

Tesis Doctoral

Interacción de la proteína quinasa dependiente de cAMP con sus genes blanco en *Saccharomyces cerevisiae*

Baccarini, Leticia Cecilia

2014-03-20

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:

Baccarini, Leticia Cecilia. (2014-03-20). Interacción de la proteína quinasa dependiente de cAMP con sus genes blanco en *Saccharomyces cerevisiae*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Baccarini, Leticia Cecilia. "Interacción de la proteína quinasa dependiente de cAMP con sus genes blanco en *Saccharomyces cerevisiae*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-03-20.

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

**Interacción de la proteína quinasa dependiente de cAMP con sus genes blanco en
Saccharomyces cerevisiae.**

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

Leticia Cecilia Baccharini.

Director de tesis: Dra. Paula Portela.

Consejero de Estudios: Dra. Silvia Moreno.

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, 2014

Interacción de la Proteína Quinasa dependiente de cAMP con sus genes blanco en *Saccharomyces cerevisiae*.

Resumen

La regulación de la expresión génica mediada por proteínas quinasas es esencial para la correcta adaptación celular frente a un estímulo extracelular. En *S. cerevisiae*, la PKA está formada por tres subunidades catalíticas: Tpk1, Tpk2 y Tpk3 y una subunidad reguladora: Bcy1. Existen antecedentes que indican la asociación de Tpk1 y Tpk2 a la cromatina durante el crecimiento en glucosa, glicerol y estrés oxidativo (Pokholok et al, 2006). El rol de la vía cAMP/PKA sobre la expresión génica en glucosa ha sido ampliamente estudiado (Livas et al, 2011). Por otro lado, se ha descrito, que la activación de la PKA limita la expresión de genes de respuesta a estrés (Leadsham et al, 2010; Ferretti et al, 2012). Durante el desarrollo de esta tesis analizamos la unión de Bcy1, Tpk1 y Tpk2 a diferentes regiones génicas en respuesta a estrés osmótico y oxidativo. Describimos que tanto las subunidades catalíticas como la subunidad reguladora de la PKA se encuentran asociadas tanto a regiones transcritas como a promotores de los genes blancos de manera estrés-dependiente. Además analizamos el requerimiento de la actividad quinasa y el papel de Bcy1 en la asociación de las Tpk a la cromatina. Versiones inactivas de Tpk1 y Tpk2 no se asociaron a la cromatina. La delección de Bcy1 promueve una mayor asociación de Tpk1, mientras que anuló la asociación de Tpk2. Luego analizamos el posible rol de las Tpk en el remodelado de la cromatina en respuesta a estrés a través del análisis de la cinética de unión de factores remodeladores de la cromatina a las regiones donde encontramos asociadas a Tpk1 y Tpk2. Observamos unión transitoria a la cromatina de Arp8, Rsc1 y Snf2 seguido temporalmente por la asociación de las Tpk. Observamos también, la ocupación concomitante de Tpk2 y el factor de transcripción de unión al DNA Rap1.

En conjunto los datos existentes y los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que la PKA podría participar en la expresión génica mediante fosforilación *in situ* de los reguladores transcripcionales o de la cromatina.

La distribución núcleo-citoplasmática permite regular la actividad diferencial de muchas proteínas quinasas. Hemos analizado la localización subcelular de las subunidades de PKA y su mecanismo de transporte durante estrés. Hemos observado que Tpk1-GFP y Tpk3-GFP acumulan en el núcleo post-estrés oxidativo y osmótico, sin embargo Tpk2-GFP y Bcy1-GFP no cambian su acumulación nuclear. El análisis cinético de la

acumulación nuclear de Tpk1 mostró mayor velocidad en respuesta a estrés osmótico *versus* oxidativo.

Hemos determinado que la acumulación nuclear de Tpk1, Tpk2, Tpk3 y Bcy1 es un mecanismo de transporte activo. Sorprendentemente, cada una de las subunidades de PKA es importada al núcleo por diferentes carioferinas. Por otra parte, las cepas defectivas en carioferinas las cuales impiden la acumulación nuclear específicamente de Tpk1 o Tpk2 no mostraron asociación a la cromatina las Tpk, lo que sugiere el requerimiento de acumulación nuclear de las subunidades catalíticas para la asociación a sus genes blancos.

Interaction of cAMP-dependent Protein Kinase with its target genes in *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract.

Regulation of gene expression by intracellular stimulus-activated protein kinases is essential for cell adaptation to environmental changes. There are three PKA catalytic subunits in *S. cerevisiae*: Tpk1, Tpk2 and Tpk3 and one regulatory subunit: Bcy1. Previous data indicates that Tpk1 and Tpk2 were found associated to the chromatin during growth on glucose, glycerol and oxidative stress (Pokholok et al, 2006). Using ChIP-real time assay we analyzed the Bcy1, Tpk1 and Tpk2 association to 5 genes regions in response to osmotic and oxidative stresses. We had demonstrated that both catalytic and regulatory subunits of PKA were associated to transcribed regions and promoters of target genes in a stress dependent manner. Furthermore we analyze the requirement of kinase activity and the role of Bcy1 protein on Tpk chromatin association. Inactive versions of Tpk1 and Tpk2 do not associate to chromatin. Deletion of BCY1 promotes higher Tpk1 association, whereas it abolished Tpk2 association. We then analyze the possible role of Tpk on chromatin remodeling in response to stress conditions. We analyze the kinetics of binding chromatin remodelers in the regions bound by Tpk1 and Tpk2 in response to stress. During stress stimulus there is a transient binding to chromatin of Arp8, Rsc1 and Snf2 - chromatin remodelers followed temporarily by Tpk association. We also observe co-occupancy of Tpk2 and DNA-binding transcription factor Rap1. The role of cAMP / PKA on gene expression in glucose has been extensively studied (Livas et al, 2011). However PKA activation limits the expression of stress responsive genes (Leadsham et al, 2010; Ferretti et al, 2012). These results suggest that PKA could participate in gene expression by *in situ* phosphorylation of transcriptional or chromatin regulators.

Actually it is known that a single protein kinase distributed dynamically between cytoplasm and nucleus, can regulate target genes expression by both nuclear and cytoplasmic signaling mechanisms. Thus, the nucleus-cytoplasmic kinases transport would be important to regulate differential activity in both compartments. Here we analyze stress subcellular localization of PKA subunits and their transport mechanism, using fluorescence microscopy. We observed that Tpk1 and Tpk3 accumulate in the nucleus post-oxidative and osmotic stress however Tpk2 and Bcy1 not change their nucleus-cytoplasmic distribution, staying preferentially nuclear. Our results over Tpk1 stress re-localization kinetics suggest that under osmotic stress is necessary its faster nuclear accumulation. We determined that Tpk1, Tpk2, Tpk3 and Bcy1 nuclear accumulation is ATP dependent

suggesting an active transport mechanism. Surprisingly, we found that each PKA subunits is transported into the nucleus by different karyopherins. Moreover, karyopherin mutant strains which prevent nuclear accumulation of Tpk1 or Tpk2 prevented its association with chromatin, suggesting that nuclear accumulation of catalytic subunits to association to their targets genes is required.

Gracias!

A Pau, por haberme enseñado tanto y por la paciencia infinita. Por hacerme pensar no sólo en el ámbito académico. Por su energía y pasión por su trabajo. Simplemente por haber hecho de mí una mejor persona. Muchísimas Gracias!!

A Sil Moreno y Sil Rossi por ser ejemplos como persona y como científicas. Por ser tan generosas, pacientes, dedicadas, detallistas y ocuparse de todos y cada uno de nosotros como si fuéramos sus hijos.

A todos los chicos del labo, empezando de atrás para adelante Jime, Pia, Jose, Richi, Fiore, Vane, Cons, Nico, Lucas, Clari, Iri, Luciana, Jimena por todo lo que compartimos, risas, reuniones, congresos, viajes. Por estar siempre y con la mejor predisposición. Gracias por haber compartido 5 años de sus vidas conmigo, de cada uno me llevo un pedacito. Los quiero!

A Markus, Payo, Fer, Ale, Alba, Rafi, Marta, Caro y Ana por compartir 2 hermosas experiencias, que aun estando lejos de la familia mi hicieron sentir y trabajar muy cómoda. Por tratarme como una más, por hacerme sentir bienvenida y preocuparse por mi bienestar.

A mi mamá, por dejarme elegir mi propio camino, sin condiciones ni restricciones. Por ayudarme a crecer y a ser la persona que soy... Te amo ma!

A Martín, mi hermano del alma, simplemente soy lo que soy por vos. A Ro, Antonia y Vicente que me convirtieron en tía, un rol que amo, los amo!

A mi Papá, que aunque hoy ya no esté, siempre me hizo sentir que era su orgullo y me acompaña desde donde está.

A mis abuelas Elsa y Poty por hacerme sentirlas cerca estos 10 años de estudio. Siempre con un paquetito para mí. Las amo con todo mi corazón.

A Leandro por tanto amor, por tanta paciencia, por tanto apoyo, por dejarme crecer en mi profesión y estar ahí alentándome en cada momento difícil tanto a la distancia como estando cerca. Por traer a Indio a casa, quien me acompañó en esto de la escritura final. Te amo mi amor.

A mis amigas, Ana, Flor y Ro, que compartieron cada pasito de la carrera que me lleva éste presente y continuamos en el mismo mundo. "Locuras" las quiero.

A todos mi amigos juninenses: Al, Geor, Tri, Pau, Car, Tete, Lili, Mariana, Seba, Rodri, Mariano, que siempre estuvieron escuchando y apoyando desde la distancia.

A toda mi familia. En especial a mis tíos Luis y Patricia que siempre estuvieron conmigo. A mis primos Julia, Ange y Rami, que más que primos son mis hermanos. A Luciano y Vero que me acompañaron en mis primeros pasos en la gran ciudad.

A Eva, Pablo, Joaqui, Pili, Bety y Caiche que se preocupan siempre por mi bienestar y me hacen sentir en familia.

Índice

Introducción	1
Respuesta a estrés en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
Respuesta general al estrés.....	3
Vías de señalización involucradas en la respuesta celular al estrés.....	4
Vía Hog1.....	4
Vía TOR.....	7
Vía cAMP-PKA.....	8
Proteína Quinasa A (PKA).....	11
Holoenzima.....	13
Localización subcelular de PKA.....	15
Regulación de la transcripción en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
Remodelación de la cromatina y Transcripción.....	21
Regulación de la transcripción bajo condiciones de estrés.....	24
La respuesta al estrés oxidativo.....	25
La respuesta a estrés osmótico.....	28
Transporte núcleo-citoplasmático de proteínas.....	30
Importancia de la flexibilidad molecular en el transporte nuclear.....	33
Regulación de la expresión génica vía control de localización de factores de transcripción.....	34
Localización núcleo-citoplasmática.....	38

Hipótesis y Objetivos	39
Resultados	41
Capítulo I: Estudio de la interacción de las subunidades de PKA con la cromatina..	41
Análisis del rol de la PKA en la adaptación celular en respuesta a estrés osmótico y oxidativo.....	44
Análisis de los datos crudos obtenidos del análisis genómico ChIP-on-chip.....	45
Rol de la PKA en la transcripción génica en respuesta a estrés: mecanismo de asociación y función en regiones que se transcriben activamente.....	48
ALD6.....	49
SED1.....	53
HSP42.....	57
Rol de la PKA en la transcripción génica en respuesta a estrés: mecanismo de asociación y rol en promotores de genes ribosomales.....	60
Promotor de Rps29B.....	60
Promotor de RPL1B.....	64
Análisis cinético de la asociación de la PKA y proteínas de complejos remodeladores de la cromatina.....	67
Discusión.....	70
Figuras Suplementarias Capítulo I.....	77
Capítulo II: Mecanismo de importación nuclear y localización subcelular de la PKA en respuesta al estrés.....	80
Localización de las subunidades de la PKA en respuesta a estrés osmótico y oxidativo.....	83

Caracterización del mecanismo de la importación nuclear de las subunidades de la PKA.....	85
Discusión.....	95
Figuras Suplementarias Capítulo II.....	99
Materiales y Métodos	102
Referencias	118

Introducción

Respuesta a estrés en *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae, es uno de los modelos de estudio más empleados, ya que es un sistema simple de células eucariota, unicelular con una tasa de crecimiento rápida. La maquinaria molecular de muchos procesos celulares se encuentra conservada tanto en levaduras como en plantas y en mamíferos. Esto último es sin duda la clave de por qué *S. cerevisiae* es un gran sistema de estudio.

El medio ambiente es un factor determinante en la evolución de los organismos, ya que induce la selección de mecanismos que les permiten sobrevivir y adaptarse a las condiciones variables del mismo. La adaptación a diferentes tipos de estrés en el medio ambiente requiere cambios en muchos aspectos del comportamiento celular.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* muestra diferentes fases de crecimiento bien definidas cuando crece en medio con glucosa como fuente de carbono: la fase lag (*lag-phase*), la fase logarítmica (*exponential growth phase*), el cambio diáuxico (*diauxic shift*), la fase postdiáuxica (*post-diauxic growth phase*) y la fase estacionaria (*stationary phase*) (Figura 1). Durante la fase logarítmica las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo un metabolismo fermentativo que produce etanol (Smets et al, 2010).

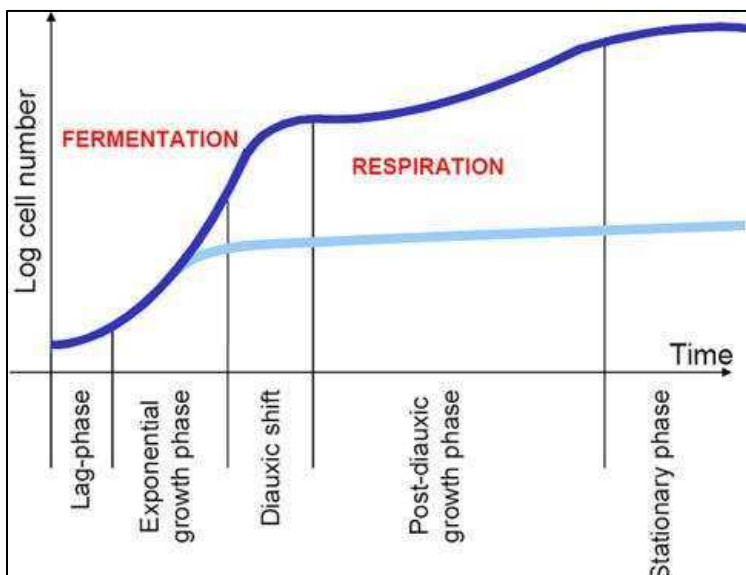


Figura 1. Fases de crecimiento de un cultivo de *S. cerevisiae*. La línea azul oscura representa el número de células en medio con glucosa como fuente de carbono. Después de una fase adaptativa corta (fase lag) se consume la glucosa conforme atraviesa el crecimiento exponencial. Cuando la glucosa es limitante, las células ingresan en el shift diauxico para convertir el metabolismo fermentativo a un metabolismo respiratorio. En la fase de crecimiento post-diauxica, las células reanudan el crecimiento utilizando etanol, acetato y otros productos de la fermentación. Finalmente, cuando estas fuentes de carbono se agotan, las células entran en un estado de quiescencia, la fase estacionaria (G0). La línea celeste representa el crecimiento exponencial en glucosa; luego son transferidas a un medio carente de un nutriente esencial como nitrógeno o fosfato; esto arresta su crecimiento, quedando en G0.

El crecimiento y la división celular deben estar estrictamente regulados y coordinados para poder responder a cambios en el medio ambiente y la disponibilidad de nutrientes. De esta manera las células deben monitorear continuamente dicha disponibilidad y ajustar tanto el crecimiento como la proliferación celular (Fingar et al, 2004).

En levaduras, tanto la respuesta a estrés como el daño celular depende del tipo y grado del estrés, y de la fase de crecimiento en que este la levadura al momento en que ocurre el estímulo (Hohmann & Mager, 1997) desarrollando diferentes sistemas de protección. Por lo general, durante el periodo de crecimiento activo las células son sensibles al estrés mientras que en periodos de quiescencia son resistentes (Zaman et al, 2008). Por ejemplo, cuando se produce un aumento en la osmolaridad extracelular, las células pierden rápidamente agua y se contraen. Las células tienen que contrarrestar este efecto para mantener la forma y la turgencia y garantizar las concentraciones apropiadas de agua e iones intracelulares para el óptimo funcionamiento de las reacciones bioquímicas. Para esto, acumulan pequeñas moléculas orgánicas, como el glicerol, el cual les permite balancear su presión osmótica en relación con el ambiente externo. Estos osmolitos

parcialmente reemplazan el agua, protegen biomoléculas y dirigen el agua nuevamente dentro de la célula por osmosis (Albertyn et al, 1994). El estrés osmótico también tiene un gran impacto en la fisiología celular, causando la reorganización del citoesqueleto, cambios en la dinámica de la pared celular, ajustes metabólicos y el arresto del ciclo celular, como también la modulación de la transcripción (Hohmann et al, 2002; Martínez-Montañés et al, 2010; de Nadal & Posas, 2010; Clotet & Posas, 2007).

Respuesta general a estrés.

Aun cuando un organismo posee mecanismos para adaptarse a los cambios en el medio que afectan su crecimiento y reproducción, cuando estos cambios son demasiado severos pueden llegar a ser letales.

Se ha observado que la tolerancia a un determinado tipo de estrés, conlleva a la tolerancia a otros tipos de estrés, aunque éstos últimos sean letales cuando se aplican sin inducción previa. Así, por ejemplo, cuando un cultivo de levaduras se somete a un tratamiento moderado de calor (37°C por media hora), estas células son capaces de resistir a estrés oxidativo que de otro modo sería letal. A este fenómeno se le ha denominado “protección cruzada”, y ha dado lugar a la idea de que la levadura posee mecanismos comunes o generales de respuesta al estrés (Lewis et al, 1995; Wieser et al, 1991). Este sistema de respuesta coordina e integra la necesidad de establecer un metabolismo basal con el objetivo de disminuir el gasto energético. Esto conlleva a una disminución en la tasa de crecimiento, con la inducción de diversos mecanismos de protección. La integración de estas respuestas determina la capacidad adaptativa de un organismo.

Existe un tipo de respuesta llamada “respuesta a estrés ambiental” (ESR- *enviromental stress response*) que conlleva a un cambio en los patrones de expresión génica. Esta respuesta no se encuentra controlada por un mecanismo regulatorio general, sino que es mediada por vías específicas de señalización (Gasch et al, 2000). La ESR se inicia en respuesta a una amplia variedad de cambios ambientales, sin embargo los niveles y el momento en el cual varían los patrones de expresión génica son específicos de cada nuevo entorno. La respuesta ESR suele ser transitoria: inmediatamente, luego del cambio ambiental, la célula responde con grandes variaciones en la expresión génica; sin embargo, a lo largo del estrés, éstas diferencias en la expresión disminuyen y los niveles de transcripción general vuelven a ser similares previo al estrés (Causton et al, 2001; Gasch et al, 2000). Esto sugiere una fase de adaptación durante la cual la célula optimiza

la utilización de su medio interno antes de re-anudar el crecimiento. Una excepción a esta observación es el estrés nutricional, donde las células no reanudan el crecimiento, sino que entran en un estado de quiescencia hasta que los nutrientes vuelvan a estar disponibles. De hecho se ha observado que varios de los cambios en los niveles de expresión génica en respuesta al hambreado nutricional no son transitorios, sino que persisten hasta que aumente la disponibilidad de nutrientes (Gasch et al, 2000).

Durante la ESR los genes cuya expresión es reprimida corresponden a síntesis proteica y funciones relacionadas con el crecimiento. Los genes que son inducidos en este tipo de respuesta se encuentran involucrados en una gran variedad de procesos, como genes involucrados en el metabolismo de lípidos (Raychaudhuri et al, 2012), progresión del ciclo celular (Duch et al, 2012) , mantenimiento del potencial redox, detoxificación de especies reactivas de oxígeno (Morano et al, 2012), autofagia, modificación de la pared celular (Levin et al, 2011), reparación de daño del DNA, secreción, en funciones vacuolares y mitocondriales entre otras (Müller et al, 2011).

Vías de señalización involucradas en la respuesta celular al estrés.

Las principales vías de transducción de señales que ocupan un rol central en la respuesta a diferentes tipos de estrés son: la vía de cascada de HOG-MAP quinasa (*High Osmolarity Glycerol Mitogen Activated Protein*) (de Nadal & Posas, 2010), la vía de Tor (*Target Of Rapamycin*) (De Virgilio & Loewith, 2006b; Rohde et al, 2008) y la vía de cAMP-PKA (Livas et al, 2011; Vandamme et al, 2012).

La vía Hog1

La quinasa Hog1 MAP tiene varios roles en la adaptación al estrés osmótico: modula directamente el transporte de iones en la membrana plasmática, la progresión del ciclo celular durante el estrés, afecta la eficiencia traduccional y coordina un complejo programa de reprogramación transcripcional en el núcleo (de Nadal & Posas, 2010) (Figura 2). Esto se refleja en el hecho de que la pérdida de función de Hog1 conlleva a una osmo-sensibilidad severa y a una disminución de la activación transcripcional de la mayoría de los genes osmo-inducibles (Posas et al, 2000; Rep et al, 2000).

Hog1 es rápidamente activada por fosforilación en respuesta a estrés hiperosmótico y transloca al núcleo donde coordina un programa de transcripción genómica (de Nadal & Posas, 2010). Los cambios en los patrones de expresión génica bajo estrés osmótico ocurren de manera transitoria. Esto implica que los componentes de señalización y factores de transcripción involucrados en la respuesta osmótica son activados solo por un

tiempo limitado, para luego retornar a su estado inicial. Dicha activación transitoria se debe a que Hog1 se localiza transitoriamente en el núcleo, la cual es revertida inmediatamente después de la reprogramación transcripcional génica (Ferrigno et al, 1998; Reiser et al, 1999).

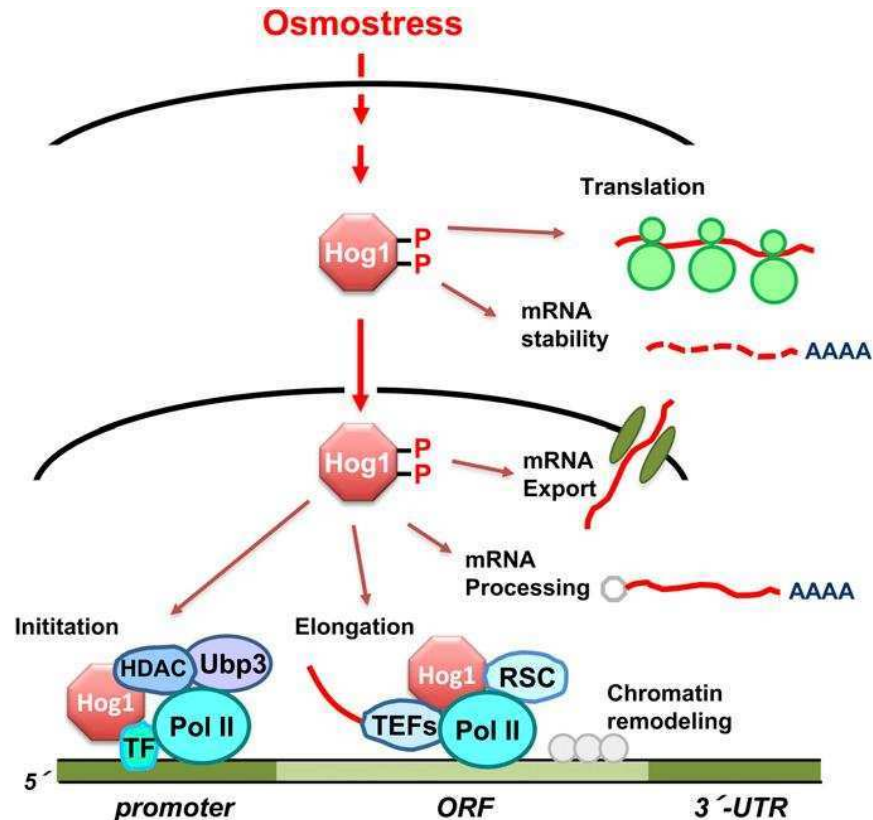


Figura 2. Respuesta al estrés osmótico en levaduras. Un aumento de la osmolaridad extracelular, activa Hog1 induciendo una respuesta adaptativa tanto en el núcleo como en el citoplasma de la célula. La respuesta citoplasmática incluye el control de flujos iónicos, transporte de glicerol, enzimas metabólicas y traducción de proteínas. La respuesta nuclear involucra la modulación de la progresión del ciclo celular y el control de la expresión génica. Adaptado de Saito et al, 2012.

Hog1 directamente se asocia y fosforila los factores de transcripción Sko1, Hot1, y Smp1 (Alepez et al, 2003; de Nadal et al, 2003; Proft et al, 2001). Sko1 es un activador/represor transcripcional de la familia β ZIP (*zipper-encoding regions*): es un represor transcripcional bajo condiciones normales de crecimiento y un activador transcripcional en respuesta a estrés osmótico. Hot1 y Smp1 son miembros de la familia MADS (MCM1, AG, DEFA y SRF, estas proteínas contienen un motivo común conservado dentro del dominio de unión a DNA) los cuales pertenecen a diferentes clases estructurales de factores de transcripción y activan la transcripción bajo estrés. Además, Hog1 regula factores de

transcripción aún más específicos, como los activadores Msn1, Msn2, Msn4, y Yap4 (Martinez-Pastor et al, 1996; Nevitt et al, 2004; Rep et al, 1999).

La regulación de la actividad de los factores de transcripción por Hog1 va más allá de la fosforilación de los mismos. En muchos casos, los factores de transcripción forman un complejo estable con Hog1 en la región -50 de los genes de respuesta osmótica (Alepuz et al, 2001; Proft & Struhl et al, 2002). La asociación estable de Hog1 con la cromatina está limitada a los loci regulados por estrés osmótico (Pascual-Ahuir et al, 2006; Pokholok et al, 2006; Proft et al, 2006).

El reclutamiento de Hog1 a los promotores es necesaria para coordinar el remodelado de la cromatina y el ensamblado del complejo de pre-iniciación de la transcripción bajo condiciones de estrés. Una vez asociada de manera estable con la cromatina, Hog1 tiene diversas funciones en la estimulación de la expresión génica. Por ejemplo, Hog1 puede directamente reclutar la maquinaria de la RNA polimerasa II en el caso de los genes regulados por Hot1 (Alepuz et al, 2003). Además, Hog1 esta directa o indirectamente involucrada en el reclutamiento de complejos modificadores de la cromatina o complejos basales de transcripción a los promotores activados por estrés. Esto incluye la deacetilasa de histonas Rpd3, el complejo co-activador SAGA (*Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase*), el complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF y el complejo Mediador (un complejo proteico formado por más de 20 subunidades, requerido para la transcripción dependiente de activadores unidos al DNA, la RNA pol II y factores generales de iniciación) (de Nadal et al, 2004; Proft & Struhl et al, 2002; Zapater et al, 2007). De esta manera, el reclutamiento diferencial de los complejos basales de transcripción puede resultar una forma de adaptación más dinámica a diferentes situaciones de estrés.

El rol de Hog1 en la activación de la expresión génica no está limitada a la iniciación de la transcripción, ya que interactúa con la RNA pol II y se asocia a otras regiones génicas como las regiones codificantes (ORF, *Open Reading Frames*) (Pascual-Ahuir et al, 2006; Pokholok et al, 2006; Proft et al, 2006). Una de sus funciones durante la elongación transcripcional es el reclutamiento del complejo remodelador de la cromatina RSC (*Remodelling Structure Chromatin*) a los ORFs osmo-inducibles para permitir el eficiente desalojo de las histonas durante la elongación transcripcional. RSC está involucrado globalmente en la transcripción génica activada por osmo-estrés ya que células mutantes *rscΔ* son osmo-sensibles (Mas et al, 2009).

La vía TOR:

Las levaduras, al igual que todos los eucariotas examinados hasta el momento, poseen dos complejos esenciales que contienen quinasas pertenecientes a la familia PI3 (*PI3-like protein kinase*), denominados TORC1 y TORC2 (De Virgilio & Loewith, 2006a; Wullschleger et al, 2006). Mientras que en la mayoría de los eucariotas una única proteína Tor aporta la actividad quinasa en ambos complejos, *S. cerevisiae* expresa dos quinasas diferentes, Tor1 y Tor2. Tor2 y otras cinco proteínas (Avo1, Avo2, Avo3, Bit61 y Lst8) forman el complejo TORC2 y regulan la organización del citoesqueleto de actina y la polaridad celular (De Virgilio & Loewith, 2006b; Wullschleger et al, 2005). Tor1 forma junto a Kog1, Lst8 y Tco89 el complejo TORC1, el cual regula la proliferación celular y la transición entre el crecimiento y la quiescencia. TORC1 pero no TORC2 es inhibida por la droga rapamicina, la cual se une al complejo y suprime su interacción con los sustratos blancos (Zaman et al, 2008).

La vía de TOR controla el crecimiento de células de levaduras, moscas y mamíferos en respuesta a factores de crecimiento y condiciones nutricionales (Jacinto & Hall, 2003). En levaduras la inhibición de TOR resulta en un arresto del crecimiento que se asocia a cambios fisiológicos que son característicos de la fase estacionaria (Werner-Washburne et al, 1993). Aunque la vía de señalización por TOR ha sido investigada principalmente en relación a la fuente de nitrógeno en el medio (Cooper et al, 2002), se ha descrito que participa también en algunas respuestas evocadas por glucosa (Slattery et al, 2008).

La proteína quinasa Sch9, un regulador central de la respuesta de crecimiento y longevidad (Pascual-Ahuir & Proft, 2007; Smets et al, 2010) ha sido implicado en la reprogramación transcripcional frente a estrés osmótico. Sch9, también denominada PKB pertenece a la familia de proteínas quinasas AGC y es ortólogo funcional de la quinasa S6 de mamíferos (Voordeckers et al, 2011). Sch9 es fosforilada por Tor1 y es requerida para la regulación de la biogénesis de ribosomas mediada por TORC1, el inicio de la traducción y la entrada en la fase G0 (Urban et al, 2007).

Bajo estrés osmótico, Sch9 se asocia a promotores específicos regulados por estrés vía el factor de transcripción Sko1 y contribuye a la inducción de la expresión génica junto con Hog1 (Pascual-Ahuir & Proft, 2007). La pérdida de función de Sch9 conlleva a la osmo-sensibilidad y la disminución de la transcripción de los genes de respuesta a estrés.

La vía de señalización cAMP-PKA.

La vía de señalización de la proteína quinasa A (PKA), forma parte de la adaptación transcripcional al estrés. Si bien la función principal de la vía de cAMP-PKA ha sido descrita para la adaptación del metabolismo respiratorio al fermentativo (Santangelo et al, 2006; Thevelein et al, 2000), esta vía tiene un rol directo en la regulación de la expresión génica bajo condiciones de estrés. En general, la actividad PKA en condiciones ambientales favorables promueve el crecimiento celular, la glucólisis y la progresión a través del ciclo celular, mientras que la resistencia a estrés es regulada negativamente (Rubio-Teixeira et al, 2010). La actividad PKA está directamente ligada a la expresión génica activada por estrés osmótico vía los factores de transcripción Msn2 y Msn4 (Martínez-Pastor et al, 1996; Schmitt & McEntee, 1996). Msn2/4 están regulados negativamente por la fosforilación de PKA al ser retenidos en el citoplasma bajo condiciones normales de crecimiento (Görner et al, 1998 & 2002).

El factor de transcripción Sko1 también se encuentra regulado por PKA. La actividad de PKA actúa a través de la fosforilación específica de sitios en Sko1, promoviendo su acumulación nuclear y de esta manera regula negativamente la expresión génica de genes blanco (Pascual-Ahuir & Proft, 2007).

El empleo de mutantes ha evidenciado la importancia de la PKA en la regulación de la división celular, el tiempo de duplicación, detección del estado nutricional del medio y la resistencia a estrés. Mutantes que presentan la vía cAMP-PKA hiperactiva son incapaces de arrestar el ciclo celular en la fase G1 como consecuencia del hambreado. Este tipo de mutantes muestra muy baja tolerancia al estrés, pierden viabilidad al entrar en la fase estacionaria, y son incapaces de acumular trehalosa y glucógeno. Por el contrario, mutaciones que disminuyen la actividad de la vía PKA presentan fenotipos con alta tolerancia a condiciones de estrés, tiempos de duplicación largos (por retraso en la fase G1 del ciclo celular), engrosamiento de la pared celular y, asociado a ello, muestran acumulación de glucógeno y trehalosa, aun en la fase logarítmica de crecimiento (Thevelein et al, 1999).

La importancia del cAMP en el funcionamiento celular se refleja en los múltiples mecanismos de regulación que modulan los niveles de esta molécula. Así, la actividad de la adenilato ciclasa (Cyr1) se encuentra regulada positivamente por las proteínas Ras y el sistema de receptores acoplados a proteínas G, Gpr1-Gpa2 (Kraakman et al, 1999). Las proteínas Ras, codificadas por los genes RAS1 y RAS2 (Field et al, 1988), pertenecen a la familia de proteínas G monoméricas y, cuando tienen GTP unido, activan a la adenilato

ciclasa. La inactivación de estas proteínas depende de una actividad de GTPasa intrínseca, la cual es estimulada por las proteínas Ira1 e Ira2 (Tanaka et al, 1989). A su vez, la activación de las proteínas Ras requiere de una proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina llamada Cdc25 que intercambia el GDP asociado a Ras por GTP. Se ha descrito un homólogo de CDC25, llamado SDC25, cuyo papel en la activación de Ras aún se desconoce (Rubio-Teixeira et al, 2009). La adenilato ciclasa también está regulada por el sistema Gpr1-Gpa2. La proteína Gpr1 pertenece a una familia de receptores acoplados a proteínas G y ha sido la primera de su clase asociada a respuestas nutricionales. Esta proteína percibe la glucosa del medio y activa a la proteína Gpa2, de la familia de las proteínas Gα heterotriméricas que a su vez activa a la adenilato ciclasa (Colombo et al, 1998) (Figura 3).

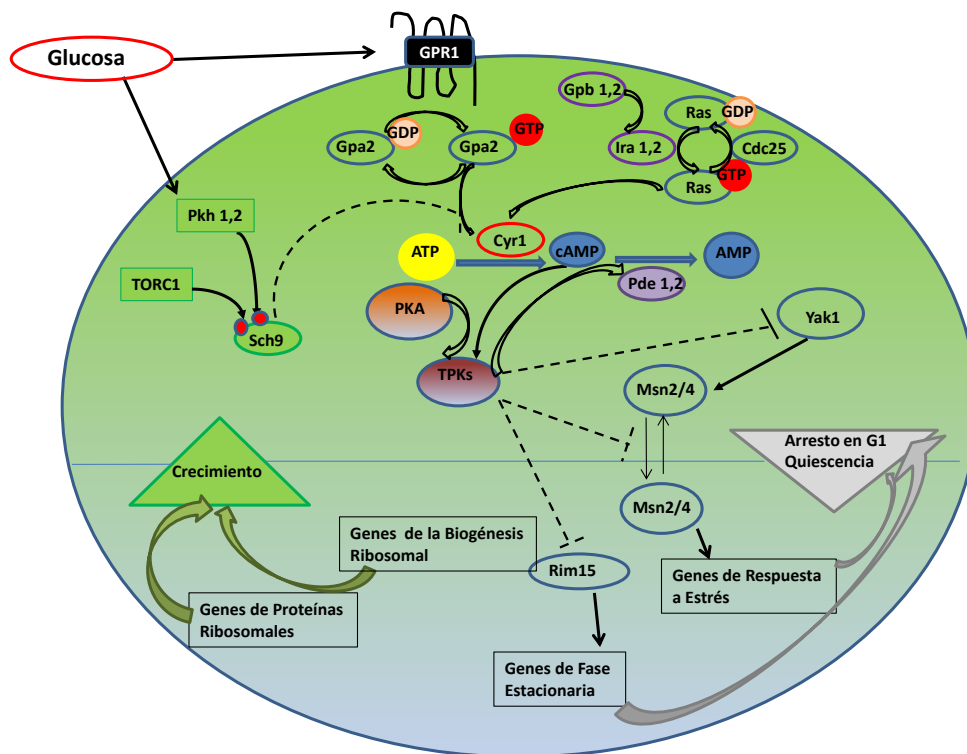


Figura 3. La vía de Ras / PKA desempeña un papel central en la regulación crecimiento y en la respuesta a la fuente de carbono disponible y al estrés. Adaptado de Broach et al, 2012.

Mientras que la delección simultánea de RAS1 y RAS2 lleva a la pérdida total de la actividad PKA y a la muerte celular, la delección del sistema GPCR afecta sólo parcialmente la producción de cAMP inducida por glucosa y la actividad PKA (Mbonyi et al, 1988; Rolland et al, 2000). La unión cooperativa de dos moléculas de cAMP a cada una de las subunidades de la proteína Bcy1 provoca la disociación de las subunidades regulatorias y la consecuente activación de las subunidades catalíticas. Por otro lado, la concentración intracelular de cAMP está regulada por los genes PDE1 y PDE2 que codifican para dos fosfodiesterasas de baja y alta afinidad, respectivamente. La fosfodiesterasa de baja afinidad es a su vez blanco de la PKA, la cual la activa y, de esta manera regula negativamente la acumulación excesiva de cAMP (Mbonyi et al, 1990; Nikawa et al, 1987).

La fosfodiesterasa de alta afinidad Pde2 controla los niveles basales de cAMP durante la fase estacionaria de crecimiento (Park et al, 2005) mientras que la fosfodiesterasa de baja afinidad Pde1, está específicamente involucrada en la inhibición de la vía de cAMP inducida por glucosa, y es activada a través de una retroalimentación negativa ejercida por la PKA (Casamayor et al, 1999). Las proteínas Ras y la adenilato ciclasa también se encuentran involucradas en la retroalimentación negativa de la vía cAMP-PKA (Colombo et al, 2004).

Además de la regulación mediada por el cAMP, la actividad de PKA se encuentra también modulada por su localización subcelular, por su estado de fosforilación, por su abundancia proteica (Budhwar et al, 2010; Griffioen et al, 2001; Portela & Moreno et al, 2006; Schmelzle et al, 2004; Werner-Washburne et al, 1991).

Las proteínas kelch Gpb1 y Gpb2 fueron identificadas inicialmente por su capacidad de interactuar con Gpa2. Varias evidencias han indicado que Gpb1 y Gpb2 regularían negativamente a la PKA. Algunos de los mecanismos propuestos para esta regulación incluyen inhibición de Gpr1 por Gpb1/2 (Harashima & Heitman, 2005), estimulación de la actividad GTPasa de Ras (Harashima et al, 2006) y estimulación de la interacción entre las subunidades catalíticas y regulatorias de la PKA (Peeters et al, 2006). Recientemente se ha demostrado que Gpb1/2 promoverían la asociación entre ambas subunidades de la PKA a través de la fosforilación de la subunidad regulatoria y estabilización proteica de la misma. Esta fosforilación se ve estimulada conforme disminuyen los niveles de glucosa en el medio (Budhwar et al, 2010).

Proteína Quinasa A (PKA).

La PKA es un heterotetrámero compuesto de dos subunidades catalíticas (C) y dos regulatorias (R). La primera es la responsable de catalizar la transferencia de fosfato mientras que la segunda es la que le confiere dependencia al cAMP y regula su localización subcelular mediante la formación de complejos multiproteicos. Cuando aumenta la concentración intracelular de cAMP en respuesta a un estímulo, dos moléculas de cAMP se unen cooperativamente a cada subunidad regulatoria, promoviendo la disociación de la holoenzima en dos moléculas catalíticas activas y un dímero de subunidad regulatoria con los cuatro sitios de cAMP ocupados (Figura 4).

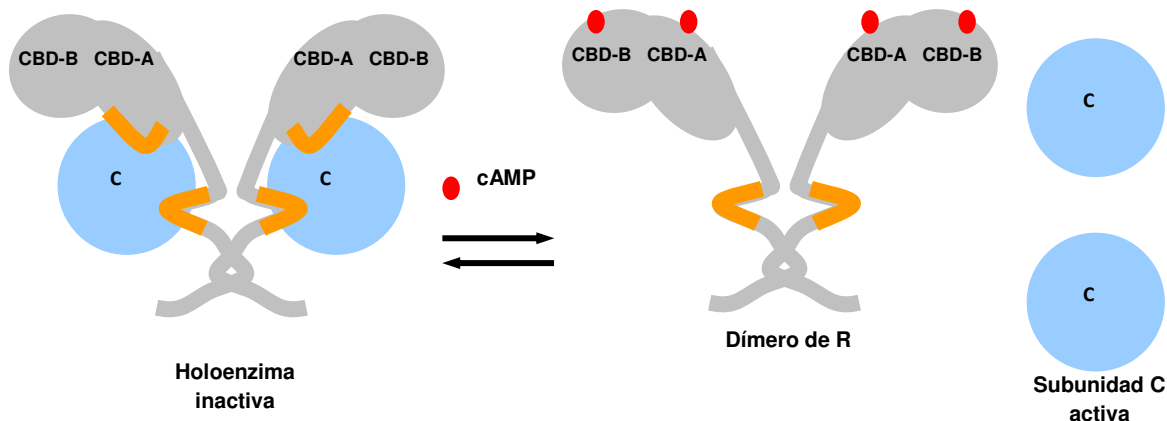


Figura 4. Mecanismo de activación de la holoenzima de PKA por cAMP. El heterotetrámero, en presencia de cAMP, se disocia en un dímero de subunidad regulatoria (R) (con los dos sitios de unión al cAMP ocupados) y dos subunidades catalíticas (C) activas. Subunidad regulatoria en gris, subunidad catalítica en celeste, cAMP en rojo. En naranja se observan los principales sitios de interacción RC, el sitio de pseudosustrato y una región del sitio CBD-A de unión a cAMP.

En mamíferos existen cuatro isoformas de subunidad catalítica $C\alpha$, $C\beta$, $C\gamma$ y PrKX (Zimmermann et al, 1999). Los niveles de expresión de las diferentes subunidades de PKA están sujetos a regulación por hormonas que actúan a través de receptores acoplados a proteínas G (Jahnsen et al, 1986; Øyen et al, 1988), señales mitogénicas a través de receptores tirosina quinasa (Skålhegg & Tasken, 2000) y hormonas esteroideas (Levy et al, 1989). La regulación de las subunidades de PKA mediada por cAMP actúa modificando la expresión génica (Taskén et al, 1991; 1993), la estabilidad del mRNA (Knutsen et al, 1991) y la estabilidad de las proteínas R y C después de la disociación de la holoenzima (Taskén et al, 1991; Houge et al, 1990).

Se han hallado secuencias regulatorias río arriba de los genes que codifican para C α , C β (Chrivia et al, 1988) y C γ (Reinton et al, 1998). Estos genes, excepto C γ tienen promotores que carecen de la región rica en GC y de la secuencia consenso TATA. Estas son características de genes altamente regulados y expresados en bajo nivel (Skálhegg & Tasken, 2000).

En *S.cerevisiae* la subunidad catalítica está codificada por tres alelos TPK1, TPK2 y TPK3. Las proteínas Tpk1 y Tpk3 presentan un 84 % de homología, y son un 67% y 76% homólogas a Tpk2 respectivamente. Las mayores diferencias se encuentran en el N terminal, siendo las homologías mayores en la región C terminal (Toda et al, 1987a).

La actividad quinasa de las células de levadura está dada en su mayor medida por los alelos Tpk1 y Tpk2 mientras que la actividad de Tpk3 es muy baja debido a su baja expresión (Mazón et al, 1993).

En mamíferos existen dos tipos de R, Tipo I y Tipo II. Cada una de ellas está codificada por dos genes RI α y RI β , RII α y RII β . Entre ellas difieren en peso molecular, punto isoeléctrico, secuencia primaria, capacidad de autofosforilación, estructura y expresión tejido específico (Diller et al, 2001).

En *S.cerevisiae* la subunidad regulatoria está codificada por un único gen BCY1 que tiene una homología del 40% con las de mamífero (Toda et al, 1987b).

A diferencia de la subunidad catalítica, la regulatoria posee una organización modular conservada. El dominio de dimerización y anclaje en posición N terminal, llamado D/D (*Dimerization/Docking Domain*), es un arreglo de cuatro hélices que también provee un sitio de anclaje para las proteínas AKAPs (*A Kinase Anchoring Proteins*). Los dos dominios de unión al cAMP se ubican en tándem en la región C terminal y se denominan CBD-A y CBD-B (*cAMP Binding Domain*). La estructura principal de estos dominios es el cassette de unión al fosfato PBC (*Phosphate Binding Cassette*), donde se une el cAMP. Separando el dominio de dimerización y los de unión a cAMP se encuentra una región bisagra flexible que contiene una secuencia inhibitoria similar a un sustrato (pseudosustrato) y que bloquea el sitio activo de la subunidad catalítica en ausencia de cAMP (Taylor et al, 2005). Las RI no pueden ser autofosforiladas por no poseer la Ser fosforilable en el sitio inhibitorio mientras que la RII sí. La fosforilación en este sitio reduce la afinidad entre las subunidades R y C (Figura 5).

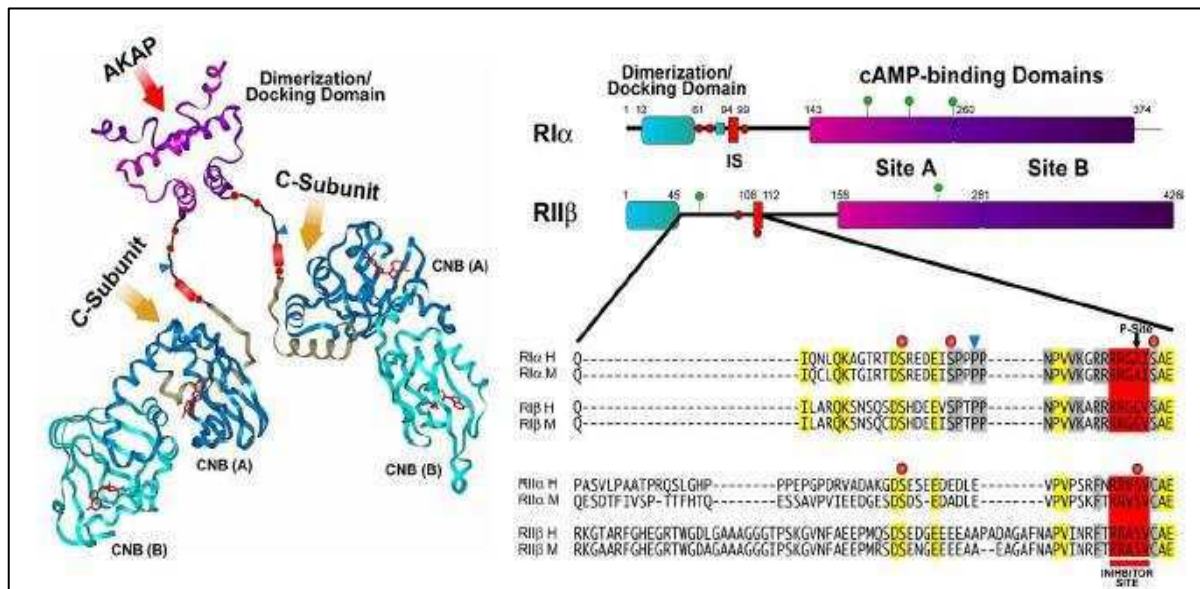


Figura 5. A la izquierda un modelo de la subunidad RI de mamíferos mostrando los dominios estructurados CNB A y B con el cAMP y la región bisagra. Además se indican con flechas los sitios de interacción con la subunidad C, con AKAPs y el sitio de dimerización. A la derecha se observa un esquema de la organización de las subunidades reguladoras de la PKA, la organización de los dominios de RI y RII donde se incluyen las regiones bisagra en detalle y en rojo la región de pseudosustrato.

