

---

## Tesis doctoral

*Nudt3. La primera endopolifosfatasa humana.*

Bàrbara Samper Martín

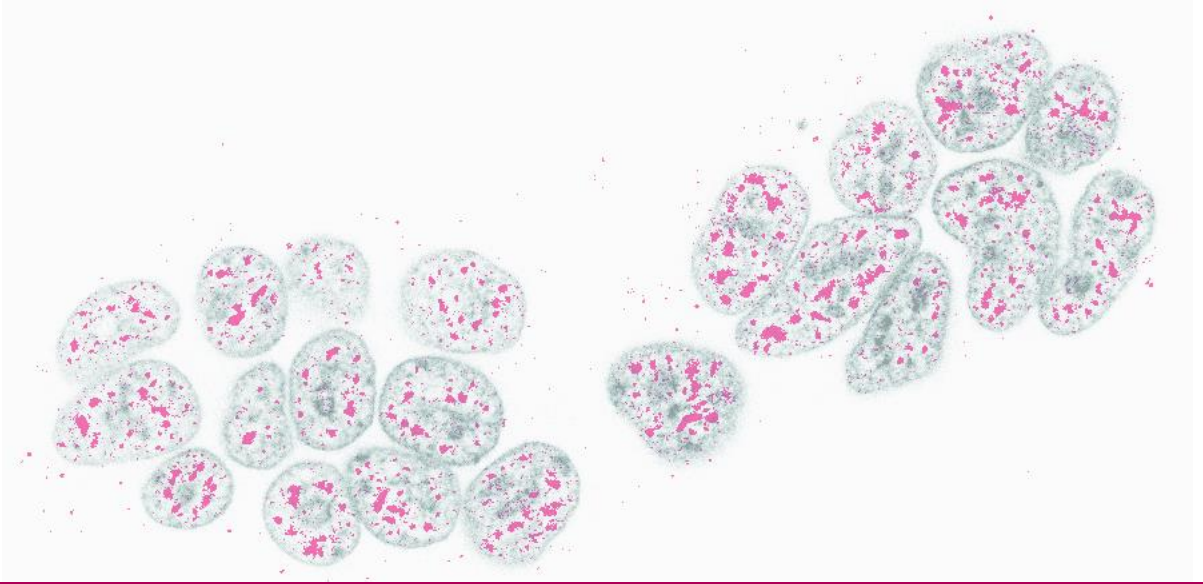
---



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la licència [Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 4.0 Internacional \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia [Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

This doctoral thesis is licensed under the [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)



Tesis doctoral

---

# NUDT3

La primera endopolifosfatasa humana

Bàrbara Samper Martín

---

Universitat Internacional de Catalunya, 2020



Universitat Internacional de Catalunya  
Facultad de Medicina y Ciencias de la  
Salud

# **Nudt3**

**La primera endopolifosfatasa humana**

Bàrbara Samper Martín

2020





Memoria presentada para optar al título de  
doctor por la Universitat Internacional de  
Catalunya.  
Barcelona, 2020

Trabajo dirigido por el Dr. Josep Clotet Erra y el  
Dr. Samuel Bru Rullo del Departamento de  
Ciencias Básicas de la Universitat Internacional  
de Catalunya.

Programa de doctorado en Investigación en  
Salud de la Universitat Internacional de  
Catalunya.

---

Dr. Josep Clotet  
Director de tesis

---

Dr. Samuel Bru  
Director de tesis

---

Bàrbara Samper  
Doctorando



“Nunca se sabe que encontrará uno tras una puerta.

Quizá en eso consiste la vida: en girar pomos.”

Albert Espinosa





## *Agradecimientos*

---



## Agradecimientos

---

Primero, agradecer a la Universitat Internacional de Catalunya por haberme dado la oportunidad de realizar el doctorado y empezar mi carrera profesional en el campo de la investigación.

Del Departamento de Ciencias Básicas, agradecer a Pep, mi director de tesis y jefe de grupo, la confianza que ha depositado en mí como investigadora para llevar a cabo mi proyecto de tesis y por dejarme participar en los proyectos del grupo lo que me ha ayudado a adquirir una visión crítica de mis resultados y la confianza suficiente para transmitirlos y defenderlos.

Después, agradecer a Samu, mi co-director de tesis, y Javi, el co-director en la sombra (o al revés... ya no se) toda la ayuda que me han brindado durante mi etapa doctoral. A Javi, gracias por los chistes malos, las charlas de motivación y por dejar que te moleste un rato cada vez que voy a tu despacho. A Samu, Samuel cuando me hace rabiar (que no son pocas las veces), agradecerle todo. A nivel científico, gracias por las bromas y juegos que hacen más ameno cualquier experimento, las conversaciones y reflexiones sobre los resultados, tu apoyo y perseverancia en los momentos más complicados del polyP y por tu complicidad en las reuniones. A nivel personal, gracias por tus consejos, por saber escuchar y por hacerme reír en todo momento independiente de mi situación personal y, sobre todo, por no ser solo un codirector de tesis sino mi amigo.

Agradecer también a Nuria y todo su grupo la ayuda que me han dado cuando la he necesitado y, sobre todo, a Rosi no solo por proporcionarme las ratas para esta tesis sino también por las charlas, los consejos, los trapicheos de sangre y alguna que otra cervecita.

## Agradecimientos

---

Gracias a todos los miembros del grupo, Mariana, Abril, Eva, Laura, Núria, Reyes, Ana, Alessandro, Joan y Naty los que ya han volado, los veteranos y los nuevos, por su aportación y ayuda en realizar esta tesis tanto dentro como fuera del laboratorio.

De esta tesis me llevo a muy buenas amigas con las que he compartido vivencias, cotilleos, cenas, viajes y, sí, alguna que otra tarde de cervecita. Por todo esto, quiero darles las gracias.

A Naty por su apoyo y sus conversaciones rápidas de pasillo.

A Palito y Sara, por sus charlas y consejos, sobre todo al inicio, las cuales me han ayudado a sobrevivir en el proceso.

A MariCarmen por acogernos en Madrid y, aunque solo nos veamos en los viajes, gracias por hacer que éstos sean más divertidos.

A Reyes por compartir esta etapa juntas con nuestros altibajos, motivaciones y desmotivaciones, las charlas de poyata, despacho, ferro... la verdad es que cualquier lugar es bueno para hablar contigo y descargar tensiones.

A Eva, gracias por ser la voz de la cordura y la tranquilidad, por tus consejos de cosmética, por contagiarme un poco tu música y por tus consejos bioquímicos en el laboratorio.

A Bob que, aunque llegaste tarde en esta etapa llegaste pisando fuerte, gracias por tus comentarios graciosos, tus firmas de email que me flipan, por enseñarme afrontar los dramas con humor y por crearme la maravillosa costumbre de bajar alguna que otra tarde a la plaza.

## Agradecimientos

---

A Marta (Pérez xD), gracias por todo tu apoyo tanto dentro como fuera del lab. En este tiempo, te has convertido en alguien importante para mí con quien he compartido muchos momentos, los mejores y los no tan buenos, pero en todos me has hecho sonreír. Por esto y mucho más, mil gracias.

Fuera del laboratorio, agradecer a todos mis compañeros del restaurante las risas y los buenos momentos durante los últimos cinco años, que no han sido pocos. Gracias por distraerme todos los fines de semana, aunque sea trabajando, por enseñarme a desconectar de la ciencia que tanto absorbe y por acogerme tan bien en nuestra pequeña familia.

Gracias a mis amig@s que son un apoyo incondicional, tanto l@s de siempre como l@s que han ido llegando, sobre todo, a Marta (Pozo xD) por nunca fallarme desde pequeñas, a Marta (compi xD) por irrumpir en una etapa complicada y devolverme la confianza en mí misma, por enseñarme a bailar ante las adversidades, a exprimir cada instante y disfrutar de la vida. A Laura, por su sensibilidad porque con apenas unas notas de piano puede decirlo todo, a Ana, por tener el don de la palabra que tanto me ha hecho reír y, finalmente, a Marina, por estar siempre muy cerca en todo momento a pesar de la distancia que nos separa.

Quiero dar las gracias a mi familia, mi madre y mi hermano, por estar siempre ahí y ser los únicos capaces de llenar los vacíos que deja la ciencia. Gracias a mi madre por todo su esfuerzo y cariño y por enseñarme a ser una mujer fuerte e independiente. Sé que no ha sido fácil el camino hasta aquí y que hemos hecho muchos sacrificios, pero no cambiaría ningún momento de los que he vivido porque sé que todo ha sido por nosotros.

## Agradecimientos

---

Finalmente, darle las gracias a mi hermano por llegar a mi vida cuando tenía siete años y no haberme fallado nunca. Por ser mi cómplice en todas las decisiones que he tomado, por ser la motivación de superarme cada día, por ser capaz de hacerme llorar riendo, por apoyarme en todos mis proyectos y por no dejar que me rinda en los peores momentos. Eres la forma más bonita que ha tenido la vida en enseñarme lo verdaderamente importante. No me faltes nunca.

*Resumen en castellano*

---





## Nudt3

### La primera endopolifosfatasa humana

El polifosfato inorgánico (polyP) es un polímero compuesto por cientos de residuos de fosfato ( $P_i$ ) unidos por enlaces fosfoanhidro de alta energía. Esta molécula se encuentra en todos los organismos desde bacteria a mamíferos y se encuentra relacionada con una gran variedad de procesos celulares. Sin embargo, su metabolismo en mamíferos aún no ha sido caracterizado. En esta tesis doctoral, se ha purificado una actividad endopolifosfatasa dependiente de  $Zn^{2+}$  presente en extracto de cerebro de rata hasta su máxima homogeneidad mediante un método de purificación bioquímico acoplado a un zimograma, una nueva aproximación que permite detectar la actividad enzimática sobre un sustrato, en este caso, el polyP. Un análisis proteómico reveló a Nudt3, una difosfoinositol polifosfato fosfohidrolasa (DIPP) como enzima responsable de la actividad endopolifosfatasa del extracto. Nudt3, descrita previamente como una fosfohidrolasa de inositoles pirofosfato (Ins- $P_7$  y Ins- $P_8$ ) y dinucleosidos oligofosfato (Ap $_5$ A y Ap $_6$ A) *in vitro*, confiere especificidad de sustrato dependiendo del ion divalente presente en la reacción mostrando actividad endopolifosfatasa exclusivamente en presencia de  $Zn^{2+}$  en condiciones fisiológicas (pH 6.8; 36°C). Además, en esta tesis se demuestra que Nudt3 tiene actividad endopolifosfatasa *in vivo* dependiendo de la concentración de  $Zn^{2+}$  intracelular, hecho que puede variar en función del estado metabólico de la célula. Finalmente, la célula cuando es sometida a un estrés oxidativo genera un aumento de la concentración de  $Zn^{2+}$  intracelular y promueve una disminución de los niveles de polyP celular. En conclusión, esta tesis identifica la primera enzima que controla la degradación del polyP en humanos.



*Resumen en inglés*

---



## **Nudt3**

### **The first endopolyphosphatase in humans**

Inorganic polyphosphate (polyP) is a polymer of hundreds of phosphate ( $P_i$ ) residues linked by high energy anhydrous bonds. It is found in all organisms from bacteria to mammals and is involved in a wide variety of cellular processes. Its metabolism, in mammals, remains mainly uncharacterized. In this thesis, an endopolyphosphatase activity dependent of  $Zn^{2+}$  has been purified to maximum homogeneity from rat brain through a biochemical purification method coupled to a zymogram, a new approach to detect enzyme activity on polyphosphate. Proteomic analysis reveals Nudt3, a diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase (DIPP) protein as responsible of endopolyphosphatase activity. Nudt3, described before as hydrolases of inositols pyrophosphates (Ins- $P_7$  and Ins- $P_8$ ) and dinucleoside oligophosphates (Ap $_5$ A and Ap $_6$ A) *in vitro*, confer substrate specificity depending on the current ion in the reaction showing endopolyphosphatase activity exclusively in the presence of  $Zn^{2+}$  at physiological conditions (pH 6.8; 36°C). Furthermore, it has also been demonstrated that Nudt3 has an endopolyphosphatase activity *in vivo* depending on the intracellular  $Zn^{2+}$  concentration, a fact that occurs when the cell is submitted to an oxidative stress. In conclusion, this thesis identifies the first enzyme that controls the degradation of polyP in mammalian cells.



*Trayectoria*

---





Mi tesis doctoral comenzó en marzo del 2016 y termina en Julio del 2020. Durante estos cuatro años he participado en los distintos proyectos del grupo de investigación los cuales me han permitido formarme como científica.

Durante mis dos primeros años de tesis he participado en tres proyectos que se desarrollaban en ese momento en el grupo. De estos proyectos, se han publicado dos y otro está pendiente de publicación a lo largo de este año.

El primero, fue publicado en enero del 2018 del cual soy tercera firmante: *“Intertwined control of the cell cycle and nucleocytoplasmic transport by the cyclin-dependent kinase Pho85 and RanGTPase Gsp1 in Saccharomyces cerevisiae”*

El segundo, fue publicado en junio del 2019 del cual soy tercera firmante: *“Comprehensive and quantitative analysis of G1 cyclins. A tool for studying the cell cycle”*.

El tercero, pendiente de publicación a lo largo del 2020, está relacionado con el papel de Yku80 en la reparación del ADN y la viabilidad celular.

Durante estos dos años, también he trabajado en un cuarto proyecto relacionado con la molécula de polifosfato que me permitió publicar un artículo como co-autora en setiembre del 2017 que tiene por título *“Polyphosphate is a key factor for cell survival after DNA damage in eukaryotic cells”*.

Además, dentro de este proyecto comenzaron a aparecer resultados preliminares que más tarde se han convertido en mi tesis doctoral. Fue desde el Setiembre de 2017 hasta hoy que he podido estar plenamente centrada en la pregunta de cuáles podrían ser las enzimas que regulan el metabolismo del polifosfato.

A continuación, pasamos a conocer los resultados obtenidos en esta tesis doctoral.

## *Índice*

---



## Índice

<b>Introducción .....</b>	<b>31</b>
1. Descripción del polifosfato (polyP).....	33
1.1. Estructura química del polyP .....	33
1.2. Niveles y localización del polyP .....	34
1.3. Técnicas de medición del polyP celular .....	37
2. Funciones del polyP .....	42
2.1. Organismos eucariotas unicelulares.....	45
2.2. Organismos eucariotas superiores .....	46
3. Metabolismo del polyP .....	50
3.1. Enzimas con actividad sintasa .....	51
3.2. Enzimas con actividad polifosfatasa .....	54
4. Familia NUDIX .....	61
4.1. Estructura, función y sustratos.....	61
4.2. Subfamilia DIPP.....	65
5. Importancia del Zn <sup>2+</sup> en el organismo.....	72
5.1. Distribución del Zn <sup>2+</sup> celular .....	72
5.2. Funciones del Zn <sup>2+</sup> celular .....	76
5.3. El cerebro presenta un elevado contenido en Zn <sup>2+</sup> celular.....	81
6. Conexión entre los niveles de polyP, Zn <sup>2+</sup> y cerebro .....	85
<b>Hipótesis .....</b>	<b>87</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>91</b>
<b>Material y métodos.....</b>	<b>95</b>
1. Células y condiciones de cultivo.....	97
2. Obtención de proteína recombinante.....	99
3. Expresión de proteína en levaduras.....	101
4. Ensayos enzimáticos.....	103

5. Inmunofluorescencia.....	106
6. Ensayo de viabilidad.....	107
7. Análisis de proteínas mediante Western Blot.....	107
8. Análisis estadísticos.....	108
9. Estrategia de purificación de las enzimas con actividad polifosfatasa a partir de tejido animal.....	109
9.1. Esquema de la purificación.....	109
9.2. Muestra.....	111
9.3. Cromatografía de afinidad.....	111
9.4. Cromatografía de exclusión por tamaño.....	114
9.5. Zimograma.....	116
9.6. Proteómica.....	118
<b>Resultados.....</b>	<b>119</b>
1. Presencia de actividad polifosfatasa en rata.....	121
1.1. Presencia de actividad polifosfatasa en sangre.....	122
1.2. Presencia de actividad polifosfatasa en cerebro.....	125
2. Nudt3 responsable de la actividad endopolifosfatasa dependiente de Zn <sup>2+</sup> en cerebro de rata.....	131
2.1. Cromatografía de afinidad de la actividad endopolifosfatasa dependiente de Zn <sup>2+</sup> .....	131
2.2. Filtración en gel de la actividad endopolifosfatasa dependiente de Zn <sup>2+</sup> .....	133
2.3. Zimograma de la actividad endopolifosfatasa dependiente de Zn <sup>2+</sup> .....	134
2.4. Rendimiento de la purificación de la actividad endopolifosfatasa dependiente de Zn <sup>2+</sup> .....	137
3. Nudt3 es una endopolifosfatasa <i>in vitro</i> .....	139
3.1. Nudt3 recombinante tiene actividad endopolifosfatasa.....	139

3.2. La familia DIPP tiene actividad endopolifosfatasa .....	140
3.3. Nudt3 tiene actividad endopolifosfatasa en presencia de distintos iones divalentes.....	142
3.4. Nudt3 no tiene actividad exopolifosfatasa .....	144
3.5. Nudt3 tiene actividad endopolifosfatasa a partir de 0,5 mM Zn <sup>2+</sup> .....	145
3.6. Nudt3 tiene actividad endopolifosfatasa a pH 6,8-7,5 .....	147
3.7. Inhibidores de la actividad endopolifosfatasa de Nudt3 .....	148
3.8. El aminoácido aspártico (E70) es responsable de la actividad catalítica de Nudt3 .....	150
3.9. Sustratos de Nudt3.....	152
4. Nudt3 es una endopolifosfatasa dependiente de Zn <sup>2+</sup> <i>in vivo</i> .	156
4.1. Sobreexpresión de Nudt3 en levaduras.....	156
4.2. Nudt3 es una endopolifosfatasa <i>in vivo</i> .....	158
4.3. Un aumento de Zn <sup>2+</sup> intracelular genera una disminución de polyP intracelular .....	162
4.4. El estrés oxidativo genera una disminución del polyP intracelular .....	164
4.5. El silenciamiento de Nudt3 disminuye la viabilidad celular en estrés oxidativo .....	166
<b>Discusión.....</b>	<b>169</b>
1. Hidrólisis química del polyP .....	171
2. Múltiples actividades polifosfatasa en mamíferos .....	172
3. Nudt3, una endopolifosfatasa <i>in vitro</i> dependiente de Zn <sup>2+</sup> ...	176
3.1. La familia DIPP tiene actividad endopolifosfatasa <i>in vitro</i> dependiente de Zn <sup>2+</sup> .....	177
4. Dualidad funcional dependiente del ion.....	179

4.1. La especificidad de sustrato de Nudt3 depende del ion divalente .....	179
5. Nudt3 es una endopolifosfatasa dependiente de $Zn^{2+}$ <i>in vivo</i> .	183
5.1. El estrés oxidativo disminuye el polyP celular .....	185
6. Nudt3, más que una endopolifosfatasa dependiente de $Zn^{2+}$ .	187
<b>Conclusiones.....</b>	<b>189</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>193</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>213</b>



## *Introducción*

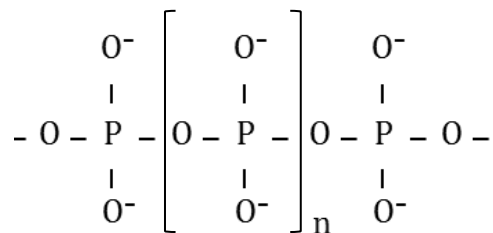
---



## 1. Descripción del polifosfato

### 1.1. Estructura química del polifosfato

El polifosfato (polyP) es un polímero lineal compuesto desde diez a cientos residuos de fosfato unidos por enlaces fosfoanhidro de alto valor energético (Figura 1). Durante años, la molécula de polyP se ha considerado una “molécula fósil” ya que se encuentra conservada en la evolución y está presente en todos los organismos vivos desde bacterias hasta organismos superiores (Kornberg 1999). Poseer moléculas de polyP a nivel celular es una ventaja en la evolución de cualquier organismo puesto que se trata de una posible fuente de fosfato libre para llevar a cabo importantes procesos celulares como, por ejemplo, puede servir como fuente de energía, como agente precursor para la fosforilación de alcoholes incluyendo azúcares, nucleósidos y proteínas o como mediador para activar precursores de ácidos grasos, fosfolípidos, polipéptidos y ácidos nucleicos (Rao, Gómez-García, and Kornberg 2009).



**Figura 1. Estructura química de la molécula de polifosfato (polyP).** El valor de n puede variar entre decenas y cientos de residuos de fosfato (PO<sub>3</sub><sup>-</sup>) dependiendo de la localización celular, el estado metabólico y el organismo.

El polyP es estable en un amplio rango de temperaturas, pHs y en presencia de oxidantes. Además, la formación de sales de polyP hace que la molécula sea soluble en solventes orgánicos. Sin embargo, se ha descrito que el polyP pierde su estabilidad a elevadas temperaturas en un medio ácido, inestabilidad que se ha aprovechado como método de detección o bien, en presencia de iones divalentes en un medio alcalino (Harold 1966).

### **1.2. Niveles y localización celular del polyP**

Los métodos de purificación bioquímicos y las técnicas de biología celular han permitido tanto la cuantificación de los niveles de polyP como su localización en diferentes organismos e incluso en los distintos compartimentos subcelulares.

En bacterias, el polyP celular se encuentra en forma de partículas de almacenamiento con elevada carga negativa llamadas gránulos de volutina (Pallerla et al. 2005). El contenido de polyP de estos granos de volutina puede variar entre los distintos géneros y especies de bacterias marcando un rango entre 100 $\mu$ M como *E.coli* a 200mM como *A. johnsonii* (Kornberg 1999).

Más tarde, análisis inmunohistoquímicos en protistas (*Trypanosoma*) revelan la presencia de vacuolas ricas en complejos de calcio-polyP en el citosol llamadas acidocalcisosomas, las cuales contienen una concentración de polyP del orden de milimolar (mM) (Lander et al. 2016). La posterior purificación y caracterización de los acidocalcisosomas permite describirlos como estructuras de almacenamiento de calcio y otros iones divalentes que forman complejo con

moléculas de polyP y pirofosfato ( $PP_i$ ), junto con enzimas responsables de su degradación todo en un medio ácido generado por las bombas de protones localizadas en la membrana vacuolar (Scott and Docampo 2000). Los acidocalcisomas se encuentran conservados en la evolución y se han hallado en otros organismos desde bacteria, algas, hongos, insectos e incluso mamíferos (Docampo et al. 2005).

El polyP también ha sido ampliamente estudiado en levaduras donde se ha descrito su localización en vacuolas, estructuras muy similares a los acidocalcisomas ya descritos anteriormente, mitocondrias, núcleo y en zonas localizadas del citosol (Lichko, Kulakovskaya, and Kulaev 2006). Además, la purificación bioquímica del polyP de la levadura muestra diferencias en los niveles y características estructurales de la molécula según el compartimento celular. Por ejemplo, en la mitocondria se encuentra el polyP de corta cadena ( $< 15$  residuos de  $P_i$ ) mientras que en la vacuola se localiza un polyP de larga cadena (100-150 residuos de  $P_i$ ) con posibles ramificaciones (Pestov, Kulakovskaya, and Kulaev 2004; Trilisenko, Vagabov, and Kulaev 2002; Wurst, Shiba, and Kornberg 1995). En la Tabla I. se muestran los niveles de polyP en residuos de  $P_i$  según los compartimentos celulares los cuales varían en función de la fase de crecimiento de la levadura. Si agrupamos todos los compartimentos celulares, la cantidad de polyP celular total en levadura es de 100-130mM (Kornberg 1999).

<b>Saccharomyces Cerevisiae</b>		
Compartimento celular	Fase exponencial	Fase estacionaria
Citosol	1.6	4.6
Núcleo	5.0	3.4
Vacuola	2.1	10.6
Mitocondria	1.0	0.4

**Tabla I.** Niveles de polyP ( $\mu\text{mol P}_i$  / mg proteína) en los distintos compartimentos celulares de *S. cerevisiae*. Los datos han sido extraídos de (Lichko et al. 2006)

La distribución del polyP en células humanas es similar a la distribución en levaduras estando presente en diferentes compartimentos subcelulares como el núcleo, el citosol, las mitocondrias y los acidocalcisomas de los precursores plaquetarios. Sin embargo, tanto los niveles de polyP como sus características estructurales difieren de los eucariotas unicelulares presentando una concentración mil veces inferior ( $\mu\text{M}$ ) y con una longitud de la molécula entre 60 y 100 residuos de  $\text{P}_i$  (Tabla II).

<b>Células de mamífero</b>	
Compartimento celular	Concentración ( $\mu\text{M}$ )
Citosol	1.6
Núcleo	5.0
Membrana plasmática	2.1
Mitocondria	1.0
Microsomas	1.0

**Tabla II.** Niveles de polyP ( $\mu\text{M}$ ) en residuos de  $\text{P}_i$  en los distintos compartimentos celulares de un extracto de hígado de rata. Los datos han sido extraídos de (Kumble and Kornberg 1995)

En organismos superiores se ha caracterizado los niveles de polyP en tejidos especializados como hígado, cerebro,

pulmón, corazón y riñón siendo el cerebro uno de los órganos con mayor cantidad de polyP (Tabla III).

Concentración de polyP ( $\mu\text{M}$ )		
Tejido específico	Ratón	Rata
Cerebro	95 $\pm$ 24	54 $\pm$ 12
Corazón	114 $\pm$ 35	58 $\pm$ 20
Riñón	64 $\pm$ 9	34 $\pm$ 12
Pulmón	91 $\pm$ 16	38 $\pm$ 4
Hígado	38 $\pm$ 4	26 $\pm$ 4

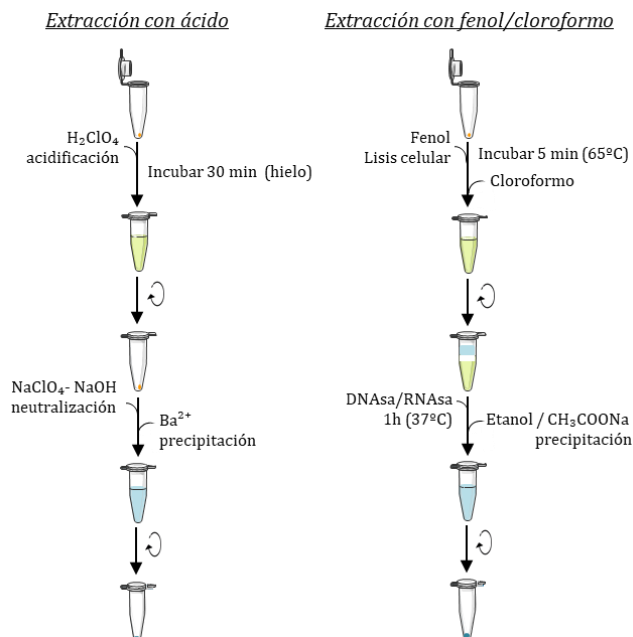
**Tabla III.** Niveles de polyP ( $\mu\text{M}$ ) en residuos de  $\text{P}_i$  en tejidos específicos de rata y ratón. Los datos han sido extraídos de (Kumble and Kornberg 1995)

### 1.3. Técnicas de medición del polyP celular

El hecho que el polyP sea una molécula implicada en tantas y diversas funciones celulares, como más adelante se expone, ha llevado a los investigadores a desarrollar una serie de técnicas que permitan su cuantificación, caracterización y visualización a nivel celular.

Existen diferentes métodos para poder aislar polyP de bacterias o eucariotas unicelulares como la levadura. A lo largo de los años, la extracción y posterior purificación mediante ácido perclórico o mediante fenol-cloroformo han sido los métodos más utilizados (Figura 2). En el primer caso, el método de extracción mediante ácido perclórico se basa en dos premisas: la primera, la adición de ácido para una lisis celular y la liberación del material citoplasmático y, la segunda, el polyP es estable en un ambiente ácido a temperatura ambiente (Kulaev, Krasheninnikov, and Kokurina 1966).

Basándose en la característica estructural del polyP, un polianión intracelular con un esqueleto de fosfatos, el polyP puede actuar de manera similar a los ácidos nucleicos (ADN y ARN) en el proceso de extracción. Por este motivo, métodos de extracción utilizados para la purificación de ácidos nucleicos como la extracción con fenol/cloroformo o trizol, también se han adaptado para la extracción de polyP (Bru, Jiménez, et al. 2017; Werner, Amrhein, and Freimoser 2005).



**Figura 2. Esquema de los métodos de extracción del polyP celular.** Esquema detallado de los protocolos de extracción más utilizados en la extracción de polyP celular de bacterias y organismos eucariotas unicelulares mediante la adición de ácido (izquierda) y fenol/cloroformo (derecha).  $H_2ClO_4$ : ácido perclórico;  $NaClO_4$ : perclorato de sodio; NaOH: hidróxido de sodio;  $CH_3COONa$ : acetato de sodio.

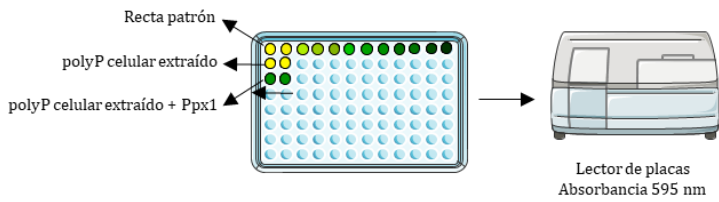
Para completar la extracción se han desarrollado una serie de técnicas que permiten visualizar y cuantificar el polyP



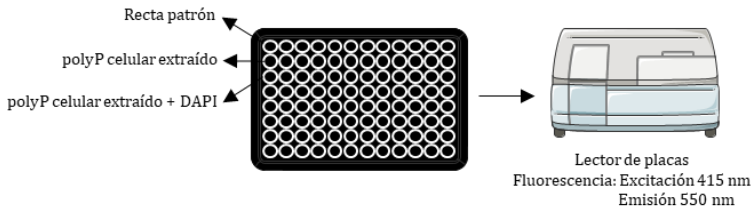
aislado. Por una parte, resulta muy interesante poder cuantificar a nivel bioquímico los niveles de polyP que una célula puede tener en unas determinadas condiciones experimentales. Es por ello por lo que aprovechando la actividad exopolifosfatasa de Ppx1 de levadura, que se encarga de degradar el polyP en monómeros de fosfato libres, podemos correlacionar los niveles de polyP de partida mediante la adición de molibdato y verde de malaquita los cuales detectan el fosfato libre de la reacción (Figura 3) (Baykov, Evtushenko, and Avaeva 1988).

Por otra parte, y teniendo en cuenta que el polyP celular puede verse modificado en cuanto a su longitud dependiente del estado metabólico de la célula, es esencial poder visualizar estos cambios en el laboratorio. La técnica más utilizada para poder valorar el estado de la molécula es la electroforesis en un gel de acrilamida y su posterior tinción con DAPI, molécula ampliamente utilizada para marcar el polyP debido a su afinidad hacia moléculas con carga negativa (Aschar-Sobbi et al. 2008; Omelon, Georgiou, and Habraken 2016). Este tipo de detección permite detectar polyP de un amplio rango de tamaños (2-450 residuos de  $P_i$ ). Sin embargo, el límite de detección de la técnica es suficiente para detectar el polyP de microorganismos o levaduras los cuales presentan niveles de polyP abundantes mientras que no es suficientemente sensible como para detectar el polyP de células de mamífero (Smith and Morrissey 2007).

## Detección con Ppx1 y verde de malaquita



## Detección mediante fluorescencia con DAPI



**Figura 3. Métodos de detección bioquímicos del polyP celular.** Esquema detallado de los protocolos de detección más utilizados para la cuantificación del polyP mediante verde de malaquita (arriba) y DAPI (abajo).

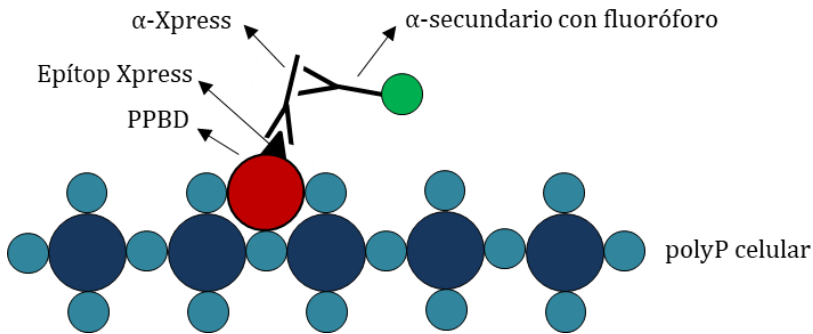
Cuando se quiere realizar el salto a células humanas, ya sea por sus bajos niveles o por el contexto celular, estas técnicas quedan en entredicho debido probablemente a su límite de detección. En la literatura, no existe un método bioquímico robusto que permita aislar y cuantificar polyP en células humanas de forma fiable y repetitiva, por tanto, se han desarrollado una serie de métodos alternativos en la visualización *in vivo*. Entre estos métodos podríamos destacar el marcaje con DAPI o el reconocimiento específico mediante un dominio presente en Ppx1 de *E. coli* denominado PPBD (Dominio de Unión a PolyP).

### *1.3.1. Métodos de visualización de polyP mediante microscopía*

Una de las opciones para la detección del polyP en células de mamífero es su visualización por microscopía mediante la tinción con DAPI. Este método ha sido ampliamente utilizado en la visualización de polyP a nivel celular en distintos tipos de organismos (Kulaev, IS; Vagabov, VM; Kulakovskaya 2004). Sin embargo, a pesar de ser un buen método para detectar fácilmente polyP celular purificado, a veces es difícil determinar las señales derivadas de la unión inespecífica del DAPI con otros compuestos celulares de elevada carga negativa o los complejos DAPI-DAPI, lo que deriva a no ser un compuesto adecuado para su uso en el análisis ultraestructural de localización de polyP (Omelson, Georgiou, and Habraken 2016).

Otro método utilizado para la visualización del polyP se basa en el reconocimiento específico de un dominio presente en Ppx de *E. coli* (Saito et al. 2005). Ppx, una enzima que hidroliza el polyP por los extremos, consta de dos dominios: el dominio N-terminal que contiene el centro catalítico de la enzima y el dominio C-terminal que contiene una secuencia de unión al polyP conocida como PPBD.

Para llevar a cabo este método se purifica la secuencia PPBD recombinante con un epítipo en el extremo N-terminal que será reconocido por el anticuerpo  $\alpha$ -Xpress mediante inmunofluorescencia indirecta de un cultivo celular (Figura 4).



