4 MLH2 REC114 NDJ1	7	47
meiotic joint molecule formation [GO:0000709]	0.00583079	RAD51 DMC1	2	3
positive regulation of transcription elongation, DNA-dependent [GO:0032786]	0.00583079	CTK1 CTK3	2	3
regulation of translational termination [GO:0006449]	0.00583079	ECM32 NAM7	2	3
sporulation resulting in formation of a cellular spore [GO:0030435]	0.00615073	SHC1 SPR6 PMD1 DMC1 ISC10 RSC1 RIM4 SPO22 UBX4 FKS3 SPO21	11	103
heme transport [GO:0015886]	0.0113166	PUG1 AAC1	2	4
high-affinity iron ion transport [GO:0006827]	0.0113166	FTR1 FET3	2	4
aromatic amino acid family biosynthetic process [GO:0009073]	0.014511	ARO1 TRP2 PHA2	3	12
glycogen biosynthetic process [GO:0005978]	0.014511	GLC3 PGM2 GLC8	3	12
late endosome to vacuole transport via multivesicular body sorting pathway [GO:0032511]	0.014511	VPS60 VPS55 DID2	3	12

meiosis [GO:0007126]	0.0166869	MAM1 SPR6 PMD1 DMC1 ISC10 RIM4 SPO22 YVH1 REC114 RAD50 SPO21 NDJ1	12	134
protein insertion into ER membrane [GO:0045048]	0.0183052	GET1 MDY2	2	5
invasive growth in response to glucose limitation [GO:0001403]	0.0194011	FLO8 TMN3 DSE1 STE11 DIA1 NCS2	6	48
pyridoxine metabolic process [GO:0008614]	0.0266516	SNO1 SNZ1	2	6
positive regulation of translational fidelity [GO:0045903]	0.0266516	CTK1 CTK3	2	6
MAPKKK cascade involved in cell wall biogenesis [GO:0000196]	0.0266516	STE11 PKH2	2	6
vacuolar acidification [GO:0007035]	0.0271353	NHX1 VMA22 STV1 VPH1	4	26
actin cortical patch localization [GO:0051666]	0.0271757	RVS167 YSC84 MYO5	3	15
rRNA export from nucleus [GO:0006407]	0.0307652	RPS26B RPS18B NUP188 RPS19A	4	27
cellular amino acid biosynthetic process [GO:0008652]	0.0309699	ARO1 ILV1 TRP2 MET6 CPA2 MET5 MET14 ARG7 PHA2	9	98
Rho protein signal transduction [GO:0007266]	0.0323638	BOI2 PEA2 WSC3	3	16
protein urmylation [GO:0032447]	0.036221	ELP6 NCS2	2	7
mitochondrial transport [GO:0006839]	0.036221	AAC1 ODC1	2	7
filamentous growth [GO:0030447]	0.0380293	VPS60 DOT6 PEA2	3	17
cellular carbohydrate metabolic process [GO:0044262]	0.0380293	MAL33 YMR099C MDH2	3	17
methylation [GO:0032259]	0.0388767	MET6 TMT1 CHO2 COQ5 TRM10 COQ3 TRM11	7	71
chromatin silencing at telomere [GO:0006348]	0.0442598	SDC1 DOT6 SCS2 IES3 GTR1 SAS2	6	58
COPI coating of Golgi vesicle [GO:0048205]	0.0448281	GLO3	1	1
regulation of intracellular lipid transport [GO:0032377]	0.0448281	SCS2	1	1
negative regulation of transcription factor import into nucleus [GO:0042992]	0.0448281	SCS2	1	1
isoleucine catabolic process [GO:0006550]	0.0448281	LPD1	1	1
hydrogen peroxide metabolic process [GO:0042743]	0.0448281	LPD1	1	1
valine catabolic process [GO:0006574]	0.0448281	LPD1	1	1