La subunidad reguladora en *S. cerevisiae*, al igual que la RII de mamíferos, posee la secuencia de autofosforilación RRTSV en la región bisagra y la fosforilación en este sitio (Ser¹⁴⁵) también disminuye la afinidad entre R y C, al menos *in vitro* (Kuret et al, 1988).

La delección del gen BCY1 provoca una desregulación de la actividad PKA en la célula, resultando en un fenotipo similar al presente en cepas con alta actividad PKA. En estas cepas se observa una alta tasa de glicólisis e inhibición de la gluconeogénesis que resultan en una incapacidad para crecer en fuentes de carbono no fermentable.

Holoenzima

La holoenzima PKA de mamíferos es un heterotetrámero formado por dos subunidades catalíticas y dos reguladoras. Tanto la R (RIα, RIβ, RIIα, RIIβ) como la C (Cα, Cβ, Cγ, PRKX) poseen distintas propiedades físicas y biológicas, están diferencialmente expresadas y son capaces de formar diferentes isoformas de holoenzimas de PKA (Taskén y Aandahl 2004).

Aunque la clasificación del tipo de holoenzima depende de la R que la conforma, se ha demostrado que la combinación con las distintas subunidades catalíticas con la misma isoforma de R también influye en las características de la holoenzima, como la constante

de asociación (K_a) para el cAMP (Gamm et al, 1996), localización subcelular, afinidad por el cAMP y preferencia de sustratos, características que podrían contribuir en la especificidad de respuesta al cAMP (Ørstavik et al, 2005).

La holoenzima en *S. cerevisiae* difiere en varios aspectos bioquímicos con la de mamíferos. La afinidad entre R y C en la levadura es del orden de 20 nM mientras que en mamíferos es subnanomolar (Kuret et al, 1988). La afinidad decrece en mamíferos en el orden de 1000 veces con el agregado de cAMP (Kopperud et al, 2003). En *S. cerevisiae* el agregado de cAMP disminuye la afinidad R-C sólo 20 veces. Las explicaciones para estas diferencias se basan en las estructuras primarias de la R y a las modificaciones postraduccionales que sufren. La subunidad C de *S. cerevisiae* también es menos afín por el Kemptido (20-30 veces menos) y por el PKI (inhibe menos a Tpk1 que a la C de mamíferos) (Zoller et al, 1988).

El mecanismo de activación generalmente aceptado para la holoenzima es la disociación de la misma, en presencia de altas concentraciones de cAMP, en un dímero de R unido por el dominio DD y dos subunidades catalíticas activas. Sin embargo también se ha propuesto la participación del sustrato en el mecanismo de activación. Tanto estudios utilizando SAXS (Small Angle X-ray Scattering) (Vigil et al, 2004) como el cristal $R\alpha:C$ obtenido (Kim et al, 2005) postulan un modelo de mecanismo de activación en donde el cAMP se asocia en primer lugar al dominio CBD-B de la R. La posterior asociación de cAMP al dominio CBD-A aumenta la accesibilidad del sustrato hacia el bolsillo catalítico de la C. Entonces el sustrato compete con el pseudosustrato de la R y completa la disociación de la holoenzima.

Recientemente se ha descrito que la especificidad en el reconocimiento del sustrato por una quinasa depende de una relación dinámica de varios factores: la secuencia aminoacídica cerca del aminoácido fosforilado, la localización y los niveles de expresión tanto del sustrato como de la quinasa y por último de la presencia o ausencia de proteínas de anclaje que limitan las interacciones sustrato-quinasa. En particular la especificidad de sustrato de cada Tpk en levadura, no parece estar relacionada con aminoácidos determinantes en la secuencia cercana al sitio de fosforilación ni con una diferencia en la constante catalítica. Sin embargo, un nuevo punto de regulación debe ser considerado para contribuir a la selectividad de cada isoforma: la participación del sustrato en la activación de PKA por cAMP (Galello et al, 2010).

Localización subcelular de PKA

La localización sitio específica de la PKA se ha estudiado en gran detalle en mamíferos. La misma está dada a través de proteínas de interacción con quinasa A (AKIPs) las cuales unen subunidad catalítica y proteínas de anclaje o AKAPs (*A Kinase Anchoring Proteins*) las cuales se unen a la subunidad reguladora. Se ha descrito una gran cantidad de miembros de la familia de las AKAPs, la mayoría de ellos se unen a la RII mientras sólo unas pocas lo hacen a RI o a ambas, es decir con especificidad dual (Jarnæs & Taskén, 2007).

La generación de microdominios de cAMP también lleva a una activación sitio específico. Los cambios en las concentraciones de cAMP se generan mediante activación o inhibición de la Adenilato Ciclasa mediada por ligandos cuyos receptores activan proteínas G asociadas a membrana. Sin embargo los niveles de cAMP generados en respuesta a un ligando específico están determinados por la localización y disponibilidad de dichos receptores y ciclasas acopladas a los mismos. Dichos dominios de cAMP están moldeados espacial y temporalmente por fosfodiesterasas. Se especula que gradientes de cAMP generados por distintos ligandos estén específicamente organizados para seguir distintas rutas de señalización mediadas por PKA o incluso activar un único grupo de moléculas de PKA localizado en determinada región mediante AKAPs para mediar su efecto biológico (Figura 6).

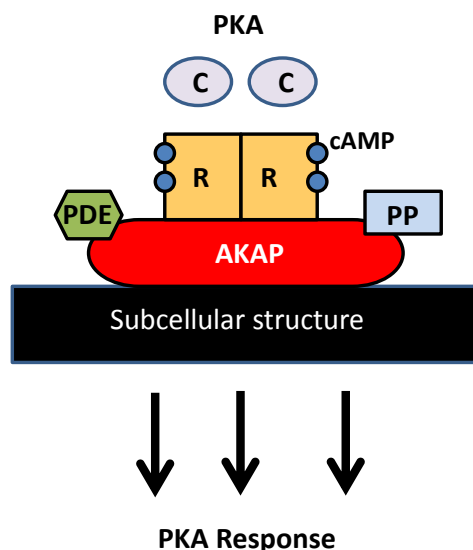


Figura 6. Modelo de localización subcelular de PKA en mamíferos. La AKAP une PKA por la subunidad reguladora y también fosfodiesterasas (PDE) y fosfatasas (PP). Este esquema representa la inhibición de PKA. Las AKAPs permiten la activación o inhibición de PKA en una zona determinada, dependiendo de la disponibilidad de cAMP en dicho microdominio. Adaptado de Patel et al, 2011.

La localización general de la holoenzima PKA es citoplasmática o se encuentra unida a organelas citoplasmáticas vía AKAPs, dependiendo del tipo de subunidad reguladora que posea asociada. La activación de PKA ocurre a través de la unión de cAMP a las subunidades regulatorias, causando la disociación de las subunidades catalíticas, las que una vez liberadas translocan al núcleo regulando la transcripción génica estimulada por cAMP (Gupta et al, 2011). En *Saccharomyces cerevisiae*, no existen homólogos AKAP o AKIP, ni tampoco del inhibidor de PKA (PKI) y la regulación de la localización de PKA aún no se conoce claramente.

Por definición, la subunidad catalítica de la holoenzima PKA colocaliza con los complejos R-AKAPs. Luego de la disociación por cAMP, la localización de C no está restringida por la interacción con R, y se encuentran competentes para fosforilar sustratos preferentemente cercanos. En células de mamíferos, la señalización nuclear vía cAMP requiere del movimiento de subunidades C libres dentro del núcleo (Mayr & Montminy, 2001) y su actividad es regulada por la manipulación espacio-temporal del cAMP (Sample et al, 2012). El ingreso de C al núcleo es por difusión pasiva (Hagiwara et al, 1993); en cambio, la salida del núcleo de C depende de un mecanismo de transporte activo. La inactivación y la exportación nuclear de C ocurren gracias a la interacción con el PKI (*Protein Kinase Inhibitor*); hecho que agregaría un punto de control sobre la accesibilidad de C a sustratos nucleares (Wen et al, 1994).

También se ha demostrado que la retención de la subunidad catalítica en el núcleo involucra la interacción con la proteína AKIP (*A-Kinase Interacting Protein*). Esta se une al extremo amino terminal de C (residuos 14-39) y favorece la acumulación nuclear de C en células HeLa. Esto representa un mecanismo de control de la localización de C que difiere al de las AKAPs que interactúan con la subunidad reguladora (Sastri et al, 2005).

En *S. cerevisiae*, la localización subcelular de Bcy1 es dinámica y responde a cambios en la disponibilidad de nutrientes así como a las condiciones de estrés. Es predominantemente nuclear en células crecidas en glucosa, mientras que presenta una localización núcleo-citoplasmática en glicerol y frente a estrés térmico (Griffioen et al, 2000). La fosforilación del cluster II de serinas en la región aminoterminal de Bcy1, incrementaría su afinidad por Zds1, un posible homólogo funcional a las AKAPs de mamífero, y como consecuencia retendría a Bcy1 en el citoplasma en ausencia de glucosa extracelular (Griffioen et al, 2001). La localización de Tpk1 depende de la interacción con Bcy1, mientras que Tpk2 presentaría localización nuclear independiente de cAMP (Pan & Heitman, 2002, Kumar et al, 2008). Un mecanismo implicado en la

localización de Tpk1 depende de la actividad de las proteínas quinasas TOR (*Target Of Rapamycine*) que controlan una gran cantidad de procesos relacionados con el crecimiento y la respuesta a la disponibilidad de nutrientes. Cuando las células son tratadas con la droga rapamicina se produce una inactivación de TOR, lo cual afecta, entre otras cosas, la localización de Tpk1, que se concentra rápidamente en el núcleo (Schmelzle et al, 2004). Además TOR regula la PKA inhibiendo la fosforilación de varios sitios de Bcy1 entre el dominio de dimerización y el dominio de unión a cAMP. Esta inhibición de la fosforilación se da a través de Sch9 y la MAP quinasa MPK1, por ende para algunos sustratos TOR estaría río arriba de PKA en la cascada de señalización propuesta (Soulard et al, 2010).

No se conoce si la exportación nuclear de las subunidades de PKA involucra un mecanismo activo. Un análisis *in silico*, no ha revelado aún la presencia de un homólogo al PKI en el genoma de *S. cerevisiae*; sugiriendo que el mecanismo de exportación nuclear de la subunidad catalítica de PKA sería diferente del descrito para células de mamíferos.

En *Saccharomyces cerevisiae*, se describió que PKA puede ser regulada por las proteínas Gpb1 y Gpb2 (Figura 3) en respuesta a la disponibilidad de nutrientes (Budwhar et al, 2010). Gpb1/2 contienen 6 o 7 repeticiones del dominio Kelch -por homología a las proteínas Kelch de *Drosophila melanogaster*- en la región carboxilo terminal que le permiten establecer interacciones proteína-proteína (Budwhar et al, 2011). Gpb1 y Gpb2 actúan río abajo de la adenilato ciclasa para afectar directamente la actividad de la PKA. Se ha demostrado que células que carecen de Gpb1 y Gpb2 presentan menor interacción Bcy1-Tpk1 (Peeters et al, 2006). Además se ha demostrado que Gpb1 y Gpb2 afectan tanto la abundancia como el estado de fosforilación de Bcy1 en respuesta a nutrientes (Budwhar et al, 2010). Gpb1 y Gpb2 son predominantemente citoplasmáticas, pero las Tpk1 localizan alternativamente entre el núcleo y el citoplasma dependiendo de las condiciones nutricionales (Griffioen et al, 2000). Estas observaciones plantean la hipótesis de que Gpb1 y Gpb2 podrían interaccionar con las Tpk1 localizadas en citoplasma controlando la localización de éstas reteniéndolas en dicho compartimento. Además, se reportó que la fosforilación de Tpk1 cambia en respuesta a glucosa de manera dependiente de Gpr1 (Portela et al, 2006). La interacción de Gpb1 y Gpb2 con la Gpa2 activa podría causar modificaciones en las subunidades catalíticas Tpk1 y liberarlas para luego translocar al núcleo y fosforilar sus sustratos (Budwhar et al, 2011).

Regulación de la transcripción en *Saccharomyces cerevisiae*.

El proceso que lleva al inicio de la transcripción requiere varios pasos de reclutamiento de diferentes factores (Fuda et al, 2009; Hahn & Young, 2011). La Figura 7 esquematiza el inicio de la transcripción.

En los primeros pasos, los activadores transcripcionales se unen a secuencias específicas de DNA cerca de los genes blanco reclutando co-activadores transcripcionales y componentes de la maquinaria de transcripción a través de interacciones proteína-proteína (Figura 7 a, b y c). La selección de promotor se determina por la interacción de uno o más activadores transcripcionales con las secuencias específicas de DNA (sitios de reconocimiento) cerca de los genes blanco. Los activadores reclutan los componentes de la maquinaria de transcripción a estos genes vía interacciones proteína-proteína. La activación de la expresión génica es inducida por el reclutamiento secuencial de grandes complejos multi-proteicos a través de la unión a activadores. Los activadores también reclutan complejos remodeladores de cromatina ATP-dependientes, que mueven o desplazan las histonas en el promotor, lo que facilita el posicionamiento de la maquinaria general de transcripción. Juntos, los co-activadores y los remodeladores de nucleosomas facilitan el acceso rápido de la RNA polimerasa II (Pol II) y factores generales de la transcripción (FGT) TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF y TFIIH para formar el complejo pre-iniciación (PIC) sobre el núcleo del promotor. Estos tres primeros pasos constituyen el reclutamiento dependiente de activadores (Hahn & Young, 2011).

Para que la polimerasa avance con la elongación de la transcripción de manera productiva, se necesita un nivel adicional de regulación (Figura 7 d y e). Después del ensamblaje del PIC, CDK7 en humanos TFIIH (Kin28 en levaduras) fosforila la posición serina 5 (S5) de la Pol II en el dominio carboxi-terminal (CTD). Al mismo tiempo, otra subunidad de TFIIH, la ADN helicasa XPB (Rad25 en levaduras), remodela el PIC, y 11-15 bases de ADN en el sitio de comienzo de la transcripción (TSS) se desenrollan para introducir una cadena simple de ADN como molde en el sitio activo de Pol II (Saunders, et al 2006). Pol II a continuación, se disocia de algunos de los GTFs y continúa a una etapa temprana de la elongación de la transcripción. Luego del despeje del promotor, Pol II transcribe 20 a 40 nucleótidos del gen y se detiene en el sitio próximo de pausa del promotor. La elongación eficiente por Pol II requiere un segundo evento de fosforilación en la posición S2 del CTD de la Pol II por CDK9, una subunidad de la P-TEFb humana (Ctk1 en levaduras). La fosforilación de la CTD crea sitios de unión para proteínas que son importantes para el procesamiento de los mRNA. Los remodeladores de nucleosomas

también facilitan el paso de RNAPol II durante la fase de elongación de transcripción. El ciclo continúa con la transcripción, elongación de la transcripción por RNA Pol II, seguido por la terminación y re-inicio de una nueva ronda de la transcripción.

La mayoría del DNA genómico en células eucariotas se encuentra compactado en cromatina por lo tanto no es accesible de manera directa para los componentes de la maquinaria general de transcripción (Campos et al, 2009).

Estudios en levaduras sugieren que los genes inducibles tienden a tener mayor densidad de nucleosomas cubriendo sus promotores que los genes constitutivamente activos, los cuales tienen promotores más expuestos, desprovistos de nucleosomas. Si bien algunos activadores transcripcionales logran unirse a sus secuencias de ADN blanco en el nucleosoma, la formación del PIC y la transcripción subsiguiente son inhibidas (Cairns et al, 2009).

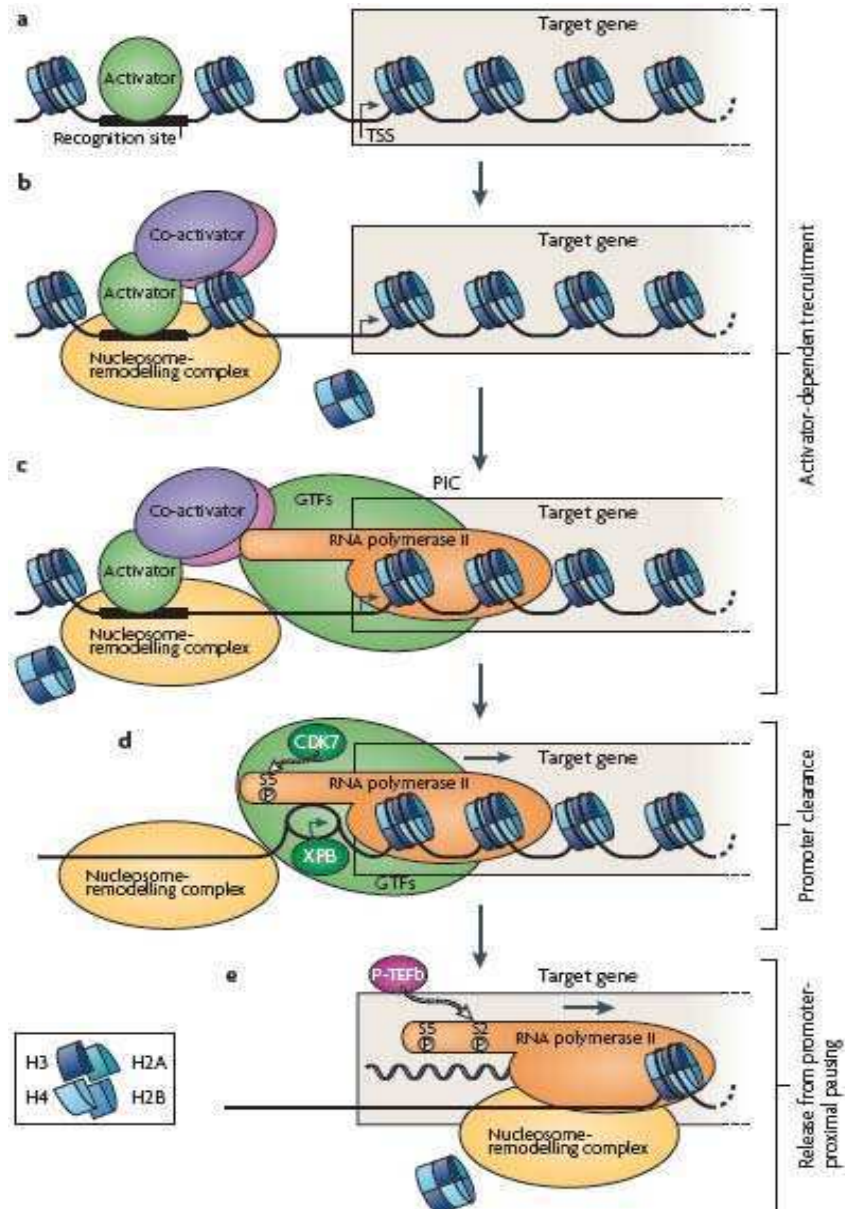


Figura 7. Los primeros pasos en el ciclo de la transcripción.

a) Unión del activador al promotor determinado. b) reclutamiento de complejos multi-proteicos (que se muestran en violeta y rosa) a través de la unión a activadores. c) Los activadores también reclutan complejos de remodelación de cromatina ATP-dependientes, que mueven o desplazan las histonas en el promotor, lo que facilita el posicionamiento de la maquinaria general de transcripción. d) Fosforilación de la Pol II en el dominio carboxi-terminal (CTD), remodelado del PIC y posterior elongación de la transcripción. e) Pausado de la Pol II en el sitio próximo de pausa del promotor. La elongación eficiente por Pol II requiere un segundo evento de fosforilación en la posición S2 del CTD. El ciclo continúa con la transcripción, elongación de la transcripción por Pol II, seguido por la terminación y re-inicio de una nueva ronda de la transcripción.

Remodelación de la cromatina y Transcripción.

La accesibilidad del DNA es facilitada por dos clases de enzimas, enzimas remodeladoras de nucleosomas ATP-dependientes y enzimas modificadoras de histonas. Estas últimas modifican post-traduccionalmente el N-terminal de las proteínas histonas para alterar la estructura de la cromatina y proveen sitios de unión para proteínas regulatorias.

En contraste, los complejos remodeladores de la cromatina utilizan energía proveniente del ATP para desordenar la interacción del DNA con los nucleosomas, moverlos, remover o intercambiarlos. Resultando así, una cromatina/DNA accesible para activadores-reguladores durante procesos celulares que requieren la activación de la transcripción génica.

En eucariotas, los co-activadores y los complejos remodeladores de cromatina actúan de manera conjunta para facilitar la activación génica en un contexto nucleosómico.

Una vez superada la barrera de los nucleosomas el inicio de la transcripción necesita de complejos tales como SAGA y Mediador. Estos complejos involucrados en la activación de la transcripción a menudo poseen actividades enzimáticas reguladas por el amino-terminal de las proteínas histonas de los nucleosomas. SAGA, por ejemplo, contiene la histona acetiltransferasa (HAT) Gnc5 (Wu et al, 2004) y Mediador contiene subunidades con actividad quinasa como las ciclina C y la CDK8 (Fondell et al, 2013).

Existen otros complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP, los cuales utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para remover histonas o desplazarlas de un sitio del DNA a otro, o actuar sobre chaperonas de histonas (Clapier et al, 2009). Uno de ellos, es el complejo SWI/SNF. Si bien en ausencia de este complejo los nucleosomas son removidos y se inicia la transcripción, dicha transcripción es mucho más lenta (Bryant et al, 2008).

En *Saccharomyces cerevisiae*, existen cuatro grandes familias de remodeladores de la cromatina: la familia SWI/SNF; la familia INO80; la familia ISWI; y la familia CHD. Los miembros de las familias SWI/SNF y ISW1 parecen estar principalmente involucrados en la regulación de la transcripción gen-específica (Martens & Winston, 2003; Mellor & Morillon, 2004; Saha et al, 2006).

La familia SWI/SNF es un complejo formado por entre 8 y 11 subunidades. Varias de estas subunidades tienen homología con mamíferos (Khavari et al, 1993; Wang et al, 1996). SWI/SNF se une casi exclusivamente a promotores y activan sus genes blancos al mismo tiempo que desplazan los nucleosomas. En contraste, los complejos BAF

(complejo SWI/SNF en mamíferos) se han encontrado mayormente en regiones intergénicas, donde actúa tanto activando como reprimiendo genes.

RSC (*Remodel the Structure of Chromatin*) es un complejo relacionado con SWI/SNF. Comparte homología entre las ATPasas de levadura STH1 y SWI2/SNF2. RSC comparte dos subunidades idénticas con SWI/SNF de levaduras, Arp7 y Arp9, y varias subunidades homologas (Cairns et al, 1996). Estudios genéticos indican que si bien estos dos complejos comparten subunidades y tienen una alta homología, no son redundantes y están funcionalmente especializados. Ambos complejos parecen regular la expresión génica sin superponerse en los sets de genes que regulan (Sudarsanam et al, 2000; Damelin et al, 2002)

La familia INO80 está compuesta por el complejo INO80, el complejo SWR1 y el complejo NuA4. Esta familia tiene afinidad por los nucleosomas, en particular por las variantes H2A, H2AZ y H2AX. INO80 y SWR1 pueden desplazar nucleosomas *in vitro* y también escindir histonas del DNA (Tsukuda et al, 2005; van Attikum et al, 2007). El complejo INO80 contiene β -actina y proteínas relacionadas con la actina (Arps) como las Arp5 y Arp8 las cuales están conservadas en moscas y mamíferos. Arp4 está presente en el complejo SWR1 y en el NuA4.

La familia ISWI, se llama así por su imitación a la familia SWI/SNF. La identificación inicial de este complejo indica un rol en la activación de la transcripción, ya que promueven la transcripción de templados (Tsukiyama et al, 1995; Xiao et al, 2001). Varios estudios resaltan la actividad del complejo ISWI en regiones de eucromatina. Sin embargo, ISWI también se concentra en regiones de heterocromatina, sugiriendo un rol para este complejo en la iniciación o mantenimiento de la formación de la heterocromatina (Deuring et al, 2000).

En levaduras solo se encontró hasta el momento a CDH1 monómero o dímero, a diferencia de las subunidades enzimáticas de los otros complejos remodeladores de la cromatina que son multiproteicos (Tran et al, 2000). CHD1 interacciona con los complejos de multi-subunidades SAGA y SLIK (SAGA LIKE, un complejo del tipo histona acetiltransferasa SAGA), dos de los complejos HAT altamente relacionados en levadura, que preferencialmente acetilan H3 y H2B (Pray-Grant et al, 2005).

La remoción de nucleosomas facilitada por los complejos de remodelado de cromatina es importante para la inducción de la expresión génica inmediata pero no es esencial para este proceso. Es decir, en algunos genes inducibles, dándole el tiempo necesario de estímulo, el reclutamiento de co-activadores y la maquinaria general de transcripción

dirigida por un solo activador es suficiente para remover los nucleosomas del promotor. Sin embargo para una inducción instantánea de la expresión génica estos complejos remodeladores son cruciales (Soutoglou & Talianidis, 2002). Se han descrito varios ejemplos en levaduras, donde la pérdida de nucleosomas es suficiente para inducir la formación del PIC y activar la expresión génica, aun en ausencia de una señal de inducción (Zhang & Reese, 2007; Adkins & Tyler, 2006).

Sin embargo, estudios en diversas especies muestran que una región libre de nucleosomas no es suficiente para activar la transcripción. Más aun la represión es posible en ausencia de nucleosomas (Mirny et al, 2010).

Aunque el modelo tradicional propuesto, reclutamiento de Pol II dependiente de activadores y factores de transcripción generales es válido para muchos genes inducibles, estudios recientes sugieren que Pol II ya está presente en muchos genes inducibles y lista para la transcripción (Pelechano et al, 2009; Radonjic et al, 2005; Darzacq et al, 2007).

Se ha descrito que hay un nivel adicional de regulación que se produce durante las etapas iniciales de la elongación de la transcripción, antes de que Pol II se libera en un ciclo productivo transcripción. Además, en estos últimos años se ha sugerido que algunos componentes de las vías de transducción de señales que conducen a la expresión de genes inducibles y que se pensaba que funcionaban exclusivamente en el citoplasma, como las MAPKs y la PKA son reclutados a la cromatina y son componentes integrales de los complejos de transcripción (de Nadal & Posas, 2010; Pokholok et al, 2006).

Un análisis genómico demostró que las vías de PKA y TOR co-regulan la expresión de varios genes en levaduras. Mientras TOR actúa como un activador, la vía de PKA actúa reprimiendo los genes respiratorios y activando los genes de proteínas ribosomales. La reducción de la actividad de la PKA, causada tanto por la falta de alguna subunidad catalítica o por el crecimiento en galactosa reduce la acumulación de moléculas inactivas de RNA pol II sobre varios tipos de genes de levaduras, permitiendo así la elongación de la transcripción. Pelechano et al, 2009 propone un modelo para la inhibición la elongación de la transcripción de genes de proteínas ribosomales por PKA (Figura 8): la glucosa estimula el reclutamiento de la RNA Pol II y un factor general de la cromatina FACT a los genes de proteínas ribosomales por medio de la vía cAMP-PKA. FACT se recluta a genes transcritos y presenta una distribución irregular a lo largo de las regiones a ser transcritas, similar a la mostrada por la RNA Pol II. PKA inhibiría la elongación de la transcripción por medio del factor de transcripción Rap1, el cual es específico de proteínas ribosomales. Dicha inhibición favorecería el pausado de la RNA Pol II, lo que

llevaría a un aumento en la proporción de polimerasas inactivas sobre el cuerpo de los genes de proteínas ribosomales. Cabe destacar que el control dependiente de Rap1 para genes de proteínas ribosomales no es el único tipo de control que actúa a nivel de elongación de la transcripción a través del genoma de levaduras. Para genes de proteínas de la biogénesis ribosomal y genes relacionados con mitocondrias también se ha observado regulación de la proporción de RNAPol activas independiente de Rap1.

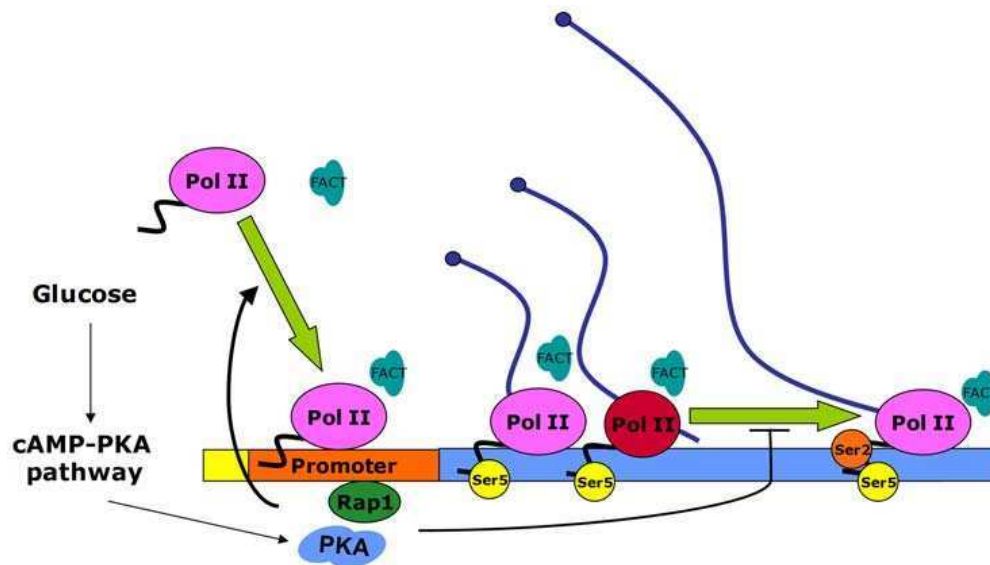


Figura 8. Modelo propuesto para la regulación de la elongación de la transcripción en genes de proteínas ribosomales. Las moléculas de RNA Pol II se muestran en diferentes colores y formas en función de sus actividades: iniciación o elongación activa (rosa) y retrocediendo (roja). Adaptado de Pelechano et al, 2009.

Regulación de la transcripción bajo condiciones de estrés

Como mencionamos anteriormente, las células deben ser capaces de responder rápidamente a los cambios del entorno externo, aprovechar y sobrevivir en las nuevas condiciones. Incluso las células en un organismo multicelular necesitan responder a señales para determinar cuándo dividirse, migrar o morir. La producción de nuevas proteínas en respuesta a estímulos externos resulta en gran parte por la rápida activación de la transcripción de genes, esto se conoce como la inducción de la expresión génica. Los genes inducibles están altamente regulados y deben ser capaces de responder rápidamente y específicamente frente a estímulos. Una vez que el estímulo se retira, dichos genes deben volver rápidamente a su estado inactivo basal. Además, varios genes deben ser activados de manera sincronizada en respuesta a los mismos estímulos.

La respuesta global a nivel transcripcional de células de *Saccharomyces cerevisiae* expuestas a estrés osmótico y a otros estrés ha sido analizada en diferentes estudios independientes (Causton et al, 2001; Gasch et al, 2000; Posas et al, 2000; Rep et al, 2000; Yale et al, 2001). En esta tesis nos concentraremos en estrés oxidativo, generado por peróxido de hidrogeno y menadiona, y estrés osmótico generado por NaCl.

La respuesta al estrés oxidativo.

El estrés oxidativo se da no solo por agentes oxidantes como el peróxido de hidrogeno, menadiona, diamida, KO_2 , o 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) sino también por varios estímulos que generan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como efectos secundarios, como por ejemplo, la temperatura.

Todos los organismos están expuestos a ROS durante el metabolismo aeróbico o después de la exposición a compuestos generadores de radicales libres (Halliwell et al, 2006). El oxígeno molecular es relativamente no reactivo e inofensivo en su estado fundamental, pero puede someterse a una reducción parcial para formar un número de ROS, incluyendo el anión superóxido y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que además puede reaccionar para producir el radical hidroxilo altamente reactivo. ROS son agentes tóxicos que pueden dañar una amplia variedad de componentes celulares resultantes de la peroxidación lipídica, la oxidación de proteínas, y daño genético a través de la modificación de ADN.

Se dice que ocurre estrés oxidativo cuando los antioxidantes y los mecanismos celulares de supervivencia son incapaces de hacer frente a las ROS o los daños causados por ellos. *S. cerevisiae* responde a un estrés oxidativo mediante mecanismos celulares que aseguran la supervivencia de la célula después de la exposición a oxidantes. Esto incluye sistemas de defensa que desintoxican ROS, reducir su tasa de producción, y reparar el daño. Muchas respuestas son ROS específica, pero también hay respuestas generales evocadas por diversas condiciones de estrés.

Se cree que la respiración mitocondrial proporciona la principal fuente de ROS en células eucariotas mediante el proceso de la fosforilación oxidativa (Murphy et al, 2009). Para generar ATP, los electrones son transportados a lo largo de complejos de proteínas que constituyen la cadena de transporte de electrones al aceptor final, el oxígeno molecular, con la formación de agua. La fuga de estos electrones de la cadena respiratoria puede resultar en la reducción de oxígeno, generando ROS en células de levaduras. Otros procesos metabólicos que potencialmente puede generar ROS endógeno, dependiendo

de las condiciones de crecimiento, incluyen la degradación peroxisomal de ácidos grasos en la vía β -oxidación (Hiltunen et al, 2003) y la desaminación oxidativa de los aminoácidos por oxidasas de D-aminoácidos (Pollegioni et al, 2007).

Muchos estudios de estrés oxidativo han hecho uso de compuestos simples tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como un oxidante modelo. Sin embargo, dado que las células pueden responder a través de respuestas oxidantes ROS específicas, se ha argumentado que no existe oxidante único que sea verdaderamente representativo de "estrés oxidativo" (Temple et al, 2005). El H_2O_2 es un oxidante débil; sin embargo, difunde y cruza las membranas fácilmente y, al reaccionar con algunos metales de transición como el hierro o el cobre reducidos (Fe^{2+} o Cu^+ respectivamente) forma al radical hidroxilo muy reactivo (HO).

Los organismos constantemente detectan y se adaptan a cualquier perturbación mediante una batería de defensa antioxidante conformada por sistemas enzimáticos y no enzimáticos.

Los sistemas de defensa no enzimáticos consisten típicamente de moléculas pequeñas que son solubles en agua o, en algunos casos, en un ambiente lipídico. Éstos actúan en general como captadores de algunas de las ROS. Por ej. El glutatión (GSH), posee un grupo sulfhidrilo que reacciona con los oxidantes y se produce glutatión oxidado (GSSG). El glutatión es posiblemente el sistema de defensa no enzimático más abundante en la célula, en consecuencia, su papel en el mantenimiento del estado redox celular es importante (Collinson et al, 1995). Otros ejemplos son las poliaminas, la espermina, la espermidina (Balasundaram et al, 1991).

Los sistemas de defensa enzimáticos incluyen a varias enzimas las cuales son capaces de remover ROS. La catalasa transforma el H_2O_2 en O_2 y H_2O . *S. cerevisiae* posee dos de estas enzimas codificadas por los genes CTA1 y CTT1. El gen CTA1 codifica para la catalasa que se localiza en los peroxisomas, la cual es la encargada de remover el H_2O_2 que se produce durante la β -oxidación de los ácidos grasos (Ruis & Hamilton, 1992).

Las superóxido dismutasas (SOD), como MnSod codificada por el gen SOD2 que se localiza en la mitocondria y Cu/ZnSod codificada por el gen SOD1 de localización citoplásmica. Las SOD dismutan el radical superóxido a H_2O_2 y O_2 (Gralla & Vallentine, 1991). Además las glutarredoxinas y las tiorredoxinas, las cuales son esenciales para el crecimiento aeróbico de *S. cerevisiae* (Luikenhuis et al, 1998; Muller et al, 1991).

La regulación de la respuesta antioxidante en *S. cerevisiae* ocurre mayoritariamente a nivel transcripcional. Se han identificado varios de los factores de transcripción que

regulan la expresión génica en respuesta al estrés oxidativo (Moye-Rowley et al, 2002). Entre los factores más extensamente estudiados en estrés oxidativo se encuentran Yap1, Yap2 y Gcn4. Yap1 afecta la transcripción de los genes que median la respuesta al estrés oxidativo, regulando los niveles celulares de glutatión y en las actividades de las enzimas antioxidantes mencionadas (Delaunay et al, 2000; Hohmann et al, 2003). La regulación de los genes de la respuesta antioxidante mediada por Yap1 depende de la acumulación nuclear de éste. En presencia de H₂O₂, su conformación proteica cambia y no puede ser reconocido por un sistema de exportación nuclear (mediado por Crm1/Xpo, se detalla más adelante), lo que promueve su acumulación nuclear (Okazaki et al, 2005). El gen YAP2 fue identificado por su habilidad de conferir resistencia a cadmio cuando se encuentra en un alto número de copias; las mutantes *yap2Δ* son hipersensibles a varios agentes oxidantes (Rodrigues-Pousada et al 2010).

Otros factores de transcripción como Sko1, Msn2/4, y Skn7 también se encuentran involucrados en la respuesta a estrés oxidativo. Datos recientes sustentan la existencia de una red regulatoria por parte de los factores de transcripción Sko1, Yap1, Msn2/4 y Skn7 que junto a componentes de señalización promueven la respuesta a estrés oxidativo en hongos (Hong et al, 2013b; Roze et al, 2004). Altas concentraciones intracelulares de ROS activan los genes antioxidantes por dos vías de traducción de señales (Figura 9). Por un lado, ROS regula negativamente la vía cAMP-PKA y Msn2/4 se une al promotor blanco activando la expresión de genes antioxidantes. Simultáneamente ROS regula positivamente la vía de señalización SAPK/MAPK a través de un sistema de múltiples pasos de fosforilación, promoviendo la unión de Sko1 y Skn7 a los promotores y posterior activación génica (Hong et al, 2013a).

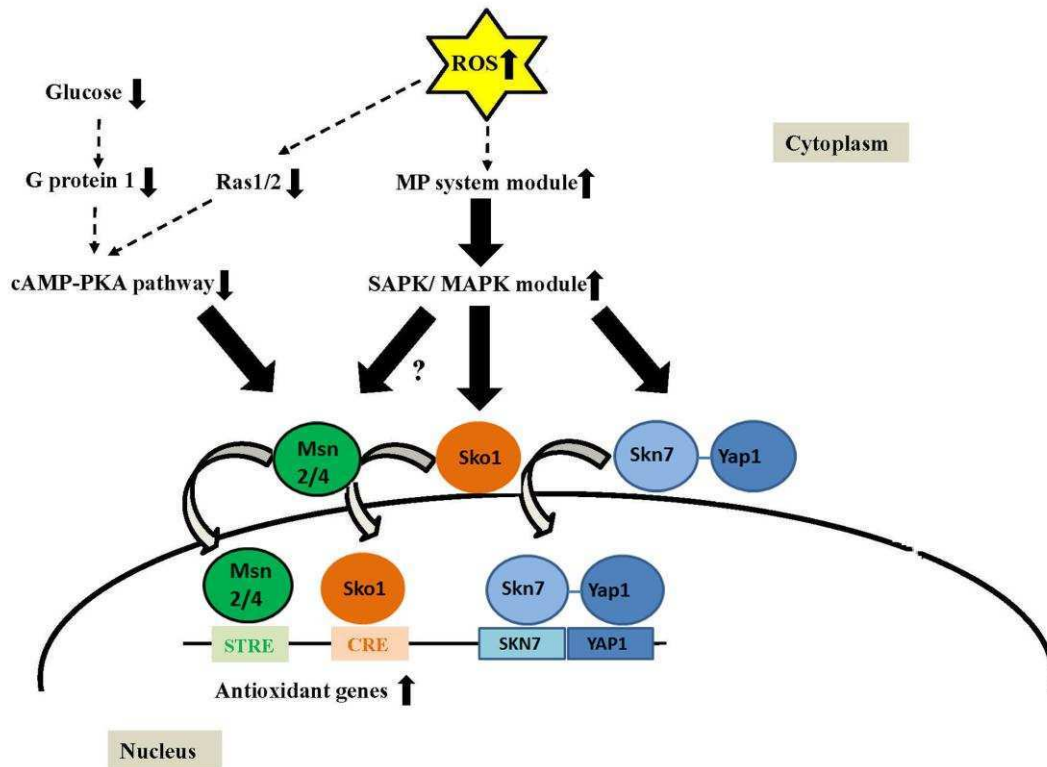


Figura 9. Modelo para la activación transcripcional de genes antioxidantes mediante factores de transcripción relacionados al estrés oxidativo. Ante el aumento de ROS en levaduras, se regula negativamente la vía cAMP-PKA, lo que promueve la unión de Msn2/4 a los sitios STRE en los promotores de genes antioxidantes para su activación. Simultáneamente, se regulan de manera positiva las SAPK/MAPK promoviendo la unión de Sko1 y Skn7-Yap1 a los promotores de los genes blancos. Las flechas punteadas indican la transducción de señales de ROS y las flechas continuas indican las vías de transducción de señales. *MP System module*: *Multistep Phosphorylated System module* (Sistema de múltiples pasos de fosforilación) Adaptado de Hong et al, 2013a.

La respuesta a estrés osmótico.

Cuando un organismo se enfrenta a una condición de estrés salino se generan, simultáneamente, dos tipos de estrés; por un lado, hay una condición de estrés osmótico que depende de la concentración de sal usada y, por otro lado, hay una toxicidad provocada por los diferentes iones (Figura 10).

Se ha demostrado que altas concentraciones salinas (más de 300-500 mM) inhiben las reacciones metabólicas ya que perturban el balance hidrofóbico-electrostático afectando así el funcionamiento de las proteínas (Serrano et al, 1996).

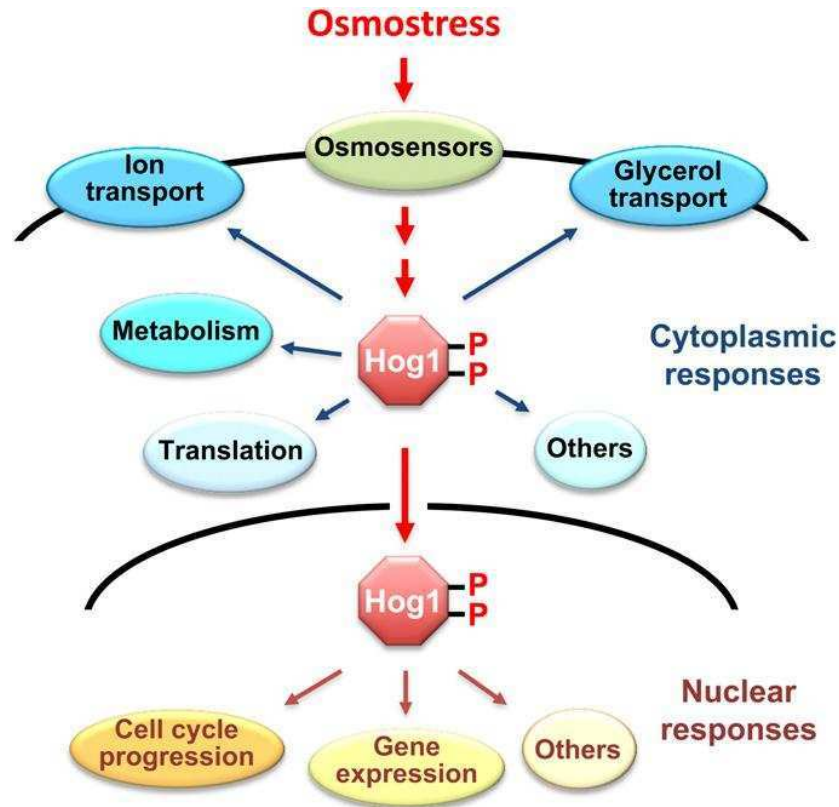


Figura 10. Modelo de la respuesta de Hog1 a estrés osmótico. En respuesta a un aumento en osmolaridad extracelular, Hog1 MAPK se activa, induciendo respuestas adaptativas citoplasmáticas y nucleares. La respuesta citoplasmática incluye el control de flujos iónicos, el transporte de glicerol, enzimas metabólicas y traducción de proteínas. La respuesta nuclear incluye el control de la progresión del ciclo celular y de la expresión génica. Adaptado de Saito et al, 2012

El número de genes que responden a estrés osmótico depende de la severidad del shock y del tiempo aplicado. En este sentido, un estudio reciente sobre la expresión génica global con estrés osmótico muestra un aumento del número de genes inducidos a más del 20% del genoma -cerca de 1400 genes- a lo largo de una cinética de tiempo (Ni et al, 2009).

En la mayoría de los casos, los estudios sobre la regulación de la expresión génica se han centrado en los genes que son inducidos por estrés osmótico, aunque hay un gran número de genes que muestran una regulación totalmente diferente y sus niveles de transcritos disminuyen (Gasch et al, 2000; Rep et al, 2000). Se ha observado que el número de transcritos reprimidos es tan grande como el de los inducidos, viéndose afectados más de 1300 genes bajo estrés osmótico (Ni et al, 2009). Entre los principales grupos de genes reprimidos están los que codifican proteínas ribosomales y los relacionados con el crecimiento celular. La represión de todos estos genes se correlaciona con la disminución de la iniciación de la traducción, el arresto transitorio del

ciclo celular y del crecimiento. La combinación de esta respuesta transcripcional y traduccional podría ayudar a conservar la masa y energía necesarias mientras la célula se adapta a las nuevas condiciones.

Transporte núcleo-citoplasmático de proteínas.

El transporte de macromoléculas entre el núcleo y el citoplasma es posible gracias a los complejos de poro nuclear (NCPs), que abarcan la doble membrana de la envoltura nuclear (NE). El transporte a través del poro nuclear no sólo localiza las proteínas destinadas al núcleo o citoplasma, sino que también desempeña un papel clave en las vías de transducción de señales y en la regulación de los principales procesos celulares. El NCP está compuesto por 30 de polipéptidos diferentes llamados nucleoporinas. Un gran número de nucleoporinas contienen secuencias repetitivas de fenilalanina-glicina (FG) que forman un filtro selectivo para el traspaso de las moléculas a través del poro nuclear, haciéndolo impermeable a las proteínas más grandes de ~ 40 kDa (Cardarelli et al, 2010).

Mientras que las moléculas pequeñas (tamaño ≤ 20 a 40 kDa) pueden transitar a través del NCP por difusión pasiva, moléculas más grandes y complejos moleculares necesitan ser transportadas con la ayuda de otras proteínas y una señal de localización nuclear (transporte activo). Sustratos dependientes de señal se unen a importinas (para importación nuclear) o exportinas (exportación nuclear) para el transporte núcleo-citoplásmico (Yang et al, 2013).

