

El polifosfat és un element clau durant la replicació del DNA.

Samuel Bru Rullo

Dipòsit Legal: B 27516-2015

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Universitat Internacional de Catalunya
Facultat de Medicina y Ciències de la Salut

El polifosfat és un element clau durant la replicació del DNA.

Samuel Bru Rullo

2015



El polifosfat és un element clau durant la replicació del DNA.

Samuel Bru Rullo

Memòria presentada per optar al títol de doctor per la
Universitat Internacional de Catalunya.
Barcelona, 2015

Treball dirigit pel Dr. Josep Clotet Erra de l'àrea de Ciències
Bàsiques de la Universitat Internacional de Catalunya.

Programa de Doctorat en Investigació en Salut de la
Universitat Internacional de Catalunya

Dr. Josep Clotet Erra

Director de tesis

Samuel Bru Rullo

Doctorand

A la meva família,

TRAJECTÒRIA

La meua tesi va començar al setembre del 2010 i finalitza al juliol del 2015. Durant aquests cinc anys he estat treballant en diferents projectes els quals m'han permès formar-me com a científic.

Durant els dos primers anys de tesi vaig col·laborar en els dos projectes que en aquell moment estaven en marxa al nostre grup. Aquests dos projectes van acabar sent publicats al 2013.

Primer, al gener del 2013 es va publicar el primer article, del qual sóc co-autor: *'Defective in Mitotic Arrest 1 (Dma1) ubiquitin ligase controls G1 cyclin degradation'*

I a l'abril d'aquest mateix any es va publicar el segon article del nostre grup, on estic de segon autor: *'Phosphate-Activated Cyclin-Dependent Kinase Stabilizes G1 Cyclin To Trigger Cell Cycle Entry'*

Durant aquests dos anys van començar aparèixer resultats preliminars del que més tard ha esdevingut el meu treball de tesi. Va ser a partir del setembre de 2012, i fins avui, quan he pogut estar plenament centrat en la pregunta de quines podrien ser les funcions del polifosfat en les cèl·lules eucariotes.

A continuació, passem ja a conèixer de què tracta aquesta tesi i quins resultats hem pogut obtenir.

ÍNDEX

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓ | 17 |
| 1. Organisme model: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 19 |
| 2. El cicle cel·lular..... | 21 |
| 3. Maquinària del cicle cel·lular..... | 23 |
| 4. Metabolisme dels dNTPs..... | 27 |
| 4.1 Visió general de la síntesi de dNTPs..... | 27 |
| 4.2 Complex de la ribonucleòtid reductasa (RNR)..... | 28 |
| 4.2.1 Estructura..... | 28 |
| 4.2.2 Mecanisme catalític i regulació al·lostèrica..... | 29 |
| 4.2.3 Regulació molecular..... | 30 |
| 4.3 Nucleòsid difosfat quinasa (NDK)..... | 31 |
| 4.4 Vies de síntesi de dNTPs: via de novo i via de salvament..... | 33 |
| 5. Resposta a dany a DNA i estrès replicatiu..... | 35 |
| 5.1 Mecanisme de resposta..... | 35 |
| 5.2 Via <i>Mec1/Rad53/Dun1</i> | 37 |
| 5.3 Nova via per controlar els nivells de dNTPs..... | 38 |
| 6. Relació del metabolisme del fosfat amb la síntesi de dNTPs..... | 39 |
| 6.1 Transport de fosfat..... | 39 |
| 7. Regulació de la captació de nutrients..... | 41 |
| 7.1 Via <i>cAMP-PKA</i> | 41 |
| 7.2 Via <i>TOR</i> | 41 |
| 7.3 Via <i>PHO</i> | 42 |
| 8. Metabolisme del polifosfat <i>S.cerevisiae</i> | 44 |

| | |
|--|-----------|
| 8.1 Què és el polifosfat?..... | 44 |
| 8.2 Quina és la seva funció?..... | 45 |
| 8.3 Quins són els enzims involucrats en el seu metabolisme?..... | 46 |
| 8.4 Com es regulen aquests enzims?..... | 47 |
| 9. Metabolisme del PolyP en mamífers..... | 48 |
| 10. Connexió entre el PolyP i els dNTPs..... | 49 |
| | |
| 2. HIPÒTESIS..... | 51 |
| | |
| 3. OBJECTIUS..... | 55 |
| 1. El PolyP sostén la síntesi del DNA..... | 57 |
| 2. El PolyP protegeix del dany a DNA..... | 57 |
| | |
| 4. MATERIAL I MÈTODES..... | 59 |
| 1. Soques utilitzades..... | 61 |
| 2. Condicions de cultiu..... | 62 |
| 3. Transformació de llevats..... | 62 |
| 4. Sincronització amb α -factor..... | 62 |
| 5. Citometria de flux..... | 63 |
| 6. Anàlisi de proteïnes per western-blot..... | 63 |
| 7. Extracció i quantificació de dNTPs..... | 64 |
| 8. Quantificació d'ortofosfat citoplasmàtic..... | 65 |
| 9. Augment del PolyP intracel·lular..... | 65 |
| 10. Purificació del PolyP en llevats..... | 66 |
| 11. Purificació del PolyP en cèl·lules HEK293..... | 67 |

| | |
|--|-----------|
| 12. Quantificació del PolyP..... | 68 |
| 13. Separació nucli-citoplasma..... | 68 |
| 14. Assaig de sensibilitat al dany DNA..... | 69 |
| 14.1 Llevats..... | 69 |
| 14.2 Cèl·lules HEK293..... | 69 |
| 14.3 Cèl·lules HDFa..... | 70 |
| 15. Anàlisi estadística..... | 70 |
| | |
| 5. RESULTATS..... | 71 |
| 1. Els nivells de PolyP estan regulats cíclicament..... | 73 |
| 2. Vtc4 i Ppn1 estan regulats cíclicament..... | 75 |
| 3. La síntesi de dNTPs es veu afectada pels nivells de PolyP..... | 77 |
| 4. Del PolyP depèn una correcta progressió pel cicle cel·lular..... | 78 |
| 5. Rellevància del PolyP en condicions fisiològiques..... | 81 |
| 6. El PolyP protegeix enfront la radiació ultraviolada..... | 83 |
| 6.1 Viabilitat dels mutants del metabolisme del PolyP..... | 84 |
| 6.2 Viabilitat dels mutants de la via PHO..... | 87 |
| 6.3 Viabilitat dels mutants del metabolisme dels dNTPs..... | 89 |
| 7. Un excés de PolyP confereix resistència enfront la radiació UV..... | 90 |
| 8. El PolyP confereix resistència contra altres agents mutagènics..... | 92 |
| 9. Es manté el rol protector del PolyP en cèl·lules de mamífer..... | 93 |
| 9.1 El PPX1 s'expressa perfectament en cèl·lules HEK293..... | 93 |
| 9.2 Ppx1 redueix els nivells de polyP en cèl·lules humanes..... | 94 |
| 9.3 El polyP protegeix de la radiació UV en cèl·lules humanes..... | 96 |
| 9.4 El polyP ens protegeix dels raigs solars..... | 97 |

| | |
|---|------------|
| 10. CPPED1, nova polifosfatasa humana..... | 99 |
| 10.1 El CPPED1 s'expressa perfectament en cèl·lules HEK293..... | 99 |
| 10.2 Cpped1 redueix els nivells de polyP en cèl·lules HEK293..... | 100 |
| 10.3 La sobreexpressió de CPPED1 provoca més sensibilitat a la llum UV..... | 101 |
| | |
| 6. DISCUSSIÓ..... | 103 |
| 1. El PolyP manté l'homeòstasi del fosfat durant la síntesi de dNTPs..... | 105 |
| 2. Regulació dels enzims..... | 107 |
| 3. Replicació del DNA sota condicions de baix fosfat..... | 109 |
| 4. Nou mecanisme per controlar els nivells de dNTPs..... | 110 |
| 5. Baixos nivells de PolyP possible causa d'inestabilitat genòmica..... | 112 |
| 6. Nova perspectiva de la nucleòsid difosfat quinasa..... | 114 |
| 7. El PolyP nou agent protector enfront al dany a DNA..... | 115 |
| 7.1 En llevats..... | 115 |
| 7.2 En cèl·lules HEK293..... | 117 |
| 7.3 En cèl·lules HDFa..... | 118 |
| 8. Noves funcions per una molècula tan antiga..... | 119 |
| | |
| 7 CONCLUSIONS..... | 121 |
| | |
| 8. RESUM EN ANGLÈS..... | 125 |
| | |
| 9. BIBLIOGRAFIA..... | 129 |

| | |
|--|------------|
| 10. ANNEXOS..... | 147 |
| 1. Protocol d'extracció i quantificació de dNTPs en llevats..... | 149 |
| 2. Protocol d'extracció i quantificació d'ortofosfat citoplasmàtic en llevats..... | 153 |
| 3. Protocol d'extracció de polyP en llevats..... | 157 |
| | |
| 11. RECONeixEMENTS..... | 165 |

INTRODUCCIÓ

1. ORGANISME MODEL: *Saccharomyces cerevisiae*

Al llarg de la història el llevat s'ha utilitzat com a organisme model en la investigació biomèdica. Per tant, no és possible començar aquesta tesi doctoral sense una breu presentació del model d'estudi utilitzat. Ha permès per una banda l'estudi funcional de diversos gens individuals, també poder investigar la interacció entre ells i finalment la possibilitat d'esbrinar complexos vies de senyalització, que han contribuït a entendre millor altres organismes eucariotes com ara l'ésser humà.

El llevat disposa d'una sèrie de avantatges que el fan idoni com a organisme model de laboratori. És fàcil de cultivar, fàcil de manipular genèticament (Botstein and Fink, 1988) i es disposa de tota la seva informació genètica, ja que va ser el primer eucariota en ser seqüenciat (Dujon, 1996). A més, una gran part dels seus gens es conserven en humans, i molts d'ells es troben implicats en la regulació del cicle cel·lular (Foury, 1997). Per aquesta raó el llevat és un dels millors models per investigar com funciona la maquinària del cicle cel·lular, procés complex a la vegada que imprescindible.

El llevat és un organisme unicel·lular que depèn exclusivament de les condicions del medi on creix, per aquesta raó els mecanismes que han desenvolupat per detectar els canvis a l'ambient són molt importants per generar una resposta adequada i garantir la viabilitat cel·lular. En particular, *Saccharomyces cerevisiae* creix perfectament en fruites, flors i altres substrats rics en sucres. Utilitza diversos sucres com a font de carboni (glucosa, maltosa, fructosa, sacarosa, rafinosa), i també poden usar fonts de carboni no fermentables com acetat, etanol o glicerol.

Al seu ambient natural, les cèl·lules de *S. cerevisiae* estan exposades a una gran variabilitat respecte a la quantitat de nutrients, temperatura, pH, radiació, disponibilitat d'oxigen i aigua (Hohmann, 2002) però això no representa un gran problema, ja que poden tolerar un ampli espectre de condicions ambientals. Aquesta gran variabilitat de condicions requereix diferents estats fisiològics en pro de maximitzar la supervivència cel·lular. Disposen de mecanismes de

senyalització que assegurin la detecció i resposta a diverses situacions, com canvis de pH (Arino, 2010), temperatura (Jenkins, 2003), pressió osmòtica (de Nadal et al., 2002) o disponibilitat de nutrients (Dann and Thomas, 2006). La majoria d'aquests mecanismes es mantenen en organismes pluricel·lulars i estan implicats en diverses patologies.

L'elegància dels experiments desenvolupats en *S. cerevisiae* ha contribuït substancialment al coneixement científic de les últimes dècades i continua sent un suport molt útil on poder investigar noves aproximacions moleculars.

2. EL CICLE CEL·LULAR

Saccharomyces cerevisiae és un organisme eucariota capaç de dividir-se de forma sexual i asexual. La reproducció asexual, poc habitual en eucariotes, es produeix per gemmació on la cèl·lula mare produeix una petita gemma o protuberància que anirà creixent al llarg del cicle i que albergarà el material hereditari que s'ha duplicat, per finalment separar-se i convertir-se amb la cèl·lula filla. Per tant, per mitjà d'una sèrie d'esdeveniments que es donen al llarg del cicle, s'obtingran dues cèl·lules de diferent mida però genèticament idèntiques (Figura1).

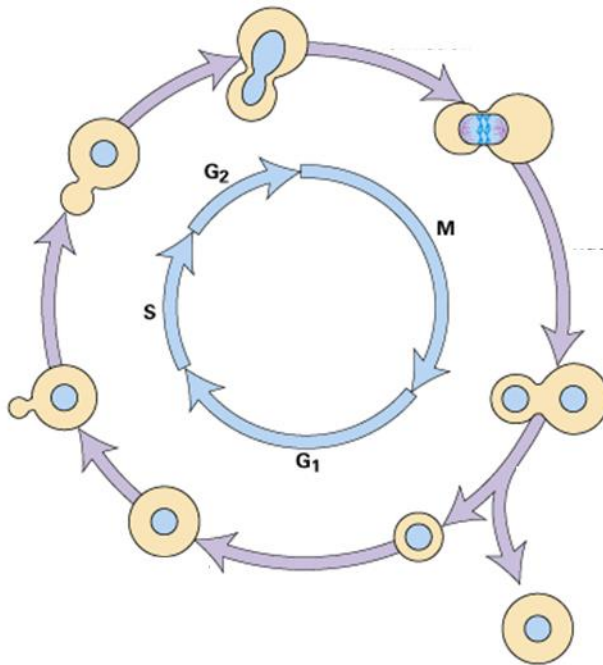


Figura 1. Cicle cel·lular de *S. cerevisiae*. Es representa l'evolució morfològica de *S. cerevisiae* durant les quatre fases del cicle (G₁, S, G₂ i M). Adaptada de Johns Hopkins University.

El cicle cel·lular està dividit en quatre fases: G_1 , S, G_2 i M. Durant la primera fase del cicle, G_1 , el llevat ha d'augmentar la seva grandària i a més s'ha de preparar per afrontar un dels esdeveniments més importants, sinó el que més, com és la duplicació del material genètic. Durant aquesta fase la cèl·lula presentarà una alta activitat transcripcional i traduccional que permetrà sintetitzar totes les proteïnes necessàries per la duplicació del DNA. A final de G_1 la cèl·lula es trobarà en un punt de no retorn anomenat *START* (Johnston et al., 1977), on la cèl·lula que tingui la mida mínima i visqui en un medi favorable es compromet a acabar el cicle de divisió que ha iniciat. A continuació la cèl·lula entrarà a la fase S, on es duplicarà el material genètic i es produirà el creixement polaritzat de la gemma, que donarà lloc a la cèl·lula filla i que albergarà una còpia d'aquest material hereditari. A la següent fase, G_2 , la cèl·lula s'encarregarà de preparar la maquinària necessària per entrar a mitosi a més de comprovar que el DNA s'ha duplicat correctament; durant G_2 la gemma continuarà creixent però ara ho farà de forma isotròpica. Finalment, la cèl·lula arribarà a mitosi, o fase M, on el DNA es condensa, els cromosomes s'alineen a la placa metafàsica, i es segreguen les cromàtides germanes. En tot aquest procés, hi ha una sèrie de proteïnes encarregades de governar cada una de les fases.

3. MAQUINÀRIA DEL CICLE CEL·LULAR

Experiments bioquímics i genètics han descrit a les CDKs (acrònim provinent de l'anglès *Cyclin Dependent Kinases*) i a les seves ciclines com a peces clau en la regulació del cicle cel·lular.

S. cerevisiae posseeix 6 CDKs diferents, l'activitat i l'especificitat de les quals dependrà de la unió a subunitats proteíniques conegudes com ciclines. Aquesta unió canvia la conformació de la CDK, permetent que el complex quedi activat. Les CDKs són generalment identificades gràcies a la presència d'una seqüència canònica, compartida per altres membres d'aquesta família prop de l'extrem N-terminal, conegut com a motiu PSTAIRE (Jeffrey et al., 1995). D'altra banda, el genoma de *S. cerevisiae* codifica 23 ciclines reconegudes per la presència d'un domini conservat conegut com *cyclin box*, regió necessària per a la unió i activació de la CDK (Evans et al., 1983; Kobayashi et al., 1992). Les parelles CDKs ciclines conegudes fins ara en *S. cerevisiae* es troben descrites a la taula 1. De totes aquestes quinases, Cdc28 i Pho85 son les encarregades de regular el cicle cel·lular.

| CDK | CICLINA | FUNCIÓ |
|-------|------------------------|--|
| Cdc28 | Cln1, Cln2, Cln3 | Essencials per START: duplicació del corpuscle polar, gemmació i creixement polaritzat, proteòlisis de Sic1, activació de la transcripció a G ₁ , adquisició de resistència a feromona. |
| | Clb5, Clb6 | Replicació del DNA. |
| | Clb1, Clb2, Clb3, Clb4 | Essencial per mitosis: assemblatge del fus, inactivació de transcripció de CLN, supressió del creixement polaritzat de la gemma, repressió de SBF. |
| Pho85 | Pcl1, Pcl2, Clg1 | Necessàries per START en absència de Cln1 i Cln2, morfogènesis. |
| | Pcl9 | Regulador negatiu de Whi5 |
| | Pho80 | Regulador negatiu de la via PHO: inhibeix la localització nuclear de Pho4. |
| | Pcl5 | Regulador negatiu de la biosíntesis d'aminoàcids mitjançant Gcn4. |
| | Pcl6, Pcl7 | Regulador positiu de la segregació cromosòmica: activa a Glc8. |
| | Pcl8, Pcl10 | Regulador negatiu de la glucogen sintasa 2 (Gsy2). |
| | Kin28 | Ccl1 |
| Srb10 | Srb11 | Regulador de transcripció. |
| Ctk1 | Ctk2 | Regulador de transcripció. |
| Sgv1 | Bur2 | Regulador de transcripció. |

Taula 1 CDKs i ciclines de *S. cerevisiae*. Resum de la funció dels diferents complexos CDK-ciclina.

Cdc28 és el principal coordinador del cicle cel·lular de *S. cerevisiae* (Hartwell, 1973). Tal i com s'ha esmentat, la seva activitat i especificitat està controlada per la unió a diferents ciclines i inhibidors específics de cada fase. Les ciclines de Cdc28 estan classificades en dos grups: les ciclines de G₁ (Cln1, Cln2 i Cln3) i les ciclines tipus B (Clb1, Clb2, Clb3, Clb4, Clb5 i Clb6). A G₁ el complex Cdc28-Cln3, principal activador de *START* (Stuart and Wittenberg, 1995), serà l'encarregat de fosforilar Whi5, inhibidor dels factors de transcripció heterodimèrics SBF (*Swi4 cell cycle box binding factor*) i MBF (*Mlu1 cell cycle box binding factor*), permetent que comenci la transcripció de *START*. El complex SBF està format per les proteïnes Swi4 i Swi6, i serà l'encarregat de promoure la transcripció de *CLN1* i *CLN2*, mentre que el complex MBF està format per les proteïnes Mbp1 i Swi6, i serà l'encarregat de promoure la transcripció de *CLB5* i *CLB6*. A més, el complex Cdc28-Cln2 serà el responsable de fosforilar Sic1 (Schwob et al., 1994), el principal inhibidor del complex Cdc28-Clb5. Un cop Sic1 està fosforilat serà degradat i el complex Cdc28-Clb5 serà actiu per promoure l'entrada en S (Schwob and Nasmyth, 1993), fosforilant components del complex pre-replicatiu per poder activar els orígens de replicació (Dahmann et al., 1995). A la fase S apareixen Clb3 i Clb4, que contribueixen en la replicació del DNA i l'assemblatge del fus mitòtic (Richardson et al., 1992). Finalment, apareixen Clb1 i Clb2 abans d'anafase que promouen creixement isotròpic de la gemma, segregació de cromosomes i inhibició d'esdeveniments específics de G₁.

L'altra CDK responsable de dirigir el cicle és Pho85, aquesta és una CDK multifuncional que regula la progressió per G₁, polaritat cel·lular, citoesquelet d'actina, metabolisme del fòsfat i glucogen i senyalització de canvis en l'ambient (Carroll and O'Shea, 2002). Tot i aquests rols, Pho85 no és essencial per la viabilitat cel·lular, almenys en condicions de laboratori fet que a portat alguns investigadors a considerar Pho85 com un element poc rellevant en el control del cicle cel·lular. Igual que en Cdc28, serà la unió a les diferents ciclines el que determinarà l'activitat i l'especificitat d'aquesta CDK.

Pcl1, Pcl2 i Pcl9 s'expressen específicament a G₁ i Pcl7 té el pic d'expressió durant fase S; Pcl2 i Pcl9 s'expressaran des de final de M fins a principi de G₁, mentre que Pcl1 s'expressa a final de G₁ coincidint amb Cln1 i Cln2 (Measday et al., 1997). La funció principal de Cln1, Cln2, Pcl1 i Pcl2 és la de dirigir la morfogènesi, de fet una soca *cln1/cln2Δ* i *pcl1/pcl2Δ* és letal. Aquesta soca duplica el DNA però no pot dividir-se degut als greus problemes de morfogènesi (Moffat and Andrews, 2004).

La correcta expressió de totes aquestes ciclins, en cada una de les fases, resultarà clau per garantir una correcta proliferació cel·lular, ja que qualsevol alteració durant el cicle podria comportar conseqüències fatals a l'organisme en qüestió, com per exemple el desenvolupament d'un procés tumoral (Maddika et al., 2007). Per garantir aquesta regulació, durant el cicle hi haurà diferents punts de control anomenats *checkpoints*. L'activació d'aquests desencadenarà una sèrie de respostes implicades, principalment, en parar o alentir la progressió pel cicle, en reparar el dany ocasionat, i si aquest dany és de gran magnitud la cèl·lula activarà vies d'apoptosis. Un dels *checkpoints* més ben estudiats és el de resposta al estrès replicatiu.

4. METABOLISME DELS dNTPs

La correcta duplicació del genoma depèn d'una aportació constant de dNTPs durant la fase S. Normalment, aquests precursors del DNA són el factor limitant a l'hora de la replicació del DNA; en conseqüència, qualsevol factor que pugui estar modificant els nivells de dNTPs, tindrà un impacte directe sobre la progressió de la forquilla de replicació, (Poli et al., 2012) desencadenant-se una situació d'estrès replicatiu.

4.1 Visió general de la síntesi de dNTPs

La síntesi de dNTPs és un procés complex que comença a final de G₁ i es manté durant tota la fase S (Kumar et al., 2010). Es produeix al citosol o a la mitocòndria (Pontarin et al., 2008; Rampazzo et al., 2010). Durant la transició G₁/S s'indueix l'expressió de molts enzims encarregats de catalitzar les diferents reaccions que es produeixen en aquest procés (Reichard, 1988), provocant de sobte un augment de la concentració intracel·lular de dNTPs justament abans d'entrar a fase S (Chabes et al., 2003; Koc et al., 2004). De totes les reaccions n'hi ha dos que són clau perquè es pugui realitzar correctament la síntesi (Figura 2). La primera, està catalitzada per l'enzim central de la via de síntesi, la ribonucleòtid reductasa que s'encarregarà de transformar els nucleòsids difosfat (NDPs) en deoxinucleòsids difosfat (dNDPs). I la segona, està catalitzada per la nucleòsid difosfat quinasa (NDK) que s'encarregarà de transformar els dNDPs a deoxinucleòsids trifosfat (dNTPs) amb l'aportació d'energia en forma d'ATP. A continuació es passarà a explicar en més detall la bioquímica d'aquests enzims.



Figura 2 Reaccions clau en la síntesi de dNTPs. El complex RNR s'encarrega de transformar els NDPs en dNDPs, i aquests seran substrat de la NDK per acabar formant dNTPs.

4.2 Complex de la ribonucleòtid reductasa (RNR)

4.2.1 Estructura

En quasi tots els eucariotes el complex RNR està format per una subunitat gran i una subunitat petita (Nordlund and Reichard, 2006). A *S. cerevisiae* *RNR1* i *RNR3* codifiquen les subunitats grans, mentre que *RNR2* i *RNR4* codifiquen les subunitats petites. Sota condicions normals, el complex RNR està format per un homodímer de Rnr1 acoblat a un heterodímer Rnr2/Rnr4.

Rnr1 és la subunitat gran principal i essencial pel creixement cel·lular (Elledge and Davis, 1990). La seva expressió s'indueix a final de G₁ i els nivells proteínics es mantenen durant tota la fase S (Mazumder et al., 2013). Aquesta subunitat es troba constitutivament al citosol (Yao et al., 2003), i sobre ella recau la funció catalítica i de regulació al·lostèrica (Figura 3). La subunitat Rnr3 s'expressa majoritàriament sota condicions d'estrès replicatiu (Elledge and Davis, 1990), al següent apartat s'explicarà amb més detall aquesta subunitat.

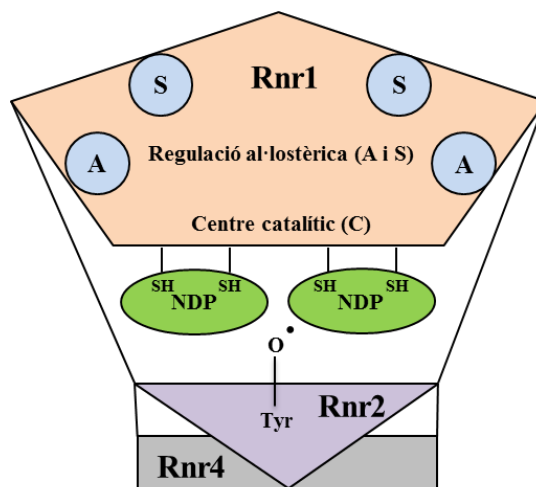


Figura 3 Representació bàsica del complex RNR. La subunitat Rnr1 (taronja) conté el centre catalític (C) i els diferents llocs de regulació al·lostèrica (blau): el que dóna especificitat pel substrat (S) i el que controla l'activitat enzimàtica (A). La subunitat Rnr2 (lila) conté el radical tirosil imprescindible per poder dur a terme la reacció. I la subunitat Rnr4 (gris) encarregada de facilitar la formació del radical tirosil i d'estabilitzar l'heterodímer Rnr2/Rnr4.

L'heterodímer Rnr2/Rnr4 també és essencial pel creixement cel·lular (Huang and Elledge, 1997). Aquestes subunitats es troben localitzades al nucli i, sota condicions normals, a final de G₁ una petita part d'aquestes són translocades cap al citoplasma per interaccionar amb l'homodímer de Rnr1 i formar el complex actiu (Yao et al., 2003). Rnr2 és la subunitat on es forma un radical tirosil indispensable per l'activitat catalítica (Voegtli et al., 2001). Per la seva banda Rnr4 és la responsable de facilitar la formació d'aquests radicals sobre Rnr2 i d'estabilitzar la unió de l'heterodímer (Figura 3).

4.2.2 Mecanisme catalític i regulació al·lostèrica

El conjunt de reaccions catalitzades pel complex RNR estan descrites al peu de la figura 4, en resum, es produeix la substitució del grup hidroxil del carboni dos de la ribosa per un hidrogen, d'aquesta forma es passa d'un nucleòsid difosfat a un deoxinucleòsid difosfat.