**Figura 4. Ilustración esquemática de la técnica de detección mediante PPBD.** El dominio PPBD tiene conjugado un epítipo Xpress que es reconocido mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo primario ( $\alpha$ -Xpress) y un anticuerpo secundario unido a un fluoróforo. La molécula de polyP se representa mediante redondas azul oscuro (fosfatos (P)) y redondas azul celeste (oxígenos (O)).

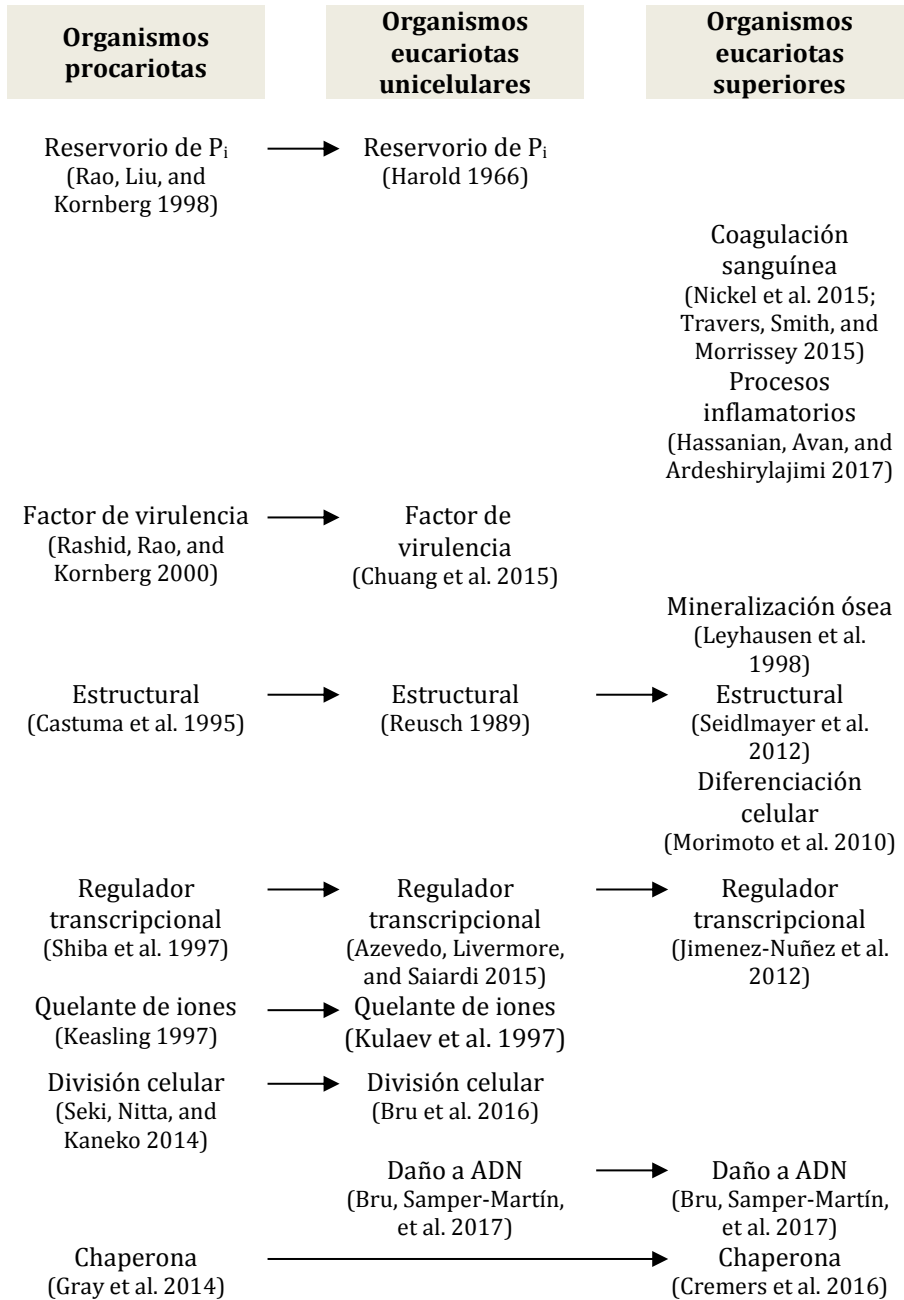
Este método permite una detección del polyP con una elevada sensibilidad y resolución. Sin embargo, una de las limitaciones de esta técnica es que la secuencia PPBD forma parte del dominio de unión a Ppx la cual presenta distintas afinidades de unión al polyP de diferentes tamaños. Se ha descrito que el PPBD tiene elevada afinidad por las moléculas de polyP de mayor tamaño y poca afinidad por las moléculas de menor tamaño, una característica del polyP celular en mamíferos. Sin embargo, esta limitación puede ser compensada cuando las moléculas de polyP de cadena corta se encuentran en una concentración elevada en puntos de condensación de polyP celular (Saito et al. 2005).

### 2. Funciones del polifosfato

El polyP, como se ha comentado anteriormente, es una molécula que se ha conservado en la evolución y se encuentra presente en todos los organismos vivos desde bacteria a organismos superiores. Este hecho hace que el polyP presente una gran variedad de funciones biológicas dependientes de su localización – organismo, tejido, localización subcelular – así como su tamaño molecular, su concentración celular o el estado fisiológico de la célula.

La mayoría de los estudios sobre el polyP se han centrado en su función en procariotas y eucariotas unicelulares donde se ha visto implicado en diferentes procesos celulares desde funciones metabólicas a funciones estructurales debido al conocimiento de las enzimas responsables de su metabolismo (Figura 5).

Algunas de estas funciones en procariotas que se encuentran conservadas en eucariotas unicelulares están relacionadas con su papel fisiológico en el crecimiento, desarrollo y adaptación a condiciones de estrés y deprivación de nutrientes como por ejemplo la utilización del polyP como fuente energética y sustituto del ATP, como reserva de  $P_i$ , como factor de virulencia o incluso como quelante de iones. La función del polyP como quelante de iones está estrictamente relacionada con la capacidad de detoxificación celular. La célula utiliza el polyP como polianion capaz de almacenar grandes cantidades de metales pesados favoreciendo así una disminución de la concentración de estos metales en la célula y, por consiguiente, una reducción del estrés oxidativo (Gray and Jakob 2015).



**Figura 5. Funciones del polyP celular en los distintos organismos.** Funciones del polyP celular en bacterias, organismos eucariotas unicelulares como las levaduras y en organismos superiores (humanos). Las flechas indican la conservación de la función entre organismos.

### *2.1. Organismos eucariotas unicelulares*

En organismos unicelulares, el polyP también desempeña un papel importante en procesos celulares cruciales como la progresión celular y la regulación transcripcional, ambas conservadas en organismos superiores.

Se ha descrito que el polyP tiene un papel importante en la replicación celular. Aparte de mantener las concentraciones intracelulares de  $P_i$  en respuesta a las fluctuaciones en la concentración de  $P_i$  extracelular, el polyP también proporciona suministro celular de elevadas cantidades de  $P_i$  cuando la célula lo requiere para la síntesis de deoxinucleótidos (dNTPs) previa a la duplicación del ADN (Bru et al. 2016). Existen otros procesos en los que una rápida síntesis de dNTPs es clave para la correcta progresión del ciclo celular y la supervivencia del organismo como por ejemplo la respuesta de daño a ADN. La degradación del polyP como fuente de  $P_i$  en respuesta de daño a ADN es crucial para la supervivencia celular tanto en organismos eucariotas unicelulares como en células de mamífero (Bru, Samper-Martín, et al. 2017).

En el caso de la regulación transcripcional, existen multitud de modificaciones post-transcripcionales que aportan mecanismos reguladores para la compleja red de funciones proteicas. El polyP sirve como fuente de  $P_i$  para una de las modificaciones post-transcripcionales conocida como polifosforilación la cual se encarga de añadir un pequeño polímero de residuos de  $P_i$  a una región rica en lisinas de una serie de proteínas diana regulando negativamente su función como por ejemplo la topoisomerasa 1 (Top1) (Azevedo et al. 2015).

### *2.2. Organismos eucariotas superiores*

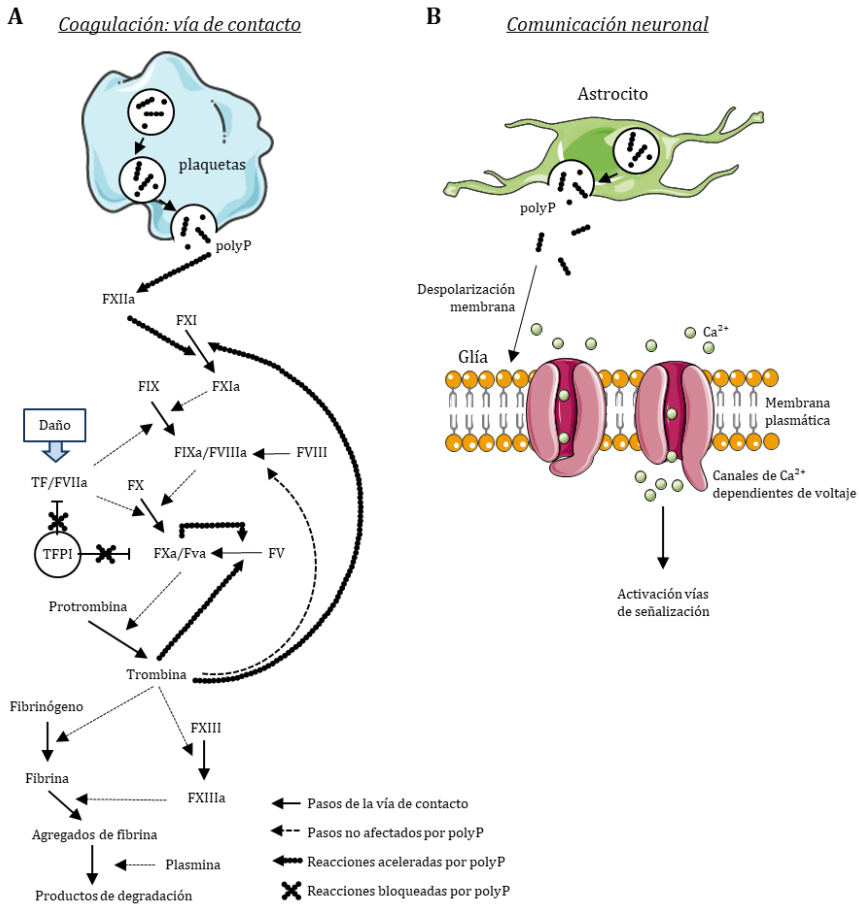
En mamíferos, la determinación de las funciones celulares en las que puede estar implicado el polyP es complicada debido a las limitaciones en las técnicas de detección y al desconocimiento de las enzimas responsables de su metabolismo. Aun así, se ha descrito que el polyP está implicado en la regulación del metabolismo energético en mitocondrias (Pavlov et al. 2010; Seidlmayer et al. 2018), en mineralización ósea (Leyhausen et al. 1998; Schröder et al. 2000) y en cáncer, relacionando niveles elevados de polyP con una mayor proliferación celular (Kulakovskaya, Zemskova, and Kulakovskaya 2018; Wang et al. 2003; Jimenez-Nuñez et al. 2012).

Una de las principales zonas de acumulación de polyP descritas en mamíferos son los gránulos densos de las plaquetas, estructuras similares a los acidocalcisomas que almacenan polyP, sobre todo de cadena larga, acompañado con cationes divalentes (Ruiz et al. 2004). Este polyP plaquetario es un potente modulador de la cascada de coagulación del plasma, con posibles funciones en la hemostasia, la trombosis y la inflamación (Müller et al. 2009; Nickel et al. 2015; Travers et al. 2015). Concretamente, el polyP de cadena larga es un potente desencadenante de la coagulación a través de la vía de contacto. Se ha descrito que las plaquetas humanas activadas secretan polyP con una distribución de tamaños muy estrecha (alrededor de 60-100 fosfatos de longitud) que acelera la activación del factor V, bloquea la actividad anticoagulante de la vía del factor tisular inhibidor, promueve la activación del factor XI por la trombina y hace que las fibras de fibrina sean más gruesas y resistentes a la fibrinólisis (Figura 6A) (Morrissey, Choi, and



Smith 2012; Smith et al. 2006). Por ello, el polyP ha recibido principal atención como posible agente terapéutico para controlar la hemorragia o como un factor de riesgo a tener en cuenta en situaciones de trombosis (Smith et al. 2012).

Otro tejido con niveles abundantes de polyP es el tejido cerebral (Kumble and Kornberg 1995). El polyP en cerebro se ha relacionado en procesos de comunicación neuronal y con la toxicidad de los procesos amiloidogénicos.



**Figura 6. Funciones del polyP celular en humanos.** A. Función del polyP celular en sangre. Esquema de la vía de contacto en coagulación sanguínea donde el polyP actúa como activador de la coagulación en distintos pasos. B. Función del polyP en cerebro. Dibujo del polyP como neuromodulador de señal entre los astrocitos y la glía.

En el caso de la comunicación neuronal, el polyP es secretado a la matriz extracelular por los astrocitos incrementando la excitabilidad de la membrana neuronal mediante la modulación del voltaje de los canales iónicos. Esta neuromodulación provoca una despolarización de la membrana y la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  promoviendo el influjo de

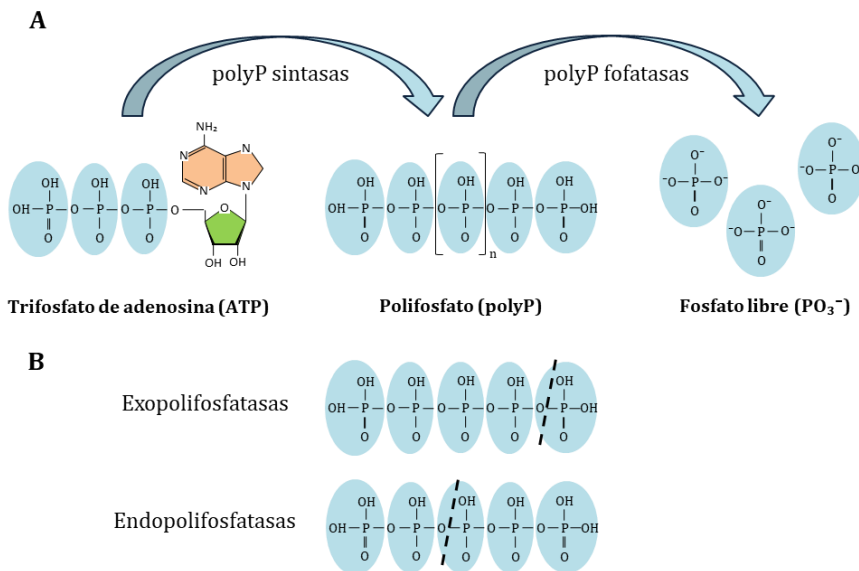
Ca<sup>2+</sup> a las células de la glía y actuando como gliotransmisor mediando la comunicación entre los astrocitos. Además de neuromodulador, el polyP también podría actuar directamente como neurotransmisor ya que se ha detectado niveles altos de polyP en las vesículas sinápticas que mediante despolarización de la membrana es secretado a la matriz extracelular para activar vías de señalización en las células receptoras (Figura 6B) (Holmström et al. 2013; Stotz et al. 2014).

Una de las funciones más importantes del polyP que además se ha conservado en la evolución es su función celular como chaperona, es decir, estabiliza las proteínas no plegadas manteniendo su estructura en una forma más estable que impida su agregación (Gray et al. 2014). En cerebro, esta función celular se ha relacionado con otros procesos celulares más complejos como los procesos amiloidogénicos involucrados en enfermedades como el Parkinson o el Alzheimer. En estos procesos, el polyP actuaría de chaperona generando un cambio estructural de los monómeros amiloidogénicos a fibrinas, una estructura más estable que impide la formación de los agregados tóxicos propios de la enfermedad (Cremers et al. 2016). Así pues, elevados niveles de polyP en cerebro estarían contribuyendo a la disminución de la toxicidad generada por la agregación de las placas amiloides.

### 3. Metabolismo del polyP

A fin de poder entender el metabolismo del polyP es imprescindible conocer las enzimas que está relacionadas con sus síntesis y degradación. Dichas enzimas han sido ampliamente descritas y caracterizadas para organismos procariotas y eucariotas unicelulares, sin embargo, aún se desconocen las enzimas responsables de su metabolismo en organismos superiores.

El metabolismo del polyP está compuesto por dos tipos de enzimas según la función que desempeñan: las enzimas quinasas o sintasas que se encargan de la síntesis de la molécula de polyP a partir de ATP libre y las enzimas polifosfatasas que se encargan de la degradación de la molécula (Figura 7A).



**Figura 7. Metabolismo del polyP.** A. El metabolismo del polyP consta de dos tipos de enzimas: polyP sintasas que se encargan de sintetizar polyP a partir de moléculas de ATP y las polyP fosfatasas que se encargan de su

hidrólisis a fosfato libre. **B.** Tipos de polyP fosfatasas: exopolifosfatasas y endopolifosfatasas.

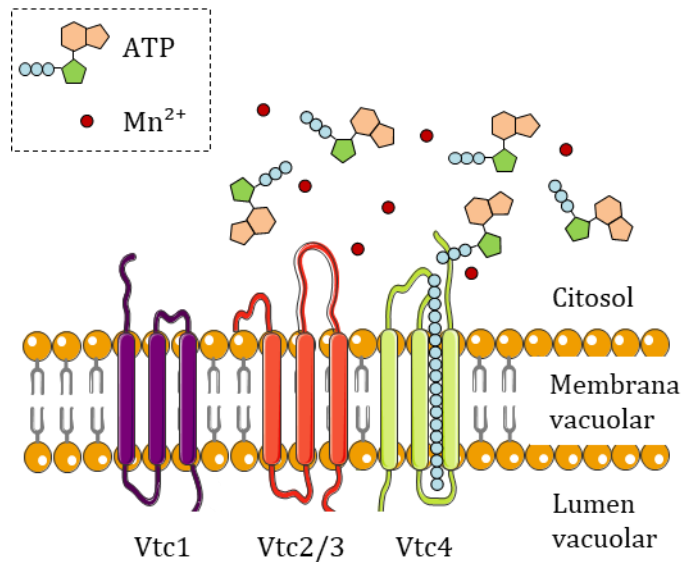
Dentro de las enzimas polifosfatasas hay que distinguir entre dos tipos de actividad: las enzimas con actividad exopolifosfatasa las cuales degradan la molécula por los extremos generando  $P_i$  como producto final de la reacción o bien las enzimas con actividad endopolifosfatasa las cuales hidrolizan la molécula por el interior generando moléculas de polyP más corto como producto de la reacción (Figura 7B).

### ***3.1. Enzimas con actividad sintasa***

La primera enzima con actividad sintasa descrita en la literatura es la polifosfato quinasa de bacterias (Ppk). Esta enzima sintetiza polyP de cadena larga utilizando como sustrato un polyP de corta cadena (3 residuos de  $P_i$ ) y ATP liberando ADP y polyP de cadena más larga como producto de reacción. Esta enzima es activa en presencia de  $Mg^{2+}$  y se inhibe con fluoruro sódico (NaF) (Kornberg 1956).

En levaduras, las enzimas responsables de la síntesis de polifosfato forman un complejo hetero-oligomérico conocido como el complejo VTC situado mayoritariamente en la membrana vacuolar y en menor presencia en la membrana plasmática. Se han descrito dos tipos de complejo VTC: el complejo Vtc1/2/4 y el complejo Vtc1/3/4. En ambos complejos, Vtc1, Vtc2, Vtc3 y Vtc4 son proteínas con tres dominios transmembrana y largos segmentos citoplasmáticos adicionales, aunque solo Vtc4 posee el centro catalítico del complejo (Hothorn et al. 2009). En este complejo, las subunidades Vtc1/4 son esenciales para la función sintasa ya

que cepas de levadura en las que se ha delecionado genéticamente la subunidad Vtc1 o Vtc4 presentan una reducción o la depleción de los niveles de polyP respectivamente, mientras que la deleción de las subunidades Vtc2/3 individualmente no generan ningún efecto en los niveles de polyP sugiriendo una función de soporte en el complejo (Ogawa, DeRisi, and Brown 2000). En este complejo, el dominio catalítico de Vtc4 se encuentra encarado en la región citoplasmática por lo que la síntesis de polyP se produce desde el citoplasma hacia el lumen de la vacuola generando una translocación del polyP a través de los dominios transmembrana. El complejo VTC, lleva a cabo la actividad sintasa a partir de moléculas de ATP en presencia del ion  $Mn^{2+}$  aunque presenta actividad en presencia de otros iones  $Mn^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+} > Mg^{2+} > Fe^{2+} > Ni^{2+}$  (Figura 8) (Gerasimaité et al. 2014).

*Síntesis de polyP en levaduras*

**Figura 8. Síntesis de polyP en levaduras.** Esquema de la síntesis de polyP mediante el complejo VTC a partir de ATP citosólico en presencia de Mn<sup>2+</sup>.

Análisis de alineamientos de las secuencias genómicas de levadura y algunos organismos superiores revelan que no hay homología de secuencia para ninguna subunidad del complejo VTC sugiriendo que el complejo no se encuentra conservado en mamíferos por lo que aún no se ha determinado y aislado la enzima o el complejo responsable de la síntesis de polyP en humanos (Azevedo and Saiardi 2014).

### *3.2. Enzimas con actividad polifosfatasa*

En cuanto a la degradación del polyP se han descrito diversas enzimas con actividad polifosfatasa en diferentes compartimentos celulares como la membrana celular, la mitocondria, el núcleo, el citosol y la vacuola sobre todo en procariotas y eucariotas unicelulares (L P Lichko et al. 2003; Lichko et al. 2006; Lidia P Lichko, Kulakovskaya, and Kulaev 2003; Wurst et al. 1995). Estas enzimas han sido caracterizadas en cuanto a su localización celular, peso molecular, especificidad del ion, afinidad por los sustratos y su sensibilidad a los distintos inhibidores.

#### *3.2.1 Enzimas con actividad exopolifosfatasa*

En bacterias, se han descrito varias enzimas con actividad exopolifosfatasa que están relacionadas con la metabolismo energético del ATP y la glucólisis. La Ppk, polyP quinasa descrita anteriormente, puede participar en la degradación del polyP ya que se trata de una reacción reversible que fluctúa en función de los niveles de ATP/ADP celulares (Kornberg, 1957). Otra enzima con actividad exopolifosfatasa es la polyP-adenosina monofosfato fosfotransferasa (Pap) la cual utiliza el polyP como sustrato para fosforilar la molécula de adenosina-monofosfatasa (AMP) para dar lugar a adenosina-difosfatasa (ADP) en presencia de  $Mg^{2+}$ , aunque la  $K_M$  para el AMP es muy alta poniendo en cuestión su posible papel fisiológico (Szymona and Kulesza, 1962). En relación con la vía glucolítica se han descrito dos enzimas con actividad exopolifosfatasa: la polyP glucoquinasa (Ppgk) y la polyP fructoquinasa (Ppfk) (Tabla IV). Ambas enzimas utilizan el polyP como sustrato para fosforilar dos compuestos que forman parte de la vía glucolítica, glucosa y



fructosa respectivamente, en presencia de  $Mg^{2+}$ . Estas enzimas quinasas tienen actividad exopolifosfatasa ya que utilizan el polyP con la finalidad de fosforilar otros sustratos celulares (Szymona and Szumilo 1966; Szymona and Widomski 1974).

Enzimas	Organismo	Ion	Reacción
Ppk	Bacteria	$Mg^{2+}$	$ATP + (polyP)_n \longleftrightarrow ADP + (polyP)_{n+1}$
Pap	Bacteria	$Mg^{2+}$	$(polyP)_n + AMP \longrightarrow ADP + (polyP)_{n-1}$
Ppgk	Bacteria	$Mg^{2+}$	$(polyP)_n + \text{glucose} \longrightarrow G6P + (polyP)_{n-1}$
Ppfk	Bacteria	$Mg^{2+}$	$(polyP)_n + \text{fructose} \longrightarrow F6P + (polyP)_{n-1}$
Ppx	Bacteria	$Mg^{2+}$	$(polyP)_n \longrightarrow (polyP)_{n-1}$
Ppx1	Levadura	$Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}$	$(polyP)_n \longrightarrow (polyP)_{n-1}$ 500 residuos $P_i/s$
h-prune	Mamífero	$Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}$	$(polyP)_n \longrightarrow (polyP)_{n-1}$ 3-4 residuos $P_i /s$
AP	Mamífero	---	$(polyP)_n \longrightarrow (polyP)_{n-1}$ 1-2 residuos $P_i /s$

**Tabla IV. Exopolifosfatasas de distintos organismos.** Se muestran las distintas enzimas con actividad exopolifosfatasa en bacterias, levaduras y mamíferos (humanos), el ion divalente y la reacción que se lleva a cabo.

Hay enzimas que catalizan la hidrólisis de polyP para dar lugar a un incremento en la concentración de  $P_i$  celular como las exopolifosfatasas (Ppx) (Tabla IV). En levaduras, Ppx1 es una exopolifosfatasa *in vivo* dependiente de  $Mg^{2+}$  localizada en el citosol que se encarga de hidrolizar el polyP (de 3 a 250 residuos de  $P_i$ ) por los extremos de la molécula para liberar  $P_i$ . A pesar de ser una enzima con elevada procesividad (500  $P_i/s$  a  $37^\circ C$ ), la delección genética de Ppx1 no genera una variación en los niveles de polyP celulares. Puesto que elevadas concentraciones de polyP en el citosol generan toxicidad, éste debe ser almacenado en la vacuola, por lo que Ppx1 en el citoplasma puede actuar como un mecanismo efectivo de

protección para la célula frente a esta toxicidad (Gerasimaitè et al. 2014). Otra característica de Ppx1 es su incapacidad de degradar pirofosfato ( $PP_i$ ), ATP y trifosfato cíclico poniendo de manifiesto su especificidad por el polyP, sobre todo por las moléculas de polyP de cadena larga. Además, aunque Ppx1 es una enzima dependiente de  $Mg^{2+}$  también puede realizar la actividad en presencia de  $Mn^{2+}$  y  $Co^{2+}$  (Wurst and Kornberg 1994; Wurst et al. 1995).

En mamíferos, se han descrito algunas enzimas que *in vitro* presentan una baja actividad exopolifosfatasa como la exopolifosfatasa humana 1 (h-prune) y la fosfatasa alcalina (AP) (Tabla IV). La enzima h-prune se encontró por homología de secuencia a Ppx1 las cuales comparten un 26.8% de identidad. Ensayos de actividad exopolifosfatasa de h-prune *in vitro* muestran que h-prune es capaz de hidrolizar moléculas de polyP de corta cadena (3-5 residuos de  $P_i$ ) en presencia de los iones  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Co^{2+}$ , sin embargo, no tiene capacidad de hidrolizar polyP de cadena larga (>25 residuos de  $P_i$ ),  $PP_i$  ni ATP, los cuales también pueden actuar como inhibidores de la reacción (Tammenkoski et al. 2008). A pesar de la homología entre Ppx1 y h-prune, su actividad y procesividad están lejos de las observadas en Ppx1 y, además, no se ha podido demostrar que h-prune actúe como una exopolifosfatasa *in vivo* en células humanas.

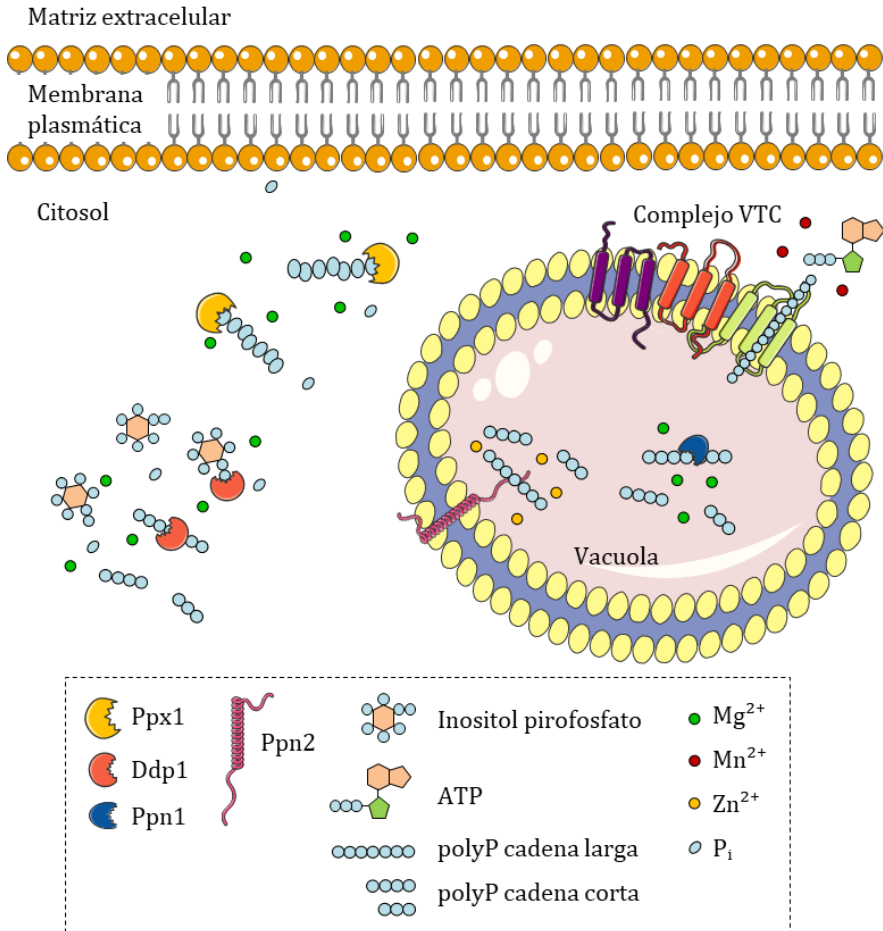
Por otra parte, la AP interviene en procesos de formación y mineralización ósea, absorción y transporte de  $P_i$  y tienen la capacidad de degradar  $PP_i$  *in vitro*, por ello, ha sido postulada como la enzima con actividad exopolifosfatasa en mamíferos. Ensayos de actividad exopolifosfatasa de AP *in vitro* muestran que AP solo es capaz de hidrolizar moléculas de polyP en

condiciones de alcalinidad ( $\text{pH} > 9$ ) disminuyendo considerablemente su actividad cuanto mayor es la longitud de la molécula de PolyP. Además, su actividad exopolifosfatasa no es dependiente de ningún ion divalente, incluso llegan a inhibir la actividad. Sus condiciones extremas de ensayo y su baja actividad *in vitro* hacen que aún no se haya demostrado su actividad *in vivo* (Lorenz and Schröder 2001).

### 3.2.2 *Enzimas con actividad endopolifosfatasa*

En levaduras, se han descrito tres enzimas con actividad endopolifosfatasa: la endopolifosfatasa-1 (Ppn1), la endopolifosfatasa-2 (Ppn2) y la diadenosina y difosfoinositol polifosfato fosfohidrolasa-1 (Ddp1). Las dos primeras se localizan en la vacuola de la levadura, lugar donde hay una gran cantidad de polyP almacenada y, la última, se localiza en el citosol igual que la exopolifosfatasa Ppx1 (Figura 9) (Gerasimaité and Mayer 2017; Huh et al. 2003; Lonetti et al. 2011; Sethuraman, Rao, and Kornberg 2001).

*Síntesis y degradación de polyP en levaduras*



**Figura 9. Síntesis y degradación del polyP celular.** Esquema de una levadura con las principales enzimas del metabolismo del polyP. En el citosol se ubican las enzimas Ppx1, una exopolifosfatasa, y Ddp1, una inositol pirofosfatasa que también actúa como endopolifosfatasa, en todos los casos, en presencia de  $Mg^{2+}$ . En la vacuola, se ubica, por un lado, el complejo VTC que se encarga de la síntesis del polyP en presencia de  $Mn^{2+}$  a partir de ATP y, por otro lado, las enzimas Ppn1 y Ppn2 con actividad endopolifosfatasa en presencia de  $Mg^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  respectivamente.

Ppn1 es una enzima vacuolar que, mediante activación proteolítica, hidroliza con elevada afinidad las moléculas de

polyP de cadena larga generando un producto intermedio de moléculas de polyP de cadena más corta (45-60 residuos  $P_i$ ) hasta su completa degradación dando como producto final moléculas de polyP de 3 residuos de  $P_i$  y pequeñas cantidades de  $P_i$  (Shi and Kornberg 2005). Esta dualidad de Ppn1 de degradar el polyP generando los productos de reacción específicos de cada tipo de actividad polifosfatasa es específica del ion presente en la reacción, es decir, Ppn1 realiza una actividad endopolifosfatasa dependiente de  $Mg^{2+}$  mientras que la actividad exopolifosfatasa es dependiente de  $Co^{2+}$  (Andreeva et al. 2015). Por otro lado, Ppn2 es una enzima vacuolar que presenta exclusivamente actividad endopolifosfatasa dependiente de  $Zn^{2+}$ . Una característica de la actividad endopolifosfatasa de Ppn2 es que su depleción celular no varía los niveles de polyP vacuolar, sin embargo, provoca una alteración en el tamaño de las moléculas (de 3-300 residuos de  $P_i$  a  $>300$  residuos de  $P_i$ ) independientemente de estado metabólico de las célula (Gerasimaité and Mayer 2017).

Ddp1 se localiza principalmente en el citosol y el núcleo. Inicialmente, Ddp1 se caracteriza como una enzima con actividad fosfatasa de inositoles pirofosfato y nucleósidos-fosfato (Cartwright and McLennan 1999; Safrany, Ingram, et al. 1999). La existencia de una relación entre el metabolismo de los inositol pirofosfato y la síntesis de polyP junto con la presencia de actividad polifosfatasa en el citosol de una cepa *ppx1Δppn1Δ* postuló a Ddp1 como una posible polifosfatasa en levaduras (Auesukaree et al. 2005; Lichko et al. 2008). Ensayos de actividad endopolifosfatasa *in vitro* muestran que Ddp1 tiene actividad endopolifosfatasa dependiente de  $Mg^{2+}$  y  $Co^{2+}$  (Lonetti et al. 2011).