La Señal de Localización Nuclear (NLS y por extensión, también NES -señal de exportación nuclear) puede definirse funcionalmente como: a) necesaria para la importación/exportación; b) suficiente para importación/exportación de una proteína no relacionada; c) capaz de unir factores de transporte directamente; d) el transporte se desactiva cuando se suprime esta señal.

Las primeras secuencias en proteínas caracterizadas, que fueron capaces de dirigir la localización nuclear, fueron identificadas en el antígeno viral T SV40 (PKKKRKV) y nucleoplasmina (AVKRPAATKKAGQAKKKKLD) (Kalderon et al, 1984). El pequeño tamaño y los patrones de secuencia relativamente simple de estos NLS básicos junto con la disponibilidad de las secuencias de genoma completo hicieron posible la identificación de muchos otros NLS, con la organización monopartito (fórmula general) y bipartito (fórmula general) de los aminoácidos básicos (Tabla 1).

NLS Type	Protein	NLS Amino Acid Sequence
Conventional NLSs	SV40 large T-Ag	PKKKRKV ¹³²
	Polyoma large T-Ag	VSRKRPRP ¹⁹⁶
	Hepatitis D virus antigen	EGAPPAKRAR ⁷⁵
	murine p53	PPQPKKKPLDGE ³²²
	NF- κ B p50	QRKRQK ³⁷²
	NF- κ B p65	EEKRKR ²⁸⁶
	Human c-myc	PAAKRVKLD ³²⁸ / RQRRNELKRSE ³⁷⁴
Bipartite NLSs	<i>Xenopus</i> nucleoplasmin	KRPAATKKAGQAKKKKLD ¹⁷¹
	Rat glucocorticoid receptor	YRKCLQAGMNLEARKTKKKIKGIQQATA ⁵²⁴
	RCC1	MSPKRIAKRRSPPADAIPKSKVKVSHR ²⁸
Arginine rich NLSs	HTLV-1 Rex protein	MPKTRRRPRRSQRKRPT ¹⁸
	HIV-1 Rev protein	RQARRRRRRWR ⁴⁶
Atypical NLSs	Mato2	MNKIPIKDLLNPQ ¹³ / VRILESWFAKNI ¹⁵⁹
	Hepatitis B virus core antigen	SKCLGWLWG ²⁹
	Human rpL23a	VHSHKKKIKRTSPTFTTPKTLRLRRQPKYPR-KSAPRRNKLDHY ⁷⁴
	Human hnRNP A1	NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQ-YFAKPRNQGGY ³⁰⁵
	SREBP2	RSSINDKIIELKDLVMTDAKMHKSGVLRK- AIDYIKYLQQVNHKLRQENMVLKLANQKNKL ⁴⁰³

Tabla 1. Diferentes tipos de señales de localización nuclear (Freitas et al, 2009). Las barras entre secuencias separan dos regiones posibles de NLS. Las letras subrayadas son las que integran la secuencia de la NLS bipartita.

Las proteínas responsables del transporte son miembros de la familia de los receptores β -carioferinas. Son importinas o exportinas, que comparten un dominio N-terminal de unión a Ran guanosina-5-trifosfato (Ran-GTP). La proteína Ran (*RAs-related Nuclear protein*) es una proteína pequeña de 25KDa, miembro de la superfamilia Ras, que interviene en el transporte núcleo-citoplasmático durante la interfase y también interviene en la mitosis del ciclo celular (Sato et al, 2010). Es esencial para la translocación de RNA y proteínas a través del complejo del poro nuclear (Hahn et al, 2011).

En *Saccharomyces cerevisiae*, existen 10 importinas y 4 exportinas. Estos receptores solubles interactúan con las señales específicas de importación o exportación presentes en sus proteínas cargos, con los componentes del NPC y con Ran-GTP (Hahn et al, 2008).

La vía de la importación nuclear clásica comienza con el reconocimiento de la NLS por la importina α , que se asocia con importina β a través de su dominio de unión en el N-

terminal (Figura 11). El complejo ternario de importación importina β/α /NLS transloca a través del poro nuclear en un proceso que requiere la interacción de β importina con las nucleoporinas ricas en residuos FG. Al entrar en el núcleo la importina β se encuentra con RanGTP, a la que se une y, a su vez se libera el complejo importina α /NLS (Lott et al, 2011).

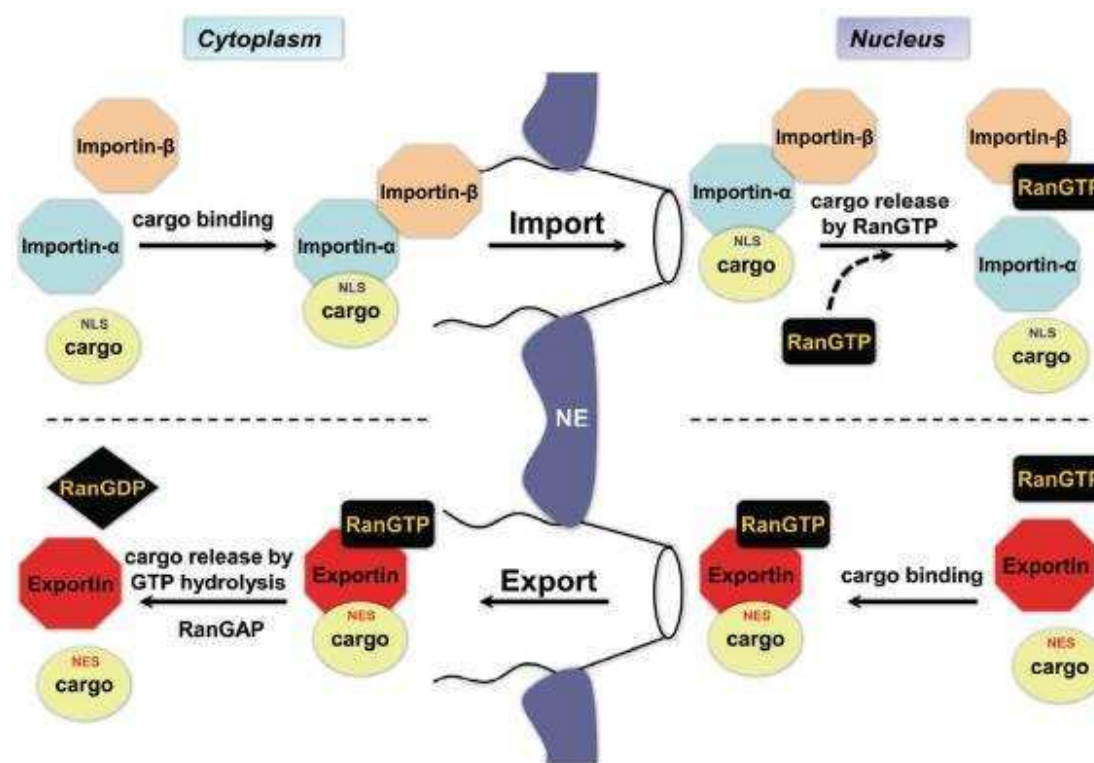


Figura 11. Modelo del mecanismo de importación-exportación clásica. La importación a través del poro nuclear de una proteína cargo que contiene un cNLS ocurre vía el heterodímero importina α / importina β . La exportación nuclear ocurre con ayuda de las exportinas. Como se puede ver en el diagrama, el gradiente de RanGTP y RanGDP a través del núcleo es un componente esencial del proceso. NE: nuclear envelope, NLS: nuclear localization signal, NES: nuclear export signal. Adaptado de Patel et al, 2011.

Luego de la importación al núcleo de la proteína cargo la importina β se recicla hacia el citoplasma en complejo con Ran. Importina α es transportada al citoplasma por su exportina específica Cse1/CAS, junto con Ran-GTP. El mecanismo de disociación del complejo NLS / importina α no está claro. Uno de los modelos indica que se disocia de manera espontánea y que un dominio específico de la importina α , inhibe la re-asociación de la proteína cargo. De acuerdo con un segundo mecanismo, Cse1/CAS y Ran-GTP liberan Importina α de la proteína cargo. Un tercer modelo propone que las nucleoporinas facilitan el paso de terminación de la importación (Hahn et al, 2008).

Hasta el momento se han descrito dos vías de transporte principales en *S. cerevisiae*: la vía clásica de importación, que se cree que es la vía de importación de mayor prevalencia en la célula, la cual está mediada por Kap95 (homóloga a los mamíferos importina β 1), y la otra Kap123. Kap95 es incapaz de unirse a la proteína cargo directamente, pero se une a una proteína adaptadora, Kap60 (homóloga a importina α en mamíferos), que a su vez se une al NLS. Cse1, otra β -carioferina implicada en la ruta clásica de importación, es necesaria para el reciclaje de Kap60 al citoplasma una vez que el complejo Kap95-Kap60-cargo se ha disociado en el núcleo. Además de su papel en la vía de la importación clásica, Kap95 contribuye a la importación de proteínas sin necesidad de un adaptador y mediante el reconocimiento de una señal de importación, distinta de las NLS clásicas (Fernández-Cid et al, 2012).

La otra β -carioferina relevante es Kap123. Kap123 está involucrada en la importación nuclear de las proteínas ribosomales, histonas, etc. Sin embargo, Kap123 no es esencial para dicha importación ya que en ausencia de ésta, otras carioferinas pueden mediar en el transporte al núcleo, lo que indica una redundancia funcional entre las diferentes carioferinas (Martínez-Bono et al, 2010).

Importancia de la flexibilidad molecular en el transporte nuclear.

Importina α forma una superhélice que consta de 10 repeticiones llamadas armadillo (ARM). El dominio repetitivo ARM forma la ranura de unión a NLS, mientras que el dominio flexible (IBB) en el N-terminal de la importina α se asocia con el receptor importina β .

La considerable variación observada en los niveles helicoidales en importina- β y CAS en diferentes estados funcionales indica que estas moléculas son flexibles. Las repeticiones HEAT en tándem en importina β y CAS se pueden considerar como un resorte helicoidal, de tal manera que pequeños cambios en la orientación relativa de las repeticiones HEAT podrían generar cambios sustanciales en el nivel helicoidal. La flexibilidad molecular permite la unión de importina β a una amplia gama de interactores diferentes a través de un mecanismo de ajuste inducido que implica cambios en el nivel helicoidal. Esto se puede ver, por ejemplo, al comparar las conformaciones de sus complejos con el dominio IBB y con RanGTP (Stewart et al, 2007; Forwood et al, 2010).

El complejo del poro nuclear (NCP) funciona como un gran transportador. Tanto iones, así como pequeñas proteínas neutras que no se unen a nucleoporinas, atraviesan el complejo de poros nucleares debido a la difusión (Görlich et al, 1999). En este caso,

pasan a través de un túnel de 8 a 10 nm de diámetro y cerca de 45 nm de longitud y no se necesita energía, debido a que va a favor del gradiente de concentración o del gradiente de carga eléctrica. Otro tipo de difusión es la difusión facilitada, donde es necesaria la presencia de un carrier o transportador para que las sustancias atraviesen la membrana vía nucleoporinas. Si las moléculas se unen a nucleoporinas, el diámetro del túnel aumenta a 40 nm (Panté et al, 2002; Kiseleva. et al, 1998), y el transporte se hace mucho más rápido. El filtro selectivo para pequeñas proteínas adopta la forma de una red de nucleoporinas con polipéptidos hidrofóbicos desplegados revistiendo el canal central del NCP. A pesar del aumento que ocurre en el diámetro del túnel, incluso algunas proteínas pequeñas (menos de 20-30 kD), como histonas, pueden atravesar el poro nuclear solo con la ayuda de mediadores y del consumo de energía. Uno de los principales actores en este tipo de transporte activo es la proteína Ran que se ha descrito anteriormente (Sorokin et al, 2007).

Regulación de la expresión génica vía control de localización de factores de transcripción.

Parte de la expresión génica es regulada por factores de transcripción específicos que reconocen y se unen a secuencias específicas de DNA. La dinámica de los factores de transcripción y especialmente la manera en que ingresan al espacio nuclear y su movilidad durante la búsqueda de sus sitios específicos en el genoma, son aspectos claves para la regulación de la expresión génica. La idea de que la regulación de la expresión génica por factores de transcripción específicos es el resultado del intercambio entre la dinámica de dichos factores de transcripción y reacciones intra-moleculares, organización del genoma y la arquitectura nuclear está siendo cada vez más fundamentada (Barrera et al, 2006; Heard et al, 2007; Schneider et al, 2007; Shu et al, 2011). Recientemente se han descrito poblaciones de RNA pol II con diferencias cinéticas en la velocidad de elongación (Darzacq et al, 2007).

De hecho, la transcripción puede cambiar drásticamente dependiendo de si los factores de transcripción están en cantidades limitantes o en exceso y si están organizados en estructuras estáticas pre-ensambladas (Carter et al, 2008), o si son capaces de moverse de manera efectiva entre diferentes loci nucleares. Por ejemplo, la expresión génica se vuelve estocástica cuando los factores de transcripción son limitantes (Yu et al, 2006).

Un caso bien descrito es el factor de transcripción ATF2 (*activating transcription factor 2*). ATF2 es una proteína del tipo β ZIP (*basic leucine zipper protein*) y es un miembro de

la familia de proteínas activadoras-1 (AP-1) (Wagner et al, 2001). Como otros factores de transcripción del tipo β ZIP, ATF2 utiliza un dominio proteico básico para unirse al DNA y una región zipper de leucina para dimerizar con otras proteínas. La actividad transcripcional de ATF2 puede ser regulada por múltiples mecanismos como la fosforilación de dos residuos treonina (T69 y T71); la interacción intramolecular entre el dominio de transactivación del N-terminal y el dominio β ZIP (Li & Green, 1996) y la localización subcelular. Su localización subcelular es regulada por su dimerización (Liu et al, 2006). Alteraciones en la localización subcelular de ATF2 parece estar implicada en la patogénesis de varias enfermedades humanas, especialmente en cáncer (Berger et al, 2003; Bhoumik et al, 2008; Yamada 1997; Ricote et al, 2006).

Las levaduras poseen tanto regulación de importación como de exportación nuclear de factores de transcripción, permitiéndoles responder de manera correcta frente a un estímulo. Si alguna de estas regulaciones se ve afectada, la levadura no logra responder a la señal producida por el estímulo o estrés (Hao et al, 2013). Las células pueden utilizar estos patrones diversos de translocación de factores de transcripción para inducir distintos programas de expresión génica (Hao et al, 2011).

En *Saccharomyces cerevisiae*, dos de los factores de transcripción mejores descritos en cuanto al control de su actividad vía localización núcleo-citoplasmática en respuesta a estrés son Msn2/4 y Yap1.

El factor de transcripción de respuesta general al estrés Msn2 (Görner et al, 1998) actúa como un procesador de señal ajustable que podría seguir, filtrar o integrar señales de manera entrada-dependiente (Hao et al, 2011). Este procesamiento de señal ajustable parece proceder de la doble regulación de importación y exportación nuclear por fosforilación. La versatilidad en el procesamiento de Msn2 es crucial para generar respuestas dinámicas frente a diferentes tipos de estrés.

En ausencia de estrés, Msn2 es fosforilado por PKA y localiza en el citoplasma; en respuesta a estrés, Msn2 es desfosforilado y transloca al núcleo donde induce la expresión génica (Görner et al, 1998).

Distintos tipos de estrés naturales provocan dinámicas altamente variables de la translocación nuclear de Msn2 (Hao et al, 2011; Cai et al, 2008), las cuales resultarían de señales de entradas oscilatorias (presuntamente por la actividad PKA) (Garmendia-Torres et al, 2007). Msn2 parece estar regulado en parte por 8 sitios consenso para PKA, localizados en los dominios de la NES y de la NLS (Görner et al, 2002). Se encontraron dos sitios ubicados en la NES (serinas en las posiciones S288 y S304) y cuatro sitios en

la NLS (S582, S620, S625, S633) funcionalmente importantes en la regulación del transporte nuclear (Hao et al, 2013). Los sitios en la NLS son preferidos por PKA (Neuberger et al, 2007; Görner et al, 2002). PKA y las fosfatasas de Msn2 localizan tanto en el núcleo como en el citoplasma por lo tanto Msn2 puede ser fosforilada y desfosforilada en ambos compartimentos.

Formas específicas de estrés, como el shock térmico y algunas formas de estrés oxidativo, requieren de la activación del factor de shock térmico (HSF), una proteína modular que contiene un dominio de unión a DNA de la clase α -helice, un dominio zipper de leucina requerido para la trimerización y un dominio de activación transcripcional en el C-terminal. HSF se une a un elemento de shock térmico de 5 pares de bases (HSE; nGAAn) presente en los promotores de todos los genes de shock térmico. HSF también es activado por la diamida, hambreado de nitrógeno y la transición a fase estacionaria (Hahn et al, 2004).

Un mecanismo independiente de HSF es mediado por Msn2/4 en respuesta a diferentes tipos de estrés (Gasch et al, 2000). Otro mecanismo HSF-independiente es el que involucra a los miembros de la familia Yap. Los factores de transcripción de la familia Yap (*yeast activator protein*) son proteínas β ZIP. Existen 8 miembros en esta familia y contienen un dominio de unión a DNA distintivo, similar al convencional del factor AP-1, Gcn4.

Saccharomyces cerevisiae, posee sensores que detectan bajos niveles de H_2O_2 y en consecuencia, las células activan las vías del glutatión y tioredoxina, que a su vez activan Yap1 (señalización redox y anti-oxidante) (Figura 12) (Toledano et al, 2004). Yap1 fue caracterizada por su hipersensibilidad a los agentes oxidantes H_2O_2 y t-BOOH (*t-butyl hydroperoxide*), así como también a químicos que generan radicales de anión superóxido (Rodrigues-Pousada et al, 2004). El mecanismo de acción de Yap1 en respuesta a estrés oxidativo quedó evidenciado en el estudio de la inducción por H_2O_2 y t-BOOH del gen TRX2 (Kuge et al, 1997). Análisis globales han agregado un número creciente de genes blancos para Yap1 involucrados en la desintoxicación por ROS (Gasch et al, 2000; Lee et al, 1999). Yap1 es retenida en el núcleo por medio de un dominio rico en cisteína ubicado en el carboxilo-terminal de la proteína (Kuge et al, 1997). Por otro lado, la exportación nuclear es mediada por la exportina Crm1 (también conocida como Xpo1) (Yan et al, 1998). La activación de Yap1 por H_2O_2 también requiere múltiples pasos de formación de puentes disulfuros que son importantes en la transducción de la señal de estrés por H_2O_2 tanto para la apropiada duración de la señal y de la transcripción (Okazaki et al, 2007). En

contraste con YAP1, los demás miembros de la familia tienen diferente localización, YAP2 y YAP8 son constitutivamente nucleares. Pereira et al, utilizando construcciones Yap4–GFP encontró que se localizaba en el núcleo, tanto en presencia como en ausencia de estrés y que el estado de fosforilación de Yap4 no afecta su localización. Además encontró que las quinasas encargadas de la fosforilación de Yap4 son PKA y GSK3, las cuales afectan su estabilidad, ya que la forma no fosforilada tiene una vida media menor que la fosforilada (Pereira et al, 2009). Si bien la inducción de Yap4 por estrés oxidativo ha resultado contradictoria, se ha encontrado que este factor de transcripción responde a otros tipos de estrés, tales como estrés osmótico, shock térmico y metales entre otros (Nevitt et al, 2004). Ni et al, 2009 y colaboradores mostraron múltiples patrones de unión para los factores de transcripción Yap4 y Sko1. También encontraron una superposición de genes blancos entre Yap4, Yap6 y Sko1, tanto en condiciones de estrés osmótico como sin estímulo, con diferente cinética de unión.

Está claro que los factores de transcripción pueden actuar de manera conjunta como de manera individual, y además regulando diferentes set de genes. El hecho de que diferentes factores actúen sinérgicamente contribuye al entendimiento de su función en la célula. Esta información es muy importante para descifrar la regulación génica en eucariotas, frente a diferentes cambios ambientales.

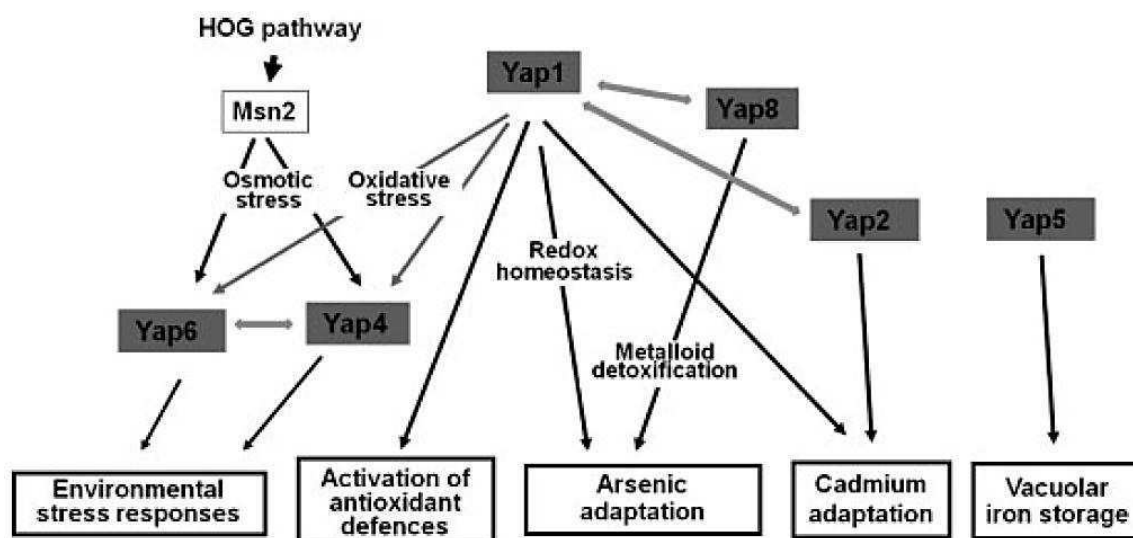


Figura 12. Respuesta cruzada de factores de transcripción frente a diferentes estímulos ambientales. Adaptado de Rodríguez-Pousadas et al, 2010.

Localización núcleo-citoplasmática

La localización de proteínas quinasas en distintos compartimientos o estructuras subcelulares es uno de los mecanismos para lograr la especificidad de sustratos. La localización puede incrementar la tasa de fosforilación de un sustrato determinado debido a un aumento en la concentración de reactivos en una localización subcelular. Además promueve la especificidad ya que se limita la cantidad de sustratos a los cuales la quinasa tiene acceso.

En la actualidad existen evidencias que una misma proteína quinasa, que se distribuye dinámicamente entre citoplasma y núcleo, puede regular la expresión de diferentes clases de genes blanco tanto por mecanismos de señalización nucleares como citoplasmáticos. Por ende, el transporte núcleo-citoplasmático de éstas sería importante para regular su actividad diferencial en ambos compartimientos.

Por ejemplo, la proteína quinasa Tor1 es distribuida dinámicamente entre citoplasma y núcleo; el complejo TORC1 (Tor complex 1) citoplasmático regula la expresión génica dependiente de RNA pol II. En contraste, TORC1 nuclear regula la expresión dependiente de RNA pol I a través de la unión al promotor de rDNA 35S (Li et al, 2006).

Hipótesis y Objetivos

Las células poseen redes complejas de transducción de señales que aseguran su correcta adaptación a las condiciones del medio ambiente. Existen varias vías de señalización, una de ellas es la vía cAMP-PKA la cual tiene un rol central en el control del metabolismo, resistencia a estrés y proliferación, particularmente en conexión con la fuente de carbono disponible. La vía cAMP-PKA está fuertemente regulada en tiempo y espacio. Esta regulación permite mantener un alto grado de especificidad y es alcanzada por la combinación de varios eventos, tales como la expresión diferencial de las subunidades que la componen, la modulación de la actividad catalítica, y por la dinámica de localización de la vía de señalización en complejos multiproteicos.

La expresión de genes específicos en tiempo y espacio es un proceso clave para el desarrollo correcto de los organismos. La dinámica de los factores de transcripción y especialmente la manera en que ingresan al espacio nuclear y su movilidad durante la búsqueda de sus sitios específicos en el genoma, son aspectos claves para la regulación de la expresión génica. Recientemente se ha descrito la interacción de proteínas quinasas con la cromatina, revelando nuevos mecanismos de acción de dichas proteínas sobre la regulación de la expresión génica.

Las evidencias presentes hasta el momento indican que si bien las tres isoformas catalíticas de la PKA en *Sacharomyces cerevisiae*, Tpk1, Tpk2 y Tpk3, son redundantes para la viabilidad, estas poseen funciones específicas. Cada isoforma parecería tener una localización núcleo-citoplasmática diferencial dependiendo de las condiciones nutricionales, crecimiento o estrés, pero aún no se ha determinado el mecanismo y la función de dicha localización en el núcleo. Evidencias aportadas por estudios a nivel genómico sugieren que cada Tpk se uniría a la cromatina de manera estrés específico (Pokholok et al, 2006).

¿Cuál es el mecanismo molecular de asociación a la cromatina de cada isoforma catalítica Tpk?

Los antecedentes bibliográficos solo han reportado la unión de las subunidades catalíticas de la PKA a la cromatina, pero no se ha realizado un estudio sobre Bcy1. Los niveles de expresión proteica y la localización núcleo-citoplasmática de las subunidades de la PKA sugiere una relación estequiometrica a favor de la formación de la holoenzima en condiciones donde las Tpk se presumen activas. Por otro lado, no se ha descrito el mecanismo molecular que rige el transporte núcleo-citoplasmático de las subunidades de

la PKA ¿Cuál es el rol de la subunidad regulatoria en el núcleo? ¿La localización diferencial de las subunidades de PKA influye en su interacción con la cromatina?

La hipótesis propuesta plantea que la regulación de la expresión génica vía PKA en respuesta a estrés estaría dada por el reclutamiento de la quinasa a la cromatina permitiendo el posicionamiento de las subunidades catalíticas cerca del sustrato para una respuesta transcripcional rápida y localizada.

Los resultados obtenidos en esta tesis se encuentran desarrollados en dos capítulos. El capítulo I tiene como objetivo estudiar el mecanismo de interacción de las subunidades de PKA con la cromatina y su rol en la expresión génica. El capítulo II tiene como objetivo analizar la localización en respuesta a estrés de las subunidades de PKA, el mecanismo de importación nuclear de la PKA y el rol de dicha localización sobre la expresión génica. Cada capítulo posee una introducción breve, la cual se encuentra contenida en la introducción general, una sección de resultados, una sección de discusión y una sección de figuras suplementarias.

Resultados

Capítulo I

Estudio de la interacción de las subunidades de PKA con la cromatina.

INTRODUCCIÓN.

Las proteínas quinasas juegan un rol importante para una rápida y correcta adaptación celular frente a un estímulo extracelular. En células eucariotas, las proteínas quinasas activadas por estrés (SAPKs: *stress-activated protein kinases*) tienen un rol esencial para la adaptación a un estímulo extracelular (Kyriakis & Avruch et al, 2001). La adaptación celular a cambios en el medioambiente, involucran una estricta regulación de la expresión génica. Dicho proceso presenta una cinética de reacción rápida y una reversibilidad muy controlada, lo que permite a la célula cambiar su capacidad transcripcional en cuestión de minutos frente a un estrés determinado y volver a su estado basal después de que el estrés haya sido removido (Causton et al, 2001; Gasch et al, 2000).

En *S. cerevisiae* es Hog1, el homólogo de la SAPK de mamíferos p38, la cual responde específicamente al incremento en la osmolaridad extracelular y es requerida para la adaptación celular frente al estrés osmótico (de Nadal et al, 2007). Hog1, no sólo fosforila directamente varios factores de transcripción para modificar sus actividades, sino que también se asocia a promotores de respuesta a estrés a través de dichos factores de transcripción (Proft et al, 2001; de Nadal et al, 2003; Capaldi et al, 2008; Ni et al, 2009). Una vez en los promotores, Hog1 sirve como plataforma para reclutar a los factores generales de transcripción, modificadores de la cromatina y la RNA Pol II. Se sabe también que la vía de SAPK tiene un papel en la elongación de la transcripción (Proft et al, 2006; Pascual-Ahuir et al, 2006). En los ORF de respuesta a estrés, Hog1 recluta complejos remodeladores de la cromatina como RSC para modificar la organización del nucleosoma. En respuesta a estrés, la fosforilación y la localización nuclear de Hog1 se produce en segundos y, dependiendo de la fuerza de la respuesta a estrés, puede durar desde 10 hasta 100 min (Hohmann et al, 2007).

Otras MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) de la levadura, como Fus3, Kss1 y Mpk1 también son reclutadas a la cromatina (Pokholok et al, 2006; Kim et al, 2008). Se han descrito otras quinasas de señalización, estructural y funcionalmente no relacionadas a las MAPKs, incluyendo Snf1 (Lo et al, 2005) o Tor1 (Li et al, 2006).

Esto indicaría que las proteínas quinasas responsables de la señalización tienen un rol sobre la expresión génica más allá de la iniciación de la transcripción. Por ejemplo, la SAPK de *S. pombe*, Sty1 se asocia a la región codificante de genes de respuesta a estrés (Reiter et al, 2008). Sty1 se activa por varios tipos de estrés, incluyendo shock por calor, estrés oxidativo, estrés osmótico, hambreado de nutrientes y daño al DNA (Degols et al, 1996; Degols & Russell, 1997; Toone et al, 1998; Chen et al, 2008).

Los cambios estructurales en la cromatina que acompañan la activación transcripcional de un gen, a menudo requieren de factores multiproteicos que remodelan los nucleosomas. Existen diferentes factores involucrados en la reestructuración de la cromatina. En *S. cerevisiae*, el complejo SWI-SNF es factor prototipo clásico de remodelación en eucariotas. A pesar de las diferencias funcionales y de composición, varias de las subunidades polipeptídicas del complejo SWI-SNF están altamente conservadas desde humanos hasta levaduras, como por ejemplo Snf2, como así también RSC que es esencial para la modificación de la estructura de nucleosomas vía hidrólisis de ATP (FuqiangGeng et al, 2003). Otro complejo involucrado en la remodelación de la cromatina es INO80 y una de las proteínas asociadas a él es Arp8, una proteína nuclear relacionada con la actina que forma parte de los complejos enzimáticos para la remodelación de la cromatina; recientemente se descubrió que puede unirse directamente al mRNA (Shen et al, 2000).

Un análisis a nivel genómico en el cual se estudió la unión *in vivo* de proteínas quinasas a la cromatina (ChIP-on-chip) reveló que además de Hog1 o proteínas quinasas de la vía MAP quinasas (Fus3, Mpk1, Kss1), las isoformas catalíticas Tpk1 y Tpk2 de la PKA se asocian a regiones promotoras así como a regiones codificantes de genes específicos. Específicamente, Tpk1 se encontró asociada físicamente con genes que son transcritos activamente en crecimiento en glucosa y bajo estrés oxidativo, mientras que Tpk2 se halló principalmente asociada a las regiones promotoras de genes de proteínas ribosomales bajo estrés oxidativo (ver Figura 14). Por otro lado, se ha descrito un rol regulatorio de la PKA sobre los genes de biogénesis de ribosomas (RiBi), donde la PKA sería la encargada de la acumulación de RNA Pol II inactiva sobre el gen inhibiendo así la elongación de la transcripción (Pelechano et al, 2009). En conjunto, los antecedentes sugieren que la PKA podría actuar sobre la expresión génica vía su asociación a la cromatina en los genes blanco.

Sin embargo, la co-localización nuclear de la subunidad regulatoria y catalíticas bajo condiciones en donde se requeriría subunidades catalíticas activas dirige la pregunta acerca del rol de la Bcy1 en el núcleo.

Para dilucidar el rol de la PKA en la regulación de la expresión génica, estudiamos la asociación temporal de Bcy1, Tpk1 y Tpk2 a diferentes regiones génicas en respuesta a diferentes tipos de estrés y que rol ejerce Bcy1 en la asociación de Tpk1 y Tpk2. Analizamos la co-asociación temporal Tpk-Bcy1 con complejos remodeladores de la

cromatina y el factor de transcripción Rap1. Además correlacionamos la asociación de la PKA con la expresión génica y el impacto sobre la sobrevivencia celular en estrés.

Nuestros resultados indican que las isoformas catalíticas activas se unen de manera específica a la región génica-estrés específico; sorprendentemente Bcy1 también se halló unida a la cromatina y su delección afecta de manera diferencial la asociación de cada Tpk. En respuesta a estrés osmótico observamos la unión de remodeladores de la cromatina- Arp8, Rsc1 y Snf2- seguido temporalmente por la asociación de las Tpk. En cambio en respuesta a estrés oxidativo observamos la co-asociación temporal entre Tpk y remodeladores. Además, observamos la co-asociación de Tpk1 y Tpk2 con el factor de transcripción Rap1. Bcy1 es necesaria para la expresión génica en respuesta a estrés osmótico mientras que no lo es para estrés oxidativo. La delección de Tpk1 o Tpk2 afectó diferencialmente la expresión génica. En este sentido, observamos que cepas hiperactivas para PKA son inviables bajo condiciones de estrés. Por otro lado, la falta de Tpk1 o tpk2 afecta diferencialmente el crecimiento.

En conjunto los resultados sugieren que la PKA, vía asociación a la cromatina podría participar en la expresión génica a través de la fosforilación *in situ* de factores de transcripción o remodeladores.

RESULTADOS.**Análisis del rol de la PKA en la adaptación celular en respuesta a estrés osmótico y oxidativo.**

Para estudiar el rol de la actividad PKA y particularmente analizar si cada isoforma catalítica -Tpk1 o Tpk2- poseen una función específica en la sobrevivencia al estrés, ensayamos la sensibilidad a concentraciones crecientes de los agentes estresores NaCl, H₂O₂ y menadiona de cepas de levaduras deficientes en cada una de las subunidades catalíticas o en la subunidad regulatoria. Las cepas *Wild-type*, *bcy1Δ*, *tpk1Δ* y *tpk2Δ* fueron crecidas hasta fase exponencial en medio rico (YPGlu). Diluciones seriadas se sembraron en placas que contenían diferentes concentraciones del agente estresor. En la Figura 13 se observa que la cepa *bcy1Δ* resultó hipersensible al estrés osmótico (NaCl) y oxidativo evocado por agua oxigenada (B-iv; C-iv) indicando que la actividad desregulada de PKA impide la adaptación a estos tipos de estrés. Diferencialmente, bajo estrés oxidativo por menadiona la delección de BCY1 (D-iv) resultó en mayor sobrevivencia comparada con la cepa salvaje indicando que una actividad alta de PKA favorece la resistencia al estrés oxidativo por menadiona. La cepa *tpk1Δ* presentó mayor resistencia a NaCl y agua oxigenada (C-ii; B-ii), mientras que la delección de TPK2 favoreció la resistencia a menadiona (D-iii).

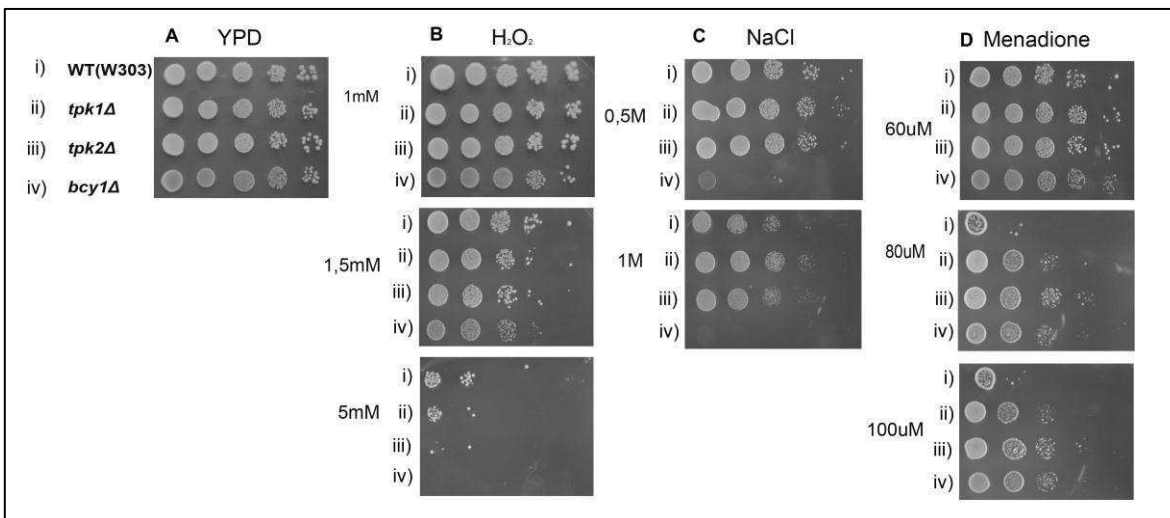


Figura 13. Viabilidad celular de mutantes *bcy1Δ*, *tpk1Δ* and *tpk2Δ* al crecimiento en estrés osmótico y oxidativo. La viabilidad al estrés osmótico y oxidativo se determinó mediante spot assay (Materiales y métodos). Diluciones seriadas (1/10) de las cepas *Wild-type* (W303), *bcy1Δ*, *tpk1Δ* y *tpk2Δ* fueron crecidas en placas YPGlu con el agente estresante respectivo. El crecimiento fue monitoreado después de la incubación durante dos días a 30°C. Los resultados se muestran para las placas que no contienen ningún agente estrés (A-YPGlu), 1, 1,5 y 5 mM H₂O₂ (B), 0,5 y NaCl 1M (C), 60, 80 y 100μM Menadiona (D). No se observó crecimiento de ninguna de las cepas a concentraciones 10mM de H₂O₂ o 1.5 M NaCl.

Estos resultados sugieren que la actividad de PKA es importante para la resistencia al estrés, donde cada isoforma catalítica de PKA, Tpk1 y Tpk2 tendrían un rol específico en la adaptación celular al estrés osmótico y oxidativo.

Como se detalla en la introducción, existe una relación estrecha entre la adaptación celular a cambios en el medio ambiente con la regulación de la expresión génica. Dado que antecedentes bibliográficos indican que la PKA regula la expresión génica frente al estrés (Livas et al, 2011) y se ha presentado evidencia de asociación física de las Tpk1 y Tpk2 a la cromatina (Pokholok et al, 2006) nos preguntamos cuál sería el mecanismo molecular ejercido por las isoformas de PKA en la regulación génica que conlleva a la adaptación y sobrevivencia frente al estrés ambiental.

Análisis de los datos crudos obtenidos del análisis genómico CHIP-on-chip.

En un artículo publicado por Pokholok et al Science, 2006 se demostró que las proteínas quinasas activadas por mitógenos Hog1, Fus3, Kss1 y Ste5 una proteína “scaffold” que participa en la respuesta a feromona y las subunidades catalíticas de la PKA, Tpk1 y Tpk2 se encuentran asociadas físicamente a los genes que éstas regulan en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae*.

En este trabajo se realizó ChIP on Chip, el cual consiste en la inmunoprecipitación de la cromatina combinada con hibridación en microarrays. Se emplearon microarrays de DNA formados por 44.290 oligonucleótidos (de 66 nucleótidos c/u) los cuales cubren el 85 % del genoma de *S.cerevisiae*. Estos microarrays fueron hibridados con muestras de DNA amplificadas y marcadas con los fluoróforos Cy3 y Cy5 provenientes de muestras totales o co-inmunoprecipitadas con quinasas en estudio etiquetadas cada una con el epítipo TAP. Particularmente para las subunidades catalíticas de la PKA este trabajo fue muy importante ya que por primera vez se describía a nivel genómico la unión física de las TPK a los genes que ellas regulan. En respuesta a cambios en la fuente de carbono, estrés oxidativo u osmótico, Tpk1 y Tpk2 se hallaron asociadas a 120 regiones génicas. Con el objetivo de establecer un patrón de unión en las cuales Tpk1 y Tpk2 aparecieron asociadas a la cromatina -no se disponían datos para Tpk3 ya que no se halló asociada al DNA debido a su bajo nivel de expresión- realizamos un análisis *in silico* empleando los datos del microarray disponibles en <http://web.wi.mit.edu/young/signaling> (Figura 14). Para este análisis sólo se emplearon los datos cuyo incremento en la señal por el estímulo fuera >3 veces y se clasificaron en dos grupos no redundantes.

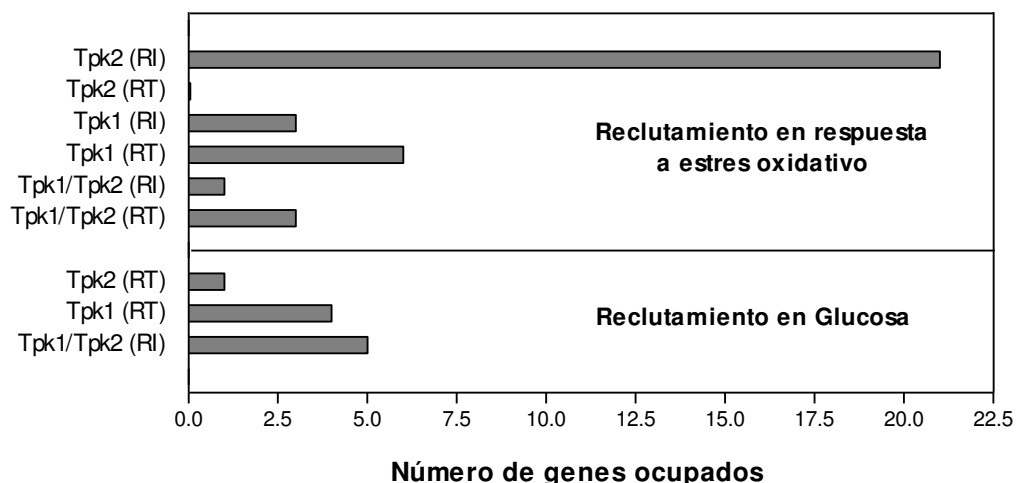


Figura 14. Análisis *in silico* de los datos crudos resultados obtenidos por Pokholok *et al*, 2006. Las condiciones analizadas corresponden: reclutamiento en respuesta a estrés oxidativo (células crecidas en glucosa 2% estimuladas con 0.4 mM de H₂O₂); reclutamiento en respuesta a glucosa (células crecidas en glicerol 2% *versus* crecimiento en glucosa 2%). Para este análisis sólo se emplearon los datos cuyo incremento en la señal por el estímulo fuera >3 veces y se clasificaron en dos grupos no redundantes. Las barras representan genes con sólo Tpk2 (Tpk2); sólo Tpk1 (Tpk1); ambas isoformas simultáneamente (Tpk1/Tpk2). RI: regiones intragénicas. RT: regiones que se transcriben activamente).

De la Figura 14 se infiere, tal como fuera observado previamente (Pokholok et al, 2006), que: 1) El patrón de asociación de Tpk2 en respuesta estrés oxidativo en regiones promotoras -regiones intragénicas (RI)- sugiere que esta isoforma podría asociarse a complejos DNA-proteínas en respuesta a un estímulo dependiendo del gen blanco.

2) Tpk1 presenta un patrón de reclutamiento que correlaciona con genes que se transcriben activamente (RT), sugiriendo que esta isoforma interaccionaría específicamente con algún factor de la maquinaria transcripcional dependiendo de las condiciones de estrés o nutricionales.

Estas evidencias indicarían que existe una marcada diferencia en la unión a regiones génicas por parte de cada isoforma Tpk, lo que sugiere que éstas presentarían diferencias funcionales en la regulación génica.

Además, este análisis muestra otra categoría: 3) Genes ocupados por Tpk1 y Tpk2 simultáneamente (categoría Tpk1/Tpk2). Este patrón de asociación podría ser consecuencia de la unión individual de cada Tpk a la misma región génica o asociación de un complejo proteína de anclaje-Tpk1-Tpk2.

Con el objetivo de estudiar el rol y el mecanismo de acción de las subunidades de la PKA Tpk1, Tpk2 y Bcy1 sobre la expresión génica en respuesta al estrés osmótico y oxidativo, elegimos cinco genes: ALD6 y SED1; pertenecientes al grupo Tpk1-(RT) reclutamiento en glucosa. HSP42; gen incluido en el grupo Tpk1/Tpk2-(RT) reclutamiento en respuesta a estrés oxidativo. iYGL136 e iYDL061; regiones incluidas en el grupo Tpk2-(RI) reclutamiento en respuesta a H₂O₂.

Dado que hemos observado un rol diferencial de la PKA en la sobrevivencia al estrés por H₂O₂ o menadiona (Figura 13) decidimos incluir menadiona como agente oxidativo. Las células fueron crecidas hasta fase exponencial en glucosa y posteriormente estresadas con NaCl, agua oxigenada o menadiona.

Analizamos el patrón de asociación de las subunidades de la PKA a la cromatina en respuesta a estrés por ChIP-real time PCR (ver Materiales y Métodos) empleando cepas etiquetadas con el epítotope TAP en su locus cromosómico: Bcy1-TAP, Tpk1-TAP, Tpk2-TAP. Para analizar el rol de la subunidad regulatoria empleamos cepas delecionadas para el gen BCY1, *bcy1Δ*Tpk1-TAP y *bcy1Δ*Tpk2-TAP. Para analizar el requerimiento de actividad catalítica empleamos las cepas *tpk1^{dead}*-TAP y *tpk2^{dead}*-TAP, las cuales poseen una mutación en el sitio activo que provoca subunidades catalíticas inactivas (Kucsera et al, 2000). Los resultados fueron analizados como las veces de unión de PKA a la región génica estudiada (ver Materiales y Métodos). En la Figura S1 se observan los controles

correspondientes a las veces de unión de cada subunidad de la PKA en cepas salvajes. Mediante northern-blot analizamos la expresión génica sobre cada gen blanco empleando cepas mutantes en las subunidades de la PKA pre y post estímulo.

Para una mejor comprensión de los resultados los hemos representado por región génica. Los niveles de expresión de las subunidades de la PKA analizadas por western-blot no cambiaron por la exposición de las células a los diferentes tipos de estrés oxidativo y osmótico (Figura S2A). Ensayos de spot assay revelaron que la viabilidad celular no resultó afectada por los tratamientos en cada cepa empleada en los experimentos de ChIP y northern-blot (Figura S2B).

Rol de la PKA en la transcripción génica en respuesta a estrés: función y mecanismo de asociación en regiones que se transcriben activamente.

El gen **ALD6** codifica para la enzima aldehído deshidrogenasa mitocondrial involucrada en la producción de acetato, precursor de Acetyl-CoA. Es indispensable para proveer de NADPH a células que carecen de la actividad de glucose-6-fosfato deshidrogenasa (Grabowska et al, 2003). Ald6 se expresa en respuesta a estrés osmótico (Parmar et al, 2011) y la falta de expresión disminuye la capacidad celular para adaptarse al estrés por H₂O₂ (Ng et al, 2008).

En la Figura 15 se muestra la asociación de las subunidades de la PKA al ORF del gen ALD6 en respuesta al agregado de NaCl (Figura 15B), menadiona (Figura 15C) y agua oxigenada (H₂O₂) (Figura 15D). Se analizó la asociación de las subunidades de la PKA en la región media del ORF +730+842 mediante ChIP real time PCR (Figura 15A).