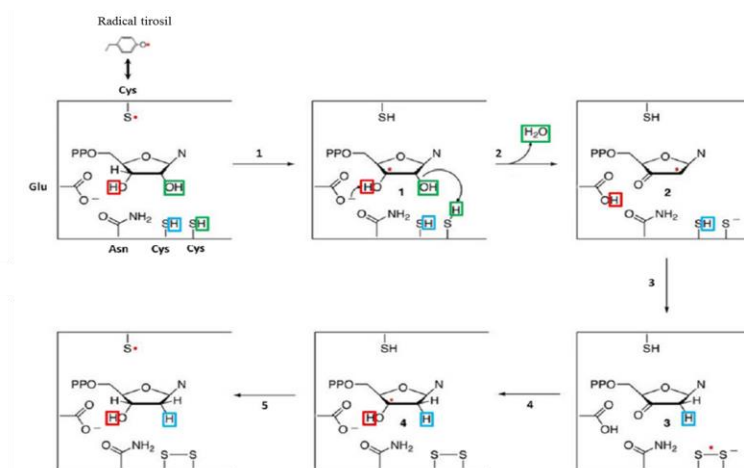


Figura 4 Conjunt de reaccions per passar de NDPs a dNDPs. El radical tirosil accepta l'hidrogen del carboni 3 (C₃) de la ribosa (1), llavors el grup hidroxil del C₂ accepta un hidrogen d'un tiol present al centre actiu de la RNR per formar una molècula d'aigua (2). És ara quan es produeix la reducció C₂ per l'acceptació d'un hidrogen de l'altre tiol de la RNR (3). Per últim el C₃ recupera els dos hidrogens que havia cedit, un al glutamat i l'altre al grup tirosil (4 i 5). Com a resultat, l'enzim queda amb el radical tirosil lliure però necessita tornar a reduir el pont disulfur per torna a començar un cicle de reducció de la ribosa. *Adaptat de Wijerathna et al. 2011.*

Sobre aquest complex enzimàtic es produeix una regulació al·lostèrica que permetrà mantenir l'equilibri entre els quatre dNTPs (Chabes et al., 2003; Hofer et al., 2012; Mathews and Ji, 1992). Els llocs S de la subunitat gran actuen com a sensors de la concentració de cada un dels dNTPs (efectors al·lostèrics) i determinen quin serà el substrat que es reduirà al centre catalític. Quan un efector al·lostèric s'uneix al lloc S, es produeix un canvi conformacional sobre el centre catalític provocant un canvi d'afinitat pel substrat. Breument, el dTTP indueix la síntesi de dGDP i inhibeix la de dUDP i dCDP, el dGTP indueix síntesi de dADP i inhibeix la de dUDP i dCDP, l'ATP indueix la síntesi de dCDP i dUDP. A més, el lloc A regula l'activitat enzimàtica, és a dir, a concentracions altes de dATP es produeix un feedback negatiu per inhibir completament l'enzim. D'aquesta forma la cèl·lula s'assegura una síntesi equilibrada de tots el dNTPs.

4.2.3 Regulació molecular

A més de la regulació al·lostèrica, cada una de les subunitats del complex RNR estan perfectament regulades a diferents nivells: transcripcional, post-traducciona i de localització subcel·lular.

L'expressió de *RNR1* és cíclica i es troba sota el control del factor de transcripció MBF (Iyer et al., 2001; Koch et al., 1993). A final de G_1 els nivells d'expressió de *RNR1* augmenten unes deu vegades respecte els nivells basals. Quan la cèl·lula entra a fase S el repressor Nrm1 s'uneix sobre MBF produint la inhibició de la transcripció de *RNR1* (de Bruin et al., 2006).

L'expressió de *RNR2 i 4* també es produeix a final de G_1 i està regulada per la via de senyalització Mec1/Rad53/Dun1, via de senyalització que veurem al següent apartat que fa referència a la resposta enfront dany a DNA i estrès replicatiu. L'expressió de *RNR2* és cíclica, per contra no s'ha observat un patró de regulació cíclica en l'expressió de *RNR3* i *RNR4* (Elledge and Davis, 1990; Huang and Elledge, 1997).

Sobre Rnr1 també es produeix una regulació post-traducciona a través de Sml1 (Chabes et al., 1999; Zhao et al., 1998). Aquest inhibidor de Rnr1 es degradat abans d'entrar a fase S i en condicions de dany a DNA. Al següent apartat s'explicarà amb més detall aquesta via de regulació.

I per últim, també es produeix una regulació per localització sobre l'heterodímer. Habitualment Rnr2 i Rnr4 es troben retenguts a nucli a través de dos proteïnes anomenades Wmt1 i Dif1 (Lee and Elledge, 2006; Lee et al., 2008; Wu and Huang, 2008). A final de G₁ es produeixen modificacions sobre aquestes proteïnes que permeten la translocació de l'heterodímer des del nucli al citoplasma per unir-se amb l'homodímer de Rnr1.

4.3 Nucleòsid difosfat quinasa (NDK)

Històricament, la rellevància fisiològica de les nucleòsid difosfat quinases ha estat eclipsada per la RNR, considerada l'enzim clau per dur a terme la síntesi de nucleòtids. Aquest fet s'ha sumat a l'absència d'un fenotip aparent en el mutant del gen *YNK1*, la NDK codificada en llevat. Però la manca de fenotip podria ser deguda a: 1) la presència d'un altre enzim amb activitat nucleòsid difosfat quinasa, Cdc8 (Chien et al., 2009; Zhang et al., 1995); i 2) la presència de fenòmens de compensació, com per exemple els descrits en bacteris on la piruvat quinasa és capaç de formar dNTPs en condicions d'anaerobiosi (Saeki et al., 1974). En aquesta tesi, s'aporten resultats que reforcen la importància de la tasca d'aquests enzims durant el procés de síntesi de dNTPs, per la replicació del DNA o per superar una situació de dany al DNA.

A *S. cerevisiae*, només hi ha una NDK codificada al gen *YNK1*. Aquest enzim està involucrat tant en el metabolisme del DNA com del RNA, catalitzant la síntesi de dNTPs i NTPs respectivament (Fukuchi et al., 1993; Jong and Ma, 1991).

Ynk1 es troba principalment al citosol, tot i que s'ha trobat activitat NDK a la fracció mitocondrial (3%), i a la fracció nuclear (<1%) (Amutha and Pain, 2003; Zhang et al., 1995).

L'enzim actiu és un homo-oligòmer format per sis monòmers. Cada monòmer està format per set hèlix α , que rodegen parcialment quatre fulles β anti-paral·leles. Cada un dels monòmers conté un centre actiu, format pel lloc d'unió del substrat i per un residu histidina (H119), molt conservat i imprescindible per dur a terme la reacció (Wang et al., 2008).

Tal com mostra la figura 5, aquesta reacció segueix un mecanisme *ping-pong*, utilitzat en les reaccions on un grup químic es transfereix d'un substrat A a un substrat B. Per la síntesi de dNTPs, aquest enzim catalitza la transferència del fosfat γ d'un nucleòsid trifosfat (NTP) a un deoxinucleòsid difosfat (dNDP) per obtenir el deoxinucleòsid trifosfat (dNTP) (Lascu and Gonin, 2000).

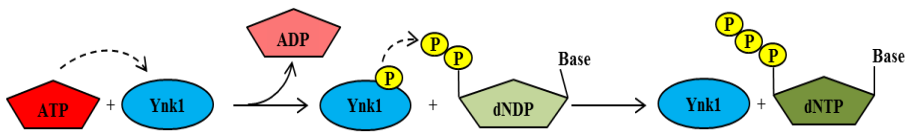


Figura 5 Mecanisme *pin-pong* catalitzat per Ynk1. En aquest esquema, una molècula d'ATP (substrat A) s'uneix al centre catalític de Ynk1 permetent l'autofosforilació sobre la histidina 119, i llavors es produeix la transferència d'aquest fosfat des de Ynk1 fins a un dNDP (substrat B) per obtenir el dNTP.

A continuació, passem a veure quines són les dues vies implicades en la síntesi de dNTPs, on podem situar RNR i Ynk1.

4.4 Vies de síntesi de dNTPs: via *de novo* i via de salvament

La via de síntesi *de novo*, és l'encarregada de la síntesi majoritària tan de NTPs per sostenir la síntesi de RNA, com de dNTPs abans de fase S per sostenir la replicació del DNA. Es produeix al citosol, i és la via on la RNR serà responsable de convertir els NDPs en dNDPs des de final de G₁ i fins a final de fase S. L'últim pas de la via és responsabilitat de Ynk1, convertint els dNDPs en dNTPs, fent que per aquesta última reacció sigui necessària una gran aportació de fosfat en forma d'ATP (Mathews, 2006) (Figura 6).

La via de salvament, és la via que sintetitza majoritàriament els dNTPs per reparar el DNA i on les nucleòsid quinases tenen un protagonisme especial. Parteix de nucleòsids provinents de l'exterior o la degradació d'àcids nucleics, no requereix d'una aportació tan gran d'energia com la via de novo i en aquesta via el factor limitant serà l'activitat de les deoxinucleòsid quinases (dNK). Aquests enzims seran els encarregats de dur a terme la primera reacció, on es transforma el deoxinucleòsid (dN) en deoxinucleòsid monofosfat (dNMP). Finalment, igual que en la via *de novo*, Ynk1 s'encarrega de transformar el dNDP en deoxinucleòsid trifosfat (dNTP) (Kurtz et al., 1999; Van Rompay et al., 2000) (Figura 6).

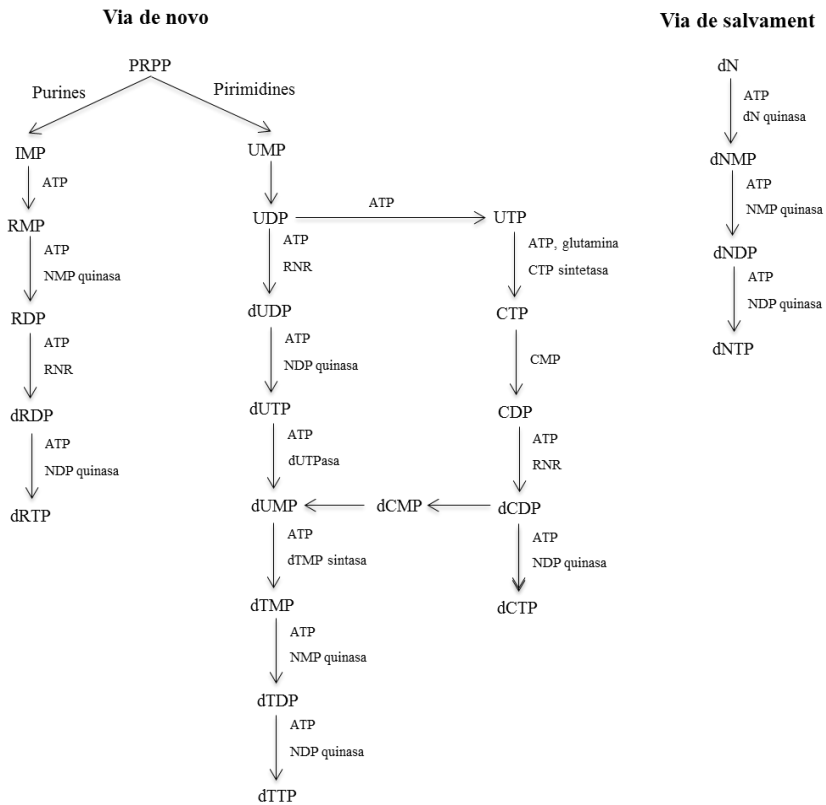


Figura 6 Vies de síntesis de dNTPs. Esquema dels diferents intermediaris produïts durant les reaccions de la via de novo i la via de salvament.

5. RESPOSTA AL DANY A DNA I ESTRÈS REPLICATIU

A més de la replicació del genoma, en llevats quan es dona una situació d'estrès replicatiu o es produeix un dany al DNA es desencadena una resposta per tal d'incrementar els nivells de dNTPs intracel·lulars (Chabes et al., 2003). Aquest increment dels nivells de dNTPs està directament correlacionat amb la tolerància al dany a DNA (Chabes and Stillman, 2007), i el seu efecte està associat amb la correcta progressió de la forquilla de replicació (Fasullo et al., 2010). Sembla que l'activitat de Ynk1 també és necessària per dur a terme la síntesi de dNTPs en condicions de dany a DNA, ja que s'ha pogut observar un increment de la freqüència de mutació en una soca *ynk1Δ* després de tractar-la amb UV (Yang et al., 2009). En organismes superiors, l'increment de dNTPs després del dany a DNA és menys pronunciat i està focalitzat al lloc cromosòmic on s'ha produït el dany (Niida et al., 2010). A continuació, anem a veure quin és el mecanisme de resposta i quines són les vies de senyalització que desencadenen aquesta resposta.

5.1 Mecanisme de resposta

Aquesta resposta produirà un augment de l'expressió de les quatre subunitats del complex RNR (Elledge et al., 1992; Tsaponina et al., 2011).

Sota condicions normals, Crt1 forma un complex amb Tup1 i Ssn6 sobre la regió promotora de *RNR2, 3 i 4*, reprimint la seva expressió. Abans d'entrar a fase S o quan es produeix un dany a DNA, Crt1 es fosforilat provocant la desestabilització del complex, i en conseqüència es produeix un augment de l'expressió d'aquests gens (Figura 7 A) (Huang et al., 1998; Zaim et al., 2005).

A més, es produeix la fosforilació de Sml1 perquè sigui ubiquitinat i degradat al proteosoma, deixant d'aquesta forma la subunitat Rnr1 activa (Figura 7 B) (Zhao et al., 2001; Zhao and

Rothstein, 2002). També, s'indueix l'expressió d'aquesta subunitat a través de l'activador Irx1 (Figura 7 C) (Tsaponina et al., 2011).

Per últim, es promou la translocació nucli-citoplasma de l'heterodímer Rnr2/Rnr4 mitjançant la fosforilació i posterior degradació de Dif1 (Figura 7 D) (Lee et al., 2008; Wu and Huang, 2008).

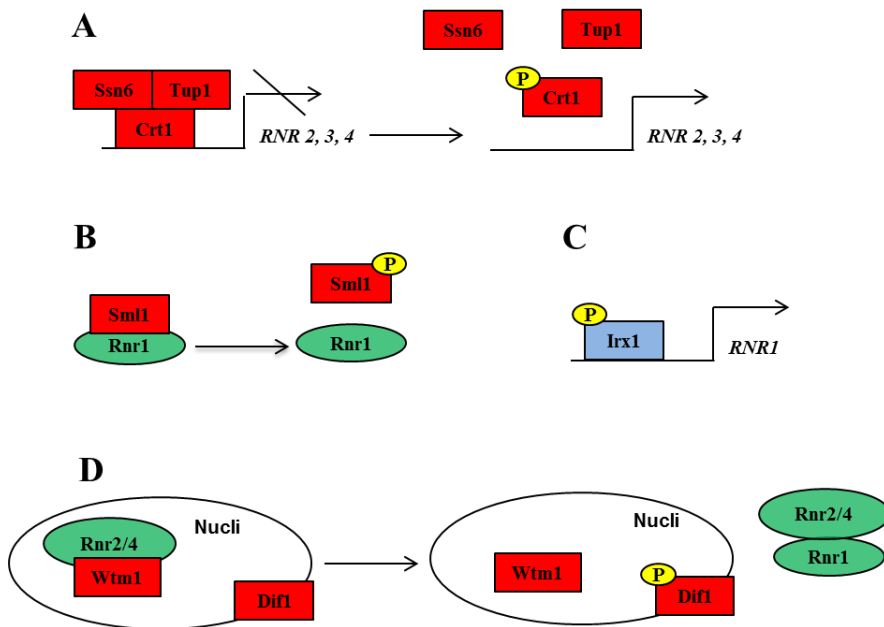


Figura 7 Mecanismes de resposta a dany a DNA. (A) Desestabilització del complex Crt1/Tup1/Ssn6. (B) Degradació de Sml1. (C) Activació de Irx1 (D) Degradació de Dif1.

A continuació passem a veure quina via és la responsable de detectar i desencadenar la resposta quan es produeix una situació d'estrès replicatiu o de dany a DNA.

5.2 Via Mec1/Rad53/Dun1

A *S. cerevisiae* Mec1 i Rad53 són essencials i controlen l'activació de Dun1, que actuarà com la quinasa efectora (Zhou and Elledge, 1993). Aquesta via s'activa constitutivament abans d'entrar a fase S per poder sintetitzar el conjunt de dNTPs necessaris per duplicar el DNA (Zhao et al., 1998; Zhao et al., 2001), però l'activació completa només es dona per respondre contra una situació d'estrès replicatiu o de dany a DNA, i és llavors quan els nivells de dNTPs augmenten unes sis vegades respecte els nivells basals (Chabes et al., 2003).

La quinasa Mec1 és el sensor i fosforila Rad53, el Rad53 hiperfosforilat activa la quinasa efectora Dun1 a través d'una fosforilació, i Dun1 serà la quinasa efectora responsable de: fosforilar Crt1, fosforilar Sml1 i fosforilar Dif1. A més, Rad53 és la responsable de fosforilar el factor de transcripció Irx1 per promoure un augment de l'expressió de *RNR1* (Figura 8).

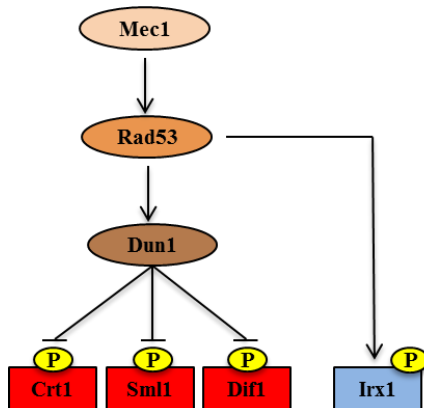


Figura 8 Ruta d'activació del complex RNR en resposta a dany a DNA. Mec1 activa Rad53 que a la vegada activarà Dun1, aquesta quinasa serà la responsable de la inhibició dels repressors Sml1, Crt1 i Dif1. Per la seva banda Rad53 activa Irx1.

5.3 Nova via per controlar els nivells de dNTPs

Fins ara es pensava que durant una situació de dany a DNA o d'estrès replicatiu, com pot ser el tractament amb hidroxiiurea (HU), es quedaven les forquilles de replicació obertes degut a un exhauriment dels dNTPs intracel·lulars. Aquesta situació portava a l'activació de la via Mec1/Rad53/Dun1 per induir l'expressió de les diferents subunitats de la ribonucleòtid reductasa per poder sintetitzar urgentment dNTPs i poder superar la parada en la replicació.

Però l'any 2004 es va demostrar que quan una cèl·lula presenta uns nivells baixos de dNTPs per fer front la duplicació del DNA (situació HU), es produeix una parada de la replicació però mai s'esgoten els dNTPs (Koc et al., 2004). És a dir, existeix algun mecanisme que s'encarrega de controlar els nivells de dNTPs i quan aquests arriben a un llindar mínim, es produeix una parada de la síntesi del DNA. A més s'ha demostrat que aquest mecanisme és independent de Mec1/Rad53/Dun1, ja que una soca *rad53* inactiu tampoc acaba esgotant tots el dNTPs en una situació d'estrès replicatiu com és la presència d'HU.

Per tant, en una situació de dany a DNA o d'estrès replicatiu, la cèl·lula activa dues vies diferents per superar la situació. Per una banda s'activa la via canònica Mec1/Rad53/Dun1, encarregada com hem vist d'induir l'expressió de les subunitats del complex RNR per poder augmentar els nivells de dNTPs intracel·lulars. Però, per una altra banda, la cèl·lula activa un mecanisme fins ara desconegut, que s'encarrega de controlar els nivells de dNTPs, d'aquesta manera quan els nivells de dNTPs arriben a un llindar mínim la cèl·lula respondrà aturant la replicació, evitant així que s'arribin a esgotar els dNTPs.

6. RELACIÓ DEL METABOLISME DEL FOSFAT AMB LA SÍNTESE DE dNTPs

Si s'analitza amb profunditat el procés de síntesis de dNTPs descrit anteriorment, s'observa que perquè la cèl·lula pugui sintetitzar els nivells necessaris de dNTPs, cada vegada que vol duplicar o reparar el genoma necessitarà l'aportació d'una gran quantitat de fosfat en forma d'ATP, concretament 3 àtoms de fòsfor per cada dNTP fabricat. D'altra banda, les cèl·lules estan contínuament consumint ortofosfat present al citoplasma per produir fosfolípids i mRNA. Tot aquest consum s'equilibra mitjançant l'activitat de diversos transportadors, amb els quals, les cèl·lules adquireixen fosfat present al medi. En aquest apartat explicarem alguns detalls del metabolisme del fosfat.

6.1 Transportadors de fosfat

S. cerevisiae codifica dos sistemes de transport de fosfat: el sistema d'alta afinitat i el sistema de baixa afinitat (Figura 9). Sota condicions fisiològiques de fosfat, el llevat expressa de forma constitutiva els transportadors de baixa afinitat (Pho87, Pho88 i Pho90), a més de la fosfatasa àcida Pho3 localitzada a l'espai periplàsmic (Auesukaree et al., 2003). Però, quan el llevat es troba en unes condicions limitants de fosfat, activarà la transcripció de tots els gens relacionats amb la captació massiva de fosfat: els transportadors d'alta afinitat Pho84 i Pho89, les fosfatases àcides Pho5 i Pho11/12, i les alcalines Pho8 i Pho13 (Klionsky and Emr, 1989; Lenburg and O'Shea, 1996; Persson et al., 2003).

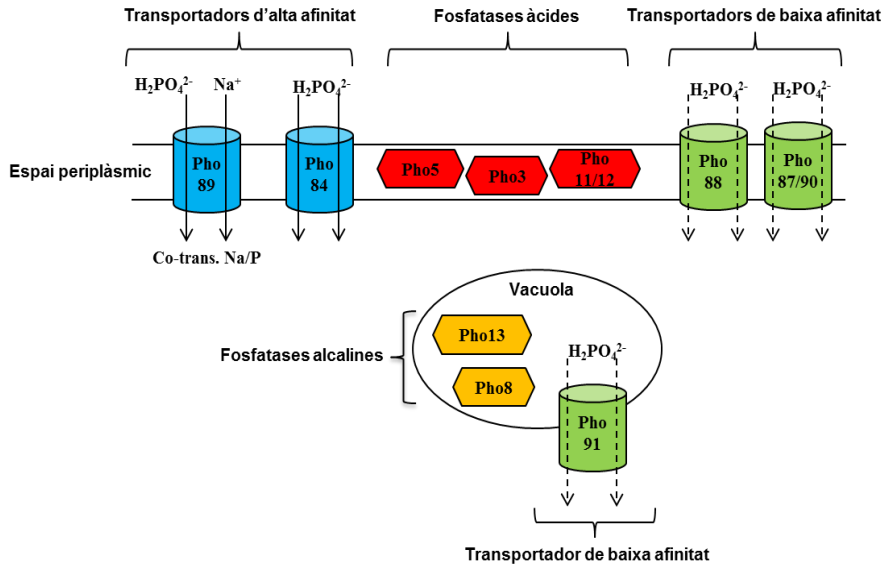


Figura 9 Esquema de les diferents proteïnes involucrades en la captació de fosfat.

L'equilibri entre l'aportació i el consum produeix una concentració d'ortofosfat lliure d'aproximadament 20 mM (Auesukaree et al., 2004; Pinson et al., 2004; van Heerden et al., 2014). No obstant, durant la síntesi del DNA, un llevat necessita l'aportació de 7.5×10^7 molècules de fosfat (aproximadament el 25% del fosfat citoplasmàtic) en un període de temps curt. No es coneix si aquest consum accentuat produeix una forta variació del fosfat citoplasmàtic, però seria d'imaginar que deu haver-hi algun sistema d'homeòstasi per evitar qualsevol variació. De fet, anàlisis de transcriptòmica revelen que molts gens involucrats en la captació del fosfat, com ara *PHO84*, *PHO5* i *PHO12*) s'expressen de manera sincrònica a la sortida de mitosis (Spellman et al., 1998) el que prepararia la cèl·lula de llevat per una captació massiva de fosfat per l'inici de la fase S. Malgrat l'interès d'aquestes dades, fins ara, no s'ha descrit la rellevància fisiològica de tota aquesta preparació molecular.

7. REGULACIÓ DE LA CAPTACIÓ DE NUTRIENTS

S. cerevisiae presenta diferents vies de transducció de senyals encarregades de relacionar l'estat fisiològic de la cèl·lula amb les condicions ambientals que l'envolten, és a dir depenent de la disponibilitat de nutrients al medi guiaran la cèl·lula cap a un estat de quiescència o de creixement. Les vies principals que responen a canvis en la disponibilitat de la font de carboni, nitrogen o fosfat són les següents:

7.1 Via cAMP-PKA

En resposta a un increment dels nivells de glucosa, la via cAMP-PKA indueix la síntesi de cAMP per estimular la PKA (quinasa depenent de cAMP). La PKA afectarà diferents proteïnes que s'encarregaran d'adaptar la cèl·lula al creixement fermentatiu, activant la glicòlisi, proliferació cel·lular, inhibició de gluconeogènesi etc (Santangelo, 2006; Tamaki, 2007; Thevelein et al., 2000).

7.2 Via TOR

La proteïna TOR (*Target Of Rapamycin*) és una Ser/Thr quinasa conservada des de llevats fins humans, que actua com element central en la major via de regulació del creixement cel·lular. En llevats existeixen dos proteïnes homologues, Tor1 i Tor2, encarregades de formar el complex actiu TORC1 i TORC2 respectivament. En condicions de disponibilitat de nitrogen i carboni, el complex TORC1 estimula la proliferació cel·lular i s'encarrega d'inhibir l'expressió de gens involucrats en resistència a l'estrès, autofàgia i de creixement en baix nitrogen. El complex TORC2, s'encarrega de regular aspectes espacials del creixement, com ara la polimerització de filaments d'actina (De Virgilio and Loewith, 2006a; De Virgilio and Loewith, 2006b).

7.3 Via PHO

La regulació de tots els transportadors i proteïnes, descrits anteriorment, involucrades en la captació de fòsfat ve regida per la via de senyalització PHO.

L'element central de la via és el complex quinasa Pho85-Pho80, el qual permet a la cèl·lula respondre enfront a canvis, tan extra com intracel·lulars, dels nivells de fòsfat. Aquest complex quinasa és l'encarregat de controlar la localització de Pho4, factor de transcripció essencial perquè es produeixi l'expressió dels gens *PHO*, involucrats en la captació i emmagatzematge de fòsfat (Figura 10) (O'Neill et al., 1996; Ogawa et al., 2000).

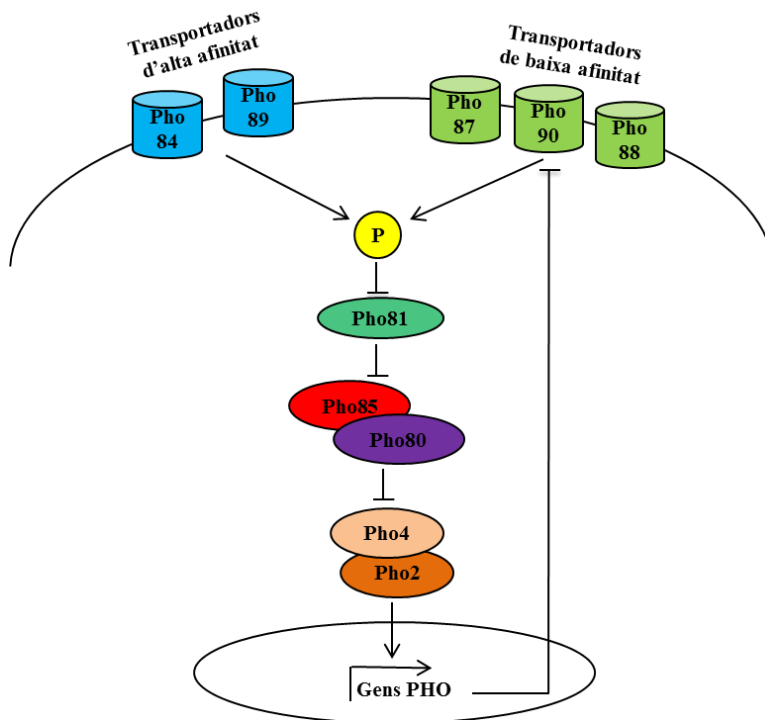


Figura 10 Esquema de la via PHO. Mostra de forma resumida la via central de regulació del metabolisme del fòsfat en *S. cerevisiae*.