meiotic sister chromatid cohesion involved in meiosis I [GO:0010789]	0.0448281 MAM1	1	1
strand invasion [GO:0042148]	0.0448281 RAD51	1	1
histone modification [GO:0016570]	0.0448281 RTF1	1	1
sodium ion transmembrane transport [GO:0035725]	0.0448281 NHX1	1	1
endonucleolytic cleavage of tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA) [GO:0000479]	0.0448281 RPS27B	1	1
negative regulation of ribosomal protein gene transcription from RNA polymerase II promoter in response to chemical stimulus [GO:0010689]	0.0448281 SRB2	1	1
negative regulation of ribosomal protein gene transcription from RNA polymerase II promoter in response to nutrient levels [GO:0010691]	0.0448281 SRB2	1	1
plasma membrane fusion [GO:0045026]	0.0448281 KEL1	1	1
attachment of telomeres to nuclear envelope [GO:0070197]	0.0448281 NDJ1	1	1
tripeptide transport [GO:0042939]	0.0448281 PTR2	1	1
activation of MAPKK activity [GO:0000186]	0.0448281 STE11	1	1
negative regulation of calcium ion-dependent exocytosis [GO:0045955]	0.0448281 ARG81	1	1
mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone [GO:0006120]	0.0448281 NDI1	1	1
mitochondrial DNA packaging [GO:0090139]	0.0448281 ABF2	1	1
borate transmembrane transport [GO:0035445]	0.0448281 YMR279C	1	1
low-affinity iron ion transport [GO:0000040]	0.0448281 FET4	1	1
negative regulation of endodeoxyribonuclease activity [GO:0032078]	0.0448281 RAD50	1	1
plasma membrane fusion involved in cytogamy [GO:0032220]	0.0448281 PRM1	1	1
L-phenylalanine biosynthetic process [GO:0009094]	0.0448281 PHA2	1	1

mitochondrial DNA metabolic process [GO:0032042]	0.0448281 HMI1	1	1
riboflavin transport [GO:0032218]	0.0448281 MCH5	1	1
polyphosphate metabolic process [GO:0006797]	0.0468876 PHO84 VPH1	2	8
methionine biosynthetic process [GO:0009086]	0.0480215 MET6 CBF1 MET5 MET14	4	31

MIPS Functional Classification (459 categories)

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
biosynthesis of methionine [01.01.06.05.01]	0.001612	MET6 CBF1 MET14	3	6
meiotic recombination [10.01.05.03.01]	0.006335	RAD51 RAD24 DMC1 RIM4 REC114 RAD50	6	38
cell wall [42.01]	0.01465	VPS54 DSE1 SPI1 ECM32 CAX4 MHP1 MET5 CNA1 ARG7 SRT1 MYO5 FKS3 YMR317W PKH2 WSC3 ZEO1 COX11	17	213
C-compound and carbohydrate transport [20.01.03]	0.01673	PHO84 ITR2 MCH4 MCH5 ODC1	5	34
meiosis I [10.03.02.01]	0.01825	REC114 RAD50 NDJ1	3	13
metabolism of ubiquinone [01.20.15.03]	0.01831	COQ5 COQ3	2	5
pyruvate dehydrogenase complex [02.08]	0.01831	PDA1 LPD1 YBR209W FMP21 YCL001W-A VPS60 YEL045C YER077C YER084W TMN3 YER121W YER128W YER135C YER137C RTR1 YER152C YER156C YER158C YER163C FMP10 YER186C YGR122W YGR210C YSC83 YHR045W YHR095W YHR140W YHR162W YIL012W MBB1 YJR061W YKL044W YKL077W YKL151C YKR070W YLL059C YLR030W YLR031W YLR040C YML090W CUE4	2	5
Unclassified proteins [99]	0.03333	YML119W YML122C YMR057C SOV1 UBX4 RCO1 YMR082C YMR084W YMR085W YMR086W YMR090W ATP25 YMR099C YMR102C YMR103C SPG4 YMR114C MGR3 YMR122C DLT1 YMR130W JLP2 EAR1 YMR181C YMR209C YMR315W YMR320W PRM1 TOS6 YOL087C YOL092W YOL098C YOL107W YOL131W BSC6 RTC1	75	1378
transcription repression [11.02.03.04.03]	0.03467	RPH1 STB2 MOT3 SNF8	4	28
glycolysis and gluconeogenesis [02.01]	0.035	SAK1 PDA1 PGM2 ADH6 MDH2	5	41
lipid binding [16.09]	0.03803	BOI2 PIB2 SNX4	3	17
budding, cell polarity and filament formation [43.01.03.05]	0.03976	CLN3 RVS167 DOT6 SHC1 FLO8 BOI2 SPR6 SHO1 DSE1 PEA2 YSC84 KEL1 STE11 BUD22 BUB2 RIM9 AIP1 MYO5 DIA1 NCS2 MSB4	21	312
sulfate assimilation [01.02.03.01]	0.04689	MET5 MET14	2	8