En respuesta a NaCl (Figura 15 B), se observó asociación de Tpk1 y Tpk2 a partir de 10 y 20 min post estrés. Sin embargo, Bcy1 se asoció transitoriamente a los 10 min. Cepas mutantes que no expresan BCY1, *bcy1ΔTpk1* o *bcy1ΔTpk2*, mostraron unión de Tpk1 y Tpk2 pero su asociación fue más temprana (5 min.) lo que sugiere que la unión de Bcy1 no es necesaria para la asociación de las Tpk pero si afecta la cinética de unión de éstas. Versiones catalíticamente inactivas *tpk^{dead}* no se hallaron asociadas lo que sugiere el requerimiento de actividad catalítica para su asociación a la cromatina.

Los niveles de expresión de ALD6 fueron analizados por Northern blot (Figura 15 E, ver materiales y métodos).

Este análisis indicó que en respuesta al agregado de NaCl, ALD6 se expresa transitoriamente en la cepa salvaje (WT) con un máximo a los 5 min, la delección de TPK1 o TPK2 presentó una cinética de expresión del mRNA ALD6 similar a la cepa *Wild type*

indicando que ambas isoformas catalíticas son redundantes. Por el contrario, la delección de BCY1 aumenta la expresión a partir de 5 min. post estrés e impide el apagado de la expresión conforme transcurre el estrés (Figura 15 E).

Estos resultados sugieren que Tpk1 y 2 regularían la activación transcripcional transitoria del mRNA ALD6 vía asociación a la cromatina en respuesta al estrés osmótico. Sorprendentemente hallamos que la actividad de las Tpk sobre la expresión génica de este locus estaría regulada temporalmente por la asociación de Bcy1 a la cromatina. La inhibición de la actividad catalítica por asociación de Bcy1 conllevaría al apagado de la expresión de ALD6.

La Figura 15 C muestra el patrón de asociación de PKA al ORF de ALD6 en respuesta a menadiona. ALD6 presentó asociación de Tpk1 a los 5 min incrementándose hasta los 20 min post estímulo, mientras que Tpk2 no se detectó asociada bajo las mismas condiciones. La asociación de Bcy1 aumentó rápidamente en respuesta al estrés, ya que a los 5 min se encontró asociada, manteniéndose hasta los 20 min post estrés. Tanto la versión inactiva $tpk1^{dead}$ y la delección de BCY1 (*bcy1ΔTpk1*) eliminaron la asociación de Tpk1, sugiriendo que Tpk1 requiere de actividad catalítica y de Bcy1 para su asociación a la cromatina en respuesta a estrés oxidativo evocado por menadiona. El análisis de expresión mostrados en Figura 15 E, indican que se requiere de Tpk1/2 para la expresión de ALD6 (Wt *versus tpk1Δ* o *tpk2Δ*), mientras que la delección de BCY1 afecto la cinética temporal de expresión de dicho gen. Estos resultados sugieren que en respuesta a estrés por menadiona Bcy1 se asocia a la cromatina para reclutar moléculas de Tpk1 y estimular la expresión de ALD6. Tpk2 posiblemente participe en la regulación de la expresión de ALD6 sin unirse a la cromatina.

En respuesta a estrés oxidativo evocado por H₂O₂ (Figura 15 D), se observó la asociación de Tpk2 con un máximo a los 30 min. Bcy1 antecede dicha unión ya que se asocia transitoriamente a los 10 min. La falta de unión de Tpk2 en la cepa *bcy1Δ* indica que esta isoforma catalítica requiere de Bcy1 pero no de su actividad catalítica ya que la versión inactiva $tpk2^{dead}$ se encontró asociada a esta región génica.

El análisis de la expresión de mRNA ALD6 (Figura 15 E, H₂O₂) indicó que se requiere de Tpk2 para su expresión basal y en respuesta al estrés (Wt *versus tpk2Δ*). La delección de BCY1 o TPK1 afectó la inducción de la expresión de ALD6 en respuesta a H₂O₂ sin modificar los niveles basales de expresión.

Estos resultados sugieren que la activación transcripcional de ALD6 requeriría de la unión de Bcy1 y de Tpk2 en repuesta al estrés oxidativo evocado por agua oxigenada. Tpk1

posiblemente participe de la expresión génica en respuesta a menadiona sin asociarse a la cromatina.

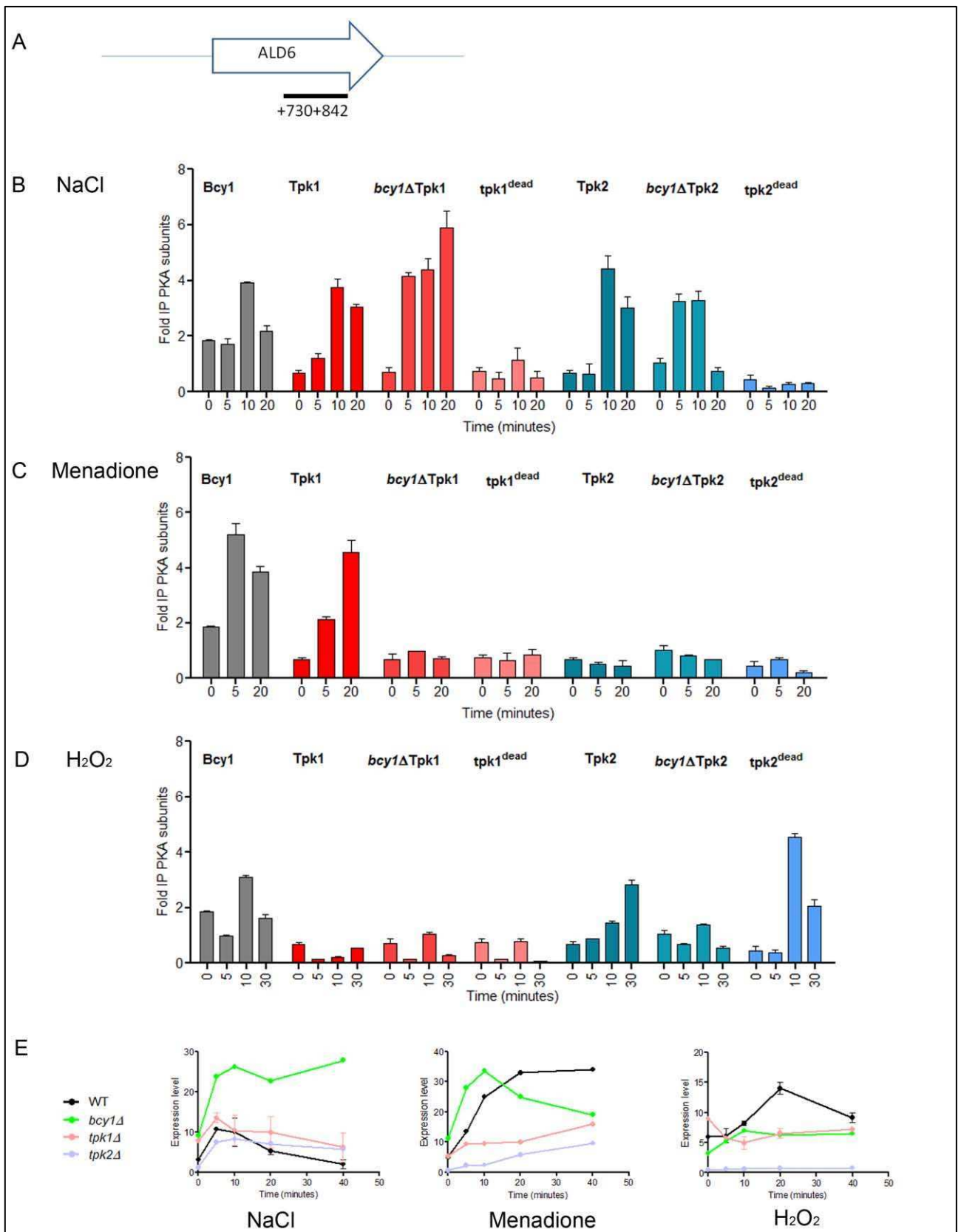


Figura 15. Asociación de las subunidades de la PKA a la región ORF del gen ALD6 en condiciones de estrés osmótico (NaCl) y oxidativo (H₂O₂ y Menadiona). (A) Región analizada del ORF ALD6. Las cepas Bcy1-TAP, Tpk1-TAP, *bcy1*Δ-Tpk1-TAP, *tpk1*^{dead}-TAP, Tpk2-TAP, *bcy1*Δ-Tpk2-TAP, *tpk2*^{dead}-TAP fueron crecidas en YPGlu hasta fase exponencial, se las sometió tanto a estrés osmótico 0,4M NaCl (B) u oxidativo 50 μM Menadiona (C) y 0,4mM H₂O₂ (D) durante 60 minutos. Se tomaron alícuotas en los tiempos indicados y se realizó ChIP-RealTimePCR según se describe en Materiales y Métodos. (E) Niveles de expresión del mRNA ALD6 en respuesta a estrés osmótico y oxidativo. Cultivos de células *Wild-type* y las cepas mutantes *bcy1*Δ, *tpk1*Δ y *tpk2*Δ fueron tratados con 0,4M de NaCl, 50μM de menadiona o 0,4mM H₂O₂. A los tiempos indicados se tomaron muestras y los niveles de mRNA se determinaron por northern blot según materiales y métodos. Las veces de unión de PKA está dado por el incremento de la cantidad de proteína en la muestra inmunoprecipitada sobre la muestra sin inmunoprecipitar. Los datos representan el promedio ±SD y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

El gen **SED1**, codifica para una proteína rica en serina/treonina anclada por GPI (glycosylphosphatidylinositol) a la pared celular y tiene importantes funciones en la estructura y en la biogénesis de la pared celular. La proteína Sed1 es inducida por hambreado de nutrientes y en fase estacionaria, siendo la proteína mayoritaria de la pared celular en estas condiciones. Las células que poseen el gen SED1 delecionado son sensibles a enzimas líticas extracelulares y a estrés oxidativo (Shimoi et al, 1998). Además, la inducción de la expresión de este gen bajo condiciones de estrés como el hambreado de nutrientes o la fase post-diaúxica es dependiente de PKC y PKA (Cardona et al, 2012).

La Figura 16 muestra la unión de la PKA y su rol en la expresión de SED1. En respuesta a estrés osmótico evocado por NaCl (Figura 16B), se observa la unión transitoria de Tpk2 a la cromatina con un máximo de unión a los 10 min. Bcy1 presenta asociación máxima a los 10 min. del estímulo. La unión de Tpk2 depende de su actividad catalítica y de la presencia de Bcy1, ya que no se observa unión en cepas *bcy1Δ*-Tpk2 y *tpk2^{dead}*. Si bien Tpk1 se une en menor grado que Tpk2, requiere de actividad catalítica para su unión pero incrementa su asociación en cepas *bcy1Δ* en respuesta al estímulo.

El análisis de los niveles de expresión del mRNA SED1 muestra la expresión transitoria con un máximo a los 5 minutos post estrés (Figura 16 E). La deleción de TPK1 o TPK2 anula la expresión transitoria mientras que la deleción de BCY1 afecta la cinética de expresión versus la cepa salvaje. Estos resultados sugieren que las subunidades catalíticas –principalmente Tpk2- regularían la expresión génica temporal de SED1 en respuesta a estrés osmótico. La subunidad regulatoria Bcy1 regularía que isoforma catalítica (Tpk2 o Tpk1) se asocia a la cromatina afectando también la cinética de la expresión génica.

En respuesta a estrés oxidativo con menadiona, se observó la unión de Bcy1 a la cromatina 5 min post estímulo mientras que Tpk1 se asoció posteriormente a los 20 min (Figura 16C). La asociación de Tpk1 requiere de actividad catalítica y depende de la presencia de Bcy1. El patrón de expresión de SED1 disminuye frente al estímulo en la cepa *Wild type*, sugiriendo un rol en la represión transcripcional en respuesta a este tipo de estrés. En este sentido, tanto la ausencia de BCY1 como de las subunidades catalíticas provocan una disminución en la expresión de SED1 en condiciones basales afectando el patrón de transcripción conforme avanza el estímulo (Figura 16E). Estos resultados sugieren que la PKA afecta los niveles de expresión en células creciendo

exponenciales en glucosa sin asociarse a la cromatina. La asociación de Tpk1-Bcy1 promovería la represión de la expresión de SED1 en respuesta a menadiona.

En respuesta a agua oxigenada, Tpk1 activa se asocia con un máximo a los 10 min, para luego disminuir a valores similares a los primeros minutos (Figura 16D). Dicha asociación requiere de Bcy1. Bcy1 se asocia a tiempos posteriores a Tpk1, presentando un máximo a los 30 min. Tpk2 no se encontró asociada a la región en respuesta a este tipo de estrés. El análisis de expresión indica que en respuesta al estrés evocado con agua oxigenada existe una represión de la expresión génica de SED1 en cepas salvajes. La delección de TPK1 aumenta la expresión de SED1, sugiriendo que Tpk1 ejercería un rol negativo sobre la transcripción. Estos resultados sugieren que Tpk1 vía Bcy1 se uniría a la cromatina para mediar la represión transcripcional del gen SED1 en respuesta al estrés evocado por agua oxigenada. La delección de TPK2 anula la expresión génica sugiriendo un rol positivo de esta subunidad independiente de la asociación a la cromatina.

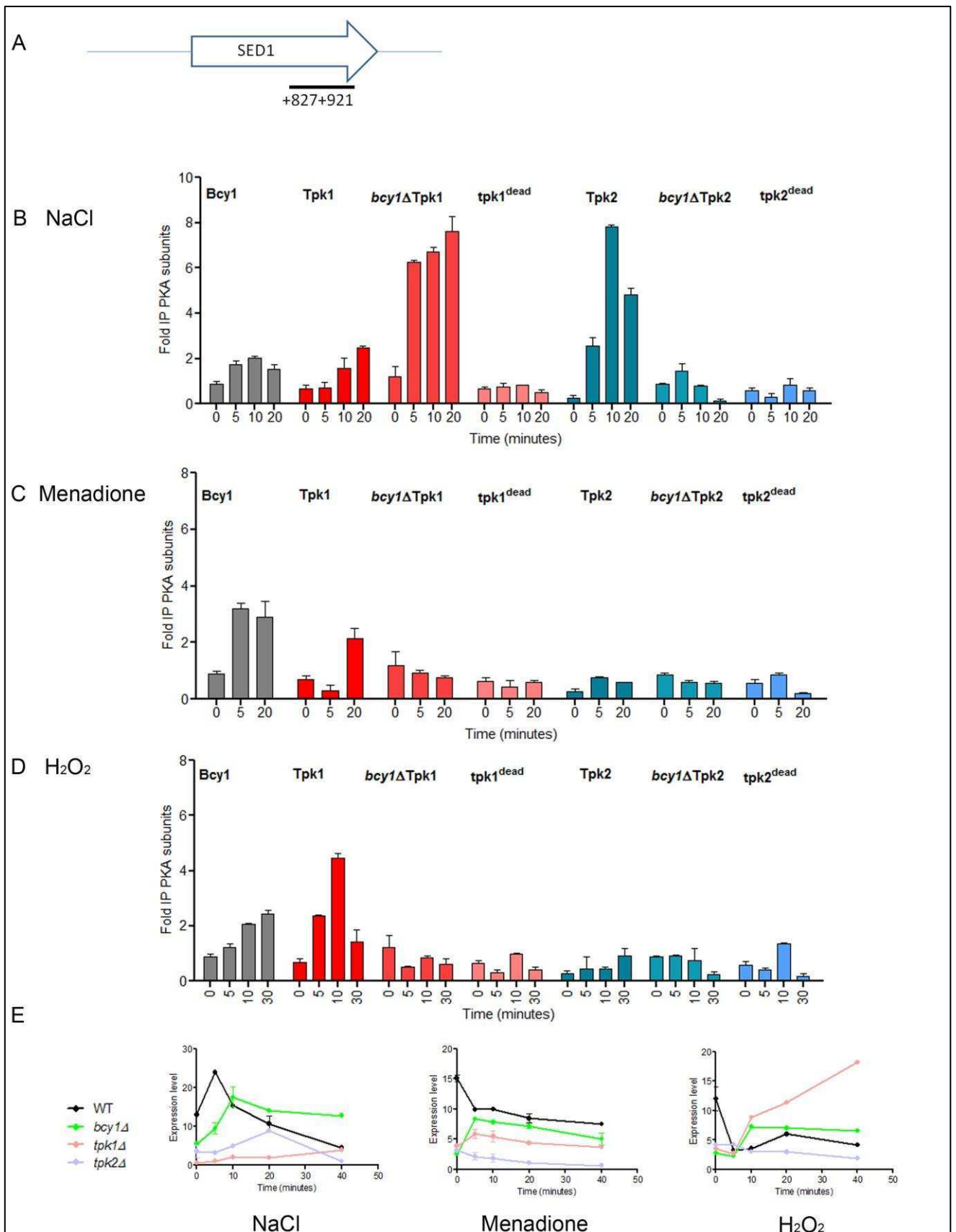


Figura 16. Asociación de las subunidades de la PKA a la región ORF del gen SED1 en condiciones de estrés osmótico (NaCl) y oxidativo (H₂O₂ y Menadiona). (A) Región analizada del ORF SED1. Las cepas Bcy1-TAP, Tpk1-TAP, *bcy1Δ*-Tpk1-TAP, *tpk1^{dead}*-TAP, Tpk2-TAP, *bcy1Δ*-Tpk2-TAP, *tpk2^{dead}*-TAP fueron crecidas en YPGlu hasta fase exponencial, se las sometió tanto a estrés osmótico 0,4M NaCl (B) u oxidativo 50 μM Menadiona (C) y 0,4mM H₂O₂ (D) durante 60 minutos. Se tomaron alícuotas en los tiempos indicados y se realizó CHIP-RealTimePCR según se describe en Materiales y Métodos. (E) Niveles de expresión del mRNA SED1 en respuesta a estrés osmótico y oxidativo. Cultivos de células *Wild-type* y las cepas mutantes *bcy1Δ*, *tpk1Δ* y *tpk2Δ* fueron tratados con 0,4M de NaCl, 50μM de menadiona o 0,4mM H₂O₂. A los tiempos indicados se tomaron muestras y los niveles de mRNA se determinaron por northern blot según materiales y métodos. Las veces de unión de PKA está dado por el incremento de la cantidad de proteína en la muestra inmunoprecipitada sobre la muestra sin inmunoprecipitar. Los datos representan el promedio ±SD y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

HSP42 codifica para una proteína de shock térmico pequeña (42,8 KDa) con actividad chaperona; involucrada en la reorganización del citoesqueleto luego del estrés por calor (Trotter et al, 2002). Si bien las proteínas HSP (*heat shock protein*) están descritas específicamente para el shock térmico, se ha presentado evidencias en la literatura que también están relacionadas con una respuesta general en la resistencia a estrés (de Nadal et al, 2011).

En la Figura 17 se observa la asociación física de las subunidades de PKA a la región media de HSP42 en respuesta a estrés osmótico y oxidativo. Bcy1, Tpk1 y Tpk2 se asocian transitoriamente en respuesta a estrés osmótico con un valor máximo a los 10 min. (Figura 17 B). La unión de ambas Tpk depende de su actividad catalítica. La delección de BCY1 anula el reclutamiento de Tpk2 y afecta la cinética de reclutamiento de Tpk1 (Figura 17B). Los niveles de expresión del mRNA HSP42 indican una represión de la expresión génica conforme avanza el estrés (Figura 17E). En conjunto éstos resultados sugieren que la unión de Tpk2 y Tpk1 provocaría represión transcripcional del gen en respuesta al estímulo. En este sentido, observamos que la delección de cada subunidad de la PKA incrementó el nivel y modificó la cinética de expresión de HSP42 en respuesta a estrés osmótico (Figura 17E).

En respuesta a menadiona y agua oxigenada (Figura 17 C y D), la región presenta asociación de Tpk1 y Bcy1. Tpk2 no se asocia en dichas condiciones. Tpk1 requiere de actividad catalítica y de la presencia de Bcy1 para su asociación física. Interesantemente, el análisis de expresión (Figura 17 E) sugiere que la asociación de Tpk1 ejercería activación transcripcional en respuesta a menadiona mientras que en agua oxigenada resultaría en la represión de este gen. El efecto observado sobre los patrones de expresión génica de HSP42 en las cepas *bcy1Δ* y *tpk1Δ* respecto a la cepa salvaje podría justificarse bajo la observación que la delección de BCY1 afecta la unión de Tpk1 a la cromatina, probablemente anulando su acción sobre la expresión génica. La delección de TPK2 anula la expresión, sugiriendo que Tpk2 regularía la expresión génica sin unirse a la cromatina.

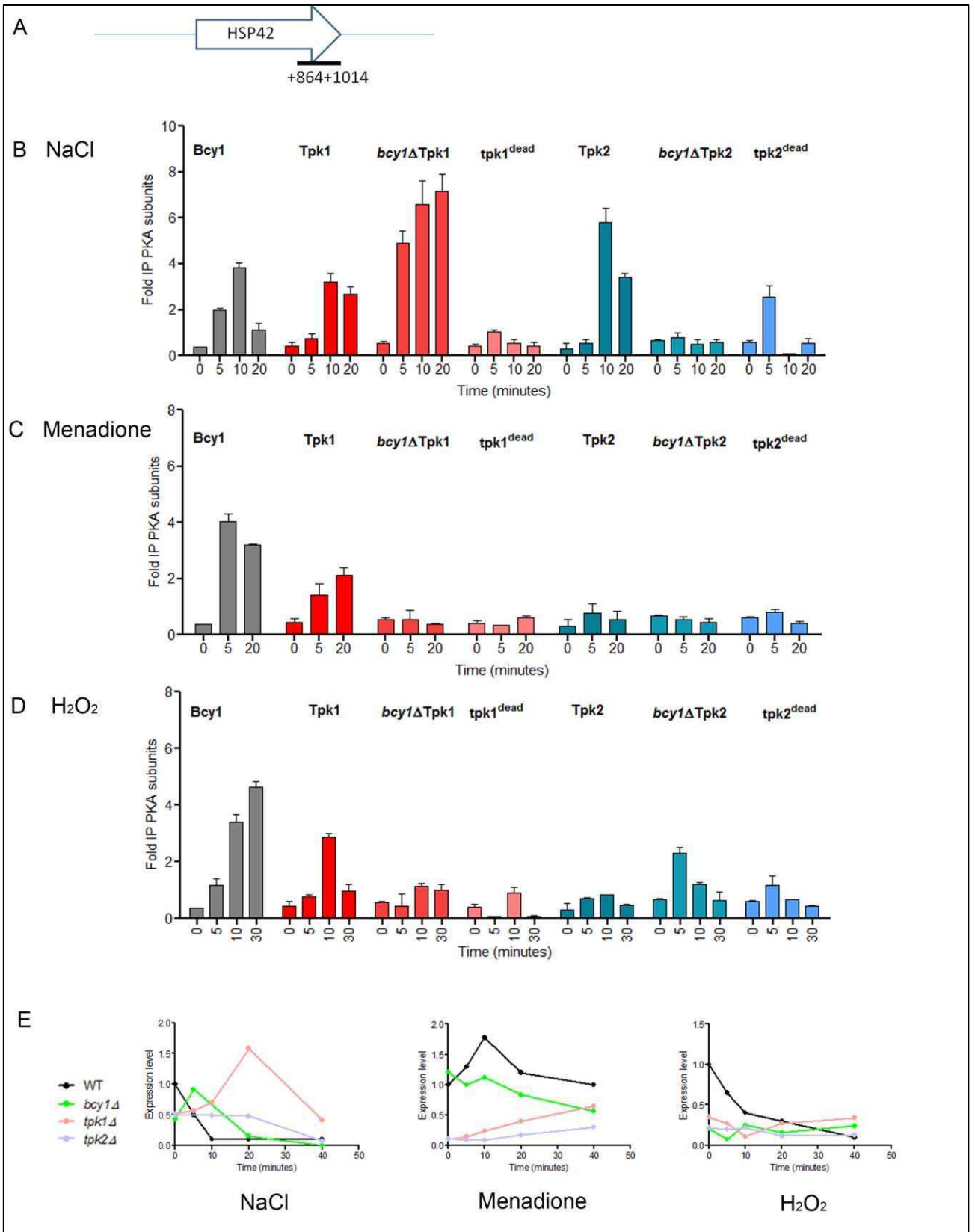


Figura 17. Asociación de las subunidades de la PKA a la región ORF del gen HSP42 en condiciones de estrés osmótico (NaCl) y oxidativo (H₂O₂ y Menadiona). (A) Región analizada del ORF HSP42. Las cepas Bcy1-TAP, Tpk1-TAP, *bcy1*Δ-Tpk1-TAP, *tpk1*^{dead}-TAP, Tpk2-TAP, *bcy1*Δ-Tpk2-TAP, *tpk2*^{dead}-TAP fueron crecidas en YPGlu hasta fase exponencial, se las sometió tanto a estrés osmótico 0,4M NaCl (B) u oxidativo 50 μM Menadiona (C) y 0,4mM H₂O₂ (D) durante 60 minutos. Se tomaron alícuotas en los tiempos indicados y se realizó ChIP-RealTimePCR según se describe en Materiales y Métodos. (E) Niveles de expresión del mRNA HSP42 en respuesta a estrés osmótico y oxidativo. Cultivos de células *Wild-type* y las cepas mutantes *bcy1*Δ, *tpk1*Δ y *tpk2*Δ fueron tratados con 0,4M de NaCl, 50μM de menadiona o 0,4mM H₂O₂. A los tiempos indicados se tomaron muestras y los niveles de mRNA se determinaron por northern blot según materiales y métodos. Las veces de unión de PKA está dado por el incremento de la cantidad de proteína en la muestra inmunoprecipitada sobre la muestra sin inmunoprecipitar. Los datos representan el promedio ±SD y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Rol de la PKA en la transcripción génica en respuesta a estrés: función y mecanismo de asociación en promotores de genes ribosomales.

La biogénesis de los ribosomas ocupa un gran porcentaje de la actividad de expresión génica celular. El 60% del total de la transcripción está dedicada a RNA ribosómico, ocupa el 50% de la actividad transcripcional de la RNA polimerasa II y el 90% del splicing es de RNA mensajero de proteínas ribosomales (Warner et al, 1999). Más aún, requiere la síntesis coordinada de 79 proteínas ribosomales que, en general, se necesitan en cantidades equimolares (Warner & McIntosh, 2009). La expresión de algunos genes de proteínas ribosomales ve afectada por las señales nutricionales y se encuentra regulada por varias vías de transducción de señales (Lippman et al, 2009).

Promotor de Rps29B, región iYDL061

Rps29B codifica para un componente proteico de la subunidad ribosomal pequeña (40S) (Planta et al, 1998). La Figura 18B muestra que, en respuesta a estrés osmótico, el promotor es ocupado principalmente por Tpk2 y ésta requiere de su actividad catalítica para la asociación ya que la mutante $tpk2^{dead}$ no se asoció a la cromatina. Bcy1 no se encontró asociada a esta región génica (Figura 18B), pero su delección incrementó la unión de Tpk1 y anuló la unión de Tpk2. Puede especularse que la ausencia de asociación de Tpk2 como consecuencia de la falta de expresión de Bcy1, permitiría la asociación de Tpk1.

El patrón de expresión en la cepa *Wild type* (Figura 18 E) indica que el mRNA de RPS29B es reprimido conforme avanza el estrés osmótico. La delección de BCY1 promovió un incremento de la expresión génica en función del tiempo post estímulo. La delección de TPK1 o TPK2 aumento los niveles basales pero la expresión fue reprimida en función del tiempo post estrés. Con estos resultados postulamos que la asociación de Tpk2 ejerce un rol regulador negativo sobre la transcripción en respuesta a estrés osmótico. Una posible explicación del efecto observado sobre la transcripción en cepas *bcy1Δ* sería que la unión de Tpk1 regularía positivamente la transcripción génica.

Frente a estrés oxidativo (Figura 18C) evocado con menadiona no hallamos asociada a la PKA en esta región génica. El patrón de expresión de RPS29B indica que la PKA ejerce un rol inhibitorio de la expresión génica en respuesta a menadiona ya que la ausencia de BCY1 promueve la expresión del gen. Más aún, la delección de TPK1 o TPK2 promueve

un incremento de la expresión sugiriendo un rol negativo sobre la expresión de este gen independiente de la asociación a la cromatina.

En respuesta al agregado de agua oxigenada, se observa la asociación transitoria de Tpk2 y Tpk1 con un máximo a los 10 min (Figura 18D). Bcy1 presenta una cinética similar de asociación pero permanece unida hasta los 30 min post estímulo. La delección de BCY1 afectó solo la asociación de Tpk1. Ambas versiones inactivas tpk^{dead} no se hallaron asociadas a la cromatina indicando que se requiere de actividad catalítica para la asociación a la cromatina. El análisis del patrón de expresión del mRNA de RPS29B indicó que en respuesta al agregado de agua oxigenada existe una inducción de la expresión concomitante con la asociación de las Tpk. La delección de BCY1 drásticamente afectó la respuesta transcripcional. Estos resultados sugieren que la asociación de Tpk1 vía Bcy1 y la asociación de Tpk2 serían necesarias para la activación transcripcional de RPS29B en respuesta al agregado de agua oxigenada.

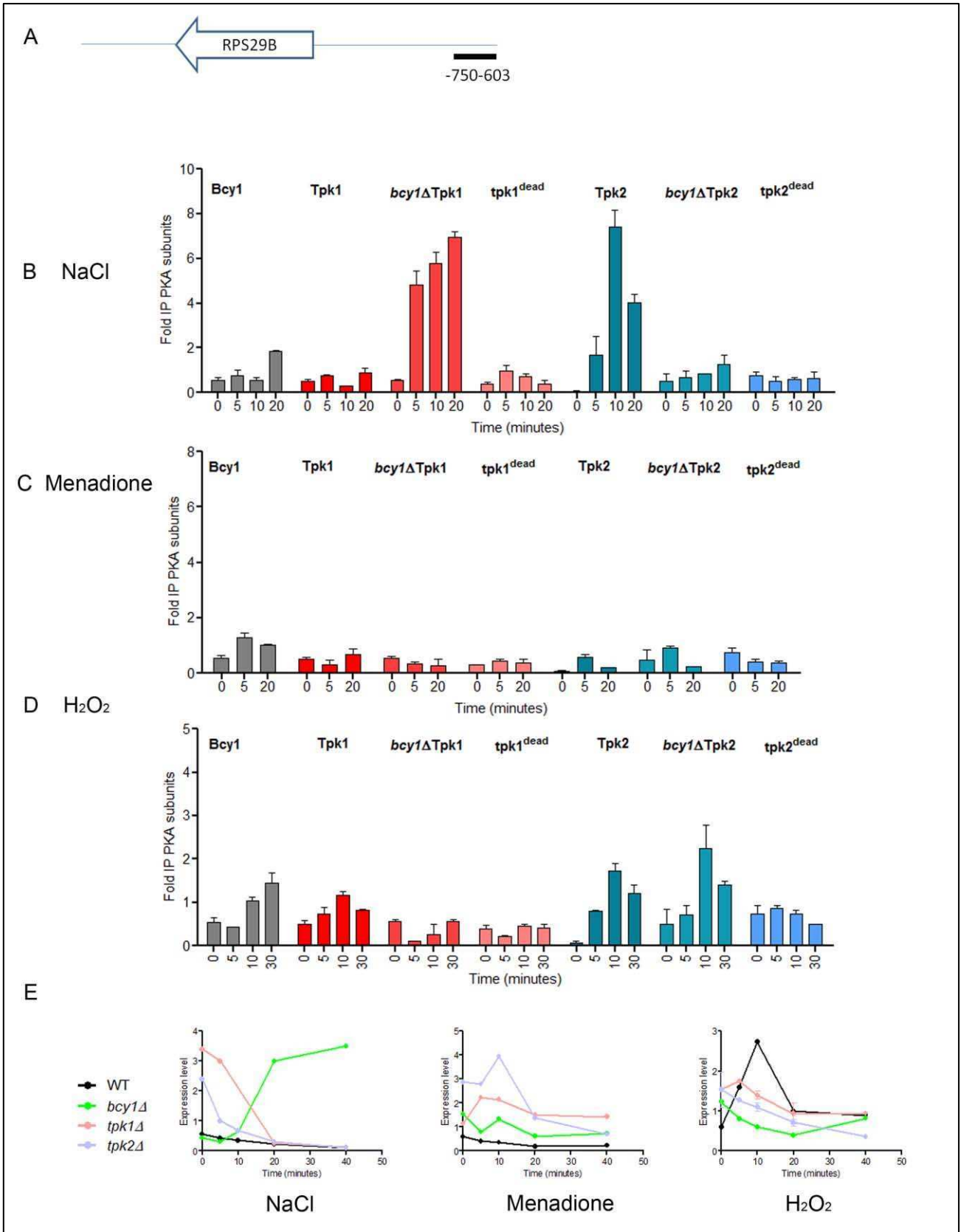


Figura 18. Asociación de las subunidades de la PKA a la región intragénica del gen *iYDL061* en condiciones de estrés osmótico (NaCl) y oxidativo (H_2O_2 y Menadiona). (A) Región intragénica analizada. Las cepas Bcy1-TAP, Tpk1-TAP, *bcy1* Δ -Tpk1-TAP, *tpk1*^{dead}-TAP, Tpk2-TAP, *bcy1* Δ -Tpk2-TAP, *tpk2*^{dead}-TAP fueron crecidas en YPGlu hasta fase exponencial, se las sometió tanto a estrés osmótico 0,4M NaCl (B) u oxidativo 50 μ M Menadiona (C) y 0,4mM H_2O_2 (D) durante 60 minutos. Se tomaron alícuotas en los tiempos indicados y se realizó ChIP-RealTimePCR según se describe en Materiales y Métodos. (E) Niveles de expresión del mRNA RPS29B en respuesta a estrés osmótico y oxidativo. Cultivos de células *Wild-type* y las cepas mutantes *bcy1* Δ , *tpk1* Δ y *tpk2* Δ fueron tratados con 0,4M de NaCl, 50 μ M de menadiona o 0,4mM H_2O_2 . A los tiempos indicados se tomaron muestras y los niveles de mRNA se determinaron por northern blot según materiales y métodos. Las veces de unión de PKA está dado por el incremento de la cantidad de proteína en la muestra inmunoprecipitada sobre la muestra sin inmunoprecipitar. Los datos representan el promedio \pm SD y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Promotor de RPL1B, región iYGL136

La región intragénica iYGL136 antecede al gen YGL135W que codifica para la proteína RPL1B, componente de la subunidad ribosomal mayor (60S) (Planta & Mager, 1998). Se ha descrito que células de levadura carentes de Rpl1B crecen lentamente y solo una fracción de subunidades 60S carentes de Rpl1 pueden asociarse a la subunidad 40S resultando competentes para la traducción (Lippman et al, 2009).

En respuesta a estrés osmótico (Figura 19 B), se observó la asociación de Tpk2 y en menor medida de Tpk1 conforme el estrés progresa en la región promotora (Figura 19 A). Las versiones mutantes inactivas $tpk1^{dead}$ y $tpk2^{dead}$ no se asociaron sugiriendo que la unión a la cromatina requiere de la actividad catalítica. No se observó unión de Bcy1 a la cromatina en esta región génica pero las cepas *bcy1Δ* mostraron patrones alterados de asociación de las Tpk: no se observó la unión de Tpk2 y provocó una mayor asociación de Tpk1. El patrón de expresión de mRNA RPL1B en la cepa *Wild-type* frente a estrés osmótico muestra una represión de la expresión génica a medida que el estrés avanza. La delección de BCY1 o de TPK1 o TPK2 afecto los niveles basales de expresión y no respondieron a variaciones de la expresión en respuesta a estrés. Estos resultados sugieren que la asociación de Tpk2 y Tpk1 a la cromatina regularía negativamente la expresión génica. El efecto ejercido por las Tpk es independiente de la unión de Bcy1 a la cromatina.

En respuesta a estrés oxidativo (Figura 19 C) por el agente menadiona, no observamos asociación de las subunidades catalíticas de la PKA a esta región génica. Sin embargo, se observa que Tpk1, Tpk2 y Bcy1 regulan la represión transcripcional en respuesta a menadiona (Figura 19 E).

En respuesta a agua oxigenada observamos asociación de Bcy1 y Tpk2 al promotor a los 10 min post estímulo. La asociación de Tpk2 no depende de Bcy1 y no requiere de actividad catalítica (Figura 19 D). El análisis de expresión indicó que este gen es reprimido durante el estrés oxidativo evocado por agua oxigenada (Figura 19E). La delección de BCY1 y de cada TPK afecto la respuesta transcripcional. Estos resultados sugieren que la asociación de Tpk2 a esta región del promotor tendría un rol regulador negativo en respuesta a estrés evocado por agua oxigenada mientras que Tpk1 afectaría la expresión sin asociación a la cromatina.

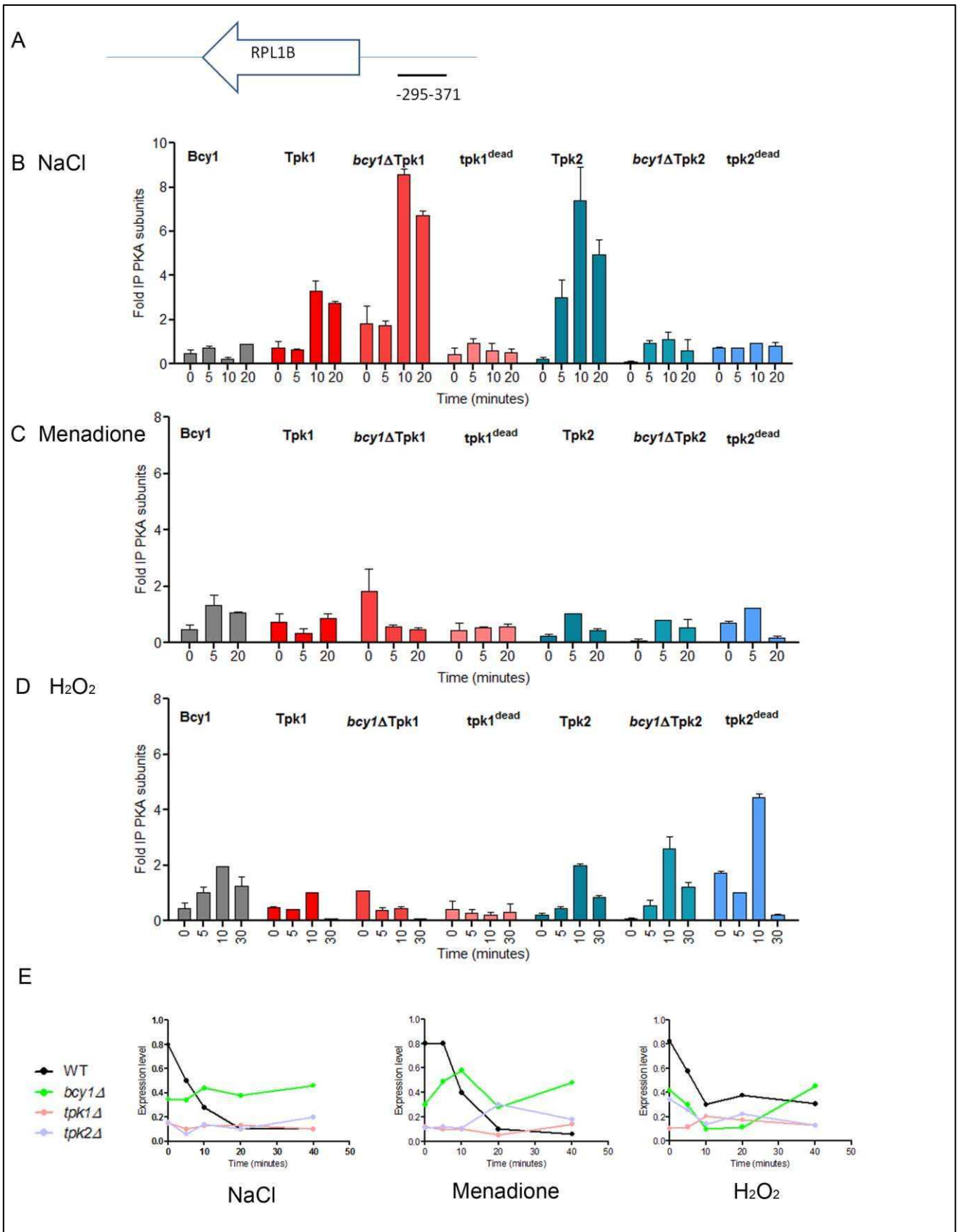


Figura 19. Asociación de las subunidades de la PKA a la región intragénica del gen *iYGL136* en condiciones de estrés osmótico (NaCl) y oxidativo (H_2O_2 y Menadiona). (A) Región intragénica analizada. Las cepas Bcy1-TAP, Tpk1-TAP, *bcy1* Δ -Tpk1-TAP, *tpk1*^{dead}-TAP, Tpk2-TAP, *bcy1* Δ -Tpk2-TAP, *tpk2*^{dead}-TAP fueron crecidas en YPGlu hasta fase exponencial, se las sometió tanto a estrés osmótico 0,4M NaCl (B) u oxidativo 50 μ M Menadiona (C) y 0,4mM H_2O_2 (D) durante 60 minutos. Se tomaron alícuotas en los tiempos indicados y se realizó ChIP-RealTimePCR según se describe en Materiales y Métodos. (E) Niveles de expresión del mRNA RPL1B en respuesta a estrés osmótico y oxidativo. Cultivos de células *Wild-type* y las cepas mutantes *bcy1* Δ , *tpk1* Δ y *tpk2* Δ fueron tratados con 0,4M de NaCl, 50 μ M de menadiona o 0,4mM H_2O_2 . A los tiempos indicados se tomaron muestras y los niveles de mRNA se determinaron por northern blot según materiales y métodos. Las veces de unión de PKA está dado por el incremento de la cantidad de proteína en la muestra inmunoprecipitada sobre la muestra sin inmunoprecipitar. Los datos representan el promedio \pm SD y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Análisis cinético de la asociación de la PKA y proteínas de complejos remodeladores de la cromatina.

Para continuar con la caracterización del mecanismo de acción de la PKA sobre la transcripción génica analizamos por ChIP-RealTimePCR la unión de factores asociados a complejos remodeladores de la cromatina Rsc1, Arp8 y Snf2 bajo las condiciones de estrés donde hallamos asociación de las subunidades catalíticas de la PKA. Para esto, células que expresan Rsc1-TAP, Arp8-TAP y Snf2-TAP fueron tratadas con 0,4M NaCl (estrés osmótico) o 50 μ M Menadiona o 0,4mM H₂O₂ (estrés oxidativo). La proteína Rsc1 (complejo RSC), Snf2 (subunidad catalítica del complejo SWI/SNF) y Arp8 (componente del complejo INO80) forman parte de complejos que remodelan la cromatina en un proceso dependiente de ATP (Bungard et al, 2004; Saha et al, 2002; Shen et al, 2000). Mediante western blot verificamos que los niveles de expresión de las proteínas Rsc1-TAP, Arp8-TAP y Snf2-TAP no variaron frente a los diferentes tipos de estrés (Figura S3A). Ensayos de spot assay revelaron que la viabilidad celular de éstas cepas no fue afectada por los tratamientos (Figura S3B).

En la Figura 20 A, se observa que en respuesta a un estrés osmótico tanto regiones medias de los ORF ALD6 y HSP42; y del promotor del gen RPS29B existe una asociación transitoria de los factores Arp8, Rsc1 y/o Snf2 en correlación con transcripción activa evaluado por la inducción de la expresión del mRNA. La asociación temporalmente posterior de Tpk1 y/o Tpk2 sugiere que éstas se asociarían a la cromatina con posible función reguladora negativa sobre la transcripción. En análisis de asociación de Rap1 mostró correlación temporal con la asociación de Tpk1 y Tpk2.

Por otro lado, en respuesta a menadiona (Figura 20 B) se observó en las regiones ORF de ALD6 y HSP42 la asociación concomitante de Arp8, Rsc1 y las Tpk (según corresponda) junto con una inducción de la actividad transcripcional del ORF. Estos resultados concuerdan con un rol positivo de las isoformas catalíticas Tpk sobre la transcripción a través de la interacción con algún componente del complejo transcripcional o de complejos modificadores de la cromatina. Por el contrario, en la región del ORF de HSP42, la correlación temporal de Arp8, Snf2, Rsc1 y Tpk1 mostró la disminución de los niveles de mRNA. Para éste caso, los resultados sugieren un rol regulador negativo de Tpk1 sobre la transcripción vía asociación con algún componente del complejo transcripcional o de complejos modificadores de la cromatina.

En respuesta a estrés oxidativo evocado por agua oxigenada (Figura 20 C), se observó correlación de la asociación de Tpk con los factores Arp8, Snf2 y Rsc1 en el ORF de

ALD6 y promotor de Rps29B que correlaciona con la activación transcripcional del gen. Por el contrario, la expresión de HSP42 es reprimido cuando Tpk1 presenta una correlación temporal similar a Arp8, Snf2 y Rsc1.

En conjunto, estos resultados sugieren que dependiendo del estrés, las Tpk's pueden asociarse temporalmente después de proteínas remodeladoras de la cromatina favoreciendo la represión génica (estrés osmótico) o asociarse co-temporalmente a dichos factores ejerciendo un rol positivo o negativo sobre la transcripción génica (estrés oxidativo).