Sota condicions limitants de fòsfat, senyal de manca de fòsfat activa la via PHO, a través de l'activació per d'un inhibidor de CDK (CKI) com és Pho81 (Lenburg and O'Shea, 1996). A la vegada, Pho81 actiu manté al complex quinasa Pho85-Pho80 en la seva forma inactiva, evitant així la hiperfosforilació sobre el factor de transcripció Pho4 (O'Neill et al., 1996). D'aquesta forma, Pho4 pot ser translocat al nucli, on forma un heterotrímer amb Pho2 per formar el complex actiu i poder activar la transcripció dels gens *PHO* (Kaffman et al., 1998b; Magbanua et al., 1997), involucrats en la captació de fòsfat. Al mateix moment, es produeix una degradació, via Pho4, dels transportadors de baixa afinitat que acabaran sent translocats des de la superfície cel·lular fins la vacuola (Wykoff et al., 2007).

Quan la cèl·lula recupera els nivells fisiològics de fòsfat, s'inactiva Pho81 i en conseqüència el complex Pho85-Pho80 torna estar actiu, fosforilant així a Pho4 que primer deixarà de formar heterotrímer amb Pho2 i després serà translocat fora del nucli, provocant així la repressió dels gens *PHO* (Kaffman et al., 1998a) (Figura 10).

8. METABOLISME DEL POLIFOSFAT EN *S.cerevisiae*

A més de tots els transportadors d'alta afinitat, s'activa la transcripció dels gens relacionats amb l'emmagatzematge vacuolar de fosfat en forma de polifosfat (PolyP), per evitar que es produeixi així un *feed-back* negatiu sobre els transportadors d'alta afinitat.

8.1 Què és el polyP?

El PolyP és una molècula lineal formada per entre desenes i centenars de residus de fosfat units per enllaços fosfoanhidres (Figura 11) (Azevedo and Saiardi, 2014). Aquesta molècula es troba present en tot organisme viu (Kulaev and Vagabov, 1983), incloent-hi el llevat i els humans (Kumble and Kornberg, 1995).

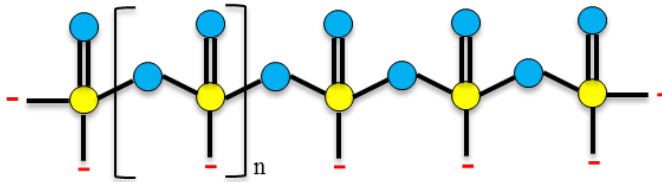


Figura 11 Esquema d'una molècula de PolyP. Les rodones grogues representen el fosfat, mentre que les blaves representen l'oxigen. La molècula està formada per n repeticions de PO_3^- .

S'ha observat que el PolyP present en *S. cerevisiae*, tot i estar present majoritàriament a la vacuola, també es localitza a nucli, mitocondria o citosol (Kulaev and Kulakovskaya, 2000; Vorisek et al., 1982).

8.2 Quina és la seva funció?

Pel que fa a la seva funció, el grup del Kornberg va hipotetitzar que el PolyP actua de reservori de fosfat intracel·lular (Kornberg, 1999), reduint així les possibilitats de patir un xoc osmòtic d'un element tan important per la cèl·lula com és el fosfat (Kulaev and Kulakovskaya, 2000; Vorisek et al., 1982). A més, se li han atribuït a aquesta molècula noves funcions associades a transport, destoxificació, metabolisme energètic o regulació transcripcional. S'ha vist, que en bacteris el PolyP forma part de transportadors de membrana no proteínics encarregats de controlar el transport catiònic a través de la membrana (Rao and Kornberg, 1999; Reusch et al., 1995). També s'ha observat, en llevats, que el PolyP segresta a la vacuola cations citosòlics permeten la destoxificació (Dunn et al., 1994; Klionsky et al., 1990). Pel que fa al metabolisme energètic, s'ha demostrat en bacteris que el PolyP vacuolar i mitocondrial poden servir com a font d'energia degut a l'energia alliberada en la hidròlisis de l'enllaç fosfoanhidre, a més s'ha observat en vacuoles purificades de llevat la síntesis d'ATP des de PolyP (Shabalín et al., 1977). I per últim s'ha vist que el PolyP és capaç de regular l'expressió gènica en microorganismes (Rao and Kornberg, 1999).

8.3 Quins són els enzims involucrats en el seu metabolisme?

El metabolisme del PolyP està regit per un conjunt de proteïnes encarregades de sintetitzar-lo i degradar-lo (Figura 12).

En llevats, el PolyP es sintetitza per un complex anomenat VTC (*vacuolar transporter chaperone*). Aquest complex és un heterotrímer format per la PolyP sintasa (Vtc4) i tres subunitats reguladores: Vtc1, Vtc2 i Vtc3 (Hothorn et al., 2009). De fet, la deleció de *VTC1* o de *VTC4* deixa les cèl·lules sense PolyP (Ogawa et al., 2000).

Al mateix temps, el PolyP és hidrolitzat cap a fosfat lliure per mitjà de dos polifosfatases: Ppn1 (endopolifosfatasa que hidrolitza cadenes llargues de PolyP) i Ppx1 (exopolifosfatasa que hidrolitza fosfat dels extrems de les molècules) (Andreeva et al., 2006). Tot i això, una soca *ppn1Δ ppx1Δ* conté activitat polifosfatasa residual, indicant que podria existir alguna altre activitat enzimàtica polifosfatasa (Lichko et al., 2008). Finalment el fosfat lliure produït serà transportat cap al citoplasma a través d'un transportador de baixa afinitat anomenat Pho91 (Hurlimann et al., 2007).

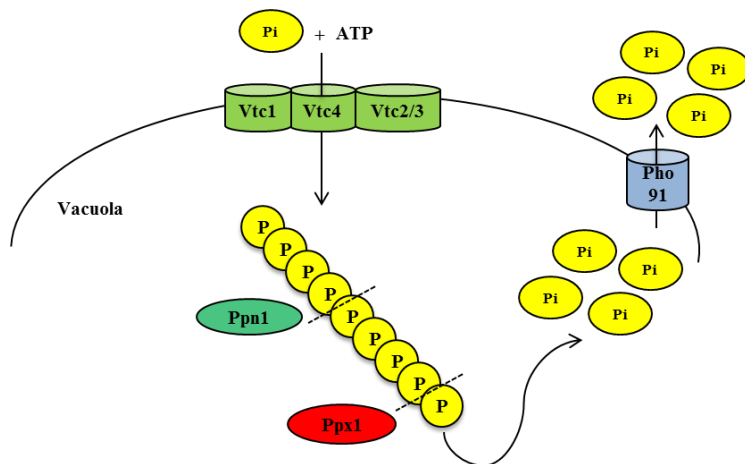


Figura 12 Metabolisme del PolyP. El complex VTC serà l'encarregat de sintetitzar i translocar a la vacuola la cadena de PolyP; al procés de degradació participaran, principalment, Ppn1 com a endopolifosfatasa i Ppx1 com a exopolifosfatasa; el fosfat lliure obtingut serà transportat cap al citoplasma a través d'un transportador de baixa afinitat anomenat Pho91.

8.4 Com es regulen aquests enzims?

Tot i que fa falta molt per conèixer sobre la regulació d'aquestes proteïnes, hi ha alguns resultats que permeten entendre millor la fisiologia d'aquests enzims.

Per exemple, s'ha demostrat que Vtc1, Vtc2, Vtc3 i Vtc4 s'expressen a través de la via PHO en condicions d'absència de fosfat (Ogawa et al., 2000). També s'ha demostrat que la subunitat Vtc2, en condicions limitants de fosfat es troba localitzada a la vacuola, mentre que en condicions òptimes queda localitzada a la perifèria cel·lular (Hothorn et al., 2009).

En aquesta tesi s'aporten nous resultats que podrien explicar la regulació d'aquests enzims en determinades situacions. A continuació, passem a veure que se'n sap d'aquesta molècula en humans.

9. METABOLISME DEL PolyP EN MAMÍFERS

En eucariotes superiors, al igual que en llevats, el PolyP es troba present en diferents teixits i compartiments subcel·lulars, incloent el nucli, mitocondri, membranes, acidocalcisosmes i vesícules (Docampo et al., 2005).

Partint de la coincidència amb la localització, s'han anat investigant les possibles funcions del PolyP en cèl·lules de mamífer veient que té diverses funcions: a) transportador a la membrana mitocondrial interna (Abramov et al., 2007), b) afecta a la respiració mitocondrial (Abramov et al., 2007), c) possible font d'energia d'una nova NAD quinasa (Ohashi et al., 2012), d) en cèl·lules de mieloma s'ha observat una gran acumulació de polyP al nuclèol, i s'ha vist que una aportació extra de PolyP inhibeix l'activitat de la RNA polimerasa I (Jimenez-Nunez et al., 2012).

Es coneix molt poc sobre els enzims que controlen el metabolisme del polyP en mamífers. Pel que fa a la síntesis, ningú ha pogut identificar l'enzim responsable de la síntesis de PolyP en mamífers. S'ha buscat activitat sintasa en lisat cel·lular, però no s'ha pogut aconseguir trobar-la. S'han donat diverses hipòtesis per les quals no s'ha trobat activitat, com per exemple que aquesta activitat estès associada a complexos multienzimàtics (Pavlov et al., 2010), la gran activitat polifosfatasa estaria dificultant la detecció (Brown and Kornberg, 2004), que sigui un procés dirigit per força protomotriu evitant així la necessitat d'ATP (Kumble and Kornberg, 1995) etc. Pel que fa a la degradació, la proteïna h-prune podria ser una de les hidrolases de polyP de cadena curta, però encara no es coneix cap polifosfatasa capaç de degradar cadenes llargues de PolyP (Tammenkoski et al., 2008).

10. CONNEXIÓ ENTRE EL PolyP I ELS dNTPs

En aquesta tesi, es mostra que el PolyP podria ser un factor important per poder sintetitzar els nivells correctes de dNTPs (Figura 13). Sota condicions limitants de fòsfat, les soques *vtc4Δ* i *ppn1Δ ppx1Δ* presenten nivells baixos de dNTPs, inverteixen més temps per replicar el DNA i són més sensibles al dany a DNA. Per altra banda, quan s'incrementen els nivells normals de PolyP, la cèl·lula es torna més resistent al dany a DNA produït per la radiació ultraviolada. També es demostra que cèl·lules humanes de la dermis amb baixos nivells de PolyP són més sensibles al dany per ultraviolada, suggerint que el rol protector del PolyP enfront al dany a DNA es troba conservat en mamífers.

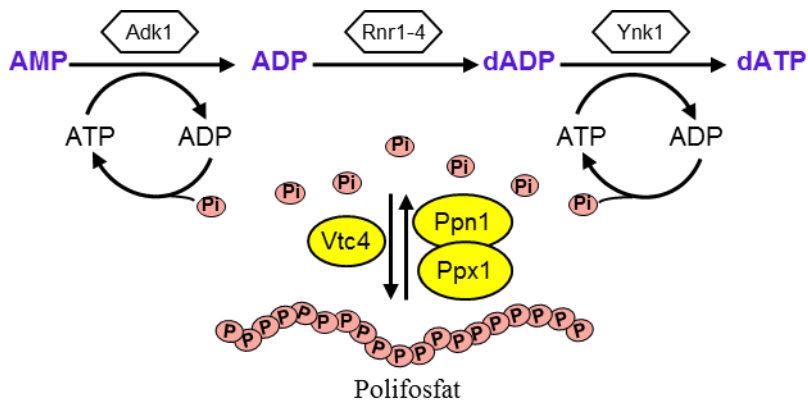


Figura 13 Connexió entre el metabolisme del PolyP i la síntesis de dNTPs. Mostra de forma resumida la idea que es vol transmetre en aquesta tesi: es necessita l'aport de fòsfor provinent del PolyP per sintetitzar correctament el conjunt de dNTPs necessaris per duplicar o reparar el DNA.

HIPÒTESIS

Tal com s'ha avançat a la introducció, durant aquesta tesi s'han dissenyat una sèrie d'experiments enfocats per provar les dues hipòtesis que es plantegen a continuació relacionades amb un nou rol del polyP a la cèl·lula:

✓ Hipòtesi I: **El PolyP sostén la síntesi del DNA.**

✓ Hipòtesi II: **El polyP protegeix del dany a DNA.**

Els experiments realitzats per confirmar o rebutjar aquestes hipòtesis estan descrits en l'apartat de resultats i comentats a fons en l'apartat de discussió.

A continuació s'exposen els objectius fixats per poder demostrar aquestes hipòtesis.

OBJECTIUS

1. EL POLYP SOSTÉN LA SÍNTESI DEL DNA.

- 1.1 Demostrar la correlació entre la degradació del polyP i la síntesi de dNTPs.
- 1.2 Aportar noves dades que ajudin a entendre millor la regulació dels enzims involucrats en el metabolisme del polyP.
- 1.3 Analitzar els nivells de dNTPs dels mutants *vtc4Δ* i *ppn1Δ/ppx1Δ*.
- 1.4 Analitzar la progressió pel cicle cel·lular dels mutants *vtc4Δ* i *ppn1Δ/ppx1Δ*.
- 1.5 Demostrar l'activació de la via Mec1/Rad53 en aquests mutants.
- 1.6 Demostrar la importància del polyP sota condicions fisiològiques.

2. EL POLYP PROTEGEIX DEL DANY A DNA.

- 2.1 Analitzar la progressió pel cicle cel·lular dels mutants *vtc4Δ* i *ppn1Δ/ppx1Δ* sota condicions de dany a DNA.
- 2.2 Demostrar la sensibilitat de *vtc4Δ* i *ppn1Δ/ppx1Δ* al dany a DNA.
- 2.3 Demostrar la correlació entre els nivells de polyP i la sensibilitat al dany a DNA.
- 2.4 Determinar si el rol protector del polyP es manté en eucariotes superiors.
- 2.5 Caracteritzar *CPPED1*, possible endopolifosfatasa humana.

MATERIAL I MÈTODES

1. SOQUES UTILITZADES

| Strain | Background | Genotype | Source |
|--------|------------|--|------------|
| YPC736 | BY4741 | <i>MATa his3Δ1 leu2 Δ 200 met15 Δ 0 ura3 Δ 0</i> | Euroscarf |
| YSB075 | BY4741 | <i>vtc4::KanMX</i> | Euroscarf |
| YSB074 | BY4741 | <i>vtc1::KanMX</i> | Euroscarf |
| YSB098 | BY4741 | <i>ppn1::KanMX / ppx1::Leu2</i> | This study |
| YSB083 | BY4741 | <i>dun1::KanMX</i> | Euroscarf |
| YSB088 | BY4741 | <i>adk1::KanMX</i> | Euroscarf |
| YSB089 | BY4741 | <i>ynk1::KanMX</i> | Euroscarf |
| YSH082 | BY4741 | <i>PCL1-TAP::HIS3</i> | Euroscarf |
| YSB122 | BY4741 | <i>vtc4::KanMX PCL1-TAP::HIS3</i> | This study |
| YSB093 | BY4741 | <i>VTC1-TAP::HIS3</i> | Euroscarf |
| YEQ025 | BY4741 | <i>VTC1-HA::Hph</i> | This study |
| YSB094 | BY4741 | <i>VTC4-TAP::HIS3</i> | Euroscarf |
| YEQ009 | BY4741 | <i>VTC4-HA::Hph</i> | This study |
| YSB095 | BY4741 | <i>PPN1-TAP::HIS3</i> | Euroscarf |
| YEQ011 | BY4741 | <i>PPN1-HA::Hph</i> | This study |
| YSB096 | BY4741 | <i>PPX1-TAP::HIS3</i> | Euroscarf |
| YEQ015 | BY4741 | <i>PPX1-HA::Hph</i> | This study |

Taula 2 Soques de *S. cerevisiae* utilitzades durant aquesta tesi.

2. CONDICIONS DE CULTIU

Les cèl·lules s'han crescut o bé en YPD (1% *yeast extract*, 2% peptona i 2% glucosa), o bé en medi sintètic complet sense fosfat (SD) (0,67% *yeast nitrogen base*, 2% glucosa), suplementat amb 9 mM KH_2PO_4 o 2,5 μM KH_2PO_4 i amb els aminoàcids requerits per suplementar l'auxotròfia.

3. TRANSFORMACIÓ DE LLEVATS

La transformació de llevats es realitza amb el mètode de transformació de l'acetat de liti. Es resupenen $1,2 \times 10^8$ cèl·lules amb la solució LiAc/TE i s'agreguen 3,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ molècules de ssDNA d'esperma de salmó desnaturalitzat amb 50% de polietilenglicol (PEG). Les cèl·lules s'incuben a 30°C duran 30 minuts i es sotmeten a un xoc tèrmic de 15 minuts a 42°C. Finalment es resupenen amb aigua MQ estèril i es plaquegen en medi SD selectiu per l'absència d'algun aminoàcid.

4. SINCRONITZACIÓ AMB α -FACTOR

Després d'un cultiu O/N, se sembren les cèl·lules en YPD o SD 9 mM a $\text{OD}_{660} = 0,5$. Al cap de 2 hores s'afegeix α -factor (Biomedal), a una concentració final de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, i es deixa incubant 2 hores més. Un cop comprovat que les cèl·lules estan parades, observant la seva morfologia característica de *shmoo* amb el microscopi de contrast de fases (Leica DMIRB), es centrifuga el cultiu a 2000 rpm durant 2 minuts. S'elimina el sobrenedant que conté restes d' α -factor, i es resuspèn el pellet amb 1 ml de medi fresc per tornar a centrifugar a 2000 rpm durant 2 minuts i acabar d'eliminar les últimes restes d' α -factor. Finalment es resupen el cultiu per començar el mostreig.

5. CITOMETRIA DE FLUX

Per analitzar la progressió pel cicle cel·lular, les cèl·lules es fixen amb etanol 70% durant 1 hora. A continuació s'elimina l'etanol per centrifugació, es resuspenen els pellets amb 500 µl de citrat sòdic 20 mM suplementat amb RNAsa a una concentració final de 10 µg/ml, i es deixa incubant O/N a 30°C. L'endemà, s'afegeixen 500 µl de citrat sòdic 20 mM suplementat amb iodur de propidi a una concentració final de. A continuació, es soniquen les cèl·lules i s'analitzen mitjançant citometria de flux FACScalibur (Becton Dickinson). La població de G₁ i G₂ es quantifica amb el programa WinMDI 2.9.

6. ANÀLISI DE PROTEÏNES PER WESTERN BLOT

El lisat cel·lular es centrifuga a 12000 rpm durant 10 minuts a 4°C. La concentració de proteïna es va determinar mitjançant Bradford. Per l'electroforesi, es van carregar 50 µg de proteïna en un gel de SDS-acrilamida, es va transferir el gel a una membrana de PVDF (Millipore).

La membrana va ser incubada amb els següents anticossos depenen de la proteïna analitzada: α-PAP 1:4000 (Sigma, P1291), α-Clb5 1:100 (Santa Cruz, sc-6704), α-flag 1:500 (Sigma, F3165), α-Rad53 1:700 (Santa Cruz, sc6749), α-Rnr3 1:5000 (Agrisera, AS09574), α-tub 1:2000 (Sigma, T9026), α-lamB 1:1000 (Santa Cruz), α-G6PDH 1:500 (Sigma A9521), α-GFP 1:500 (Cell Signaling, #2956). Com a secundaris es van utilitzar: α-rabbit-HRP 1:25000 (Jackson), α-goat-HRP 1:2000 (Jackson), α-mouse 1:30000 (Jackson).

El revelat de la membrana es va dur a terme usant Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore), la captura d'imatges es va realitzar amb el GeneSnap (Syngene) i la quantificació amb el Image Studio Lite (Li-Cor).

7. EXTRACCIÓ I QUANTIFICACIÓ DE dNTPs

L'extracció de dNTPs es va dur a terme com està descrit a (Chabes et al., 2003) (Annex I).

Breument, es van recollir 2×10^7 cèl·lules per filtració mitjançant filtres de GN-6 Metricel (47 mm, 0.45 μm , GelmanSciences). Els filtres, es van submergir en eppendorfs de 1.5 que contenen 700 μl de solució de lisis freda (12% (w/v) àcid tricloracètic, 15 mM clorur de magnesi). A continuació es van vortejar durant 30 segons, i incubar amb agitació durant 15 minuts a 4°C. Passats aquests 15 minuts es van centrifugar a 13000 rpm durant 1 minut i al sobrenedant se li va afegir 800 μl de solució de freó-trioctilamina (78% / 22%) (1,1,2-triclor-1,2,2-trifluoroetà, Sigma-Aldrich Sweeden AB, >99%) (trioctilamina, Sigma-Aldrich Sweeden AB, 98%), es va vortejar i centrifugar 1 minut a 13000 rpm. De nou, la fase aquosa es va transferir a 700 μl d'una solució (78% / 22%) freó / trioctilamina, es va vortejar i centrifugar 1 minut a 13000 rpm.

La fase aquosa es va utilitzar per quantificar els nivells de dNTPs, 5 μl de la fase aquosa es van utilitzar en una reacció basada en l'activitat d'una seqüenassa, com està descrit a (Gonzalez-Vioque et al., 2011) (Annex I).

8. QUANTIFICACIÓ D'ORTOFOSFAT CITOPLASMÀTIC

La quantificació de l'ortofosfat es va dur a terme tal com està descrit a (Puigpinos et al., 2015) (Annex II).

Breument, es van recollir 1×10^7 cèl·lules per centrifugació, el pellet es va rentar dos cops amb 1 ml d'aigua MQ, llavors es van resuspendre les cèl·lules en 500 μ l de Tritó X-100 (0,1%) i es van lisar afegint boles de vidre i vortejant. L'extracte resultant es va centrifugar a 4°C a 13000 rpm durant 2 minuts.

Finalment, es va mesurar el fosfat present al sobrenedant, a 10 μ l de mostra se li van afegir 86 μ l d'heptamolibdat d'amoni 28 mM / àcid sulfúric 2.1 M, i 64 μ l de solució de verd de malaquita (0,015% verd de malaquita, 0,1% àcid acètic i 0,17% glicerol). La reacció es va quantificar mitjançant espectrofotometria (Synergy HT, Bio Tek Instruments) a 600 nm, i es va comparar amb els patrons corresponents (0-500 μ M Pi).

9. AUGMENT DEL PolyP INTRACEL·LULAR

Els nivells de polyP intracel·lulars es van incrementar utilitzant dos metodologies diferents.

Per una banda, es va clonar el gen *VTC4* (sintasa de polyP) al plasmidi multicopia pRS426 i llavors es van transformar cèl·lules wt amb el plasmidi buit o amb la construcció pRS426-*VTC4*.

Per altra banda, cèl·lules wt van ser sotmeses a unes condicions de creixement específiques per incrementar els nivells de polyP (Werner et al., 2005). Breument, es van tenir les cèl·lules creixent durant 6h amb un medi SD sense fosfat, llavors es van recollir per centrifugació i es van transferir a un medi SD 2 mM fosfat durant 1 hora.

10. PURIFICACIÓ DEL PolyP EN LLEVATS

L'extracció de polyP es va fer tal i com està descrit en (Kumble and Kornberg, 1995), aplicant algunes modificacions (Annex III).

Breument, es van recollir 10^7 cèl·lules per centrifugació, el pellet es va resuspendre amb 400 μ l de solució AE (50 mM AcNa pH 5.3, 10 mM EDTA). A aquest extracte se li va afegir fenol més SDS 20% i es va bullir a 65°C durant 5 minuts per lisar les cèl·lules. A continuació es van realitzar diferents centrifugacions per obtenir una fase aquosa lliure d'impureses. Finalment, el sobrenedant es va tractar durant 1 hora a 37°C amb DNAsa/RNAsa.

La purificació es va dur a terme tal com està descrit en (Werner et al., 2005). L'extracte es va passar per una columna de purificació de PCR (Quiagen) per poder aïllar els polyP. Les columnes es van rentar dues vegades amb la solució de rentat (10 mM Tris, pH 7.5, 50% etanol, 1 mM EDTA i 100 mM NaCl). Finalment es va eluir el polyP amb 50 μ l d'aigua MQ.

11. PURIFICACIÓ DEL PolyP EN CÈL·LULES HEK293

L'extracció de polyP en HEK293 es va fer tal i com està descrit en (Kumble and Kornberg, 1995), aplicant algunes modificacions.

Breument, es van recollir 4×10^6 cèl·lules per centrifugació, el pellet es va resuspendre amb 400 μ l de solució AE (50 mM AcNa pH 5.3, 10 mM EDTA) suplementat amb inhibidors de fosfatases. A aquest extracte se li va afegir 300 μ l fenol més SDS 20% i es va bullir a 65°C durant 5 minuts per lisar les cèl·lules, i llavors es van realitzar diferents centrifugacions per obtenir una fase aquosa lliure d'impureses. Finalment el sobrenedant es va tractar durant 3 hores a 37°C amb RNAsa.

Per purificar el polyP d'aquesta fase aquosa es va precipitar o/n amb 1 ml d'etanol absolut. Finalment, es va centrifugar durant 20' a 14000 rpm, es va eliminar l'etanol i es va resuspendre el pellet, que conté el polyP, amb 50 μ l d'aigua MQ.

12. QUANTIFICACIÓ DEL PolyP

La quantificació es va dur a terme tal i com està descrit en (Werner et al., 2005). Primer, es van digerir específicament 10 µl de l'eluït amb Ppx1 recombinant. Segon, es va quantificar el fosfat alliberat afegint 86 µl d'heptamolibdat d'amoni 28 mM / àcid sulfúric 2.1 M, i 64 µl de solució de verd de malaquita (0,015% verd de malaquita, 0,1% àcid acètic i 0,17% glicerol). La reacció es va quantificar mitjançant espectrofotometria (Synergy HT, Bio Tek Instruments) a 600 nm, i es va comparar amb els patrons corresponents (0-500 µM Pi).

13. SEPARACIÓ NUCLI-CITOPLASMA

La separació nucli-citoplasma es va dur a terme com està descrit a (Kwak et al., 2013).

Breument, es recullen les cèl·lules amb PBS, es resuspenen amb 400 µl de solució A (10 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 1% NP40, inhibidors de proteases i fosfatases) i s'incuben 10 minuts a 4°C en agitació suau. A continuació, es centrifuga a 2000 rpm durant 10 minuts a 4°C, es recull el sobrenedant on hi ha la fracció citoplasmàtica. El pellet es resuspèn amb 200 µl de solució B (250 µM sacarosa, 10 mM MgCl₂, inhibidors de proteases i fosfatases), un cop resuspès s'afegeixen 200 µl de solució C (880 µM sacarosa, 500 µM MgCl₂, inhibidors de proteases i fosfatases) i es deixa reposar 10 minuts en gel. Finalment, es centrifuga a 6500 rpm durant 10 minuts a 4°C, s'elimina el sobrenedant i es resuspèn el pellet on hi ha la fracció nuclear amb 400 µl de solució RIPA.

14. ASSAIG DE SENSIBILITAT AL DANY A DNA

14.1 Llevats

Per mesurar la sensibilitat a la llum ultraviolada, es van plaquejar 0.5×10^3 cèl·lules en plaques YPD, llavors es van irradiar amb la dosi indicada en cada cas. Es van deixar créixer durant 48 hores, i es van contar les colònies automàticament amb un programa informàtic anomenat GeneTools (Syngene).

Per mesurar la sensibilitat al MMS, es van créixer 2.5×10^6 cèl·lules durant 4 hores en SD complet suplementat amb 0,033% MMS. A continuació es van plaquejar en plaques YPD, i es van deixar créixer durant 48 hores en foscor. Es va utilitzar el mateix mètode per contar les colònies i el mateix criteri per establir els percentatges de supervivència que per mesurar la sensibilitat a la llum ultraviolada.

Els percentatges de supervivència es van calcular dividint el nombre de colònies de la placa irradiada pel nombre de colònies de la placa no irradiada. En cada experiment, la supervivència de la soca salvatge es va considerar el 100% de supervivència i es va utilitzar per normalitzar els percentatges obtinguts.