En mamíferos, se ha descrito actividad endopolifosfatasa en extracto de cerebro de rata poniendo de manifiesto la existencia de enzimas responsables de la degradación del polyP, aunque nunca se ha llegado a aislar la enzima responsable de dicha actividad (Kumble and Kornberg 1996). Además, hay un grupo de enzimas pertenecientes a la familia NUDIX con actividad fosfatasa de inositoles pirofosfato y nucleósidos-fosfato que presentan homología de secuencia con Ddp1. En *Trypanosoma*, se ha descrito que estas enzimas, TbNH2 y TbNH4, presentan actividad endopolifosfatasa en presencia de  $Mg^{2+}$  sugiriendo una conservación de las enzimas y su función en mamíferos (Cordeiro et al. 2019). Sin embargo, ensayos *in vitro* de estas enzimas humanas, Dipp1/2/3, presentan una leve actividad endopolifosfatasa dependiente de  $Mg^{2+}$  en condiciones poco fisiológicas de pH (pH>9) sugiriendo que no ha habido una conservación de la función en humanos (Lonetti et al. 2011).

A pesar de la caracterización *in vitro* de cinco enzimas postuladas como exopolifosfatasas y endopolifosfatasas de mamífero, las condiciones extremas de ensayo junto con la ausencia de experimentos que demuestren la actividad polifosfatasa y su relevancia fisiológica *in vivo* sugiere que aún no se han hallado las enzimas responsables de la degradación del polyP ni su papel fisiológico dentro del metabolismo del polyP en mamíferos.

## 4. Familia NUDIX

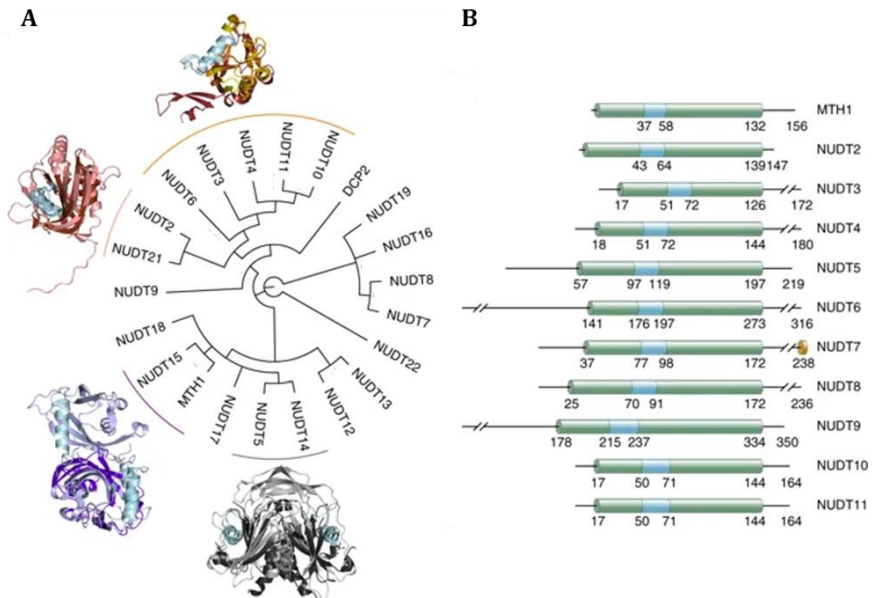
### 4.1. Estructura, función y sustratos

Las enzimas hidrolasas Nucleosido Difosfato unidos a cualquier grupo X (NUDIX) son una superfamilia de enzimas conservada a lo largo de la evolución que se encuentra presente en todos los organismos vivos. Todas las enzimas de la familia NUDIX tienen un dominio catalítico consenso conocido como caja NUDIX o motivo MutT (Gx5Ex5[UA]<sub>x</sub>REx2EE<sub>x</sub>GU), donde U es un aminoácido alifático (L, V o I) y X cualquier aminoácido, que se encuentra en una estructura helicoidal (Figura 10A y B). Dentro de esta secuencia consenso, los aminoácidos glutámicos, REx2EE, juegan un papel importante en la unión de cationes divalentes esenciales además de alojar el centro catalítico de la enzima.

En la mayoría de las NUDIX, es probable que Mg<sup>2+</sup> sea el ion más relevante fisiológicamente, aunque se ha visto que pueden utilizar otros iones divalentes como el Mn<sup>2+</sup> o el Co<sup>2+</sup>. Numerosos estudios de mutagénesis dirigida en la secuencia consenso han definido la importancia de cada uno de los aminoácidos individualmente para la hidrólisis del sustrato, aunque existe una variación en la determinación del lugar de unión del sustrato, en el aminoácido con la actividad catalítica (generalmente un glutámico (E)) y en el número de iones divalentes involucrados en la reacción (Mildvan et al. 2005). La especificidad del sustrato se determina mediante secuencias y dominios en otras partes de la estructura.

Las NUDIX son típicamente proteínas pequeñas (16–21 kDa), a excepción de algunas más grandes que pueden contener

otros dominios. Muchas desempeñan la hidrólisis en condiciones óptimas a pH alcalino y están fuertemente inhibidas por fluoruro (F<sup>-</sup>) (Mildvan et al. 2005).



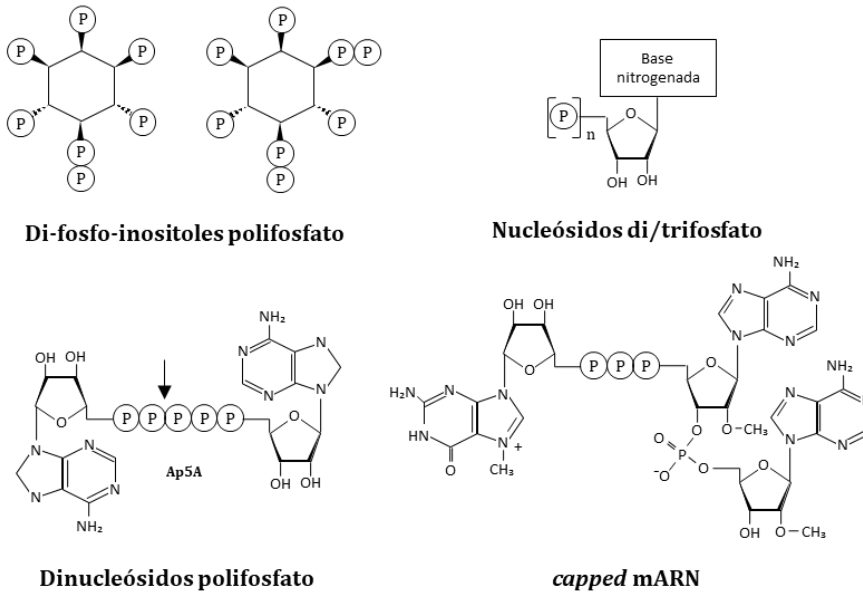
**Figura 10. Análisis secuencial y estructural de las NUDIX humanas. A.** Árbol filogenético consenso del análisis de la secuencia aminoacídica completa de las proteínas NUDIX humanas. En el exterior del árbol filogenético, se muestran las estructuras terciarias consenso dentro de los grupos de proteínas NUDIX. **B.** Representación gráfica de la motivo consenso MutT de la primera mitad de proteínas NUDIX. Los datos y la figura se han extraído de Carreras-Puigvert et al. 2017.

La adaptación estructural y catalítica de estas enzimas para la unión e hidrólisis de una amplia gama de nucleósidos y otros pirofosfatos pone de manifiesto una gran diversidad de funciones lo que hace difícil encontrar una función general para esta familia de proteínas.



Una de las principales funciones con las que se ha relacionado la actividad hidrolasa de algunas de estas enzimas es la detoxificación celular, sobre todo en estrés oxidativo, eliminando metabolitos tóxicos y manteniendo el control de distintos intermediarios de las vías metabólicas principales (Bessman, Frick, and O'Handley 1996; Kennedy, Pass, and Mitchell 2003). Además de esta función, algunas de las NUDIX también se han relacionado con otras funciones celulares como la homeostasis celular, el procesamiento del ARN mensajero (mARN), la regulación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , la activación de enzimas de algunas vías metabólicas y la regulación de la vía de señalización ERK (Fisher et al. 2002; McLennan 2006; Zhang et al. 2018).

Como su nombre sugiere, las enzimas que pertenecen a esta familia se encargan de hidrolizar un amplio rango de pirofosfatos orgánicos incluyendo nucleósidos di/trifosfato, dinucleósidos y difosfoinositoles polifosfato, nucleótidos y *capped*-mARNs con diferentes grados de especificidad de sustrato (Figura 11). Algunos miembros de la familia también tienen capacidad para hidrolizar más de un sustrato dependiendo de las condiciones del ensayo y el estado fisiológico de la célula (Bessman et al. 1996).



**Figura 11. Sustratos de las enzimas de la familia NUDIX.** Los sustratos engloban desde di-fosfo-inositoles polifosfato, dinucleósidos polifosfato, nucleósidos, nucleósidos di/trifosfato y *capped*-mARNs. Las redondas con (P) representan grupos fosfato ( $PO_3$ ).

Un análisis filogenético de las secuencias íntegras de las proteínas o bien de sus dominios conservados permitió dividir la familia en tres grandes bloques y una proteína aislada (Nudt22) según sus sustratos y funciones. Sin embargo, solo uno de los bloques presenta una relación entre la secuencia o el dominio proteico y la especificidad de sustrato conocida como subfamilia difosfoinositol pirofosfato polifosfatasa (DIPP) (Carreras-Puigvert et al. 2017).

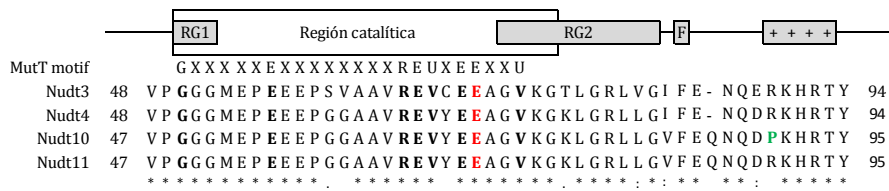
### 4.2. *Subfamilia DIPP*

Las enzimas difosfoinositol pirofosfato polifosfatasa (DIPP) son un grupo de enzimas dentro de la familia NUDIX que presentan elevada similitud de secuencia y comparten especificidad de sustrato. Puesto que pertenecen a la familia NUDIX, todas las DIPPs poseen el motivo MutT, mencionado anteriormente que, junto con su capacidad de metabolizar un amplio rango de nucleósidos y difosfoinositoles hace que se sitúe su resurgimiento en una etapa evolutiva temprana. Prueba de ello, es que se han encontrado DIPPs presentes en diferentes organismos desde microorganismos como *Phreatamoeba* y *Entamoeba* (Martin et al. 2000) pasando por diferentes tipos de hongos (Stephens et al. 1993), diferentes cepas de levaduras (Ali et al. 1995; Safrany, Ingram, et al. 1999), plantas (Brearley and Hanke 1996) hasta mamíferos (Shears et al. 1995).

#### 4.2.1. *Estructura de la familia DIPP*

En la familia DIPP se distinguen 4 miembros conocidos como Nudt3 (Dipp1), Nudt4 (Dipp2), Nudt10 y Nudt11 (Dipp3 $\alpha/\beta$ ). El alineamiento múltiple de secuencias de estas cuatro DIPPs de mamífero con dos DIPPs de levaduras, Ddp1 (*Saccharomyces cerevisiae*) y Aps1 (*Schizosaccharomyces pombe*), que comparten la misma habilidad de hidrólisis de diadenosina-polifosfatos y di-fosfo-inositol-polifosfatos permite obtener regiones o aminoácidos que están implicadas en la actividad de estas proteínas. Entre estas regiones se destaca la secuencia consenso MutT y pequeñas secuencias que flanquean este dominio como posibles aminoácidos candidatos a ser responsables de la capacidad catalítica de las DIPPs. El estudio de estas regiones permite destacar cuatro elementos

característicos: (i) grupo de residuos glutámicos altamente conservados, (ii) regiones ricas en glicina que flanquean el dominio MutT, (iii) un residuo de fenilalanina conservado en las cuatro DIPPs y, por último, (iv) una región de aminoácidos con elevado potencial positivo donde el residuo de histidina es el más conservado (Figura 11) (Frick et al. 1995; Yang, Safrany, and Shears 1999).



**Figura 12. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las DIPP.** Alineamiento Clustalw del motivo MutT y las regiones flanqueantes en N-terminal y C-terminal de las proteínas DIPP. Las letras en negrita representan los aminoácidos idénticos al motivo MutT. Los guiones hacen referencia a los espacios introducidos para un mejor alineamiento. Los residuos en rojo indican el aminoácido catalítico y en verde una prolina responsable de una disminución de actividad en Nudt10. RG1 y RG2 son regiones ricas en glicinas, F es un aminoácido fenilalanina altamente conservado en las DIPPs y (++++) indica una región rica en aminoácidos con carga positiva. Finalmente, (\*) indica aminoácidos idénticos, (.) aminoácidos pertenecientes al mismo grupo según la carga eléctrica del grupo radical y (:) aminoácidos pertenecientes al mismo grupo según el grupo radical.

El análisis de los cuatro elementos característicos de la secuencia de las DIPP mediante mutagénesis dirigida revela que los residuos glutámicos tienen un papel importante en la actividad hidrolítica de las DIPP participando tanto en la unión ion-sustrato como en la catálisis. Sin embargo, solo dos de los residuos (E66 y E70) son esenciales para la hidrólisis de ambos sustratos confirmando que solo tienen un centro activo, hecho esperado debido al tamaño de las proteínas (18-21kDa). Los

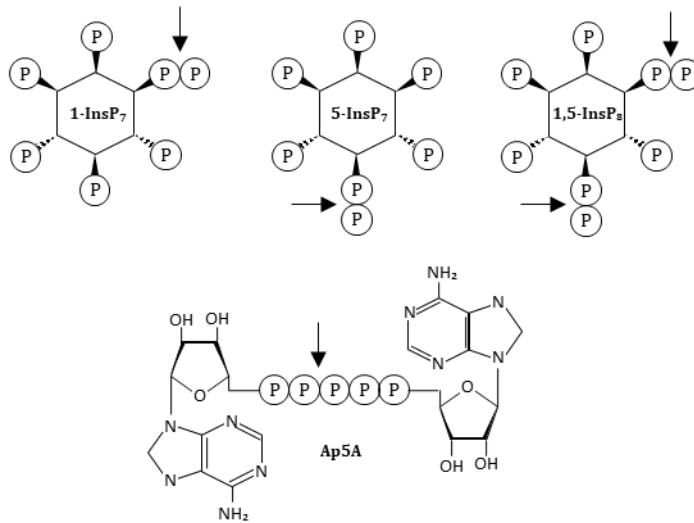
residuos de fenilalanina (F) e histidina (H) en la región de aminoácidos con carga positiva tienen un papel importante en asegurar el correcto posicionamiento del sustrato ya que la mutación de estos residuos genera una disminución del 75% de la actividad de las DIPP en el caso de los dinucleósidos-polifosfato y un 35% en los di-fosfo-inositoles-polifosfato (Lin et al. 1996, 1997; Yang et al. 1999). Finalmente, se han descrito dos regiones ricas en glicinas (GR1 y GR2) compuestas por un total de trece de las cuales se han conservado cuatro de la región GR2 formando una secuencia consenso (GX<sub>2</sub>GX<sub>6</sub>G). Se ha visto mediante análisis de la estructura tridimensional de las DIPP que estas glicinas forman parte de los bucles que flanquean la hélice  $\alpha$  que contienen la secuencia MutT. Estructuralmente, estas regiones se encargan de formar parte del esqueleto de las DIPP del cual depende la estructura del centro activo. Además de la función estructural, existen circunstancias en las que estos bucles forman un túnel de unión a sustrato donde las glicinas participan directamente y pueden modular la entrada del sustrato modificando la actividad catalítica de las DIPP (Bossemeyer 1994; Yang et al. 1999).

Hasta ahora, se han encontrado varios aminoácidos que tienen un papel importante en la actividad de las DIPP modulando la interacción de los distintos sustratos en el centro activo. Sin embargo, todavía no se ha encontrado ninguna región o aminoácidos que permitan una discriminación total de la actividad dual y la especificidad de las DIPP frente a los dos tipos de sustrato.

### 4.2.2. *Sustratos de la familia DIPP*

Las DIPPs son capaces de degradar dos compuestos diferentes: (i) los di-fosfo-inositoles polifosfato (InsP) y los polifosfatos de diadenosina ( $A_{p_n}A$ ) (Figura 13).

La hidrólisis de los InsP (1-PP-InsP<sub>5</sub>, 5-PP-InsP<sub>5</sub> y PP<sub>2</sub>-InsP<sub>4</sub>) por las DIPPs es dependiente de la presencia de Mg<sup>2+</sup> mostrando la actividad máxima a una concentración de 1-2mM Mg<sup>2+</sup>. Los distintos InsP se encuentran a una concentración celular similar del orden de 0,5-2μM siendo condiciones saturantes para las DIPP. Según los valores de las constantes cinéticas, las DIPP presentan una constante de afinidad similar para los distintos tipos de sustratos, aunque la constante catalítica es mayor en 1-PP-InsP<sub>5</sub> y 5-PP-InsP<sub>5</sub> que en PP<sub>2</sub>-InsP<sub>4</sub>, lo que sugiere que la tasa de metabolismo de los distintos InsP *in vivo* depende del suministro de cada uno de ellos por la célula. Se han descrito distintos inhibidores de la actividad hidrolasa de InsP: (i) el F<sup>-</sup>, actuando como un inhibidor competitivo, (ii) InsP<sub>6</sub> realizando una inhibición por acumulación del producto de la reacción y (iii) otros compuestos involucrados en señalización como el cAMP (Kilari et al. 2013; Safrany and Shears 1998).



**Figura 13. Sustratos de las enzimas de la familia DIPP.** Los sustratos de las DIPP comprenden los di-fosfo-inositoles pirofosfato y los dinucleósidos polifosfato. Las flechas indican los enlaces hidrolizables por las DIPP.

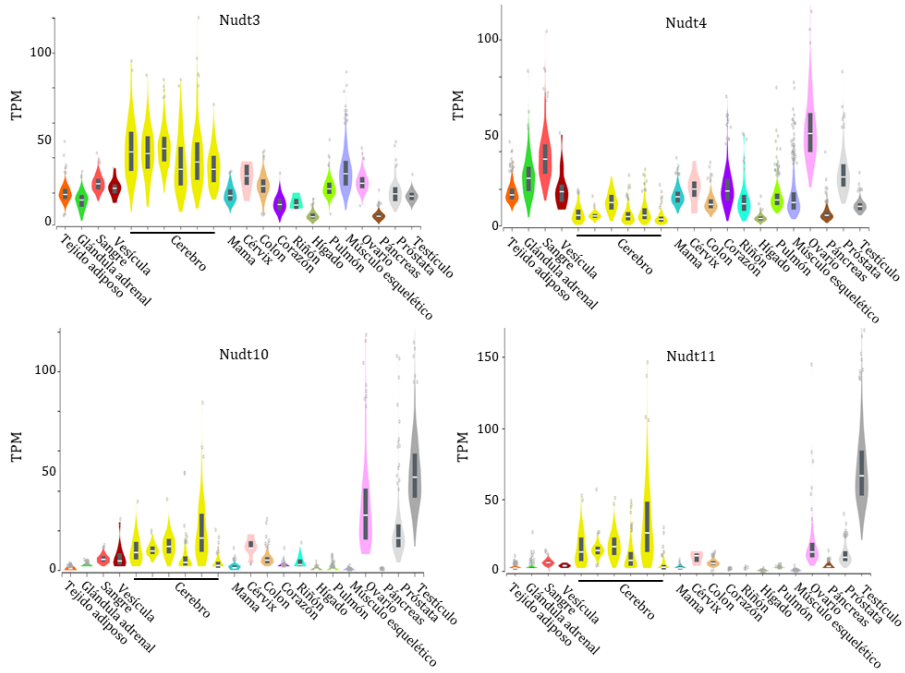
Otro de los sustratos de las DIPPs son los Ap<sub>n</sub>A (Ap<sub>5</sub>A y Ap<sub>6</sub>A). Los niveles celulares de estos compuestos varían entre 10nM y 5 μM y se han encontrado en la fracción soluble de células eucariotas y procariotas. En mamífero, cabe destacar su presencia en los gránulos densos de plaquetas y ciertas vesículas sinápticas las cuales pueden ser secretados y unirse a los receptores de células que causan un variedad de respuestas fisiológicas. La hidrólisis de los Ap<sub>n</sub>A es dependiente de la presencia de Mn<sup>2+</sup> mostrando un máximo de actividad a una concentración entre 1-2 mM Mn<sup>2+</sup>. Una característica de esta actividad de las DIPPs es que el pH óptimo para la hidrólisis de los Ap<sub>n</sub>A es a pH alcalino (pH>8) (Safrany, Caffrey, et al. 1999). Además, DIPP1 (Nudt3) también tiene capacidad de hidrolizar *capped*-mARNs en presencia de Mn<sup>2+</sup> lo que le otorga una función decapping de mARNs interviniendo en la modulación de la migración celular (Grudzien-Nogalska et al. 2016).

### *4.2.3. Patrón de expresión de la familia DIPP*

Como se ha comentado anteriormente, todas las enzimas de la familia DIPP tienen capacidad de hidrolizar los mismos sustratos con diferente procesividad. Otra característica diferencial de estas enzimas es su patrón de expresión en función del tejido.

Nudt3 se expresa en todos los tejidos presentando mayor expresión en cerebro y en músculo esquelético. Nudt4 se expresa nuevamente en todos los tejidos, sin embargo, a diferencia de Dipp1, presenta su menor expresión en cerebro y la mayor en ovarios, próstata, sangre y la glándula adrenal. Finalmente, Nudt10 y Nudt11, además de ser prácticamente idénticas por secuencia también presentan un patrón de expresión muy similar. Ambas se expresan en niveles muy bajos en todos los tejidos a excepción del cerebro y los órganos reproductores donde presentan niveles elevados de expresión (Figura 14).





**Figura 14. Patrón de expresión de las enzimas DIPPs según el tejido.** Los datos se han extraído de la base de datos GTEx y los niveles de expresión se miden en TPM (Transcritos por millón), es decir, el valor de expresión de cada DIPP se normaliza por cada millón de moléculas de RNA en la muestra de RNA-seq.

## 5. Importancia del $Zn^{2+}$ en el organismo

El zinc es uno de los elementos más abundantes en la corteza terrestre y un nutriente esencial para el crecimiento de los organismos vivos, debido a su falta de almacenamiento en los órganos principales. Normalmente, los mamíferos tienen entre 2-3 gramos de  $Zn^{2+}$  total a una concentración de 15-16  $\mu M$ , de los cuales el 0.1% se intercambia diariamente (Maret and Sandstead 2006).

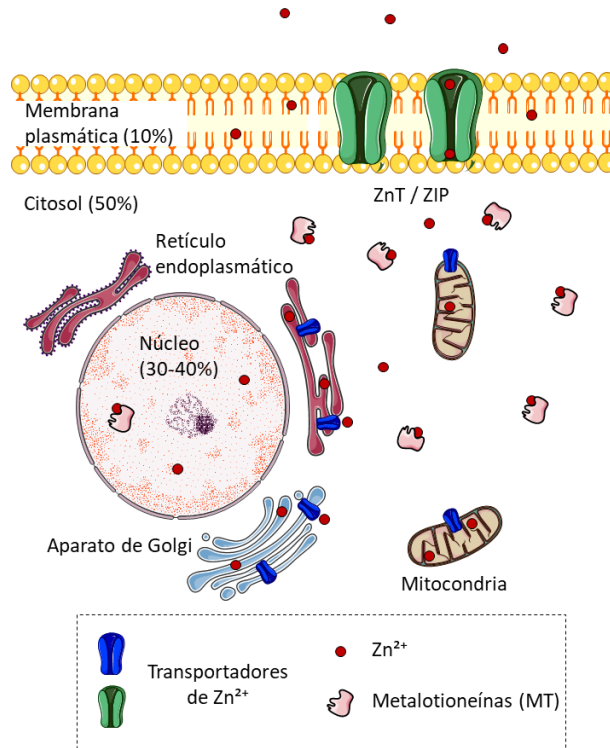
### 5.1. *Distribución de $Zn^{2+}$ celular*

El zinc celular se distribuye en los distintos compartimentos celulares siendo más abundante en el citoplasma (50%), seguido del núcleo (30-40%) y, finalmente, en la membrana plasmática (10%) (Vallee and Falchuk 1993). Además, puede clasificarse en tres formas, dependiendo de su comportamiento molecular: primero, el zinc inmóvil no reactivo el cual se encuentra unido predominantemente a proteínas formando parte de su estructura a fin de mantener su concentración celular (54%); segundo, el zinc móvil reactivo, el cual se une predominantemente a proteínas para llevar a cabo una reacción o bien para formar parte de una cascada de señalización celular (44.7%); y, tercero, el zinc libre (<1%, 5pM-1nM) (Lee et al. 2015).

En cuanto a la funcionalidad del  $Zn^{2+}$  en la célula, un análisis metaloproteómico en procariotas revela que la mayoría de las proteínas dependientes de zinc se utilizan para llevar a cabo catálisis enzimáticas (80%) mientras que en eucariotas presentan otra distribución en las funciones: reacciones

catalíticas (47%), transcripción de ADN (44%), transporte celular (5%) y señalización celular (3%)(Lee et al. 2015).

El zinc, siendo un elemento esencial para los organismos, puede ser perjudicial cuando su homeostasis se encuentra alterada. Un aumento de su concentración intracelular puede generar toxicidad ( $>9\text{nM}$ ) mientras que una disminución de su concentración puede comprometer la función de muchas proteínas ( $<10\text{pM}$ ). Así pues, la célula regula estrictamente los niveles de  $\text{Zn}^{2+}$  libre intracelular para prevenir los efectos adversos de la deficiencia o la toxicidad, mediante tres sistemas de captación: el aislamiento en vesículas o compartimentos celulares, el secuestro mediante proteínas específicas o bien mediante el internamiento en la mitocondria.



**Figura 15. Distribución del Zn<sup>2+</sup> celular.** El Zn<sup>2+</sup> se encuentra distribuido entre la membrana plasmática, el núcleo, el citoplasma y los orgánulos celulares. En el citosol, para evitar la toxicidad generada por un exceso de Zn<sup>2+</sup> libre, éste se encuentra quelado por metaloproteínas (MTs).

El aislamiento del Zn<sup>2+</sup> en vesículas u orgánulos celulares depende de la acción de dos familias de proteínas transportadoras de Zn<sup>2+</sup> (ZnT y ZIP) las cuales se encargan de transportar el Zn<sup>2+</sup> del citosol hacia el espacio extracelular o bien hacia el internamiento de orgánulos como el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (Figura 15). Estas proteínas son específicas de tejido y presentan elevada sensibilidad a los niveles de Zn<sup>2+</sup> en la dieta, así como otros estímulos hormonales y citoquímicos (Liuzzi and Cousins 2004; Sekler et al. 2007).

Cuando el  $Zn^{2+}$  extracelular entra en la célula, otro mecanismo de aislamiento es mediante el secuestro por un conjunto de proteínas conocidas como metalotioneínas (MTs – 14kDa) las cuales contienen entre 61-68 aminoácidos con una secuencia de 20 residuos de cisteína (C) altamente conservados y agrupados en dos dominios. Estos dominios  $Zn^{2+}$ /C mediante cambios de pH celular o bien mediante cambios en el potencial redox de la célula consiguen controlar los niveles de  $Zn^{2+}$  intracelular. Así pues, cuando se genera un cambio en el potencial redox celular, el  $Zn^{2+}$  se libera de los ligandos fisiológicos de  $Zn^{2+}$  (MTs) para realizar su función, normalmente como transductor de señal. Una vez el pH celular aumenta o se invierte el potencial redox, el  $Zn^{2+}$  vuelve a ser absorbido por los ligandos intracelulares evitando así una toxicidad por una elevada concentración de  $Zn^{2+}$  (Figura 15) (Stankovic, Chung, and Penkowa 2007).

Finalmente, otro método para el control de la concentración de  $Zn^{2+}$  intracelular libre es el transporte de  $Zn^{2+}$  a la mitocondria mediante transportadores. La mitocondria puede almacenar elevadas cantidades de  $Zn^{2+}$  citosólico, sin embargo, un exceso de  $Zn^{2+}$  en el orgánulo puede provocar disfunciones y estrés oxidativo (Figura 15) (Malaiyandi et al. 2005).

### *5.2. Funciones del $Zn^{2+}$ celular*

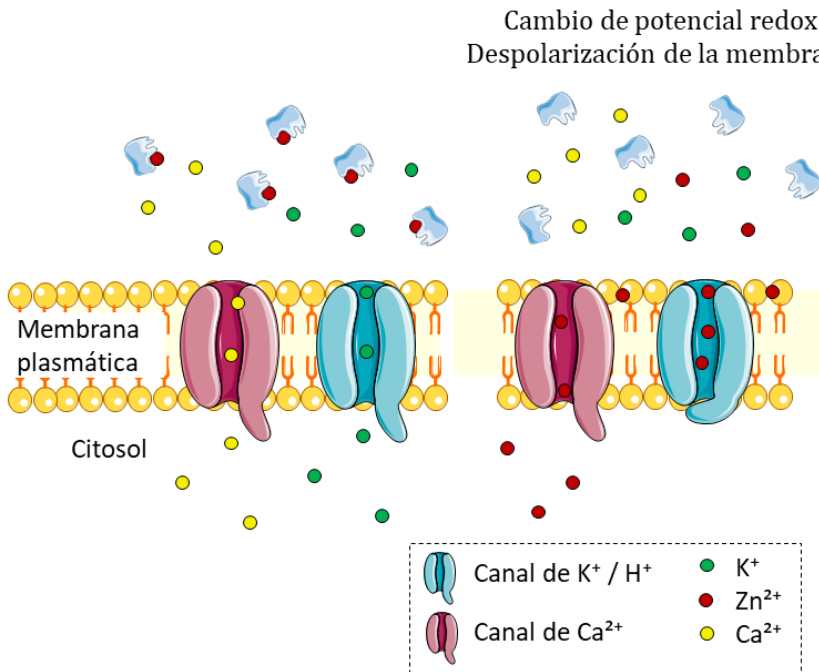
Se ha descrito que numerosas vías de señalización se ven influenciadas por un aumento o disminución de la concentración de  $Zn^{2+}$  intracelular poniendo de manifiesto el posible papel del  $Zn^{2+}$  como transductor de señales. A continuación, se detallan algunas de las funciones celulares más representativas del  $Zn^{2+}$ .

#### *5.2.1. El $Zn^{2+}$ regula la actividad de los canales iónicos*

La actividad celular de los canales iónicos se determina por el número total de canales proteicos presentes en la membrana y por su actividad la cual es controlada por modificaciones post-transcripcionales u oxidativas. La disfunción de los canales iónicos puede dar lugar a la desregularización de multitud de procesos celulares como la excitabilidad celular, la exocitosis, la movilidad, la apoptosis o la transcripción génica.

La actividad de los canales iónicos se puede ver afectada por la acción de metales iónicos como el  $Zn^{2+}$ , el cual puede inducir a la inactivación de los canales mediante el bloqueo del potencial de membrana o bien modificando su estructura interaccionando con los aminoácidos con carga del canal proteico. Se ha descrito que el  $Zn^{2+}$  puede inducir cambios en el potencial de membrana que afecten a los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje modificando las propiedades de apertura, reduciendo el flujo de iones a través del canal o inhibiendo completamente su actividad (Figura 16) (Noh et al.

2015). Además, también se ha descrito que, en neuronas corticales, el  $Zn^{2+}$  puede inhibir la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje actuando como un inhibidor competitivo de manera que, incluso en presencia de niveles elevados de  $Ca^{2+}$  extracelulares, el  $Zn^{2+}$  promueve su propia entrada en las neuronas mediante estos canales de  $Ca^{2+}$  (Figura 16). Este proceso puede ser potenciado por un pH extracelular ácido hecho que favorece la liberación del  $Zn^{2+}$  secuestrado por las MTs confirmando así la localización del  $Zn^{2+}$  en vesículas sinápticas y su posible función como transductor del señal en la transmisión sináptica (Atar et al. 1995).



**Figura 16. Inhibición de los canales iónicos por  $Zn^{2+}$ .** Un cambio de potencial redox genera la liberación del  $Zn^{2+}$  el cual actúa sobre la membrana generando una despolarización de membrana que afecta a la actividad de los canales iónicos de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ . En el caso de los canales de  $K^+$ , el  $Zn^{2+}$  interactúa con las proteínas del canal provocando su inhibición. En el caso de los canales de  $Ca^{2+}$ , el  $Zn^{2+}$  actúa como un inhibidor competitivo del  $Ca^{2+}$

generando la entrada de  $Zn^{2+}$  a través del canal promoviendo un aumento de la concentración de  $Zn^{2+}$  intracelular.

### *5.2.2. El $Zn^{2+}$ aumenta la proliferación y diferenciación celular*

La proliferación y diferenciación celular en eucariotas generalmente es inducida por hormonas de crecimiento que desencadenan cascadas de elementos de señalización intracelular como segundos mensajeros intracelulares y factores de transcripción. En todos los niveles de transducción de señales celulares se ha visto que el  $Zn^{2+}$  está involucrado ya sea como un elemento estructural o un factor regulador (Beyersmann and Haase 2001).

En procesos de proliferación, el  $Zn^{2+}$  es parte estructural de las enzimas involucradas en la síntesis de ADN (Chesters, Petrie, and Vint 1989), síntesis de tRNA (Hicks and Wallwork 1987), función ribosomal (Härd et al. 2000) y en factores de transcripción (Berg and Shi 1996). Sin embargo, la homeostasis celular del  $Zn^{2+}$  está parcialmente regulada por las MTs las cuales se ha demostrado que juegan un papel importante en la regulación de la proliferación celular. Estudios de los niveles de MTs en células tumorales muestran un incremento de los niveles de MT dependiendo de la etapa del ciclo celular, siendo más elevados en la fase de transición G1-S, coincidiendo con una translocación de la proteína del citoplasma al núcleo probablemente para aumentar los niveles de  $Zn^{2+}$  nuclear para la síntesis de ADN (Beyersmann and Haase 2001).

En procesos de diferenciación celular, también se ha descrito cambios en la localización subcelular de  $Zn^{2+}$  y MT. Durante la diferenciación de líneas celulares de mioblastos a



miotubos se produce una translocación nuclear de MT y  $Zn^{2+}$  durante la etapa de diferenciación temprana mientras que, en mioblastos completamente diferenciados, la MT vuelve a reubicarse en el citoplasma y el contenido de  $Zn^{2+}$  celular disminuye sugiriendo así un papel para el  $Zn^{2+}$  en diferenciación celular (Apostolova, Ivanova, and Cherian 1999).