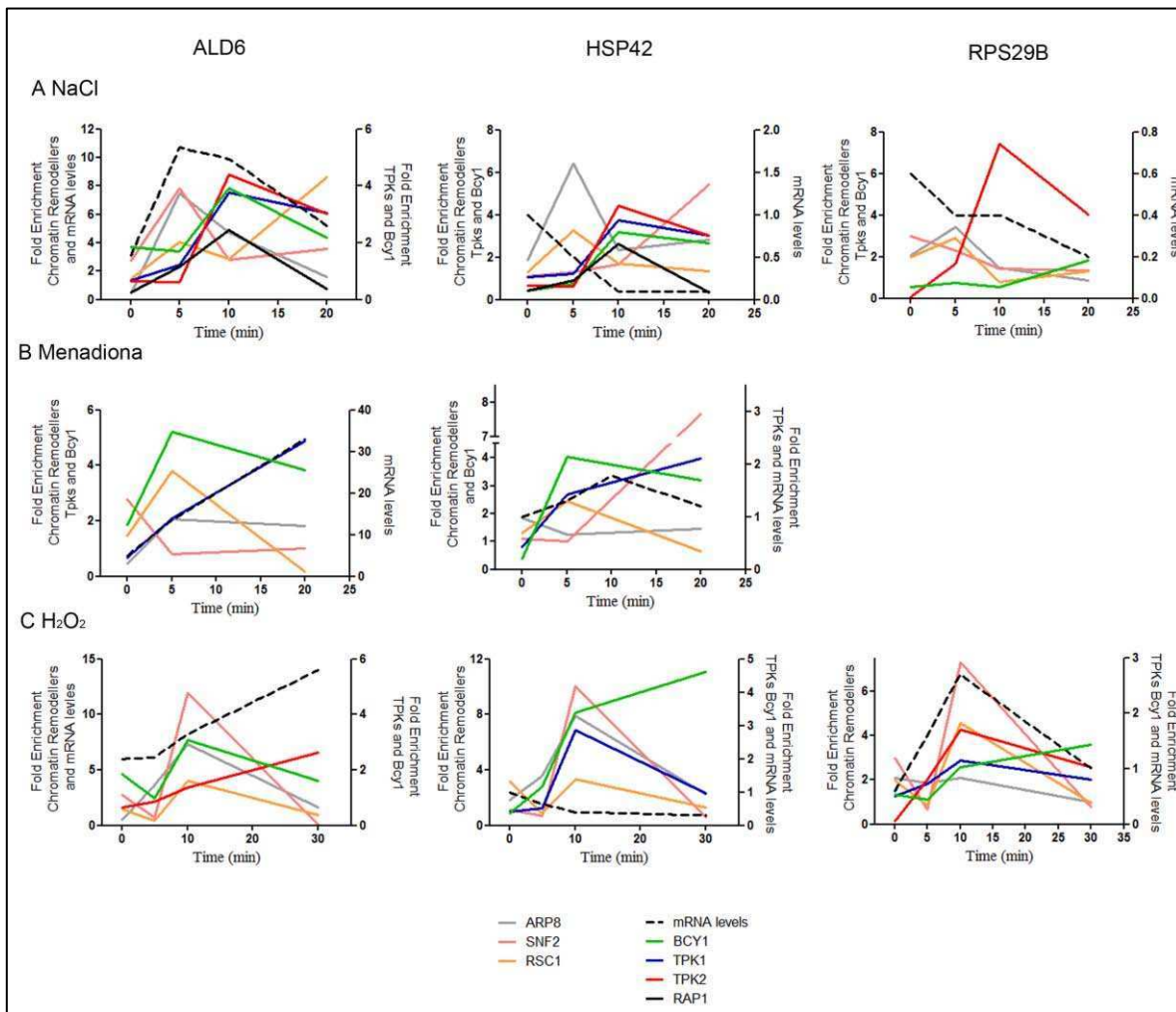


Figura 20. Cinética de unión de remodeladores de la cromatina y Tpk1 y Tpk2 en las regiones ALD6, HSP42 e iYDL061 en respuesta a estrés. Las cepas Arp8-TAP, Snf2-TAP, Rsc1-TAP y Rap1-TAP fueron crecidas en YPGlu hasta fase exponencial, se las sometió tanto a (A) estrés osmótico (0,4M NaCl) y oxidativo (B) 50 μ M Menadiona y (C) 0,4mM H₂O₂). Se realizó ChIP-RealTimePCR según Materiales y Métodos. Los gráficos son representativos de dos experimentos independientes. No se analizó la unión de remodeladores de la cromatina a la región intragénica de RPS29B bajo el estrés evocado por menadiona porque las subunidades de PKA no se hallaron asociadas a dicha región.

DISCUSIÓN.

Los cambios en la expresión génica en respuesta a estrés garantizan la supervivencia celular frente al estrés inmediato, la exposición a estrés posterior o protección cruzada contra estrés de diferente naturaleza.

La vía cAMP-PKA tiene un impacto principal sobre la expresión génica, ilustrado por la observación que aproximadamente el 90 % de los cambios transcripcionales que ocurren por el agregado de glucosa a células hambreadas es similar al perfil transcripcional que se observa en células activas en la vía cAMP-PKA (Wang et al, 2004). De acuerdo con esto, muchas de las proteínas “*targets*” sustrato de la PKA afectan directa o indirectamente los niveles de transcripción. Por ejemplo PKA regula de manera directa o indirecta la localización subcelular y la unión al DNA de distintos factores de transcripción como Hsf1, Msn2/Msn4, Sfp1 y Maf1 los cuales regulan la expresión génica en respuesta a múltiples estrés como estrés térmico, oxidativo y hambre de glucosa (Lee et al, 2008; Wei et al, 2009; Marion et al, 2004).

Sin embargo, otros estudios han demostrado que las subunidades catalíticas de la PKA, Tpk1 y Tpk2 tendrían otros mecanismos de participación en la regulación de la transcripción. Por ejemplo, se unen físicamente alrededor de 130 genes en respuesta a diferentes estímulos (Pokholok et al, 2006). Estas regiones comprenden promotores y regiones que se transcriben activamente en respuesta a estrés oxidativo y al agregado de glucosa a células creciendo en glicerol. De este análisis “*genome wide*” se ha descrito que Tpk2 posee un patrón de ocupancia que correlaciona con factores de transcripción y remodeladores de la cromatina asociados a promotores como Fhl1, Rap1 y Sfp1 en los genes ribosomales en respuesta a estrés oxidativo. Tpk1 presentó un patrón de asociación a regiones génicas transcritas donde además se han descrito asociados factores de elongación, reguladores de la cromatina asociados a genes y algunos modificadores de histonas. Además, se ha descrito que la PKA podría inhibir la elongación de la RNAPol II vía la unión del factor de transcripción Rap1 a genes de proteínas ribosomales en respuesta al cambio en la fuente de carbono (Pelechano et al, 2009).

En este capítulo hemos investigado el mecanismo molecular por el cual la PKA regula la transcripción génica vía asociación a la cromatina en la adaptación a estrés osmótico y oxidativo.

Asociación de la PKA a genes blanco en respuesta a estrés osmótico.

Un mecanismo por el cual las células reprograman la transcripción en respuesta a diversos estrés involucran reclutamiento de factores de transcripción específicos incluyendo la RNAPol II, para regular la iniciación, la elongación y la estabilidad de mRNA (Martinez-Montañés et al, 2010; de Nadal & Posas, 2010).

Existe un balance dinámico entre diferentes complejos remodeladores de la cromatina así como enzimas modificadoras de histonas asociadas a regiones génicas necesarias para el silenciamiento o la estimulación de la expresión de genes de estrés. Recientemente, las proteínas quinasas que participan en la señalización del estrés se hallaron asociadas a la cromatina. Un ejemplo muy estudiado es el rol de Hog1 sobre la transcripción de genes que responden a estrés osmótico. Se ha descrito que ésta puede modular la iniciación de la transcripción por fosforilación directa de factores de transcripción específicos, reclutar a la RNAPol II y co-activadores, reclutar deacetilasas de histonas. Además se la ha descrito como factor de elongación de la transcripción y dirige la asociación de factores remodeladores de la cromatina RSC a las regiones transcribibles de estos genes (de Nadal et al, 2011).

Nosotros hemos analizado la cinética temporal de asociación de las subunidades de la PKA a la cromatina y la actividad transcripcional de cinco regiones génicas en respuesta a estrés osmótico. Los resultados presentados (Figura 15, 16, 17) indican que en las regiones génicas codificantes de los genes ALD6, HSP42 y SED1 las subunidades catalíticas Tpk1 y/o Tpk2 se asocian a la cromatina en respuesta a estrés. Sorprendentemente también hallamos Bcy1 asociada a la cromatina. Bcy1 no sólo afecta la unión de una isoforma en particular sino también modula la cinética de unión de la Tpk a la cromatina y la expresión génica. De esta manera, la asociación física de Bcy1 a la cromatina modularía temporalmente la asociación física de las Tpk a la cromatina y en consecuencia la respuesta transcripcional de los genes estudiados.

Como era de esperar, el análisis de la asociación de factores que forman parte de complejos remodeladores de la cromatina como Rsc1 (componente del complejo RSC), Arp8 (componente del complejo INO80) y Snf2 (subunidad catalítica del complejo SWI/SNF) mostraron correlación con la activación transcripcional del gen en repuesta al estrés osmótico. La asociación posterior de Tpk correlaciono con la disociación de factores remodeladores de la cromatina y la consecuente represión transcripcional (Figura 20). Estos resultados sugieren que la asociación de Tpk-Bcy1 permitiría regular negativamente la transcripción modulando negativamente factores que modifican la

cromatina provocando el apagado de la expresión génica luego de los 10 min post estrés osmótico (Figura 21 A- NaCl).

En los promotores de los genes ribosomales RPS29 y RPL1B (regiones iYDL061 e iYGL136 respectivamente, Figura 18 y 19) hemos observado que la asociación de Tpk2 y Tpk1 regularían negativamente la transcripción del gen. A diferencia de las regiones ORF, en estos promotores no hemos observado la asociación de Bcy1 a la cromatina. Sin embargo, la delección de BCY1 afectó la expresión génica posiblemente por modificar que tipo de isoforma de asocia a la cromatina. El análisis de asociación temporal de factores remodeladores de la cromatina y los niveles de expresión génica mostraron que, similar a lo observado para las regiones codificantes, la asociación de las Tpk es posterior a la asociación de Arp8, Snf2 y Rsc1 (Figura 20 B- NaCl). La represión de la actividad del promotor sugiere un rol silenciador de las Tpk en respuesta al agregado del estrés osmótico.

La respuesta adaptativa frente al estrés debe ser temporalmente restringida, ya que se ha observado que la inducción constitutiva de ésta ejerce un efecto nocivo al crecimiento celular. Por ejemplo, la activación sostenida SAPKs, tanto en levaduras como en mamíferos, conlleva a retraso en el ciclo celular y una respuesta similar a la apoptosis (Yaakov et al, 2003; Vendrell et al, 2011; Dolado et al, 2008). Nuestros resultados indican que la activación transcripcional restringida temporalmente en respuesta al estrés osmótico es dependiente de la asociación de Tpk pero principalmente de la presencia de Bcy1. La subunidad regulatoria de la PKA parece jugar un rol principal en la respuesta transcripcional transiente, controlando la temporalidad y que isoforma catalítica se asocia a la cromatina.

En este sentido, el análisis de viabilidad celular frente al estrés (Figura 13) indico que la delección de la subunidad regulatoria resulto completamente letal para la sobrevivida al estrés osmótico.

Se ha presentado evidencia que Hog1 en respuesta a NaCl 0,4 M se asocia a 36 genes en los primeros 5 minutos mostrando una correlación con la activación transcripcional de los genes donde se asocia (Poholok et al, 2006). Dentro de éstos se encuentran ALD6, HSP42 y SED1, cuya expresión fue regulada negativamente por la asociación de PKA a los 10-20 minutos post estímulo (Figura 21A). En conjunto, estos resultados sugieren que la activación transcripcional transitoria en respuesta a estrés osmótico podría estar regulada por la asociación primaria de la vía HOG y posterior de la PKA.

PKA ha sido descrita en procesos de regulación de proteínas represoras de la transcripción como Sko1 y Rgt1. Sko1 es un represor que recluta el complejo co-represor Cyc8-Tup1 a los promotores de genes blanco en condiciones normales. En respuesta a estrés osmótico, Hog1 transloca al núcleo e hiperfosforila a Sko1 lo que promueve la activación de la transcripción vía reclutamiento de complejos remodeladores de la cromatina SWI/SNF y SAGA (Proft & Struhl 2002). Por otro lado, PKA regula positivamente la afinidad de Sko1 por el DNA y su acumulación nuclear (Pacual-Ahuir et al, 2001).

Se ha descrito además que una vez que el regulador negativo Mth1 es degradado vía proteasoma, PKA podría fosforilar al factor de transcripción Rgt1 lo que promovería su disociación del complejo represor Cyc8-Tup1 y del DNA promoviendo la desrepresión de los genes targets (Adhiraj et al, 2013).

Asociación de la PKA a genes blanco en respuesta a estrés oxidativo: agua oxigenada versus menadiona.

Se ha demostrado previamente que diversos tipos estrés oxidativos desencadenan una respuesta celular específica ya que diferentes sets de genes son necesarios o requeridos para la protección a cada tipo de estrés (Sha et al, 2013). El análisis de la viabilidad frente a estrés oxidativo evocado por agua oxigenada y menadiona indicó una respuesta diferencial en cepas PKA hiperactivas (cepas *Wild-type versus bcy1Δ*) y cepas que expresan Tpk1 o Tpk2 (Figura 13). Estos resultados sugieren que cada isoforma tendría un rol diferencial en la resistencia a cada tipo de estrés oxidativo. Estas diferencias nos valieron de un buen modelo para analizar si existe un rol diferencial de cada subunidad catalítica de la PKA en la regulación transcripcional vía asociación a la cromatina en respuesta a dos tipos de estrés oxidativo.

En respuesta al agregado de menadiona como agente oxidativo, en las regiones codificantes de los genes ALD6, SED1 y HSP42 observamos que la asociación de Tpk1 requiere de la expresión de Bcy1. La cinética temporal de asociación mostró que Tpk1 se asocia a la cromatina temporalmente posterior a la asociación de Bcy1 (Figura 20), por lo que especulamos que Bcy1 se asocia a la cromatina para reclutar moléculas de Tpk1. El análisis de la asociación de factores Snf2, Rsc1 y Arp8 mostró una correlación temporal con la transcripción génica y la asociación de Bcy1-Tpk1 (Figura 20). Estos resultados sugieren que Tpk1 vía Bcy1 podría ser parte del complejo remodelador de la cromatina estimulando la activación transcripcional en respuesta a menadiona. Contrariamente, la

unión de Tpk1 a la región media de SED1 correlaciona con la represión génica. Cabe aclarar que si bien no observamos a Tpk2 asociada a la cromatina en estas regiones al estimular las células con menadiona, cepas *tpk2Δ* presentaron un patrón de expresión génica alterado por lo que posiblemente Tpk2 regule la expresión génica sin unirse a la cromatina, modificando vía fosforilación la actividad de algún factor de transcripción no caracterizado aún.

En respuesta al agregado de agua oxigenada observamos que, a diferencia de menadiona, en las regiones SED1 y HSP42 se asociarían Tpk1 y Bcy1 co-temporalmente en respuesta al estímulo para regular negativamente la expresión génica (Figuras 16 y 17). En la región codificante de ALD6, al igual que en las células estimuladas con menadiona, su expresión génica es estimulada por el agregado de agua oxigenada pero en este caso Tpk2 vía Bcy1 se halló asociada a la cromatina (Figura 15).

En las regiones promotoras de los genes RPS29B y RPL1B observamos un mecanismo de acción diferencial de la PKA sobre la respuesta transcripcional al estrés oxidativo.

En respuesta al agregado de agua oxigenada, la activación transcripcional del gen RPS29B correlacionó con la unión de Tpk1 y Tpk2 a la cromatina, donde sólo Tpk1 resultó dependiente de Bcy1 (Figura 18). Dicha asociación mostró correlación con la asociación de Snf2 y Rsc1 a la cromatina (Figura 20 C). Diferencialmente, la represión del gen RPL1B mostró correlación con la asociación de Tpk2 independiente de la asociación de Bcy1.

En respuesta al agregado de menadiona no observamos asociación a la cromatina de la PKA pero sí un efecto sobre la respuesta transcripcional (Figura 18) sugiriendo regulación de la transcripción indirecta.

Estos resultados muestran un mecanismo común en la respuesta al estrés oxidativo evocado por menadiona, donde la asociación de Bcy1 favorecería la asociación posterior de Tpk1 conforme avanza el estrés (Figura 21 A, menadiona). Sin embargo, en respuesta al agregado de agua oxigenada, asociación de Tpk1 y/o Tpk2 resultó co-temporal con la asociación Bcy1 (Figura 21 A, H₂O₂). El rol estimulador o inhibitorio sobre la transcripción por parte de cada isoforma de Tpk observado resultó ser específico de cada gen/estímulo oxidativo y dependerá de que función sobre la transcripción tenga el potencial sustrato de cada isoforma Tpk en un contexto transcripcional específico. Si bien queda por caracterizar el/los sustratos de PKA, los resultados concuerdan con observaciones previas que indican especificidad de acción por parte de cada isoforma catalítica de la PKA en *S. cerevisiae*.

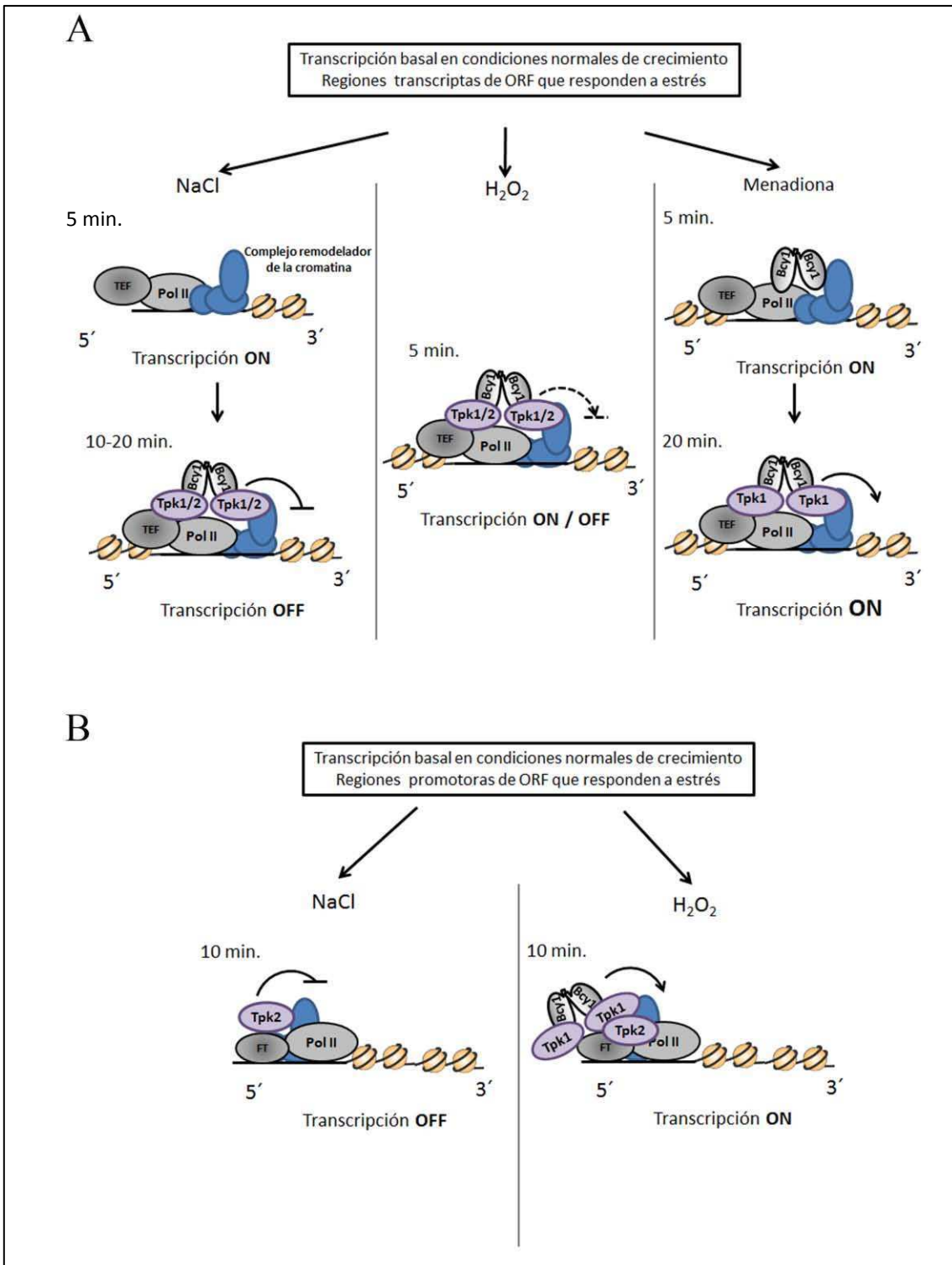


Figura 21. En respuesta a diferentes condiciones de estrés la PKA participaría en la regulación de la transcripción vía asociación a regiones codificantes (A) y a través de la asociación a regiones promotoras (B). En respuesta a estrés oxidativo evocado por agua oxigenada el rol de la PKA resultó positivo o negativo dependiendo del gen analizado (línea punteada).

Mecanismo de asociación de la PKA a la cromatina.

Hemos realizado un análisis de proteínas asociadas a Bcy1 mediante purificación por afinidad seguido de espectrometría de masa. De este análisis hemos identificado a las subunidades mayores de la RNA Pol II, Rpb2 (subunidad B150) y Rpo21 (subunidad mayor B220) como interactores de Bcy1 *in vivo* (resultados no mostrados). Ambas subunidades forman parte del *core* central de la enzima. Para determinar que dominio de Bcy1 está involucrado en dicha interacción hemos realizado experimentos de pull-down empleando versiones salvaje Bcy1, la mutante de delección *bcy1Δ*¹⁻¹⁴⁰ (carece del dominio de dimerización y el linker 1) y la holoenzima RNAPol II purificada empleando la subunidad Rpb2-TAP etiquetada. Los resultados obtenidos indicaron que la región amino terminal de Bcy1 sería un potencial dominio de interacción entre Bcy1-RNA pol II.

Interesantemente, reportes previos han descrito que Bcy1 interacciona con Nrd1, proteína que interacciona con el dominio carboxilo terminal de la subunidad Rpo21 fosforilada en Ser5 (Darby et al, 2012) y Ess1 proteína que regula la fosforilación del dominio carboxilo terminal de Rpo21 (Ho et al, 2002). Además, Tpk1 y Tpk2 se hallaron como interactores de Rpo21 (Breitkreutz et al, 2010).

El análisis del patrón de unión de Tpk1 y Tpk2 a las regiones génicas analizadas resulto diferente en cepas que no expresan Bcy1 respecto a cepas salvajes. En respuesta a estrés osmótico observamos que Tpk2 depende de la expresión de BCY1 mientras que la unión de Tpk1 se observó aun en cepas *bcy1Δ* pero con una cinética de asociación diferente. En respuesta a estrés oxidativo por menadiona y agua oxigenada, observamos que Tpk1 depende de Bcy1 para su asociación a la cromatina. Más aún, la asociación de Bcy1 precede a la asociación de Tpk1. Diferencialmente, la asociación de Tpk2 no depende de la subunidad reguladora.

Similar a Hog1, el cual requiere de actividad catalítica para asociarse a los genes blanco (Alepuz et al, 2001), la asociación de Tpk1 depende de su actividad catalítica ya que las versiones "*kinase dead*" no se hallaron asociadas a la cromatina. Diferencialmente, Tpk2 requirió de actividad catalítica para asociarse a la cromatina en respuesta a estrés osmótico y oxidativo por menadiona, mientras que las versiones *tpk2^{dead}* se hallaron asociadas bajo estrés oxidativo evocado por agua oxigenada.

Estas observaciones sugieren mecanismos de asociación diferencial de cada Tpk en respuesta al mismo estímulo.

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

CAPITULO I.

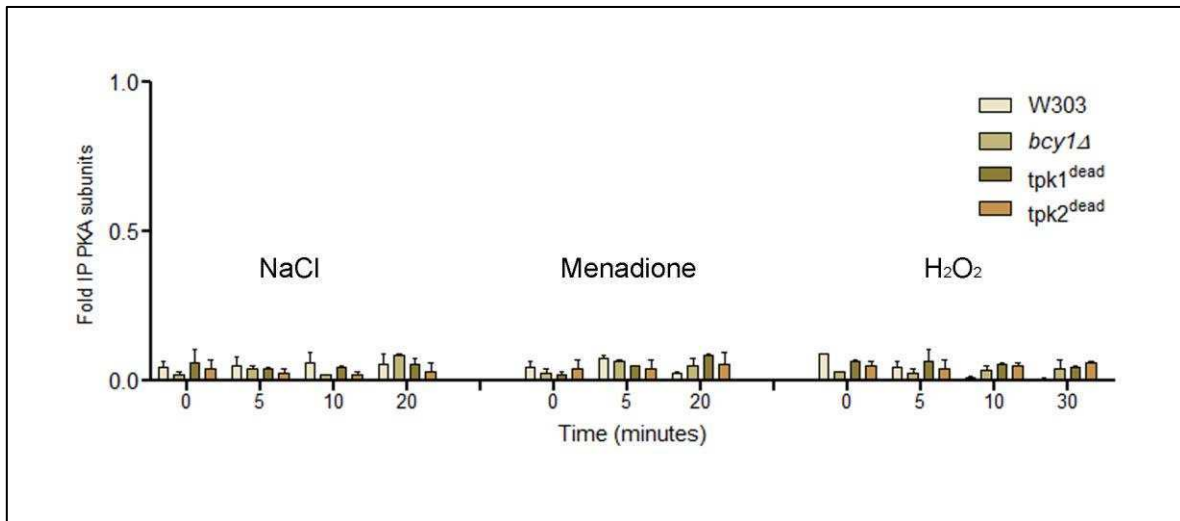


Figura S1. Control inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en condiciones de estrés osmótico (NaCl) y oxidativo (H₂O₂ y Menadiona). Las cepas W303, *bcy1*Δ, *tpk1*^{dead}, *tpk2*^{dead} fueron crecidas en YPGlu hasta fase exponencial, se las sometió tanto a estrés osmótico 0,4M NaCl, oxidativo 50 μM Menadiona y 0,4mM H₂O₂ durante 60 minutos. Se tomaron alícuotas en los tiempos indicados y se realizó ChIP-RealTimePCR según se describe en Materiales y Métodos. La figura sólo muestra la región génica perteneciente a ALD6, ya que para las 5 regiones analizadas los resultados fueron similares (datos no mostrados).

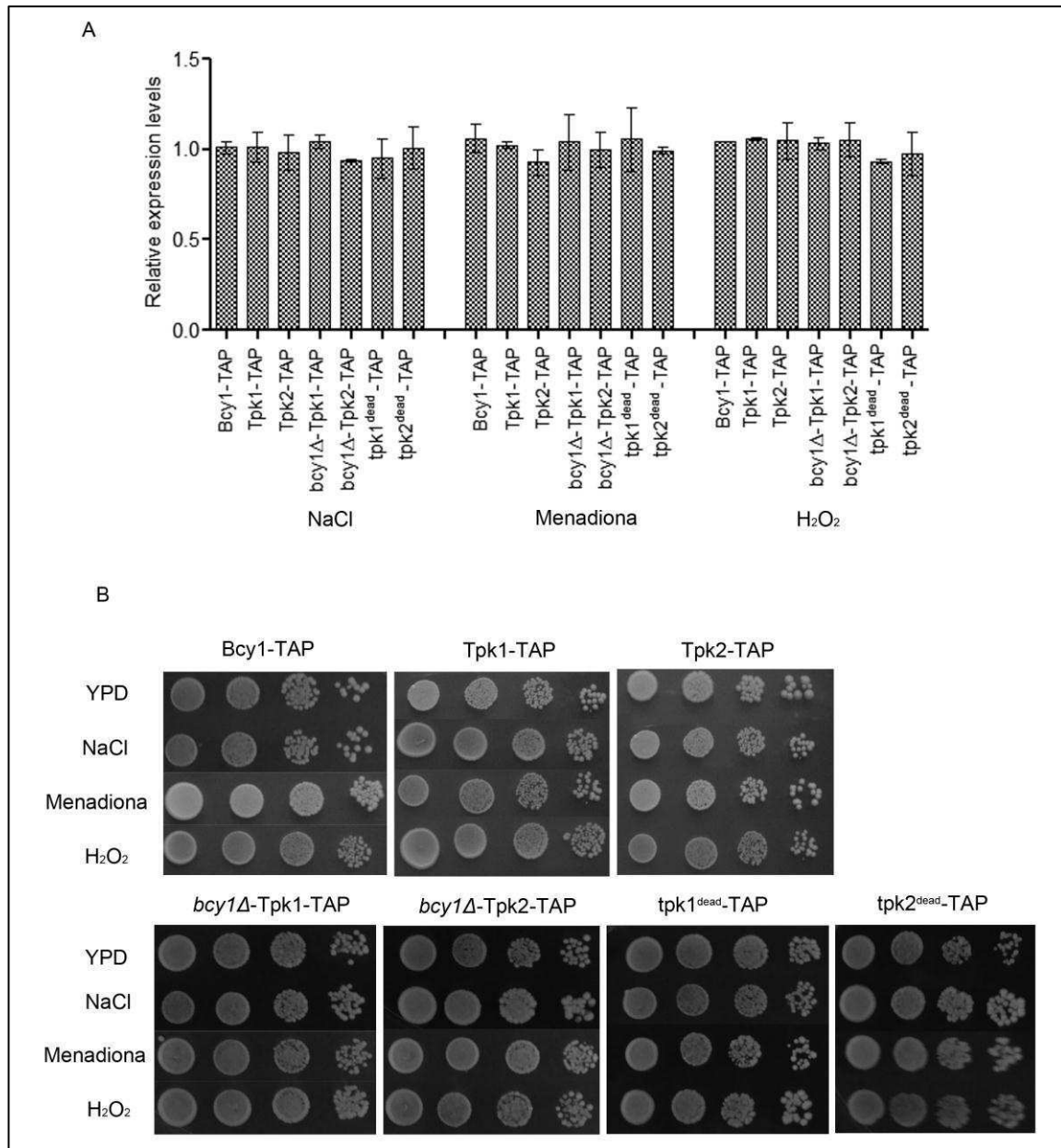


Figura S2. Niveles de expresión y viabilidad de las subunidades de PKA en respuesta a estrés. (A) Extractos crudos de las cepas indicadas se prepararon según materiales y métodos y se sometieron a SDS / PAGE Western Blot. Los niveles de proteína de Bcy1, Tpk1, Tpk2, *bcy1*Δ-Tpk1, *bcy1*Δ-Tpk2, *tpk1*^{dead} y *tpk2*^{dead} (expresadas a partir de su localización cromosómica, excepto *Tpk1*^{dead} y *Tpk2*^{dead} a partir de plásmido) se determinaron utilizando un anticuerpo anti-TAP. El histograma muestra la cuantificación densitométrica de la señal de TAP con relación a la cantidad total de proteína cargada. Los niveles de cada proteína detectados en las diferentes cepas para cada condición se expresaron relativos a los niveles de expresión en condiciones normales (células exponencial glucosa pre estímulo). (B) Las cepas que expresan Bcy1-TAP, Tpk1-TAP, Tpk2-TAP, *bcy1*Δ-Tpk1-TAP, *bcy1*Δ-Tpk2-TAP, *tpk1*^{dead}-TAP y *tpk2*^{dead}-TAP fueron crecidas en YPGlu hasta fase exponencial a 30°C y tratadas durante 40 minutos con 0.4M de NaCl, 50μM de menadiona y 0.4mM de H₂O₂. La viabilidad celular fue verificada mediante un ensayo de spot assay.

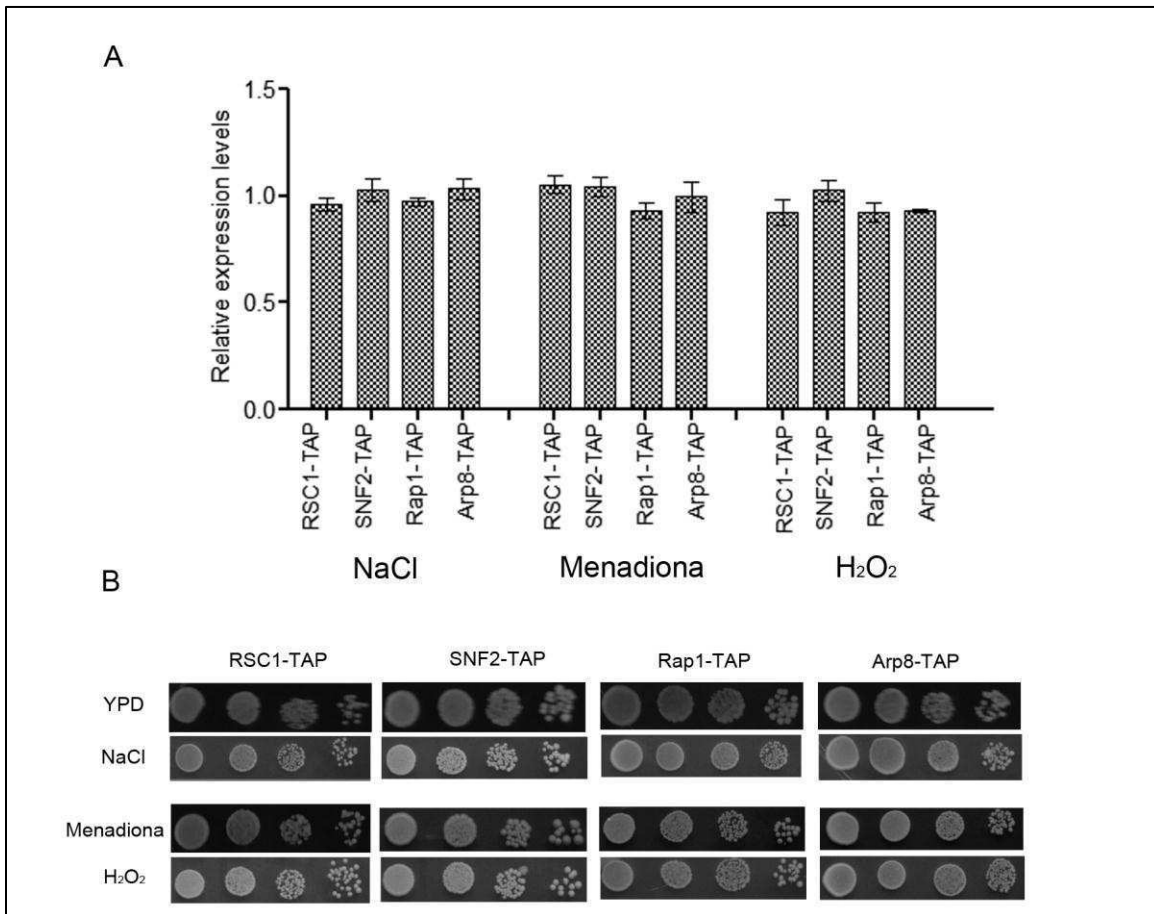


Figura S3. Niveles de expresión y viabilidad de las subunidades de PKA en respuesta a estrés. (A) Extractos crudos de las cepas indicadas se prepararon según materiales y métodos y se sometieron a SDS / PAGE Western Blot. Los niveles de proteína de RSC1, SNF2, Rap1 y Arp8 (expresadas a partir de su localización cromosómica) se determinaron utilizando un anticuerpo anti-TAP. El histograma muestra la cuantificación densitométrica de la señal de TAP con relación a la cantidad total de proteína cargada. Los niveles de cada proteína detectados en las diferentes cepas para cada condición se expresaron relativos a los niveles de expresión en condiciones normales (células exponencial glucosa pre estímulo). (B) Las cepas que expresan RSC1-TAP, SNF2-TAP, Rap1-TAP y Arp8-TAP fueron crecidas en YPGlu hasta fase exponencial a 30°C y tratadas durante 40 minutos con 0.4M de NaCl, 50µM de menadiona y 0.4mM de H₂O₂. La viabilidad celular fue verificada mediante un ensayo de spot assay.

Capítulo II:

Mecanismo de importación nuclear y localización subcelular de la PKA en respuesta al estrés.

INTRODUCCIÓN.

En la naturaleza, tanto los organismos eucariotas como procariotas tienen la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones ambientales. La respuesta a un cambio en el medio ambiente es coordinada por vías de transducción de señales. Dichas vías de transducción de señales involucran proteínas quinasas las cuales fosforilan proteínas blanco. De esta manera la localización subcelular es uno de los mecanismos involucrados en la regulación de la especificidad de sustrato. La localización de una proteína quinasa y su sustrato en una región subcelular determinada permitiría la fosforilación específica de ciertos sustratos debido al aumento de la concentración local de los reactivos y simultáneamente limitando el número de sustratos a los cuales la quinasa tiene acceso (Ubersax & Ferrell et al, 2007). En la actualidad existen evidencias que una misma proteína quinasa, que se distribuye dinámicamente entre citoplasma y núcleo puede regular la expresión de diferentes clases de genes blanco tanto por mecanismos de señalización nucleares como citoplasmáticos (Li et al, 2006).

Las AKAPs (*A-kinase anchoring proteins*) localizan a la PKA cerca de sustratos específicos y ensamblan complejos de señalización multi-proteicos que incluyen fosfatasas y fosfodiesterasas, las cuales controlan aspectos temporales de la regulación de la vía de señalización por cAMP (Michel & Scott, 2002; Tasken & Aandahl, 2004). Producto del incremento del cAMP, isoformas específicas de moléculas de holoenzimas se disocian (Martin et al, 2007) y las subunidades catalíticas libres translocan dentro del núcleo por difusión pasiva (Harootunian et al, 1993). Sin embargo, se ha descrito la existencia de holoenzima PKA en el núcleo en células de mamíferos (Meoli et al, 2008; Zippin et al, 2004; Sample et al, 2012). Se ha demostrado que el cAMP generado en la membrana plasmática no activaría el pool nuclear de holoenzima PKA y se ha sugerido que complejos de señalización de la vía cAMP-PKA en el núcleo controlarían las concentraciones locales de cAMP y la actividad de la PKA nuclear (Sample et al, 2012). A diferencia de la entrada al núcleo, la exportación nuclear de las subunidades catalíticas depende de mecanismos de transporte activo. La interacción de estas subunidades con un inhibidor de PKA (PKI), promueve la inactivación y exportación nuclear de las subunidades catalíticas (Fantozzi et al, 1994; Wen et al, 1994). También se ha sugerido que la interacción con la proteína de interacción a PKA (AKIP) retendría a las subunidades catalíticas en el núcleo (Sastri et al, 2005).

En *Saccharomyces cerevisiae* se ha descrito que la localización núcleo-citoplasmática de la PKA en levaduras está regulada por la fuente de carbono, disponibilidad de

nutrientes y estrés térmico. En presencia de glucosa Bcy1 se localiza en el núcleo, mientras que en presencia de fuente de carbono no fermentable, en la fase estacionaria de crecimiento o estrés térmico su distribución es núcleo-citoplasmática (Griffioen et al, 2000). La acumulación citoplasmática de Bcy1 depende de la interacción con la proteína Zds1 (Griffioen et al, 2001). En presencia de glucosa, Tpk2 se encuentra predominantemente nuclear, mientras que Tpk1 y Tpk3 presentan una localización núcleo-citoplasmática, mientras que en presencia de una fuente de carbono no fermentable como glicerol o en fase estacionaria, las Tpk se distribuyen homogéneamente entre el núcleo y el citoplasma. Se ha descrito que en fase estacionaria o hambreado de glucosa, Tpk2 y Tpk3 se acumulan en gránulos de estrés (SGs) y *Processing bodies* (PBs) (Tudisca et al, 2010, Tudisca et al, 2012). La localización nuclear de Tpk1 depende de la interacción con Bcy1 (Griffioen et al, 2000; Schmelzle et al, 2003; Tudisca et al, 2012), mientras que Tpk2 presentaría localización nuclear independiente de cAMP (Pan X and Heitman, 2002; Bharucha et al, 2008).

El transporte de macromoléculas entre el núcleo y el citoplasma es posible gracias a los complejos de poro nuclear (NPCs), que abarcan la doble membrana de la envoltura nuclear (NE). El NPC está compuesto por 30 de polipéptidos diferentes llamados nucleoporinas. Un gran número de nucleoporinas contienen secuencias repetitivas de fenilalanina-glicina que forman un filtro selectivo para el traspaso de las moléculas a través del poro nuclear tanto por transporte activo como pasivo, haciéndolo impermeable a las proteínas más grandes de ~ 40 kDa (Cardarelli et al, 2010).

Muchas de las proteínas que se transportan dentro o fuera del núcleo requieren un aparato de transporte especializado que incluye miembros de la familia importina β (Wente et al, 2011). En *Saccharomyces cerevisiae*, existen 10 importinas y 4 exportinas. Estos receptores solubles interactúan con las señales específicas de importación o exportación presentes en sus proteínas cargos, con los componentes del NPC y con RanGTP (Hahn et al, 2008). La vía de importación de mayor prevalencia esta mediada por Kap95 (homóloga a los mamíferos importina β 1) y la otra Kap123. Kap95 se une a una proteína adaptadora Kap60 (homóloga a importina α en mamíferos) la cual a su vez se une al NLS de la proteína a ser transportada. Cse1, otra β -carioferina implicada en la ruta clásica de importación, es necesaria para el reciclaje de Kap60 al citoplasma una vez que el complejo Kap95-Kap60-cargo se ha disociado en el núcleo. Otra β -carioferina que participa en la importación nuclear es Kap123, sin embargo su delección no afecto la

importación general de proteínas, indicando una redundancia funcional entre las diferentes carioferinas (Martínez-Bono et al, 2010).

El mecanismo por el cual las subunidades de la PKA de *S.cerevisiae* son exportadas e importadas al núcleo aun no se conoce. El análisis *in silico* de las secuencias primarias de Tpk1, Tpk2, Tpk3 y Bcy1 empleando el programa PSORT (permite buscar NLS clásicas monopartita PKKKRKV o bipartita AVKRPAATKKAGQAKKKKLD) no reveló la presencia de una señal de localización nuclear canónica. Sin embargo, se conocen varias secuencias de localización no clásicas las cuales deben ser definidas experimentalmente (Fries et al, 2007; Marfori et al, 2011).

Dado el rol de la PKA sobre la expresión génica por asociación física a la cromatina en respuesta al estrés osmótico y oxidativo (Resultados Capítulo I) fenómeno que da cuenta del rol de la PKA en el compartimento nuclear, hemos estudiado el mecanismo de importación nuclear en respuesta a dichas condiciones de estrés.

En este capítulo hemos observado que: Tpk2 y Bcy1 se localizan en el núcleo durante el crecimiento exponencial en glucosa y no cambian su distribución subcelular en respuesta a estrés oxidativo y osmótico; Diferencialmente, Tpk1 y Tpk3 se acumulan en el núcleo en repuesta a estrés oxidativo y osmótico. Tpk1 tiene una cinética de acumulación nuclear más rápida en respuesta a estrés osmótico *versus* estrés oxidativo. Por otro lado, hemos caracterizado el mecanismo de transporte nuclear de las subunidades de PKA. La acumulación nuclear de Tpk1, Tpk2, Tpk3 y Bcy1 es dependiente de ATP lo que sugiere un mecanismo de transporte activo. Hemos determinamos que la acumulación nuclear de Bcy1 depende de la carioferina Kap95, mientras que Tpk1 sería dependiente de Kap123 y Kap114, empleando la misma vía para su acumulación nuclear en respuesta al estrés osmótico y oxidativo. Por último, Tpk2 emplearía la carioferina Kap108; en crecimiento exponencial glucosa y frente al estrés oxidativo; sin embargo bajo estrés osmótico podría utilizar una vía de transporte alternativo para su acumulación nuclear. Finalmente, determinamos que la acumulación nuclear de Tpk1 y Tpk2 es necesaria para su asociación a la cromatina.

RESULTADOS

Localización de las subunidades de la PKA en respuesta a estrés osmótico y oxidativo.

Con el objetivo de establecer si la acumulación nuclear de cada subunidad de la PKA regula su función nuclear sobre la transcripción génica, analizamos la localización núcleo-citoplasmática de las diferentes subunidades de PKA en respuesta a estrés osmótico (NaCl) y a estrés oxidativo (H₂O₂). Este análisis no lo pudimos llevar a cabo con el agente estresante menadiona, ya que este emite fluorescencia cuando es excitado con la longitud de onda correspondiente a la luz UV o luz azul. Se analizó la localización de Tpk1-GFP, Tpk2-GFP, Tpk3-GFP y Bcy1-GFP etiquetadas en su locus cromosómico en células crecidas hasta fase exponencial en medio rico con glucosa (YPGlu) y a diferentes tiempos post estímulo con NaCl 0,4 M o H₂O₂ 0.4mM. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. La localización subcelular se cuantificó como se indica en materiales y métodos.

Los niveles de expresión de las subunidades de la PKA no variaron por la exposición a los diferentes tipos de estrés oxidativo y osmótico (Figura S4A). Ensayos de spot assay revelaron que la viabilidad celular no resultó afectada por los tratamientos (Figura S4B). El tratamiento con cicloheximida no mostró alteraciones en los patrones de localización obtenidos por estrés (resultados no mostrados).

Como se ha descrito previamente (Tudisca et al, 2010), en células creciendo en fase exponencial glucosa Bcy1 y Tpk2 mostraron un patrón de localización predominantemente nuclear (N>C 80 %) mientras que Tpk1 y Tpk3 se distribuyeron en núcleo y citoplasma (Figura 22, tiempo 0 min). En respuesta al estrés oxidativo evocado por el agregado de H₂O₂, Tpk1-GFP y Tpk3-GFP se acumulan en el núcleo (70% y 65% N>C respectivamente). La cinética de acumulación resultó diferente, Tpk3 alcanza el máximo de acumulación nuclear a los 10 min. mientras que Tpk1 se acumula lentamente alcanzando a los 20 min de estímulo el porcentaje máximo de localización nuclear. La localización nuclear de Tpk2 y Bcy1 no se vio afectada por el estrés oxidativo (Figura 22).

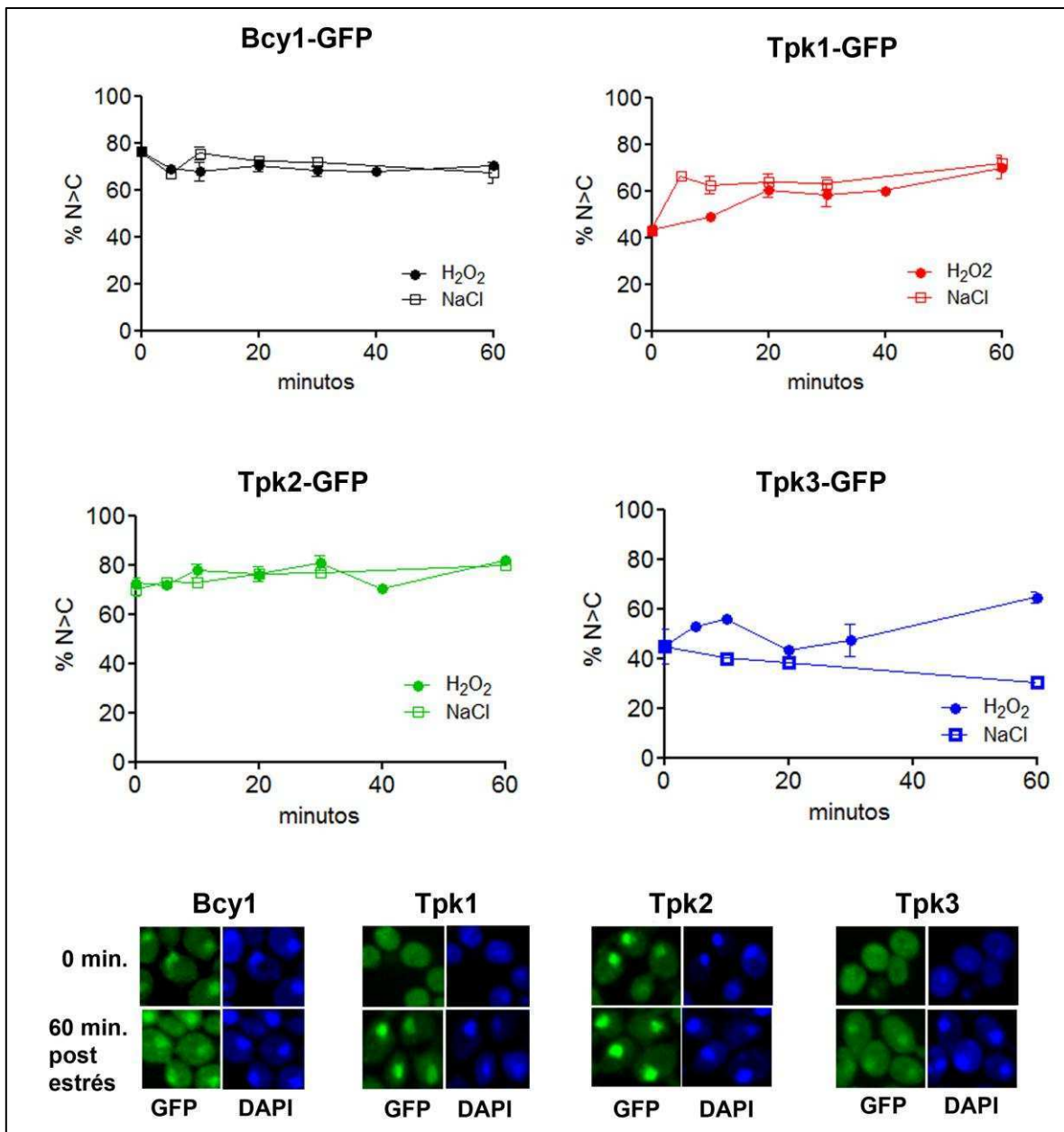


Figura 22. Cinética de localización de las subunidades de la PKA en respuesta a estrés osmótico y oxidativo. Células que expresan Bcy1-GFP, Tpk1-GFP, Tpk2-GFP o Tpk3-GFP fueron crecidas hasta fase exponencial en YPGlu y posteriormente estresadas con 0.4M de NaCl y 0.4mM de H₂O₂. Se tomaron alícuotas a los tiempos indicados durante 60 minutos. Las células fueron fijadas con formaldehído, los núcleos teñidos con DAPI y su localización analizada mediante microscopía de fluorescencia. El gráfico muestra el porcentaje de células con localización nuclear. Se contaron 100 células para cada determinación. Los valores representan la media \pm SD de tres experimentos independientes. B) imágenes representativas pre estímulo (0 min.) y 60 min post estímulo con NaCl. Imágenes similares fueron observadas para el estrés con H₂O₂, resultado no mostrado.