14.2 Cèl·lules HEK293

Cèl·lules HEK293 es van créixer en DMEM (Sigma) suplementat amb 10% FBS (Gibco), 2 mM L-glutamina (Sigma), 4 unitats/ml de penicil·lina, i 20 mg/ml estreptomicina (Gibco). Es van transfectar amb 20 µg del constructe corresponent usant el mètode del fosfat càlcic. L'eficiència de la sobreexpressió es va analitzar per western-blot, i es va observar la sobreexpressió màxima a les 48 hores.

Les cèl·lules transfectades amb el pIRES2-eGFP buit, o bé amb el scPPX1, el NLS-scPPX1 o el hCPPE1 es van sembrar al cap de 48 hores de la transfecció en plaques de 48 pous a una concentració de 7.5×10^4 cèl·lules/pou. A les 24 hores, es va eliminar el medi, es van irradiar amb 80 J/m^2 de llum UV i es va tornar a afegir medi. A les 23

hores després d'irradiar, es va afegir MTT a una concentració final de 0.2 mg/ml a cada pou, i 1 hora després es va eliminar el medi per lisar les cèl·lules amb DMSO. Finalment es va mesurar l'absorbància a 570 nm.

14.3 Cèl·lules HDFa

Es van créixer cèl·lules HDFa (*Human Dermal Fibroblast adult*) en medi M106 (Life Technologies) suplementat amb *Low Serum Growth Supplement* (Gibco), 4 unitats/ml de penicil·lina, i 20 mg/ml d'estreptomicina (Gibco), i 10 µg/ml de gentamicina (Gibco). Les cèl·lules van ser infectades amb el lentivirus corresponent: pLenti6/V5-DEST, pLenti6/V5-DEST-scPPXI o pLenti6/V5-DEST-NLS-scPPXI amb polibré 8 µg/ml. A les 24 hores després de la infecció, es va canviar el medi de cultiu. L'eficiència de la sobreexpressió dels diferents gens es va comprovar per western-blot, el qual va demostrar que l'efecte màxim es produeix a les 48 hores després de la infecció.

Les cèl·lules infectades amb el pIRES2-eGFP buit, o bé amb el scPPXI o el NLS-scPPXI es van sembrar al cap de 48 hores de la infecció en plaques de 12 pous a una concentració de 4.6×10^4 cèl·lules/pou. A les 24 hores, es va eliminar el medi, es van irradiar amb 60 J/m^2 de llum UV i es va tornar a afegir medi. A les 23 hores després d'irradiar, es va afegir MTT a una concentració final de 0.2 mg/ml a cada pou, i 1 hora després es va eliminar el medi per lisar les cèl·lules amb DMSO. Finalment es va mesurar l'absorbància a 570 nm.

15. ANÀLISI ESTADÍSTIC

S'han dut a terme com a mínim 3 replicats de cada experiment. Els valors representen la mitjana \pm l'error estàndard de la mitjana (SEM). Es considera significatiu quan el valor de $p < 0.05$, aplicant el test de Mann-Whitney.

RESULTATS

1. ELS NIVELLS DE PolyP ESTAN REGULATS CÍCLICAMENT

En les cèl·lules eucariotes, la síntesi de dNTPs s'incrementa a final de G₁ i continua al llarg de fase S, per mitjà de diferents activitats enzimàtiques perfectament coordinades. En un període molt curt de temps el llevat ha d'incorporar 7.5×10^7 molècules de fosfat netes per poder sintetitzar tants nucleòtids com bases té al seu genoma. Malgrat aquesta gran quantitat de fosfat (que representa el 25% de l'ortofosfat citoplasmàtic), els nivells d'ortofosfat es mantenen constants al llarg de tot el cicle cel·lular, (Figura 14) demostrant la gran capacitat d'homeòstasi que té el llevat per mantenir la concentració de fosfat lliure al citoplasma cel·lular.

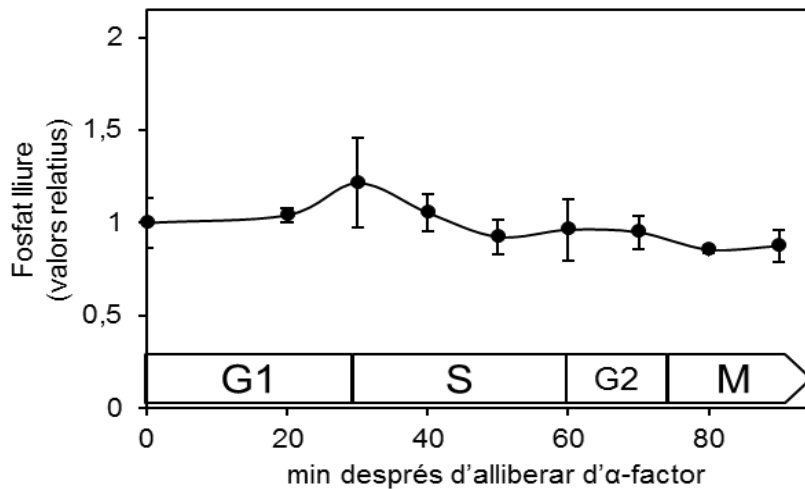


Figura 14 Els nivells d'ortofosfat romanen constants al llarg del cicle. Cèl·lules wt van ser sincronitzades a G₁ amb α-factor i alliberades en YPD. Es van prendre mostres a temps indicats per mesurar la concentració de fosfat lliure a la cèl·lula. Els valors mostren la mitjana entre dos experiments, on les barres mostren el valor obtingut en cada un d'ells.

Una de les funcions del polyP podria ser esmorteir les variacions brusques de fosfat intern (Thomas and O'Shea, 2005), per tant vam decidir veure si el consum de fosfat durant la replicació del DNA estava correlacionat amb la degradació del polyP. Com es pot veure a la figura 15, hi ha una progressiva degradació del polyP durant la fase S, al mateix temps que un augment dels nivells de dNTPs. A més la concentració interna de polyP no torna a incrementar-se, fins acabada la replicació del DNA.

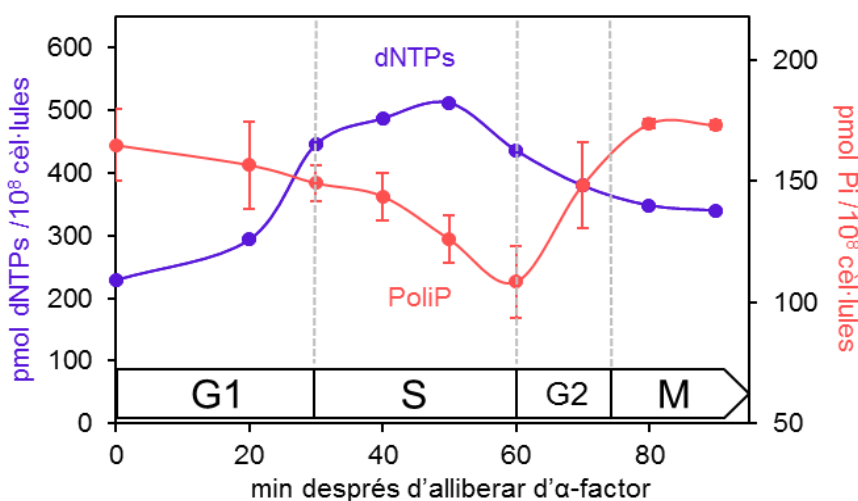


Figura 15 Correlació entre la síntesis de dNTPs i la degradació de polyP. Cèl·lules wt van ser sincronitzades a G₁ amb α-factor i alliberades en YPD. Es van prendre mostres a temps indicats per mesurar nivells de polyP i dNTPs. Els valors dels dNTPs són el sumatori dels quatre dNTPs (dATP, dGTP, dCTP i dTTP) d'un sol experiment, mentre que els del polyP són la mitjana ± SEM de 4 experiments independents.

Aquest resultat suggereix que el gran consum de fosfat durant la fase S podria venir, com a mínim en part, de la degradació del polyP.

El següent pas va ser buscar quins són els mecanismes moleculars que permeten aquesta regulació cíclica del polyP.

2. *VTC4* I *PPN1* S'EXPRESSEN CÍCLICAMENT

Fins ara no hi ha cap resultat previ que expliqui aquesta regulació cíclica del polyP, per tant es va decidir analitzar els perfils d'expressió, després de sincronitzar les cèl·lules amb α -factor i alliberar-les en medi ric, de *VTC4* (enzim responsable de la síntesis de polyP), *VTC1* (regulador positiu de *VTC4*), *PPX1* i *PPN1* (les dos polifosfatases principals de *S. cerevisiae*).

Com es pot veure a la figura 16, *Vtc4* presenta una regulació cíclica amb un pic màxim d'expressió al minut 60. Tot i que aquest resultat no coincideix amb el de la figura 15, ja que al minut 60 és on hi ha els nivells de polyP més baixos, si que suggereix la presència de mecanismes postraduccionals encarregats de regular l'activitat del complex de síntesi.

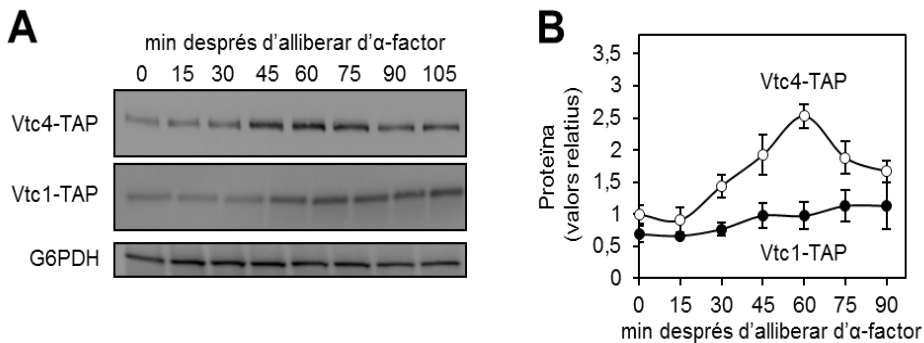


Figura 16 *VTC4* està regulat cíclicament. (A) Cèl·lules wt amb un tag-TAP genòmic van ser sincronitzades a G_1 amb α -factor i alliberades en YPD. Es van analitzar els nivells de TAP mitjançant western-blot. (B) Quantificació de 3 experiments independents (mitjana \pm SEM). Es va normalitzar respecte al temps zero de *Vtc4*-TAP.

També s'observa com Ppx1 es manté bastant constant al llarg del cicle (Figura 17), mentre que Ppn1 descriu un pic al minut 60, després d'alliberar les cèl·lules d' α -factor, coincidint amb el moment de degradació màxima de polyP (Figura 17). Aquest comportament de les polifosfatases si que permet explicar, parcialment, la degradació del polyP durant el període de síntesi de dNTPs.

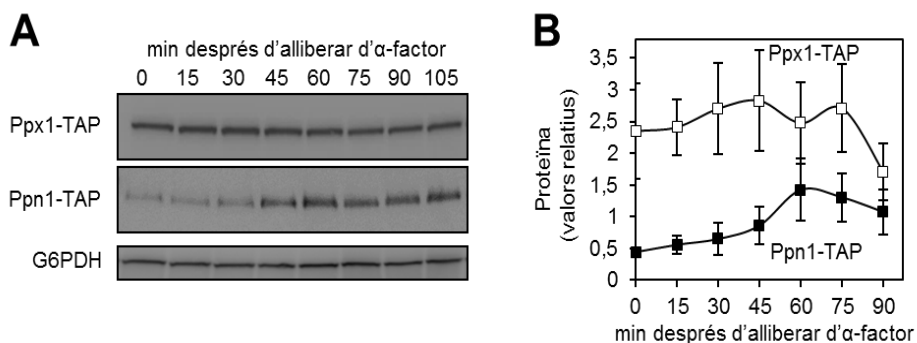


Figura 17 PPNI també està regulat cíclicament. (A) Cèl·lules wt amb un tag-TAP genòmic van ser sincronitzades a G_1 amb α -factor i alliberades en YPD. Es van analitzar els nivells de TAP mitjançant western-blot. (B) Quantificació de 3 experiments independents (mitjana \pm SEM). Es va normalitzar respecte al temps zero de Vtc4-TAP.

A continuació, veient aquesta correlació entre la síntesi de dNTPs i la degradació del polyP, es va decidir investigar si la síntesi de dNTPs es veia afectada en mutants que tenen el metabolisme del polyP alterat.

3.LA SÍNTESIS DE dNTPs ES VEU AFECTADA PELS NIVELLS DE PolyP

Per poder observar millor el rol fisiològic del polyP, es van sincronitzar a G₁ una soca salvatge, una *vtc4Δ* i una *ppn1Δ ppx1Δ* i es van alliberar en un medi baix en fosfat, ja que el polyP esdevé especialment important en un medi limitant de fosfat (Thomas and O'Shea, 2005). En aquestes condicions, es van mesurar els nivells de polyP i de dNTPs. Com esperàvem, una soca *ppn1Δ ppx1Δ* gairebé no pot degradar el polyP, mentre que una soca *vtc4Δ* no té polyP. Tal i com apunta la nostra hipòtesi, 50 minuts després d'alliberar les cèl·lules, els nivells de dNTPs a les soques mutants són 3 vegades inferiors que a la soca salvatge (Figura 18).

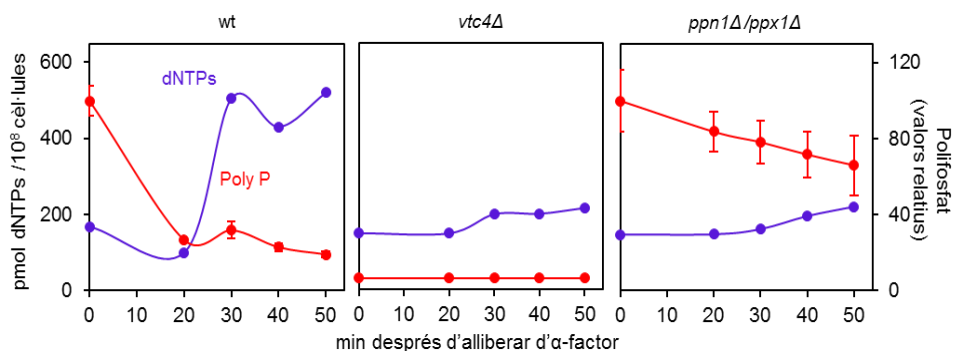


Figura 18 Els mutants *vtc4Δ* i *ppn1Δ/ppx1Δ* presenten una baixa síntesis de dNTPs durant la fase S. Cèl·lules wt, *vtc4Δ* i *ppn1Δ/ppx1Δ* van ser sincronitzades a G₁ amb α -factor i alliberades en medi sintètic complet baix en fosfat. Es van prendre mostres a temps indicats per mesurar nivells de polyP i dNTPs. Els valors dels dNTPs són el sumatori dels quatre dNTPs (dATP, dGTP, dCTP i TTP) d'un sol experiment, mentre que els del polyP són la mitjana \pm SEM de 4 experiments independents.

Aquests resultats suggereixen que la degradació del polyP és necessària per sostenir la síntesis de dNTPs, probablement perquè s'evita així una variació brusca dels nivells fisiològics d'ortofosfat citoplasmàtic.

4. DEL PolyP DEPÈN UNA CORRECTA PROGRESSIÓ PEL CICLE CEL·LULAR

La baixa quantitat de dNTPs observada als mutants a final de G₁ va donar peu a predir que aquests mutants haurien de presentar un retràs durant la progressió pel cicle cel·lular.

Per comprovar la nostra idea, una soca wt, una *vtc4Δ* i una *ppn1Δ/ppx1Δ* es van sincronitzar a G₁ i es van alliberar en medi baix en fosfat, la progressió pel cicle es va analitzar mitjançant un anàlisi de FACS. Després de 70 minuts, el 80% de les cèl·lules wt havien completat la replicació del DNA, mentre que els mutants necessitaven de uns 140 minuts per completar-la (Figura 19).

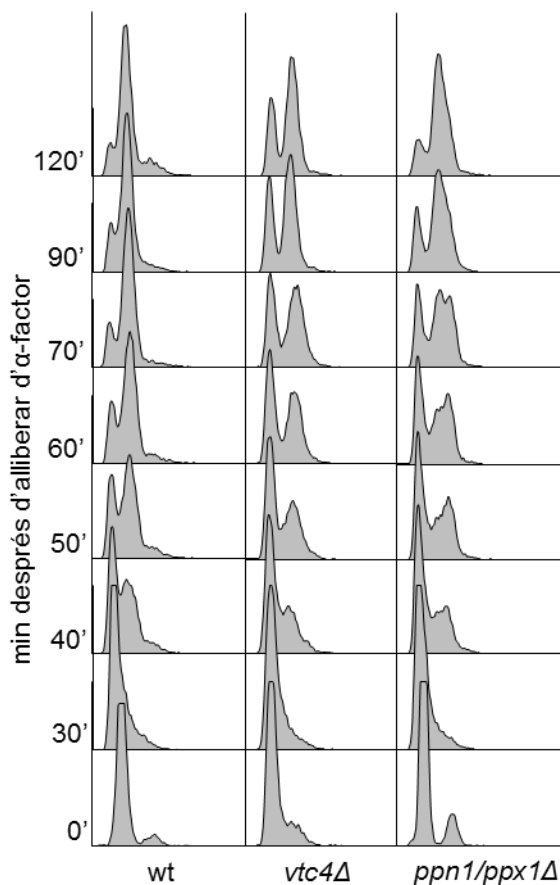


Figura 19 Els mutants *vtc4Δ* i *ppn1Δ/ppx1Δ* presenten un retràs important durant la progressió pel cicle cel·lular. Cèl·lules wt, *vtc4Δ* i *ppn1Δ/ppx1Δ* van ser sincronitzades a G₁ amb α-factor i alliberades en medi sintètic complet baix en fosfat. Es van recollir mostres a temps indicats per analitzar la progressió pel cicle mitjançant FACS.

Per descartar qualsevol efecte indirecte de la manca de polyP sobre la maquinària del cicle cel·lular, es van mesurar els nivells d'alguns dels marcadors moleculars necessaris perquè tingui lloc la transició G₁/S. Com es pot veure a continuació, no va haver-hi diferències ni en nivells ni moment d'expressió de les ciclines Pcl1 (indicador de la transcripció dependent de SBF) (Figura 20 A) i Clb5 (indicador de la transcripció dependent de MBF i d'entrada en fase S) (Figura 20 B), al comparar una soca salvatge amb una *vtc4Δ*.

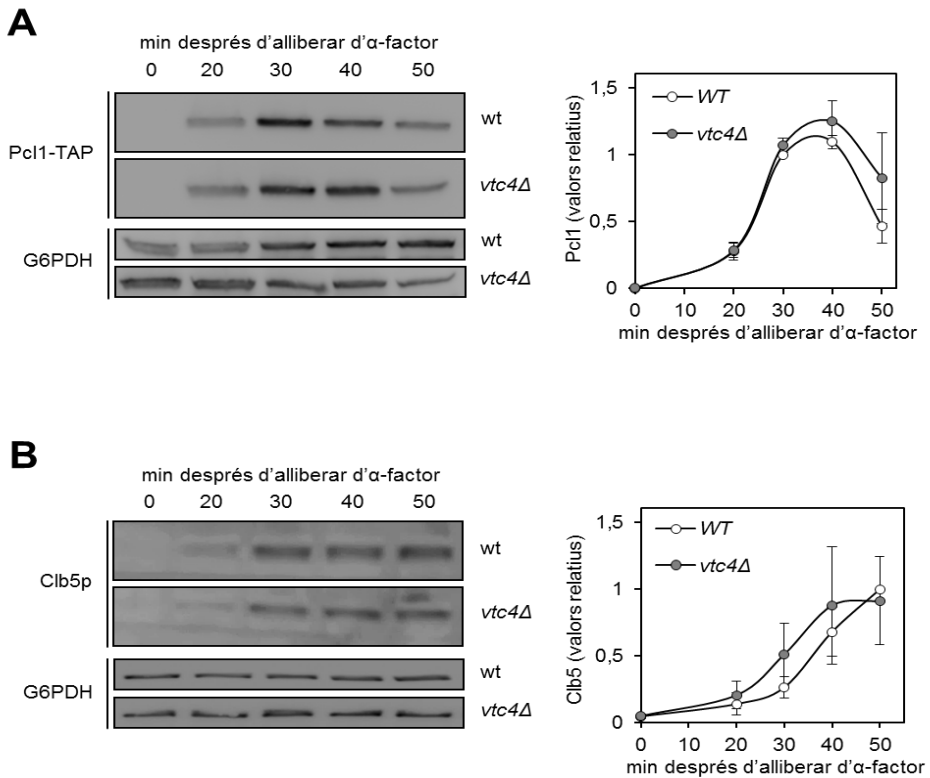


Figura 20 La manca de polyP no afecta a la transcripció per SBF i MBF, el mutant *vtc4Δ* presenta nivells normals d'expressió de ciclines de G₁. Cèl·lules wt i *vtc4Δ* van ser sincronitzades a G₁ amb α -factor i alliberades en medi sintètic complet baix en fosfat. Els nivells de Pcl1-TAP i Clb5 es van quantificar mitjançant western-blot usant anticossos contra la proteïna A (per detectar Pcl1-TAP) (A) o contra Clb5 (B). Els gràfics mostren la mitjana \pm SEM de la quantificació de 3 experiments independents.

Per tant, es va concloure que els mutants presentaven els requeriments moleculars necessaris per progressar pel cicle, excepte la font de fosfat necessària per poder sintetitzar els dNTPs. De fet, quan es va afegir fosfat inorgànic al medi els mutants van revertir el seu fenotip (Figura 21).

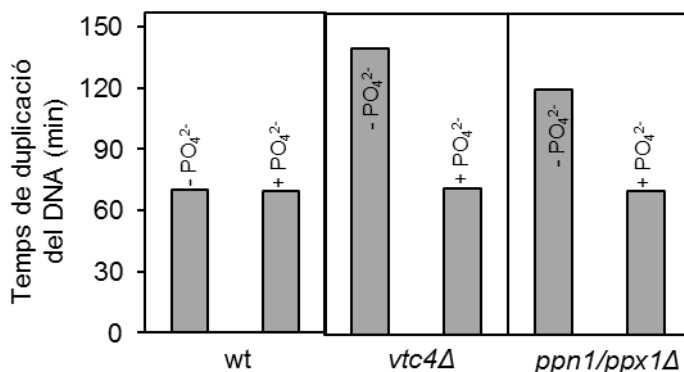


Figura 21 L'addició de fosfat inorgànic provoca la recuperació del retràs de les soques *vtc4Δ* i *ppn1Δ/ppx1Δ*. Cèl·lules wt, *vtc4Δ* i *ppn1Δ/ppx1Δ* van ser sincronitzades a G₁ amb α-factor i alliberades o bé en medi sintètic complet baix en fosfat o bé amb el mateix medi suplementat amb 1mM fosfat. El gràfic mostra el temps que triga cada soca en completar la duplicació del DNA, basant-se amb mesures preses mitjançant FACS. Es considera que han duplicat el DNA quan el pic representatiu de 2n conté el 80% de les cèl·lules.

5. RELLEVÀNCIA DEL PolyP EN MEDI RIC EN FOSFATS

Si s'analitzen els valors que representa la figura anterior es pot observar com inclús afegint fosfat al medi els mutants mantenen un retràs d'uns dos minuts respecte la soca salvatge, que no es poden apreciar al gràfic, suggerint que la degradació del polyP es rellevant àdhuc en medis rics en fosfat. Per poder quantificar millor aquesta petita diferència es va decidir analitzar la progressió pel cicle d'un *vtc4Δ* en YPD a 25°C, i mostrejant cada 5 minuts (Figura 22 A).

Per poder quantificar el retràs, es va decidir mesurar el temps que cada una de les soques triga en duplicar el contingut de DNA, es considera que han duplicat el DNA quan el pic representatiu de 2n conté el 80% de les cèl·lules. Com es pot observar a la figura 22 B, al minut 69 el 80% de les cèl·lules salvatges han completat la duplicació del DNA, mentre que la soca *vtc4Δ* no és fins al minut 71 quan aconseguix tenir el 80% de la població en 2n. Per tant s'observa que el *vtc4Δ* presenta un retràs de 2,46 minuts respecte la soca salvatge.

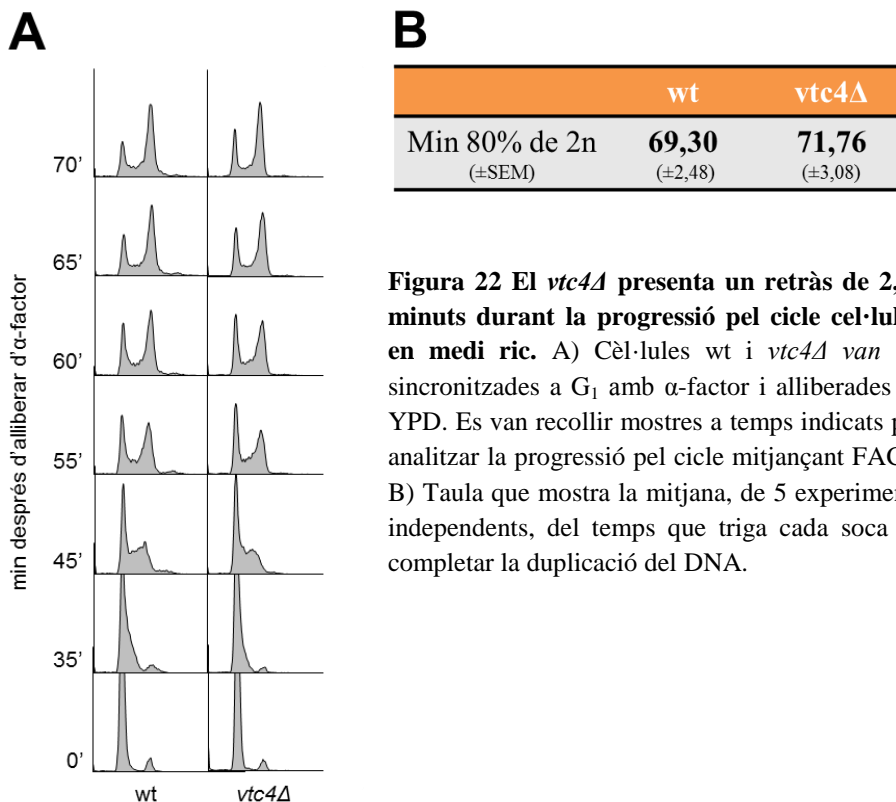


Figura 22 El *vtc4Δ* presenta un retràs de 2,46 minuts durant la progressió pel cicle cel·lular en medi ric. A) Cèl·lules wt i *vtc4Δ* van ser sincronitzades a G₁ amb α-factor i alliberades en YPD. Es van recollir mostres a temps indicats per analitzar la progressió pel cicle mitjançant FACS. B) Taula que mostra la mitjana, de 5 experiments independents, del temps que triga cada soca en completar la duplicació del DNA.

Finalment, per analitzar la rellevància fisiològica d'aquest petit retràs, es va testar l'habilitat d'una soca sense polyP per competir amb una soca salvatge en un medi ric. Aquest tipus d'experiments de competició permeten observar al cap dels dies si una soca s'ha imposat (en termes quantitius) sobre de l'altre. Com es pot veure a la figura 23, al cap de 6 dies les cèl.lules de la soca *vtc4Δ* representen el 30% de la població del cultiu.