21. Agrupamiento en categorías de los reguladores de *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* y *BCY1* con $p < 0,01$

GO Biological Process

Category	p-value	In Category from Cluster	k	f
TPK1				
vacuolar acidification [GO:0007035]	0.000262057	RRG1 NHX1 VMA7 DBF2 RAV1 VPH1 VMA4 VMA13	8	26
transcription-coupled nucleotide-excision repair [GO:0006283]	0.000834918	RPB9 SPT4 RAD26 THP1 ELC1	5	12
inositol phosphate biosynthetic process [GO:0032958]	0.00300217	KCS1 ARG82 PLC1	3	5
propionate metabolic process [GO:0019541]	0.00300217	ACO1 PDR12 PDH1	3	5
protein complex localization [GO:0031503]	0.00482238	ATG19 ATG34	2	2
mitochondria-nucleus signaling pathway [GO:0031930]	0.00569541	RTG3 RTG2 MKS1	3	6
endoplasmic reticulum inheritance [GO:0048309]	0.00569541	SWA2 SCS2 YPT11	3	6
cysteine biosynthetic process [GO:0019344]	0.0072802	MET28 MET3 MET5 MET16	4	12
mitotic recombination [GO:0006312]	0.00994702	IRC4 IRC19 RAD10 ARP8	4	13
TPK2				
mitochondrial genome maintenance [GO:0000002]	6,75E-02	MDM10 KGD2 MHR1 THI4 MGM101 CCE1 RRG9 HMI1 MGM1 RRG8	10	36
vacuolar acidification [GO:0007035]	0.0001667	NHX1 VMA7 VMA22 VMA5 VPH2 VPH1 VMA4 VMA13	8	26
cellular amino acid biosynthetic process [GO:0008652]	0.0001674	TYR1 ARO4 THR4 LYS21 GLT1 ARO3 ARO1 MET10 MET28 MET3 MET14 MET1 LEU3 ARG7 LEU4 ARO7 MET16	17	98
ubiquitin-dependent protein catabolic process via the multivesicular body sorting pathway [GO:0043162]	0.0002224	VPS25 DID4 SNF7 VPS36 SNF8 VPS28	6	15
mitochondrion organization [GO:0007005]	0.0002348	MDM10 MFB1 GET1 MDM34 TPK3 RRG9 MDM32 MGM1 YME1	9	34
positive regulation of transcription elongation, DNA-dependent [GO:0032786]	0.0002744	CTK2 CTK1 CTK3	3	3
sulfate assimilation [GO:0000103]	0.0003807	MET10 MET3 MET14 MET1 MET16	5	11
cysteine biosynthetic process [GO:0019344]	0.0006179	MET10 MET28 MET3 MET14 MET16	5	12