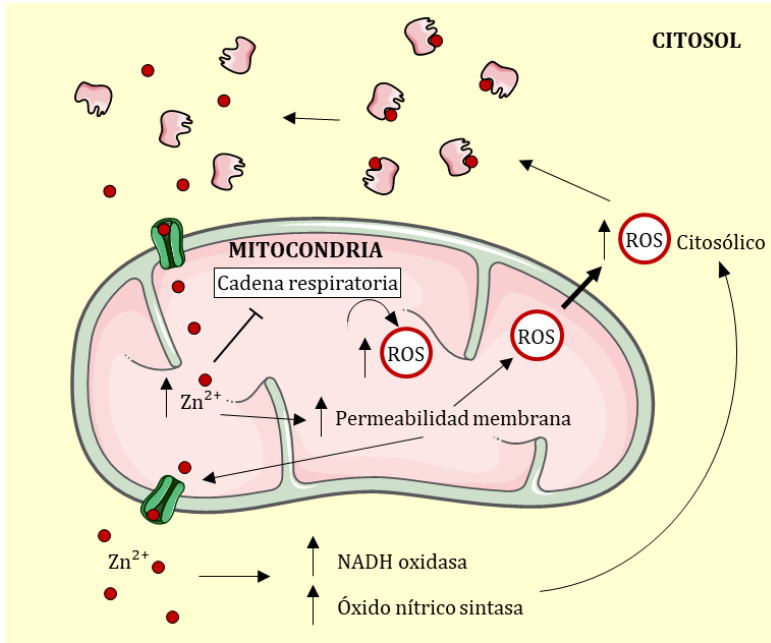
### *5.2.3. El $Zn^{2+}$ se libera frente al estrés oxidativo*

El estrés oxidativo es un estado en el que se generan niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) celulares y disminuyen los mecanismos celulares antioxidantes que reducen el impacto potencialmente dañino de ROS y RNS.

El  $Zn^{2+}$  puede promover la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de dos vías: la vía mitocondrial mediante la inhibición de la respiración celular interfiriendo en la actividad de la cadena transportadora de electrones; y la vía extra-mitocondrial incrementando la actividad de la NADH-oxidasa y la óxido nítrico sintasa. Además, el  $Zn^{2+}$  no solo promueve la producción de ROS sino que, en su defecto, la oxidación celular y ROS son los principales contribuyentes a un rápido aumento de los niveles intracelulares de  $Zn^{2+}$  mediante su liberación de las MTs, ya sea por nitrosilación u oxidación del ligando tiol. Este hecho hace que se dé lugar a un ciclo de retroalimentación negativa para la célula (Frazzini et al. 2006).

Además, el  $Zn^{2+}$  puede generar un aumento en la permeabilidad mitocondrial permitiendo así la liberación de

ROS y factores pro-apoptóticos al citosol que junto con la inhibición de la respiración celular desencadenarán el proceso de apoptosis celular.



**Figura 17. El  $Zn^{2+}$  genera estrés oxidativo.** El  $Zn^{2+}$  inhibe la cadena respiratoria y aumenta la permeabilidad de la membrana produciendo un aumento y translocación al citosol de ROS el cual promueve la liberación de  $Zn^{2+}$  quelado por las MTs las cuales son sensibles a cambios redox. Este  $Zn^{2+}$  liberado puede entrar dentro de la mitocondria y seguir produciendo más ROS. Además, el  $Zn^{2+}$  citosólico incrementa la producción de ROS activando la NADH oxidasa y la óxido nítrico sintasa lo que conlleva a un ciclo de retroalimentación negativa que conducirá a la muerte celular.

El estrés oxidativo se ha relacionado con un rango muy diverso de enfermedades que incluyen el trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), cáncer, aterosclerosis, infarto de miocardio, depresión e incluso diabetes mellitus. En cerebro, se ha descrito que el estrés oxidativo es una característica clínica temprana de la enfermedad de Alzheimer,

así como otros trastornos neurodegenerativos. El estrés oxidativo relacionado con Alzheimer surge como resultado de una mayor generación de ROS, inducida por un fallo en la actividad mitocondrial y una disminución de los niveles de antioxidantes endógenos de la célula. Además, muchas de las biomacromoléculas que forman parte de la fisiología celular normal son susceptibles a modificaciones oxidativas que alteran su función como es el caso de las proteínas  $\beta$ -amiloide y Tau (Cioffi, Adam, and Broersen 2019).

### *5.3. El cerebro presenta un elevado contenido en $Zn^{2+}$ celular*

El cerebro es uno de los órganos con más contenido en  $Zn^{2+}$  el cual se estima en una concentración de 150  $\mu$ M, sin embargo, la concentración de  $Zn^{2+}$  libre en este órgano se estima en el rango de picomolar (pM). Como se ha comentado anteriormente, mantener la correcta homeostasis de  $Zn^{2+}$  es clave para la correcta función celular de manera que una deficiencia del ion puede bloquear numerosas funciones celulares y, por el contrario, un exceso, o bien por disfunción mitocondrial o estrés oxidativo, puede causar la muerte de las células neuronales.

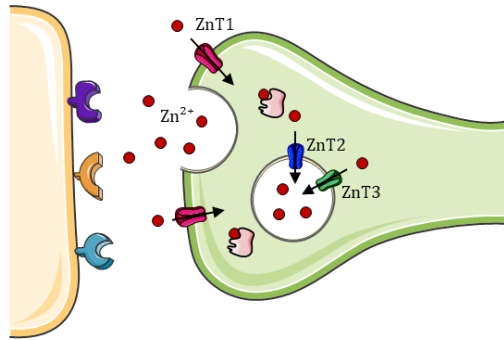
El zinc se encuentra en el cerebro como un componente estructural de muchas proteínas, lo que contribuye al rendimiento eficiente de más de 2000 factores de transcripción y más de 300 enzimas. Entre el 10 y el 15% del zinc cerebral se encuentra en forma "libre" o quelable, mostrando una concentración muy baja en los líquidos extracelulares cerebrales (<500 nM). Sin embargo, la concentración de zinc en las vesículas sinápticas glutamatérgica es >1mM por lo que se

las conoce como neuronas “gluzinérgicas” (Mocchegiani et al. 2005).

### *5.3.1. El $Zn^{2+}$ puede actuar como neurotransmisor*

En cerebro, la familia de proteínas ZnT las cuales se encargan de regular la concentración de  $Zn^{2+}$  intracelular a través del flujo de salida de las células y los compartimentos celulares desempeñan un papel importante en la cognición. En cerebro se expresan mayoritariamente tres tipos de ZnTs: ZnT1 el cual se localiza principalmente en la membrana plasmática donde se encarga de transportar  $Zn^{2+}$  del citosol al espacio extracelular; ZnT2 y ZnT3 localizados en las membranas de las vesículas que se encargan de transportar el  $Zn^{2+}$  citosólico al lumen de las vesículas que posteriormente serán secretadas.

ZnT3 tiene un papel importante en la modulación de la neurotransmisión y la plasticidad de las neuronas glutamatérgicas. Cuando el  $Zn^{2+}$  se libera de la vesícula pre-sináptica por los transportadores ZnT3, ayuda a regular los procesos neuronales relacionados con la cognición y la memoria al actuar sobre receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). Además, también se ha descrito que el  $Zn^{2+}$  activa receptores tirosina-quinasa (TrkB), receptores de glutamato y p75 lo que contribuye a su papel modulador de la transmisión sináptica siendo postulado como un “neurotransmisor atípico” (Portbury and Adlard 2017).



**Figura 18. El  $Zn^{2+}$  puede actuar como neurotransmisor.** Esquema/dibujo de una sinapsis neuronal en la que se libera el  $Zn^{2+}$  a partir de vesículas pre-sinápticas y actúa como neurotransmisor interactuando con receptores de distinta índole como receptores NMDA, tirosina-quinasa o de glutamato, los cuales activan distintas vías de señalización de la neurona receptora. El internamiento del  $Zn^{2+}$  en las vesículas se da mediante transportadores ZnT que controlan los niveles de  $Zn^{2+}$  intracelular.

### 5.3.2. *El $Zn^{2+}$ influye en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas*

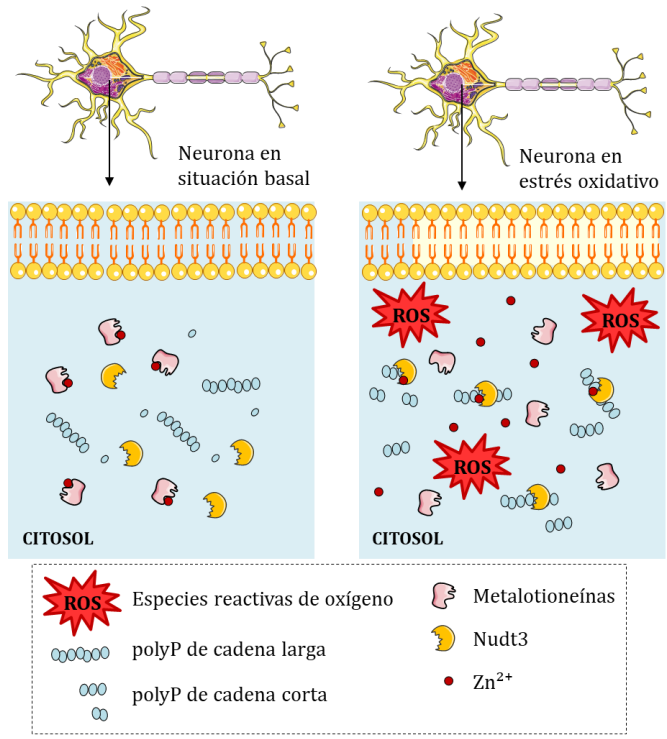
Existe una amplia gama de enfermedades neurológicas en las que la homeostasis del  $Zn^{2+}$  se ve afectada y, posteriormente, se asocia con la patogénesis del trastorno. Estas incluyen la depresión, la esquizofrenia, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Alzheimer (AD) y la enfermedad de Parkinson.

La enfermedad de Alzheimer es la demencia progresiva más común que afecta a la población en la actualidad. La teoría principal de la patogénesis de la AD se ha centrado en la acumulación de  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), un producto de escisión de un precursor amiloide más grande (APP), y en el papel de la forma hiperfosforilada de la proteína Tau asociada a los microtúbulos en el inicio y la progresión de la AD (Portbury and Adlard 2017). El interés del zinc en la patogénesis de la AD se deriva de

la observación de que el zinc, por encima de una concentración de 300 nM, puede precipitar A $\beta$  para dar lugar a su agregación en placas seniles, una de las principales características patológicas de la enfermedad. Este hecho junto con que la concentración extracelular de zinc durante la transmisión sináptica aumenta a 300  $\mu$ M hace posible que esta transmisión sináptica pueda contribuir a la deposición de A $\beta$  en AD (Bush et al. 1994; Bush and Tanzi 2002). Además, se ha descrito que el Zn<sup>2+</sup> regula la fosforilación de la proteína Tau a través de la vía de la MAP/ERK quinasas e inactiva la fosfatasa que la defosforila (PP2A), para dar lugar a la hiperfosforilación de Tau (Kim et al. 2011; Xiong et al. 2013).

## **6. Conexión entre los niveles de polyP, el Zn<sup>2+</sup> y el cerebro**

En esta tesis se demuestra que Nudt3, en presencia de Zn<sup>2+</sup>, es la primera endopolifosfatasa descrita en humanos. Como se ha comentado en la introducción, Nudt3 es una proteína con un patrón de expresión elevado en cerebro, uno de los órganos que presenta niveles más elevados de polyP y Zn<sup>2+</sup>. El Zn<sup>2+</sup> intracelular, en cerebro, se encuentra mayoritariamente almacenado en las vesículas pre-sinápticas y quelado por metalotioneínas las cuales son sensibles a cambios redox. Así pues, Nudt3 puede degradar el polyP citosólico cuando hay un aumento puntual de los niveles de Zn<sup>2+</sup> intracelular, por ejemplo, en una situación de estrés oxidativo, la cual se puede dar en alguna patología neurológica como la isquemia, la depresión o enfermedades neurodegenerativas (Figura 19).



**Figura 19. Esquema de Nudt3 en la neurona en situación basal y en estrés oxidativo.** A la izquierda, una neurona en situación basal donde el Zn<sup>2+</sup> intracelular se encuentra quelado por las MTs y la actividad endopolifosfatasa dependiente de Zn<sup>2+</sup> se encuentra inactiva. En la derecha, una neurona en situación de estrés oxidativo donde el Zn<sup>2+</sup> intracelular es liberado por las MTs debido a un cambio redox por la acumulación de ROS en el citoplasma. En este caso, la actividad endopolifosfatasa dependiente de Zn<sup>2+</sup> se encuentra activa.



## *Hipótesis*

---



Como se ha avanzado en el apartado de introducción, durante esta tesis se ha diseñado una serie de experimentos enfocados a probar las hipótesis que se plantean a continuación relacionadas con el metabolismo del polyP en mamíferos:

- **Hipótesis I:** En mamíferos, existen una o varias enzimas con actividad polifosfatasa que se encargan de la degradación del polyP
- **Hipótesis II:** Estas enzimas se regulan por procesos celulares estrictos para evitar la desregulación del polyP en las distintas funciones en las que participa

Los experimentos que se han realizado para confirmar o rechazar estas hipótesis se detallan en el apartado de resultados y son comentados en detalle en el apartado de discusión.

A continuación, se exponen los objetivos que se han llevado a cabo en esta tesis para demostrar las hipótesis.



## *Objetivos*

---



Los objetivos de la tesis planteados para comprobar las hipótesis mencionadas anteriormente son los siguientes:

1. Diseñar una estrategia de purificación y determinación de las enzimas con actividad polifosfatasa.
2. Demostrar la presencia de actividad polifosfatasa en mamíferos.
3. Caracterización *in vitro* de Nudt3 como endopolifosfatasa de mamíferos.
4. Demostrar que Nudt3 es una endopolifosfatasa dependiente de  $Zn^{2+}$  *in vivo*.
5. Demostrar que Nudt3 es una endopolifosfatasa en situación de estrés oxidativo *in vivo*.





## *Material y métodos*

---



## 1. Células y condiciones de cultivo

### 1.1. Tipos celulares

En este trabajo se han utilizado tanto cepas de levadura como líneas celulares de mamífero:

- YSB170: BY4742. Cepa *wild-type* de levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, obtenida de la Université de Lausanne.

- YSB162: BY4742 *ppn1Δppn2Δppx1Δ*. Cepa de levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, obtenida de la Université de Lausanne la cual no expresa enzimas con actividad polifosfatasa y, por lo tanto, no puede degradar el polyP.

- HEK293T: línea celular derivada de riñón embrionario humano. Han sido empleadas para la visualización de polyP mediante microscopía y como modelo genético para estudiar el metabolismo del polyP. Se han obtenido del servicio de la Universitat Autònoma de Barcelona.

- SH-SY5Y: línea celular derivada de neuroblastoma humano. Han sido empleadas, igual que las HEK293T, para la visualización de polyP mediante microscopía y como modelo genético para estudiar el metabolismo del polyP. Se han obtenido de ATCC ([www.ATCC.org](http://www.ATCC.org))

### *1.2. Condiciones de cultivo*

En condiciones estándar para las levaduras, las células han crecido en medio rico YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% glucosa) o bien en medio sintético completo SD (0,67% base nitrogenada de levadura, 2% glucosa), suplementado con los aminoácidos requeridos para suplementar la auxotrofia.

En condiciones estándar para las líneas celulares de mamífero, las células han crecido en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM D5671; Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS12A; Capricorn Scientific), 1% glutamina (Glutamine Stable 100x MS007A1008; Biowest) y 1% penicilina/estreptomicina (P/S P0781; Sigma-Aldrich). Las células han crecido en un ambiente húmedo a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células se han usado hasta un máximo de 15 pases después de la descongelación y se ha monitorizado la contaminación por micoplasma periódicamente.

En experimentos donde así lo indica se han alterado las condiciones de cultivo añadiendo a las condiciones estándar un suplemento de 100µM Zn<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para aumentar la concentración de Zn<sup>2+</sup> intracelular o bien añadiendo 10-50µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para producir un estrés oxidativo.

## 2. Obtención de proteína recombinante

### 2.1. Construcciones

Las proteínas Nudt3, Nudt4, Nudt10 y Nudt11 han sido amplificadas mediante PCR a partir de cDNA de células HEK293T y se han clonado con un GST-tag en el extremo N-terminal en un vector pGEX6p1. La mutagénesis dirigida de GST-Nudt3 se ha realizado por PCR con una secuencia molde que contiene la mutación en cuestión (cambio del aminoácido aspártico 70 por un aminoácido alanina).

La proteína Nudt5 se ha obtenido a partir de la construcción pANT-GST-Nudt5 facilitada por el Centro de Regulación Genómica (CRG) de Barcelona.

### 2.2. Transformación de bacterias

Para la obtención de proteína recombinante, los plásmidos han sido transformados en bacterias RIPL. Para la transformación se han incubado las células RIPL competentes (previamente tratadas con  $\text{CaCl}_2$  para aumentar su capacidad para incorporar moléculas de ADN) con las construcciones del apartado anterior en hielo durante 30 min hasta que se someten a un choque térmico a  $42^\circ\text{C}$  durante 1min y 15s. Seguidamente, las células se han incubado en medio rico SOC durante 1h a  $37^\circ\text{C}$ . Finalmente, se han plaqueado en placas con medio LB suplementado con  $50\mu\text{g/ml}$  de ampicilina.

### ***2.3. Obtención de proteína recombinante***

De un cultivo de RIPL transformadas en fase estacionaria se ha inoculado (1:500) en un litro de medio de cultivo LB que contiene 50µg/ml de ampicilina y ha sido incubado a 37°C hasta una OD<sub>600</sub> entre 1 y 1.3. En este punto, el cultivo se ha incubado a 16°C durante 16h con 0.2mM del inductor isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG A4773; Panreac)). El cultivo se ha centrifugado y las células se han resuspendido con tampón de lisis (50 mM Tris, pH 7.5; 1 M NaCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 10% glicerol; 5% Triton X-100; and 1 mM DTT) y se han sonificado en un sonicador manual UP-100H Hielscher a máxima amplitud. Después de la lisis, el extracto se ha incubado con glutatión unido a una resina de sefarosa (GST Sefarosa 17-5132-01; GE Healthcare Life Sciences) a 4°C en rotación durante 1h. La proteína marcada con GST se ha eluido con 500µl del tampón de elución (50 mM Tris, pH 8; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 10% glicerol; and 1 mM DTT) suplementado con 20mM glutatión libre (G4251; Sigma-Aldrich).

### ***2.4. Cuantificación de proteína recombinante***

Para valorar la pureza y la cantidad de proteína marcada con GST obtenida en la purificación anterior se realiza una electroforesis en un gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) donde se ha cargado 0.4µl de enzima recombinante y cantidades crecientes de albúmina de suero bovino (0-2µg BSA, 10735078001; Roche) como recta patrón. Posteriormente, el gel ha sido teñido con Coomassie y revelado en un transiluminador de UV (Synergy HT, Bio Tek Instruments)

durante 2-3 minutos seguido de una captura de la imagen mediante SnapGene (Syngene). La intensidad de las bandas ha sido cuantificada con el software Image Studio Lite (Li-Cor) y se ha extrapolado a la recta patrón para así obtener la concentración en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de proteína recombinante en cuestión.

### **3. Expresión de proteína en levaduras**

#### **3.1. Construcción**

Las proteínas Nudt3 y Ppn2 han sido amplificadas mediante PCR a partir de cDNA de células HEK293T y ADN genómico de levadura (BY4742) respectivamente y se han clonado fusionadas a un GFP (N-terminal) bajo un promotor TEF en un pRS425 con resistencia a leucina (LEU). En el caso de Nudt3, también se ha añadido una secuencia que codifica para una señal vacuolar para dirigir a Nudt3 a la vacuola.

#### **3.2. Transformación en levaduras**

La transformación de levaduras se realiza mediante el método del acetato de litio (LiAc). Se resuspenden  $1,2 \cdot 10^8$  células con una solución de LiAc/TE a la cual se añaden 3.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de ssDNA de esperma de salmón desnaturalizado con 50% de polietilenglicol (PEG). Las células se incuban a 30°C durante 30 min y se someten a un choque térmico a 42°C durante 15 min. Finalmente, se resuspenden con agua MQ estéril y se plaquean en medio SD selectivo por la ausencia de algún aminoácido, en este caso, sin leucina (-LEU).

### ***3.3. Visualización de levaduras al microscopio***

Las levaduras se han crecido en medio SD selectivo (-LEU) hasta alcanzar su fase exponencial de crecimiento hasta una  $OD_{660}$  de 1. Las levaduras se han visualizado en un Leica DM IRB 100x.

### ***3.4. Extracción de polifosfato en levaduras***

La purificación y extracción de polyP se ha llevado a cabo igual que está descrito en (Bru et al, 2016).

Brevemente, se recogen  $10^7$  células por centrifugación, el pellet se resuspende en 400 $\mu$ l de solución AE (50mM NaAc pH 5.3, 10mM EDTA). Al extracto se añade fenol y SDS al 20% y se hierbe a 65°C durante 5min para romper las células. A continuación, se añade cloroformo y se realizan diferentes centrifugaciones para obtener la fase acuosa libre de impurezas. Seguidamente, se trata el sobrenadante con DNAsa/RNAsa a 37°C durante 1h. Finalmente, para purificar el polyP se precipita O/N con 1ml de etanol absoluto. Para eliminar el etanol, se centrifuga a 14000rpm durante 20 min, se elimina el etanol, y se resuspende el pellet, que contiene el polyP, con 50 $\mu$ l de agua MQ.



## 4. Ensayos enzimáticos

### 4.1. *Ensayo de actividad exopolifosfatasa*

El ensayo exopolifosfatasa se realiza igual que (Werner et al. 2005). La actividad exopolifosfatasa se analiza en una reacción que contiene 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM acetato de amonio, 5 mM acetato de magnesio y muestra enzimática (extracto de cerebro, plasma sanguíneo o proteína recombinante) en un volumen final de 100  $\mu$ L. El ensayo se realiza a 37°C durante 1h. El fosfato libre producto de la reacción se cuantifica mediante adición de 86  $\mu$ L de heptamolibdato de amonio 28 mM / ácido sulfúrico 2.1 M y 64  $\mu$ L de solución de verde de malaquita. La reacción se cuantifica mediante espectrofotometría (Synergy HT, Bio Tek Instruments) a 595nm utilizando como estándar una recta patrón de fosfato (0-500  $\mu$ M Pi).

### 4.2. *Ensayo de actividad endopolifosfatasa*

La actividad endopolifosfatasa se estima mediante una reacción que contiene 20 mM Tris-HCl pH 6.8 (a menos que se indique lo contrario), 100 mM acetato de amonio, 5 mM sulfato de zinc (a menos que se indique lo contrario) y muestra enzimática (extracto de cerebro, plasma sanguíneo o proteína recombinante). La reacción se realiza a 37°C muestreando a diferentes tiempos y añadiendo en cada punto 0.2 volúmenes de tampón de carga 6x (5ml de TBE (Tris-Borato-EDTA); 2.5g de sacarosa; 0.01g de azul de bromofenol). Los controles se han incubado a 37°C en los mismos tiempos de reacción sin la adición de la muestra enzimática. El producto de la reacción se analiza mediante electroforesis en un gel Urea-PAGE.

### *4.2.1. Visualización de polifosfato en geles de poliacrilamida suplementados con urea (Urea-PAGE)*

Los geles de poliacrilamida al 15% con urea contienen 17g de urea, 8 mL Tris-Borato-EDTA 5x (pH 8) (54g Tris-HCl pH 7.5; 27.5g de ácido bórico; 20mL EDTA 0.5M), 27 mL de solución acrilamida/bisacrilamida 10:1 (27.7g de acrilamida y 2.7g de bisacrilamida disueltas en agua desionizada a un volumen final de 100mL), persulfato de amonio 10% (200  $\mu$ L) y TEMED (16  $\mu$ L) a un volumen final de 50 mL. Geles de otros porcentajes se han realizado ajustando las cantidades de la solución de acrilamida/bisacrilamida. Para cargar la muestra de polifosfato en el gel se añadió 0.2 volúmenes de tampón de carga 6x (5ml de TBE (Tris-Bórico-EDTA); 2.5g de sacarosa; 0.01g de azul de bromofenol). La electroforesis de los geles (18x20x0.1 cm o 20x20x0.1 cm) se realizó a 300V durante 4h. Finalmente para su visualización se realiza una tinción DAPI (10  $\mu$ g/ $\mu$ L) en solución de fijación (25% metanol, 5% glicerol) durante 1h a temperatura ambiente (T.A.) seguido de un proceso de destinción con solución fijación sin DAPI. Para el revelado de los geles se utiliza un transiluminador (Synergy HT, Bio Tek Instruments) seguido de una captura de la imagen mediante SnapGene (Syngene).

### *4.2.2. Cuantificación de la actividad endopolifosfatasa*

La actividad endopolifosfatasa (nmol /min·mg o  $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ ) se calcula midiendo la intensidad de cada carril del gel de poliacrilamida de un ensayo de actividad endopolifosfatasa a distintos tiempos utilizando el software Image Studio Lite (Li-Cor). Seguidamente, se comparan las intensidades de cada tiempo de muestreo del ensayo respecto al tiempo 0 para poder calcular el porcentaje de degradación para cada tiempo. A partir de la cantidad de polyP en el ensayo y del porcentaje de degradación se obtiene la cantidad de polyP consumido en cada tiempo que mediante una regresión lineal permite obtener la velocidad de la reacción (nmol / min). Finalmente, la actividad específica o actividad endopolifosfatasa (nmol/min·mg) se obtiene dividiendo la velocidad de reacción por la cantidad de enzima utilizada en la reacción.

### *4.3. Ensayo de actividad inositol pirofosfatasa*

El ensayo inositol pirofosfatasa se realiza igual que (Riley et al. 2018). La actividad inositol pirofosfatasa se analiza en una reacción que contiene 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 40 mM cloruro de sodio, 1mM DTT, 1 mM acetato de magnesio, 5  $\mu\text{g}$  5-InsP<sub>7</sub> (cedido por el laboratorio del Dr. Herning Jessen) y GST-Nudt3 en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$ . El ensayo se realiza a 37°C. El fosfato libre producto de la reacción se cuantifica mediante adición de 86  $\mu\text{L}$  de heptamolibdato de amonio 28 mM / ácido sulfúrico 2.1 M y 64  $\mu\text{L}$  de solución de verde de malaquita. La reacción se cuantifica mediante espectrofotometría (Synergy

HT, Bio Tek Instruments) a 595nm utilizando como estándar una recta patrón de fosfato (0-500  $\mu$ M Pi).

### ***4.4. Ensayo de actividad dinucleósido polifosfatasa***

El ensayo exopolifosfatasa se realiza igual que (Riley et al. 2018). La actividad inositol pirofosfatasa se analiza en una reacción que contiene 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 40 mM cloruro de sodio, 1mM DTT, 1 mM cloruro de manganeso, 5  $\mu$ g Ap<sub>5</sub>A (D4022: Sigma-Aldrich) y GST-Nudt3 en un volumen final de 100  $\mu$ L. El ensayo se realiza a 37°C. El fosfato libre producto de la reacción se cuantifica mediante adición de 86  $\mu$ L de heptamolibdato de amonio 28 mM / ácido sulfúrico 2.1 M y 64  $\mu$ L de solución de verde de malaquita. La reacción se cuantifica mediante espectrofotometría (Synergy HT, Bio Tek Instruments) a 595nm utilizando como estándar una recta patrón de fosfato (0-500  $\mu$ M Pi).

## **5. Inmunofluorescencia**

Para los ensayos de inmunofluorescencia, las células se han fijado con parformaldehído al 4% (PFA) durante 15 min a 4°C. Seguidamente, se han incubado con solución de bloqueo (suero de cabra al 10% y Tween20 al 0.5% en PBS) durante 1h a temperatura ambiente. La incubación con el anticuerpo primario (PPBD- $\alpha$ -Xpress 46-0528; Life Technologies) se ha realizado O/N a 4°C. Para el anticuerpo secundario (Alexa 488  $\alpha$ -mouse A11001, Invitrogen) se ha empleado una dilución 1:000 en solución de bloqueo y se incuban durante 1h a temperatura ambiente en condiciones de humedad y oscuridad. Tras el anticuerpo secundario, se han incubado 5 min

temperatura ambiente con Hoechst 33342 diluido 1:1000 en PBS. Posteriormente, las preparaciones han sido montadas en portaobjetos utilizando como medio de montaje Fluoromount-G® (#0100-01 Southern Biotech). Las imágenes han sido tomadas con un microscopio Leica SP8 63x y se cuantifican con el software Fiji ImageJ.

### **6. Ensayo de viabilidad**

La viabilidad celular se ha evaluado mediante el ensayo MTT. Las células han sido crecidas en placas de 24 pocillos y, a las 24h, a una confluencia del 50-70%, las células fueron transfectadas con 10nM de siRNA para Nudt3 con lipofectamina (Lipo2000) y después de 72h fueron sometidas a un estrés oxidativo (incubación con 50 $\mu$ M). Finalmente, a las 24h, las células han sido incubadas con solución MTT (M2128; Sigma-Aldrich) a 37°C durante 1h. Los cristales de formazan producto de la reacción han sido disueltos en DMSO y cuantificados midiendo la absorbancia con un lector de placas Synergy HT a una longitud de onda de 570nm. La viabilidad por MTT se ha expresado como el porcentaje del valor de absorbancia obtenido en la célula no tratada con estrés oxidativo (control) el cual se considera el 100% de viabilidad.

### **7. Análisis de proteínas mediante Western Blot**

Se obtiene el extracto celular mediante su lisis con tampón de lisis (20mM Tris-HCl pH7.5; 5mM EDTA; 1% NP40; 150mM NaCl) y se incuba en hielo durante 15 min. El lisado celular se centrifuga a 10.000 rpm durante 20 min a 4°C y se determina su concentración con Bradford. Para la electroforesis se cargan 40 $\mu$ g de proteína en geles SDS-acrilamida comerciales de

gradiente del 4-15% (BioRad) y se transfieren en membranas de PVDF (Millipore).

Las membranas se incuban con diferentes anticuerpos primarios en función de las proteínas analizadas:  $\alpha$ -GFP 1:2000 (29565; Cell Signaling) y  $\alpha$ -Nudt3 1:2000 (SAB2700523; Sigma-Aldrich). Como anticuerpos secundarios se utilizan:  $\alpha$ -rabbit 1:30000 (111-03-144; Immuno Research Laboratory Ink).

El revelado de las membranas se lleva a cabo con bioluminiscencia utilizando Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore), la captura de la imagen se realiza mediante el programa GeneSnap (Syngene) y la cuantificación de las imágenes con el programa Image Studio Lite (Li-Cor).

### 8. Análisis estadístico

Para los experimentos de actividad endopolifosfatasa, se han realizado como mínimo 3 réplicas por experimento. Los valores se han representado como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) y se ha aplicado la prueba estadística Mann-Whitney. Para los experimentos de actividad enzimática de los distintos sustratos de Nudt3, se ha realizado un mínimo 3 réplicas por experimento y se ha representado los valores como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Para estos experimentos se ha aplicado la prueba estadística de análisis de la varianza ANOVA. Finalmente, en los experimentos de microscopía se han contado un mínimo de 5 campos de microscopía con una media de 30-100 células por campo. Se han representado la media de cada campo  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). En este caso se ha realizado la prueba estadística de Mann-Whitney. Se ha considerado significativo

cuando el p-valor ha sido inferior a 0.05 ( $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*)  
y  $p < 0.001$  (\*\*\*))

## 9. Estrategia de purificación de las enzimas con actividad polifosfatasa a partir de tejido animal

### 9.1. Esquema de la purificación

Para abordar el segundo objetivo empecé por diseñar mi estrategia de purificación para poder aislar enzimas capaces de degradar el polyP, ya sean exopolifosfatasas o endopolifosfatasas.

Como he comentado en la introducción, no se conocen las enzimas responsables de la síntesis y la degradación del polyP en mamíferos, por tanto, es imprescindible realizar un buen diseño experimental para alcanzar el éxito en la purificación. En la Figura 20, muestro el camino que he seguido hasta llegar a una única proteína con actividad polifosfatasa, resaltando los puntos clave de dicha estrategia.



**Figura 20. Purificación de las enzimas responsables de actividad polifosfatasa.** Esquema de la purificación describiendo los cinco pasos del procedimiento de obtención de la enzima con actividad polifosfatasa en mamífero.

Un detalle importante en el diseño de la estrategia de purificación fue establecer el tipo de muestra del que partir ya que, en mamíferos, el metabolismo del polyP aún es bastante desconocido, y el sistema de purificación que emplear para obtener una purificación por homogeneidad de la proteína con actividad polifosfatasa.

La cromatografía es uno de los métodos más comunes para la purificación de proteínas y consiste en separar según las diferencias entre las propiedades de la proteína a ser purificada y las propiedades de otras sustancias y proteínas presentes en la muestra.

Para la purificación de la enzima con actividad polifosfatasa, he realizado como primer paso de purificación una cromatografía de afinidad. Este método es muy selectivo y me permite seleccionar solo las enzimas que presentan afinidad por mi sustrato. Para la eliminación de las impurezas y los agregados obtenidos en la cromatografía de afinidad he aplicado un segundo paso de purificación, una cromatografía de exclusión por tamaño o filtración en gel. Esta cromatografía me permite concretar un rango de peso molecular para la enzima con actividad polifosfatasa, Para mejorar el rendimiento de la purificación y obtener una proteína en homogeneidad he realizado un zimograma seguido de una proteómica como paso adicional de purificación.

A continuación, pasaré a explicar con más detalle cada uno de estos cinco pasos clave para la determinación de la enzima con actividad polifosfatasa.