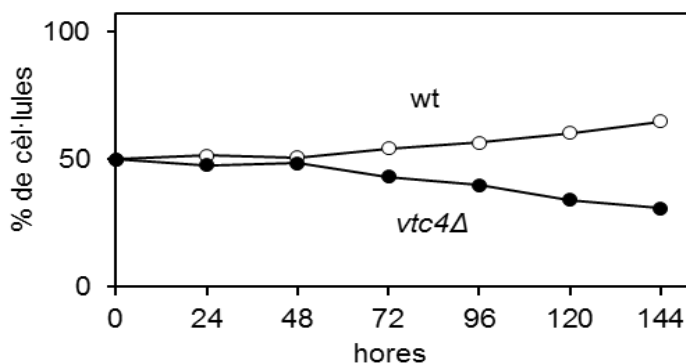


Figura 23 El mutant *vtc4Δ* presenta una pitjor fitness que el wt. Cèl.lules wt i *vtc4Δ* van ser transformades amb el plasmidi pRS413(HIS) i amb el pRS415(LEU) respectivament. Es van sembrar al mateix matraç en YPD $1,5 \times 10^7$ cèl.lules/ml de cada una de les soques. Cada 24 hores es va recollir mostra per plaquejar-la en plaques sense histidina i en plaques sense leucina. Finalment, es va calcular el creixement dividint el nombre de cèl.lules en cada temps per les cèl.lules presents a temps zero. La figura mostra un experiment representatiu.

6. EL PolyP PROTEGEIX ENFRONT LA RADIACIÓ ULTRAVIOLADA EN LLEVATS

A més de la síntesis del DNA, existeix una altra situació cel·lular que requereix grans quantitats de dNTPs: sobreviure després de dany a DNA (Chabes et al., 2003), i podria ser que en aquesta situació el polyP també jugués un paper en la síntesis de dNTPs durant la reparació del dany al DNA. Per comprovar aquesta hipòtesi, es va utilitzar la radiació ultraviolada (UV) com agent mutagènic. Aquest mutagen provoca la formació de dímers de pirimidina, majoritàriament T-T, entre bases adjacents.

Es van sincronitzar les cèl·lules a G₁, es van irradiar amb 40 J/m² i van ser alliberades en medi ric i es va seguir la seva progressió pel cycle mitjançant FACS. En 140 minuts el 80% de les cèl·lules salvatges van completar la duplicació del DNA, mentre que en les soques mutants només el 50% van poder duplicar el seu genoma (Figura 24).

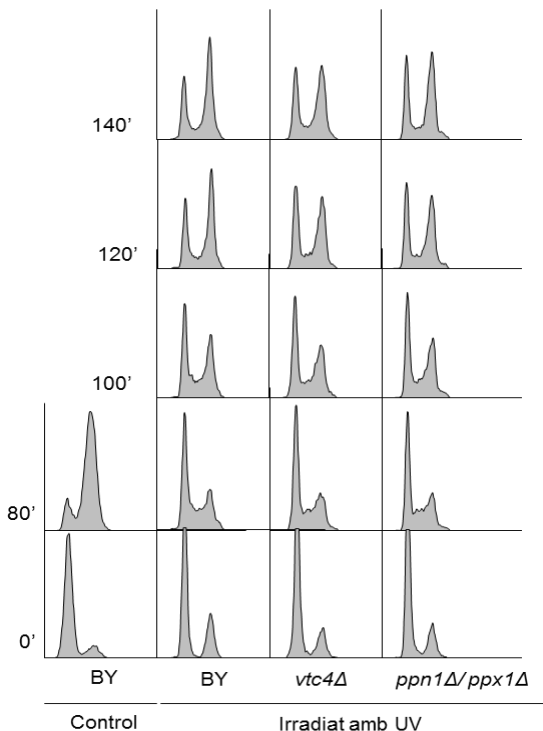


Figura 24 Els mutants que no poden utilitzar el polyP presenten un retràs en la progressió pel cycle després d'irradiar les cèl·lules amb UV. Cèl·lules wt, *vtc4Δ* i *ppn1Δ/ppx1Δ* van ser sincronitzades a G₁ amb α -factor, irradiades amb 40 J/m² i alliberades en medi sintètic complet. Es van recollir mostres a temps indicats per analitzar la progressió pel cycle mitjançant FACS.

6.1 Viabilitat dels mutants del metabolisme del polyP

A continuació, es va avaluar si aquest retràs pel cicle afecta la viabilitat cel·lular. I com es pot veure a la figura 25, aquests mutants presenten una viabilitat menor que les cèl·lules salvatge, després de ser irradiats amb una dosi de 60 J/m^2 de radiació UV, indicant que el polyP podria estar jugant un paper molt important en la protecció enfront la radiació UV.

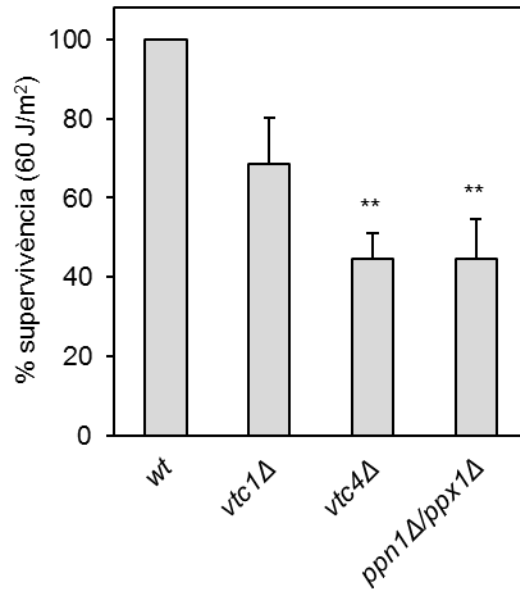


Figura 25 Els mutants del metabolisme del polyP són més sensibles al dany per UV. Cèl·lules wt, *vtc1Δ*, *vtc4Δ* i *ppn1Δ/ppx1Δ* van ser plaquejades en YPD i irradiades amb 60 J/m^2 , es van contar el nombre de colònies al cap de 48 hores. El gràfic mostra el percentatge de supervivència dels mutants respecte la soca wt. Es mostra la mitjana de 4 experiments independents \pm SEM. L'asterisc indica diferències significatives determinat pel test de Mann-Whitney U. * indica $p < 0.05$ i ** indica $p < 0.005$.

Per poder utilitzar les reserves de polyP, a més dels enzims necessaris per sintetitzar-lo o degradar-lo, podria necessitar-se Pho91, el transportador de baixa afinitat, situat a la membrana de la vacuola, responsable de la sortida del fosfat des de la vacuola cap al citosol, per això es va decidir testar la viabilitat cel·lular d'una soca *pho91Δ*.

En un principi i tal com indica la figura 27, la soca *pho91Δ* provinent de la col·lecció és molt més sensible a la radiació UV que la soca salvatge. Aquest resultat tan dràstic (més sensible que una soca *vtc4Δ*), va fer que s'analitzés en més detall aquest mutant. Es va començar analitzant quina és la posició genòmica de *PHO91*, com es pot veure a la figura 26, *PHO91* es troba localitzat al cromosoma 14 a la cadena (-). La porció C-ter coincideix amb el terminador d'un altre gen anomenat *URK1* (*uridine kinase 1*) localitzat a la cadena (+). Aquest gen, curiosament codifica una proteïna quinasa involucrada en la via de salvament tan de ribonucleòtids com de deoxinucleòtids. Aquesta quinasa és la responsable de la fosforilació, tan de citidina i uridina per obtenir CMP i UMP, com de deoxicitidina i deoxiuridina per obtenir dCMP i dUMP.

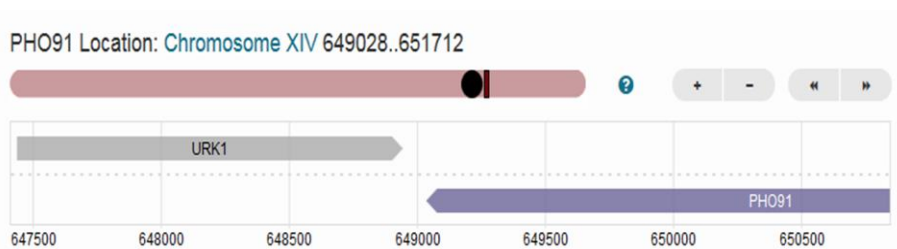


Figura 26 Esquema de la localització de *PHO91*. Imatge obtinguda de la pàgina web: *Saccharomyces* genome data base (SGD).

El que ens vam plantejar a continuació va ser si el KO de *PHO91* podria estar afectant al terminador de *URK1*. Per descartar aquesta hipòtesi, es va decidir construir un *pho91Δ* deixant intacta la zona del terminador de *URK1*, per tant el KO engloba des de la Met fins la Val 826, deixant els últims 68 aminoàcids de la proteïna intactes. I com s'observa a la figura 27, aquest nou *pho91Δ(1-826 aa)* presenta la mateixa viabilitat que la soca salvatge, indicant probablement que l'efecte observat anteriorment era degut a l'afectació del terminador de *URK1*. Per acabar de confirmar aquesta hipòtesi hauríem d'analitzar l'efecte de la radiació UV sobre una soca *urk1Δ*.

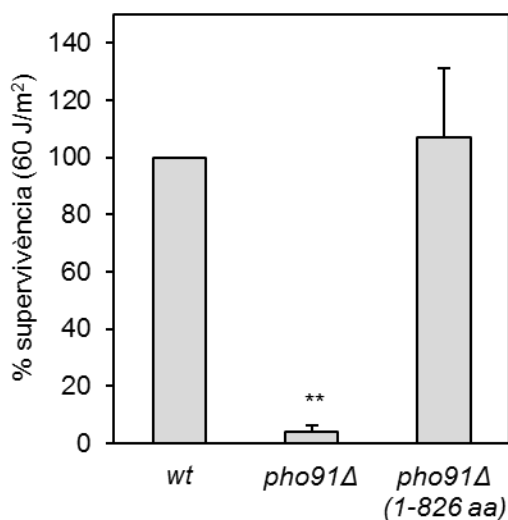


Figura 27 El mutant *pho91Δ* de la col·lecció de EUROSCARF, és probablement *urk1Δ*. Cèl·lules wt, *pho91Δ* i *pho91Δ(1-826 aa)* van ser plaquejades en YPD i irradiades amb 60 J/m², es van contar el nombre de colònies al cap de 48 hores. El gràfic mostra el percentatge de supervivència dels mutants respecte la soca salvatge. Es mostra la mitjana de 3 experiments independents ± SEM. L'asterisc indica diferències significatives determinat pel test de Mann-Whitney U. * indica p<0.05 i ** indica p<0.005.

6.2 Viabilitat dels mutants de la via PHO

Tenint en compte aquests resultats i que la via de senyalització PHO és responsable de la captació i emmagatzematge de fosfat en forma de polyP, és lògic preguntar-se com afectaria la radiació ultraviolada a les cèl·lules que tenen mutat algun dels elements clau de captació de fosfat.

Es va començar analitzant la viabilitat cel·lular d'una soca *pho84Δ*, en aquesta soca, que no pot captar fosfat de forma massiva, els nivells de polyP són pràcticament zero (Ogawa et al., 2000). Com es pot veure a la figura 28, el *pho84Δ* és significativament més sensible a la radiació ultraviolada que la soca salvatge.

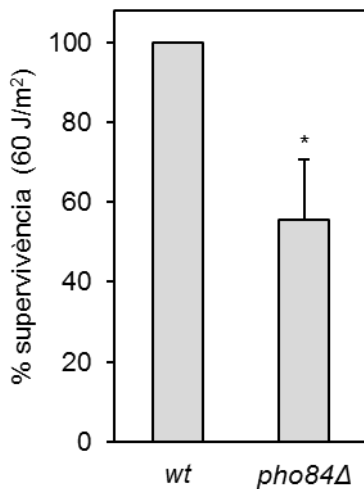


Figura 28 La soca *pho84Δ* també és més sensible a la radiació UV. Cèl·lules wt i *pho84Δ* van ser plaquejades en YPD i irradiades amb 60 J/m², es van contar el nombre de colònies al cap de 48 hores. El gràfic mostra el percentatge de supervivència del *pho84Δ* respecte la soca salvatge. Es mostra la mitjana de 7 experiments independents ± SEM. L'asterisc indica diferències significatives determinat pel test de Mann-Whitney U. * indica p<0.05 i ** indica p<0.005.

A continuació, es va decidir inferir en la via de senyalització, i es va testar la sensibilitat a la radiació ultraviolada d'una soca *pho85Δ*, d'una *pho80Δ* i d'una *pho4Δ*.

Com s'aprecia al gràfic la soca *pho4Δ* és significativament sensible a la radiació UV (Figura 29), d'aquesta soca es coneix que presenta uns nivells molt baixos de polyP (Ogawa et al., 2000), ja que promou la transcripció dels gens involucrats en la síntesi d'aquests, per tant es confirma la importància del polyP per fer front al dany per UV.

En canvi, els mutants *pho85Δ* i *pho80Δ*, que s'esperaria a priori que fossin més resistents, o si més no, no fossin sensibles ja que tenen Pho4 constitutivament activat, es veu com són més sensibles que la soca salvatge (Figura 29). Això pot ser degut a diferents efectes secundaris sobre aquests mutants que es detallaran a l'apartat de discussió.

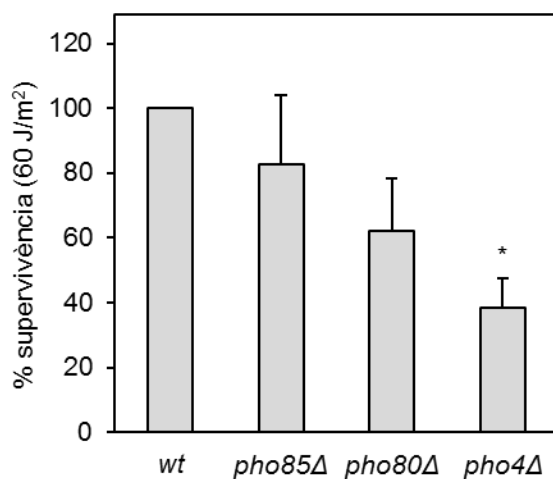


Figura 29 La soca *pho4Δ* també és més sensible a la radiació UV. Cèl·lules wt, *pho85Δ*, *pho80Δ* i *pho4Δ* van ser plaquejades en YPD i irradiades amb 60 J/m², es van contar el nombre de colònies al cap de 48 hores. El gràfic mostra el percentatge de supervivència dels diferents mutants respecte la soca salvatge. Es mostra la mitjana de 7 experiments independents ± SEM. L'asterisc indica diferències significatives determinat pel test de Mann-Whitney U. * indica p<0.05 i ** indica p<0.005.

6.3 Viabilitat dels mutants del metabolisme dels dNTPs

Finalment, si la deleció dels gens encarregats d'aportar la font de fosfat a la via de síntesis de dNTPs, ja siguin transportadors d'alta afinitat, complex de síntesis de polyP o polifosfatases, són sensibles al dany a DNA per ultraviolat; la següent qüestió és quin serà l'efecte de la radiació ultraviolada sobre els mutants amb baixa activitat nucleòsid quinasa.

Per respondre la pregunta, es van utilitzar els següents mutants: *adk1Δ*, quinasa responsable de la conversió de AMP a ADP, *ynk1Δ*, nucleòsid difosfat quinasa responsable de la conversió de dNDPs a dNTPs, i coma control positiu *dun1Δ*, quinasa responsable d'induir la resposta de síntesi de dNTPs després de dany a DNA. Com s'observa a la figura 30, aquests mutants són significativament més sensibles a la radiació ultraviolada que la soca salvatge.

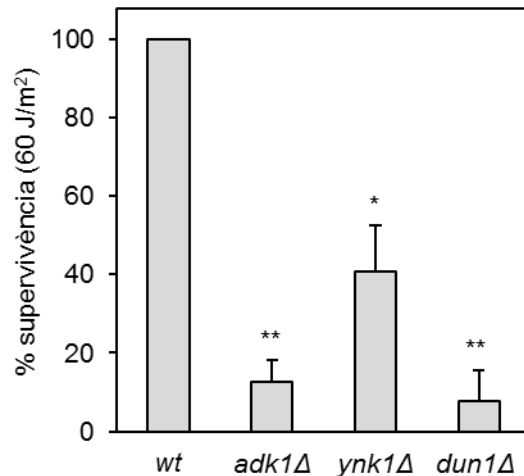


Figura 30 Mutants amb baixa activitat nucleòsid quinasa també són més sensibles a la radiació UV. Cèl·lules wt, *adk1Δ*, *ynk1Δ* i *dun1Δ* van ser plaquejades en YPD i irradiades amb 60 J/m², es van contar el nombre de colònies al cap de 48 hores. El gràfic mostra el percentatge de supervivència dels diferents mutants respecte la soca wt. Es mostra la mitjana de 4 experiments independents ± SEM. L'asterisc indica diferències significatives determinat pel test de Mann-Whitney U. * indica p<0.05 i ** indica p<0.005.

7. UN EXCÈS DE POLYP CONFEREIX RESISTÈNCIA ENFRONT LA RADIACIÓ UV

Per confirmar el rol protector del polyP enfront la radiació UV, es va investigar si nivells superiors als normals de polyP podrien protegir la cèl·lula de la radiació UV. Es van incrementar els nivells de polyP de dues maneres. Per una banda es van créixer cèl·lules salvatges en condicions de sobrecàrrega de polyP (Werner et al., 2005), amb les quals s'obtenen nivells tres vegades superiors als normals com s'indica a la figura 31. Per altra banda, es va induir la sobre expressió de *VTC4*, amb la qual cosa es va incrementar en un 20% els nivells de polyP a la cèl·lula. Tan en l'una com en l'altra, es va observar una bona correlació entre els nivells de polyP al moment d'irradiar les cèl·lules i la supervivència (Figures 31 i 32).

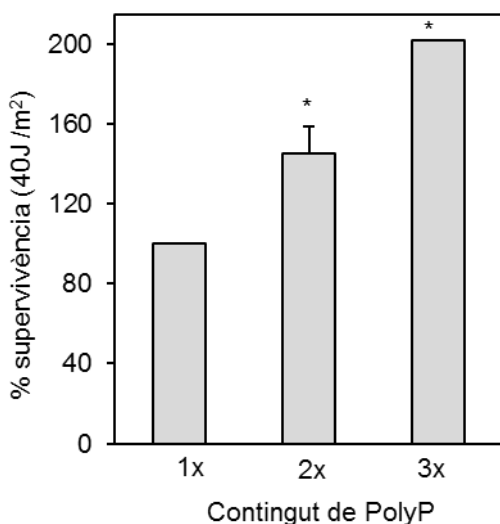


Figura 31 Nivells més alts de polyP confereixen més resistència enfront a dany per UV. Cèl·lules wt es van créixer amb unes condicions específiques per sobrecarregar-les de polyP (Werner et al., 2005). Es van plaquejar i irradiar amb 40 J/m² i al cap de 48 hores es van contar el nombre de colònies. Es mostra la mitjana de 3 experiments independents \pm SEM. L'asterisc indica diferències significatives determinat pel test de Mann-Whitney U. * indica $p < 0.05$ i ** indica $p < 0.005$.

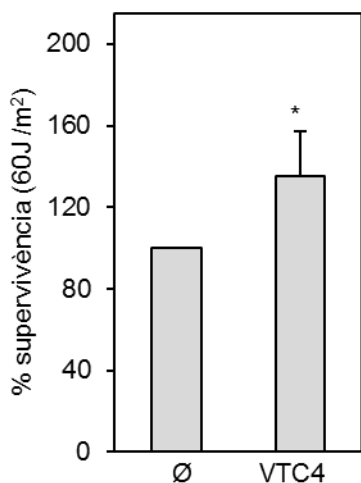


Figura 32 La sobreexpressió de vtc4 dona resistència enfront el dany per UV. Cèl·lules wt portadores del vector buit o portadores del vector amb VTC4 van ser plaquejades en YPD i irradiades amb 60 J/m². El gràfic mostra la supervivència de les cèl·lules que sobreexpressaven VTC4 respecte les portadores del vector buit després de 48 hores del tractament. Es mostra la mitjana de 3 experiments independents ± SEM. L'asterisc indica diferències significatives determinat pel test de Mann-Whitney U. * indica p<0.05 i ** indica p<0.005.

Aquests resultats reforcen la idea prèvia que el polyP és un element clau per protegir les cèl·lules de la radiació UV en llevats. El que es va plantejar a continuació va ser si el polyP confereix resistència enfront d'altres agents mutagènics, o aquests efectes observats són específics pel tipus de dany provocat per la radiació UV.

8. EL POLYP CONFEREIX RESISTÈNCIA CONTRA ALTRES TIPUS D'AGENTS MUTAGÈNICS

Per elucidar aquesta qüestió es van exposar les cèl·lules a MMS. Aquest mutagen és un agent alquilant que ocasiona canvis químics en les bases del DNA, provocant la formació d'aparellaments erronis entre les bases; es produeixen transicions o transversions.

A l'igual que en el cas de del dany per UV, la soca *vtc4Δ* presenta pitjor supervivència que la soca salvatge enfront al mutagen (Figura 33), suggerint que el polyP protegeix contra diferents tipus de dany a DNA.

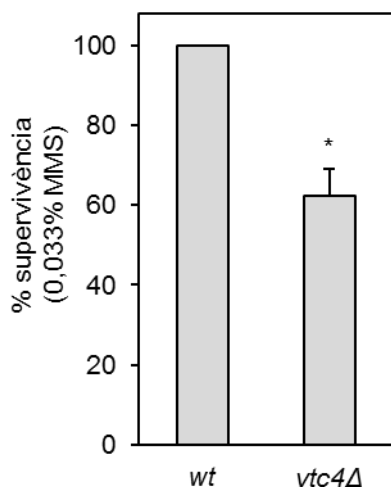


Figura 33 La soca *vtc4Δ* també és més sensible al dany per MMS. Cèl·lules wt i *vtc4Δ* es van créixer durant 4 hores en medi sintètic complet suplementat amb un 0.033% de MMS, llavors es van plaquejar en plaques YPD i es van contar el nombre de colònies al cap de 48 hores. El gràfic mostra el percentatge de supervivència del *vtc4Δ* respecte la soca wt. Es mostra la mitjana de 4 experiments independents \pm SEM. L'asterisc indica diferències significatives determinat pel test de Mann-Whitney U. * indica $p < 0.05$ i ** indica $p < 0.005$.

Per continuar en la investigació, es va decidir investigar si el rol protector del polyP en cèl·lules de llevat està conservat en cèl·lules de mamífer.

9.ES MANTÉ EL ROL PROTECTOR DEL POLYP EN CÈL·LULES DE MAMÍFER

Com s'ha mencionat a la introducció, els enzims responsables de la síntesis i la degradació del polyP en cèl·lules de mamífer encara no s'han pogut identificar. Per aquesta raó molts autors han utilitzat la sobreexpressió del gen *PPXI* de llevats, per aconseguir reduir els nivells de polyP en cultius cel·lulars (Wang et al., 2003). A més, es va sobreexpressar el *PPXI* fusionat a una seqüència de localització nuclear (NLS), ja que en cèl·lules animals l'increment de dNTPs per fer front al dany a DNA es troba focalitzat al lloc del dany (Niida et al., 2010), suggerint que la fracció important de polyP durant el dany a DNA podria ser la nuclear.

9.1 El *PPXI* s'expressa perfectament en cèl·lules HEK293

El primer que es va fer va ser, per una banda comprovar que realment el *PPXI* de *S.cerevisiae* s'expressés en cèl·lules HEK293, i per l'altra que el NLS-*PPXI* es localitzés a nucli.

Com s'observa a la figura 34, tan el Ppx1 com el NLS-Ppx1 s'expressen perfectament en cèl·lules HEK293, però desafortunadament només una petita part del NLS-Ppx1 es troba localitzat a nucli.

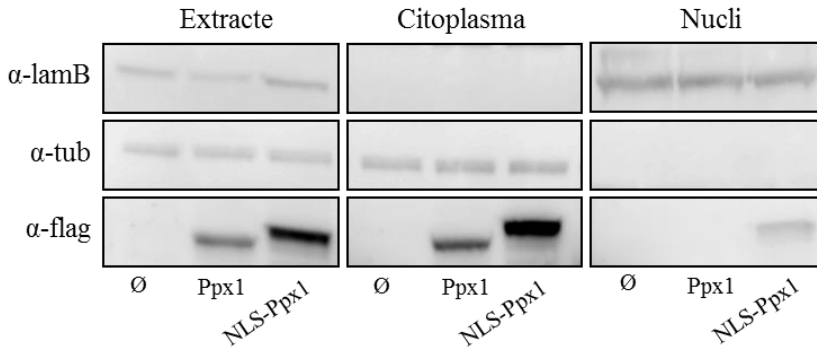


Figura 34 Nivells d'expressió i localització del Ppx1 i del NLS-Ppx1 en cèl·lules HEK293. Cèl·lules HEK293 van ser transfectades amb el plasmidi pIRES2 buit, amb el mateix plasmidi portador del gen *PPX1* de *S. cerevisiae* o amb el gen *PPX1* fusionat a una senyal de localització nuclear (NLS). Primer, es va dur a terme una separació nucli-citoplasma, i a continuació es fer un western-blot de cada una de les fraccions (extracte, citoplasma i nucli). Es va utilitzar un α -flag per detectar el Ppx1, un α -laminina B per diferenciar la fracció nuclear i un α -tubulina per diferenciar la fracció citoplasmàtica.

9.2 Ppx1 redueix els nivells de polyP en cèl·lules humanes

A continuació, es va procedir a comprovar si aquesta sobreexpressió tenia algun efecte sobre els nivells de polyP d'aquestes cèl·lules. Com s'observa a la figura 35, les cèl·lules que sobreexpressen *PPX1* presenten nivells de polyP estadísticament significatius més baixos que les cèl·lules portadores del plasmidi buit. A més, el NLS-*PPX1* sembla que presenta uns nivells encara més baixos que el *PPX1*, indicant que possiblement estigui degradant almenys una petita part de la fracció nuclear del polyP a més de la citoplasmàtica.

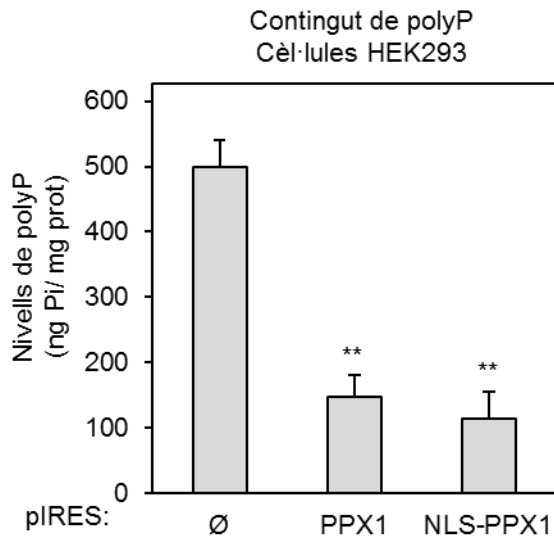


Figura 35 La sobreexpressió de *PPX1* i *NLS-PPX1* produeix la caiguda del polyP en cèl·lules HEK293. Es van mesurar els nivells de polyP de les mateixes cèl·lules que a la figura 33. El gràfic mostra els nivells de polyP de les cèl·lules que sobreexpressen *PPX1* i el *NLS-PPX1* respecte els nivells de les cèl·lules que contenen el plasmidi buit. Es mostra la mitjana de 6 experiments independents \pm SEM. L'asterisc indica diferències significatives determinat pel test de Mann-Whitney U. * indica $p < 0.05$ i ** indica $p < 0.005$.

Quan es va tenir el sistema a punt es va procedir a investigar el rol protector que pot tenir el polyP en cèl·lules de mamífer exposant aquestes cèl·lules a la radiació UV.

9.3 El polyP protegeix de la radiació UV en cèl·lules humanes

Amb aquesta estratègia, es va comparar la viabilitat de les cèl·lules HEK293 transfectades, o bé amb un plasmidi portador del gen *PPX1* o *NLS-PPX1*, o bé amb un plasmidi buit.