aromatic amino acid family biosynthetic process [GO:0009073]	0.0006179	TYR1 ARO4 ARO3 ARO1 ARO7	5	12
mRNA 3'-end processing [GO:0031124]	0.0009508	FKH1 CTK2 CTK1 CTK3 THP1	5	13
vacuolar proton-transporting V-type ATPase complex assembly [GO:0070072]	0.001044	VMA21 VMA22 VPH2	3	4
intraluminal vesicle formation [GO:0070676]	0.002484	DID4 SNF7 VPS4	3	5
inositol phosphate biosynthetic process [GO:0032958]	0.002484	KCS1 IPK1 PLC1	3	5
ATP hydrolysis coupled proton transport [GO:0015991]	0.003679	VMA7 VMA5 VPH1 VMA4 VMA13	5	17
protein retention in Golgi apparatus [GO:0045053]	0.004052	DID4 VPS36 VPS27 VPS4	4	11
positive regulation of translational fidelity [GO:0045903]	0.004729	CTK2 CTK1 CTK3	3	6
negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter by glucose [GO:0000433]	0.007879	VPS25 VPS36 SNF8	3	7
ascospore wall assembly [GO:0030476]	0.008843	VPS54 SPO71 SWF1 SPS2 YVH1 CDA2 GAS2 END3	8	46
TPK3				
sulfate assimilation [GO:0000103]	7,01E-02	MET10 MET3 MET5 MET14 MET1	5	11
cysteine biosynthetic process [GO:0019344]	0.0001158	MET10 MET28 MET3 MET5 MET14	5	12
cellular amino acid biosynthetic process [GO:0008652]	0.0001261	TYR1 ARO1 ILV1 TRP2 MET10 THR1 MET28 MET3 CPA2 MET5 MET14 MET1 ARG7 LEU4	14	98
response to DNA damage stimulus [GO:0006974]	0.0002274	UMP1 MSH3 MUS81 BUD25 RAD51 SLX8 MAG1 RAD4 CKA1 RPB4 CTK1 RAD5 RAD33 UNG1 CTK3 PSO2 YIM1 YAF9 RAD50 MSH2 CKB2	21	197
ATP hydrolysis coupled proton transport [GO:0015991]	0.0007488	VMA2 VMA7 VMA5 STV1 VPH1	5	17
inositol phosphate biosynthetic process [GO:0032958]	0.0008759	KCS1 ARG82 PLC1	3	5
vacuolar acidification [GO:0007035]	0.0009063	VMA2 VMA7 RAV1 VMA5 STV1 VPH1	6	26
regulation of transcription from RNA polymerase I promoter [GO:0006356]	0.001693	SPT4 CKA1 CKB2	3	6

mitochondria-nucleus signaling pathway [GO:0031930]	0.001693	RTG3 RTG2 MKS1	3	6
dipeptide transport [GO:0042938]	0.002071	DAL5 PTR2	2	2
methionine biosynthetic process [GO:0009086]	0.002392	MET10 MET28 MET3 MET5 MET14 MET1	6	31
basic amino acid transport [GO:0015802]	0.002863	VBA2 VBA1 ALP1	3	7
base-excision repair [GO:0006284]	0.004984	MAG1 POL32 UNG1 RAD50	4	16
metabolic process [GO:0008152]	0.005875	TYR1 BUD23 ARO1 KGD2 YEL020C ILV1 MET10 LSC2 ARD1 YIR042C CPA2 MET5 PGU1 MET1 YKR070W ACO1 YLR460C UNG1 ARG7 ADH3 SNZ1 YMR130W YIM1 ALD3 DFG5 ADE4 LEU4 DSE4 YNR073C FAA1 ELP3	31	425
meiotic joint molecule formation [GO:0000709]	0.006027	RAD51 DMC1	2	3
positive regulation of transcription elongation, DNA- dependent [GO:0032786]	0.006027	CTK1 CTK3	2	3
NADH oxidation [GO:0006116]	0.008861	NDI1 ADH3 NDE1	3	10
microautophagy [GO:0016237]	0.008861	SLM4 GTR2 VTC4	3	10
DNA repair [GO:0006281]	0.009062	MSH3 MUS81 RAD51 SLX8 MAG1 RAD4 RPH1 RPB4 RAD5 RAD33 UNG1 PSO2 YAF9 MGS1 RAD50 MSH2	16	183
BCY1				
vacuolar proton-transporting V-type ATPase complex assembly [GO:0070072]	0.000345	VMA21 VMA22 PKR1	3	4
iron assimilation by reduction and transport [GO:0033215]	0.002003	FTR1 FET3	2	2
reciprocal meiotic recombination [GO:0007131]	0.004553	RAD51 RAD24 DMC1 RIM4 MLH2 REC114 NDJ1	7	47
regulation of translational termination [GO:0006449]	0.005831	ECM32 NAM7	2	3
meiotic joint molecule formation [GO:0000709]	0.005831	RAD51 DMC1	2	3
positive regulation of transcription elongation, DNA- dependent [GO:0032786]	0.005831	CTK1 CTK3	2	3
sporulation resulting in formation of a cellular spore [GO:0030435]	0.006151	SHC1 SPR6 PMD1 DMC1 ISC10 RSC1 RIM4 SPO22 UBX4 FKS3 SPO21	11	103