Frente a un estrés osmótico evocado por el agregado de NaCl observamos que la localización de Bcy1, Tpk2 y Tpk3 no cambian hasta 60 minutos de estímulo. Diferencialmente, Tpk1-GFP transloca al núcleo rápidamente ya que a los 5 min pos estímulo alcanza la acumulación nuclear máxima (65% N>C). Cabe notar que la cinética de acumulación de Tpk1 en respuesta a los dos estímulos analizados resultó diferente, siendo más rápida para NaCl.

En conjunto, estos resultados sugieren que en respuesta a diferentes tipos de estrés- NaCl o agua oxigenada- la acumulación nuclear de las subunidades catalíticas de la PKA presenta una respuesta dinámica diferente sugiriendo una función específica para la adaptación celular al estrés.

Caracterización del mecanismo de la importación nuclear de las subunidades de la PKA.

En primer lugar estudiamos si el transporte de las subunidades de PKA es dependiente de energía, observación que sugeriría un transporte activo al núcleo.

Células que expresan Bcy1-GFP, Tpk1-GFP, Tpk2-GFP y Tpk3-GFP crecidas hasta fase exponencial en un medio con glucosa como fuente de carbono fueron recolectadas e incubadas en un medio sin glucosa con azida sódica y 2-deoxy-D-glucosa durante 40 minutos a 30°C. Se tomaron alícuotas en los tiempos indicados en la Figura 23. El análogo de la glucosa, 2-deoxy-D-glucosa posee un grupo hidroxilo en la posición 2 reemplazado por un hidrogeno, esto hace que no pueda ingresar en glucolisis, impidiendo la generación de ATP (Franzsoff & Cirillo, 1982). La azida sódica actúa inhibiendo la citocromo c oxidasa. Este compuesto se enlaza irreversiblemente al cofactor hemo interrumpiendo la cadena de transporte de electrones y por ende se interrumpe también la generación de energía (Duncan & Mackler, 1966). Luego para restituir el contenido energético celular y determinar la cinética de re-importación, se reemplazó el medio con glucosa y se determinó la localización subcelular de las subunidades de la PKA por microscopía de fluorescencia.

En la Figura 23 se observa que la localización núcleo-citoplasma de Bcy1 llega a un equilibrio a los 40 minutos de depleción energética. En cambio, la importación nuclear de Tpk1, Tpk2 y Tpk3 luego de 30 min en condiciones de bajo contenido de ATP. Cabe notar que las tres Tpk3 mostraron una localización en gránulos citoplasmáticos. Estos gránulos citoplasmáticos podrían ser gránulos de procesamiento de mRNA (PBs) ya que se ha

descrito que la depleción de energía por agregado de 2-deoxy-glucosa más azida sódica promueve la formación de PB (Grousl et al, 2009) y que Tpk2 y Tpk3 se asocian a PBs bajo depleción de glucosa (Tudisca et al, 2012). Al re-establecer la energía celular por incubación en medio YPGlu, observamos que Bcy1 se acumula en el núcleo a los 5 min. Sin embargo Tpk1, Tpk2 y Tpk3 vuelven a ser reimportadas a los 30 min.

Estos resultados indican que el mecanismo de transporte nuclear de las subunidades de la PKA es dependiente de energía, lo que sugiere un transporte activo. El siguiente objetivo es determinar cuáles son las carioferinas involucradas en la importación nuclear de las subunidades de PKA.

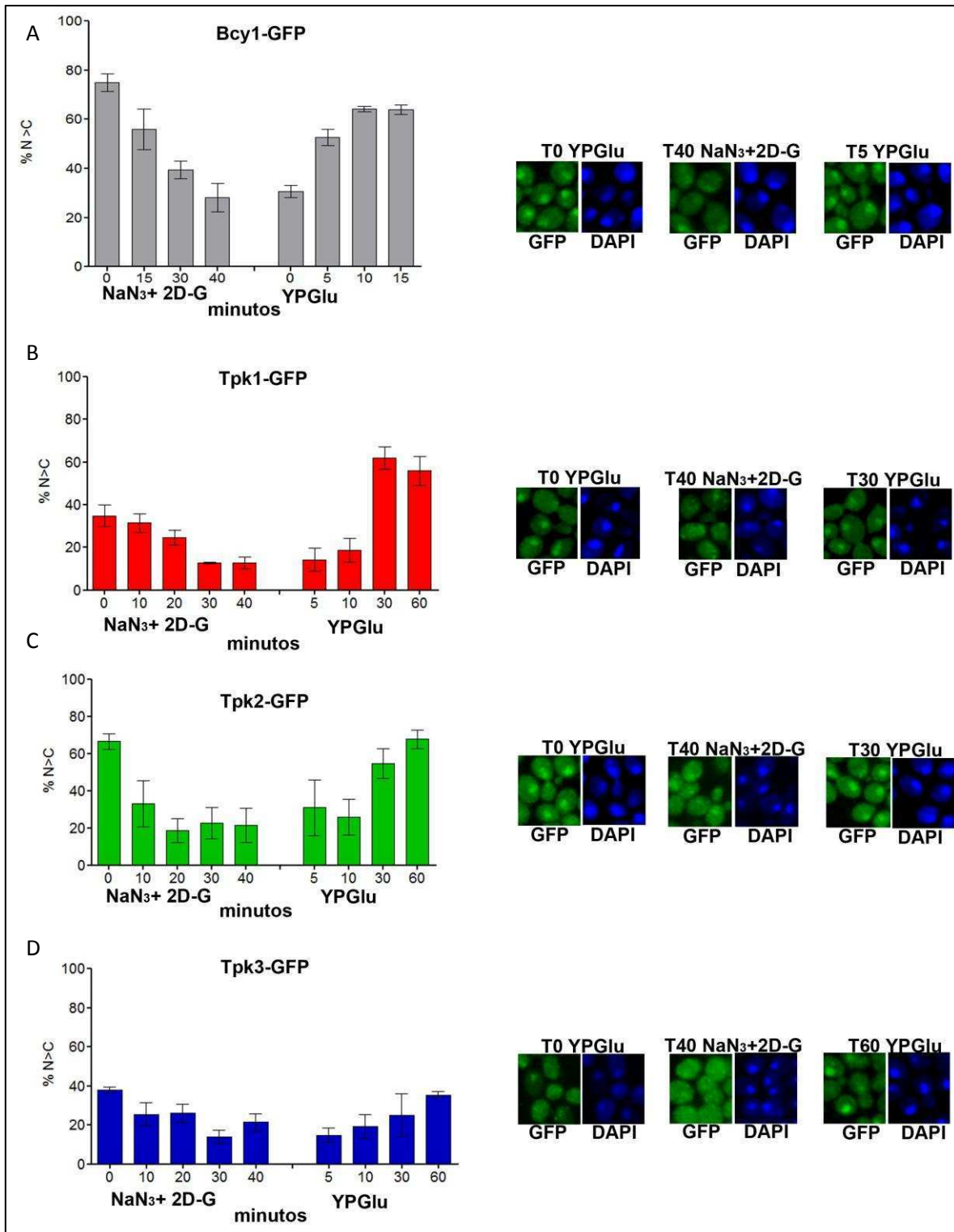


Figura 23. El transporte núcleo-citoplasmático de las subunidades de la PKA es dependiente de energía. Células crecidas a fase exponencial en YPGlu a 30°C fueron recolectadas, lavadas y resuspendidas en un medio libre de glucosa con 10mM de azida sódica y 10mM de 2-deoxy-d-glucosa. Se tomaron alícuotas a cada tiempo indicado y se determinó la proporción de células con fluorescencia N>C. Para la re-importación las células fueron recolectadas, lavadas y resuspendidas en medio YPGlu (con 2% de glucosa). Cada tiempo representa la media de tres experimentos independientes n= 300.

Para caracterizar que miembros de la familia de importinas estarían involucrados en la importación nuclear de las subunidades de la PKA se realizaron siete cepas defectivas en una o varias importinas/exportinas (Tabla suplementaria 1) las cuales expresaron Bcy1-GFP, Tpk1-GFP o Tpk2-GFP desde su locus cromosómico. Los niveles de expresión de las subunidades de la PKA no variaron en las diferentes cepas mutantes de carioferinas (Figura S4).

El empleo de la cepa defectiva en KAP95 nos permite estudiar la vía clásica de importación nuclear, donde el complejo sustrato-Kap60-Kap95 es necesario para la importación nuclear (Wente et al, 2011). Esta carioferina tiene un rol fundamental en la fisiología celular ya que está involucrada tanto en el progreso del ciclo celular como en la vía de integridad de pared celular (CWI) (Taberner et al, 2010; Martinez-Bono et al, 2010). También participa en el ensamblaje del poro nuclear y la síntesis de fosfatidilcolina (Ryan et al, 2007; MacKinnon et al, 2009).

Las demás carioferinas son redundantes en su función y pueden funcionar tanto como importinas o exportinas: Kap108, Kap120, Kap123, Kap114 (Leslie et al, 2004; Bakhrat et al, 2006; Caesar et al, 2006). La Kap114 ha sido descrita tanto para el transporte como para el ensamblaje de histonas en los nucleosoma (Mosammaparast et al, 2005). En un estudio reciente muestran que la sumoilación de la Kap114 es requerida para su correcta función como importina (Rothenbusch et al, 2012). La Kap123 está implicada en la vía de integridad celular al igual que la Kap95 y tiene un rol fundamental en la estabilidad de los microtúbulos (Martinez-Bono et al, 2010). Recientemente se ha demostrado que se requiere de la actividad conjunta de Kap114 y Kap123 para la importación nuclear de una variante de histonas Htz1 (H2A.Z) (Straube et al, 2010). Por último la Kap108, se encarga del transporte de proteínas con sitios de unión a RNA y se ha demostrado que si estos sitios son alterados en su secuencia, las proteínas cambian su transportador Kap108 por otras carioferinas como la Kap121 por ejemplo (Chaves et al, 2011).

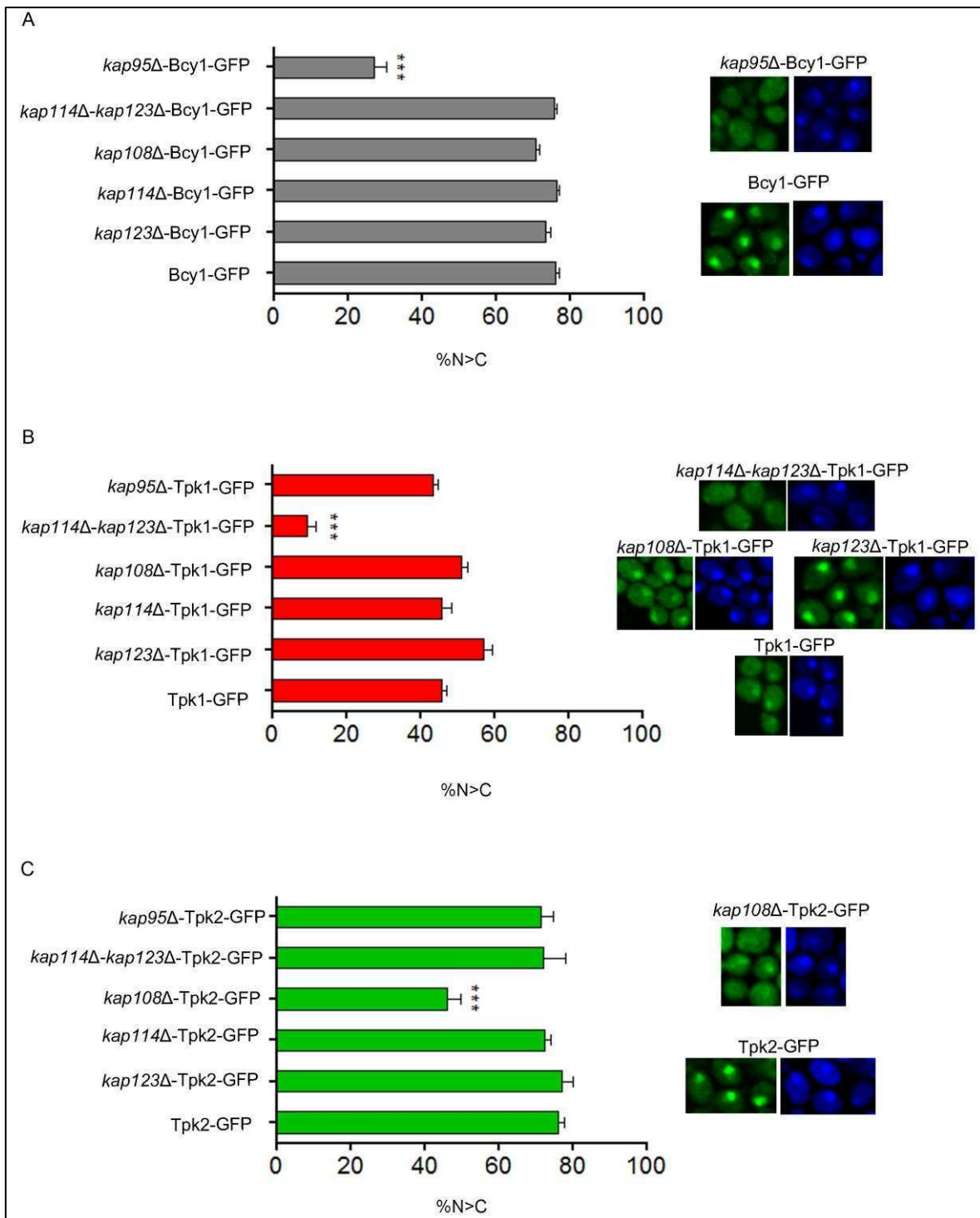


Figura 24. Estudio de las carioferinas involucradas en el transporte núcleo-citoplasmático de las subunidades de la PKA en YPGlu. Las cepas indicadas en los gráficos fueron crecidas hasta fase exponencial en YPGlu a 30°C. Las células fueron fijadas con formaldehído, los núcleos teñidos con DAPI y su localización analizada mediante microscopía de fluorescencia. El gráfico muestra el porcentaje de células con localización nuclear. Se contaron 100 células para cada determinación. Los valores representan la media \pm SD de tres experimentos independientes ($p < 0.005^{***}$).

Dado que la delección del gen KAP95 es letal empleamos la cepa JCY970. Esta cepa permite la represión transcripcional del gen tetO-KAP95 por la expresión del represor TetR en presencia de doxiciclina (Martinez-Bono, et al 2010).

La falta de expresión del gen KAP95 afecta la integridad de la pared celular y como consecuencia, aumenta la sensibilidad de la pared celular a concentraciones crecientes de zimoliasa, una enzima que degrada la pared de la levadura. Para verificar la represión transcripcional del gen KAP95 bajo nuestras condiciones experimentales, tratamos células JCY970 con doxiciclina por 4 horas (Martinez Bono et al, 2010) y ensayamos la sensibilidad a zimoliasa como se describe en materiales y métodos. La Figura S5 muestra que el tratamiento con doxiciclina durante 4 horas inhibió la expresión de Kap95 evidenciado por la disminución en la integridad de la pared celular.

Analizamos la localización subcelular de Bcy1-GFP en células defectivas para carioferinas (Figura 24, A). Bcy1-GFP no se acumuló en el núcleo sólo en la cepa JCY970, sugiriendo que la carioferina Kap95 estaría involucrada en el transporte nuclear de Bcy1.

Por otro lado, al analizar la localización nuclear de las subunidades catalíticas durante el crecimiento en glucosa observamos que Tpk1 emplearía las Kap114 y Kap123, ya que en ausencia de ambas se ve una disminución en la cantidad de células con Tpk1 localizada en el núcleo (Figura 24B). Diferencialmente, la subunidad catalítica Tpk2 mostró una localización en el citoplasma en la cepa *kap108Δ*, sugiriendo que esta carioferina sería en parte responsable de su importación nuclear (Figura 24C).

En conjunto estos resultados muestran que la subunidad regulatoria Bcy1 y cada subunidad catalítica Tpk1 y Tpk2 emplearían diferentes carioferinas para su importación nuclear.

En el Capítulo1 hemos descrito el rol de la PKA en el núcleo a través de la unión a la cromatina de genes blanco en respuesta a diferentes condiciones de estrés. En este capítulo la Figura 22 muestra que las subunidades Tpk pueden acumularse con una cinética diferente dependiendo del estímulo presente. Las Figura 23 y 24 muestran que el transporte de las subunidades de la PKA es activo y la acumulación nuclear de éstas en células creciendo en glucosa como fuente de carbono sería por diferentes carioferinas. La siguiente pregunta está dirigida a caracterizar que carioferinas están involucradas en la acumulación nuclear en respuesta al estrés.

Para esto se emplearon las cepas defectivas en una o varias importinas/exportinas que expresan Bcy1-GFP, Tpk1-GFP o Tpk2-GFP desde el locus cromosómico correspondiente y analizamos la cinética de localización subcelular de la subunidades en

respuesta al estrés osmótico y oxidativo. Las cepas fueron crecidas a fase exponencial en glucosa (T0) y luego fueron estresadas con 0.4M NaCl (osmótico) o 0.4mM H₂O₂ (oxidativo) durante 60 minutos. Se tomaron alícuotas a los tiempos y se determinó la localización nuclear de las proteínas por microscopía de fluorescencia como se describe en materiales y métodos (Figura 25).

Los niveles de expresión de las subunidades de la PKA resultaron constantes en las diferentes cepas y tratamientos realizados (Figura S4A). Ensayos de spot assay revelaron que la viabilidad celular de las diferentes cepas empleadas no resultó afectada por los tratamientos (Figura S4B). La excepción fueron las cepas mutantes *kap95Δ*-Bcy1-GFP, *kap95Δ*-Tpk1-GFP y *kap95Δ*-Tpk2-GFP, las cuales no sobrevivieron al estrés post tratamiento con doxiciclina, por lo que no fueron empleadas en este análisis (dato no mostrado).

Tpk1 mostró una distribución núcleo-citoplasmática en células creciendo exponencial en glucosa, donde Kap114-Kap123 serían las carioferinas encargadas de la acumulación nuclear de Tpk1 (Figura 24). En respuesta a estrés osmótico y oxidativo Tpk1 transloca al núcleo (Figura 25). En la Figura 25B se observa que las carioferinas Kap114/Kap123 serían las responsables de la acumulación de Tpk1 en el núcleo en repuesta al estrés, ya que, Tpk1 no se acumula en el núcleo en repuesta a estrés osmótico y oxidativo en la cepa *kap114Δkap123Δ* en comparación con la cepa WT.

La localización de Tpk2 en cepas *kap108Δ* presentó una acumulación nuclear menor, sugiriendo que esta carioferina sería responsable de la acumulación nuclear de Tpk2 (Figura 24). Sin embargo, bajo estrés osmótico Tpk2 (Figura 25) puede acumularse en el núcleo lentamente en respuesta a estrés, alcanzando el valor de la cepa salvaje a los 60 min. Estos resultados indicarían que Tpk2 emplearía carioferina/s alternativa/s para su acumulación nuclear en respuesta al estrés oxidativo y osmótico.

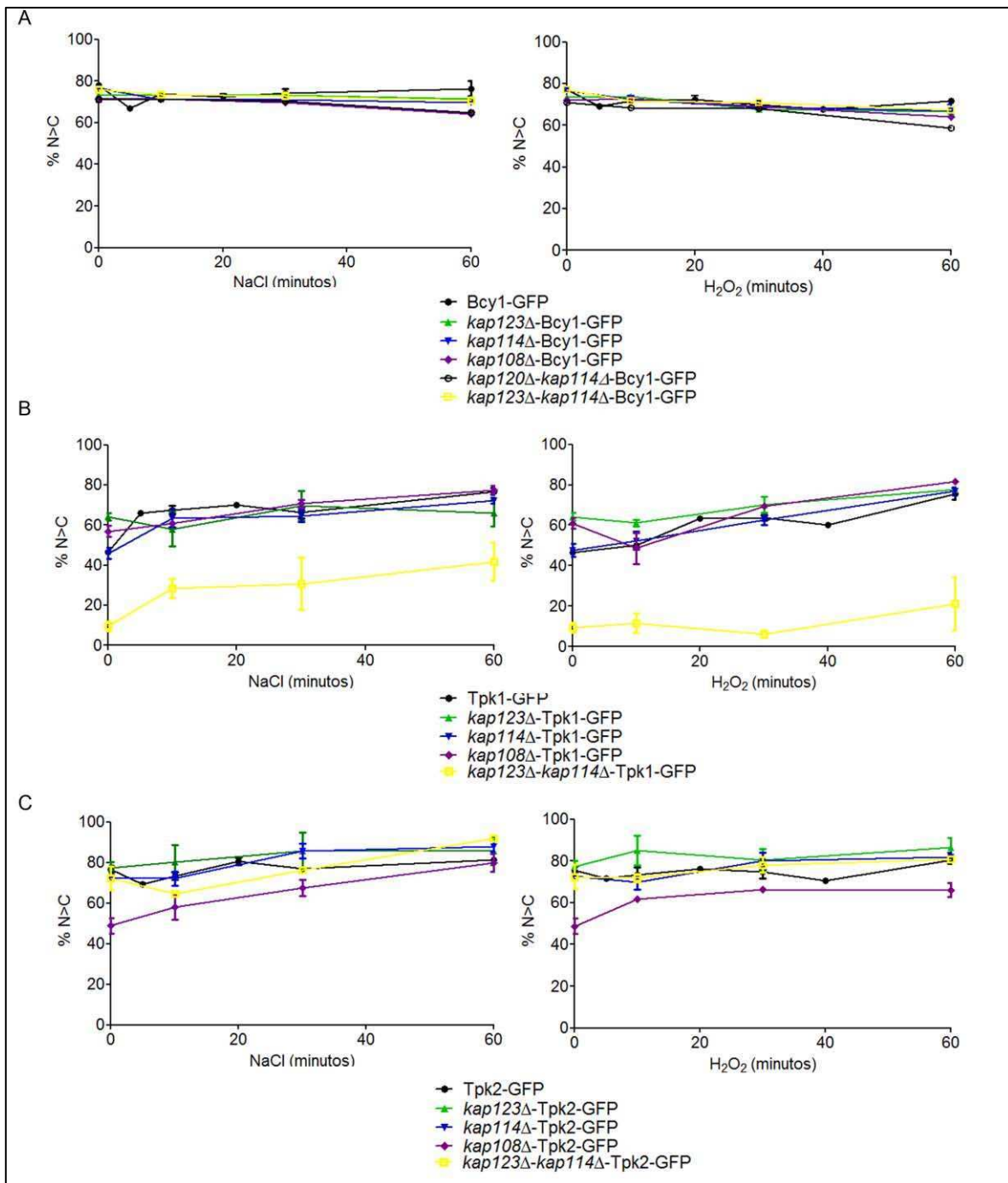


Figura 25. Estudio de las carioferinas involucradas en el transporte núcleo-citoplasmático de las subunidades de la PKA en estrés osmótico y oxidativo. Células crecidas a fase exponencial en YPGlu a 30°C fueron sometidas a estrés osmótico con 0.4M de NaCl y a estrés oxidativo con 0.4mM de H₂O₂. Se tomaron alícuotas en los tiempos indicados en la figura y las células fueron fijadas con formaldehído, los núcleos teñidos con DAPI y su localización analizada mediante microscopía de fluorescencia. El gráfico muestra el porcentaje de células con localización nuclear. Se contaron 100 células para cada determinación. Los valores representan la media ± SD de tres experimentos independientes.

Por último estudiamos la asociación física de las subunidades de PKA a la cromatina en cepas mutantes de las correspondientes carioferinas caracterizadas anteriormente en función de estrés osmótico. Cepas *kap114Δkap123Δ* y *kap108Δ* que expresan Tpk1-TAP o Tpk2-TAP respectivamente fueron crecidas hasta fase exponencial en medio YPGlu y estresadas por el agregado de NaCl. A diferentes tiempos se tomaron alícuotas y se determinó la asociación de Tpk1 y de Tpk2 a la cromatina para la región codificante del gen ALD6 (ver capítulo 1, Figura 15).

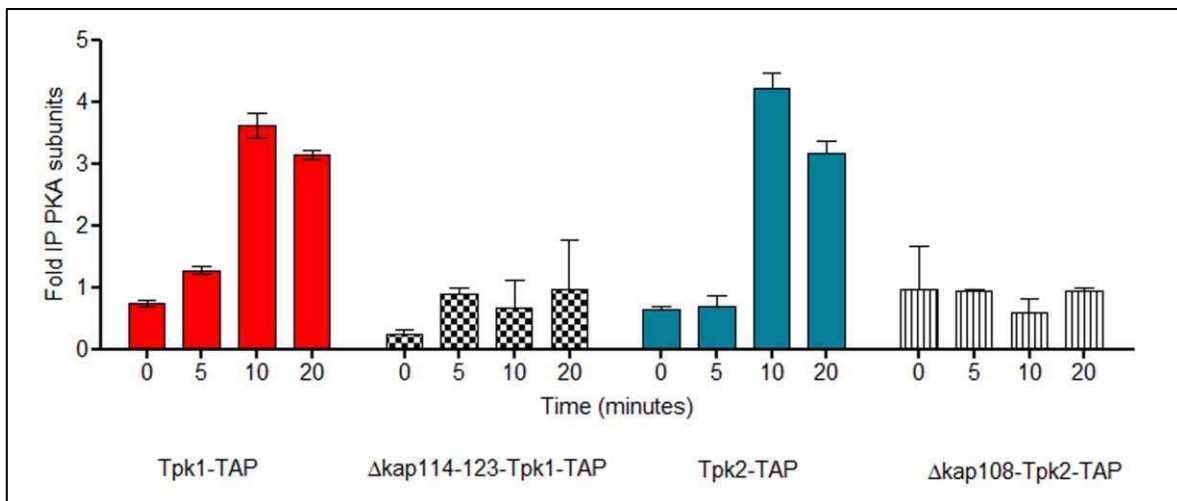


Figura 26. Asociación de las subunidades de la PKA a la región ORF del gen ALD6 en condiciones de estrés osmótico (NaCl) en cepas defectivas para las carioferinas que transportan Tpk1 y Tpk2. Las cepas Tpk1-TAP, *kap114-123Δ*-Tpk1-TAP, Tpk2-TAP, *kap108Δ*-Tpk2-TAP, fueron crecidas en YPGlu hasta fase exponencial, se las sometió tanto a estrés osmótico 0,4M NaCl durante 20 minutos. Se tomaron alícuotas en los tiempos señalados en el gráfico y se realizó ChIP-RealTimePCR para analizar la asociación de la PKA a la cromatina según materiales y métodos.

En la Figura 26 se observa que la falta de la carioferina específica para cada subunidad catalítica Tpk afecta su asociación a la cromatina. En estrés osmótico Tpk1 se asocia a la región ORF del gen ALD6 en respuesta al estrés osmótico (Figura 15), sin embargo en la cepa *kap114Δkap123Δ* no se observó interacción Tpk1-DNA (Figura 26). Un comportamiento similar se observó para Tpk2 en la cepa *kap108Δ* versus la cepa salvaje. Teniendo en cuenta que la delección de las correspondientes carioferinas disminuye la acumulación nuclear de Tpk1 y Tpk2, éstos resultados sugieren que la localización nuclear de las subunidades catalíticas sería necesaria para su asociación a la cromatina.

DISCUSIÓN

La separación espacial de la transcripción y traducción en eucariotas no solo permite controlar la expresión génica, sino que también requiere de un transporte selectivo de moléculas entre los compartimientos nucleares y citoplasmáticos. Este transporte selectivo permite mantener una composición específica de cada compartimiento y ofrece la posibilidad de regular temporalmente diferentes procesos (Murray et al, 2007). Básicamente, la importación nuclear es realizada por β -carioferinas, las cuales pueden ser importinas y/o exportinas. En *Saccharomyces cerevisiae* muchas proteínas utilizan la importina β Kap95 la cual emplea la importina α Kap60 como un adaptador, aunque algunas son importadas por otras importinas, tales como la transportina Kap104.

Hasta ahora no se había caracterizado el mecanismo que emplea la PKA para su transporte a través de la membrana nuclear. En este capítulo describimos que el transporte activo de las subunidades catalíticas Tpk1, Tpk2 y la subunidad regulatoria Bcy1 sería a través de diferentes carioferinas (Figura 24).

Tanto las subunidades catalíticas como la regulatoria no presentan una secuencia del tipo NLS mono o bipartita clásica. Sin embargo, se han propuesto distintas clases de NLS típicos a partir de bases de datos de proteínas de ratón y levadura (Fries et al, 2007; Marfori et al, 2011). El análisis por homología de la secuencias primarias de las subunidades de PKA (Figura 27) permitió predecir 2 secuencias con motivos: KK/RR/K y R/KxxL(x)nV/YxxV/IK/R en Bcy1 y una sola secuencia del tipo R/KxxL(x)nV/YxxV/IK/R una para cada una de las Tpk. La caracterización de estas secuencias como potenciales NLS debe ser analizado experimentalmente.

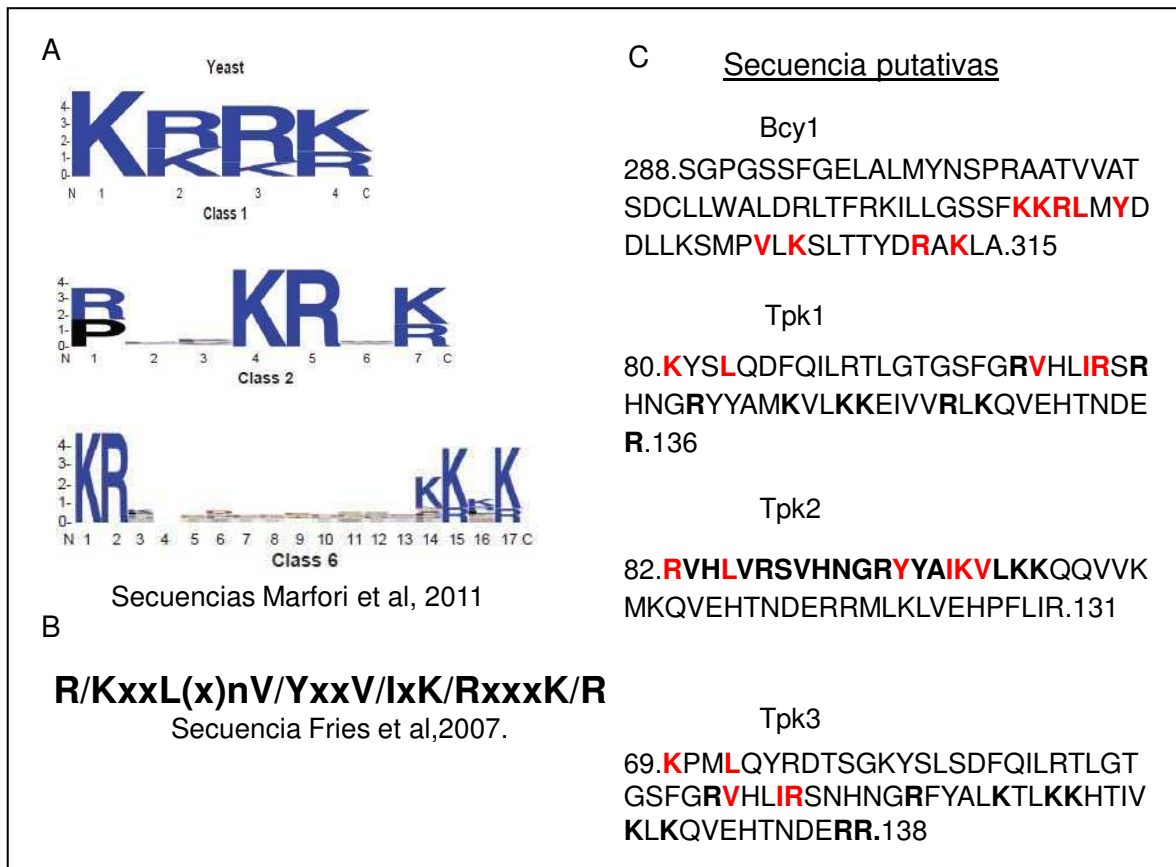


Figura 27. Búsqueda de NLS en las subunidades de PKA por homología de secuencia. A) adaptado de Marfori et al, 2011. B) adaptado de Fries et al, 2007. C) Se muestran parte de las secuencias aminoacídicas de cada subunidad de la PKA, indicando a posición aminoacídica. Las letras en rojo y negro muestran homologías con las secuencias NLS descritas por Marfori et al, 2011 y Fries et al, 2007.

La localización nuclear de la PKA en *S. cerevisiae* depende de las condiciones ambientales como la fuente de carbono y el estrés. Aún no se han descrito AKAPs en *S. cerevisiae* sin embargo la localización citoplasmática de Bcy1 depende de su extremo aminoterminal y es regulada por la proteína Zds1 (Griffioen & Thevelein, 2002). Por otro lado se sabe que la localización nuclear de Tpk1 y no Tpk2 depende de la asociación con Bcy1, por lo que cada Tpk parecería tener un mecanismo de retención nuclear diferente (Griffioen et al, 2001; Tudisca et al, 2010).

Nuestros experimentos muestran que cada subunidad de la PKA podría ser transportada al núcleo vía carioferinas diferentes lo cual permitiría un mecanismo de regulación del transporte núcleo-citoplasmático específico para cada subunidad. En este sentido, los resultados mostrados en la Figura 22, sugieren que la localización núcleo-citoplasmática de las subunidades de la PKA presenta una respuesta dinámica diferente en respuesta a

diferentes tipos de estrés. Tpk1 muestra una cinética más rápida de acumulación nuclear en respuesta a estrés osmótico *versus* oxidativo (Figura 22). Diferencialmente, Tpk3 se acumuló en el núcleo sólo en respuesta a estrés oxidativo. Tpk2 y Bcy1 no variaron su localización subcelular en respuesta a estrés. Los resultados obtenidos en la Figura 25 indican que, bajo estrés osmótico y oxidativo Tpk1 emplearía a las carioferinas Kap114/Kap123 para su acumulación nuclear en respuesta a estrés oxidativo y osmótico. Sin embargo Tpk2, se acumula en el núcleo en respuesta a estrés oxidativo y osmótico en la cepa kap108 Δ sugiriendo que en respuesta al estrés emplearía una vía alternativa para su importación al núcleo.

La acumulación nuclear de proteínas quinasas parece no ser un mecanismo conservado para la asociación de éstas a la cromatina. Por ejemplo, la acumulación nuclear por el agregado de una señal de localización nuclear a Hog1 no fue suficiente para incrementar su asociación a la cromatina (Alepez et al, 2001). Por otro lado, la localización nuclear de Tor1 es crítica para la síntesis de 35S rRNA pero no para la expresión de genes codificantes para transportadores de aminoácidos y proteínas ribosomales (Li et al, 2006). A diferencia, los resultados presentados aquí indican que en respuesta a estrés osmótico u oxidativo Tpk1 se acumula en el núcleo vía Kap123/Kap114 mientras que Tpk2 y Bcy1 mantienen una localización nuclear vía Kap108 y Kap95 respectivamente. La acumulación nuclear de Tpk1 y Tpk2 sería un requisito para su participación en la regulación de la transcripción vía asociación a la cromatina (Figura 24).

La acumulación nuclear de Bcy1 afectaría la cinética de unión de las Tpk's a la cromatina (Capítulo I).

Si bien no ha sido demostrado experimentalmente, se hipotetiza que el cAMP puede entrar al núcleo ya que se ha observado liberación de Tpk's vía cAMP desde holoenzima PKA localizada en el núcleo (Griffioen et al, 2000).

Sin embargo, estudios de localización han demostrado que Ras, Ira y Cdc25 así como algunos de sus efectores río abajo, por ejemplo, Cyr1 no sólo se encuentran localizados en membrana plasmática sino también se hallaron asociados en compartimientos como retículo endoplasmático, mitocondria y núcleo (Belotti et al, 2011; Dong & Bai, 2011; Belotti et al, 2012; Broggi et al, 2013).

La presencia co-temporal de la subunidad regulatoria y catalíticas en sitios donde la actividad catalítica se presupone activa es pausable teniendo en cuenta el rol del sustrato en el proceso de activación de la PKA. Se ha demostrado previamente que tanto para la PKA tipo I de mamíferos (Vigil et al, 2004; Viste et al, 2005) como para la PKA de *S.*

cerevisiae (Galello et al, 2010) el sustrato puede favorecer la disociación de la holoenzima en presencia de concentraciones de cAMP similares a las fisiológicas.

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

CAPITULO II.

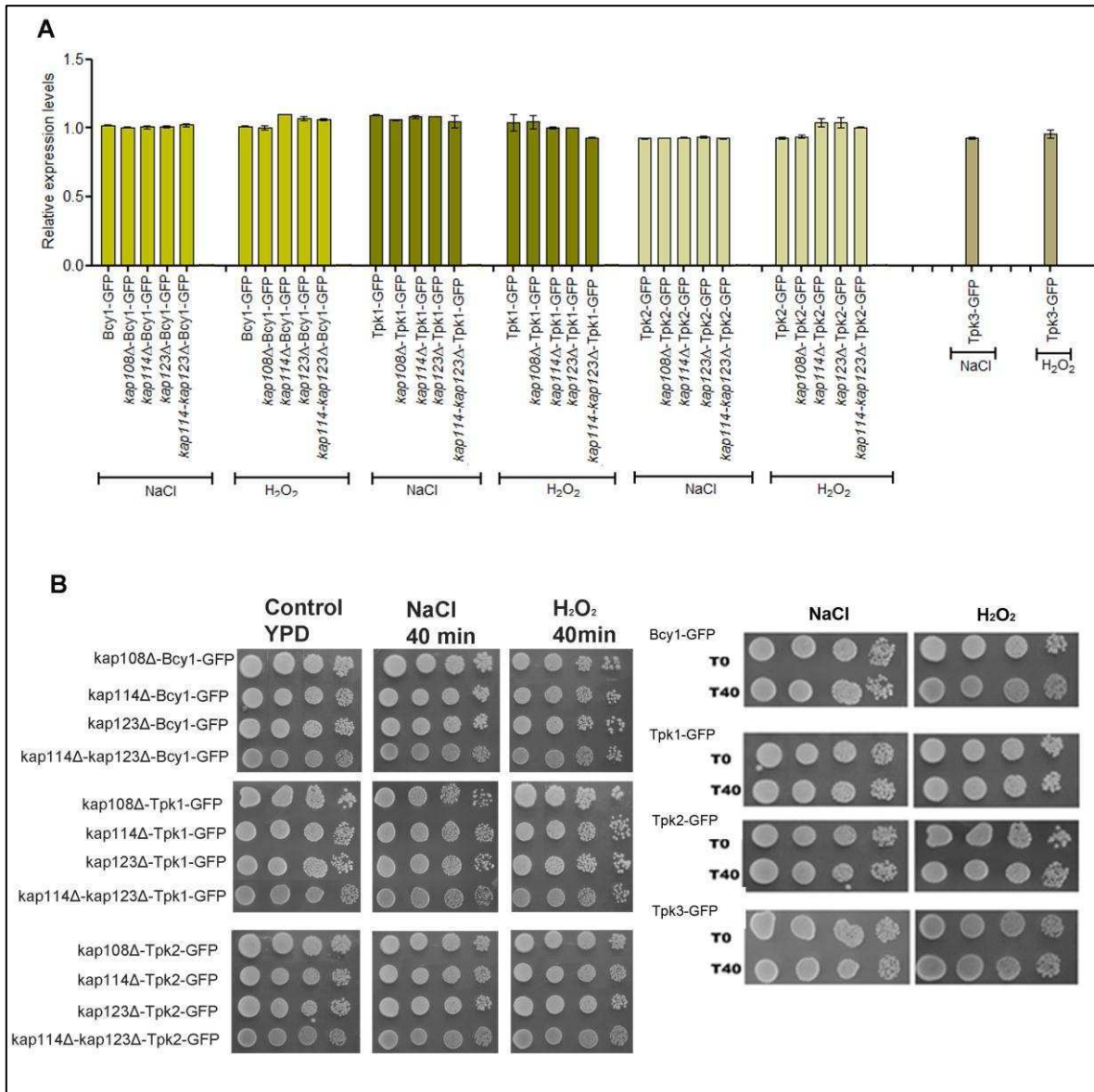


Figura S4. Niveles de expresión de las subunidades de la PKA y viabilidad celular de cepas empleadas en éste capítulo Extractos crudos de las cepas indicadas en la figura se prepararon luego de 40 minutos de estrés con 0.4M de NaCl y 0.4mM de H₂O₂ tal como se detalla en materiales y métodos y se sometieron a Western Blot. Los niveles de proteína de Bcy1, Tpk1, Tpk2 y Tpk3 (expresadas a partir de su localización cromosómica) se determinaron vía SDS-PAGE western blot utilizando un anticuerpo anti-GFP. El histograma muestra la cuantificación densitométrica de la señal de GFP con relación a la cantidad total de proteína cargada. Los niveles de cada proteína detectados en las diferentes cepas para cada condición se expresaron en relación a la cantidad de dicha proteína determinados en células crecidas hasta fase exponencial glucosa. (B) Las cepas que expresan Bcy1-GFP, Tpk1-GFP, Tpk2-GFP y Tpk3-GFP con diferentes fondos genéticos fueron crecidas en YPGlu a 30 °C y tratadas por 40 minutos con 0.4M de NaCl y 0.4mM de H₂O₂. La viabilidad celular fue verificada mediante un ensayo de spot assay.

Karyopherin transport factors of yeast and vertebrates.		
<i>S. cerevisiae</i> Karyopherins	Vertebrate Karyopherins	Examples of Cargo(s): (v) – vertebrate, (sc) – <i>S. cerevisiae</i>
Kap95	Importin- β 1	Imports via sc-Kap60/v-importin- α adaptor proteins with cNLS; Imports via v-Snurportin the UsnRNPs; with no adaptor, imports v-cargo SREBP-2, HIV Rev, HIV TAT, cyclin B.
Kap104	Transportin or Transportin 2	Imports sc-cargo – Nab2, Hrp1; v-cargo – PY-NLS proteins, mRNA-binding proteins, histones, ribosomal proteins.
Kap108/Sxm1	Importin 8	Imports sc-cargo – Lhp1, ribosomal proteins; v-cargo –SRP19, Smad.
Kap109/Cse1	CAS	Imports sc-cargo – Kap60/Srp1; v-cargo – importin α
Kap111/Mtr10	Transportin SR1 or SR2	Imports sc-cargo – Npl3, tRNAs; v-cargo – SR proteins, HuR
Kap114	Importin 9	Imports sc-cargo – TBP, histones, Nap1, Sua7; v-cargo – histones, ribosomal proteins.
Kap119/Nmd5	Importin 7	Imports sc-cargo – Hog1, Crz1, Dst1, ribosomal proteins, histones; v-cargo – Smad, ERK, GR, ribosomal proteins.
Kap120	HsRanBP11	Imports sc-cargo – Rpf1.
Kap121/Pse1	Importin 5/Importin β 3/RanBP5	Imports sc-cargo – Yra1, Spo12, Ste12, Yap1, Pho4, histones, ribosomal proteins; v-cargo – histones, ribosomal proteins.
Kap122/Pdr6	-	Imports sc-cargo – Toa1 and Toa2, TFIIA.
Kap123	Importin 4	Imports sc-cargo – SRP proteins, histones, ribosomal proteins; v-cargo - Transition Protein 2, histones, ribosomal protein S3a.
Kap127/Los1	Exportin-t	Exports tRNAs.
Kap142/Msn5	Exportin 5	sc-cargo – imports replication protein A; exports Pho4, Crz1, Cdh1; v-cargo - exports pre-miRNA.
Crm1/Xpo1	Importin 13 CRM1/Exportin 1	v-cargo – imports UBC9, Y14; exports eIF1A Exports proteins with leucine-rich NES, 60S ribosomal subunits (via NMD3 adaptor), 40S ribosomal subunits.
—	Exportin 4	v-cargo – imports SOX2, SRY; exports Smad3, eIF5A.
—	Exportin 6	Exports profilin, actin.
—	Exportin 7/RanBP16	Exports p50-RhoGAP.

Tabla Suplementaria 1. Carioferinas de *Saccharomyces cerevisiae* y vertebrados (adaptado de Went et al, 2010).