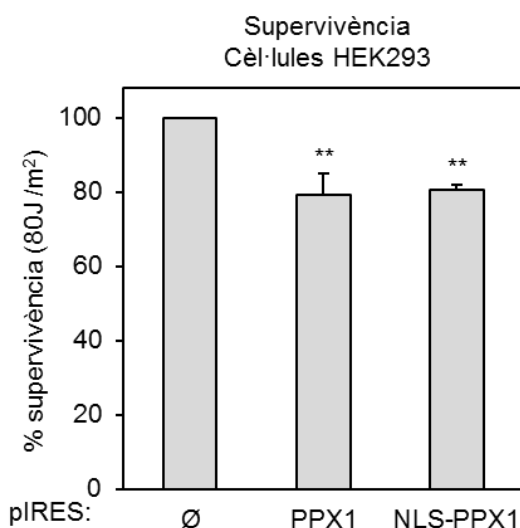


Figura 36 Baixos nivells de polyP estan relacionats amb una baixa resistència enfront al dany amb UV en cultius cel·lulars. Les mateixes cèl·lules de la figura 36 es van irradiar amb 80 J/m² i es va fer un assaig MTT per determinar la seva viabilitat. Es mostra la mitjana de 3 experiments independents \pm SEM. L'asterisc indica diferències significatives determinat pel test de Mann-Whitney U. * indica $p < 0.05$ i ** indica $p < 0.005$.

Com s'observa a la figura 36, les cèl·lules que sobreexpressen *PPX1* presenten una supervivència significativament inferior que les cèl·lules control portadores del plasmidi buit, posant de manifest el rol protector del polyP enfront el dany a DNA.

Les cèl·lules portadores del gen *NLS-PPX1* també són sensibles a la radiació ultraviolada (Figura 36), però tenint en compte que només una petita fracció localitza a nucli i que presenta el mateix índex de supervivència que el *PPX1*, podríem afirmar que el que estem veient és

l'efecte de *PPXI* al citoplasma. Per poder analitzar en precisió el rol de la fracció nuclear del polyP, intentarem buscar la forma de localitzar el Ppx1 majoritàriament a nucli.

9.4 El polyP ens protegeix dels raigs solars

Finalment, es va comprovar la mateixa idea amb un model més fisiològic. La llum UV, provinent dels raigs solars que impacten sobre la pell humana, arriba a la dermis induint dany sobre els fibroblasts presents en aquesta capa (Sander et al., 2002).

Es van infectar cultius primaris de fibroblasts humans de la dermis (HDFa) amb lentivirus portadors o bé d'un plasmidi buit o bé qualsevol de les dos construccions de *PPXI*. Tot i que es va comprovar que les dues construccions expressessin perfectament *PPXI*, no es van provar els nivells de polyP d'aquestes cèl·lules sense sobreexpressar *PPXI* i sobreexpressant-lo, per tant es va suposar que Ppx1 també pot degradar el polyP en aquestes cèl·lules. Tampoc s'ha comprovat que el NLS-*PPXI* es localitzi a nucli, però considerem que almenys la mateixa proporció observada en cèl·lules HEK293 estarà present també a nucli en aquest tipus cel·lular. Igual que les cèl·lules HEK293, es van irradiar els HDFa amb llum UV per analitzar el possible rol protector del polyP en aquestes cèl·lules.

Els HDFa que expressaven *PPXI* van esdevenir també més sensibles a la radiació UV que les cèl·lules control (Figura 37). Sorprenentment, en aquest cas el NLS-*PPXI* presenta una supervivència més baixa que el *PPXI*, possiblement aquí si que existeix un efecte addicional sobre la degradació citoplasmàtica produït per la degradació de la fracció nuclear del polyP. Per tant, aquest resultat suggereix que la fracció nuclear del polyP podria actuar coma un nou factor de resistència contra el dany induït per radiació ultraviolada en cultius cel·lulars.

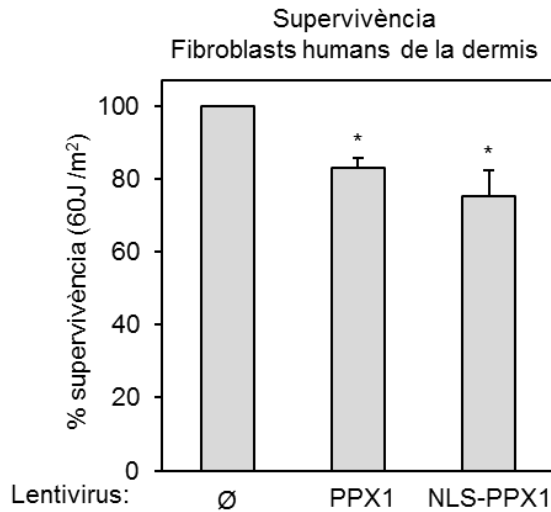


Figura 37 Baixos nivells de polyP disminueixen la resistència al dany per UV dels fibroblasts humans de la dermis (HDFa). HDFa van ser infectats amb els lentivirus indicats i irradiats amb 60 J/m², llavors es va fer un assaig MTT per determinar la viabilitat. Es mostra la mitjana de 5 experiments independents ± SEM. L'asterisc indica diferències significatives determinat pel test de Mann-Whitney U. * indica p<0.05 i ** indica p<0.005.

El conjunt d'aquests resultats suggereix, primer que el polyP actua com a protector enfront la radiació UV, provinent dels raigs solars, que incideix sobre la pell humana. I segon, que possiblement aquest rol protector es troba conservat des de llevats fins a humans.

10. *CPPEDI*, NOVA POLIFOSFATASA HUMANA?

L'any 2006 es va fer un estudi bioinformàtic mitjançant un mètode anomenat EFICAZ (*Enzyme Function Inference by a Combined Approach*) (Arakaki et al., 2006). Aquest mètode té com a objectiu determinar la possible funció d'un enzim desconegut a partir de la seva seqüència. Combina diferents mètodes per generar prediccions el més fiables possible: (1) associar la seqüència a una família gènica, (2) presència de possibles dominis funcionals, (3) presència de residus associats a alguna funció concreta.

En aquest estudi es va predir que el gen *CPPEDI* és una possible endopolifosfatasa humana, per tant es va decidir testar si la sobreexpressió d'aquest gen tenia el mateix efecte que la sobreexpressió de *PPXI*.

10.1 El *CPPEDI* s'expressa en cèl·lules HEK293

Igual que es va fer amb el *PPXI*, es va començar comprovant que el gen transfectat *CPPEDI* s'expressés en cèl·lules HEK293 (Figura 38).

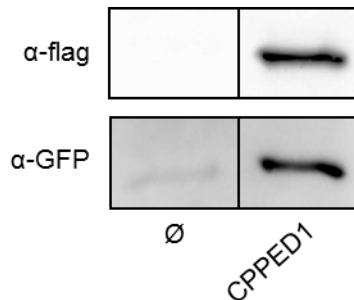


Figura 38 Expressió de *CPPEDI* en cèl·lules HEK293. Cèl·lules HEK293 van ser transduïdes amb el plasmidi pIRES2 buit o amb el mateix plasmidi portador del gen *CPPEDI* humà. Es va fer un western-blot per veure per una banda, els nivells de transducció amb un α -GFP, i per una altra veure els nivells d'expressió del constructe amb un α -flag.

10.2 Cpped1 redueix els nivells de polyP en cèl·lules de mamífer

Una vegada comprovat que *CPPED1* s'expressa en aquesta línia cel·lular, es va procedir a comprovar si aquesta sobreexpressió tenia algun efecte sobre els nivells de polyP d'aquestes cèl·lules.

Com s'observa a la figura 39, les cèl·lules que sobreexpressen *CPPED1* presenten nivells de polyP estadísticament significatius més baixos que les cèl·lules portadores del plasmidi buit. Aquest resultat indica per primera vegada que Cpped1 podria tenir activitat polifosfatasa.

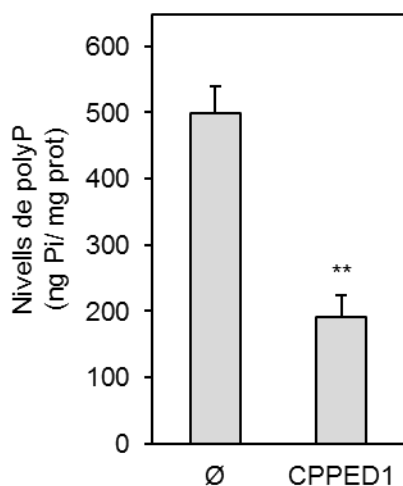


Figura 39 La sobreexpressió de *CPPED1* produeix la caiguda del polyP en cèl·lules HEK293. Cèl·lules HEK293 van ser transduïdes amb el plasmidi pIRES2 buit o amb el mateix plasmidi portador del gen *CPPED1* humà. El gràfic mostra els nivells de polyP de les cèl·lules que sobreexpressen *CPPED1* respecte els nivells de les cèl·lules que contenen el plasmidi buit. Es mostra la mitjana de 6 experiments independents \pm SEM. L'asterisc indica diferències significatives determinat pel test de Mann-Whitney U. * indica $p < 0.05$ i ** indica $p < 0.005$.

Finalment, es va analitzar si la sobreexpressió de *CPPED1* també produïa més mortalitat a les cèl·lules després de ser irradiades amb llum ultraviolada.

10.3 La sobreexpressió de *CPPED1* provoca més sensibilitat a la llum UV

Com era d'esperar, si la sobreexpressió de *CPPED1* redueix considerablement els nivells de polyP, aquestes cèl·lules haurien de ser més sensibles a la llum UV que les portadores del plasmidi buit; i aquest és el cas (Figura 40).

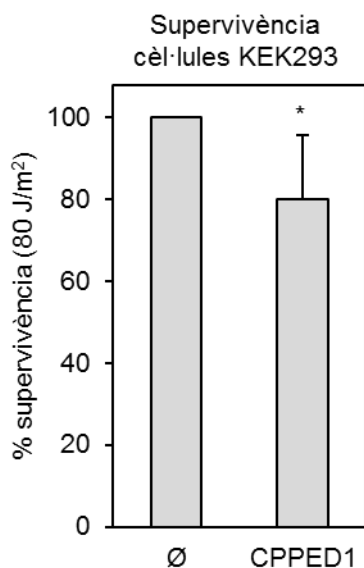


Figura 40 La sobreexpressió de *CPPED1* produeix més sensibilitat enfront la llum UV en cèl·lules HEK293. Les mateixes cèl·lules de la figura 39 es van irradiar amb 80 J/m² i es va fer un assaig MTT per determinar la seva viabilitat. Es mostra la mitjana de 3 experiments independents \pm SEM. L'asterisc indica diferències significatives determinat pel test de Mann-Whitney U. * indica $p < 0.05$ i ** indica $p < 0.005$.

DISCUSSION

1. EL POLYP MANTÉ ESTABLES ELS NIVELLS DE FOSFAT DURANT LA SÍNTESI DE dNTPs

La hipòtesi inicial en que es basa aquest treball és que el polyP podria ser un factor molt important per mantenir la homeòstasi del fosfat durant la síntesi de dNTPs abans i durant la fase S. De fet, la idea es troba suportada per diverses reflexions:

La primera, en llevats la concentració de fosfat corresponent als nucleòtids és d'uns 20 mM, similar a la del fosfat lliure citoplasmàtic, per tant tot indica que hi ha d'haver una regulació coordinada entre el metabolisme del fosfat i la síntesi de nucleòtids (Gauthier et al., 2008).

La segona, en medi ric una cèl·lula de llevat té una activitat de transport de fosfat estimada entre 4.6×10^6 i 7.8×10^7 molècules/minut i cèl·lula segons els càlculs realitzats en diferents laboratoris (Giots et al., 2003; Wykoff and O'Shea, 2001; Zvyagilskaya et al., 2008). Aquests valors, s'obtenen a partir d'estudis on es mesurava el transport de fosfat cap a l'interior de la cèl·lula en diferents situacions (taula 3).

| Autor | Condicions | Velocitat (molècules/min i cel) |
|--------------|----------------------|------------------------------------|
| Wikoff | YPD | $7,8 \times 10^7$ |
| Giots | <i>Starved cells</i> | $2,1 \times 10^7$ |
| Zvyagilskaya | <i>Starved cells</i> | $4,6 \times 10^6$ |
| Zvyagilskaya | 3% glucosa | $14,4 \times 10^7$ |

Taula 3 Velocitat de captació de fosfat en *S. cerevisiae*.

Podríem assumir com a general un valor entremig entre les velocitats extremes aportades pels diferents laboratoris, i per tant que aquesta velocitat d'entrada aporta aproximadament la quantitat de fosfat necessària per tirar endavant la constant síntesi de RNA i fosfolípids sense alterar l'homeòstasi del fosfat. Però caldria tenir en compte que durant la replicació del DNA, la cèl·lula necessita en qüestió de minuts una gran aportació de fosfat per sintetitzar el conjunt de dNTPs necessaris per replicar el genoma. El genoma de *S. cerevisiae* consta de 2.4×10^7 nucleòtids, cada un format per tres molècules de fosfat per tant durant la replicació del DNA la cèl·lula necessita més de 7.5×10^7 molècules de fosfat, ja que sempre es sintetitzen més dels necessaris. Aquesta síntesi per tant pot afectar considerablement l'homeòstasi del fosfat a no ser que hi hagi una reserva de fosfat preparada per esmorteir aquesta demanda, segons la nostra hipòtesi el polyP.

Tenint en compte que les cèl·lules de llevat només incrementen unes tres vegades, aproximadament, els nivells de dNTPs durant la replicació del DNA, podríem pensar que el rol del polyP en cèl·lules de mamífer, on l'increment de dNTPs és d'unes 20 vegades (Hakansson et al., 2006), és encara més rellevant que en llevats.

2. REGULACIÓ DELS ENZIMS DEL PolyP

Resultats presentats en aquesta tesi, que demostren una connexió entre el metabolisme del polyP i la síntesi de dNTPs, podrien ajudar a interpretar resultats aïllats obtinguts durant els últims anys i que fins ara no tenien una interpretació clara que fan referència al rol dels enzims del metabolisme del polyP durant diverses situacions. Alguns d'aquests resultats són els següents:

Primer, Ppn1 relocalitza de la vacuola al citoplasma quan s'inhibeix la síntesi de dNTPs amb HU (Tkach et al., 2012). La resposta de la cèl·lula enfront una situació d'estrès replicatiu és incrementar els nivells de dNTPs intracel·lulars, per tant es necessita una aportació molt gran de fosfat provinent, segons nosaltres, del polyP. Una possible explicació seria que hi hagi una mobilització parcial d'aquesta endopolifosfatasa des de la vacuola al citoplasma per poder aprofitar, a més de les reserves majoritàries presents a la vacuola, les reserves de polyP presents al citosol.

Segon, el mutant *vtc4Δ* és sensible a hidroxiiurea (HU) (Niu et al., 2008). Segons els nostres resultats, els mutants que no poden utilitzar reserves de polyP són més sensibles al dany a DNA que una soca salvatge, probablement perquè no poden sintetitzar el conjunt de dNTPs necessaris per superar aquesta situació adversa.

Tercer, hi ha un increment dels nivells de proteïna de Vtc1 i Vtc4 en resposta a estrès replicatiu (Tkach et al., 2012). Aquest resultat pareix ser contradictori ja que Vtc4 s'encarrega de la síntesi de polyP, però pot ser interpretat com un efecte indirecte provocat per una degradació sobtada de les reserves de polyP intracel·lulars. Nosaltres veiem un efecte paregut, ja que els nivells de Vtc4 augmenten a final de G₁ i durant la fase S al mateix temps que es produeix la degradació del polyP per fer front a la síntesi de dNTPs.

Quart i últim, Vtc2 i Vtc3 canvien la seva localització depenent dels nivells de fosfat intracel·lulars. En condicions òptimes de fosfat es troben situats a la perifèria cel·lular, en canvi quan el fosfat és limitant a la cèl·lula es situen a la vacuola (Hothorn et al., 2009). Seguint amb el plantejament anterior, la cèl·lula detecta que han caigut els nivells de fosfat i respon expressant els transportadors d'alta afinitat i relocalitzant a la vacuola el complex de síntesi de polyP per evitar que es produeixi un feedback negatiu sobre els transportadors d'alta afinitat. Aquest resultat ens permet seguir investigant ja que ens han sorgit diferents preguntes com per exemple, si canvien la localització aquestes proteïnes durant el cicle cel·lular o si la canvien enfront d'una situació de dany a DNA, que ens poden ajudar a entendre millor la regulació d'aquests enzims.

En conjunt aquests resultats suggereixen que el metabolisme del polyP està modulats, almenys en part, d'una forma coordinada amb la necessitat de dNTPs.

3. REPLICACIÓ DEL DNA SOTA CONDICIONS DE BAIX FOSFAT

Els medis sintètics i rics utilitzats habitualment als laboratoris, el fosfat està 5 vegades més concentrat que la concentració típica del most (Coombe and Dry, 2004). En les condicions del laboratori, podríem pensar que la rellevància fisiològica del polyP durant la fase S podria estar emmascarada per la gran quantitat de fosfat present al medi i l'activitat dels transportadors, esmentat a l'apartat anterior. Això podria explicar perquè no s'ha descrit mai un fenotip evident dels mutants *vtc4Δ* i *ppn1Δ/ppx1Δ* en condicions normals de laboratori. A més, pel que fa a *ppn1Δ/ppx1Δ* és important formar el doble KO, ja que els mutants simples tenen activitat polifosfatasa i per tant no tenen fenotip aparent, aquesta podria ser una altre explicació de perquè no s'han trobat mai fenotips dels mutants individuals en cribratges del tipus “*high-throughput*”.

Però, si es van a buscar petites diferències, hem vist que una soca *vtc4Δ* en YPD presenta un retràs de dos minuts durant la progressió pel cicle respecte una soca salvatge, a més aquest subtil fenotip es torna molt aparent en experiments molt específics com són els de competició. És aquí quan es pot observar que els dos minuts de retràs, signifiquen una reducció gairebé del 50% de la població *vtc4Δ* respecte la població salvatge en qüestió de pocs dies, posant de manifest la importància del polyP en la natura.

Malgrat nosaltres per poder treballar sobre un fenotip més evident hem realitzat els experiments en condicions limitants de fosfat, creiem que el polyP juga un paper essencial en qualsevol condició.

4. NOU MECANISME PER CONTROLAR ELS NIVELLS DE dNTPs

Sorprenentment, els mutants del PolyP que presenten nivells molt baixos de dNTPs i un retràs considerable durant la progressió pel cicle cel·lular, no activen la via Mec1/Rad53 de resposta a estrès replicatiu o a dany a DNA (Figura 41).

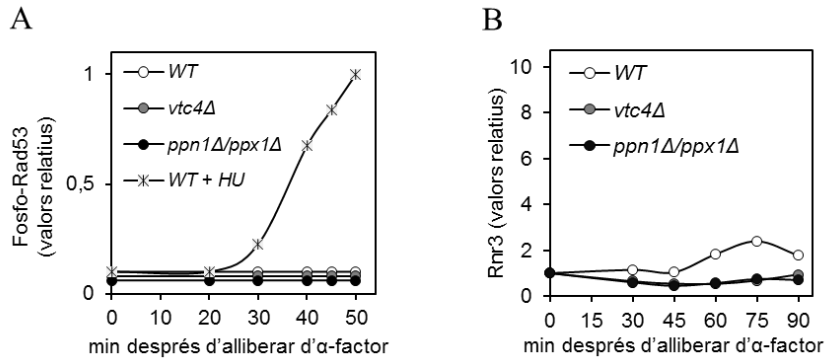


Figura 41 Els mutants *vtc4* Δ i *ppn1* Δ /*ppx1* Δ no presenten activació de la via Mec1/Rad53. Cèl·lules wt, *vtc4* Δ i *ppn1* Δ /*ppx1* Δ van ser sincronitzades a G₁ amb α -factor i alliberades en medi sintètic complet baix en fosfat. El panell A mostra la mitjana de la quantificació dels nivells de Rad53 fosforilat de 2 experiments independents. El panell B mostra la mitjana de la quantificació dels nivells de Rnr3 de 2 experiments independents. Aquests resultats han estat obtinguts pel Joan Marc Martínez i formaran part de la seva tesi.

Aquesta absència d'activació dels indicadors de dany a DNA pot tenir varies explicacions:

Primer, que el nivell d'activació del *checkpoint* estigui per sota del nostre límit de detecció en aquestes condicions.

Segon, que els mutants progressen lentament per fase S però suficientment ràpid com per no activar la via de Rad53. És a dir, aquests mutants presenten nivells baixos de dNTPs però abans d'entrar en S s'observa un petit increment respecte al temps zero, per tant pensem que podria ser suficient com per no activar el *checkpoint*.

I tercer, com va publicar el grup del Merril, podria estar actuant un nou mecanisme que s'encarrega de frenar la replicació del DNA quan els nivells de dNTPs no es mantenen per sobre d'uns mínims, independentment de la via Mec1-Rad53 (Koc et al., 2004). Tot i que aquest grup no ha publicat res més d'aquesta mecanisme, podria ser molt interessant i compatible amb el comportament dels mutants incapaços de sintetitzar o degradar polyP. En qualsevol cas es necessiten més experiments per poder identificar el mecanisme molecular responsable del retràs durant la progressió pel cicle d'aquests mutants i, de fet, actualment estem treballant per identificar aquest mecanisme. Al respecte, ja tenim algun resultat preliminar, per tant desitjaria el dia de la defensa oral poder aportar noves proves que confirmin l'existència d'aquest nou mecanisme.

5. BAIXOS NIVELLS DE POLYP POSSIBLE CAUSA D'INESTABILITAT GENÒMICA

Recentment, el grup d'en Keren va demostrar que començar la replicació del DNA en nivells baixos de dNTPs, desencadenava en inestabilitat genòmica en cèl·lules de mamífer (Bester et al., 2011), factor determinant en la majoria de càncers. Van concloure que qualsevol factor que facilités la divisió cel·lular sense una síntesi de dNTPs adequada, podria ser causant de dany al DNA i per tant de la conseqüent carcinogènesis.

En aquesta tesi es demostra que la degradació del polyP està acoblada amb la síntesi de dNTPs, i que en la seva absència no es poden sintetitzar els dNTPs necessaris per afrontar la replicació del DNA, almenys en condicions limitants de fosfat.

Per tant, tenint en compte els resultats del grup d'en Keren, els nostres resultats suggereixen que el polyP podria ser un factor important per mantenir l'estabilitat genòmica. Durant aquesta tesi no s'ha provat que fos així, però un dels futurs objectius serà determinar si l'absència de polyP pot ser una causa d'inestabilitat genòmica.

Seguint en aquesta línia, és lògic pensar que mutacions sobre els enzims involucrats en la síntesi i la degradació del polyP en cèl·lules de mamífer podrien ser una causa de inestabilitat genòmica i, per tant, causa de carcinogènesis. Encara que aquestes activitats enzimàtiques són fins avui desconegudes, ja s'ha descrit una possible exopolifosfatasa de mamífers anomenada h-prune (Tammenkoski et al., 2008), la qual es troba involucrada amb els processos tumorals, de fet, se la considerat una diana quimioteràpica important (Carotenuto et al., 2013; Carotenuto et al., 2014).

En el mateix sentit, el fet que la sobreexpressió de *CPPED1*, descrita com a possible endopolifosfatasa ara fa uns anys (Arakaki et al., 2006), provoqui una davallada dels nivells de polyP en cèl·lules HEK293, tot i que és un resultat molt preliminar podríem estar davant de la primera endopolifosfatasa descrita en humans, doncs bé aquest enzim també està relacionat en càncer. Curiosament, s'ha descrit una sobreexpressió d'aquest gen en cultius primaris de melanoma en fase metastàsica, indicant que probablement juga un paper important en etapes avançades de la malaltia (Smith et al., 2004).

Aquests dos casos s'ajusten a la predicció que fa aquest treball de tesi que el polyP juga un paper en l'estabilitat genòmica i els processos d'establiment de la carcinogènesi. A més, ens marquem com a futurs objectius, per una banda caracteritzar *in vitro* la possible activitat endopolifosfatasa d'aquesta proteïna, i per l'altra analitzar el seu rol fisiològic en cèl·lules de mamífer.

6. NOVA PERSPECTIVA DE LA NUCLEÒSID DIFOSFAT QUINASA

Com ja s'ha explicat a la introducció, històricament el complex RNR ha estat considerat el complex essencial per tirar endavant la síntesi de dNTPs, de manera que pocs són els estudis referents als enzims necessaris de la fosforilació del nucleòsid per finalment obtenir el nucleòsid trifosfat.

Un altre de les aportacions interessants d'aquest treball de tesi, es indicar el paper també rellevant d'aquestes quinases, concretament la nucleòsid difosfat quinasa Ynk1, durant la síntesi de dNTPs, ja sigui abans de fase S o en una situació de dany a DNA. Això quadra amb el fet, que el gen que codifica per la nucleòsid difosfat quinasa de llevats (*YNK1*), s'expressa al final de G₁ justament abans de la sobtada síntesi dels dNTPs (Spellman et al., 1998; Keim et al., 1992), posant de manifest la seva importància durant la síntesi de dNTPs.

D'altra banda, hem pogut veure que una soca *ynk1Δ* és significativament més sensible a la radiació ultraviolada que una soca salvatge, posant de manifest, també, la importància de Ynk1 en la recuperació després de dany a DNA (Yang et al., 2009). En aquest sentit, Ynk1 comparteix el 60% de la seqüència aminoacídica amb la proteïna humana NM23-H1, el primer gen supressor de tumors identificat en humans (Hartsough and Steeg, 1998). A més, cal assenyalar que l'expressió NM23-H1 està reduïda en cèl·lules metastàsiques de melanoma i mama (Steeg et al., 1988), suggerint que l'activitat catalítica d'aquesta nucleòsid difosfat quinasa és necessària per produir els nivells correctes de dNTPs, i per tant per evitar la presència d'instabilitat genòmica en les cèl·lules de mamífer.

En conjunt, aquests resultats reforcen la idea de què la nucleòsid difosfat quinasa no és un simple enzim que actuarà després del principal complex RNR, sinó que és un enzim a tenir molt en compte a l'hora de replicar el DNA o afrontar una situació de dany al DNA.

7.EL PolyP NOU AGENT PROTECTOR ENFRONT AL DANY A DNA

Ja es coneix en cèl·lules procariotes, que el polyP protegeix del dany a DNA regulant l'activitat de les DNA polimerases que formen part de la família Y en *E. Coli*, mitjançant un mecanisme desconegut fins ara (Stumpf and Foster, 2005). D'altra banda es coneix que aquestes polimerases són sensibles a les variacions de dNTPs intracel·lulars, per tant estic temptat d'especular que el polyP podria també ser una font de fosfat per la síntesi de dNTPs en els bacteris després del dany a DNA.

En qualsevol cas, ningú ha demostrat aquest rol protector del polyP en cèl·lules eucariotes. En aquesta tesi, un dels resultats més interessants que podem veure és que el polyP actua com un factor molt important per protegir la cèl·lula enfront del dany a DNA en llevats i també en cèl·lules humanes.

7.1 En llevats

En llevats, hem pogut veure com el polyP confereix resistència enfront dos tipus diferents de dany a DNA: llum UV i MMS.

Aquests resultats guanyen molta força quan els relacionem amb el medi natural on es troba una cèl·lula de *S.cerevisiae*. El llevat es troba sobre la pell del raïm exposat a tot tipus d'agents físico-químics que podrien estar afectant la seva viabilitat. Un d'aquests agents dels quals s'ha de protegir el llevat és la radiació ultraviolada que li arriba de la llum del Sol, per tant segons els nostres resultats suggereixen que la presència de polyP pot ser una avantatge adaptativa per les cèl·lules de llevat en l'ambient natural on es troba.