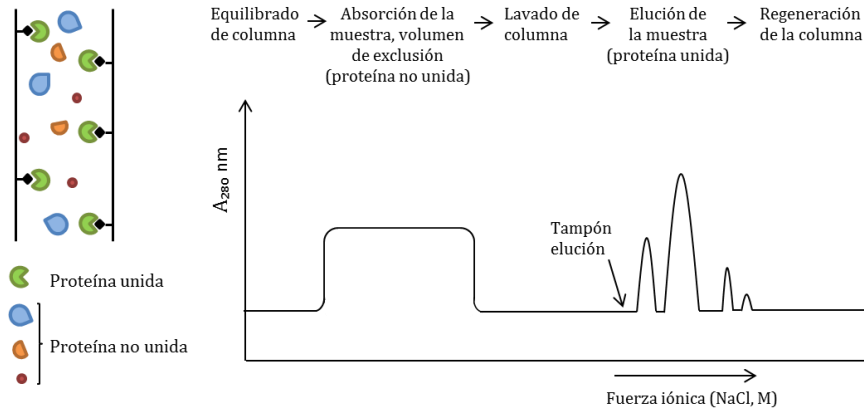
### 9.2. *Muestra*

Para realizar el cribado de actividades polifosfatasas he utilizado como modelo la rata albina. Tal y como ya he comentado, solo existe una referencia donde se pudo observar actividad polifosfatasa en células de mamífero. En dicho trabajo se utilizó como organismo modelo la rata albina y, además, se realizaron cribados en distintos órganos siendo el cerebro el órgano con mayor actividad polifosfatasa. Con esto, decidí utilizar la rata y, concretamente el cerebro, para perseguir hasta máxima homogeneidad la enzima responsable de degradar el polyP en mamíferos.

Además del cerebro, he utilizado un segundo tejido para el cribado, la sangre. Este tejido es de fácil manejo, no requiere de lisis mecánica lo que simplifica el protocolo de purificación y, sobre todo, por el importante papel del polyP en coagulación sanguínea. Como he comentado en la introducción, el polyP favorece el proceso de coagulación lo que sugiere que la sangre pueda ser un tejido con presencia de actividad polifosfatasa a fin de poder regular los niveles de polyP en dicha función.

### 9.3. *Cromatografía de afinidad*

La cromatografía de afinidad consiste en separar las proteínas en función de una interacción reversible entre la proteína a purificar y un ligando específico unido a una matriz cromatográfica. Para la elución de la proteína a purificar se añade un competidor del ligando o bien se cambian las condiciones de la solución como el pH, la fuerza iónica o la polaridad (Figura 21).

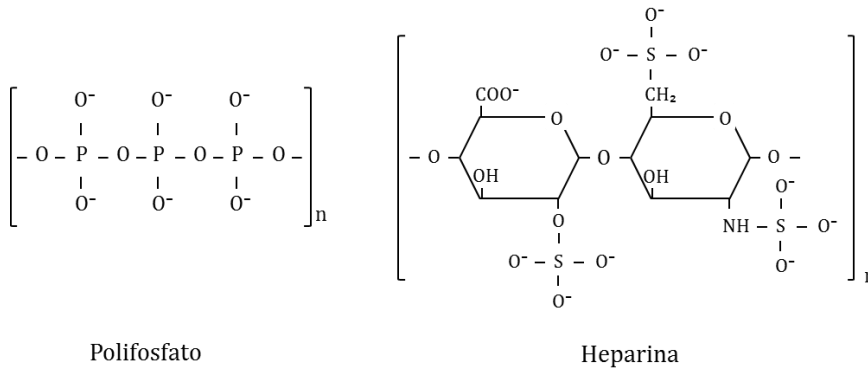


**Figura 21. Proceso de la cromatografía de afinidad. A.** Descripción gráfica de una columna de afinidad. La muestra se aplica en una columna de afinidad, previamente equilibrada con un tampón específico que favorece la unión de la(s) proteína(s) diana(s) a una sustancia (el ligando) fijada en la columna. La unión ligando-proteína es específica y reversible, por lo que una vez realizado el lavado de la columna y eliminado las proteínas no unidas, la(s) proteína(s) diana(s) se recupera cambiando las condiciones del medio para favorecer la elución de las moléculas unidas. Para una elución no específica de las proteínas se ha variado la fuerza iónica (NaCl, M) del tampón de elución. **B.** Cromatograma esquemático de una cromatografía de afinidad.

En este caso, he utilizado una columna de heparina la cual consta de tres compuestos: el polipropileno, material de la columna que es biocompatible con la muestra y no interacciona con biomoléculas; una matriz de sefarosa que confiere un ambiente hidrofílico favorable para los procesos de unión; y un ligando, en este caso, la heparina.

La cromatografía de afinidad como paso de purificación de la enzima responsable de actividad polifosfatasa se basa en el intercambio catiónico que confiere la heparina. El polifosfato, así como la heparina o los ácidos nucleicos son moléculas con similar estructura aniónica, denominadas polianiones (Figura 22). En este paso de purificación, la heparina actúa como un

mimético de la molécula de polifosfato permitiendo la unión tanto de proteínas de unión a ácidos nucleicos como proteínas de unión al polifosfato como, por ejemplo, la enzima responsable de su degradación.

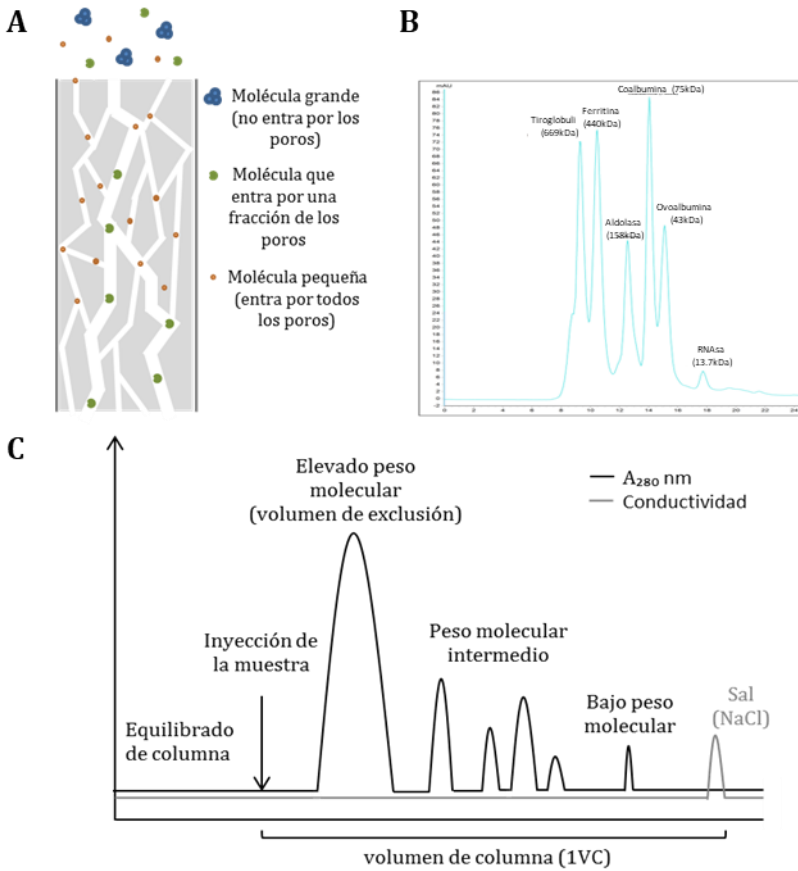


**Figura 22. Estructura química del polifosfato y la heparina.** El polifosfato y la heparina son polímeros de alto peso molecular que contienen grupos electrolitos en su estructura los cuales en contacto con soluciones acuosas se disocian generando carga negativa a la molécula y recibiendo el nombre de polianiones.

La cromatografía de afinidad ofrece alta selectividad y resolución, sin embargo, pueden unirse un amplio rango de biomoléculas como, por ejemplo, proteasas, enzimas de la coagulación, factores de crecimiento, proteínas de la matriz extracelular, proteínas de unión a ácidos nucleicos, receptores hormonales y lipoproteínas, las cuales confieren cierto grado de impureza a la muestra. Por ello, debido a que el nivel de pureza requerido es elevado se ha utilizado un segundo paso de purificación, una cromatografía de exclusión por tamaño.

#### ***9.4. Cromatografía de exclusión por tamaño***

Este tipo de cromatografía permite la separación de moléculas según las diferencias de tamaño a medida que pasan a través de un medio de filtración en gel empaquetado en una columna. En este tipo de cromatografía, las moléculas no se unen al medio, por lo que las muestras se eluyen isocráticamente y la composición del tampón no afecta directamente a la resolución (Figura 23). En consecuencia, una ventaja significativa de la filtración en gel es que las condiciones pueden variar para adaptarse al tipo de muestra o los requisitos para una purificación adicional.



**Figura 23. Proceso de la cromatografía de exclusión por tamaño. A.** Esquema dibujo de una muestra que difunde en los poros de una columna de exclusión por tamaño. Se muestra una descripción gráfica de la separación: la muestra, una vez aplicada en la columna, se separan las proteínas por tamaño eluyéndose primero las de mayor tamaño (azul) seguidamente las de tamaño intermedio (verde) y finalmente, las moléculas más pequeñas (naranja). **B.** Cromatograma de patrones de la columna Superdex 200 10/300GL. **C.** Cromatograma esquemático de una cromatografía de exclusión por tamaño.

En este caso, para llevar a cabo la purificación de la enzima con actividad polifosfatasa y debido a que no se conoce ni tamaño ni la capacidad de formación de complejos de la enzima a purificar he utilizado una columna que admite un amplio rango de tamaño, la columna Superdex 200 10/300 GL.

El Superdex es un medio de filtración en gel compuesto de dextrano y agarosa. El entramado formado por la combinación del dextrano con la agarosa proporciona estabilidad física y química para generar un medio de separación con elevada selectividad y resolución. Además, su baja interacción inespecífica permite un elevado porcentaje de recuperación de la muestra.

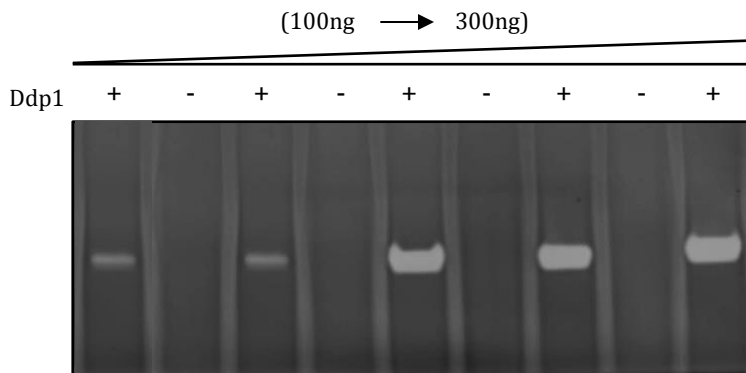
### *9.5. Zimograma*

La zimografía es una técnica que permite detectar la actividad de una enzima mediante la electroforesis de la muestra en condiciones nativas en un gel de acrilamida el cual ha co-polimerizado con el sustrato para dicha enzima. Después de la electroforesis, el gel se incuba con el tampón de reacción enzimática apropiado que permite que las enzimas presentes en la muestra se activen y digieran el sustrato co-polimerizado en el gel. Para que las áreas con actividad enzimática se vuelvan visibles, al finalizar la electroforesis se tiñe el sustrato fijado en el gel con algún colorante para proceder a su posterior revelado.

En este trabajo, la actividad enzimática que se pretende analizar es una polifosfatasa por lo que el sustrato de la reacción fijado en el gel es el polifosfato. Como se ha descrito en la introducción, el polifosfato es una molécula compuesta por fosfatos inorgánicos unidos por enlaces fosfoanhidro lo que le confiere a la molécula una carga aniónica elevada. La presencia de dicha carga negativa en la molécula dificulta su fijación en el gel por lo que he procedido, en este caso, a correr el sustrato juntamente con la muestra que contiene la enzima a 4°C, para evitar la degradación del sustrato.

Una vez finalizada la electroforesis, se ha incubado el gel en el tampón de reacción correspondiente a la enzima. Transcurrido el tiempo de incubación preciso he procedido a la tinción y revelado del gel.

Para la tinción y el revelado del zimograma he teñido el polifosfato con DAPI y revelado con un transiluminador de UV a 365 nm. De esta manera, los carriles del gel han quedado teñidos en color negro correspondiente a la presencia de polifosfato (sustrato de la reacción) mientras que las zonas donde ha habido actividad enzimática han quedado sin teñir (Figura 24).



**Figura 24. Figura 5. Zimograma de la enzima con actividad endopolifosfatasa de levadura, Ddp1.** Electroforesis de cantidades crecientes de Ddp1 recombinante (100-300ng) en un gel nativo de poliacrilamida al 15% con polifosfato de 100 residuos (polyP<sub>100</sub>) comercial fijado en el gel como sustrato de la reacción. La electroforesis se realiza en condiciones nativas a 100V, 4°C durante 3h. Posteriormente, se incuba el gel con tampón de reacción a 37°C durante 1h. Finalmente, se visualiza el polifosfato inmovilizado en el gel mediante tinción por DAPI. Las bandas blancas presentes en la visualización del gel corresponden a zonas sin polyP<sub>100</sub> y, por tanto, zonas con presencia de actividad polifosfatasa.

### 9.6. *Proteómica*

La proteómica de la banda de zimograma se ha llevado a cabo en el servicio de proteómica del *Cummings Life Science Center* de la Universidad de Chicago.

Brevemente, las muestras se sometieron a tripsinización en gel y los péptidos se analizaron por espectrometría de masas (LC-MS/MS). Los datos obtenidos de la LC-MS/MS se analizaron con la versión MaxQuant 1.5.2.8, según las intensidades LFQ. La intensidad de LFQ es un método en espectrometría de masas que tiene como objetivo determinar la cantidad relativa de proteínas en una muestra biológica. En este caso se analizaron los datos que presentaban un mínimo de 1 péptido de alta confianza.



## *Resultados*

---



### 1. Presencia de actividad polifosfatasa en rata

Como se ha descrito anteriormente en la literatura, el polyP desempeña un papel crucial en importantes procesos celulares en los diferentes tejidos del organismo.

En el caso de la sangre, el polyP es un potente modulador de la cascada de coagulación del plasma. Concretamente, el polyP favorece la coagulación sanguínea promoviendo la activación de factores involucrados en las distintas vías de coagulación. Por ello, el polyP ha recibido principal atención como posible agente terapéutico controlar la trombosis en enfermedades como el cáncer.

Además, el polyP desempeña una función celular importante como chaperona, es decir, estabiliza las proteínas no plegadas manteniendo su estructura en una forma más estable que impida su agregación. En cerebro, esta función celular se ha relacionado con otros procesos celulares más complejos como los procesos amiloidogénicos involucrados en enfermedades como el Parkinson o el Alzheimer. En estos procesos, el polyP actuaría como una chaperona generando un cambio estructural de los monómeros amiloidogénicos a fibrinas, una estructura más estable que impide la formación de los agregados tóxicos propios de la enfermedad.

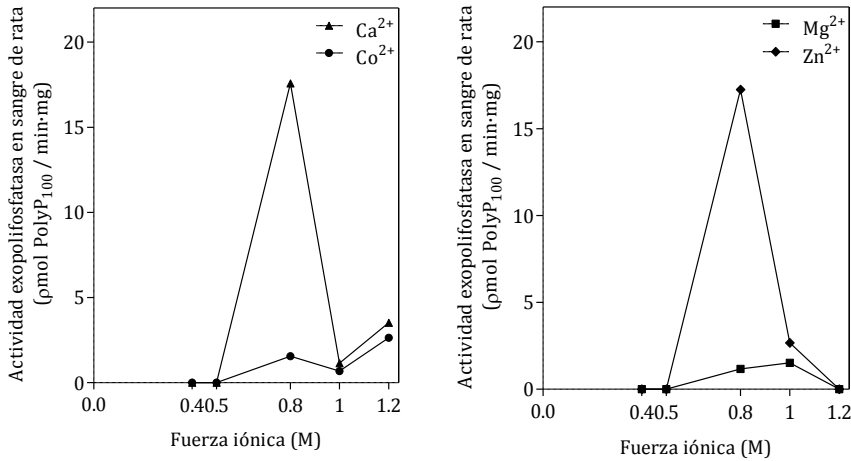
El importante papel del polyP en coagulación sanguínea y en los procesos amiloidogénicos sugiere la existencia de un mecanismo estricto que regule los niveles de polyP. A partir de aquí, he decidido plantear mi primer objetivo de la tesis el cual consiste en determinar las enzimas responsables de la degradación del polyP mediante la estrategia de purificación detallada en el apartado de Material y métodos.

## *1.1. Presencia de actividad polifosfatasa en sangre*

A partir de suero de rata, he realizado una cromatografía de afinidad de la que obtuve 5 fracciones a diferentes concentraciones de NaCl (0.4-0.5-0.8-1-1.2M). He ensayado cada una de estas fracciones para determinar la presencia de actividad polifosfatasa, tanto exopolifosfatasa como endopolifosfatasa. En el caso de la actividad exopolifosfatasa, he seleccionado los siguientes iones divalentes: calcio,  $\text{Ca}^{2+}$ ; cobalto,  $\text{Co}^{2+}$ ; magnesio,  $\text{Mg}^{2+}$  y zinc,  $\text{Zn}^{2+}$  para realizar el ensayo. La elección de los iones se debe a dos diferentes razones: la primera, es que algunos son utilizados por otras enzimas polifosfatasa ya descritas en levaduras como el  $\text{Mg}^{2+}$ , el  $\text{Co}^{2+}$  o el  $\text{Zn}^{2+}$  y, la segunda, desempeñan un papel importante en el proceso de coagulación sanguínea como es el caso del  $\text{Ca}^{2+}$ . En el caso de la actividad endopolifosfatasa, solo la he ensayado en presencia del ion  $\text{Mg}^{2+}$  ya que es el ion que está más relacionado con las actividades enzimáticas.

### *1.1.1. Presencia de actividad exopolifosfatasa en sangre*

El análisis de la actividad exopolifosfatasa de todas las fracciones de la cromatografía de afinidad muestra dos picos de actividad exopolifosfatasa mayoritarios situados en la fracción 0.8M en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  (17.58, 15.58 y 17.25 pmol polyP<sub>100</sub>/min·mg respectivamente) (Figura 25).



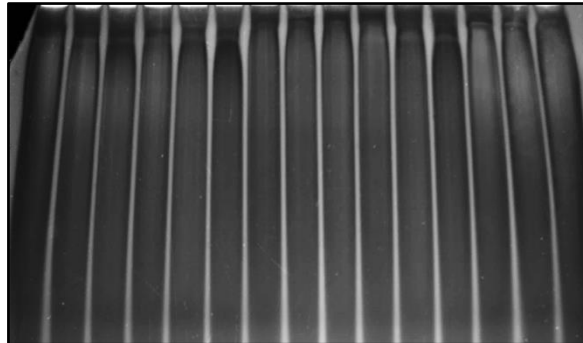
**Figura 25. Actividad exopolifosfatasa en sangre de rata.** Detección de múltiples actividades exopolifosfatasa en pmol PolyP<sub>100</sub> /min·mg en cinco fracciones provenientes de la cromatografía de afinidad de una muestra de plasma de rata. Los ensayos se han realizado con 25µg de proteína de cada fracción (0,4-0,5-0,8-1-1,2M NaCl) en un tampón de reacción que contiene 5mM Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> o Zn<sup>2+</sup> y 5µg polyP<sub>100</sub> comercial como sustrato de reacción en condiciones fisiológicas (pH 6.8; 36°C). A los 90 min de ensayo, se mira la formación de fosfato libre con verde de malaquita a A<sub>595</sub>nm.

El pico de actividad dependiente de Mg<sup>2+</sup> (1.52 pmol polyP<sub>100</sub>/min·mg) se ubica en la fracción 1M NaCl mientras que el pico de menor actividad exopolifosfatasa es dependiente de Co<sup>2+</sup> (0.68 pmol polyP<sub>100</sub>/min·mg) y se ubica en la fracción 0.8M NaCl. En el caso de la actividad dependiente de Co<sup>2+</sup> no se puede descartar la presencia de otros picos en fracciones inferiores a 0.4M NaCl o bien en la fracción 1.2M NaCl como así lo indica el patrón y el valor de las actividades en estas fracciones (1.55 y 2.64 pmol polyP<sub>100</sub>/min·mg respectivamente) (Figura 25).

### 1.1.2. Presencia de actividad endopolifosfatasa en sangre

El ensayo muestra que no hay actividad endopolifosfatasa dependiente de  $Mg^{2+}$  en sangre de rata (Figura 26). Sin embargo, hay que tener en cuenta que para este tipo de muestra no se han realizado ensayos en presencia de otros iones divalentes por lo que no se descarta la posibilidad de la existencia de una enzima con actividad endopolifosfatasa en sangre dependiente de otro ion.

Fuerza iónica (M):	0,4			0,5			0,8			1			1,2		
Tiempo de reacción (h):	0	2	4	0	2	4	0	2	4	0	2	4	0	2	4



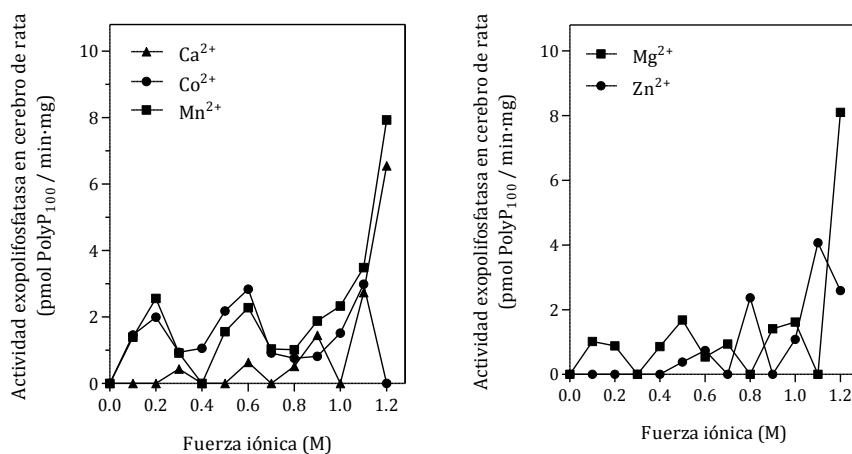
**Figura 26. Actividad endopolifosfatasa en sangre de rata.** Detección de la actividad endopolifosfatasa de cinco fracciones provenientes de la cromatografía de afinidad de una muestra de plasma de rata mediante un gel de poliacrilamida suplementado con urea 7M. El ensayo de actividad se ha realizado con 25  $\mu$ g de proteína de cada fracción (0,4-0,5-0,8-1-1,2M NaCl) de la cromatografía de afinidad en un tampón de reacción que contiene 5mM  $Mg^{2+}$  y 5  $\mu$ g polyP<sub>100</sub> comercial como sustrato de reacción en condiciones fisiológicas (pH 6.8; 36°C).

### *1.2. Presencia de actividad polifosfatasa en cerebro*

A partir de extracto de cerebro de rata, he realizado una cromatografía de afinidad de la que obtuve 12 fracciones a diferentes concentraciones de NaCl según gradiente (0-1.2M). He ensayado cada una de estas fracciones para determinar la presencia de actividad exopolifosfatasa y endopolifosfatasa. En ambos casos, he realizado los ensayos con los siguientes iones divalentes:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ .

#### *1.2.1. Presencia de actividad exopolifosfatasa en cerebro*

El análisis de las fracciones de la cromatografía de afinidad a partir de extracto de cerebro de rata muestra actividad exopolifosfatasa en la mayoría de las fracciones en presencia de todos los iones divalentes ensayados (Figura 27).



**Figura 27. Actividad exopolifosfatasa en cerebro de rata.** Detección de múltiples actividades exopolifosfatasa en pmol PolyP<sub>100</sub> /min·mg de trece fracciones provenientes de la elución en gradiente (0-1,2M NaCl) de una cromatografía de afinidad de extracto de cerebro de rata. Los ensayos se han realizado con 25µg de proteína de cada fracción en un tampón de reacción que contiene 5mM Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> o Zn<sup>2+</sup> y 5µg polyP<sub>100</sub> comercial como sustrato de reacción en condiciones fisiológicas (pH 6.8; 36°C). A los 90 min de ensayo, se mira la formación de fosfato libre con verde de malaquita a A<sub>595</sub>nm.

Analizando más en detalle las actividades de cada ion se puede observar una heterogeneidad de picos con actividad exopolifosfatasa. En el caso del ion Ca<sup>2+</sup>, se pueden observar distintos picos de actividad en las fracciones 0.3M, 0.6M, 0.9M y 1.2M NaCl (0.44, 0.64, 1.45 y 6.55 pmol polyP<sub>100</sub>/min·mg respectivamente). Para el ion Co<sup>2+</sup>, hay tres picos de actividad en las fracciones 0.2M, 0.6M y 1.1M (2, 2.8 y 2.9 pmol polyP<sub>100</sub>/min·mg respectivamente). Para el ion Mg<sup>2+</sup> se observan cuatro picos de actividad en las fracciones 0.2M, 0.5M, 1M y 1.2M NaCl (1.0, 1.7, 1.6 y 8.1 pmol polyP<sub>100</sub>/min·mg respectivamente). La actividad dependiente del ion Mn<sup>2+</sup> sigue un patrón similar al Co<sup>2+</sup> mostrando picos en la fracción 0.2M, 0.6M y 1.2M NaCl (2.6, 2.3 y 7.9 pmol polyP<sub>100</sub>/min·mg



respectivamente). Finalmente, la actividad dependiente de  $Zn^{2+}$  muestra dos picos en las fracciones 0.8M y 1.1M NaCl (2.3 y 4.0 pmol polyP<sub>100</sub>/min·mg respectivamente). El análisis de actividad exopolifosfatasa muestra una elevada heterogeneidad de actividades dependientes de los distintos iones divalentes en cada fracción, la cual puede relacionarse con una inespecificidad enzimática sugiriendo la opción que cualquier enzima con actividad fosfatasa podría estar realizando la actividad exopolifosfatasa presente en cada fracción.

Puesto que en la literatura se ha descrito que algunas enzimas del metabolismo energético de los microorganismos presentan actividad exopolifosfatasa, en este trabajo decidí evaluar si los picos de actividad exopolifosfatasa observados en las distintas muestras de tejido de rata podían corresponder a la actividad exopolifosfatasa llevada a cabo por las distintas fosfatasas del extracto. Para ello, realicé ensayos de actividad exopolifosfatasa de algunas de las enzimas del metabolismo energético en mamíferos como la fosfofructoquinasa (Pfk<sub>m</sub>), gliceraldehido-3-deshidrogenasa (Gapdh) y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6pdh) en presencia de los iones ensayados anteriormente.

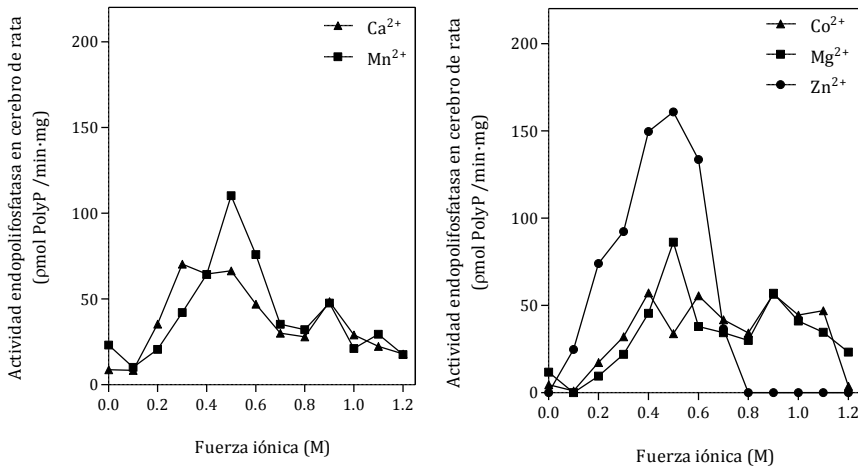
Fracción	Actividad específica (nmol/min·mg)	Ion divalente con mayor actividad
Pfk <sub>m</sub>	5,54	$Mg^{2+}$
Gapdh	3,09	$Mg^{2+}$
G6pdh	4,27	$Mg^{2+}$

**Tabla V.** Actividad exopolifosfatasa en nmol/min·mg de las enzimas del metabolismo de la glucosa.

En la tabla V. se muestra que las enzimas de la glucólisis presentan actividad exopolifosfatasa *in vitro* dependiente de  $Mg^{2+}$ . Estas actividades se dan en valor de nmol PolyP<sub>100</sub> /min·mg, un orden de magnitud 1000 veces superior a las observadas en la purificación de extracto de cerebro y suero de rata, lo que sugiere que estas enzimas pueden verse representadas en los picos de actividad exopolifosfatasa obtenidos en estas muestras. Sin embargo, estas actividades no justifican todos los picos observados en las actividades obtenidas a partir del extracto de tejido de rata puesto que todas ellas tienen actividad solo en presencia de  $Mg^{2+}$ .

### *1.2.2. Presencia de actividad endopolifosfatasa en cerebro*

El cerebro de rata presenta actividad endopolifosfatasa para todos los iones divalentes analizados ( $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ ) y aparece repartida en seis fracciones de la cromatografía de afinidad (0.2M, 0.3M, 0.4M, 0.5M, 0.6M y 0.9M NaCl) (Figura 28).



**Figura 28. Actividad endopolifosfatasa en cerebro de rata.** Detección de múltiples actividades endopolifosfatasa de trece fracciones provenientes de la elución en gradiente (0-1,2M NaCl) de una cromatografía de afinidad de extracto de cerebro de rata. Los ensayos se han realizado con 25µg de proteína de cada fracción en un tampón de reacción que contiene 5mM Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> o Zn<sup>2+</sup> y 5µg polyP<sub>100</sub> comercial como sustrato de reacción en condiciones fisiológicas (pH 6.8; 36°C). A los 90 min, se visualiza el ensayo en un gel de poliacrilamida con urea 7M al 16% teñido con DAPI. La cuantificación de la actividad para cada fracción se da en pmol/min·mg.

Analizando con mayor detalle los picos de actividad se puede observar que las fracciones 0.2M, 0.3M, 0.4 y 0.6M NaCl presentan actividad endopolifosfatasa en presencia de un único ion (0.2M/Zn<sup>2+</sup>- 73.9; 0.3M/Ca<sup>2+</sup>- 70.3; 0.4-0.6M/Co<sup>2+</sup>- 57.3 y 56.9 pmol polyP<sub>100</sub>/min·mg respectivamente). La fracción 0.5M NaCl presenta actividad endopolifosfatasa en presencia de cuatro iones (Ca<sup>2+</sup>- 48.6; Mg<sup>2+</sup>- 86.3; Mn<sup>2+</sup>- 110.3 y Zn<sup>2+</sup>- 160.9 pmol polyP<sub>100</sub>/min·mg) siendo el pico de actividad dependiente de Zn<sup>2+</sup> la actividad endopolifosfatasa más elevada en extracto de cerebro de rata. La fracción 0.9M presenta actividad en presencia de tres iones (Co<sup>2+</sup>- 56.5; Mg<sup>2+</sup>- 56.9; Mn<sup>2+</sup>- 47.7 pmol polyP<sub>100</sub>/min·mg).

Los resultados de este trabajo muestran la presencia de actividades endopolifosfatasa en el extracto con un patrón de distribución de picos de actividad muy definidos que, junto con la elevada actividad, sugieren la presencia de enzimas con especificidad por el polyP. A pesar de que hay distintos picos con actividad endopolifosfatasa que son interesantes para el estudio, finalmente, decido centrar este trabajo en hallar la enzima responsable de la actividad más elevada presente en el extracto la cual es dependiente de  $Zn^{2+}$ .

## **2. Nudt3 responsable de la actividad endopolifosfatasa dependiente de $Zn^{2+}$ en cerebro de rata**

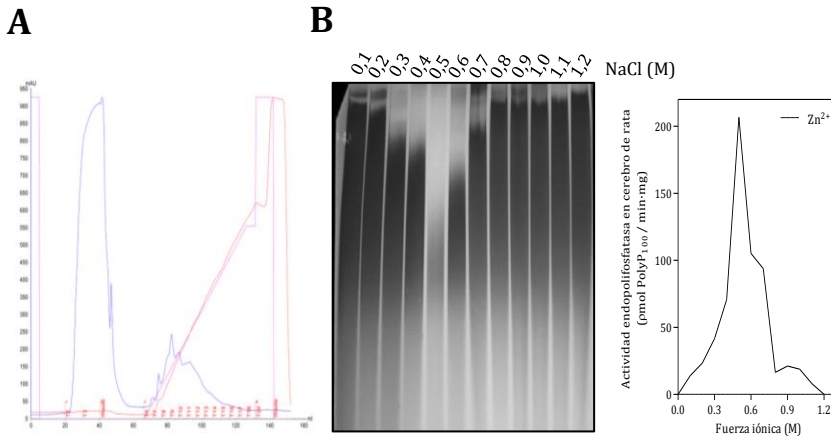
A partir de los resultados del apartado anterior, he planteado una estrategia de purificación y posterior determinación de la enzima responsable de la actividad endopolifosfatasa dependiente de  $Zn^{2+}$ . Este proceso de purificación consta de tres fraccionamientos: la primera es una cromatografía de afinidad; la segunda es una filtración en gel; y, finalmente, un zimograma.

### ***2.1. Cromatografía de afinidad de la actividad endopolifosfatasa dependiente de $Zn^{2+}$***

A partir del extracto de cerebro de rata he realizado una cromatografía de afinidad de la que he obtenido 12 fracciones a diferentes concentraciones de NaCl (0-1.2M) (Figura 29A). Los resultados muestran actividad endopolifosfatasa dependiente de  $Zn^{2+}$  en cuatro fracciones (0.3-0.4-0.5-0.6M NaCl) mostrando un pico de actividad máxima en la fracción 0,5M NaCl (Figura 29B).

La aparición de actividad endopolifosfatasa en cuatro fracciones consecutivas de la cromatografía de afinidad puede deberse a la baja presión de la FPLC (AktaStart) que hace que no se puedan discriminar picos proteicos y, por consiguiente, la enzima responsable de la actividad endopolifosfatasa se eluya en un gradiente de sal más amplio. Además, cabe destacar que las fracciones de la cromatografía de afinidad presentan una

mezcla compleja de proteínas que dificulta encontrar la enzima responsable de esta actividad. Este hecho hizo plantearme un paso de purificación adicional y complementario a la cromatografía de afinidad a partir de la fracción 0.5M NaCl.