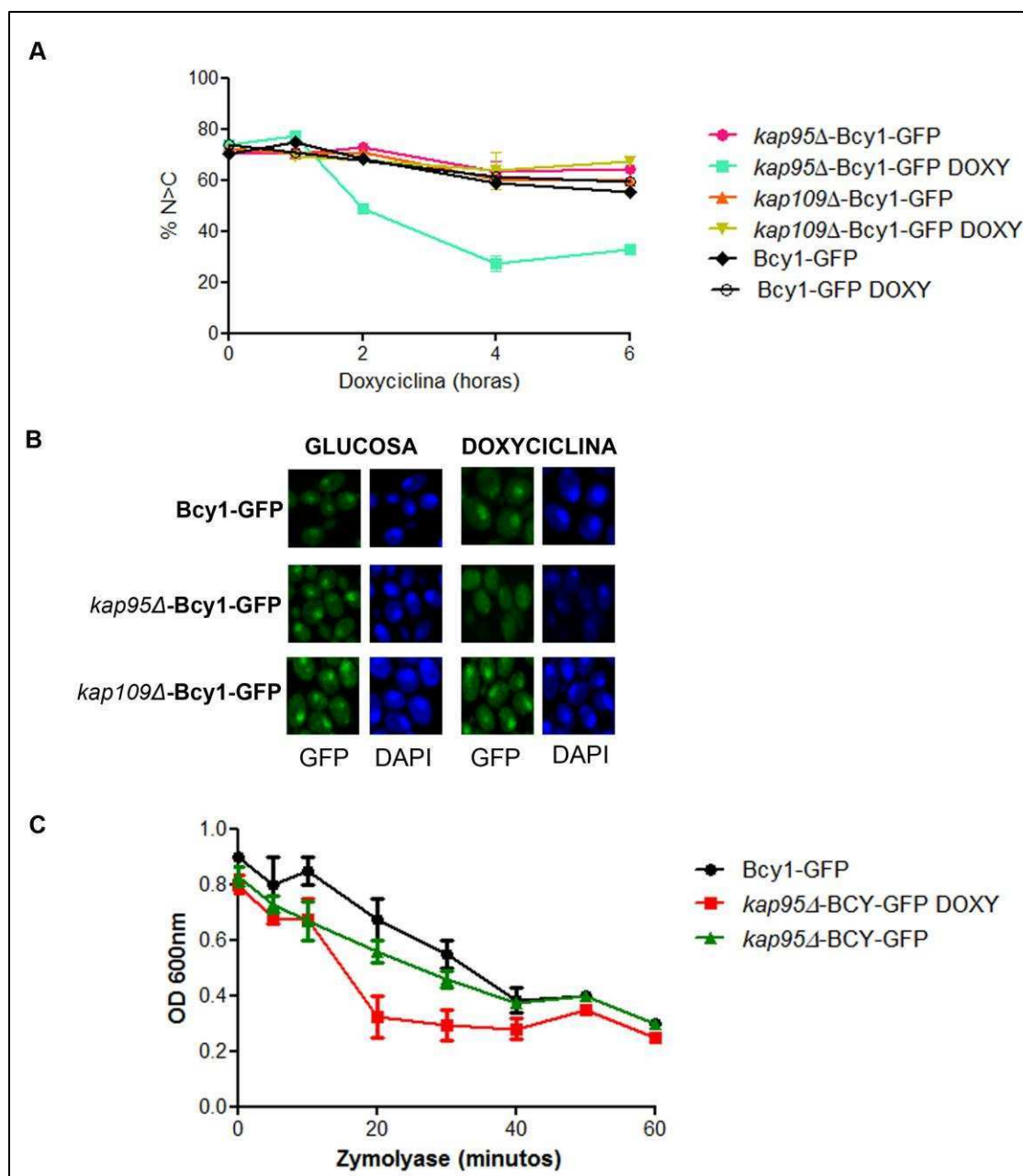


Figura S5. A) Deslocalización de Bcy1 hacia el citoplasma en la mutante *kap95Δ* (JCY970). Las cepas *kap95Δ*-Bcy1-GFP, *kap109Δ*-Bcy1-GFP y Bcy1-GFP fueron tratadas con Doxyciclina durante 6 horas. Se tomaron alícuotas cada 2 horas y se analizó la localización subcelular de Bcy1-GFP. Cada tiempo representa la media de tres experimentos independientes n= 300. Abajo: imágenes de las cepas *kap95Δ*-Bcy1-GFP, *kap109Δ*-Bcy1-GFP y Bcy1-GFP sin y con Doxyciclina. C) Defectos en la integridad celular en la mutante *kap95Δ*. Las cepas Bcy1-GFP *kap95Δ*-Bcy1-GFP (tratada o no con Doxyciclina) fueron crecidas hasta fase exponencial y resuspendidas en agua destilada con 1mg/ml de zymolyase 100T. Se midió la OD 600nm. Los valores corresponden a tres experimentos independientes. La cepa JCY972 se utilizó como control. Esta cepa expresa la KAP109 bajo el mecanismo de TetOff, esta carioferina es una proteína de la envoltura nuclear que media la exportación e importación de la kap60/Srp1 y es requerida para una adecuada segregación de cromosomas (Schroeder et al, 1999; Xiao et al, 1993).

Materiales y Métodos

1- Cepas de levaduras

Cepa	Genotipo
BY4741 (Wt)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
W3031A (Wt)	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>
S288C (Wt)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
<i>tpk1Δ</i>	<i>W3031A TPK1::kanMX4</i>
<i>tpk2Δ</i>	<i>W3031A TPK2::kanMX4</i>
<i>tpk3Δ</i>	<i>W3031A TPK3::kanMX4</i>
<i>TPK1-TAP</i>	<i>S288C TPK1-TAP::HIS3</i>
<i>TPK2-TAP</i>	<i>S288C TPK2-TAP::HIS3</i>
<i>TPK3-TAP</i>	<i>S288C TPK3-TAP::HIS3</i>
<i>TPK1-GFP</i>	<i>S288C TPK1-GFP::HIS3</i>
<i>TPK2-GFP</i>	<i>S288C TPK2-GFP::HIS3</i>
<i>TPK3-GFP</i>	<i>S288C TPK3-GFP::HIS3</i>
<i>BCY1-GFP</i>	<i>S288C BCY1-GFP::HIS3</i>
JT20590 (Δ bcy)	<i>BY4742 Mata ade2 trp1 leu2 his3 bcy1::URA3</i>
* <i>tpk1Δ + TPK1d</i>	<i>Δtpk1 pTPK1d</i>
* <i>tpk2Δ + TPK2d</i>	<i>Δtpk2 pTPK2d</i>
* <i>bcy1Δ-TPK1-TAP</i>	<i>JT2590 TPK1-TAP</i>
* <i>bcy1Δ-TPK2-TAP</i>	<i>TPK2-TAP BCY1::URA3</i>
<i>kap109Δ (JCY0972)</i>	<i>Mat a his3Δ1,1 met15Δ0, ura3Δ0, tetOCSE1-KanMXtTR'::LEU</i>
<i>kap114Δ (GSY501)</i>	<i>Mata ura3-52, leu2Δ1, his3Δ200, trp1Δ63, kap114::TRP1</i>
<i>kap120Δkap114Δ (GSY517)</i>	<i>Mata ura3-52, leu2Δ1, his3Δ200, trp1Δ63, kap120::TRP1, kap114::LEU2</i>
<i>kap95Δ (JCY0970)</i>	<i>Mat a his3Δ1,1 met15Δ0, ura3Δ0, tetOKap95-KanMXtTR'::LEU</i>
<i>sxm1Δ</i>	<i>BY4741; Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YDR395w::kanMX4</i>

<i>kap120Δ</i>	<i>BY4741; Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YPL125w::kanMX4</i>
<i>kap123Δ</i>	<i>BY4741; Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YER110c::kanMX4</i>
<i>kap114Δ</i>	<i>BY4741; Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YGL241w::kanMX4</i>
<i>kap123Δ-kap114Δ</i>	<i>Mata ura3, leu2, his3, trp1, kap123::TRP1, kap114::LEU2</i>
<i>*kap109Δ-BCY1-GFP</i>	<i>kap109Δ-BCY1-GFP</i>
<i>*kap114Δ-BCY1-GFP</i>	<i>kap114Δ-BCY1-GFP</i>
<i>*kap120Δkap114Δ-BCY1-GFP</i>	<i>kap120Δkap114Δ-BCY1-GFP</i>
<i>*kap95Δ-BCY1-GFP</i>	<i>kap95Δ-BCY1-GFP</i>
<i>*sxm1Δ -BCY1-GFP</i>	<i>sxm1Δ -BCY1-GFP</i>
<i>*kap120Δ-BCY1-GFP</i>	<i>kap120Δ-BCY1-GFP</i>
<i>*kap123Δ-BCY1-GFP</i>	<i>kap123Δ-BCY1-GFP</i>
<i>*kap114Δ-BCY1-GFP</i>	<i>kap114Δ-BCY1-GFP</i>
<i>*kap123Δ-kap114Δ-BCY1-GFP</i>	<i>kap123Δ-kap114Δ-BCY1-GFP</i>
<i>*kap109Δ-TPK1-GFP</i>	<i>kap109Δ-TPK1-GFP</i>
<i>*kap114Δ-TPK1-GFP</i>	<i>kap114Δ-TPK1-GFP</i>
<i>*kap114Δ-kap120Δ-TPK1-GFP</i>	<i>kap114Δ-kap120Δ -TPK1-GFP</i>
<i>*kap95Δ-TPK1-GFP</i>	<i>kap95Δ JCY0970-TPK1-GFP</i>
<i>*sxm1Δ -TPK1-GFP</i>	<i>sxm1Δ -TPK1-GFP</i>
<i>*kap120Δ-TPK1-GFP</i>	<i>kap120Δ-TPK1-GFP</i>
<i>*kap123Δ-TPK1-GFP</i>	<i>kap123Δ-TPK1-GFP</i>
<i>*kap114Δ-TPK1-GFP</i>	<i>kap114Δ-TPK1-GFP</i>
<i>*kap123Δ-kap114Δ-TPK1-GFP</i>	<i>kap123Δ-kap114Δ-TPK1-GFP</i>
<i>*kap109Δ-TPK2-GFP</i>	<i>kap109Δ-TPK2-GFP</i>

<i>*kap114Δ-TPK2-GFP</i>	<i>kap114Δ-TPK2-GFP</i>
<i>* kap114Δ-kap120Δ - TPK2-GFP</i>	<i>kap114Δ-kap120Δ -TPK2-GFP</i>
<i>*kap95Δ-TPK2-GFP</i>	<i>kap95Δ-TPK2-GFP</i>
<i>*sxm1Δ -TPK2-GFP</i>	<i>sxm1Δ -TPK2-GFP</i>
<i>*kap120Δ-TPK2-GFP</i>	<i>kap120Δ-TPK2-GFP</i>
<i>*kap123Δ-TPK2-GFP</i>	<i>kap123Δ-TPK2-GFP</i>
<i>*kap114Δ-TPK2-GFP</i>	<i>kap114Δ-TPK2-GFP</i>
<i>*kap123Δ-kap114Δ-TPK2-GFP</i>	<i>kap123Δ-kap114Δ-TPK2-GFP</i>
<i>*kap114Δ-kap123Δ-Tpk1-TAP</i>	<i>kap114Δ-kap123Δ-Tpk1-TAP</i>
<i>*kap108 Δ -Tpk2-TAP</i>	<i>kap108 Δ -Tpk2-TAP</i>

Tabla 2. Cepas de levaduras utilizadas en esta tesis. * Estas cepas fueron realizadas durante esta tesis doctoral.

2- Plásmidos.

Plásmido	Descripción
<i>ptpk2^d-GFP</i>	<i>pTD55, CEN, LEU, promotor TPK2, versión inactiva de TPK2, fusionada a GFP Porta la mutación K99M.</i>
<i>ptpk1^d-GFP</i>	<i>pTD49, CEN, LEU, promotor TPK3, versión inactiva de TPK1 fusionada a GFP. Porta la mutación K117M.</i>
YCplac33	<i>YCplac33 2μ URA3, promotor ADH1 versión TPK1 Wild-type fusionada a GFP-HA₃.</i>

Tabla 3. Plásmidos utilizados en esta tesis.

3- Medios y condiciones de crecimiento y tratamientos con drogas.

El medio de crecimiento para levaduras fue preparado como describió previamente Sherman et al, (Sherman et al, 1981). Las cepas fueron crecidas en medio rico compuesto por 2% de Bactopeptona, 1% de extracto de levaduras y 2% de glucosa (YPGlu). El medio sintético contiene 0.67% de base nitrogenada para levaduras sin aminoácidos, 2% de glucosa (SD-Glu), más los aminoácidos necesarios para completar los requerimientos auxotróficos y mantener la selección de los plásmidos. El medio sólido contiene 2% de agar.

Para realizar el estrés osmótico, células de levadura crecidas en YPGlu hasta fase exponencial de crecimiento se las sometió a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (0.4, 0.5 y 1M), según la cepa a tratar y el experimento llevado a cabo. En caso del estrés oxidativo, las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de los agentes oxidativos menadiona (50, 60 80 y 100 μ M) o agua oxigenada (0.4, 1, 1.5 y 5mM). Las concentraciones específicas y el tiempo de tratamiento esta detallado en cada Figura. Las cepas de bacterias *E.coli* portadoras de los plásmidos utilizados fueron crecidas en medio LB-Ampi, compuesto por 1% peptona, 0.5% extracto de levaduras, 0.5% NaCl y ampicilina en una concentración final de 100 μ g/ml para mantener la selección de los plásmidos.

4-Transformación de levaduras.

Las células de levaduras fueron transformadas utilizando el método de acetato de litio (Ito et al, 1983). Las transformantes fueron seleccionadas en medio SD-Glu en ausencia del aminoácido/nucleótido necesario para la selección o la resistencia a drogas.

5- Construcción de cepas de levaduras.

La construcción de diferentes fondos genético que expresan Bcy1-GFP, Tpk1-GFP y Tpk2-GFP fue realizada como se describió previamente (Huh et al, 2003). Básicamente, el *cassette* conteniendo la región codificante carboxilo terminal de Bcy1, Tpk1 y Tpk2 fusionado a GFP portando el marcador de selección HIS3 fue amplificado mediante PCR a partir de DNA genómico de Bcy1-GFP, Tpk1-GFP y Tpk2-GFP respectivamente. Los primers utilizados fueron: Tpk1For: TGTTAAGGAAAGCCCAAAGATTTCCCAAC, Tpk1Rev: GATTCCGACCTTGTTTGGAGC; Tpk2For: ACTGCAGATTTGACAAGAAG, Tpk2Rev:GTGCGCCAGATTTTGGTGGG;Bcy1For:GCGCGAATTCGCCGCCGACGATTTT AC; Bcy1 Rev ACGTAAGCTTACTGTCAAGGAGGG. Se analizó la fluorescencia de cada

proteína de fusión mediante microscopía de fluorescencia. La expresión de las proteínas de fusión se verificó mediante *Western blot* utilizando α -GFP y α -TPK1 (Santa Cruz Biotechnology).

6- Preparación de extracto crudo.

Las células de levaduras fueron crecidas en el medio apropiado hasta fase exponencial (OD_{600nm} de 0.4-0.6). Las células fueron lisadas por ruptura con bolitas de vidrio a 4°C en 0.5 ml de Tris-HCl 50mM pH 7, EDTA 5mM, EGTA 3mM, 2-mercapto-etanol 10mM más inhibidores de fosfatasa (glicerofosfato 5mM, fluoruro de sodio 10mM, ortovanadato de sodio 0.1mM, molibdato de amonio 0.1mM, pirofosfato de sodio 10mM) y un coctel para inhibidores de proteasa (Roche). Los restos celulares fueron eliminados por centrifugación a 10.000rpm y el sobrenadante utilizado para análisis por SDS-PAGE *Western Blot* o para purificación proteica.

7- Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE y *Western Blot*.

Se utilizaron geles de poliacrilamida 10% T (Laemmli, 1970). Los geles se corrieron en buffer de corrida (glicina 1.5% Tris Base 0.3% SDS 0.1%) con voltaje constante de 90 V a temperatura ambiente. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (GE) usando Tris 25 mM, Glicina 192 mM, metanol 20% (v/v), durante 60 minutos a 90 volts. Las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche descremada, 0.05% Tween 20 en buffer PBS e incubadas con los anticuerpos correspondientes (Tabla 3) durante 16 hs a 4° C. Posteriormente las membranas fueron lavadas e incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) durante 1 h a temperatura ambiente. Después de la incubación, las membranas fueron lavadas e incubadas con el reactivo quimioluminiscente ECL. Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas por imagen digital (Bio-Imaging Analyzer Bas-1800II and Image Gauge 3.12 Fujifilm).

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Origen
α -Tpk1	1:200	α -goat	Santa Cruz Biotechnology
α -TAP	1:1000	α -rabbit	Open Biosystems
α -GFP	1:1000	α -rabbit	Santa Cruz Biotechnology
α Bcy1 COOH	1:200	α -goat	Santa Cruz Biotechnology
α Bcy1 NH	1:200	α -goat	Santa Cruz Biotechnology

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en este trabajo.

8- Purificación de proteínas fusionadas a TAP. Cepas Tpk-TAP y S288C (utilizada como control) fueron crecidas en YPGlu hasta fase exponencial y posteriormente estresadas con NaCl, Menadiona y H₂O₂. Los extractos proteicos fueron purificados por el método TAP como se describió previamente (Gerber et al, 2004). Los complejos proteicos fueron analizados mediante SDS-PAGE y *western blot*.

9- Microscopía.

Para realizar los experimentos de microscopia en fase exponencial de crecimiento las cepas fueron crecidas en 50 ml de medio YPGlu hasta una OD de 0.4-0.6. Para los análisis de localización en respuesta a estrés, las células fueron tratadas con el agente estresante indicado y se tomaron alícuotas a los tiempos determinados. Para el análisis del tipo de transporte nucleocitoplasmático, las células fueron crecidas hasta fase exponencial (A₆₀₀=0.4-0.6) en medio rico (YPGlu), se recolectaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en 1 ml de 10mM de azida sódica y 10mM de 2-deoxy-D-glucosa en un medio libre de glucosa (YP). Se incubaron hasta 60 minutos a 30°C para permitir el equilibrio nucleocitoplasmático de la fluorescencia requerida. Luego las células fueron recolectadas a 3000 rpm por 1 minuto y resuspendidas en 100ul de un medio con glucosa (YPGlu) precalentado a 30°C.

Para analizar la localización subcelular en respuesta a estrés, cultivos en fase exponencial en YPGlu fueron estresados por el agregado de NaCl 0.4 M o 0.4mM H₂O₂ y se tomaron alícuotas de cada cultivo a los tiempos que se indican en las figuras. Como control de autofluorescencia se utilizó la cepa S288C (parental de las cepas GFP) en las distintas condiciones. Este análisis no lo pudimos llevar a cabo con el agente estresante menadiona, ya que este emite fluorescencia cuando es excitado con la longitud de onda correspondiente a la luz UV o luz azul.

La cuantificación de la señal de fluorescencia se realizó mediante cuantificación de la intensidad de píxeles de áreas iguales correspondientes al núcleo, citoplasma o *background*. Para asignar localización nuclear o citoplasmática se definieron dos categorías de localización: N>C cuando la fluorescencia nuclear fue mayor que la citoplasmática (señal núcleo/citoplasma > 1,5) y N=C cuando la fluorescencia nuclear fue similar a la citoplasmática (señal núcleo/citoplasma \leq 1,5). Cada tiempo representa la media de tres experimentos independientes, n= 300 cada experimento.

Alícuotas de cada cultivo fueron fijadas en un volumen igual de formaldehído 7.4%, lavadas en buffer PBS y resuspendidas en una solución de Triton 0.05% PBS 1X DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindol) 1 μ g/ml. Luego de 30 minutos de incubación las células fueron cosechadas por centrifugación y montadas para su observación al microscopio de fluorescencia. Se utilizó un microscopio confocal Olympus FV 300. El objetivo utilizado fue Plan Apo 60X. Las imágenes fueron adquiridas utilizando el software Fluo View (Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina). Las imágenes fueron procesadas utilizando el programa Image J del National Institute of Health y Adobe Photoshop CS5.

10- Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) (Figura 28)

Realizamos la puesta a punto del ChIP siguiendo el protocolo de Strhul et al, 1999 con las modificaciones que se detallan a continuación. Probamos variaciones en tiempo de fijación, ruptura celular, sonicación del DNA y condiciones de inmunoprecipitación. Una vez establecidas las condiciones óptimas, se analizó la asociación a la cromatina en células crecidas en glucosa y a los tiempos determinados en las Figuras post estrés osmótico (0.4M NaCl) y oxidativo (50 μ M menadiona y 0.4mM H₂O₂) sobre las regiones génicas indicadas en la Tabla N°5 y con los primers indicados en la Tabla N° 6.

Nombre del gen	Producto	Región
ALD6/YPL061W	Aldehído deshidrogenasa citosólica; se localiza en la superficie citosólica de la mitocondria bajo estrés oxidativo.	+730+842
SED1/YDR077W	Glicoproteína estructural GPI-de pared celular que se induce fuertemente en fase estacionaria.	+827+921
HSP42/YDR171W	Proteína de shock térmico pequeña con actividad chaperona; involucrada en la reorganización del citoesqueleto luego del estrés por calor.	+864+1014
RPS29B/iYDL061C	Componente proteico de la subunidad ribosomal pequeña (40S)	-750-603
RPL1B/iYGL136C	Proteína acetilada en el amino terminal componente de la subunidad ribosomal grande (60S).	-295-371

Tabla 5. Genes seleccionados para la verificación por ChIP de los datos obtenidos por Pokholok et al, 2006. Los primers, se numeran de acuerdo al ATG de iniciación.

Región	Primer Foward	Primer Reverse
YPL061W/ORF ALD6	AGCTGGCTTTTACCGGT TCT	ACCAAATGGGCGGACTTA C
YDR077W/ORF SED1	GGGCACTACCACCAAA GAAA	AGAGGATGAAACTGGGAC GA
YDR171W/ORF HSP42	AGAGTGGGCATTGATG AAAA	AGGCACCTTAATTTGTAGT AGAC
iYDL061C/ORF RPS29B	ATCAACTTCTAACTCAC ACA	CCCCCAAGTGAAATAAATA G
iYGL136C/ORF RPL1B	CTTCGGCCCCACAAACT C	CGCTTTCCTTGATCAACA TAC

Tabla 6. Primers de las regiones génicas e intragenicas estudiadas.

10-i Preparación de fragmentos de cromatina unidos a proteína (Figura 28 A).

Cultivos de 100 ml en YPGlu hasta fase exponencial de crecimiento fueron sometidos a estrés según indica cada figura. A cada tiempo indicado, se fijaron las células con 10 ml de formaldehído 11% (preparado en el momento a partir de un stock comercial a 37%) en buffer A (50mM Hepes/KOH pH 7.5, 1mM EDTA, 100mM NaCl). Se dejaron los cultivos a temperatura ambiente durante 20 minutos, moviendo ocasionalmente, y se añadió 15 ml de glicina 3M para frenar la fijación, incubando 5 minutos. Luego, se centrifugaron las muestras durante 3 minutos a 3500 rpm y las células se lavaron dos veces con 100 ml de TBS frío (20mM Tris/HCl pH 7.5, 150mM NaCl) y una vez con 5ml de buffer de lisis FA frío (50mM Hepes/KOH pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% TritonX-100, 1mM PMSF, 0.1% deoxicolato sódico) con 0.1% SDS. El precipitado obtenido se resuspendió en 1 ml de buffer de lisis FA con 0.5% SDS frío y se añadió 0.5ml de bolas de vidrio. Las células se rompieron con el MiniBeadbeater-8™ (Biospec) durante 4 rondas de 1 minuto (dejando las muestras en hielo durante 2 minutos entre cada ronda de agitación); se recogió el lisado en un nuevo tubo eppendorf frío, centrifugándolo durante 1 minuto a 13000 rpm. El sobrenadante se desechó y el precipitado, con la cromatina insoluble, se solubilizó en 1ml de buffer de lisis FA con 0.1% SDS. Se centrifugó 1 minuto a 13000 rpm y se resuspendió en 1ml de buffer de lisis FA con 0.1% SDS. A continuación se sonicaron las muestras con el fin de obtener fragmentos de DNA de aproximadamente 400 pares de bases. Para ello se utilizó un sonicador UP200S (Hielscher Ultrasonics GmbH), de manera que se realizaron 3-4 rondas de ultrasonidos durante 30 segundos. Por último, las muestras se centrifugaron durante 30 minutos en una minicentrífuga fría a 13000 rpm y el sobrenadante, que contenía los fragmentos de cromatina solubles, se transfirió a un nuevo tubo eppendorf. Las muestras se guardaron a -80 °C hasta su posterior uso.

10-ii Inmunoprecipitación, reversión del entrecruzamiento (descrosslinking) y purificación de cromatina (Figura 28A-B-C).

Para la inmunoprecipitación de cromatina se utilizaron bolas magnéticas Dynabeads® (Invitrogen), que permiten la separación de materiales biológicos como proteínas o ácidos nucleicos mediante su acople por afinidad a la superficie de las mismas. En nuestro trabajo, se utilizaron bolas que llevan acoplado covalentemente un ligando, proteína IgG Pan Mouse, con afinidad por el epítipo TAP. Las bolas se preparan el día anterior a su uso, incubándolas en buffer PBS toda la noche a 4 °C (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄; pH 7.3) y lavándolas 3 veces con 1ml de buffer PBS suplementado con 5mg/ml de BSA. Los lavados se realizan con un campo magnético en

un concentrador de partículas magnéticas DynaMag™-2 (Invitrogen), de modo que el material se separó rápidamente del sobrenadante, que fue eliminando simplemente por aspiración. Al día siguiente, se incubaron junto a 500 µl de muestra (fragmentos de cromatina) durante al menos 90 minutos a 4°C. Pasado este tiempo, se procedió a lavar las muestras de la siguiente manera:

- dos lavados con 1 ml de buffer de lisis FA con 0.1% SDS.
- dos lavados con 1 ml de buffer de lisis FA con 0.1% SDS y 0.5M NaCl.
- un lavado con 1 ml de buffer B (10 mM Tris/HCl pH 8, 0.25M LiCl, 1mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.5% deoxicolato de sodio)
- un lavado con buffer TE.

Entre cada lavado se incubaron las muestras durante 3-5 minutos en un rotor a temperatura ambiente.

Luego las bolas se resuspendieron en 250µl de buffer C (50mM Tris/HCl pH 7.5, 1% SDS, 10 mM EDTA) para eluir las muestras, incubándolas durante exactamente 10 minutos a 65 °C, agitando cada 2 minutos. Opcionalmente se realizaron varias rondas de elución. Después de separarlas en el concentrador magnético, se transfirió el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo con 250µl de buffer TE y 20µl de pronasa (20 mg/ml, Roche).

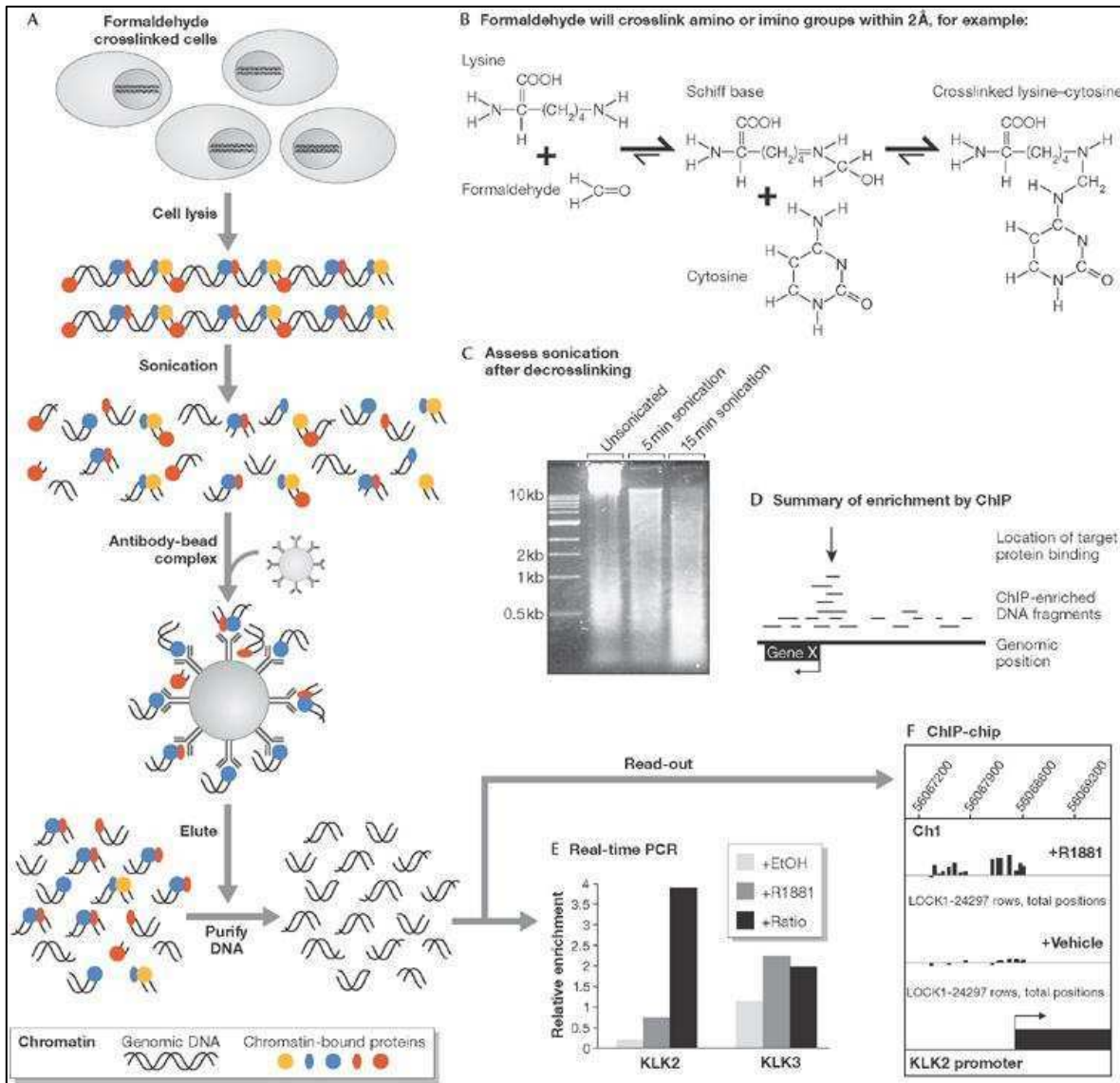


Figura 28. Ejemplo del proceso de inmunoprecipitación de cromatina. Se muestran los fragmentos de cromatina previamente obtenidos por sonicación, algunos de ellos con la proteína a estudiar fijada al DNA con formaldehído, así como los epitopes fusionados. La proteína G pegada a la bola magnética permite por afinidad la inmunoprecipitación selectiva de los fragmentos de interés (adaptado de Charles E Massie & Ian G Mills et al 2008).

Consecutivamente, se prepararon muestras de cromatina total, sin inmunoprecipitar (muestras CT). Para ello se empleó 50µl de cromatina fragmentada a la cual se añadió 450µl de buffer TE y 20µl de pronasa (20 mg/ml, Roche) para obtener un volumen similar al de las muestras inmunoprecipitadas.

La desligación de las proteínas de la cromatina tuvo lugar mediante la incubación de las muestras durante 1 hora a 42 °C seguida de incubación a 5 horas o incluso toda la noche

a 65 °C. Después se añadió 50µl de CILi 4M y se extrajo el DNA con 1 ml de fenol-cloroformo/isoamilalcohol (1:1), una segunda extracción con 1 ml de cloroformo/isoamilalcohol (24:1) y se precipitó con 1 ml de etanol más 20µg de glucógeno (20g/l, Roche), mediante incubación toda la noche a -20 °C. Al día siguiente se centrifugaron las muestras CT y las inmunoprecipitadas (IP) durante 10 minutos a la máxima velocidad y se lavaron con 1 ml de etanol al 96%, siendo por último resuspendidas en 100µl de buffer TE.

10iii- Ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real con EVA Green™ (Figura 28D-E)

Los ensayos de PCR en tiempo real se llevaron a cabo para cuantificar DNA, ya que una secuencia abundante puede ser identificada sobre otra menos abundante por el menor número de ciclos de PCR necesarios para llegar a una determinada cantidad de producto de PCR. En el ensayo con EVA Green™, el producto de PCR puede ser detectado por la incorporación de este colorante fluorescente durante su síntesis.

Las reacciones de PCR se realizaron a volumen final 10 µl cada una, conteniendo 2 µl de DNA molde (fragmentos de Cromatina Total o Inmunoprecipitada obtenida mediante ChIP), 3 µl de la mezcla de primers forward y reverse a 3,3 µM (según se detalla en la Tabla 4) y 5 µl del cóctel compuesto por una mezcla Eva Green™ qPCR Basic HS Mix (Biotium) que contiene el fluoróforo, el buffer de reacción, dNTPs y 5 U/µl TrueStart™ Hot Start Taq DNA Polimerasa (Fermentas) y el fluoróforo de referencia 5(6)-carboxy-X-rodamina (ROX™, Molecular Probes) diluido a 0.1µM.

La PCR cuantitativa fue llevada a cabo en un detector de secuencias Applied Biosystem 7500 Fast utilizando las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos, seguida de 40 ciclos de 5 segundos a 95 °C, 5 segundos a 53 °C y 30 segundos a 72 °C. Seguidamente se analizó la curva de fusión del producto, producida como consecuencia de la caída de la señal fluorescente debido a la fusión dependiente de temperatura del producto (T_m). Este análisis posibilitó la caracterización del fragmento amplificado y la discriminación de productos inespecíficos.

Comparando los Ct (número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de la fluorescencia significativo con respecto a la señal base) de la región interna de referencia con la región del gen problema en muestras inmunoprecipitadas (IP) y sin inmunoprecipitar (CT) se determinó el aumento de unión de las subunidades de PKA tanto en los promotores como en las regiones intragénicas estudiadas. La fórmula utilizada para determinar el grado de ocupación relativo fue:

Grado de ocupación= [(IP – CT) Gen problema – (IP – CT) Cepa sin etiquetar]

Los experimentos fueron llevados cabo al menos sobre dos muestras de cromatina independientes para cada cepa y condición y las reacciones de PCR se realizaron por triplicado en una placa óptica de 96 pocillos (código #4306737, Applied Biosystems), sellada con plástico adhesivo.

11- Purificación de RNA total de levadura con fenol ácido.

Cultivos en 20 ml de medio YPGlu crecidos hasta fase exponencial (OD 600nm: 0.4-0.6) y se las sometió al estrés correspondiente. Se lavaron con agua y los precipitados fueron resuspendidos en 400µl de buffer TES (10mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.5% SDS). Se añadió 400µl de fenol ácido (equilibrado a pH 4) y se mezcló bien. La mezcla se incubó durante 45 minutos a 65°C y luego en hielo 5 minutos. Luego se centrifugaron las muestras para separar las fases durante 1 minuto a 10000 rpm. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo eppendorf y se realizó una segunda extracción con 400µl de fenol ácido. Se recuperó la fase acuosa a otro tubo eppendorf, se añadió 40µl de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol. Se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 14000 rpm y se lavó el precipitado con etanol 70%. El precipitado obtenido se dejó secar y se resuspendió en 100µl de buffer TE. Por último, se midió el contenido de RNA con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 y se congelaron las muestras a -20 °C.

12- Análisis de expresión de RNA mensajeros (Northern Blot)

Se realizó electroforesis en geles de agarosa desnaturalizantes. El gel (100ml) se preparó mezclando 1 gramo de agarosa, 84 ml de agua y 10 ml de buffer MAE 10X (0.2M MOPS, pH 7 ajustado con NaOH, 50 mM acetato de sodio, 10mM EDTA) esterilizado por filtración y guardado a 4 °C protegido de la luz. Una vez la agarosa se calentó, disolvió y enfrió a 60 °C, se añadió en campana de gases 6 ml de formaldehído 37% (2.2% final), se mezcló y vertió la disolución en una cubeta hasta que gelificó.

Las muestras a sembrar se prepararon mezclando unos 10-30 µg de RNA total (5-10 µl de muestra), 20µl de buffer de carga 1.25x (2.2ml de formamida desionizada, 0.8ml de formaldehído 37%, 0.5ml 10x MAE, 0.4ml glicerol 80%, 0.1 ml azul de bromofenol 2%) y 1µl de bromuro de etidio 0.1%.

Luego de calentar las muestras 10 minutos a 56°C, se llevó a cabo la electroforesis durante 2-3 horas a 120V. Luego, se observaron la presencia de los RNA ribosomales (la subunidad 60S migra alrededor de 3.5 kb y la subunidad 40S migra alrededor de 1.8 kb)

en transiluminador de luz ultravioleta. Las imágenes fueron registradas en un equipo G-box.

La transferencia desde el gel a la membrana se llevó a cabo por el método tradicional de capilaridad. Para ello, el gel de RNA se incubó previamente 2 veces durante 20 minutos con un exceso de 10X SSC (1.5M NaCl, 0.15M Tri-Na-Citrato, ajustado a pH 7 con HCl 1M) para eliminar el formaldehído. Después el gel se colocó encima de papel de filtro Whatman 3MM empapado en el líquido de transferencia (10X SSC, con gran cantidad de sales para unir los ácidos nucleicos). Se eliminaron las burbujas atrapadas entre el papel de filtro y el gel. Se colocó encima el filtro de membrana cortado del mismo tamaño que el gel y previamente mojado en 10X SSC. Se colocó encima 3 trozos de papel de filtro cortados al mismo tamaño que el gel. Seguidamente se puso encima servilletas de papel secas cortadas del mismo tamaño del gel y formando una pila de unos 7 cm. Por encima se colocó una placa de vidrio de alrededor de 250g y se dejó transfiriendo toda la noche. Al día siguiente se comprobó la transferencia observando el RNA transferido por exposición de la membrana a luz ultravioleta.

Se procedió a fijar covalentemente el RNA al nylon utilizando UV Stratalinker, de Stratagene, que dosifica la luz ultravioleta adecuada. Utilizando el botón de “auto cross-link”, se determinó una dosis óptima de 0.12 julios de luz de 254 nm. Por último, los filtros de membrana se conservaron a temperatura ambiente hasta su uso. Eventualmente se fijaron por calor durante 2hs a 80°C.

12.i Marcación de sonda de DNA.

Las sondas fueron sintetizadas por PCR. Las condiciones de la PCR fueron 3 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 2.5 minutos a 72 °C y un último paso de extensión de 10 minutos a 72 °C. Cada reacción de PCR de 100 µl contenía 10 µl de buffer 10x, 10 µl de dNTPs 2mM, 1 µl de cada oligonucleótido a 100 µM, 1 µl de DNA genómico como molde y 1 µl de DNA polimerasa a 5U/ µl.

La amplificación y tamaño de los fragmentos de DNA se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7% y se purificaron mediante el método estándar “freeze-squeeze”. La técnica “freeze-squeeze” (Tautz & Renz, 1983) se basa en la extracción del DNA de la agarosa por centrifugación, consiguiendo así expulsar el líquido. Las bandas de agarosa fueron previamente equilibradas con Buffer Tris 10mM a pH 8 durante 15 minutos y congeladas durante al menos 2 horas para destruir la estructura del gel. Tras cortar las bandas, se insertaron en un cartucho con filtro (0.45 µm Durapore®)

obtenido del DNA Gel Extraction Kit de Montage™, y el filtro a su vez se insertó en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se centrifugaron durante 10 minutos a 12000 rpm. De esta manera se retuvo la agarosa en el filtro y se recuperó el líquido en el fondo del tubo eppendorf. Luego se purificó del DNA por precipitación con acetato de sodio 3M y etanol absoluto. Finalmente el DNA se resuspendió en 50 µl de buffer Tris 10mM pH 8 y se cuantificó su concentración.

Las sondas radiactivas fueron generadas con una disolución llamada *High Prime* (Roche), de acuerdo a la técnica de marcación con oligonucleótidos al azar como primers (Feinberg & Vogelstein, 1983,1984). La mezcla *High Prime* contiene oligonucleótidos al azar, el fragmento Klenow de la DNA Polimerasa, dATP, dGTP y dTTP en un buffer concentrado con glicerol 50%.

El protocolo consistió en añadir 25-100 ng de molde de DNA (sondas obtenidas en el paso anterior) en agua destilada estéril hasta un volumen final de 11 µl por vial y desnaturalizar el DNA a 95 °C durante 10 minutos, seguido por un enfriamiento rápido en hielo. Luego se añadió 4 µl de la mezcla High Prime al DNA desnaturalizado y a continuación 2 µl de 250µCi α-[³²P]dCTP. Se mezcló y centrifugó antes de incubarlo a 37 °C durante 10 minutos. Pasado este tiempo se detuvo la reacción añadiendo 2 µl de EDTA 0.2M pH 8 y/o calentando las muestras a 65°C durante 10 minutos.

Antes de comenzar la hibridación, los filtros de membrana se trataron con buffer PSE (3ml de fosfato sódico 1M a pH 7.2, 7ml de 10% SDS y 20µl 0.5M EDTA) durante 10 minutos a 65°C. Este buffer tiene fuerza iónica alta y previene la unión inespecífica de DNA al filtro. Luego se hibridó el filtro, bañado en un tubo con 10 ml de PSE, con la sonda recién marcada durante toda la noche a 65 °C. A la mañana siguiente se procedió a lavar los filtros dos veces durante 10 minutos a 65 °C con 4x SSC/0.1% SDS y una vez con 0.4X SSC/0.1% SDS y se sellaron con plástico Saran Wrap para proceder a la exposición en un Hypercassette™, de Amersham Biosciences, con pantalla intensificadora. La duración de la exposición de los filtros por autorradiografía en los cassettes dependió de la intensidad de hibridación obtenida y estuvo comprendida entre 1 hora y varios días a temperatura ambiente. La señal detectada se cuantificó exponiendo los filtros en una pantalla Fujifilm BAS-1500 Phosphoimager a temperatura ambiente. Después de la exposición, se escaneó la pantalla en un lector Fujifilm FLA5100™, utilizando el programa Fujifilm Image Reader y se procedió a la cuantificación mediante el software Image Gauge v. 4.0 de Fujifilm.

Cuantificación y representación de los resultados. La cuantificación se llevó a cabo sobre las imágenes obtenidas del mRNA ribosomal y sobre las imágenes obtenidas por el Fujifilm BAS-1500 Phosphoimager. Con estos datos se relativizaron todos los valores de mRNA a su RNA ribosomal, obteniendo así los niveles de mRNA correspondientes para cada proteína. Luego estos resultados se graficaron utilizando el programa *Heatmap Builder Copyright 2003*. Los datos fueron ingresados al programa y seteados para que cada fila refleje el mRNA obtenido en cada cepa sometida a los distintos tipos de estrés. La intensidad de color corresponde a la cantidad de mRNA, así color más oscuro corresponde a un mayor nivel de mRNA de la proteína estudiada.

13. Validación de resultados.

El análisis estadístico de las figuras 24 del Capítulo II se realizó utilizando la prueba de ANOVA-Turkey HSD, $\alpha=0,05$.

Referencias

- Adhiraj Roy**, Yong Jae Shin, Kyu Hong Choa, and Jeong-Ho Kim (2013) Mth1 regulates the interaction between the Rgt1 repressor and the Ssn6-Tup1 corepressor complex by modulating PKA-dependent phosphorylation of Rgt. *Mol. Biol. Cell* mbc.E13-01-0047
- Adkins, M. W. & Tyler, J. K. (2006)** Transcriptional activators are dispensable for transcription in the absence of Spt6-mediated chromatin reassembly of promoter regions. *Mol. Cell* 21, 405–416
- Albertyn, J.,** Hohmann, S., Thevelein, J. M. & Prior, B. A (1994) GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4135–4144
- Alepuz PM,** Jovanovic A, Reiser V, Ammerer G (2001) Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. *Mol Cell.*;7(4):767-77
- Alepuz PM,** de NE, Zapater M, Ammerer G, and Posas F (2003) Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *EMBO J*, 22, 2433-2442.
- Bakhrat A,** Baranes K, Krichevsky O, Rom I, Schlenstedt G, Pietrokovski S, Raveh D. (2006) Nuclear import of ho endonuclease utilizes two nuclear localization signals and four importins of the ribosomal import system. *J Biol Chem*;281(18):12218-26.
- Balasundaram, D.,** Tabor, CW. & H. Tabor (1991) Spermidine or spermine is essential for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl Acad. Sci* 88:5872–5876.
- Barrera LO,** Ren B (2006) The transcriptional regulatory code of eukaryotic cells insights from genome-wide analysis of chromatin organization and transcription factor binding. *Curr Opin Cell Biol*;18(3):291-8
- Berger, A. J.,** Kluger, H. M., Li, N., Kielhorn, E., Halaban, R., Ronai, Z., and Rimm, D. L. (2003) Subcellular localization of activating transcription factor 2 in melanoma specimens predicts patient survival. *Cancer Res.* 63, 8103–8107
- Belotti F,** Tisi R, Paiardi C, Groppi S, Martegani E. (2011) PKA-dependent regulation of Cdc25 RasGEF localization in budding yeast. *FEBS Lett*;585(24):3914-20.
- Belotti F,** Tisi R, Paiardi C, Rigamonti M, Groppi S, Martegani E. (2012) Localization of Ras signaling complex in budding yeast. *Biochim Biophys Acta*;1823(7):1208-16.
- Bharucha N,** Ma J, Dobry CJ, Lawson SK, Yang Z, Kumar A. (2008) Analysis of the yeast kinome reveals a network of regulated protein localization during filamentous growth. *Mol Biol Cell*;19(7):2708-17.
- Bhounik, A.,** Fichtman, B., Derossi, C., Breitwieser, W., Kluger, H. M., Davis, S., Subtil, A., Meltzer, P., Krajewski, S., Jones, N., and Ronai, Z. (2008) Suppressor role of activating transcription factor 2 (ATF2) in skin cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 1674–1679.
- Breitkreutz A,** Choi H, Sharom JR, Boucher L, Neduva V, Larsen B, Lin ZY, Breitkreutz BJ, Stark C, Liu G, Ahn J, Dewar-Darch D, Reguly T, Tang X, Almeida R, Qin ZS, Pawson T, Gingras AC, Nesvizhskii AI, Tyers M. (2010) A global protein kinase and phosphatase interaction network in yeast. *Science.*;328(5981):1043-6.
- Broach JR. (2012)** Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics*;192(1):73-105.
- Broggi S,** Martegani E, Colombo S. (2013) Live-cell imaging of endogenous Ras-GTP shows predominant Ras activation at the plasma membrane and in the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Biochem Cell Biol*;45(2):384-94.

- Bryant, GO. (2008)** Activator control of nucleosome occupancy in activation and repression of transcription. *PLoS Biol.* 6, 2928–2939
- Budhwar R, Lu A, Hirsch JP (2010)** Nutrient control of yeast PKA activity involves opposing effects on phosphorylation of the Bcy1 regulatory subunit. *Mol Biol Cell* 21: 3749-3758
- Budhwar R, Fang G, Hirsch JP. (2011)** Kelch repeat proteins control yeast PKA activity in response to nutrient availability. *Cell Cycle.*;10(5):767-70.
- Bungard D, Reed M, Winter E. (2004)** RSC1 and RSC2 are required for expression of mid-late sporulation-specific genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*; 3(4):910-8.
- Caesar S, Greiner M, Schlenstedt G. (2006)** Kap120 functions as a nuclear import receptor for ribosome assembly factor Rpf1 in yeast. *Mol Cell Biol*;26(8):3170-80.
- Cai L, Dalal C. K, Elowitz M. B. (2008)** Frequency-modulated nuclear localization bursts coordinate gene regulation. *Nature*;455(7212):485-90.
- Cairns BR, Lorch Y, Li Y (1996)** RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell* 1996; 87:1249-1260.
- Cairns BR (2009)** The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters. *Nature* 461, 193–198.
- Campos EI, Reinberg D (2009)** Histones: annotating chromatin. *Annu Rev Genet.* ;43:559-99.
- Capaldi AP, Kaplan T, Liu Y, Habib N, Regev A, Friedman N, O'Shea EK. (2008)** Structure and function of a transcriptional network activated by the MAPK Hog1. *Nat Genet.*(11):1300-6.
- Cardarelli F, Gratton E (2010)** In Vivo Imaging of Single-Molecule Translocation Through Nuclear Pore Complexes by Pair Correlation Functions. *PLoS ONE*, Volume 5. Issue 5.
- Cardona F, Del Olmo ML, Aranda A. (2012)** Phylogenetic origin and transcriptional regulation at the post-diauxic phase of SPI1, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol Lett.* Sep;17(3):393-407.
- Carter D.R.F., Eskiw C., Cook P.R., (2008)** Transcription factories, *Biochem. Soc. Trans.* 36 585–589.
- Casamayor A, Torrance PD, Kobayashi T, Thorner J, Alessi DR (1999)** Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Curr Biol* 9: 186-197
- Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES, Young RA (2001)** Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell* 12: 323-337
- Chaves S. R, Rosenblum J.S (2011)** Efficient Nuclear Transport of Structurally Disturbed Cargo: Mutations in a Cargo Protein Switch Its Cognate Karyopherin. *PLoS ONE* 6(2): e16846.
- Chen X, Xu L, (2011)** Mechanism and regulation of nucleocytoplasmic trafficking of smad. *Cell Biosci*;1(1):40.
- Chrivia JC, Uhler MD, McKnight GS (1988)** Characterization of genomic clones coding for the C alpha and C beta subunits of mouse cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 263: 5739-5744
- Clapier CR, & Cairns, B. R (2009)** The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 273–304.
- Clotet, J. & Posas, F. (2007)** Control of cell cycle in response to osmotic stress: lessons from yeast. *Methods Enzymol.* 428, 63.