El llevat també es troba exposat a altres agents com són els pesticides o insecticides, utilitzats per controlar les plagues al camp de conreu. Molts d'aquests poden reaccionar amb la molècula de DNA actuant com agents alquilants. Nosaltres hem demostrat que el polyP

també protegeix contra el dany per MMS, per tant podria també protegir al llevat dels efectes produïts per aquests productes.

Quan s'han analitzat soques que tenen mutat algun altre gen implicat en el metabolisme del fosfat, com ara *pho4Δ* i *pho84Δ*, que a més són mutants amb uns nivells molt baixos de polyP, hem pogut demostrar que també són més sensibles al dany per ultraviolat, posant de manifest la importància del fosfat durant una situació de dany al DNA, probablement per poder sintetitzar el conjunt de dNTPs necessaris per reparar el dany. En canvi, els mutants *pho85Δ* i *pho80Δ*, dels quals s'esperaria a priori que fossin més resistents degut a la sobre activació de Pho4, són també més sensibles a UV. Però, si analitzem en profunditat aquests mutants veiem que tot i tenir Pho4 molt actiu, els seus nivells de polyP són ínfims degut a greus problemes vacuolars (Huang et al., 2002; Nicolson et al., 1995). Per tant, el resultat de diferents mutants s'ajusta a la nostra hipòtesi de què el polyP és un factor molt important per poder recuperar-se del dany a DNA.

7.2 En cèl·lules HEK293

Com era d'esperar, la sobreexpressió de *PPXI* en aquestes cèl·lules provoca una reducció dels nivells de polyP del 70%. Aquesta reducció s'apropa molt al descrit en la literatura on van sobreexpressar *PPXI* en cultius de cèl·lules cardíques de ratolí i van observar una reducció dels nivells de polyP del 80% (Seidlmayer et al., 2012).

En paral·lel a aquesta reducció s'observa una interessant disminució de la supervivència després d'irradiar les cèl·lules amb UV, indicant que el paper protector del polyP front al dany a DNA per radiació UV demostrat en *S. cerevisiae* es manté també en cèl·lules humanes.

Per tant, veient que les HEK293 són un bon model per continuar estudiant el rol dels polyP en cèl·lules humanes, el que ara ens plantejem és veure si el polyP podria ser un factor modulador de l'efectivitat de determinats quimioteràpics d'ús clínic com ara la cisplatina. La cisplatina és un agent pseudo-alquilant utilitzat per combatre diferents tipus de càncers: sarcomes, alguns carcinomes, limfomes i tumors de cèl·lules germinals. El problema d'aquest quimioteràpic, per una banda, és que cal subministrar-lo a dosis elevades amb la conseqüent toxicitat i efectes secundaris. I per l'altra, els pacients desenvolupen resistència al cap d'un temps amb el tractament. Per tant, qualsevol tractament coadjuvant que incrementi la sensibilitat de les cèl·lules tumorals a aquest tipus de fàrmacs podria ser considerat com una estratègia terapèutica d'interès clínic.

7.3 En cèl·lules HDFa

Existeix un article que mostra els nivells de polyP en diferents línies cel·lulars i els seus compartiments (Kumble and Kornberg, 1995). Una de les línies analitzades és NIH 3T3, línia cel·lular de fibroblasts embrionaris de ratolí. Aquesta línia cel·lular presenta uns nivells de polyP al voltant de 280 pmol/ mg de proteïna, molt similars als de HEK293. Veient que els fibroblasts són cèl·lules amb nivells importants de polyP, es va decidir utilitzar cultius primaris de fibroblasts humans de la dermis per demostrar el paper protector del polyP enfront la radiació UV en un model el màxim de fisiològic possible.

El resultat obtingut, on es demostra que els fibroblasts que sobreexpressen *PPXI* són més sensibles a la radiació UV, és especialment rellevant ja que com hem dit als resultats, els fibroblasts de la dermis són especialment vulnerables als raigs UV provinents dels raigs solars. Tot fa indicar doncs, que el metabolisme del polyP és especialment important en aquestes cèl·lules exposades constantment a la radiació UV, per tant continuarem treballant per esbrinar si pot haver-hi alguna associació entre el polyP i l'aparició de determinants desordres en aquestes cèl·lules.

En conclusió, ja sigui per la seva participació en la síntesi de dNTPs o per un efecte encara avui desconegut, podem afirmar que el polyP juga un paper protector enfront al dany a DNA molt conservat des de bacteris fins a eucariotes superiors.

8. NOVES FUNCIONS PER UNA MOLÈCULA TAN ANTIGA

Recentment, el grup d'en Teusink ha demostrat que les molècules de polyP són essencials per aportar residus de fosfat en una situació diferent a l'habitual: en la transició des de un medi baix en glucosa a un medi ric en glucosa (van Heerden et al., 2014). Aquesta transició implica una sobtada activació de la glucòlisis, per tant es produeix un consum massiu de residus de fosfat en un període molt curt de temps.

En el fons, el treball del Teusink i el d'aquesta tesi reflecteixen la mateixa idea: el polyP no només serveix per equilibrar els nivells de fosfat durant les fluctuacions externes, sinó que també és important durant les sobtades variacions internes, que es produeixen com a conseqüència, per exemple, de l'inici de la glucòlisis o de l'inici de la replicació del DNA.

De fet, en cèl·lules de mamífer, últimament s'han descobert una ampla gamma de funcions que desenvolupa el polyP i que resulten crucials per a la cèl·lula. Dins d'aquesta ampla varietat s'inclou, regulació de la coagulació sanguínia (Muller et al., 2009; Smith et al., 2006), mineralització de l'os (Omelon et al., 2009), diferenciació cel·lular (Morimoto et al., 2010), expressió gènica (Muller et al., 2011) i funcionament dels cardiomiocits (Seidlmayer et al., 2012).

Els resultats exposats en aquesta tesi, permeten ampliar aquesta varietat funcional del polyP, ja que indiquen que en eucariotes superiors el polyP podria ser un nou i important factor durant la replicació i la reparació del DNA, per la seva implicació directa en la síntesis de dNTPs.

Per acabar, m'agradaria resumir una vegada més la idea principal que es desprèn d'aquesta tesi.

El PolyP, molècula tan antiga i a la vegada tan desconeguda sembla estar implicada en un procés tant antic i alhora tant conegut com és la replicació del DNA, i a més, juga una paper protector enfront al dany a DNA, conservat des de bacteris fins a eucariotes superiors.

Tenint en compte que actualment el polyP està guanyant molta importància per explicar processos essencials per al bon funcionament de la cèl·lula, considero que aquesta serà una molècula que anirà guanyant en importància al llarg dels propers anys.

CONCLUSIONS

- La degradació del polyP està correlacionada amb la síntesi de dNTPs.
- Tan *VTC4* com *PPX1* presenten una expressió cíclica.
- Els mutants *vtc4Δ* i *ppn1Δ/ppx1Δ* presenten cinètiques més lentes de síntesi de dNTPs, almenys en condicions limitants de fosfat.
- Els mutants *vtc4Δ* i *ppn1Δ/ppx1Δ* progressen molt lentament pel cicle sota condicions limitants de fosfat.
- No s'observa activació del *checkpoint* Mec1/Rad53 durant la transició G₁/S en els mutants *vtc4Δ* i *ppn1Δ/ppx1Δ*.
- El mutant *vtc4Δ* presenta un retràs pel cicle d'uns 2 minuts en YPD.
- El mutant *vtc4Δ* presenta una pitjor *fitness* que una soca salvatge.
- Els mutants *vtc4Δ* i *ppn1Δ/ppx1Δ*, sota condicions de dany a DNA, progressen més lentament pel cicle que una soca salvatge.
- Els mutants *vtc4Δ* i *ppn1Δ/ppx1Δ* són significativament més sensibles al dany a DNA que una soca salvatge.
- El mutant *pho91Δ* de la col·lecció EUROSCARF sembla ser *pho91Δ/urk1Δ*.
- Nivells alts de polyP es correlacionen amb més supervivència després d'una situació de dany al DNA.
- El rol protector del polyP de dany al DNA podria estar conservat des de bacteris fins eucariotes pluricel·lulars.
- La sobreexpressió de *CPPE1* provoca una depleció dels nivells de polyP en cèl·lules HEK293 i una sensibilització davant el dany al DNA.

- Cultius primaris de fibroblasts humans de la dermis són més sensibles a la radiació UV quan es sobreexpressa *PPXI*.

RESUM EN ANGLÈS

Polyphosphate is a key factor during DNA replication

Throughout its lifespan, eukaryotic cells steadily consume free cytoplasmic orthophosphate to produce phospholipids and mRNA. However, during DNA synthesis, in a matter of minutes, cells require large amount of phosphate molecules to be incorporated in dNTPs. It is not known whether this high consumption produces a sharp variation in cellular orthophosphate levels, or alternatively, a homeostatic system exists to prevent any variation. Polyphosphate (polyP) is a linear chain made of hundreds of P_i residues present in all living organisms, with a still unclear molecular function. In the present study we show that degradation of polyP is cell cycle regulated and, also, an important process to sustain the synthesis of dNTPs in *S. cerevisiae*. Mutants that cannot synthesise polyP (*vtc4Δ*) or cannot hydrolyse it (*ppn1Δ ppx1Δ*) present a lower rate of dNTP synthesis and it takes longer time to duplicate DNA. Recovery after UV stress also requires high levels of dNTPs, and here we show that mutants bearing low levels of polyP are more sensitive to UV, while cells overexpressing *VTC4* are more resistant. Finally, we demonstrate that human dermal fibroblasts with reduced levels of polyP are also more sensitive to UV damage, suggesting that the protective role of polyP against UV damage might be conserved. In conclusion, this work identifies a new and important player during the synthesis of the building blocks of DNA.

BIBLIOGRAFIA

Abramov, A.Y., Fraley, C., Diao, C.T., Winkfein, R., Colicos, M.A., Duchon, M.R., French, R.J., and Pavlov, E. (2007). Targeted polyphosphatase expression alters mitochondrial metabolism and inhibits calcium-dependent cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 18091-18096.

Amutha, B., and Pain, D. (2003). Nucleoside diphosphate kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, Ynk1p: localization to the mitochondrial intermembrane space. *Biochem. J.* *370*, 805-815.

Andreeva, N.A., Kulakovskaya, T.V., and Kulaev, I.S. (2006). High molecular mass exopolyphosphatase from the cytosol of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by the PPN1 gene. *Biochemistry (Mosc)* *71*, 975-977.

Arakaki, A.K., Tian, W., and Skolnick, J. (2006). High precision multi-genome scale reannotation of enzyme function by EFICAz. *BMC Genomics* *7*, 315.

Arino, J. (2010). Integrative responses to high pH stress in *S. cerevisiae*. *Omics* *14*, 517-523.

Auesukaree, C., Homma, T., Kaneko, Y., and Harashima, S. (2003). Transcriptional regulation of phosphate-responsive genes in low-affinity phosphate-transporter-defective mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *306*, 843-850.

Auesukaree, C., Homma, T., Tochio, H., Shirakawa, M., Kaneko, Y., and Harashima, S. (2004). Intracellular phosphate serves as a signal for the regulation of the PHO pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *279*, 17289-17294.

Azevedo, C., and Saiardi, A. (2014). Functions of inorganic polyphosphates in eukaryotic cells: a coat of many colours. *Biochem. Soc. Trans.* *42*, 98-102.

Bester, A.C., Roniger, M., Oren, Y.S., Im, M.M., Sarni, D., Chaoat, M., Bensimon, A., Zamir, G., Shewach, D.S., and Kerem, B. (2011). Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. *Cell* *145*, 435-446.

Botstein, D., and Fink, G.R. (1988). Yeast: an experimental organism for modern biology. *Science* *240*, 1439-1443.

- Brown, M.R., and Kornberg, A. (2004). Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 16085-16087.
- Carotenuto, M., De Antonellis, P., Liguori, L., Benvenuto, G., Magliulo, D., Alonzi, A., Turino, C., Attanasio, C., Damiani, V., Bello, A.M., *et al.* (2014). H-Prune through GSK-3 β interaction sustains canonical WNT/ β -catenin signaling enhancing cancer progression in NSCLC. *Oncotarget* *5*, 5736-5749.
- Carotenuto, M., Pedone, E., Diana, D., de Antonellis, P., Dzeroski, S., Marino, N., Navas, L., Di Dato, V., Scoppettuolo, M.N., Cimmino, F., *et al.* (2013). Neuroblastoma tumorigenesis is regulated through the Nm23-H1/h-Prune C-terminal interaction. *Sci. Rep.* *3*, 1351.
- Carroll, A.S., and O'Shea, E.K. (2002). Pho85 and signaling environmental conditions. *Trends Biochem. Sci.* *27*, 87-93.
- Chabes, A., Domkin, V., and Thelander, L. (1999). Yeast Sm11, a protein inhibitor of ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* *274*, 36679-36683.
- Chabes, A., Georgieva, B., Domkin, V., Zhao, X., Rothstein, R., and Thelander, L. (2003). Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase. *Cell* *112*, 391-401.
- Chabes, A., and Stillman, B. (2007). Constitutively high dNTP concentration inhibits cell cycle progression and the DNA damage checkpoint in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 1183-1188.
- Chien, C.Y., Chen, B.R., Chou, C.K., Sclafani, R.A., and Su, J.Y. (2009). The yeast Cdc8 exhibits both deoxythymidine monophosphate and diphosphate kinase activities. *FEBS Lett.* *583*, 2281-2286.
- Coombe, E., and Dry, P. (2004). *Viticulture Volume 1 Resources 2nd Edition 1*,
- Dahmann, C., Diffley, J.F., and Nasmyth, K.A. (1995). S-phase-promoting cyclin-dependent kinases prevent re-replication by inhibiting the transition of replication origins to a pre-replicative state. *Curr. Biol.* *5*, 1257-1269.

- Dann, S.G., and Thomas, G. (2006). The amino acid sensitive TOR pathway from yeast to mammals. *FEBS Lett.* 580, 2821-2829.
- de Bruin, R.A., Kalashnikova, T.I., Chahwan, C., McDonald, W.H., Wohlschlegel, J., Yates, J., 3rd, Russell, P., and Wittenberg, C. (2006). Constraining G1-specific transcription to late G1 phase: the MBF-associated corepressor Nrm1 acts via negative feedback. *Mol. Cell* 23, 483-496.
- de Nadal, E., Alepuz, P.M., and Posas, F. (2002). Dealing with osmotic stress through MAP kinase activation. *EMBO Rep* Aug;3, 735-740.
- De Virgilio, C., and Loewith, R. (2006a). Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. *Oncogene* 25, 6392-6415.
- De Virgilio, C., and Loewith, R. (2006b). The TOR signalling network from yeast to man. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 1476-1481.
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., and Moreno, S.N. (2005). Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 251-261.
- Dujon, B. (1996). The yeast genome project: what did we learn? *Trends Genet.* 12, 263-270.
- Dunn, T., Gable, K., and Beeler, T. (1994). Regulation of cellular Ca²⁺ by yeast vacuoles. *J. Biol. Chem.* 269, 7273-7278.
- Elledge, S.J., and Davis, R.W. (1990). Two genes differentially regulated in the cell cycle and by DNA-damaging agents encode alternative regulatory subunits of ribonucleotide reductase. *Genes Dev.* 4, 740-751.
- Elledge, S.J., Zhou, Z., and Allen, J.B. (1992). Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation. *Trends Biochem. Sci.* 17, 119-123.
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33, 389-396.

- Fasullo, M., Tsaponina, O., Sun, M., and Chabes, A. (2010). Elevated dNTP levels suppress hyper-recombination in *Saccharomyces cerevisiae* S-phase checkpoint mutants. *Nucleic Acids Res.* *38*, 1195-1203.
- Foury, F. (1997). Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene* *195*, 1-10.
- Fukuchi, T., Nikawa, J., Kimura, N., and Watanabe, K. (1993). Isolation, overexpression and disruption of a *Saccharomyces cerevisiae* YNK gene encoding nucleoside diphosphate kinase. *Gene* *129*, 141-146.
- Gauthier, S., Couplier, F., Jourden, L., Merle, M., Beck, S., Konrad, M., Daignan-Fornier, B., and Pinson, B. (2008). Co-regulation of yeast purine and phosphate pathways in response to adenylc nucleotide variations. *Mol. Microbiol.* *68*, 1583-1594.
- Giots, F., Donaton, M.C., and Thevelein, J.M. (2003). Inorganic phosphate is sensed by specific phosphate carriers and acts in concert with glucose as a nutrient signal for activation of the protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* *47*, 1163-1181.
- Gonzalez-Vioque, E., Torres-Torronteras, J., Andreu, A.L., and Marti, R. (2011). Limited dCTP availability accounts for mitochondrial DNA depletion in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *PLoS Genet.* *7*, e1002035.
- Hakansson, P., Hofer, A., and Thelander, L. (2006). Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 7834-7841.
- Hartsough, M.T., and Steeg, P.S. (1998). Nm23-H1: genetic alterations and expression patterns in tumor metastasis. *Am. J. Hum. Genet.* *63*, 6-10.
- Hartwell, L.H. (1973). Three additional genes required for deoxyribonucleic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* *115*, 966-974.
- Hofer, A., Crona, M., Logan, D.T., and Sjoberg, B.M. (2012). DNA building blocks: keeping control of manufacture. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *47*, 50-63.

- Hohmann, S. (2002). Osmotic adaptation in yeast control of the yeast osmolyte system. *Int Rev Cytol.* 215, 149-187.
- Hothorn, M., Neumann, H., Lenherr, E.D., Wehner, M., Rybin, V., Hassa, P.O., Uttenweiler, A., Reinhardt, M., Schmidt, A., Seiler, J., *et al.* (2009). Catalytic core of a membrane-associated eukaryotic polyphosphate polymerase. *Science* 324, 513-516.
- Huang, D., Moffat, J., and Andrews, B. (2002). Dissection of a complex phenotype by functional genomics reveals roles for the yeast cyclin-dependent protein kinase Pho85 in stress adaptation and cell integrity. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5076-5088.
- Huang, M., and Elledge, S.J. (1997). Identification of RNR4, encoding a second essential small subunit of ribonucleotide reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6105-6113.
- Huang, M., Zhou, Z., and Elledge, S.J. (1998). The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell* 94, 595-605.
- Hurlimann, H.C., Stadler-Waibel, M., Werner, T.P., and Freimoser, F.M. (2007). Pho91 is a vacuolar phosphate transporter that regulates phosphate and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 18, 4438-4445.
- Iyer, V.R., Horak, C.E., Scafe, C.S., Botstein, D., Snyder, M., and Brown, P.O. (2001). Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. *Nature* 409, 533-538.
- Jeffrey, P.D., Russo, A.A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., and Pavletich, N.P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376, 313-320.
- Jenkins, G.M. (2003). The emerging role for sphingolipids in the eukaryotic heat shock response. *Cell Mol. Life Sci.* 60, 701-710.
- Jimenez-Nunez, M.D., Moreno-Sanchez, D., Hernandez-Ruiz, L., Benitez-Rondan, A., Ramos-Amaya, A., Rodriguez-Bayona, B., Medina, F., Brieva, J.A., and Ruiz, F.A. (2012). Myeloma cells contain high levels of inorganic polyphosphate which is associated with nucleolar transcription. *Haematologica* 97, 1264-1271.

Johnston, G.C., Pringle, J.R., and Hartwell, L.H. (1977). Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp. Cell Res.* *105*, 79-98.

Jong, A.Y., and Ma, J.J. (1991). *Saccharomyces cerevisiae* nucleoside-diphosphate kinase: purification, characterization, and substrate specificity. *Arch. Biochem. Biophys.* *291*, 241-246.

Kaffman, A., Rank, N.M., O'Neill, E.M., Huang, L.S., and O'Shea, E.K. (1998a). The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. *Nature* *396*, 482-486.

Kaffman, A., Rank, N.M., and O'Shea, E.K. (1998b). Phosphorylation regulates association of the transcription factor Pho4 with its import receptor Pse1/Kap121. *Genes Dev.* *12*, 2673-2683.

Keim, D., Hailat, N., Melhem, R., Zhu, X.X., Lascu, I., Veron, M., Strahler, J., and Hanash, S.M. (1992). Proliferation-related expression of p19/nm23 nucleoside diphosphate kinase. *J. Clin. Invest.* *89*, 919-924.

Klionsky, D.J., and Emr, S.D. (1989). Membrane protein sorting: biosynthesis, transport and processing of yeast vacuolar alkaline phosphatase. *Embo j.* *8*, 2241-2250.

Klionsky, D.J., Herman, P.K., and Emr, S.D. (1990). The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* *54*, 266-292.

Kobayashi, H., Stewart, E., Poon, R., Adamczewski, J.P., Gannon, J., and Hunt, T. (1992). Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol. Biol. Cell* *3*, 1279-1294.

Koc, A., Wheeler, L.J., Mathews, C.K., and Merrill, G.F. (2004). Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. *J. Biol. Chem.* *279*, 223-230.

Koch, C., Moll, T., Neuberg, M., Ahorn, H., and Nasmyth, K. (1993). A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G1 to S phase. *Science* *261*, 1551-1557.

Kornberg, A. (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* *23*, 1-18.

- Kulaev, I., and Kulakovskaya, T. (2000). Polyphosphate and phosphate pump. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 709-734.
- Kulaev, I.S., and Vagabov, V.M. (1983). Polyphosphate metabolism in micro-organisms. *Adv. Microb. Physiol.* 24, 83-171.
- Kumar, D., Viberg, J., Nilsson, A.K., and Chabes, A. (2010). Highly mutagenic and severely imbalanced dNTP pools can escape detection by the S-phase checkpoint. *Nucleic Acids Res.* 38, 3975-3983.
- Kumble, K.D., and Kornberg, A. (1995). Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues. *J. Biol. Chem.* 270, 5818-5822.
- Kurtz, J.E., Exinger, F., Erbs, P., and Jund, R. (1999). New insights into the pyrimidine salvage pathway of *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of six genes for cytidine metabolism. *Curr. Genet.* 36, 130-136.
- Kwak, Y., Jeong, J., Lee, S., Park, Y.U., Lee, S.A., Han, D.H., Kim, J.H., Ohshima, T., Mikoshiba, K., Suh, Y.H., Cho, S., and Park, S.K. (2013). Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) regulates the function of CLOCK protein by direct phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 288, 36878-36889.
- Lascu, I., and Gonin, P. (2000). The catalytic mechanism of nucleoside diphosphate kinases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32, 237-246.
- Lee, Y.D., and Elledge, S.J. (2006). Control of ribonucleotide reductase localization through an anchoring mechanism involving Wtm1. *Genes Dev.* 20, 334-344.
- Lee, Y.D., Wang, J., Stubbe, J., and Elledge, S.J. (2008). Dif1 is a DNA-damage-regulated facilitator of nuclear import for ribonucleotide reductase. *Mol. Cell* 32, 70-80.
- Lenburg, M.E., and O'Shea, E.K. (1996). Signaling phosphate starvation. *Trends Biochem. Sci.* 21, 383-387.
- Lichko, L.P., Kulakovskaya, T.V., Kulakovskaya, E.V., and Kulaev, I.S. (2008). Inactivation of PPX1 and PPN1 genes encoding exopolyphosphatases of *Saccharomyces cerevisiae* does not prevent utilization of polyphosphates as phosphate reserve. *Biochemistry (Mosc)* 73, 985-989.

Maddika, S., Ande, S.R., Panigrahi, S., Paranjothy, T., Weglarczyk, K., Zuse, A., Eshraghi, M., Manda, K.D., Wiechec, E., and Los, M. (2007). Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist Updat* 10, 13-29.

Magbanua, J.P., Ogawa, N., Harashima, S., and Oshima, Y. (1997). The transcriptional activators of the PHO regulon, Pho4p and Pho2p, interact directly with each other and with components of the basal transcription machinery in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.* 121, 1182-1189.

Mathews, C.K. (2006). DNA precursor metabolism and genomic stability. *Faseb j.* 20, 1300-1314.

Mathews, C.K., and Ji, J. (1992). DNA precursor asymmetries, replication fidelity, and variable genome evolution. *Bioessays* 14, 295-301.

Mazumder, A., Tummler, K., Bathe, M., and Samson, L.D. (2013). Single-cell analysis of ribonucleotide reductase transcriptional and translational response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 33, 635-642.

Measday, V., Moore, L., Retnakaran, R., Lee, J., Donoviel, M., Neiman, A.M., and Andrews, B. (1997). A family of cyclin-like proteins that interact with the Pho85 cyclin-dependent kinase. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1212-1223.

Moffat J., and Andrews B. (2004). Late-G1 cyclin-CDK activity is essential for control of cell morphogenesis in budding yeast. *Nat. Cell. Biol.* 6, 59-66.

Morimoto, D., Tomita, T., Kuroda, S., Higuchi, C., Kato, S., Shiba, T., Nakagami, H., Morishita, R., and Yoshikawa, H. (2010). Inorganic polyphosphate differentiates human mesenchymal stem cells into osteoblastic cells. *J. Bone Miner. Metab.* 28, 418-423.

Muller, F., Mutch, N.J., Schenk, W.A., Smith, S.A., Esterl, L., Spronk, H.M., Schmidbauer, S., Gahl, W.A., Morrissey, J.H., and Renne, T. (2009). Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell* 139, 1143-1156.

- Muller, W.E., Wang, X., Diehl-Seifert, B., Kropf, K., Schlossmacher, U., Lieberwirth, I., Glasser, G., Wiens, M., and Schroder, H.C. (2011). Inorganic polymeric phosphate/polyphosphate as an inducer of alkaline phosphatase and a modulator of intracellular Ca²⁺ level in osteoblasts (SaOS-2 cells) in vitro. *Acta Biomater.* 7, 2661-2671.
- Neef, D.W., and Kladde, M.P. (2003). Polyphosphate loss promotes SNF/SWI- and Gcn5-dependent mitotic induction of PHO5. *Mol. Cell. Biol.* 23, 3788-3797.
- Nicolson, T.A., Weisman, L.S., Payne, G.S., and Wickner, W.T. (1995). A truncated form of the Pho80 cyclin redirects the Pho85 kinase to disrupt vacuole inheritance in *S. cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 130, 835-845.
- Niida, H., Katsuno, Y., Sengoku, M., Shimada, M., Yukawa, M., Ikura, M., Ikura, T., Kohno, K., Shima, H., Suzuki, H., Tashiro, S., and Nakanishi, M. (2010). Essential role of Tip60-dependent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage sites in DNA repair during G1 phase. *Genes Dev.* 24, 333-338.
- Niu, W., Li, Z., Zhan, W., Iyer, V., and Marcotte, E. (2008). Mechanisms of Cell Cycle Control Revealed by a systematic and Quantitative Overexpression Screen in *S. cerevisiae*. *PLoS Genet.* 4(7), e1000120.
- Nordlund, P., and Reichard, P. (2006). Ribonucleotide reductases. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 681-706.
- Ogawa, N., DeRisi, J., and Brown, P.O. (2000). New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol Biol Cell.* 11, 4309-4321.
- Ohashi, K., Kawai, S., and Murata, K. (2012). Identification and characterization of a human mitochondrial NAD kinase. *Nat. Commun.* 3, 1248.
- Omelson, S., Georgiou, J., Henneman, Z.J., Wise, L.M., Sukhu, B., Hunt, T., Wynnyckyj, C., Holmyard, D., Bielecki, R., and Grynepas, M.D. (2009). Control of vertebrate skeletal mineralization by polyphosphates. *PLoS One* 4, e5634.