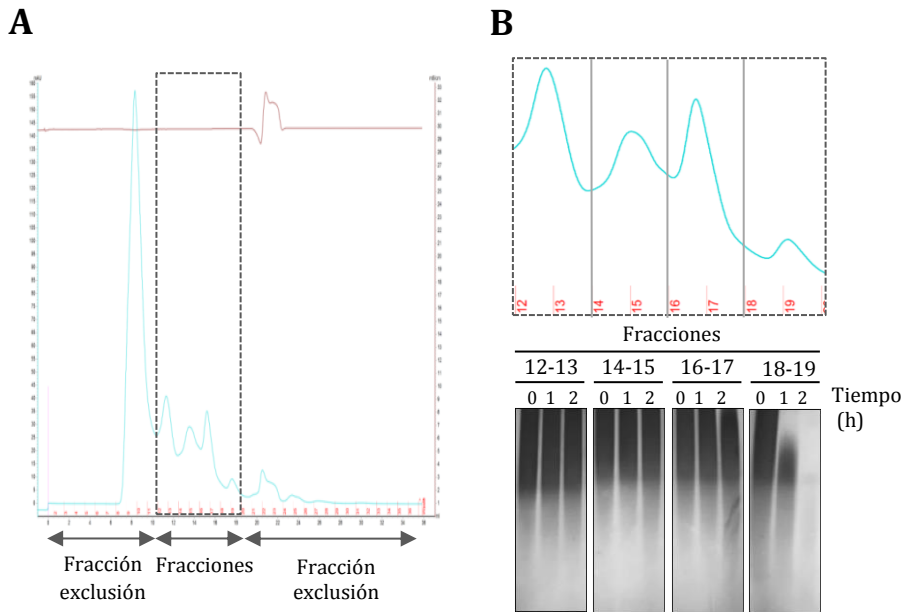


**Figura 29. Cromatografía de afinidad de la actividad endopolifosfatasa dependiente de  $Zn^{2+}$  de un extracto de cerebro de rata. A.** Cromatograma de la columna de afinidad. **B.** A la izquierda, ensayo de actividad endopolifosfatasa de las fracciones obtenidas en la cromatografía de afinidad. Se incuban 25  $\mu$ g de cada fracción en un tampón de reacción que contiene 5mM  $Zn^{2+}$  y 5 $\mu$ g polyP<sub>100</sub> comercial como sustrato de reacción en condiciones fisiológicas (pH 6.8; 36°C). A los 90 min, se visualiza en un gel de poliacrilamida 7M urea al 15% teñido con DAPI. A la derecha, la cuantificación de la actividad específica para cada fracción se da en pmol PolyP<sub>100</sub>/min·mg.

## *2.2. Filtración en gel de la actividad endopolifosfatasa dependiente de $Zn^{2+}$*

Posteriormente, teniendo en cuenta la complejidad proteica de las fracciones de la cromatografía de afinidad, decidí añadir un nuevo paso de purificación basado en una filtración en gel que me separará las proteínas por tamaño y disminuirá la complejidad de la muestra.

Siguiendo con mi estrategia de purificación, he realizado una filtración en gel de la fracción 0.5M NaCl puesto que presentaba el pico de mayor actividad. En la filtración en gel he obtenido 24 fracciones de las cuales he descartado 16 por formar parte del volumen de exclusión de la columna (Figura 30A). En un primer cribado de las fracciones, he analizado cada una de ellas individualmente mediante un ensayo de actividad endopolifosfatasa dependiente de  $Zn^{2+}$ . En este primer cribado no he observado actividad en ninguna de las fracciones probablemente porque un paso de filtración en gel en una purificación genera una dilución considerable de la muestra y, en consecuencia, la pérdida de actividad en las fracciones. Para solventar el problema de dilución de la muestra, he realizado un segundo cribado agrupando las fracciones por parejas. En este segundo cribado, sólo la pareja de fracciones 18-19 de la filtración en gel presentan actividad endopolifosfatasa dependiente de  $Zn^{2+}$  (Figura 30B). Según el patrón de proteínas con el que se ha equilibrado la columna de filtración en gel, la pareja de fracciones 18-19 corresponden a enzimas con un peso molecular entre 10,4 y 23,4 kDa (Figura 23 apartado de Material y métodos).



**Figura 30. Filtración en gel de la actividad endopolifosfatasa dependiente de  $Zn^{2+}$  de un extracto de cerebro de rata. A.** Cromatograma de la filtración en gel. **B.** Arriba, cromatograma correspondiente a las fracciones de la filtración en gel agrupando las fracciones por parejas para el ensayo. Abajo, Ensayo de actividad endopolifosfatasa de las parejas de fracciones obtenidas de la filtración en gel. Se incuban 0,5  $\mu$ g de cada fracción en un tampón de reacción que contiene 5mM  $Zn^{2+}$  y 5 $\mu$ g polyP<sub>100</sub> comercial como sustrato de reacción en condiciones fisiológicas (pH 6.8; 36°C) y se visualiza en un gel de poliacrilamida 7M urea al 15% teñido con DAPI.

### 2.3. Zimograma de la actividad endopolifosfatasa dependiente de $Zn^{2+}$

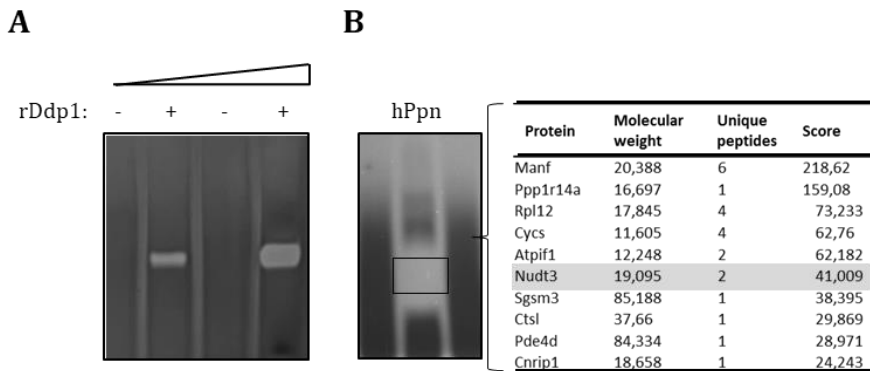
Para mejorar el rendimiento de la purificación y obtener una proteína en homogeneidad he decidido realizar un zimograma como último paso de purificación.

Como se detalla en el apartado 9.4 de Material y métodos, el zimograma es una técnica que permite detectar la actividad de una enzima en un gel de acrilamida que contiene el sustrato



para dicha enzima mediante la electroforesis de la muestra en condiciones nativas.

En el zimograma de la purificación de la enzima responsable de la actividad endopolifosfatasa dependiente de  $Zn^{2+}$  he cargado dos tipos de muestras: dos cantidades crecientes de proteína recombinante de una enzima con actividad endopolifosfatasa de levadura, Ddp1, y la pareja de fracciones 18-19 obtenida de la filtración en gel, paso anterior en la purificación. En el primer caso, he obtenido dos bandas con un patrón de actividad creciente a medida que aumenta la cantidad de rDdp1 (Figura 31A). En el zimograma de la fracción 18-19 de la filtración en gel he obtenido una banda de degradación que corresponde al lugar donde se ubica la enzima con actividad endopolifosfatasa la cual decidí llamar por el momento hPpn (Figura 31B).



**Figura 31. Zimograma de la purificación de la actividad endopolifosfatasa en cerebro de rata.** A la izquierda, se realiza la electroforesis de cantidades crecientes de Ddp1 recombinante utilizadas como control y de 1  $\mu$ g de proteína de la fracción de elución de la filtración en gel en un gel nativo de poliacrilamida al 15% con polifosfato de 100 residuos (polyP<sub>100</sub>) comercial fijado en el gel como sustrato de la reacción. La electroforesis se realiza en condiciones nativas a 100V, 4°C durante 3h. a 100V durante 3h. Posteriormente, se incuba el gel con tampón de reacción a 37°C durante 1h. Finalmente, se visualiza mediante tinción por DAPI. A la derecha, 10 primeras proteínas de la lista de proteómica obtenida de la banda de zimograma ordenadas por Score. En gris, se marca la propuesta como hPpn.

Finalmente, para hallar la enzima con dicha actividad, se recorta la banda del zimograma y se envía a un servicio de proteómica. Los resultados obtenidos de proteómica constan de una lista con 40 proteínas las cuales se organizaron por Score, puntuación estadística que valora el grado de coincidencia de los péptidos de la muestra con los péptidos introducidos en las bases de datos, y por péptidos únicos encontrados. De las diez primeras proteínas ordenadas por Score decidí resaltar Nudt3, una difosfoinositol polifosfato fosfohidrolasa descrita previamente como una enzima con actividad di-fosfo-inositol polifosfatasa y dinucleósido polifosfatasa (Figura 31B).

## *2.4. Rendimiento de la purificación de la actividad endopolifosfatasa dependiente de Zn<sup>2+</sup>*

Con la finalidad de conocer el grado de purificación obtenido durante el proceso de determinación de la enzima responsable de la actividad endopolifosfatasa dependiente de Zn<sup>2+</sup> a partir de un extracto de cerebro de rata, he calculado el rendimiento de la purificación mediante el cálculo de la actividad específica y la cantidad de proteína de cada paso de purificación. En la Tabla VI. muestro un resumen de los resultados obtenidos en los diferentes pasos de la purificación.

Fracción	Proteína (µg)	Actividad específica (µmol/min·mg)	Actividad total	Nivel de purificación	Rendimiento (%)
Extracto	226.200	27,04	6.116,44	1	100
Sobrenadante	120.480	28,07	3.381,87	1,04	55
Heparina	4.760	155,91	742,13	5,77	12,1
Superdex 200	112,5	1.984,35	223,24	73,36	3,7

**Tabla VI.** Purificación de la actividad endopolifosfatasa dependiente de Zn<sup>2+</sup> en cerebro de rata.

Al final del segundo fraccionamiento (filtración en gel) he obtenido un rendimiento del 3,7 % y un nivel de purificación de 73.36. Sin embargo, en la Tabla VI, hay que tener en cuenta que no he incluido el rendimiento que proporciona la técnica de zimografía debido a que no se puede estimar la cantidad de proteína que se encuentra en la banda de degradación por lo

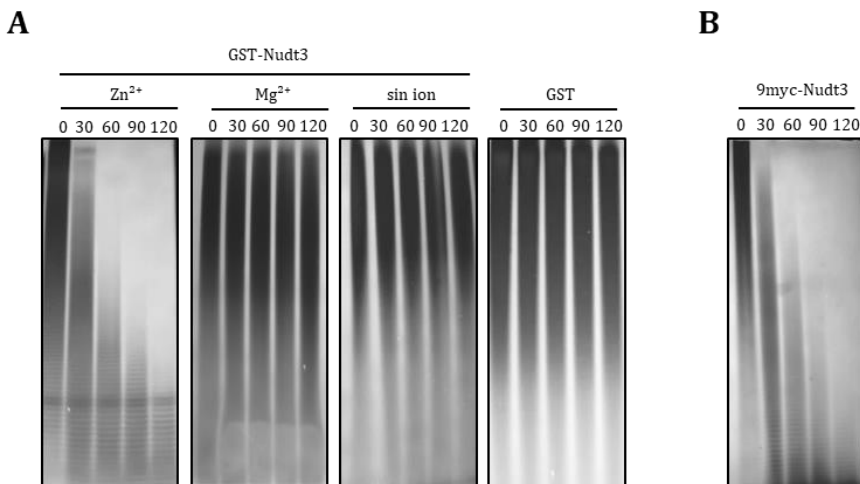
que hay que considerar que el rendimiento y el nivel de purificación para este proceso de purificación será superior.

### 3. Nudt3 es una endopolifosfatasa *in vitro*

#### 3.1. *Nudt3* recombinante tiene actividad endopolifosfatasa

Una vez seleccionada Nudt3 como posible endopolifosfatasa, procedí a su caracterización *in vitro*. Para ello, se procedió a la purificación de la proteína recombinante tanto de *E.coli* como de HEK293T.

Una de las principales actividades de Nudt3 descritas en la literatura es la actividad inositol pirofosfatasa la cual es dependiente del ion  $Mg^{2+}$ . Por ello, a partir de la purificación de Nudt3 recombinante de *E.coli* (GST-Nudt3), decidí realizar un ensayo de actividad endopolifosfatasa utilizando el ion  $Zn^{2+}$ , ion con el que presenta actividad endopolifosfatasa en la purificación, o el ion  $Mg^{2+}$ .



**Figura 32. Actividad endopolifosfatasa de Nudt3 recombinante de *E.coli* (GST-Nudt3) y recombinante de HEK293 (9myc-Nudt3). Ensayo de**

actividad endopolifosfatasa de 100ng de GST-Nudt3 (A) o bien 100ng de 9myc-Nudt3 (B) en un tampón de reacción que contiene 5mM  $Zn^{2+}$  y 5 $\mu$ g polyP<sub>100</sub> comercial como sustrato de reacción en condiciones fisiológicas (pH 6.8; 36°C). A las dos horas, se visualiza en un gel de poliacrilamida 7M urea al 15% teñido con DAPI. Como controles se realiza la actividad sin la enzima y sin ion en la reacción.

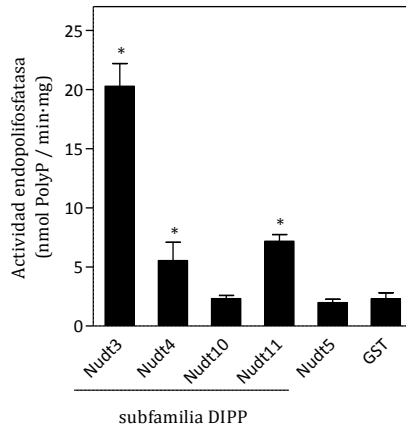
Los resultados de este ensayo muestran que Nudt3 tiene actividad dependiente de  $Zn^{2+}$  y no de  $Mg^{2+}$  (pH 6.8; 36°C) y, por lo tanto, es la enzima responsable de dicha actividad observada en cerebro de rata (Figura 32A).

Un segundo objetivo fue comprobar si GST-Nudt3 presenta la misma actividad que Nudt3 purificada de una línea celular humana, HEK293 (9myc-Nudt3). El ensayo de actividad endopolifosfatasa muestra que ambas proteínas presentan la misma actividad sugiriendo así que no existe ninguna modificación post-traducciona para su activación (Figura 32B). A partir de este resultado la caracterización *in vitro* de la proteína se ha realizado con GST-Nudt3.

### ***3.2. La familia DIPP presenta actividad endopolifosfatasa in vitro***

Como he comentado en el apartado de introducción, Nudt3 forma parte de una subfamilia de proteínas perteneciente a la familia Nudix conocida como DIPP. En este apartado, he analizado si todos los componentes de la subfamilia DIPP tienen actividad endopolifosfatasa, o bien, es una actividad exclusiva de Nudt3. Para ello, he realizado un ensayo endopolifosfatasa de GST-Nudt3, GST-Nudt4, GST-Nudt10, GST-Nudt11 (como miembros de la familia Nudix-DIPP) y GST-Nudt5 (como miembro de la familia Nudix no

pertenciente a la subfamilia DIPP) en presencia de  $Zn^{2+}$  (pH 6.8; 36°C).



**Figura 33. Actividad endopolifosfatasa de la subfamilia DIPP.** Ensayo endopolifosfatasa de 100ng de GST-Nudt3, GST-Nudt4, GST-Nudt10, GST-Nudt11 y GST-Nudt5 en un tampón de reacción que contiene 5mM  $Zn^{2+}$  y 5 $\mu$ g PolyP<sub>100</sub> como sustrato de reacción en condiciones fisiológicas (pH 6.8; 36°C). Cada tiempo se visualiza en un gel de poliacrilamida 7M urea al 15% teñido con DAPI. La actividad endopolifosfatasa se mide mediante la cuantificación de los geles utilizando el programa Image Studio Lite. Como control se realiza el ensayo de actividad sin ion. Para la significancia estadística se ha realizado la prueba estadística Mann-Whitney con los siguientes criterios de significación ( $p < 0.05$ (\*);  $p < 0.01$ (\*\*);  $p < 0.001$ (\*\*\*)).

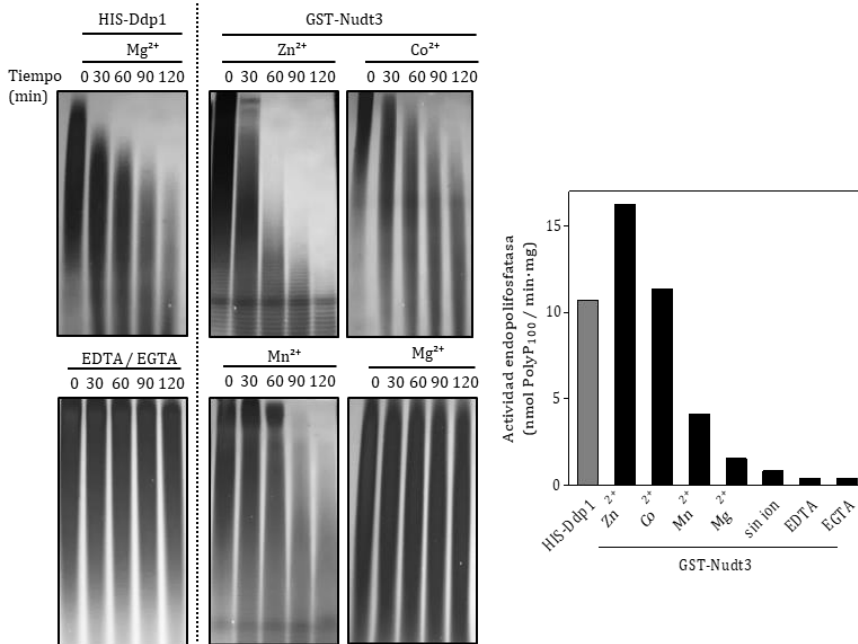
El ensayo muestra que Nudt3 presenta una elevada actividad endopolifosfatasa dependiente de  $Zn^{2+}$  en comparación con los otros miembros de la familia DIPP. A pesar de que Nudt4 y Nudt11 también presentan actividad endopolifosfatasa en comparación con el control negativo (GST), esta actividad es muy baja sugiriendo que Nudt3 es la principal enzima que realiza la acción a nivel celular (Figura 33).

### ***3.3. Nudt3 tiene actividad endopolifosfatasa en presencia de distintos iones divalentes***

Anteriormente, en la figura 27, aparecían varios picos de actividad endopolifosfatasa en la fracción 0,5 M NaCl de la cromatografía de afinidad correspondiente a la actividad de una o varias enzimas en función del catión presente en el ensayo a pH 6.8 y 36°C. Esto sugiere que o bien Nudt3 es la responsable de todos los picos de actividad en esta fracción y, por tanto, presenta una actividad endopolifosfatasa promiscua independientemente del catión, o bien que los picos pertenezcan a otras enzimas con actividad endopolifosfatasa.

Para testar esta hipótesis, he realizado un ensayo de actividad endopolifosfatasa de GST-Nudt3 con distintos iones.





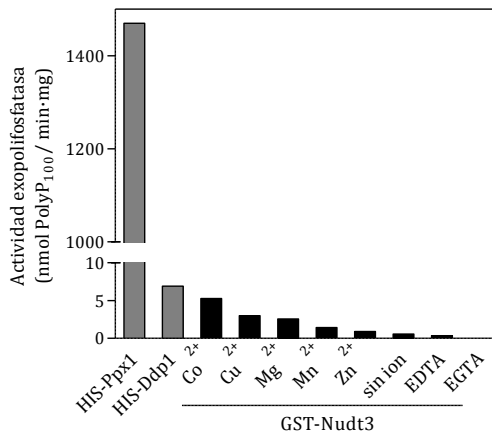
**Figura 34. Actividad endopolifosfatasa de rNudt3 con diferentes iones.** Ensayo de actividad endopolifosfatasa de 100ng de GST-Nudt3 en un tampón de reacción que contiene 5mM Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> Zn<sup>2+</sup> o EDTA/EGTA y 5µg polyP<sub>100</sub> comercial como sustrato de reacción en condiciones fisiológicas (pH 6.8; 36°C). Finalmente, se visualiza en un gel de poliacrilamida 7M urea al 15% teñido con DAPI. Como control positivo se realiza un ensayo de actividad endopolifosfatasa con 100ng de HIS-Ddp1. La actividad endopolifosfatasa específica se da en nmol PolyP<sub>100</sub> / min·mg mediante la cuantificación de los geles de poliacrilamida.

En este ensayo se observa que Nudt3 presenta actividad endopolifosfatasa con otros iones diferentes a Zn<sup>2+</sup> en la reacción como el Co<sup>2+</sup> o el Mn<sup>2+</sup>, aunque ambas actividades son inferiores a la actividad dependiente de Zn<sup>2+</sup>. Sin embargo, no presenta actividad endopolifosfatasa en ausencia de ion o en presencia de Mg<sup>2+</sup> como es el caso de su homólogo en levaduras, Ddp1. Además, Nudt3 presenta una actividad endopolifosfatasa dependiente de Zn<sup>2+</sup> superior a la actividad endopolifosfatasa

dependiente de  $Mg^{2+}$  de su homólogo en levaduras, Ddp1 (Figura 34).

### 3.4. *Nudt3* no tiene actividad exopolifosfatasa

Como se ha mencionado en la introducción, hay enzimas que pueden presentar tanto actividad endopolifosfatasa como actividad exopolifosfatasa en función del ion presente en la reacción como es el caso de la enzima Ppn1 de levaduras. Teniendo en cuenta dicha capacidad de algunas enzimas he procedido a realizar una serie de ensayos para determinar la actividad exopolifosfatasa de Nudt3 en presencia de distintos iones en el ensayo.

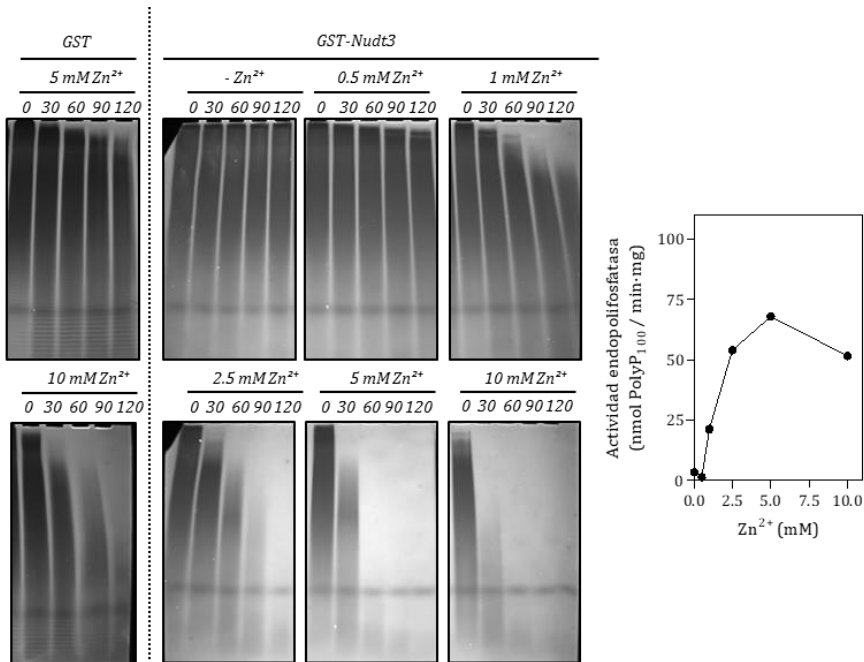


**Figura 35. Actividad exopolifosfatasa de GST-Nudt3 con diferentes iones.** Ensayo de actividad exopolifosfatasa de 100ng de GST-Nudt3 en un tampón de reacción que contiene 5mM  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$   $Zn^{2+}$  o EDTA/EGTA y 5 $\mu$ g polyP<sub>100</sub> comercial como sustrato de reacción en condiciones fisiológicas (pH 6.8; 36°C). La actividad exopolifosfatasa específica se da en nmol PolyP<sub>100</sub> / min-mg mediante la cuantificación de fosfato libre ( $PO_3^-$ ) con verde de malaquita midiendo absorbancia a  $A_{595nm}$ . Como controles se realizan ensayos exopolifosfatasa de 1ng HIS-Ppx1, 25ng de HIS-Ddp1.

Nudt3 tiene una actividad exopolifosfatasa en presencia de cualquier ion parecida a la actividad exopolifosfatasa que presenta su homólogo Ddp1. Además, se puede considerar que esta actividad exopolifosfatasa es muy baja en comparación con la actividad que presenta la enzima con actividad exopolifosfatasa en levaduras, Ppx1 (Figura 35).

### *3.5. Nudt3 tiene actividad endopolifosfatasa a partir de 1 mM Zn<sup>2+</sup>*

La purificación de Nudt3 a partir de cerebro de rata, así como los ensayos de actividad endopolifosfatasa posteriores se han realizado con una concentración de Zn<sup>2+</sup> de 5 mM en el tampón de reacción y en condiciones fisiológicas de temperatura y pH. Puesto que la actividad endopolifosfatasa de Nudt3 es dependiente de Zn<sup>2+</sup> pretendí encontrar la concentración de Zn<sup>2+</sup> a la que la actividad de Nudt3 es máxima. Para ello, he realizado ensayos de actividad endopolifosfatasa con concentraciones crecientes de Zn<sup>2+</sup> en la reacción en condiciones fisiológicas de pH y temperatura.



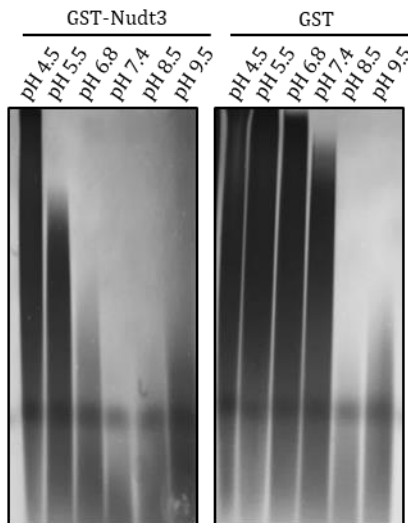
**Figura 36. Actividad endopolifosfatasa de GST-Nudt3 a diferentes concentraciones de  $Zn^{2+}$ .** Ensayo de actividad endopolifosfatasa de 100ng de rNudt3 en un tampón de reacción que contiene 0, 0.5, 1, 2.5, 5 y 10mM  $Zn^{2+}$  y  $5\mu g$  polyP<sub>100</sub> comercial como sustrato de reacción en condiciones fisiológicas (pH 6.8; 36°C). Finalmente, se visualiza en un gel de poliacrilamida 7M urea al 15% teñido con DAPI. Como control se realiza un ensayo de actividad endopolifosfatasa sin GST-Nudt3. La actividad endopolifosfatasa específica se da en nmol PolyP<sub>100</sub>/min·mg mediante la cuantificación de los geles de poliacrilamida.

Los resultados muestran que Nudt3 tiene su máxima actividad endopolifosfatasa cuando se ensaya con 5 mM de  $Zn^{2+}$ . Además, también observamos que si incrementamos la concentración a 10 mM  $Zn^{2+}$ , Nudt3 disminuye su actividad por lo que un exceso de  $Zn^{2+}$  genera una inhibición de la enzima. También cabe destacar que el ensayo en presencia de 10mM  $Zn^{2+}$  genera la degradación inespecífica del polyP manifestando así una de las características químicas del polyP, su

inestabilidad frente a elevadas concentraciones de un ion divalente (Figura 36).

### 3.6. *Nudt3* tiene actividad endopolifosfatasa a pH entre 6.8-7.5

Durante la purificación de la actividad endopolifosfatasa dependiente de  $Zn^{2+}$  partir de extracto de cerebro de rata se realizaron los ensayos a un pH de 6.8 a  $36^{\circ}C$ . Para confirmar que estas condiciones de ensayo corresponden al máximo de actividad de la enzima y a fin de determinar el rango de pH en que *Nudt3* es activo, he realizado un ensayo de actividad endopolifosfatasa con un gradiente de pH a  $36^{\circ}C$ .



**Figura 37. Actividad endopolifosfatasa de GST-Nudt3 en distintas condiciones de pH.** Ensayo de actividad endopolifosfatasa de 100ng de GST-Nudt3 en un tampón de reacción que contiene 5mM  $Zn^{2+}$  y  $5\mu g$  polyP<sub>100</sub> comercial como sustrato de reacción a  $36^{\circ}C$  en distintas condiciones de pH. Finalmente, se visualiza en un gel de poliacrilamida 7M urea al 15% teñido con DAPI. Como control se realiza el ensayo de actividad endopolifosfatasa sin GST-Nudt3.

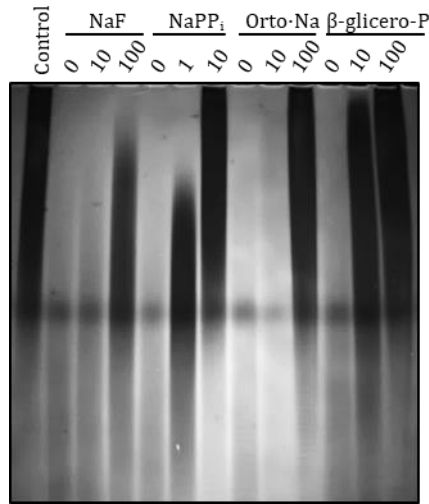
Los resultados muestran que las condiciones de ensayo empleadas en la purificación de la actividad endopolifosfatasa dependiente de  $Zn^{2+}$  (pH 6,8; 36°C) corresponden a las condiciones óptimas de ensayo de Nudt3. Para pH ácidos (pH<5,5) Nudt3 pierde su actividad endopolifosfatasa mientras que para pH básicos (pH>7,5) no se ha podido testar debido a que el polyP de la reacción utilizado como sustrato se degrada inespecíficamente sin la presencia de Nudt3 (Figura 37).

### *3.7. Inhibidores de la actividad endopolifosfatasa de Nudt3*

Para la caracterización de Nudt3 he realizado un ensayo endopolifosfatasa con los inhibidores de fosfatasas típicamente utilizados en investigación básica: fluoruro sódico (NaF), pirofosfato sódico (NaPP<sub>i</sub>), ortovanadato sódico (Orto-Na) y β-glicerofosfato (β-gliceroP).

Como se ha comentado en la Introducción, se ha descrito que existe una relación entre los niveles celulares de polifosfato e inositoles pirofosfato y que, además, la incubación de una línea celular con 100mM de NaF durante 15 min incrementa los niveles celulares de inositoles pirofosfato. Probablemente, este hecho pueda deberse a que el NaF puede actuar como un inhibidor de la actividad fosfatasa de Nudt3. En el caso de los inhibidores NaPP<sub>i</sub> y β-glicero-P se evalúa la inhibición por acumulación del producto de la reacción ya que la adición de estos inhibidores incrementa la concentración de pirofosfato (PP<sub>i</sub>) y fosfato libre (PO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

Para evaluar la inhibición de cada inhibidor he realizado el ensayo con dos concentraciones diferentes y he evaluado el tamaño del polyP a los 30 min de la adición de GST-Nudt3.



**Figura 38. Actividad endopolifosfatasa de GST-Nudt3 en distintas condiciones de pH.** Ensayo de actividad endopolifosfatasa de 100ng de GST-Nudt3 en un tampón de reacción que contiene 5mM  $Zn^{2+}$  y 5 $\mu$ g polyP<sub>100</sub> comercial como sustrato de reacción y cantidades crecientes de inhibidores de fosfatasas en condiciones fisiológicas (pH 6.8; 36°C). A los 30 min de ensayo, se visualiza en un gel de poliacrilamida 7M urea al 15% teñido con DAPI. Como control se realiza el ensayo de actividad endopolifosfatasa sin inhibidor.

Los resultados del ensayo muestran que la actividad endopolifosfatasa de Nudt3 también se inhibe con NaF a una concentración de 100mM igual que manifiestan la mayoría de los miembros de la familia NUDIX (Figura 38).

Los resultados muestran que la actividad endopolifosfatasa de Nudt3 se inhibe a una concentración de 10mM NaPP<sub>i</sub> y β-glicero-P indicando que Nudt3 puede ser inhibida por producto final de la reacción (Figura 38).

Finalmente, los resultados muestran que Nudt3 también puede ser inhibida por otro inhibidor utilizado ampliamente en un laboratorio de bioquímica como el Ortovanadato sódico (Orto-Na) a una concentración de 100 mM (Figura 38).

### ***3.8. El aminoácido aspártico (E70) responsable de la actividad catalítica de Nudt3***

Como se ha comentado en la introducción, mediante la alineación múltiple de secuencias de la familia Nudix y por mutagénesis dirigida se determinaron los aminoácidos que componen el centro catalítico de la familia Nudix y, por consiguiente, los aminoácidos pertenecientes al centro catalítico de Nudt3. En la región catalítica de Nudt3 destacan cuatro aminoácidos glutámicos y dos regiones ricas en glicinas que son clave para la actividad catalítica de Nudt3. Además, se describe una región rica en aminoácidos con carga positiva que facilita la unión de sustratos de Nudt3 de carga negativa (Figura 39A).

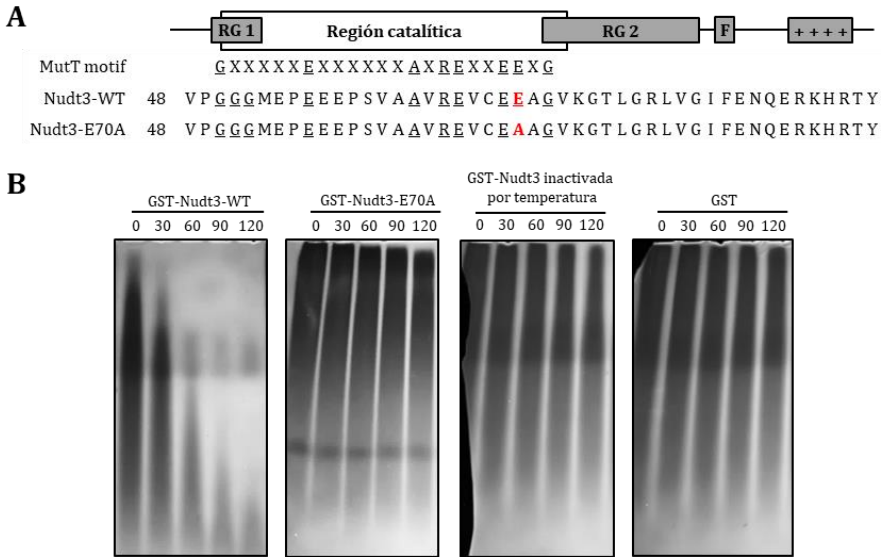
Con la finalidad de comprobar si Nudt3 presenta más de un centro catalítico, procedí a realizar un mutante Nudt3 catalíticamente inactivo.

Para construir dicho mutante, realicé una mutación en el glutámico (E) 70 por un alanina (A), E70A, ya que es el aminoácido responsable de la actividad inositol pirofosfatasa ya descrita para Nudt3 (Figura 39A).