- Collinson, L.P. & I.W. Dawes. (1995)** Isolation, characterization and overexpression of the yeast gene, GLR1, encoding glutathione reductase. *Genes Dev.* 156:123-127
- Colombo S, Ma P, Cauwenberg L, Winderickx J, Crauwels M, Teunissen A, Nauwelaers D, de Winde JH, Gorwa MF, Colavizza D, Thevelein JM (1998)** Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 17: 3326-3341.
- Colombo S, Ronchetti D, Thevelein JM, Winderickx J, Martegani E (2004)** Activation state of the Ras2 protein and glucose-induced signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279: 46715-46722.
- Cooper TG (2002)** Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. *FEMS Microbiol Rev*;26(3):223-38.
- Damelin M, Simon I, Moy TI, (2002)** The genome-wide localization of Rsc9, a component of the RSC chromatin-remodeling complex, changes in response to stress. *Mol Cell*; 9:563-573.
- Darby MM, Serebreni L, Pan X, Boeke JD, Corden JL.(2012)** The *Saccharomyces cerevisiae* Nrd1-Nab3 transcription termination pathway acts in opposition to Ras signaling and mediates response to nutrient depletion. *Mol Cell Biol*; 32(10):1762-75.
- Darzacq X, Shav-Tal Y, de Turrís V, Brody Y, Shenoy SM (2007)** In vivo dynamics of RNA polymerase II transcription. *Nat Struct Mol Biol* 14: 796–806.
- de Nadal E, Casadomé L, Posas F. (2003)** Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol*;23(1):229-37.
- de Nadal E, Zapater M, Alepuz PM, Sumoy L, Mas G, Posas F. (2004)** The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmosensitive genes. *Nature*;427 (6972):370-4.
- de Nadal E, Real FX, Posas F. (2007)** Mucins, osmosensors in eukaryotic cells? *Trends Cell Biol*;17(12):571-4.
- de Nadal, E. & Posas, F (2010)** Multilayered control of gene expression by stress-activated protein kinases. *EMBO J.* 29, 4–13.
- de Nadal E, Ammerer G, Posas F. (2011)** Controlling gene expression in response to stress. *Nat Rev Genet*;12(12):833-45.
- De Virgilio C, Loewith R (2006a)** Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. *Oncogene* 25: 6392-6415
- De Virgilio C, Loewith R (2006b)** The TOR signalling network from yeast to man. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1476-1481
- Dechant R, Peter M (2008)** Nutrient signals driving cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 20: 678-687
- Degols G, Shiozaki K, Russell P. (1996)** Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*; 16(6):2870-7.
- Degols G, Russell P. (1997)** Discrete roles of the Spc1 kinase and the Atf1 transcription factor in the UV response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*; 17(6):3356-63.
- Delaunay, A., Isnard, A.D., & M.B. Toledano. (2000)** H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J.*(19):5157-66.

- Deuring R**, Fanti L, Armstrong JA (2000) The ISWI chromatin-remodeling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure in vivo. *Mol Cell*; 5:355-365.
- Diller TC**, Madhusudan, Xuong NH, Taylor SS. (2001) Molecular basis for regulatory subunit diversity in cAMP-dependent protein kinase: crystal structure of the type II beta regulatory subunit. *Structure*;9(1):73-82.
- Dolado I**, Nebreda AR. (2008) AKT and oxidative stress team up to kill cancer cells. *Cancer Cell*;14(6):427-9.
- Dong J, & Bai X (2011)** The membrane localization of Ras2p and the association between Cdc25p and Ras2-GTP are regulated by protein kinase A (PKA) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*;585(8):1127-34.
- Duch A**, de Nadal E, Posas F. (2012) The p38 and Hog1 SAPKs control cell cycle progression in response to environmental stresses. *FEBS Lett.*;586(18):2925-31.
- Duncan & Mackler (1966)** Electron transport systems of yeast. 3. Preparation and properties of cytochrome oxidase. *J Biol Chem*;241(8):1694-7.
- Fantozzi DA**, Harootunian AT, Wen W, Taylor SS, Feramisco JR, Tsien RY, Meinkoth JL (1994) Thermostable inhibitor of cAMP-dependent protein kinase enhances the rate of export of the kinase catalytic subunit from the nucleus. *J Biol Chem* 269: 2676-2686.
- Fernández-Cid A**, Vega M, Herrero P, Moreno F. (2012) Yeast importin- β is required for nuclear import of the Mig2 repressor. *BMC Cell Biol*;13:31.
- Ferretti AC**, Mattaloni SM, Ochoa JE, Larocca MC, Favre C. (2012) Protein kinase A signals apoptotic activation in glucose-deprived hepatocytes: participation of reactive oxygen species. *Apoptosis*;17(5):475-91.
- Ferrigno P**, Posas F, Koepp D, Saito H, Silver PA. (1998) Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *EMBO J*;17(19):5606-14.
- Field J**, Nikawa J, Broek D, MacDonald B, Rodgers L, Wilson IA, Lerner RA, Wigler M (1988) Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Mol Cell Biol* 8: 2159-2165.
- Fingar DC**, Blenis J. (2004) Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene*;23(18):3151-71.
- Freitas N**, Cunha C. (2009) Mechanisms and signals for the nuclear import of proteins. *Curr Genomics*;10(8):550-7.
- Fries T**, Betz C, Sohn K, Caesar S, Schlenstedt G, Bailer SM (2007) A Novel Conserved Nuclear Localization Signal Is Recognized by a Group of Yeast Importins. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* VOL. 282, NO. 27, pp. 19292–19301.
- Fondell JD.** (2013) The Mediator complex in thyroid hormone receptor action. *Biochim Biophys Acta*;1830(7):3867-75.
- Forwood JK**, Lange A, Zachariae U, Marfori M, Preast C, Grubmüller H, Stewart M, Corbett AH, Kobe B. (2010) Quantitative structural analysis of importin- β flexibility: paradigm for solenoid protein structures. *Structure*;18(9):1171-83.
- Franzusoff & Cirillo (1982)** Uptake and phosphorylation of 2-deoxy-D-glucose by wild-type and single-kinase strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*;688(2):295-304.

- Fuqiang Geng**, Brehon C Laurent (2003) Roles of SWI/SNF and HATs throughout the dynamic transcription of a yeast glucose-repressible gene *The EMBO Journal* Volume 23, Issue 1, 127–137.
- Fuda NJ**, Ardehali MB, Lis JT. (2009) Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription in vivo. *Nature*;461(7261):186-92.
- Gallelo F**, Portela P, Moreno S, Rossi S (2010) Characterization of substrates that have a differential effect on *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase A holoenzyme activation. *J Biol Chem* 285: 29770-29779
- Gamm DM**, Baude EJ, Uhler MD. (1996) The major catalytic subunit isoforms of cAMP-dependent protein kinase have distinct biochemical properties in vitro and in vivo. *J Biol Chem*;271(26):15736-42.
- Garmendia-Torres C**, Goldbeter A, Jacquet M. (2007) Nucleocytoplasmic oscillations of the yeast transcription factor Msn2: evidence for periodic PKA activation. *Curr Biol*;17(12):1044-9.
- Gasch AP**, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11: 4241-4257
- Görlich D**, Kutay U. (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 15:607-60.
- Görner W**, Durchschlag E, Martinez-Pastor MT, Estruch F, Ammerer G, Hamilton B, Ruis H, Schüller C. (1998) Nuclear localization of the C2H2zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev*; 12:586-597.
- Görner W**, Durchschlag E, Wolf J, Brown EL, Ammerer G, Ruis H, Schüller C. (2002) Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *EMBO J*;21(1-2):135-44.
- Gralla, E. & Vallentine J.S.** (1991) Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu, Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. *J. Bacteriol.* 173:5918-5920.
- Griffioen G**, Anghileri P, Imre E, Baroni MD, Ruis H (2000) Nutritional control of nucleocytoplasmic localization of cAMP-dependent protein kinase catalytic and regulatory subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275: 1449-1456.
- Griffioen G**, Branduardi P, Ballarini A, Anghileri P, Norbeck J, Baroni MD, 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. *Mol Cell Biol* 21: 511-523.
- Griffioen G, Thevelein JM** (2002) Molecular mechanisms controlling the localisation of protein kinase A. *Curr Genet* 41: 199-207.
- Grousl T**, Ivanov P, Frydlova I, Vasicova P, Janda F, Vojtova J, Malinska K, Malcova I, Novakova L, Janoskova D, Valasek L, Hasek J (2009) Robust heat shock induces eIF2alpha-phosphorylation-independent assembly of stress granules containing eIF3 and 40S ribosomal subunits in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 122: 2078-2088.
- Gupta DR**, Paul SK, Oowatari Y, Matsuo Y, Kawamukai M. (2011) Multistep regulation of protein kinase A in its localization, phosphorylation and binding with a regulatory subunit in fission yeast. *Curr Genet*;57(5):353-65.

- Hagiwara M**, Brindle P, Harootunian A, Armstrong R, Rivier J, Vale W, Tsien R, Montminy MR. (1993) Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Mol Cell Biol.*(8):4852-9.
- Hahn S**, Maurer P, Caesar S, Schlenstedt G. (2008) Classical NLS Proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 379, 678–694
- Hahn, JS, & Thiele DJ. (2004)** Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor under glucose starvation conditions by Snf1 protein kinase. *J. Biol. Chem.* 279:5169–5176.
- Hahn S**, Schlenstedt G. (2011) Importin β -type nuclear transport receptors have distinct binding affinities for Ran-GTP. *Biochem Biophys Res Commun*; 406(3):383-8.
- Hahn S**, Young ET. (2011) Transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation, and roles of activators and coactivators. *Genetics*;189(3):705-36.
- Halliwell B. (2006)** Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*; 97(6):1634-58.
- Hao N**, Budnik BA, Gunawardena J, O'Shea EK. (2013) Tunable signal processing through modular control of transcription factor translocation. *Science*; 339(6118):460-4.
- Hao N**, O'Shea EK. (2011) Signal-dependent dynamics of transcription factor translocation controls gene expression. *Nat Struct Mol Biol*;19(1):31-9.
- Harashima T**, Anderson S, Yates JR, 3rd, Heitman J (2006) The kelch proteins Gpb1 and Gpb2 inhibit Ras activity via association with the yeast RasGAP neurofibromin homologs Ira1 and Ira2. *Mol Cell* 22: 819-830.
- Harashima T, & Heitman J (2005)** Galpha subunit Gpa2 recruits kelch repeat subunits that inhibit receptor-G protein coupling during cAMP-induced dimorphic transitions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 16: 4557-4571.
- Harootunian AT**, Adams SR, Wen W, Meinkoth JL, Taylor SS, Tsien RY (1993) Movement of the free catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into and out of the nucleus can be explained by diffusion. *Mol Biol Cell* 4: 993-1002
- Heard E., & Bickmore W., (2007)** The ins and outs of gene regulation and chromosome territory organisation, *Curr. Opin. Cell Biol.* 19 311–316.
- Hiltunen JK**, Mursula AM, Rottensteiner H, Wierenga RK, Kastaniotis AJ, Gurvitz A. (2003) The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*;27(1):35-64. Review.
- Hohmann, S. (2003)** The osmotic stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast stress responses*. Germany, Springer:121-200.
- Hohmann, S (2002)** Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 300–372 (2002).
- Hohmann S**, Krantz M, Nordlander B. (2007) Yeast osmoregulation. *Methods Enzymol.* ;428:29-45. Review.
- Ho Y**, Gruhler A, Heilbut A, Bader GD, Moore L, Adams SL, Millar A, Taylor P, Bennett K, Boutillier K, Yang L, Wolting C, Donaldson I, Schandorff S, Shewnarane J, Vo M, Taggart J, Goudreault M, Muskat B, Alfarano C, Dewar D, Lin Z, Michalickova K, Willems AR, Sassi H, Nielsen PA, Rasmussen KJ, Andersen JR, Johansen LE, Hansen LH, Jespersen H, Podtelejnikov A, Nielsen

E, Crawford J, Poulsen V, Sørensen BD, Matthiesen J, Hendrickson RC, Gleeson F, Pawson T, Moran MF, Durocher D, Mann M, Hogue CW, Figeys D, Tyers M. (2002) Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*;415(6868):180-3.

Houge G, Steinberg RA, Ogreid D, Døskeland SO. (1990) The rate of recombination of the subunits (RI and C) of cAMP-dependent protein kinase depends on whether one or two cAMP molecules are bound per RI monomer. *J Biol Chem*;265(32):19507-16.

Hong SY, Roze LV, Linz JE. (2013a) Oxidative stress-related transcription factors in the regulation of secondary metabolism. *Toxins (Basel)* 5(4):683-702.

Hong, S.Y.; Roze, L.V.; Wee, J.; Linz, J.E. (2013b) Evidence that a transcription factor regulatory network coordinates oxidative stress response and secondary metabolism in *aspergilli*. *Microbiol.Open*, 2, 144–160.

Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, O'Shea EK (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425: 686-691.

Jacinto E, & Hall MN (2003) Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 117-126.

Jahnsen T, Hedin L, Kidd VJ, Beattie WG, Lohmann SM, Walter U, Durica J, Schulz TZ, Schiltz E, Browner M, et al. (1986) Molecular cloning, cDNA structure, and regulation of the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase from rat ovarian granulosa cells. *J Biol Chem* 261: 12352-12361.

Jarnaess E, & Taskén K. (2007) Spatiotemporal control of cAMP signalling processes by anchored signalling complexes. *Biochem Soc Trans*;35(Pt 5):931-7.

Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE. (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*;39(3 Pt 2):499-509.

Lott K, Cingolani G. (2011) The importin β binding domain as a master regulator of nucleocytoplasmic transport. *Biochim Biophys Acta*;1813(9):1578-92.

Khavari PA, Peterson CL, Tamkun JW, Mendel DB, Crabtree GR (1993) BRG1 contains a conserved domain of the SWI2/SNF2 family necessary for normal mitotic growth and transcription. *Nature*; 366:170-174.

Ki-Young Kim, Andrew W. Truman, and David E. Levin (2008) Yeast Mpk1 Mitogen-Activated Protein Kinase Activates Transcription through Swi4/Swi6 by a Noncatalytic Mechanism That Requires Upstream Signal MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, p. 2579–2589 Vol. 28, No. 8

Kim C, Xuong NH, Taylor SS (2005) Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RI α) subunits of PKA. *Science* 307: 690-696

Kiseleva E, Goldberg MW, Allen TD, Akey CW. (1998) Active nuclear pore complexes in *Chironomus*: visualization of transporter configurations related to mRNP export. *J Cell Sci*;111 (Pt 2):223-36.

Knutsen HK, Taskén KA, Eskild W, Jahnsen T, Hansson V. (1991) Adenosine 3',5'-monophosphate-dependent stabilization of messenger ribonucleic acids (mRNAs) for protein kinase-A (PKA) subunits in rat Sertoli cells: rapid degradation of mRNAs for PKA subunits is dependent on ongoing RNA and protein synthesis. *Endocrinology*;129(5):2496-502.

Kopperud R, Christensen AE, Kjarland E, Viste K, Kleivdal H, Døskeland SO (2002) Formation of inactive cAMP-saturated holoenzyme of cAMP-dependent protein kinase under physiological conditions. *J Biol Chem* 277: 13443-13448

- Kraakman L**, Lemaire K, Ma P, Teunissen AW, Donaton MC, Van Dijck P, Winderickx J, de Winde JH, Thevelein JM (1999) A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol Microbiol* 32: 1002-1012
- Kucsera J**, Yarita K, Takeo K (2000) Simple detection method for distinguishing dead and living yeast colonies. *J Microbiol Methods* 41: 19-21
- Kuge S**, Jones N, Nomoto A. (1997) Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J.* Apr 1;16(7):1710-20.
- Kumar A** (2008) Multipurpose transposon insertion libraries for large-scale analysis of gene function in yeast. *Methods Mol Biol* 416: 117-129
- Kuret J**, Johnson KE, Nicolette C, Zoller MJ (1988) Mutagenesis of the regulatory subunit of yeast cAMP-dependent protein kinase. Isolation of site-directed mutants with altered binding affinity for catalytic subunit. *J Biol Chem* 263: 9149-9154
- Kyriakis JM, & Avruch J.** (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*;81(2):807-69.
- Leadsham JE**, Gourlay CW. (2010) cAMP/PKA signaling balances respiratory activity with mitochondria dependent apoptosis via transcriptional regulation. *BMC Cell Biol*;11:92.
- Lee J**, Godon C, Lagniel G, (1999) Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem* 274: 16040–16046.
- Lee P**, Cho BR, Joo HS, Hahn JS. (2008) Yeast Yak1 kinase, a bridge between PKA and stress-responsive transcription factors, Hsf1 and Msn2/Msn4 *Molecular Microbiology* 70(4), 882–895.
- Leslie DM**, Zhang W, Timney BL, Chait BT, Rout MP, Wozniak RW, Aitchison JD. (2004) Characterization of Karyopherin Cargoes Reveals Unique Mechanisms of Kap121p-Mediated Nuclear Import. *Mol. Cell. Biol.* 2004, 24(19):8487
- Levin DE.** (2011) Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics.* Dec;189(4):1145-75.
- Levy FO**, Ree AH, Eikvar L, Govindan MV, Jahnsen T, Hansson V (1989) Glucocorticoid receptors and glucocorticoid effects in rat Sertoli cells. *Endocrinology* 124: 430-436
- Lewis JG**, Learmonth RP, Watson K (1995) Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 141 (Pt 3): 687-694
- Li XY, & Green MR.** (1996) Intramolecular inhibition of activating transcription factor-2 function by its DNA-binding domain. *Genes Dev.* 10, 517–527.
- Li H**, Tsang CK, Watkins M, Bertram PG, Zheng XF (2006) Nutrient regulates Tor1 nuclear localization and association with rDNA promoter. *Vol 442(7106):1058-61.Nature Letters.*
- Lippman SI**, Broach JR. (2009) Protein kinase A and TORC1 activate genes for ribosomal biogenesis by inactivating repressors encoded by Dot6 and its homolog Tod6. *Proc Natl Acad Sci U S A*;106(47):19928-33.
- Livas D**, Almering MJ, Daran JM, Pronk JT, Gancedo JM. (2011) Transcriptional responses to glucose in *Saccharomyces cerevisiae* strains lacking a functional protein kinase A. *BMC Genomics*;12:405.

- Liu Y**, Belkina NV, Graham C, Shaw S (2006) Independence of protein kinase C-delta activity from activation loop phosphorylation: structural basis and altered functions in cells. *J Biol Chem* 281: 12102-12111
- Lo WS**, Gamache ER, Henry KW, Yang D, Pillus L, Berger SL. (2005) Histone H3 phosphorylation can promote TBP recruitment through distinct promoter-specific mechanisms. *EMBO J*. Mar 9;24(5):997-1008. Epub 2005 Feb 17.
- Luikenhuis, S.**, Perrone, G., Dawes, I.W. & C.M. Grant. (1998) The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol. Biol. Cell* 9:1081-1091.
- MacKinnon MA**, Curwin AJ, Gaspard GJ, Suraci AB, Fernández-Murray JP, McMaster CR. (2009) The Kap60-Kap95 Karyopherin Complex Directly Regulates Phosphatidylcholine Synthesis. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* VOL. 284, NO. 11, pp. 7376–7384.
- Marion RM**, Regev A, Segal E, Barash Y, Koller D, Friedman N, O'Shea EK. (2004) Sfp1 is a stress- and nutrient-sensitive regulator of ribosomal protein gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*;101(40):14315-22.
- Marfori M**, Mynott A, Ellis JJ, Mehdi AM, Saunders NF, Curmi PM, Forwood JK, Bodén M, Kobe B. (2011) Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813- 1562–1577
- Martens JA, & Winston F.** (2003) Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. *Curr Opin Genet Dev*. Apr;13(2):136-42. Review.
- Martin BR**, Deerinck TJ, Ellisman MH, Taylor SS, Tsien RY. (2007) Isoform-specific PKA dynamics revealed by dye-triggered aggregation and DAKAP1alpha-mediated localization in living cells. *Chem Biol* (9):1031-42.
- Martinez-Bono B**, Quelas I, Zalve E, Igual JC. (2010) Yeast karyopherins Kap123 and Kap95 are related to the function of the cell integrity pathway. *FEMS Yeast Res* 10 (2010) 28–37
- Martínez-Montañés F**, Pascual-Ahuir A, Proft M. (2010) Toward a genomic view of the gene expression program regulated by osmotic stress in yeast. *OMICS* (6):619-27.
- Martinez-Pastor MT**, Marchler G, Schuller 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). *EMBO J* 15: 2227-2235
- Mas G**, de Nadal E, Dechant R, Rodríguez de la Concepción ML, Logie C, Jimeno-González S, Chávez S, Ammerer G, Posas F. (2009) Recruitment of a chromatin remodeling complex by the Hog1 MAP kinase to stress genes. *EMBO J*;28(4):326-36.
- Mayr B**, Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 599-609
- Mazon MJ**, Behrens MM, 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. *Eur J Biochem* 213: 501-506
- Mbonyi K**, Beullens M, Detremere K, Geerts L, Thevelein JM (1988) Requirement of one functional RAS gene and inability of an oncogenic ras variant to mediate the glucose-induced cyclic AMP signal in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 8: 3051-3057

- Mbonyi K**, van Aelst L, Arguelles JC, Jans AW, Thevelein JM (1990) Glucose-induced hyperaccumulation of cyclic AMP and defective glucose repression in yeast strains with reduced activity of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 10: 4518-4523
- Mellor J, & Morillon A.** (2004) ISWI complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*;1677(1-3):100-12.
- Meoli E**, Bossis I, Cazabat L, Mavrakis M, Horvath A, Stergiopoulos S, Shiferaw ML, Fumey G, Perlemoine K, Muchow M, Robinson-White A, Weinberg F, Nesterova M, Patronas Y, Groussin L, Bertherat J, Stratakis CA. (2008) Protein kinase A effects of an expressed PRKAR1A mutation associated with aggressive tumors. *Cancer Res.* 68, 3133–3141
- Michel JJ**, Scott JD. (2002) AKAP mediated signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 42:235-57
- Mirny LA.** (2010) Nucleosome-mediated cooperativity between transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*;107(52):22534-9.
- Morano KA**, Grant CM, Moyer-Rowley WS. (2012) The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*;190(4):1157-95.
- Mosammamaparast N**, Del Rosario BC, Pemberton LF. (2005) Modulation of Histone Deposition by the Karyopherin Kap114. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, p. 1764–1778
- Moye-Rowley WS.** (2002). Transcription factors regulating the response to oxidative stress in yeast. *Antioxid Redox Signal.* 4(1):123-40.
- Muller, E.** (1991) Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *J. Biol. Chem.* 266:9194-9202.
- Müller M**, Heym RG, Mayer A, Kramer K, Schmid M, et al. (2011) A Cytoplasmic Complex Mediates Specific mRNA Recognition and Localization in Yeast. *PLoS Biol* 9(4): e1000611.
- Murphy MP** (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.*;417(1):1-13.
- Murray DB**, Beckmann M, Kitano H (2007) Regulation of yeast oscillatory dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*,104:2241-2246
- Neuberger G.**, Schneider G., Eisenhaber F., (2007) pkaPS: prediction of protein kinase A phosphorylation sites with the simplified kinase-substrate binding model. *Biol. Direct* 2:1
- Nevitt T**, Pereira J, Rodrigues-Pousada C. (2004) YAP4 gene expression is induced in response to several forms of stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21: 1365–1374.
- Ng CH**, Tan SX, Perrone GG, Thorpe GW, Higgins VJ, Dawes IW (2008) Adaptation to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*: The role of NADPH-generating systems and the SKN7 transcription factor. *Free Radic Biol Med* 44(6):1131-45.
- Ni L**, Bruce C, Hart C, (2009) Dynamic and complex transcription factor binding during an inducible response in yeast. *Genes Dev* 23: 1351–1363.
- Nikawa J**, Sass P, Wigler M (1987) Cloning and characterization of the low-affinity cyclic AMP phosphodiesterase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7: 3629-3636
- Oyen O**, Sandberg M, Eskild W, Levy FO, Knutsen G, Beebe S, Hansson V, Jahnsen T (1988) Differential regulation of messenger ribonucleic acids for specific subunits of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-dependent protein kinase by cAMP in rat Sertoli cells. *Endocrinology* 122: 2658-2666

- Orstavik S**, Funderud A, Hafte TT, Eikvar S, Jahnsen T, Skálhegg BS. (2005) Identification and characterization of novel PKA holoenzymes in human T lymphocytes. *FEBS J*;272(7):1559-67.
- Okazaki S**, Naganuma A, Kuge S. (2005) Peroxiredoxin-mediated redox regulation of the nuclear localization of Yap1, a transcription factor in budding yeast. *Antioxid Redox Signal*; 7(3-4):327-34.
- Okazaki S**, Tachibana T, Naganuma A (2007) Multistep disulfide bond formation in Yap1 is required for sensing and transduction of H₂O₂ stress signal. *Mol Cell* 27: 675–688.
- Pan X & Heitman J** (2002) Protein kinase A operates a molecular switch that governs yeast pseudohyphal differentiation. *Mol Cell Biol* 22: 3981-3993
- Panté N**, Kann M. (2002) Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell*. (2):425-34.
- Park JI**, Grant CM, Dawes IW (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. *Biochem Biophys Res Commun* 327: 311-319
- Parmar JH**, Bhartiya S, Venkatesh KV. (2011) Characterization of the adaptive response and growth upon hyperosmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biosyst*.(4):1138-48.
- Pascual-Ahuir A**, Posas F, Serrano R, and Proft M (2001) Multiple levels of control regulate the yeast cAMP-response element-binding protein repressor Sko1p in response to stress. *J Biol Chem*, 276, 37373-37378.
- Pascual-Ahuir A**, Struhl K, and Proft M (2006) Genome-wide location analysis of the stress-activated MAP kinase Hog1 in yeast. *Methods*, 40, 272-278.
- Pascual-Ahuir A & Proft M** (2007) The Sch9 kinase is a chromatin-associated transcriptional activator of osmotic stress-responsive genes. *EMBO J*, 26, 3098-3108.
- Patel VP**, Chu CT. (2011) Nuclear transport, oxidative stress, and neurodegeneration. Review Article. *Int J Clin Exp Pathol*;4(3):215-229.
- Peeters T**, Louwet W, Gelade R, Nauwelaers D, Thevelein JM, Versele M (2006) Kelch-repeat proteins interacting with the Galpha protein Gpa2 bypass adenylate cyclase for direct regulation of protein kinase A in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 13034-13039
- Pelechano V**, Jimeno-González S, Rodríguez-Gil A, García-Martínez J, Pérez-Ortín JE, Chávez S. (2009) Regulon-specific control of transcription elongation across the yeast genome. *PLoS Genet*.(8):e1000614.
- Pereira J**, Pimentel C, Amaral C (2009) Yap4 PKA- and GSK3-dependent phosphorylation affects its stability but not its nuclear localization. *Yeast* 26: 641–653.
- Planta RJ and Mager WH** (1998) The list of cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14(5):471-7
- Pokholok DK**, Zeitlinger J, Hannett NM, Reynolds DB, Young RA (2006) Activated signal transduction kinases frequently occupy target genes. *Science* 313: 533-536
- Pollegioni L**, Sacchi S, Caldinelli L, Boselli A, Píloni MS, Piubelli L, Molla G. (2007) Engineering the properties of D-amino acid oxidases by a rational and a directed evolution approach. *Curr Protein Pept Sci* (6):600-18.

- Portela P.**, Moreno S., Rossi S (2006) Characterization of yeast pyruvate kinase 1 as a protein kinase A substrate, and specificity of the phosphorylation site sequence in the whole protein. *Biochem. J.* 396, 117–126
- Portela P & Moreno S (2006)** Glucose-dependent activation of protein kinase A activity in *Saccharomyces cerevisiae* and phosphorylation of its TPK1 catalytic subunit. *Cell Signal* 18: 1072-1086
- Posas F**, Chambers JR, Heyman JA, Hoeffler JP, de NE, and Arino J (2000) The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem*, 275, 17249-17255.
- Pray-Grant MG**, Daniel JA, Schieltz D, Yates JR 3rd, Grant PA (2005) Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature* 2005; 433:434-438.
- Proft M**, Pascual-Ahuir A, de NE, Arino J, Serrano R, and Posas F (2001) Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J*, 20, 1123-1133.
- Proft M**, Mas G, de NE, Vendrell A, Noriega N, Struhl K, and Posas F (2006) The stress-activated Hog1 kinase is a selective transcriptional elongation factor for genes responding to osmotic stress. *Mol Cell*, 23, 241-250.
- Proft M & Struhl K (2002)** Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol Cell*, 9, 1307-1317.
- Radonjic M**, Andrau JC, Lijnzaad P, Kemmeren P, Kockelkorn TT (2005) Genome-wide analyses reveal RNA polymerase II located upstream of genes poised for rapid response upon *S. cerevisiae* stationary phase exit. *Mol Cell* 18: 171–183.
- Raychaudhuri S**, Young BP, Espenshade PJ, Loewen C Jr. (2012) Regulation of lipid metabolism: a tale of two yeasts. *Curr Opin Cell Biol.*(4):502-8.
- Reinton N**, Haugen TB, Orstavik S, Skålhegg BS, Hansson V, Jahnsen T, Taskén K. (1998) The gene encoding the C gamma catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase is a transcribed retroposon. *Genomics*;49(2):290-7.
- Reiser V**, Ruis H, Ammerer G. (1999) Kinase activity-dependent nuclear export opposes stress-induced nuclear accumulation and retention of Hog1 mitogen-activated protein kinase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*;10(4):1147-61.
- Reiter W**, Watt S, Dawson K, Lawrence CL, Bähler J, Jones N, Wilkinson CR. (2008) Fission yeast MAP kinase Sty1 is recruited to stress-induced genes. *J Biol Chem*;283(15):9945-56.
- Rep M**, Reiser V, Gartner U, Thevelein JM, Hohmann S, Ammerer G, Ruis H. (1999) Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Mol Cell Biol*;8(8):5474-85.
- Rep, M.**, Krantz, M., Thevelein, J.M., & S. Hohmann. (2000) The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem* 275(12):8290-300. 108
- Ricote, M.**, García-Tuñón, I., Bethencourt, F., Fraile, B., Onsurbe, P., Paniagua, R., and Royuela, M. (2006) The p38 transduction pathway in prostatic neoplasia. *J. Pathol.* 208, 401–407.
- Rodriguez-Pousada CA**, Nevitt T, Menezes R, (2004) Yeast activator proteins and stress response: an overview. *FEBS Lett.* 567: 80–85.

- Rodrigues-Pousada C**, Menezes RA, Pimentel C (2010). The Yap family and its role in stress response. *Yeast*. (5):245-58.
- Rohde JR**, Bastidas R, Puria R, Cardenas ME (2008) Nutritional control via Tor signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol* 11: 153-160
- Rolland F**, De Winde JH, Lemaire K, Boles E, Thevelein JM, Winderickx J (2000) Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. *Mol Microbiol* 38: 348-358.
- Rothenbusch U**, Sawatzki M, Chang Y, Caesar S, Schlenstedt G. (2012) Sumoylation regulates Kap114-mediated nuclear transport. *The EMBO Journal* 31, 2461–2472
- Roze, L.V.**; Miller, M.J.; Farick, M.; Mahanti, N.; Linz, J.E. (2004) A novel cAMP-response element, CRE1, modulates expression of *nor-1* in *Aspergillus parasiticus*. *J. Biol. Chem.*, 279,27428–27439.
- Ruis, H. & Hamilton B..** (1992) Regulation of yeast catalase genes. In *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*, CSH Press:153-172.
- Rubio-Teixeira M**, Van Zeebroeck G, Voordeckers K, Thevelein JM (2010) *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane nutrient sensors and their role in PKA signaling. *FEMS Yeast Res* 10: 134-149.
- Ryan KJ**, Zhou Y, Wentz SR (2007) The Karyopherin Kap95 Regulates Nuclear Pore Complex Assembly into Intact Nuclear Envelopes In Vivo. *Molecular Biology of the Cell* Vol. 18, 886–898.
- Saha A**, Wittmeyer J, Cairns BR. (2002) Chromatin remodeling by RSC involves ATP-dependent DNA translocation. *Genes Dev*;16(16):2120-34.
- Saha A**, Wittmeyer J, Cairns BR. (2006) Mechanisms for nucleosome movement by ATP-dependent chromatin remodeling complexes. *Results Probl Cell Differ.*;41:127-48.
- Saito H & Posas F** (2012) Response to Hyperosmotic Stress *Genetics.*;192(2):289-318.
- Sample V**, DiPilato LM, Yang JH, Ni Q, Saucerman JJ, Zhang J. (2012) Regulation of nuclear PKA revealed by spatiotemporal manipulation of cyclic AMP. *NChemBio*. 8(4):375-82
- Santangelo GM** (2006) Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 253-282.
- Sastri M**, Barraclough DM, Carmichael PT, Taylor SS (2005) A-kinase-interacting protein localizes protein kinase A in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 349-354.
- Sato M**, Toda T. (2010) Space shuttling in the cell: nucleocytoplasmic transport and microtubule organization during the cell cycle. *Nucleus*;1(3):231-6.
- Saunders, A.**, Core, L. J. & Lis, J. T (2006) Breaking barriers to transcription elongation. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 7, 557–567.
- Schmelzle T**, Beck T, Martin DE, Hall MN (2004) Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. *Mol Cell Biol* 24: 338-351.
- Schmitt AP & McEntee K.** (1996) Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*;93(12):5777-82.

- Schneider R. & Grosschedl R. (2007)** Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression, *Genes Dev.* 21 3027–3043.
- Schroeder AJ,** Chen XH, Xiao Z, Fitzgerald-Hayes M (1999) Genetic evidence for interactions between yeast importin alpha (Srp1p) and its nuclear export receptor, Cse1p. *Mol Gen Genet* 261(4-5):788-95.
- Serrano, R. (1996)** Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int. Rev. of Cyt.* 165:1-52.
- Sha W,** Martins AM, Laubenbacher R, Mendes P, Shulaev V. (2013) The genome-wide early temporal response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by cumene hydroperoxide. *PLoS One*; 8(9):e74939.
- Shen X,** Mizuguchi G, Hamiche A, Wu C. (2000) A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature*;406(6795):541-4.
- Shen X,** Ranallo R, Choi E, Wu C. (2003) Involvement of actin-related proteins in ATP-dependent chromatin remodeling. *Mol Cell.* (1):147-55.
- Shimoi H,** Kitagaki H, Ohmori H, Imura Y, Ito K. (1998) Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance. *J Bacteriol*;180(13):3381-7.
- Shu W.,** H. Chen, X. Bo, S Wang (2011) Genome-wide analysis of the relationships between DNaseI HS, histone modifications and gene expression reveals distinct modes of chromatin domains, *Nucleic Acids Res.* 39 7428–7443
- Skalhegg BS,** Tasken K. (2000) Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci*;5:D678-93.
- Slattery MG,** Liko D, Heideman W (2008) Protein kinase A, TOR, and glucose transport control the response to nutrient depletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 7: 358-367.
- Smets B,** Ghillebert R, De Snijder P, Binda M, Swinnen E, De Virgilio C, Winderickx J (2010) Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 56: 1-32
- Sorokin AV,** Kim ER, Ovchinnikov LP. (2007) Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry (Mosc).* Dec;72(13):1439-57.
- Soulard A,** Cremonesi A, Moes S, Schütz F, Jenö P, Hall MN. (2010) The rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that TOR controls protein kinase A toward some but not all substrates. *Mol Biol Cell*;21(19):3475-86.
- Soutoglou, E. & Talianidis, I (2002)** Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation. *Science* 295, 1901–1904.
- Stewart M (2007)** Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *NATURE REVIEWS. Molecular Cell Biology.* Volume 8. (3):195-208.
- Straube K,** Blackwell JS Jr, Pemberton LF. (2010) Nap1 and Chz1 have separate Htz1 nuclear import and assembly functions. *Traffic*;11(2):185-97
- Sudarsanam P,** Iyer VR, Brown PO, Winston F (2000) Whole-genome expression analysis of snf/swi mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:3364-3369

- Taberner & Igual (2010)** Yeast karyopherin Kap95 is required for cell cycle progression at Start. *BMC Cell Biology* 2010, 11:47
- Tanaka K, Matsumoto K, Toh EA (1989)** IRA1, an inhibitory regulator of the RAS-cyclic AMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 9: 757-768
- Tasken K, Aandahl EM (2004)** Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev* 84: 137-167
- Taskén K, Skålhegg BS, Solberg R, Andersson KB, Taylor SS, Lea T, Blomhoff HK, Jahnsen T, Hansson V. (1993)** Novel isozymes of cAMP-dependent protein kinase exist in human cells due to formation of RI alpha-RI beta heterodimeric complexes. *J Biol Chem*;268(28):21276-83.
- Taskén KA, Knutsen HK, Attramadal H, Taskén K, Jahnsen T, Hansson V, Eskild W. (1991)** Different mechanisms are involved in cAMP-mediated induction of mRNAs for subunits of cAMP-dependent protein kinases. *Mol Endocrinol*;5(1):21-8.
- Tautz D and Renz M (1983)** An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal Biochem*, 132, 14-19.
- Taylor SS, Kim C, Vigil D, Haste NM, Yang J, Wu J, Anand GS (2005)** Dynamics of signaling by PKA. *Biochim Biophys Acta* 1754: 25-37.
- Temple MD, Perrone GG, Dawes IW. (2005)** Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol. Jun*;15(6):319-26.
- Thevelein JM (1994)** Signal transduction in yeast. *Yeast* 10: 1753-1790.
- Thevelein JM, de Winde JH (1999)** Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 33: 904-918.
- Thevelein JM, Cauwenberg L, Colombo S, De Winde JH, Donation M, Dumortier F, Kraakman L, Lemaire K, Ma P, Nauwelaers D, Rolland F, Teunissen A, Van Dijck P, Versele M, Wera S, 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 Microb Technol* 26: 819-825.
- Tkach JM, Yimit A, Lee AY, Riffle M, Costanzo M, Jaschob D, Hendry JA, Ou J, Moffat J, Boone C, Davis TN, Nislow C, Brown GW. (2012)** Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. *Nat Cell Biol.*(9):966-76.
- Toledano MB, Delaunay A, Monceau L, Tacnet F. (2004)** Microbial H₂O₂ sensors as archetypical redox signaling modules. *Trends Biochem Sci* 29: 351–357.
- Toone WM, Jones N. (1998)** Stress-activated signalling pathways in yeast. *Genes Cells.* (8):485-98. Review.
- Toda T, Cameron S, Sass P, Zoller M, Scott JD, McMullen B, Hurwitz M, Krebs EG, Wigler M (1987a)** Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7: 1371-1377
- Toda T, Cameron S, Sass P, Zoller M, Wigler M (1987b)** Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50: 277-287
- Tran HG, Steger DJ, Iyer VR, Johnson AD (2000)** The chromo domain protein chd1p from budding yeast is an ATP-dependent chromatin-modifying factor. *EMBO J*; 19:2323-2331

- Tsukiyama T**, Daniel C, Tamkun J, Wu C (1995) ISWI, a member of the SWI2/SNF2 ATPase family, encodes the 140 kDa subunit of the nucleosome remodeling factor. *Cell* 1; 83:1021-1026.
- Tsukuda T**, Fleming AB, Nickoloff JA, Osley MA (2005) Chromatin remodelling at a DNA double-strand break site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 438:379-383.
- 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. *Eur J Cell Biol.*(4):339-48.
- Tudisca V**, Haesendonckx S, Voordeckers K, Moreno S, Thevelein JM, Portela P (2012) The activation loop of PKA catalytic isoforms is differentially phosphorylated by Pkh protein kinases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 448, 307–320.
- Urban J**, Soulard A, Huber A, Lippman S, Mukhopadhyay D, Deloche O, Wanke V, Anrather D, Ammerer G, Riezman H, Broach JR, De Virgilio C, Hall MN, Loewith R. (2007) Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell.* 26(5):663-74.
- Ubersax & Ferrell 2007**. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7): 530-41.
- van Attikum H**, Fritsch O, Gasser SM, (2007) Distinct roles for SWR1 and INO80 chromatin remodeling complexes at chromosomal double-strand breaks. *EMBO J* 26(18):4113-25.
- Vandamme J**, Castermans D, Thevelein JM. (2012) Molecular mechanisms of feedback inhibition of protein kinase A on intracellular cAMP accumulation. *Cell Signal.* Aug;24(8):1610-8.
- Vendrell A**, Posas F. (2011) Sir2 plays a key role in cell fate determination upon SAPK activation. *Aging (Albany NY)* 3 (12):1163-8.
- Vigil D**, Blumenthal DK, Brown S, Taylor SS, Trewhella J (2004) Differential effects of substrate on type I and type II PKA holoenzyme dissociation. *Biochemistry* 43: 5629-5636
- Voordeckers K**, Kimpe M, Haesendonckx S, Louwet W, Versele M, Thevelein JM (2011) Yeast 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) orthologs, Pkh1-3, differentially regulate phosphorylation of PKA and the PKB/S6K ortholog, Sch9. *J Biol Chem* 286(25):22017-27.
- Wagner, E. F. (2001)** AP-1. Introductory remarks. *Oncogene* 20, 2334–2335
- Wang W**, Cote J, Xue Y (1996) Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex. *EMBO J* 1996; 15:5370-5382.
- Wang Y.**, Pierce M., Schnepfer L., Guldal C. G., Zhang X. (2004) Ras and Gpa2 mediate one branch of a redundant glucose signaling pathway in yeast. *PLoS Biol.* 2: E128.
- Warner JR (1999)** The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *TrendsBiochem Sci* 24: 437–440.
- Warner JR & McIntosh KB (2009)** How Common are Extra-ribosomal Functions of Ribosomal Proteins? *Mol Cell* 34: 3–11.
- Wei Yuehua**, Chi Kwan Tsang and XF Steven Zheng (2009) Mechanisms of regulation of RNA polymerase III-dependent transcription by TORC1. *The EMBO Journal* 28, 2220–2230.
- Wen W**, Harootunian AT, Adams SR, Feramisco J, Tsien RY, Meinkoth JL, Taylor SS. (1994) Heat-stable inhibitors of cAMP-dependent protein kinase carry a nuclear export signal. *J Biol Chem* 269(51): 32214-20.

- Wente SR**, Rout MP (2010) The Nuclear Pore Complex and Nuclear Transport. Cold Spring Harb Perspect Biol 2:a000562
- Werner-Washburne M**, Braun E, Johnston GC, Singer RA (1993) Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 57: 383-401.
- 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. *J Biol Chem* 266: 19704-19709.
- Wieser R**, Adam G, Wagner A, Schuller C, Marchler G, Ruis H, Krawiec Z, Bilinski T (1991) Heat shock factor-independent heat control of transcription of the CTT1 gene encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 266: 12406-12411.
- Wu Pei-Yun Jenny**, Christine Ruhlmann, Fred Winston, and Patrick Schultz (2004) Molecular Architecture of the *S. cerevisiae* SAGA Complex Molecular Cell, Vol. 15, 199–208.
- Wullschlegel S**, Loewith R, Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124: 471-484.
- Wullschlegel S**, Loewith R, Oppliger W, Hall MN (2005) Molecular organization of target of rapamycin complex 2. *J Biol Chem* 280: 30697-30704.
- Xiao Z**, McGrew JT, Schroeder AJ, Fitzgerald-Hayes M. (1993) CSE1 and CSE2, two new genes required for accurate mitotic chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13:4691–4702.
- Xiao H**, Sandaltzopoulos R, Wang HM (2001) Dual functions of largest NURF subunit NURF301 in nucleosome sliding and transcription factor interactions. *Mol Cell* 2001; 8:531-543.
- Yaakov G**, Bell M, Hohmann S, Engelberg D. (2003) Combination of two activating mutations in one HOG1 gene forms hyperactive enzymes that induce growth arrest. *Mol Cell Biol.* Jul; 23 (14): 4826-40.
- Yale J**, Bohnert HJ. (2001) Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *J Biol Chem.* May 11;276(19):15996-6007.
- Yamada, T.**, Yoshiyama, Y., and Kawaguchi, N. (1997) Expression of activating transcription factor-2 (ATF-2), one of the cyclic AMP-response element (CRE)-binding proteins, in Alzheimer disease and non-neurological brain tissues. *Brain Res.* 749, 329–334.
- Yan C**, Lee LH, Davis LI. (1998) Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *EMBO J.* 17: 7416–7429.
- Yang W.** (2013) Distinct, but not completely separate spatial transport routes in the nuclear pore complex. *Nucleus.* May-Jun;4(3):166-75.
- Yu J.**, J. Xiao, X. Ren, K. Lao, X.S. Xie, (2006) Probing gene expression in live cells, one protein molecule at a time, *Science* 311 1600–1603.
- Zaman S**, Lippman SI, Zhao X, Broach JR (2008) How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Genet* 42: 27-81.
- Zapater M**, Sohrmann M, Peter M, Posas F, and de NE (2007) Selective requirement for SAGA in Hog1-mediated gene expression depending on the severity of the external osmotic stress conditions. *Mol Cell Biol*, 27, 3900-3910.

Zhang, H. & Reese, J. C, (2007) Exposing the core promoter is sufficient to activate transcription and alter coactivator requirement at RNR3. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 8833–8838.

Zimmermann B, Chiorini JA, Ma Y, Kotin RM, Herberg FW (1999). PrKX is a novel catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase regulated by the regulatory subunit type I. *J Biol Chem* 274: 5370-5378.

Zippin JH, Farrell J, Huron D, Kamenetsky M, Hess KC, Fischman DA, Levin LR, Buck J. (2004) Bicarbonate-responsive “soluble” adenylyl cyclase defines a nuclear cAMP microdomain. *J. Cell Biol.* 164, 527–534.

Zoller MJ, Kuret J, Cameron S, Levin L, Johnson KE (1988). Purification and characterization of C1, the catalytic subunit of *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent protein kinase encoded by TPK1. *J Biol Chem* 263: 9142-9148.