- O'Neill, E.M., Kaffman, A., Jolly, E.R., and O'Shea, E.K. (1996). Regulation of PHO4 nuclear localization by the PHO80-PHO85 cyclin-CDK complex. *Science* 271, 209-212.
- Pavlov, E., Aschar-Sobbi, R., Campanella, M., Turner, R.J., Gomez-Garcia, M.R., and Abramov, A.Y. (2010). Inorganic polyphosphate and energy metabolism in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 285, 9420-9428.
- Persson, B.L., Lagerstedt, J.O., Pratt, J.R., Pattison-Granberg, J., Lundh, K., Shokrollahzadeh, S., and Lundh, F. (2003). Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 43, 225-244.
- Pinson, B., Merle, M., Franconi, J.M., and Daignan-Fornier, B. (2004). Low affinity orthophosphate carriers regulate PHO gene expression independently of internal orthophosphate concentration in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279, 35273-35280.
- Poli, J., Tsaponina, O., Crabbe, L., Keszthelyi, A., Pantesco, V., Chabes, A., Lengronne, A., and Pasero, P. (2012). dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress. *Embo j.* 31, 883-894.
- Pontarin, G., Fijolek, A., Pizzo, P., Ferraro, P., Rampazzo, C., Pozzan, T., Thelander, L., Reichard, P.A., and Bianchi, V. (2008). Ribonucleotide reduction is a cytosolic process in mammalian cells independently of DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 17801-17806.
- Puigpinos, J., Casas, C., and Herrero, E. (2015). Altered intracellular calcium homeostasis and endoplasmic reticulum redox state in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking Grx6 glutaredoxin. *Mol. Biol. Cell* 26, 104-116.
- Rampazzo, C., Miazzi, C., Franzolin, E., Pontarin, G., Ferraro, P., Frangini, M., Reichard, P., and Bianchi, V. (2010). Regulation by degradation, a cellular defense against deoxyribonucleotide pool imbalances. *Mutat. Res.* 703, 2-10.
- Rao, N.N., and Kornberg, A. (1999). Inorganic polyphosphate regulates responses of *Escherichia coli* to nutritional stringencies, environmental stresses and survival in the stationary phase. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 23, 183-195.

- Reichard, P. (1988). Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 349-374.
- Reusch, R.N., Huang, R., and Bramble, L.L. (1995). Poly-3-hydroxybutyrate/polyphosphate complexes form voltage-activated Ca²⁺ channels in the plasma membranes of *Escherichia coli*. *Biophys. J.* 69, 754-766.
- Richardson, H., Lew, D.J., Henze, M., Sugimoto, K., and Reed, S.I. (1992). Cyclin-B homologs in *Saccharomyces cerevisiae* function in S phase and in G2. *Genes Dev.* 6, 2021-2034.
- Saeki, T., Hori, M., and Umezawa, H. (1974). Pyruvate kinase of *Escherichia coli*. Its role in supplying nucleoside triphosphates in cells under anaerobic conditions. *J. Biochem.* 76, 631-637.
- Sander, C.S., Chang, H., Salzman, S., Muller, C.S., Ekanayake-Mudiyanselage, S., Elsner, P., and Thiele, J.J. (2002). Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 118, 618-625.
- Santangelo, G.M. (2006). Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 253-282.
- Schwob, E., Bohm, T., Mendenhall, M.D., and Nasmyth, K. (1994). The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* 79, 233-244.
- Schwob, E., and Nasmyth, K. (1993). CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 7, 1160-1175.
- Seidlmayer, L.K., Gomez-Garcia, M.R., Blatter, L.A., Pavlov, E., and Dedkova, E.N. (2012). Inorganic polyphosphate is a potent activator of the mitochondrial permeability transition pore in cardiac myocytes. *J. Gen. Physiol.* 139, 321-331.
- Shabalina, I., Vagabov, V.M., Tsiomenko, A.B., Zemlenukhina, O.A., and Kulaev, I.S. (1977). Polyphosphate kinase activity in yeast vacuoles. *Biokhimiia* 42, 1642-1648.

Smith, A.P., Weeraratna, A.T., Spears, J.R., Meltzer, P.S., Becker, D. (2004). SAGE identification and fluorescence imaging analysis of genes and transcripts in melanomas and precursor lesions. *Cancer Biol. Ther.* 3, 104-109.

Smith, S.A., Mutch, N.J., Baskar, D., Rohloff, P., Docampo, R., and Morrissey, J.H. (2006). Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 903-908.

Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D., and Futcher, B. (1998). Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol. Biol. Cell* 9, 3273-3297.

Steege, P.S., Bevilacqua, G., Pozzatti, R., Liotta, L.A., and Sobel, M.E. (1988). Altered expression of NM23, a gene associated with low tumor metastatic potential, during adenovirus 2 Ela inhibition of experimental metastasis. *Cancer Res.* 48, 6550-6554.

Stuart, D., and Wittenberg, C. (1995). CLN3, not positive feedback, determines the timing of CLN2 transcription in cycling cells. *Genes Dev.* 9, 2780-2794.

Stumpf, J.D., and Foster, P.L. (2005). Polyphosphate kinase regulates error-prone replication by DNA polymerase IV in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 57, 751-761.

Tamaki, H. (2007). Glucose-stimulated cAMP-protein kinase A pathway in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* 104, 245-250.

Tammenkoski, M., Koivula, K., Cusanelli, E., Zollo, M., Steegborn, C., Baykov, A.A., and Lahti, R. (2008). Human metastasis regulator protein H-prune is a short-chain exopolyphosphatase. *Biochemistry* 47, 9707-9713.

Thevelein, J.M., Cauwenberg, L., Colombo, S., De Winde, J.H., Donation, M., Dumortier, F., Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Nauwelaers, D., *et al.* (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.

- Thomas, M.R., and O'Shea, E.K. (2005). An intracellular phosphate buffer filters transient fluctuations in extracellular phosphate levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 9565-9570.
- Tkach, J.M., Yimit, A., Lee, A.Y., Riffle, M., Costanzo, M., Jaschob, D., Hendry, J.A., Ou, J., Moffat, J., Boone, C., *et al.* (2012). Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. *Nat. Cell Biol.* *14*, 966-976.
- Tsaponina, O., Barsoum, E., Astrom, S.U., and Chabes, A. (2011). Ixr1 is required for the expression of the ribonucleotide reductase Rnr1 and maintenance of dNTP pools. *PLoS Genet.* *7*, e1002061.
- van Heerden, J.H., Bruggeman, F.J., and Teusink, B. (2014). Multi-tasking of biosynthetic and energetic functions of glycolysis explained by supply and demand logic. *Bioessays*
- Van Rompay, A., Johansson, M., and Karlsson, A. (2000). Phosphorylation of nucleosides and nucleoside analogs by mammalian nucleoside monophosphate kinases. *87*, 189-198.
- Voegtli, W.C., Ge, J., Perlstein, D.L., Stubbe, J., and Rosenzweig, A.C. (2001). Structure of the yeast ribonucleotide reductase Y2Y4 heterodimer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 10073-10078.
- Vorisek, J., Knotkova, A., and Kotyk, A. (1982). Fine cytochemical localization of polyphosphates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Zentralbl. Mikrobiol.* *137*, 421-432.
- Wang, H., Bao, R., Jiang, C., Yang, Z., Zhou, C.Z., and Chen, Y. (2008). Structure of Ynk1 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* *64*, 572-576.
- Wang, L., Fraley, C.D., Faridi, J., Kornberg, A., and Roth, R.A. (2003). Inorganic polyphosphate stimulates mammalian TOR, a kinase involved in the proliferation of mammary cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 11249-11254.
- Werner, T.P., Amrhein, N., and Freimoser, F.M. (2005). Novel method for the quantification of inorganic polyphosphate (iPoP) in *Saccharomyces cerevisiae* shows dependence of iPoP content on the growth phase. *Arch. Microbiol.* *184*, 129-136.

- Wu, X., and Huang, M. (2008). Dif1 controls subcellular localization of ribonucleotide reductase by mediating nuclear import of the R2 subunit. *Mol. Cell. Biol.* 28, 7156-7167.
- Wykoff, D.D., and O'Shea, E.K. (2001). Phosphate transport and sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 159, 1491-1499.
- Wykoff, D.D., Rizvi, A.H., Raser, J.M., Margolin, B., and O'Shea, E.K. (2007). Positive feedback regulates switching of phosphate transporters in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell* 27, 1005-1013.
- Yang, M., Jarrett, S.G., Craven, R., and Kaetzel, D.M. (2009). YNK1, the yeast homolog of human metastasis suppressor NM23, is required for repair of UV radiation- and etoposide-induced DNA damage. *Mutat. Res.* 660, 74-78.
- Yao, R., Zhang, Z., An, X., Bucci, B., Perlstein, D.L., Stubbe, J., and Huang, M. (2003). Subcellular localization of yeast ribonucleotide reductase regulated by the DNA replication and damage checkpoint pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 6628-6633.
- Zaim, J., Speina, E., and Kierzek, A.M. (2005). Identification of new genes regulated by the Crt1 transcription factor, an effector of the DNA damage checkpoint pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 280, 28-37.
- Zhang, S.Q., Hu, Y., and Jong, A.Y. (1995). Temporal and spatial distributions of yeast nucleoside diphosphate kinase activities and its association with the Cdc8p. *Cell. Mol. Biol. Res.* 41, 333-346.
- Zhao, X., Chabes, A., Domkin, V., Thelander, L., and Rothstein, R. (2001). The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage. *Embo j.* 20, 3544-3553.
- Zhao, X., Muller, E.G., and Rothstein, R. (1998). A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol. Cell* 2, 329-340.
- Zhao, X., and Rothstein, R. (2002). The Dun1 checkpoint kinase phosphorylates and regulates the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 3746-3751.

Zhou, Z., and Elledge, S.J. (1993). DUN1 encodes a protein kinase that controls the DNA damage response in yeast. *Cell* 75, 1119-1127.

Zvyagilskaya, R.A., Lundh, F., Samyn, D., Pattison-Granberg, J., Mouillon, J.M., Popova, Y., Thevelein, J.M., and Persson, B.L. (2008). Characterization of the Pho89 phosphate transporter by functional hyperexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 8, 685-696.

ANNEXOS

ANNEX I:

Protocol d'extracció i quantificació de dNTPs en llevats.

Extracció:

1. Preparar un o/n a OD= 0,05 en 9 mM PO₄.
2. Posar el cultiu a OD=0,5 i deixar-lo amb exponencial 2h.
3. Preparar la solució A (12% TCA, 15mM MgCl₂), per 5ml: 600µl TCA 100% + 75 µl MgCl₂ 1M + aigua.
4. Obtenir un pellet de 2×10^7 (2 ml de 0,7 ODs) cèl·lules per filtració. Passar el filtre a un eppendorf de 1,5 ml. **A partir d'ara es treballa a 4⁰C.**
5. Afegir 1 ml de solució A freda. Vortejar 30 segons, deixar incubant a 4⁰C durant 15 minuts, i tornar a vortejar 30 segons.
6. Centrifugar a 13000 rpm durant 5 minuts. Recollir fase aquosa (sobrenedant)
7. Afegir 800µl de Freó:Trioctilamina (78%:22%). Agitar, centrifugar a 13000 rpm durant 5 minuts.
8. Tornar a afegir a la fase aquosa 700 µl Freó:Trioctilamina (78%:22%). Agitar, centrifugar a 13000 rpm durant 5'.
9. Recollir 400 µl del sobrenedant i guardar-los a -80°C.

Quantificació:

1. Retolar tots els tubs de PCR (estàndards + mostres), per cada un dels 4 dNTPs.
2. Retolar els discs de paper Whatman de 2.3 cm de diàmetre. Sempre en llapis, utilitzant el mateix codi que als tubs.
3. Engegar *speed-back* abans de començar. **Es treballa sempre en gel.**
4. Es calcula el volum de radionucleòtid que s'utilitzarà perquè quedi a una concentració final de 5 µM . Es liofilitzarà amb *speed-back* i es resuspèn amb el volum final amb el nucleòtid que està a 10 µM, de manera que ens queda a una concentració final de 15 µM. Els radionucleòtids utilitzats són el ³H-ATP (per mesurar nivells de dTTP, dCTP i dGTP) i el ³H-TTP (per mesurar nivells de dATP).
5. S'afegeix el volum calculat de radionucleòtid en dos eppendorfs per separat (³H-ATP i ³H-TTP) i es deixa liofilitzar durant 30 minuts al *speed-back*.

6. Preparació dels estàndards a partir d'una barreja de dNTPs d'un kit de PCR. Les dilucions es fan amb aigua MQ. La curva és la següent afegint 5 µl: per a dATP, dGTP i dCTP (0 pmol, 0.025 pmol, 0.05 pmol, 0.1 pmol, 0.5 pmol, 1 pmol i 2 pmol). Per al dTTP (0 pmol, 0.025 pmol, 0.05 pmol, 0.1 pmol, 0.2 pmol, 0.35 pmol i 0.5 pmol).
7. Es recuperen els dNTPs* liofilitzats i es dilueixen amb dATP o dTTP freds.

8. Màster mix de la reacció (volum final de cada reacció 20 µl)

| <u>Component</u> | <u>Volum per una reacció</u> |
|---|------------------------------|
| Aigua MQ | 10 µl |
| Tris-HCl 1M pH 7.5 | 0.8 µl |
| MgCl ₂ 0.1 M | 2 µl |
| DTT 0.5 M | 0.2 µl |
| Oligonucleòtid 5 µM | 1 µl |
| ³ H-ATP (G, C, T) o ³ H-TTP (A) | 1 µl |
| Seqüenasa (Bioron) | 0.1024 µl |

9. S'afegeixen 15 µl de màster mix en cada tub.
10. S'afegeixen 5 µl d'estàndards i 5 µl de mostra.
11. S'incuba 1 hora en un bany a 48°C.
12. Es prepara 1 litre de Na₂HPO₄ 5% w/v.
13. Passada l'hora de reacció, s'agafen 18 µl de la reacció i es passen als discs de Whatman. Es deixen assecar durant 1-2 hores a temperatura ambient.
14. Es realitzen 3 rentats dels discs, de 10 minuts en agitació amb Na₂HPO₄ 5% w/v.
15. Es realitza un rentat de 10 minuts en agitació amb aigua MQ.
16. Es realitza un rentat de 10 minuts en agitació amb etanol 70%.
17. Es deixen assecar els discs sobre parafilm durant 30 minuts. S'accelera el procés amb una làmpara d'infraroig.
18. S'introdueix cada disc al seu vial de centelleig, i s'afegeixen 2 ml de líquid de centelleig.
19. Finalment, es quantifica la radioactivitat al contador beta.

ANNEX II:

**Protocol d'extracció i quantificació d'ortofosfat
citoplasmàtic en llevats.**

1. Es recullen 10^7 cèl·lules (0,7 OD) centrifugant 1 minut a 10.000 rpm. A partir d'ara es treballa a 4°C.
2. Es resuspen el pellet de cèl·lules amb 1 ml d'aigua MQ.
3. Centrifugació a 10000 rpm.
4. Es repeteix el pas 2 i 3.
5. Es resuspen el pellet amb 500 µl de Tritó X-100 (0,1%).
6. Es lisen les cèl·lules amb boles de vidre (3 cicles de 30 segons a velocitat 6 m/s a la *Fastprep*).
7. Es centrifuga l'extracte a 13000 rpm durant 2 minuts.
8. Es recull el sobrenedant per quantificar els nivells d'ortofosfat citoplasmàtic.
9. Utilitzant una placa de 96 pous, a 10 µl de mostra se li afegeixen 86 µl d'heptamolibdat d'amoni 28 mM / àcid sulfúric 2.1 M, i 64 µl de solució de verd de malaquita (0,015% verd de malaquita, 0,1% àcid acètic i 0,17% glicerol).
10. Finalment es mesura l'absorbància a 600 nm, s'analitzen els valors obtinguts comparant-los amb una recta patró de KH_2PO_4 (0-500 µM Pi).

ANNEX III:

Protocol d'extracció de polyP en llevats.

Els dos protocols utilitzats per dur a terme l'extracció de PolyP són: extracció amb H₂SO₄ (Werner et al., 2005) o fenol-cloroform (Kumble and Kornberg, 1995).

Molt breument, el primer tracta de lissar les cèl·lules amb H₂SO₄, neutralitzar amb NaOH i aquesta fase aquosa es passa per una columna per purificar el polyP. Al segon es lisen les cèl·lules amb fenol més SDS, s'afegeix cloroform, es centrifuga i la fase aquosa es passa per una columna per purificar el polyP.

Tenint en compte sempre les nostres condicions experimentals, vam apreciar l'aparició de molta variabilitat en els nostres resultats, per això vam decidir comparar aquests dos mètodes d'extracció.

Els nostres experiments s'han basat en mesurar els nivells de polyP al llarg del cycle cel·lular, esperant poder veure les variacions descrites en la literatura (Neef and Klädde, 2003). Amb el mètode del sulfúric, com s'observa a la figura 42 A, nosaltres no hem aconseguit veure variacions al llarg del cycle, probablement perquè els nivells de partida són massa baixos. En canvi si ens fixem amb la figura 42 B, podem veure com en aquest cas els nivells de partida són més elevats i si detectem les fluctuacions del polyP al llarg del cycle.

Creiem que el que ens interfereix en el protocol del sulfúric, i que ens traiem de sobre amb el del fenol-cloroform, és la gran quantitat de DNA present en l'extracte. En cultius asincrònics la interferència del DNA deu ser menor, però en el nostre cas que tenim totes les cèl·lules replicant el DNA a la vegada podria ser determinant.

La nostra hipòtesi és que el DNA, segurament, col·lapsa la columna provocant la pèrdua de la major part del polyP, per això els nivells inicials ja són tan baixos. Per comprovar aquesta hipòtesi, es va comparar cada un dels protocols tractant la fase aquosa amb més menys DNAsa i RNAsa. I com s'observa a la figura 42, quan tractem en D/RNAsa millorem l'eficiència d'extracció i podem veure millor les fluctuacions del polyP al llarg del cycle.

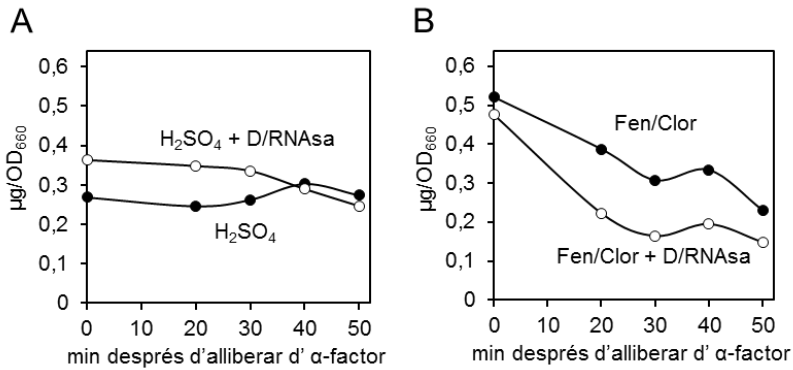


Figura 42 Nivells de polyP dependent del protocol utilitzat. Cèl·lules wt van ser sincronitzades a G₁ amb α-factor i alliberades en YPD. Es van prendre mostres per quadruplicat a temps indicats per mesurar els nivells de polyP a la cèl·lula. El gràfic A mostra els resultats obtinguts lisant les cèl·lules amb àcid sulfúric +/- DNAsa-RNAsa, i el gràfic B mostra els resultats obtinguts lisant les cèl·lules amb fenol-cloroform +/- DNAsa-RNAsa.

Per tant, l'extracció de polyP es va fer tal i com està descrit en (Kumble and Kornberg, 1995), aplicant algunes modificacions.

A més, degut a que Ogawa descriu que la població majoritària de polyP en llevats són cadenes de menys de 60 residus, i aquestes, en gran majoria, no s'atrapen amb les columnes (Ogawa et al., 2000), vam decidir comparar el polyP obtingut mitjançant la purificació en columna i la purificació per precipitació. Com s'observa a la figura 15, quan es purifiquen els polyP amb columna estem perdent vora el 50% del contingut total respecte la purificació per precipitació.

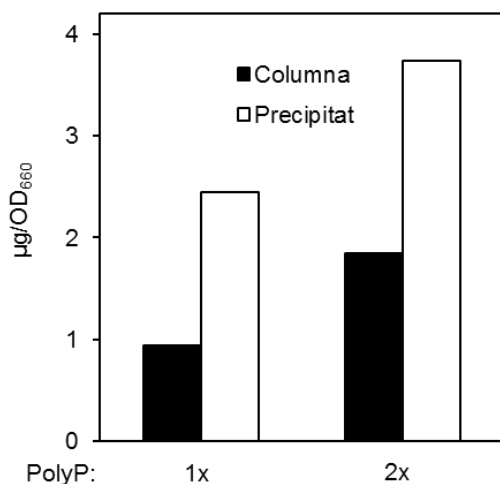


Figura 43 Nivells de polyP dependent de la purificació emprada. Cèl·lules wt es van créixer en condicions de sobrecàrrega de polyP. Es van prendre mostres a diferents temps per per mesurar els nivells de polyP a la cèl·lula. Les barres negres mostren els nivells de polyP obtinguts purificant amb columna i les barres blanques indiquen els nivells de polyP obtinguts per precipitació. El gràfic mostra els resultats d'un experiment representatiu.

Nosaltres ens vam percatar d'aquesta situació quan ja teníem gairebé totes les mesures fetes amb el sistema de columna, per tant vam decidir acabar el projecte purificant amb columna, però ho tindrem en compte en futurs experiments.

El protocol complet detallat és el següent:

Preparació dels tubs de rosca:

- A) Afegir 300 µl de fenol + 40 µl de SDS 10%. (Per agafar el fenol passem un volum x amb una pipeta de vidre a un falcon de 50 ml vigilant no agafar de la capa superior i d'aquí anem dispensant als tubs.)
 - B) Afegir 350 µl de cloroform. (Hi ha alíquota de cloroform en pot de vidre)
1. Resuspendre el pellet de cèl·lules amb 400 µl de buffer AE (50 mM AcNa pH 5.3, 10 mM EDTA) fred.
 2. Passem les cèl·lules al tub A (Se resuspen un i es passa ràpidament al tub A, el segon i tub A i així successivament)
 3. S'enrosquen bé els taps, es mouen vigorosament 4 cops i es vortegen durant 5 segons cada un.
 4. Bullir a 65°C durant 5 minuts.
 5. Deixar-los mínim 1 minut en gel.
 6. Afegir 300 µl de cloroform.
 7. Enroscar, moure 4 cops vigorosament i voteijar 5 segons.
 8. Centrifugar a temperatura ambient 2 minuts a 14000 rpm.
 9. Recuperar la fase aquosa (part de dalt) i passar-la al tub B (pipeta de 1000 marcada a 400 µl, sostenim el tub obliquament i es va succionant molt poc a poc continuadament i sempre desde el límit superior fins que arribem a la interfase (restes cel·lulars, color blanc)).
 10. Enroscar, moure 4 cops vigorosament i vorteijar durant 5 segons (si no ens hem emportat interfase quedarà transparent)
 11. Centrifugar a temperatura ambient 2 minuts a 14000 rpm.
 12. Recuperar la fase aquosa i passar-la a un tub de rosca nou. (mateix procediment del pas 10, aquí no veurem interfase per tant es para d'agafar al límit amb la fase orgànica).
 13. Afegir 2 µl de RNAsa (10 mg/ml) i 2 µl de DNAsa (10 mg/ml) a cada tub i incubar 1 hora a 37°C.
 14. Preparar eppendorfs amb 1 ml de etanol absolut (Panreac) + 40 µl d'acetat de sodi (3M, pH 5.3) i gurdar-los a -20°C.
 15. Transeferir la fase aquosa a l'eppendorf amb etanol i acetat de sodi, i incubar 3 hoeres a -20°C.

16. Centrifugar durant 20 minuts a 14000 rpm a 4°C.
17. Eliminar per decantació el sobrenedant.
18. Afegir 500 µl de etanol 70%
19. Centrifugar durant 5 minuts a 14000 rpm a 4°C.
20. Eliminar per decantació el sobrenedant.
21. Centrifugar 1 minut per eliminar restes d'etanol
22. Treure amb la pipeta de 200 les restes d'etanol
23. Deixar els eppendorfs oberts a temperatura ambient durant 5 minuts perquè s'acabin d'assecar.
24. Resuspendre amb la pipeta de 200 els pellets amb 50 µl d'aigua MQ. (Si es preveu poca mostra resuspendre en 25 µl, però mai en menys perquè necessitem 20 µl per quantificar)
25. Guardar les mostres a 4°C (Més val no congelar si s'han de quantificar en 24-72 hores).

RECONeixEMENTS

Agrair a tots els membres del meu grup (Joan Marc Martínez, Sara Hernández, Eva Quandt, Javier Jiménez, Elisabet Bállega, Natalia Ricco, Abril Sánchez, Mariana Ribeiro, Marta Pérez, Sergio Garcia i Oriol Mirallas) per ajudar-me cada dia a millorar el treball.

Agrair a Sushma Sharma, David Canadell, Marta Rafel, Javier Torres, Andrei Chabes, Joaquín Ariño, Ramon Martí i Eloi Garí per la seva implicació amb el treball ja sigui en l'aportació de noves idees per millorar els resultats, per deixar-nos soques per poder realitzar els experiments o per poder realitzar experiments fora del meu abast.

AGRAÏMENTS

Vull començar agraint a la Universitat Internacional de Catalunya per haver-me donat la oportunitat de formar-me com a investigador, professor i persona durant aquests cinc anys de tesi.

Entre tots els membres de la UIC, vull remarcar la figura de Pep, el meu director de tesis, per la seva confiança depositada en mi des del primer dia. M'ha ensenyat moltes coses durant aquests cinc anys però em quedo amb dos, la seva visió crítica de les coses i la seva capacitat per transmetre coneixement. A més, m'ha permès complir un dels meus somnis que sempre ha estat el de ser doctor algun dia. Per això i moltes altres coses et dono les GRÀCIES!!!

Agrair també a la Núria i tot el seu grup per les ajudes rebudes sempre que se'ls ha necessitat.

Agrair a tots els meus companys de grup: Sara, Javi, Naty, Mariana, Eva, Bob, Eli, Abril, Marta, Sergio i Oriol la seva aportació en aquesta tesi tan dins com fora del laboratori. Moltes gràcies.

A tu Sara, perquè has sigut la meva referència al laboratori, perquè m'has fet riure i perquè m'has ajudat en monets de bajon. Per tot això només dir-te que m'enporto una bona amiga.

A Javi, pel coneixement que m'ha aportat fruit de la seva experiència al laboratori i, pel repertori de chistes que ha creat dins al grup.

A Naty, per tot el que he après i tots els bons moments viscuts: classes de màster, sustos, patades voladores etc..

A Eva i Marta, per ajudar-me durant aquelles llarguíssimes sessions de viables a plaquejar no sé jo quantes plaques, a més dels bons moments viscuts durant les tardes de birres, dinars, sopars, trivials etc.

A Bob, per l'esforç que ha realitzat per poder aconseguir resultats que han ajudat a l'execució d'aquest treball, i per tots els bons moments viscuts tant al laboratori com fora.

A Eli i Abril, pel seu bon humor que sempre t'ajuda a superar moments delicats.

A Mariana, per l'ajuda rebuda en la difícil tasca de mesurar polifosfat en cèl·lules de mamífer, i per alimentar-me amb les seves galetes durant el període d'escriptura de la tesi (no vull pensar ara amb els referees).

Agrair a la gent de l'Autònoma i la Vall d'Hebrón, especialment a David i a Javi, per haver-me ajudat a realitzar experiments claus de la meva tesi.

Agrair als meus pares per haver-me donat la oportunitat d'arribar fins aquí, han sigut molts anys d'esforç per part vostra per aconseguir aquest resultat, que segurament vos il·lusiona a vutros tant o més que a mi. Joaquim i Llàtzer, gràcies per haver aportat, entre moltes altres coses, moments de rises infinites que m'han permès desconectar de la rutina diària.

Finalment vull agrair a les dos persones, Mercè i Samuel, que m'acompanyen durant el dia a dia. A Mercè, moltes gràcies per haver estat sempre al meu costat, ja que has sigut un pilar fonamental durant aquests cinc anys. I a Samuel, el nostre tresor, agrair-li tot el que és capaç d'aportar cada dia per fer que la nostra vida sigui molt més agradable. És increïble com una persona tant petita pot aportar coses tant grans.