El ensayo muestra que mutando el mismo aminoácido del centro catalítico que es responsable de la actividad inositol pirofosfatasa también se anula la actividad endopolifosfatasa de Nudt3 indicando que Nudt3 presenta un único centro catalítico



con el que realiza la actividad fosfatasa para sus distintos sustratos (Figura 39B).



**Figura 39. Actividad endopolifosfatasa de GST-Nudt3 *wild-type* (WT) y GST-Nudt3 mutante (E70A).** **A.** Esquema de los dominios funcionales de Nudt3: dos regiones ricas en glicinas (RG1 y RG2), región catalítica que contiene el motivo MutT, un residuo de fenilalanina (F) conservado en las proteínas con un dominio catalítico MutT y una región de aminoácidos con potencial electrostático positivo. Los aminoácidos subrayados indican los aminoácidos idénticos respecto al motivo MutT. En rojo, se marca el aminoácido catalítico mutado (E70A). **B.** Ensayo de actividad endopolifosfatasa de 100ng de GST-Nudt3-WT, GST-Nudt3-E70A, GST-Nudt3-WT inactivada por temperatura (95°C; 5min) en un tampón de reacción que contiene 5mM Zn<sup>2+</sup> y 5µg polyP<sub>100</sub> comercial como sustrato de reacción en condiciones fisiológicas (pH 6.8; 36°C). A las dos horas, se visualiza en un gel de poliacrilamida 7M urea al 15% teñido con DAPI. Como control negativo se realiza la actividad sin la enzima.

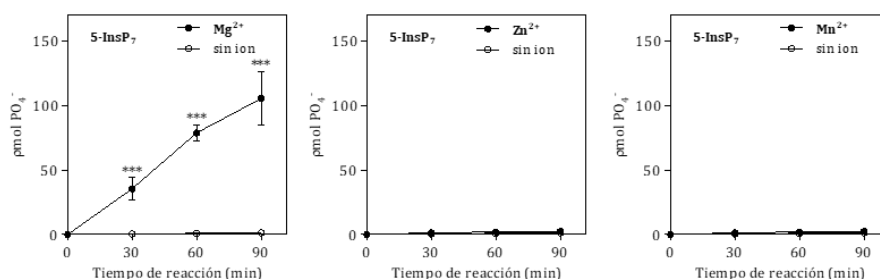
### 3.9. *Sustratos de Nudt3*

Puesto que Nudt3 es una proteína pequeña con un solo centro catalítico y una única región rica en aminoácidos de carga positiva que facilita la unión del sustrato he decidido estudiar la especificidad de Nudt3 para los distintos sustratos.

Como se ha descrito en la Introducción, Nudt3 tiene distinta actividad fosfatasa en función del sustrato habiendo sido descritas en la literatura dos actividades distintas: la actividad inositol pirofosfatasa y la actividad dinucleósido oligofosfatasa. En el primer caso se trata de una actividad fosfatasa *in vitro* dependiente del ion  $Mg^{2+}$  mientras que el segundo caso es una actividad fosfatasa *in vitro* dependiente del ion  $Mn^{2+}$  ambas en condiciones fisiológicas de pH y temperatura (pH 6.8; 37°C). Puesto que en este trabajo he encontrado una nueva actividad de Nudt3 dependiente de  $Zn^{2+}$ , un nuevo objetivo es determinar si la especificidad de sustrato de Nudt3 viene determinada por el ion divalente presente en la reacción.

#### 3.9.1. *La actividad inositol pirofosfatasa de Nudt3 es dependiente de $Mg^{2+}$*

Para determinar si la actividad inositol pirofosfatasa es exclusivamente dependiente de  $Mg^{2+}$  he realizado un ensayo de actividad inositol pirofosfatasa con GST-Nudt3 a diferentes tiempos en presencia de los tres iones clave en las distintas actividades fosfatasas de Nudt3.

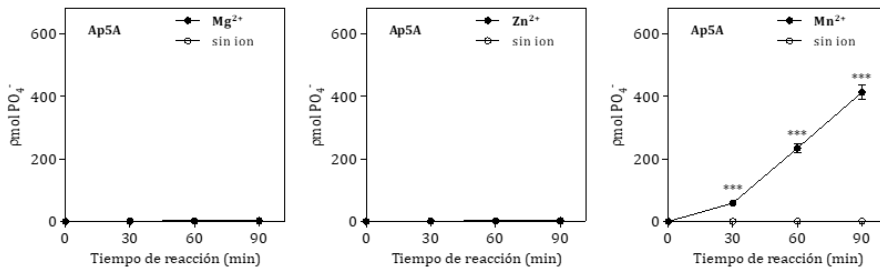


**Figura 40. Actividad inositol pirofosfatasa de GST-rNudt3.** Ensayo enzimático *time-course* de 100ng de GST-Nudt3 en un tampón de reacción que contiene 5mM Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup> y 5μg 5-InsP<sub>7</sub> como sustrato de reacción en condiciones fisiológicas (pH 6.8; 36°C). La actividad inositol pirofosfatasa se mide cuantificando el fosfato libre (PO<sub>3</sub><sup>-</sup>) con verde de malaquita a una absorbancia de A<sub>595nm</sub>. Como control se realiza el ensayo de actividad sin ion. Para la significancia estadística se ha realizado un análisis de varianza ANOVA con los siguientes criterios de significación ( $p < 0.05$ (\*);  $p < 0.01$ (\*\*);  $p < 0.001$ (\*\*\*)).

Los resultados muestran que la actividad inositol pirofosfatasa de Nudt3, como se ha descrito en la literatura, es dependiente de Mg<sup>2+</sup> y no presenta ninguna actividad en presencia de ninguno de los dos iones restantes, Zn<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup> (Figura 40).

### 3.9.2. La actividad dinucleósido oligofosfatasa de Nudt3 es dependiente de Mn<sup>2+</sup>

Nuevamente, para determinar si la actividad dinucleósido oligofosfatasa es exclusivamente dependiente de Mn<sup>2+</sup> he realizado un ensayo de actividad dinucleósido oligofosfatasa con GST-Nudt3 a diferentes tiempos en presencia de los tres iones clave en las distintas actividades fosfatasas de Nudt3.

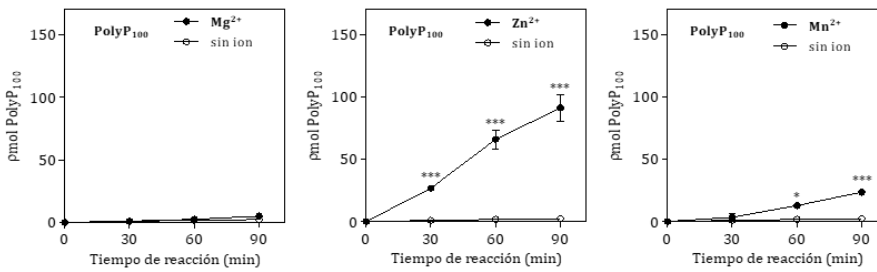


**Figura 41. Actividad dinucleósido oligofosfatasa de GST-Nudt3.** Ensayo enzimático *time-course* de 100ng de GST-Nudt3 en un tampón de reacción que contiene 5mM Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup> y 5μg Ap5A como sustrato de reacción en condiciones fisiológicas (pH 6.8; 36°C). La actividad dinucleósido oligofosfatasa se mide cuantificando el fosfato libre (PO<sub>3</sub><sup>-</sup>) con verde de malaquita a una absorbancia de A<sub>595nm</sub>. Como ion control se realiza el ensayo de actividad sin ion. Para la significancia estadística se ha realizado un análisis de varianza ANOVA con los siguientes criterios de significación ( $p < 0.05$ (\*);  $p < 0.01$ (\*\*);  $p < 0.001$ (\*\*\*)).

Igual que ocurre en la actividad inositol pirofosfatasa, la actividad dinucleósido oligofosfatasa es exclusivamente dependiente de Mn<sup>2+</sup> y no presenta ninguna actividad en presencia de ninguno de los dos iones restantes, Zn<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> (Figura 41).

### 3.9.3. Actividad endopolifosfatasa de Nudt3 es dependiente de Zn<sup>2+</sup>

En el apartado 4.2 de Resultados se muestra que Nudt3 presenta una elevada actividad endopolifosfatasa dependiente de Zn<sup>2+</sup> y, además, una baja actividad en presencia de Mn<sup>2+</sup>. Para ver la relevancia del valor de dichas actividades endopolifosfatasa de Nudt3 he realizado un ensayo endopolifosfatasa de GST-Nudt3 a diferentes tiempos en de Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>.



**Figura 42. Actividad endopolifosfatasa de GST-Nudt3.** Ensayo enzimático *time-course* de 100ng de GST-Nudt3 en un tampón de reacción que contiene 5mM Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup> y 5μg Ap5A como sustrato de reacción en condiciones fisiológicas (pH 6.8; 37°C). Cada tiempo se visualiza en un gel de poliacrilamida 7M urea al 15% teñido con DAPI. La actividad endopolifosfatasa se mide mediante la cuantificación de los gels utilizando el programa Image Studio Lite. Como control se realiza el ensayo de actividad sin ion. Para la significancia estadística se ha realizado un análisis de varianza ANOVA con los siguientes criterios de significación ( $p < 0.05$ (\*);  $p < 0.01$ (\*\*);  $p < 0.001$ (\*\*\*)).

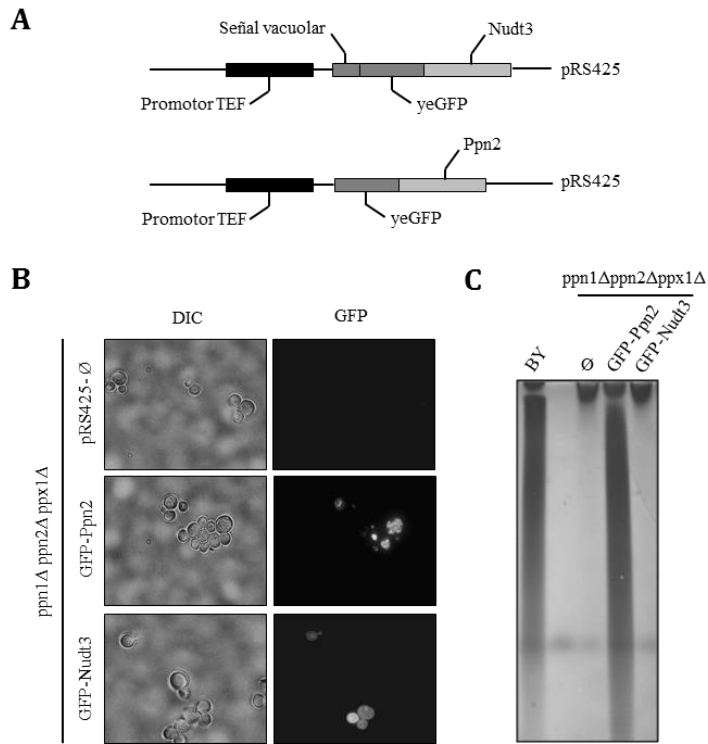
El ensayo muestra que hay una actividad endopolifosfatasa significativa dependiente de Zn<sup>2+</sup> y otra actividad significativa, aunque de menor valor, dependiente de Mn<sup>2+</sup>. La existencia de actividad endopolifosfatasa dependiente de Mn<sup>2+</sup> es esperable puesto que la actividad dinucleósido oligofosfatasa es exclusiva de Mn<sup>2+</sup> y los sustratos presentan similitud de estructura ya que el dinucleósido Ap5a contiene una cadena de polifosfato de 5 residuos que unen los dos nucleósidos, lugar donde Nudt3 realiza la hidrólisis enzimática (Figura 42).

## 4. Nudt3 es una endopolifosfatasa dependiente de $Zn^{2+}$ *in vivo*

### 4.1. Sobreexpresión de Nudt3 en levaduras

A fin de comprobar si Nudt3 es una endopolifosfatasa *in vivo*, he decidido expresar Nudt3 en un organismo heterólogo, la levadura. Para ello, he decidido realizar una construcción de Nudt3 con una señal vacuolar que la dirija a la vacuola de la levadura donde se encuentra almacenado el polyP. Además de la señal vacuolar, también he añadido un GFP a fin de poder seguir la expresión de Nudt3 mediante microscopía, todo ello, bajo un promotor constitutivo, un promotor TEF (Figura 43A).

Esta construcción la he clonado en un plásmido pRS425 multicopia y la he transformado en una cepa de levadura *Wild-type* (BY4748) y una cepa triple mutante en las que se ha deletado los genes que codifican para las polifosfatasas de levadura (BY4748 *ppn1Δppn2Δppx1Δ*), la cual presenta un fenotipo característico que consiste en un polyP altamente ramificado que se queda en la parte superior del gel de poliacrilamida al 15% suplementado con 7M urea. Como control positivo he utilizado una construcción con Ppn2, una de las endopolifosfatasas de levadura responsable del fenotipo característico de la cepa *ppn1Δppn2Δppx1Δ* (Figura 43A).



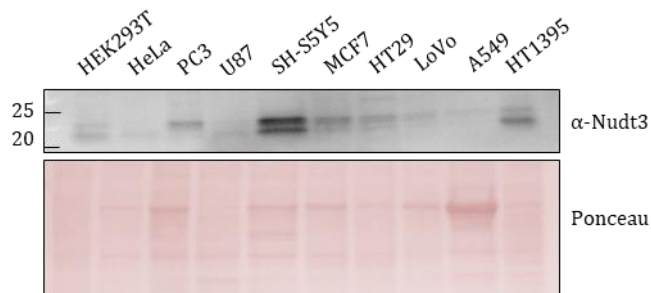
**Figura 43. Actividad endopolifosfatasa de Nudt3 en levadura. A.** Esquema de la construcción de Nudt3 y Ppn2 clonada en el plásmido pRS425. **B.** Imágenes de microscopía de la expresión de Nudt3 y Ppn2 en las cepas de levadura *Wild-type* (BY4748) y triple mutante (BY4748 *pnp1Δpnp2Δppx1Δ*). **C.** Niveles y estructura del polyP vacuolar en un gel de poliácridamida al 15% suplementado con 7M urea y teñido con DAPI.

Primeramente, se observa que tanto Nudt3 como Ppn2 tienen elevada expresión en la levadura y que, además, se encuentra localizada en la membrana vacuolar (Figura 43B). En el caso de la estructura de la molécula de polyP, la sobreexpresión de Ppn2 mediante un plásmido pRS425 es capaz de revertir el fenotipo característico de la cepa triple mutante (BY4748 *pnp1Δpnp2Δppx1Δ*) y degradar así el polyP almacenado en la vacuola. Sin embargo, la sobreexpresión de

Nudt3 no es capaz de revertir el fenotipo de la cepa *ppn1Δppn2Δppx1Δ* (Figura 43C).

#### 4.2. *Nudt3 es una endopolifosfatasa in vivo*

Para demostrar que Nudt3 es una endopolifosfatasa *in vivo* en mamíferos decidí realizar una sobreexpresión en una línea celular de mamífero. Para determinar cuál es la línea celular que se ajusta a nuestro modelo genético he realizado un Western Blot de los niveles de Nudt3 en distintas líneas celulares de mamífero que teníamos disponibles en el laboratorio, todas ellas líneas tumorales humanas de próstata, cerebro, mama, pulmón y colon a excepción de las HEK293T la cual es una línea embrionaria de riñón (Figura 44).



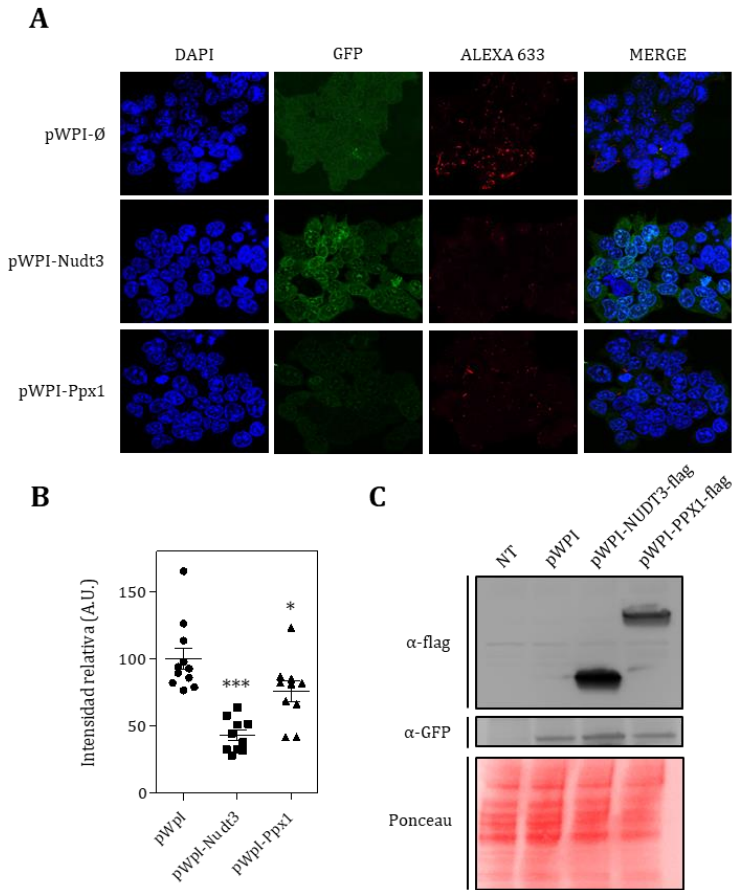
**Figura 44. Western Blot de los niveles de Nudt3 en distintas líneas celulares de mamífero.** En cada carril se ha cargado 40  $\mu$ g de extracto celular de cada una de las líneas celulares de mamífero. Como control de carga se ha realizado una tinción de Ponceau.

El Western Blot revela diferentes niveles de expresión según la línea celular y, además, cabe destacar que Nudt3 también presenta un patrón de expresión variable en forma de doblete con distinto nivel de expresión. Para valorar los niveles de Nudt3 para cada línea celular he cuantificado las dos bandas



de expresión mostrando la siguiente relación: SH-SY5Y > HT29 > MCF7 > LoVo > HT1395 > U87 > PC3 > HEK293T > HeLa > A549. En este caso se destaca SH-SY5Y, una línea de neuroblastoma, como la línea celular con mayor expresión de Nudt3 y A549, una línea de cáncer de pulmón, como la línea celular con los niveles más bajos (Figura 44).

A partir de este resultado procedí a utilizar HEK293T como línea celular de mamífero para la sobreexpresión de Nudt3 por dos características principales: la primera, los niveles de Nudt3 son bajos lo que nos permitirá observar el fenotipo de una sobreexpresión y, la segunda, los niveles de polyP son elevados lo que nos permitirá seguir una posible degradación.



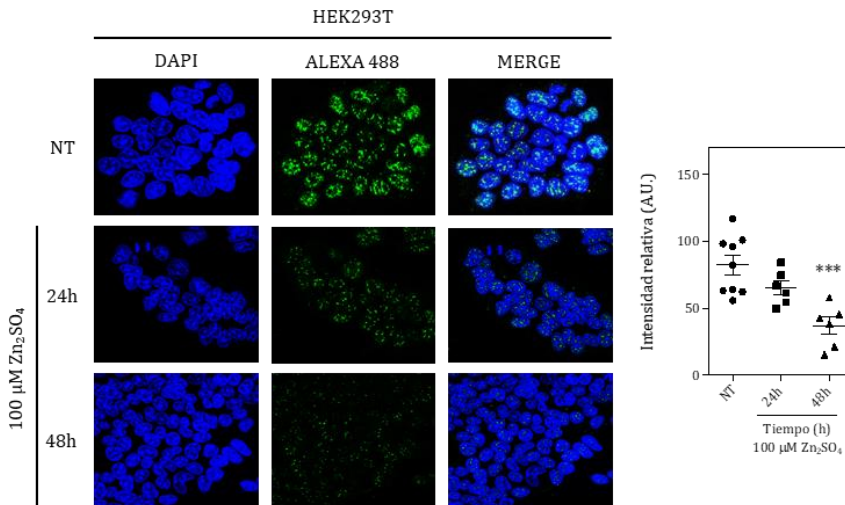
**Figura 45. Sobreexpresión de Nudt3 en HEK293T.** **A.** Imágenes de microscopía tomadas en un Leica SP8 63x de la inmunofluorescencia de polyP-PPBD en la línea celular HEK293T donde se ha sobreexpresado Nudt3 (pWPI-Nudt3-flag). Como control negativo se ha sobreexpresado el plásmido vacío (pWPI-flag) y como control positivo la exopolifosfatasa de levadura Ppx1 (pWPI-Ppx1-flag). **B.** Cuantificación de los niveles de polyP mediante Fiji-ImageJ de la inmunofluorescencia del panel A representada en un diagrama de dispersión. Se han realizado 3 experimentos y cada símbolo representa un campo con una media entre 20-100 células por campo. Para la significancia estadística se ha realizado la prueba estadística Mann-Whitney de una media de tres experimentos independientes con los siguientes criterios de significación ( $p < 0.05$ (\*);  $p < 0.01$ (\*\*);  $p < 0.001$ (\*\*\*)). **C.** Western Blot de los niveles de expresión de Nudt3 en las líneas celulares del panel A utilizando como control de carga la tinción Ponceau.

Con esto, procedí a sobreexpresar Nudt3 clonado en un plásmido pWPI que permite por un lado la sobreexpresión de la proteína mediante un promotor constitutivo y, por otro, el seguimiento de la transfección mediante GFP por microscopía. En la línea celular HEK293T, una vez comprobada la sobreexpresión de Nudt3 mediante Western Blot (Figura 45C), realicé una inmunofluorescencia para marcar los niveles de polyP utilizando como marcador la secuencia de unión al polyP de la exopolifosfatasa de *E.coli*, Ppx, conocida como PPBD.

Los resultados muestran que la sobreexpresión del plásmido vacío no genera un cambio en los niveles de polyP respecto a las células que no han sido transfectadas. La sobreexpresión de Ppx1 disminuye los niveles de polyP un 30% respecto a las células transfectadas con el plásmido vacío. En la literatura, la transfección de Ppx1 ha sido ampliamente utilizada para provocar una caída de los niveles de polyP en mamíferos debido a la ausencia de enzimas polifosfatasas en estos organismos, sin embargo, genera una gran variabilidad entre un 20-80% de caída. Esta variabilidad posiblemente pueda deberse a que se trata de la expresión de la proteína en un organismo heterólogo lo que puede disminuir su eficiencia o bien que dependa del fondo genético la línea celular donde se genera la sobreexpresión. En el caso de la sobreexpresión de Nudt3, se observa una caída drástica de los niveles de polyP, hasta un 65%, indicando que Nudt3 es una endopolifosfatasa *in vivo* (Figura 45A y 45B).

### 4.3. Un aumento de $Zn^{2+}$ intracelular genera una disminución de polyP intracelular

A fin de demostrar que los niveles de polyP celular pueden estar relacionados con la concentración de  $Zn^{2+}$  intracelular prediciendo que un aumento puntual de  $Zn^{2+}$  puede promover la sobreactivación de la actividad endopolifosfatasa de Nudt3, he decidido mirar los niveles de polyP de la línea celular HEK93T tratada con  $100\mu M Zn_2SO_4$  a diferentes tiempos mediante inmunofluorescencia utilizando como marcador el PPBD. Para ello se ha seguido el procedimiento publicado en (Lee, 2018) donde se ha comprobado que la incubación de una línea celular con  $100\mu M Zn_2SO_4$  no genera toxicidad celular.

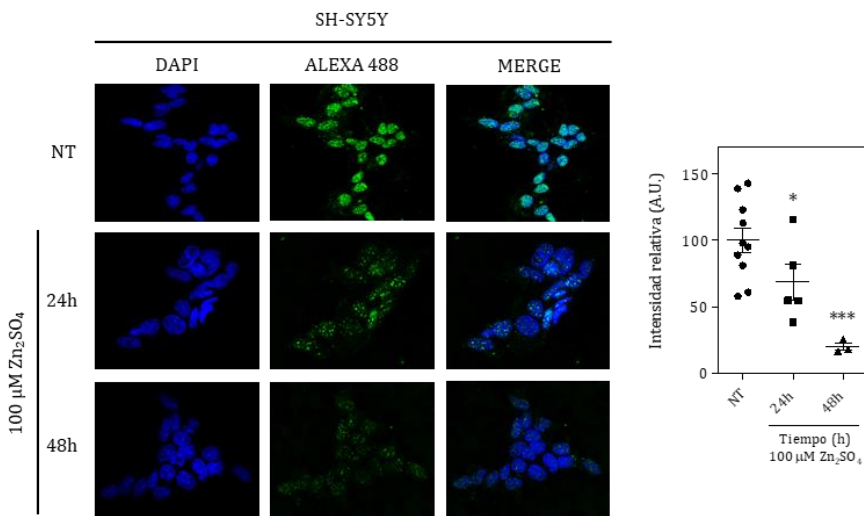


**Figura 46. Un aumento de  $Zn^{2+}$  promueve la degradación del polyP.** A la izquierda, imágenes representativas de microscopía tomadas en un Leica SP8 63x de la inmunofluorescencia de polyP-PPBD en la línea celular HEK293T donde se ha tratado con  $100\mu M Zn_2SO_4$  durante 24 y 48 horas. Como control negativo se han utilizado las células HEK293 sin tratar. A la derecha, la cuantificación de los niveles de polyP mediante Fiji-ImageJ de la

inmunofluorescencia del panel A representada en un diagrama de dispersión. Se han realizado 3 experimentos y cada símbolo representa un campo con una media entre 20-100 células por campo. Para la significancia estadística se ha realizado la prueba estadístico Mann-Whitney de la media de tres experimentos independientes con los siguientes criterios de significación ( $p < 0.05$ (\*);  $p < 0.01$ (\*\*);  $p < 0.001$ (\*\*\*)).

A las 24h de incubación, se observa una disminución de los niveles de polyP de un 15% respecto a las células no tratadas la cual se intensifica a las 48h de incubación llegando a una disminución del 50% de polyP intracelular (Figura 46).

Para verificar los resultados obtenidos con la línea celular HEK293T he considerado conveniente realizar el mismo experimento en la línea celular SH-SY5Y, la cual tiene elevada expresión de Nudt3 y un alto contenido en polyP que me permitirá intensificar el fenotipo.



**Figura 47. Un aumento de Zn<sup>2+</sup> promueve la degradación del polyP.** A la izquierda, imágenes representativas de microscopía tomadas en un Leica SP8 63x de la inmunofluorescencia de polyP-PPBD en la línea celular SH-SY5Y donde se ha tratado con 100 μM Zn<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durante 24 y 48 horas. Como control negativo se han utilizado las células SH-SY5Y sin tratar. A la derecha,

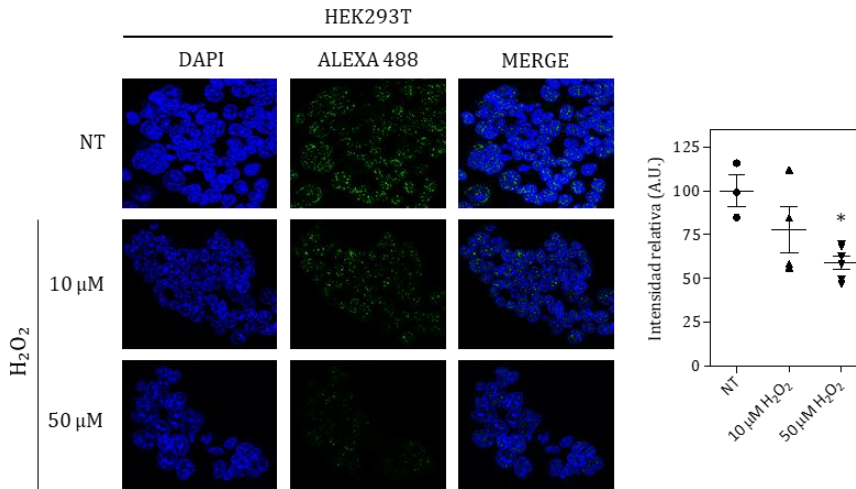
la cuantificación de los niveles de polyP mediante Fiji-ImageJ de la inmunofluorescencia del panel A representada en un diagrama de dispersión. Se han realizado dos experimentos y cada símbolo representa un campo con una media entre 20-100 células por campo. Para la significancia estadística se ha realizado la prueba estadística Mann-Whitney de la media de los campos de los dos experimentos independientes con los siguientes criterios de significación ( $p < 0.05$ (\*);  $p < 0.01$ (\*\*);  $p < 0.001$ (\*\*\*)).

En este caso, los resultados muestran una disminución más drástica de los niveles de polyP cuando las células son incubadas con  $Zn^{2+}$ . Detalladamente, las células presentan una disminución de polyP del 25% cuando son tratadas durante 24h y una disminución del 75% cuando se aumenta el tiempo de tratamiento a las 48h (Figura 47). Esta diferencia en la caída del polyP frente al tratamiento con  $Zn_2SO_4$  y en los niveles de expresión de Nudt3 de estas dos líneas celulares sugiere que un aumento puntual de la concentración de  $Zn^{2+}$  intracelular genera una degradación de polyP que puede estar mediada por la actividad endopolifosfatasa de Nudt3.

#### ***4.4. El estrés oxidativo genera una disminución del polyP intracelular***

Como se ha comentado en la introducción, el estrés oxidativo es una situación celular en la que se produce un aumento puntual de la concentración de  $Zn^{2+}$  intracelular ya que las metalotioneínas, proteínas que tienen quelado el  $Zn^{2+}$ , son sensibles a pequeños cambios redox los cuales permiten su liberación. Para comprobar la variación de los niveles de polyP intracelular debido a un aumento de  $Zn^{2+}$  intracelular mediante una situación fisiológica como el estrés oxidativo, he cuantificado los niveles de polyP de unas células HEK293T

tratadas con dos concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 y 50  $\mu\text{M}$ ) durante 24h.



**Figura 48. Disminución de los niveles de polyP en estrés oxidativo.** A la izquierda, imágenes representativas de microscopía tomadas en un Leica SP8 63x de la inmunofluorescencia de polyP-PPBD en la línea celular HEK293T donde se ha tratado con 10 o 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 24 horas. Como control negativo se han utilizado las células HEK293T sin tratar. A la derecha, la cuantificación de los niveles de polyP mediante Fiji-ImageJ de la inmunofluorescencia del panel A representada en un diagrama de dispersión. Se representa un experimento y cada símbolo representa un campo con una media entre 50-100 células por campo. Para la significancia estadística se ha realizado la prueba estadística Mann-Whitney de la media de los campos con los siguientes criterios de significación ( $p < 0.05$ (\*);  $p < 0.01$ (\*\*);  $p < 0.001$ (\*\*\*)).

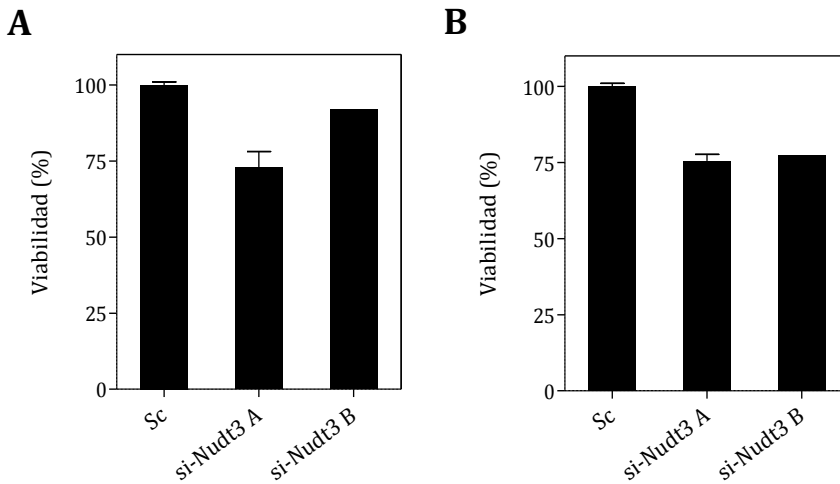
Los resultados muestran que las células HEK293T tratadas con 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 24h presentan una disminución del 25% de los niveles de polyP comparada con las células no tratadas. En el caso de las células tratadas con 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , la disminución de los niveles baja un 40% respecto a las células no tratadas (Figura 48). Como he mencionado anteriormente, las células en situación de estrés oxidativo producen un aumento

de los niveles de  $Zn^{2+}$  intracelular libre. Los resultados sugieren que este  $Zn^{2+}$  libre puede ser utilizado por Nudt3 para actuar como endopolifosfatasa y degradar el polyP.

### ***4.5. El silenciamiento de Nudt3 disminuye la viabilidad celular en estrés oxidativo***

Las células sometidas a un estrés oxidativo, las cuales presentan un incremento puntual en la concentración de  $Zn^{2+}$  intracelular, pueden inducir a apoptosis lo que se traduce en una disminución de la viabilidad. Además, se ha descrito que el polyP podría tener un papel protector frente a situaciones de estrés oxidativo de manera que la expresión de Nudt3 podría ser clave en la supervivencia de las células en esta situación celular. Con esto, he decidido estudiar el papel de Nudt3, y por consiguiente de los niveles de polyP, sobre la viabilidad celular en dos líneas celulares en situación de estrés oxidativo. Para ello, he realizado un ensayo MTT para evaluar la viabilidad de las células HEK293T y SH-SY5Y en las cuales se ha silenciado Nudt3 y han sido tratadas con  $50\mu M$   $H_2O_2$  durante 24h.





**Figura 49. El silenciamiento de Nudt3 disminuye la viabilidad en estrés oxidativo.** Ensayo MTT de células HEK293T **(A)** y SH-SY5Y **(B)** con Nudt3 silenciado mediante siRNAs (10nM A y B) durante 48h y luego tratadas con 50  $\mu$ M  $H_2O_2$  durante 24 horas. Como control utilizado células HEK293T silenciadas con un *scramble*-siRNA (Sc) sin tratar. En ambas líneas celulares se representan dos experimentos para el siNudt3A y un experimento para el siNudt3B.

Los resultados muestran que el silenciamiento de Nudt3 promueve una disminución de la concentración de polyP celular lo que genera una disminución de la viabilidad celular en situación de estrés oxidativo (Figura 49).



## *Discusión*

---



## 1. Hidrólisis química del polyP

Es ampliamente conocido que la estabilidad de la molécula de polyP es dependiente de las condiciones químicas del medio que lo contiene. Los ensayos de actividad endopolifosfatasa en gradiente de pH llevados a cabo en esta tesis han puesto de manifiesto que el polyP es una molécula lábil en condiciones de alcalinidad en presencia de iones divalentes promoviendo así su hidrólisis inespecífica.

Estos resultados ya habían sido observados anteriormente en la literatura, concretamente en las primeras publicaciones sobre la bioquímica de la molécula de polyP donde se describe su inestabilidad en función de las condiciones de pH y temperatura. Analíticamente, se ha descrito que el polyP es una molécula lábil cuando se encuentra en un medio ácido llegando a su completa hidrólisis cuando se incuba a 95°C durante 15 min o bien cuando se encuentra en presencia de iones divalentes en un medio alcalino, lo que genera su hidrólisis inespecífica a moléculas de polyP muy cortas (tres residuos de  $P_i$ ) (Becke-Goehring 1961; Harold 1966; Thilo 1962). Así pues, cualquier ensayo enzimático en el que se evalúa la hidrólisis específica del polyP hace imprescindible la presencia de controles que demuestren la integridad de la molécula en esas condiciones de ensayo.

## 2. Múltiples actividades polifosfatasa en mamíferos

El polyP es una molécula que se ha vinculado en muchas de las funciones celulares importantes que se dan en el organismo. La hipótesis inicial en que se basa este trabajo es que debe de existir un mecanismo de regulación del metabolismo del polyP mediante enzimas que se encarguen de su síntesis y degradación a fin de poder regular todas estas funciones celulares. En funciones celulares donde se necesita un aumento rápido de la cantidad de fosfato libre celular como, por ejemplo, la síntesis de dNTPs donde el polyP actúa como reservorio de fosfato, parece interesante la existencia de una enzima con actividad exopolifosfatasa (Bru et al. 2016).

Resultados de este trabajo muestran la presencia de distintas actividades exopolifosfatasa tanto en un extracto de cerebro como en suero de rata. Estas actividades presentan baja procesividad frente a polyP de cadena larga y son dependientes de distintos iones divalentes como el  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ .

En la literatura, se han descrito diversas enzimas con actividad exopolifosfatasa, dos de las cuales han tenido cierta relevancia: h-prune y la fosfatasa alcalina. A pesar de que ha sido demostrada su capacidad de degradación *in vitro*, lo cierto es que no se ha podido demostrar su actividad exopolifosfatasa *in vivo* debido a su baja eficiencia o bien a las extremas condiciones de ensayo en las cuales son activas.

Según la base de datos de expresión de proteínas por tejido, GTeX, ambas presentan una baja expresión en tejido cerebral, aunque si se encuentran altamente expresadas en

sangre lo que puede sugerir la presencia de sus actividades exopolifosfatasa en el suero de rata.

H-prune es una enzima exopolifosfatasa *in vitro* dependiente de  $Mg^{2+}$  que comparte un 20% de identidad con una exopolifosfatasa de levaduras, Ppx1, hecho que hizo postular a h-prune como la exopolifosfatasa en mamíferos. Su caracterización *in vitro* demostró que presenta actividad exopolifosfatasa para polyP de cadena corta (3 residuos de  $P_i$ ) la cual disminuye drásticamente en presencia de polyP de cadena larga, aunque estos resultados no se han demostrado *in vivo* (Tammenkoski et al. 2008). Es interesante tener en cuenta que, en este trabajo, se han realizado los ensayos con un polyP de cadena larga lo que dificulta observar un pico de actividad específica perteneciente a la actividad exopolifosfatasa de h-prune. Sin embargo, este hecho no permite descartar a h-prune como posible exopolifosfatasa en mamíferos.

Por otro lado, la fosfatasa alcalina se ha descrito como una exopolifosfatasa *in vitro* independiente de ion divalente incluso quedando inhibida su actividad en presencia de alguno (Lorenz and Schröder 2001). Estas condiciones de ensayo descartan una relación entre su actividad exopolifosfatasa con cualquiera de las observadas en los resultados en este trabajo ya que las actividades observadas son dependientes de ion.

Puesto que en otros organismos como las bacterias se ha descrito actividad exopolifosfatasa en algunas enzimas involucradas en el metabolismo energético (Szymona and Szumilo 1966; Szymona and Widomski 1974), en este trabajo también se ha probado la actividad exopolifosfatasa *in vitro* de algunas enzimas involucradas en la glucólisis como la fosfofructoquinasa (Pfk<sub>m</sub>), la gliceraldehido-3-fosfato

deshidrogenasa (Gapdh) y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6pdh). Estas enzimas presentan actividad exopolifosfatasa *in vitro* con baja procesividad en presencia de los iones divalentes  $Mg^{2+}$  y  $Co^{2+}$  lo que sugiere que pueden ser responsables de las actividades observadas en el extracto junto con otros posibles enzimas del metabolismo energético.

En estos resultados, la elevada cantidad de enzimas con actividad exopolifosfatasa presentes en el extracto junto con su baja actividad y promiscuidad en presencia de los iones divalentes sugieren que cualquier enzima con actividad fosfatasa presente en el extracto es capaz de degradar el polyP *in vitro* lo cual hace imposible resaltar ninguna actividad exopolifosfatasa que tenga una elevada procesividad ni especificidad por la degradación del polyP en mis condiciones de ensayo. Es interesante tener en cuenta que la longitud de las moléculas de polyP en mamíferos se encuentra entre 40-60 residuos de  $P_i$ . De existir tanto enzimas con actividad exopolifosfatasa como endopolifosfatasa en mamíferos, una opción para la degradación rápida de la molécula puede ser que las enzimas con actividad endopolifosfatasa se encarguen de degradar el polyP a moléculas muy cortas las cuales terminaran de ser procesadas por las enzimas con actividad exopolifosfatasa por lo que sería interesante probar la búsqueda de actividades exopolifosfatasa con polyP de cadena más corta.

En este trabajo, además de actividad exopolifosfatasa, también se ha evaluado la presencia de actividad endopolifosfatasa tanto en extracto de cerebro como en suero de rata.



En la literatura, ya se había descrito la presencia de actividad endopolifosfatasa en un extracto de cerebro de rata poniendo de manifiesto la existencia de enzimas responsables de la degradación del polyP. Sin embargo, esta enzima responsable de dicha actividad aún no ha sido aislada (Kumble and Kornberg 1996).

Los resultados obtenidos en este trabajo también muestran la presencia de distintas actividades endopolifosfatasa en el extracto que, igual que las exopolifosfatasa, son dependientes de varios iones divalentes como  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ . La obtención de picos de actividad muy definidos con elevada actividad, sugieren la presencia de enzimas con una actividad de degradación específica para el polyP lo que hace muy interesante la persecución de cualquiera de estas actividades.

### 3. Nudt3 es una endopolifosfatasa *in vitro* dependiente de $Zn^{2+}$

Una de las enzimas con actividad endopolifosfatasa que se ha hallado y caracterizado en este estudio es Nudt3, una difosfoinositol pirofosfato polifosfatasa (DIPP), la cual presenta actividad endopolifosfatasa dependiente de  $Zn^{2+}$ . El hecho de que Nudt3 sea homólogo de Ddp1, una enzima con actividad endopolifosfatasa dependiente de  $Mg^{2+}$  en levaduras, y su obtención mediante la purificación de la actividad endopolifosfatasa a partir de extracto de cerebro de rata en presencia de otro ion divalente ( $Zn^{2+}$ ), la postula como la enzima con actividad endopolifosfatasa responsable de la degradación del polyP en mamíferos.

Una publicación anterior a esta tesis establece que Nudt3 es una enzima con actividad endopolifosfatasa dependiente de  $Mg^{2+}$  en unas condiciones extremas ( $pH > 9$ ) (Lonetti et al. 2011), condiciones que ponen en duda su funcionalidad *in vivo*. Con esto, considero que en esta tesis es la primera vez que se describe Nudt3 como una endopolifosfatasa humana.

Un ensayo de actividad endopolifosfatasa *in vitro* con Nudt3 recombinante en las mismas condiciones de la purificación, en presencia de  $Zn^{2+}$  en condiciones fisiológicas ( $pH$  6.8;  $36^{\circ}C$ ), pone de manifiesto que Nudt3 es una endopolifosfatasa de mamífero dependiente de  $Zn^{2+}$ . Este resultado resalta que Nudt3, hasta ahora, no había sido ensayada en las condiciones de  $pH$  adecuadas para su actividad, así como tampoco en presencia del ion divalente correcto.

Ensayos de gradiente de  $pH$  en este trabajo muestran que Nudt3 presenta su actividad endopolifosfatasa máxima

dependiente de  $Zn^{2+}$  a pH entre 6.8.-7.5. El pH fisiológico de la célula se encuentra alrededor de 7 siendo más alcalino en sangre con valores alrededor de 7.25-7.35, datos que ponen de manifiesto la posible funcionalidad de Nudt3 como una endopolifosfatasa *in vivo*.

Además, a diferencia de su homólogo en levaduras, Nudt3 no presenta actividad en presencia de  $Mg^{2+}$ , sino que su actividad es principalmente dependiente de  $Zn^{2+}$  ( $\geq 1$  mM). En cerebro, se ha descrito que la concentración de  $Zn^{2+}$  intracelular libre es 1nM (Lee et al. 2015). Sin embargo, en vesículas pre-sinápticas o bien en situaciones de estrés celular, como el estrés oxidativo, se produce un incremento de la concentración de  $Zn^{2+}$  intracelular a un valor  $>1$  mM (Mocchegiani et al. 2005), situación en la que Nudt3 podría actuar como una endopolifosfatasa *in vivo*.

### ***3.1. La familia DIPP tiene actividad endopolifosfatasa in vitro dependiente de $Zn^{2+}$***

Nudt3, también conocida como DIPP1, forma parte de una subfamilia de proteínas la familia NUDIX conocida como difosfoinositol pirofosfato polifosfatasa (DIPPs). En la familia DIPP se distinguen 4 miembros conocidos como Nudt3 (Dipp1), Nudt4 (Dipp2), Nudt10 y Nudt11 (Dipp3 $\alpha/\beta$ ), las cuales presentan características estructurales altamente similares y son capaces de hidrolizar los mismos sustratos celulares. En cuanto a su actividad, se ha descrito que, aunque todas son capaces de degradar InsP y  $Ap_nA$ , no todas lo hacen con la misma eficiencia (Thomas and Potter 2014). Para ambos sustratos, la que presenta mayor actividad fosfatasa con

diferencia es Nudt3 seguida de Nudt4 y Nudt11 y, finalmente, Nudt10.

En este trabajo se ha comprobado *in vitro* que la familia DIPP sigue un patrón de actividad endopolifosfatasa similar al que se ha descrito para los otros dos sustratos. Nudt3 presenta una elevada actividad endopolifosfatasa dependiente de  $Zn^{2+}$  seguida de Nudt4 y Nudt11, las cuales presentan una leve actividad y, finalmente Nudt10 la cual no tiene capacidad de degradación del polyP.

La distinta capacidad de degradación del polyP *in vitro* de los miembros de la familia DIPP sugiere que Nudt3 es la única enzima con actividad endopolifosfatasa. Sin embargo, no se descarta que los otros miembros de la familia DIPP adquieran la competencia de degradar estos sustratos en ausencia de Nudt3 o en otras situaciones en las que la célula requiera de su degradación.

## 4. Dualidad funcional dependiente del ion

Algunas enzimas del metabolismo de degradación del polyP en levaduras presentan dualidad de actividades, es decir, que presentan tanto actividad exo como endopolifosfatasa, en función del ion presente en la reacción. Por ejemplo, Ppn1 tiene actividad endopolifosfatasa en presencia de  $Mg^{2+}$ , sin embargo, se convierte en una enzima con actividad exopolifosfatasa en presencia del ion  $Co^{2+}$  (Sethuraman et al. 2001) o bien Ppx1 la cual presenta actividad exopolifosfatasa en presencia de  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Co^{2+}$ , aunque la mayor actividad es dependiente de  $Mg^{2+}$  (Wurst et al. 1995).

En este trabajo, Nudt3 únicamente presenta actividad endopolifosfatasa en presencia de los iones  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  aunque la mayor actividad es dependiente de  $Zn^{2+}$  como ocurre con la endopolifosfatasa de levaduras, Ppn2 (Gerasimaité and Mayer 2017). Sin embargo, Nudt3 no tiene actividad exopolifosfatasa ya que la actividad que presenta en presencia de los distintos iones es muy baja y puede considerarse residual o consecuencia de tratarse de un ensayo *in vitro* donde la enzima esta forzada a actuar.

### 4.1. La especificidad de sustrato de Nudt3 depende del ion divalente

Nudt3 es capaz de hidrolizar tres compuestos muy diferentes, los cuales dos de ellos han sido ampliamente descritos en la literatura como los inositoles polifosfato (InsP) y los diadenosina oligofosfatos ( $Ap_nA$ ), que junto con el polyP hacen plantearse cuál es la diferencia de especificidad entre ellos (Kilari et al. 2013; Safrany, Caffrey, et al. 1999).

Experimentos de mutagénesis dirigida en Nudt3 han revelado que dos aminoácidos glutámicos (E66 y E70) son esenciales para la hidrólisis de dos de los sustratos de Nudt3, InsP y Ap<sub>n</sub>A, sugiriendo que Nudt3 solo tiene un único centro activo (Yang et al. 1999). En este estudio, se ha visto que el residuo E70 es clave para la actividad endopolifosfatasa de Nudt3 indicando que o bien la presencia del ion divalente en la reacción o bien otras regiones estructurales de Nudt3 que están en contacto con los distintos sustratos son las responsables de la especificidad de sustrato de Nudt3.

En este trabajo se muestra que la especificidad de sustrato es en función del ion divalente presente en la reacción. En el caso de los InsP (5-PP-InsP<sub>5</sub>), la hidrólisis del grupo pirofosfato por parte de Nudt3 es exclusivamente dependiente de la presencia de Mg<sup>2+</sup> mientras que, en el caso de los Ap<sub>n</sub>A, su hidrólisis es exclusivamente dependiente de Mn<sup>2+</sup>. En el caso del polyP, la actividad endopolifosfatasa de Nudt3 es dependiente de Zn<sup>2+</sup>, aunque también presenta una leve actividad significativa en presencia de Mn<sup>2+</sup> posiblemente porque la parte hidrolizable por Nudt3 de los Ap<sub>n</sub>A es una pequeña cadena de polyP que une los dos nucleósidos de adenosina.

Esta especificidad de sustrato en función del ion sugiere que, a nivel celular, Nudt3 podría estar regulada en función de las necesidades celulares generando un aumento puntual de alguno de los iones en el entorno celular adecuado para que Nudt3 realice la hidrólisis del sustrato concreta.

A nivel de características de los iones, tanto el Mg<sup>2+</sup>, el Mn<sup>2+</sup> y el Zn<sup>2+</sup> presentan propiedades similares en cuando a radio iónico y coordinación electrónica, variables importantes en la interacción de estos iones con las proteínas, aunque el

$Mn^{2+}$  tiene un tamaño iónico ligeramente mayor (Hill et al. 2017; Riley et al. 2018). Las similitudes en las características electrónicas de estos iones hacen que los tres iones divalentes puedan participar en muchas funciones hidrolíticas o estructurales de las proteínas. A nivel de enlaces químicos, todos estos iones tienen capacidad de unión a cualquier átomo de oxígeno (O) que forme parte de algún residuo aminoácido como el ácido aspártico, el ácido glutámico, la asparagina y la glutamina, así como el que forme parte de la estructura del sustrato como, por ejemplo, los que se encuentran en los residuos de fosfato ( $PO_3^-$ ). Cabe destacar que la unión Z-O es más flexible que las uniones Mg-O y Mn-O, hecho que permite a este enlace Zn-O mayor movilidad a nivel estructural. Además, el  $Mn^{2+}$  y el  $Zn^{2+}$  tienen capacidad de unión a los átomos de nitrógeno (N) que forman parte de algunos aminoácidos como la histidina, así como los que forman parte de sustratos como los ácidos nucleicos (Harding, Nowicki, and Walkinshaw 2010).

Estas características estructurales me sugieren que estos iones no solo interactúan con Nudt3 para llevar a cabo la hidrólisis de los distintos sustratos, sino que pueden tener un papel importante en la presentación del sustrato a Nudt3. El  $Mg^{2+}$  se ha visto que participa en la degradación de compuestos que contienen una pequeña cadena de fosfatos (hasta tres residuos) como el NTPs, NDPs, desfosforilación de algunas proteínas, entre otros lo que permite, por similitud en el sustrato, adjudicar la función de hidrólisis de los inositoles pirofosfato. El  $Mn^{2+}$ , puesto que tiene la capacidad de unión tanto a átomos de O como N, sugiere que se une tanto a los O de los residuos glutámicos del centro activo de Nudt3 como a los O y N de sustrato  $Ap_nA$  lo que permite que éste quede ubicado en el centro activo haciendo accesible la pequeña cadena de polyP

que une las bases nitrogenadas para llevar a cabo su hidrólisis. Por otro lado, el  $Zn^{2+}$ , puesto que realiza enlaces flexibles y de elevada energía con átomos de O tanto del sustrato, polyP, como de los residuos de glutámico del centro activo hace que la molécula de polyP quede encarada y se combe con mayor fuerza mostrando el enlace anhidro a ser hidrolizado por Nudt3.

Llegados a este punto, a fin de aportar conocimiento a la especificidad de Nudt3 en función del ion, sería interesante realizar estudios de cristalografía de Nudt3 con los respectivos iones y sustratos de la reacción.



## 5. Nudt3 es una endopolifosfatasa *in vivo*

En este trabajo, a diferencia de los otros dos sustratos de Nudt3, se ha demostrado que Nudt3 presenta actividad endopolifosfatasa *in vivo* postulando a Nudt3 como la primera enzima endopolifosfatasa descrita en mamíferos.

En primera instancia, el método de sobreexpresión de Nudt3 en un organismo heterólogo, concretamente, una cepa de levadura la cual no expresa ninguna de las polifosfatasas endógenas, no fue efectivo para revertir el fenotipo característico de esta cepa y demostrar su actividad endopolifosfatasa *in vivo*. Sin embargo, hay que considerar que este resultado puede deberse a varios posibles factores. Por un lado, puede que la síntesis de Nudt3 en la levadura no sea correcta generando una Nudt3 no funcional, o bien, que la vacuola no tenga la concentración de  $Zn^{2+}$  necesaria para que Nudt3 sea activa. Esta última opción es menos probable puesto que una de las endopolifosfatasas endógenas de la levadura, Ppn2, es activa en presencia de  $Zn^{2+}$ , aunque no se puede descartar que en las condiciones de cultivo de estas cepas no generen disponibilidad de  $Zn^{2+}$  libre en la vacuola. Por otro lado, otra posible causa puede deberse a la estructura química de la molécula de polyP de manera que Nudt3 puede no ser capaz de degradar el polyP altamente ramificado que se genera por la ausencia de las polifosfatasas en esta cepa (Gerasimaité and Mayer 2017).

Una segunda aproximación empleando la sobreexpresión de Nudt3 en líneas celulares de mamífero, un modelo más fisiológico, ha demostrado que Nudt3 es una endopolifosfatasa *in vivo*. La caída de los niveles de polyP intracelular por la sobreexpresión de Nudt3 es más drástica que la caída generada

por la sobreexpresión de Ppx1 en estas mismas líneas, modelo que se ha utilizado hasta la actualidad para disminuir los niveles de polyP en mamíferos. El hecho que Nudt3 haya superado los efectos provocados por Ppx1, considerada una exopolifosfatasa muy potente en levaduras, pone de manifiesto que Nudt3 es una endopolifosfatasa *in vivo* y que, además, puede ser utilizada como una herramienta para modular los niveles de polyP en mamíferos que, hasta ahora, no teníamos.

Cabe destacar que, en levaduras, se ha descrito que el metabolismo de los InsP está íntimamente relacionado con el metabolismo del polyP. Por ejemplo, se ha descrito que una disminución de los niveles de InsP celulares debido a su degradación, o bien, la delección de la enzima Kcs, sintasa de los InsP, se traduce en una disminución de los niveles de polyP celulares (Gerasimaite et al. 2017; Wild et al. 2016). Así pues, en caso de que esta relación se encuentre conservada en mamíferos, parte de este efecto observado en los niveles de polyP por la sobreexpresión de Nudt3 puede verse potenciado por una disminución de los niveles de InsP ocasionados por esta misma sobreexpresión. Este hecho evidencia la complejidad existente en la regulación del metabolismo del polyP en la cual pueden participar no solo las enzimas que se encuentran directamente involucradas sino también otros sustratos relacionados con las enzimas como los InsP por lo que sería interesante en un futuro medir los niveles de InsP celulares en estas condiciones.

Una característica importante *in vitro* de Nudt3 descrita en este trabajo es la especificidad de sustrato dependiente del ion. Los resultados de una incubación de las líneas celulares de mamífero, HEK293T y SH-SY5Y, con  $Zn^{2+}$  muestran una disminución de los niveles de polyP celular *in vivo*, siendo más

drástica la caída de los niveles de polyP en la línea celular que más expresa Nudt3, SH-SY5Y. Estos resultados ponen de manifiesto que en una situación celular de elevada disponibilidad de  $Zn^{2+}$  intracelular libre existe una relación lineal entre la expresión de Nudt3 y los niveles de polyP, siendo así que cuanto mayor es la expresión de Nudt3, mayor es la caída de los niveles de polyP. Posiblemente en estos resultados, la incubación previa de las células con  $Zn^{2+}$  ha permitido decantar la especificidad de Nudt3 por el polyP celular incrementando su actividad de degradación del polyP respecto a su actividad de hidrólisis de otros sustratos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que este aumento en los niveles de  $Zn^{2+}$  intracelular es artificial y, aunque no genera efectos tóxicos en la célula, los resultados no permiten descartar que el  $Zn^{2+}$  pueda estar activando otras vías independientes a Nudt3 que impliquen una degradación del polyP.

Aunque los experimentos de sobreexpresión de Nudt3 y de incubación con  $Zn^{2+}$  muestran una clara degradación de polyP por parte de Nudt3 y, por consiguiente, han demostrado que Nudt3 es la primera endopolifosfatasa descrita en mamíferos, sería interesante realizar experimentos de silenciamiento de Nudt3 que nos permitan aportar más conocimientos sobre el metabolismo del polyP.

### ***5.1. El estrés oxidativo disminuye los niveles de polyP celular***

El estrés oxidativo es un estado de la célula en el que hay un aumento de los niveles de ROS en el citoplasma lo que provoca la liberación del  $Zn^{2+}$  quelado por las metalotioneinas (MTs) y, por consiguiente, un aumento puntual en la

concentración intracelular de  $Zn^{2+}$  libre (Frazzini et al. 2006; Stankovic et al. 2007). En esta situación fisiológica, Nudt3 dispondría de la concentración de  $Zn^{2+}$  necesaria para llevar a cabo la degradación del polyP.

Mis resultados muestran que frente a una situación de estrés oxidativo se produce una degradación drástica del polyP poniendo de manifiesto la posible activación de la actividad endopolifosfatasa de Nudt3 por el aumento puntual de la concentración intracelular de  $Zn^{2+}$  libre. Además, un experimento de viabilidad silenciando Nudt3 en estrés oxidativo provoca una mayor mortalidad, teniendo en cuenta que el silenciamiento de Nudt3 en esta situación celular no tiene ningún impacto negativo en la viabilidad celular. En conjunto, estos resultados sugieren la importancia de la respuesta celular frente estrés oxidativo en la cual la célula necesita degradar polyP para sobrevivir.

Estos resultados no van acorde con los resultados publicados en bacterias en los cuales se describe que la integridad de la molécula de polyP es clave para la supervivencia celular en situación de estrés oxidativo postulando un papel protector para el polyP en esta situación celular (Gray and Jakob 2015). Esta discrepancia en los resultados puede deberse al desconocimiento de los efectos del silenciamiento de Nudt3 sobre los niveles de polyP, es decir, aunque en principio esperaría el mantenimiento o incluso un aumento del polyP celular, puede ser que el silenciamiento implique la disminución de éstos debido a un equilibrio interno entre su síntesis y degradación.

## 6. Nudt3, más que una endopolifosfatasa de mamífero

Para acabar con esta tesis me gustaría realizar una reflexión sobre los resultados obtenidos dentro del marco de la investigación del polyP.

A partir de los años 60 hasta hoy en día, la molécula de polyP ha sido ampliamente estudiada desde bacterias hasta levaduras tanto en su estructura química, su metabolismo como las funciones celulares en las que se encuentra implicada e incluso, hoy en día, siguen apareciendo nuevos detalles o más funciones para esta molécula en este tipo de organismos. Todos estos avances en las publicaciones sobre el polyP en microorganismos y eucariotas unicelulares se deben a mejoras en los protocolos de extracción y cuantificación del polyP, así como al conocimiento de la regulación del metabolismo del polyP en estos organismos.

Recientemente, se ha estudiado el papel de esta molécula en distintas funciones celulares de los mamíferos, sin embargo, el desconocimiento de las enzimas responsables de su metabolismo no permite avanzar en el rol del polyP en estas funciones ya descritas o en otras en las que pueda participar. Por ello, muchos autores hasta la fecha reclaman al final de sus publicaciones la necesidad de que algún grupo de investigación sobre el polyP encuentre las enzimas responsables de su metabolismo.

En esta tesis se ha descrito a Nudt3 como una endopolifosfatasa humana dependiente de  $Zn^{2+}$  la cual presenta especificidad de sustrato en función del ion divalente presente en la reacción. Esta aportación al campo de investigación sobre

el polyP abre nuevas vías de trabajo para profundizar en el conocimiento de las funciones de esta molécula en mamíferos.

Además, en los últimos 20 años, el polyP ha empezado a ser estudiado en mamíferos aportando al conocimiento de la molécula nuevas funciones en eucariotas superiores como su papel en coagulación sanguínea, mineralización ósea, así como su papel en algunas enfermedades como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson donde el polyP actúa como estabilizador de los procesos amiloidogénicos disminuyendo la toxicidad de la patología (Cremers et al. 2016; Leyhausen et al. 1998; Travers et al. 2015).

El hecho que el polyP se encuentre implicado en la patología de enfermedades como el Alzheimer o el Parkinson, así como la elevada expresión de Nudt3 en cerebro, órgano con los mayores niveles de  $Zn^{2+}$  en el organismo, sugiere que Nudt3 podría tener mucha relevancia como diana terapéutica en este tipo de enfermedades neurodegenerativas.

## *Conclusiones*

---





- Hay presencia de actividad exopolifosfatasa y endopolifosfatasa en extracto de cerebro y en suero de rata.
- Nudt3, es una endopolifosfatasa *in vitro* dependiente de  $Zn^{2+}$ .
  - Nudt3 presenta actividad endopolifosfatasa en presencia de  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Co^{2+}$ , sin embargo, no presenta actividad exopolifosfatasa.
  - Nudt3 tiene actividad en un rango de pH entre 6.8-7.5 a una concentración superior de 1mM  $Zn^{2+}$ .
  - Nudt3 presenta un único centro catalítico siendo el aminoácido E70 responsable de la actividad.
- Nudt3 presenta especificidad de sustrato en función del ion divalente, concretamente presenta actividad inositol pirofosfatasa en presencia de  $Mg^{2+}$ ; actividad diadenosina polifosfatasa en presencia de  $Mn^{2+}$ ; y actividad endopolifosfatasa en presencia de  $Zn^{2+}$ .
- Nudt3 es la única enzima de la familia DIPP que presenta elevada actividad endopolifosfatasa dependiente de  $Zn^{2+}$  *in vitro*.
- La sobreexpresión de Nudt3 en células humanas disminuye los niveles de polyP *in vivo*.
- La incubación de células humanas con  $Zn^{2+}$  provoca la disminución de los niveles de polyP *in vivo*.
- El estrés oxidativo en células humanas provoca la disminución de los niveles de polyP *in vivo*.
- El silenciamiento de Nudt3 en células con estrés oxidativo provoca una disminución de la viabilidad celular.



## *Bibliografía*

---



- Ali, N., R. Duden, M. E. Bembenek, and S. B. Shears. 1995. "The Interaction of Coatomer with Inositol Polyphosphates Is Conserved in *Saccharomyces Cerevisiae*." *The Biochemical Journal* 310 ( Pt 1):279–84.
- Andreeva, Nadezhda, Ludmila Trilisenko, Mikhail Eldarov, and Tatiana Kulakovskaya. 2015. "Polyphosphatase PPN1 of *Saccharomyces Cerevisiae*: Switching of Exopolyphosphatase and Endopolyphosphatase Activities." *PLoS One* 10(3):e0119594.
- Apostolova, M. D., I. A. Ivanova, and M. G. Cherian. 1999. "Metallothionein and Apoptosis during Differentiation of Myoblasts to Myotubes: Protection against Free Radical Toxicity." *Toxicology and Applied Pharmacology* 159(3):175–84.
- Aschar-Sobbi, Roozbeh, Andrey Y. Abramov, Catherine Diao, Margaret E. Kargacin, Gary J. Kargacin, Robert J. French, and Evgeny Pavlov. 2008. "High Sensitivity, Quantitative Measurements of Polyphosphate Using a New DAPI-Based Approach." *Journal of Fluorescence* 18(5):859–66.
- Atar, Dan, Peter H. Backx, Melissa M. Appel, Wei Dong Gao, and Eduardo Marban. 1995. "Excitation-Transcription Coupling Mediated by Zinc Influx through Voltage-Dependent Calcium Channels." *Journal of Biological Chemistry* 270(6):2473–77.
- Auesukaree, Choowong, Hidehito Tochio, Masahiro Shirakawa, Yoshinobu Kaneko, and Satoshi Harashima. 2005. "Plc1p, Arg82p, and Kcs1p, Enzymes Involved in Inositol Pyrophosphate Synthesis, Are Essential for Phosphate Regulation and Polyphosphate Accumulation in *Saccharomyces Cerevisiae*." *The Journal of Biological Chemistry* 280(26):25127–33.
- Azevedo, Cristina, Thomas Livermore, and Adolfo Saiardi. 2015. "Protein Polyphosphorylation of Lysine Residues by Inorganic Polyphosphate." *Molecular Cell*.
- Azevedo, Cristina and Adolfo Saiardi. 2014. "Functions of

- Inorganic Polyphosphates in Eukaryotic Cells: A Coat of Many Colours." *Biochemical Society Transactions*.
- Baykov, A. A., O. A. Evtushenko, and S. M. Avaeva. 1988. "A Malachite Green Procedure for Orthophosphate Determination and Its Use in Alkaline Phosphatase-Based Enzyme Immunoassay." *Analytical Biochemistry* 171(2):266–70.
- Becke-Goehring, M. 1961. "Phosphorus and Its Compounds, Bd. 1: Chemistry, von J. R. Van Wazer. Interscience Publishers, New York-London 1958. 1. Aufl., XIII, 954 S., Geb. \$ 27.50." *Angewandte Chemie* 73(15):552–552.
- Berg, Jeremy M. and Yigong Shi. 1996. "The Galvanization of Biology: A Growing Appreciation for the Roles of Zinc." *Science* 271(5252):1081–85.
- Bessman, Maurice J., David N. Frick, and Suzanne F. O'Handley. 1996. "The MutT Proteins or 'Nudix' Hydrolases, a Family of Versatile, Widely Distributed, 'Housecleaning' Enzymes." *Journal of Biological Chemistry* 271(41):25059–62.
- Beyersmann, Detmar and Hajo Haase. 2001. "Functions of Zinc in Signaling, Proliferation and Differentiation of Mammalian Cells." *BioMetals* 14(3–4):331–41.
- Bossemeyer, D. 1994. "The Glycine-Rich Sequence of Protein Kinases: A Multifunctional Element." *Trends in Biochemical Sciences* 19(5):201–5.
- Brearley, C. A. and D. E. Hanke. 1996. "Inositol Phosphates in the Duckweed Spirodela Polyrhiza L." *The Biochemical Journal* 314 ( Pt 1):215–25.
- Bru, Samuel, Javier Jiménez, David Canadell, Joaquín Ariño, and Josep Clotet. 2017. "Improvement of Biochemical Methods of PolyP Quantification." *OPEN ACCESS / Www.Microbialcell.Com* 6 *Microbial Cell* 4(1).
- Bru, Samuel, Joan Marc Martínez-Laínez, Sara Hernández-Ortega, Eva Quandt, Javier Torres-Torronteras, Ramón

- Martí, David Canadell, Joaquin Ariño, Sushma Sharma, Javier Jiménez, and Josep Clotet. 2016. "Polyphosphate Is Involved in Cell Cycle Progression and Genomic Stability in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular Microbiology*.
- Bru, Samuel, Bàrbara Samper-Martín, Eva Quandt, Sara Hernández-Ortega, Joan M. Martínez-Laínez, Eloi Garí, Marta Rafel, Javier Torres-Torronteras, Ramón Martí, Mariana P. C. Ribeiro, Javier Jiménez, and Josep Clotet. 2017. "Polyphosphate Is a Key Factor for Cell Survival after DNA Damage in Eukaryotic Cells." *DNA Repair* 57:171–78.
- Bush, Ashley I., Warren H. Pettingell, Gerd Multhaup, Marc D. Paradis, Jean Paul Vonsattel, James F. Gusella, Konrad Beyreuther, Colin L. Masters, and Rudolph E. Tanzi. 1994. "Rapid Induction of Alzheimer A $\beta$  Amyloid Formation by Zinc." *Science* 265(5177):1464–67.
- Bush, Ashley I. and Rudolph E. Tanzi. 2002. "The Galvanization of Beta-Amyloid in Alzheimer's Disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(11):7317–19.
- Carreras-Puigvert, Jordi, Marinka Zitnik, Ann Sofie Jemth, Megan Carter, Judith E. Unterlass, Björn Hallström, Olga Loseva, Zhir Karem, José Manuel Calderón-Montanó, Cecilia Lindskog, Per Henrik Edqvist, Damian J. Matuszewski, Hammou Ait Blal, Ronnie P. A. Berntsson, Maria Häggblad, Ulf Martens, Matthew Studham, Bo Lundgren, Carolina Wählby, Erik L. L. Sonnhhammer, Emma Lundberg, Pål Stenmark, Blaz Zupan, and Thomas Helleday. 2017. "A Comprehensive Structural, Biochemical and Biological Profiling of the Human NUDIX Hydrolase Family." *Nature Communications* 8(1):1541.
- Cartwright, J. L. and A. G. McLennan. 1999. "The *Saccharomyces Cerevisiae* YOR163w Gene Encodes a Diadenosine 5', 5''-P1,P6-Hexaphosphate (Ap6A) Hydrolase Member of the MutT Motif (Nudix Hydrolase) Family." *The Journal of Biological Chemistry* 274(13):8604–10.
- Castuma, C. E., R. Huang, A. Kornberg, and R. N. Reusch. 1995.

- “Inorganic Polyphosphates in the Acquisition of Competence in *Escherichia Coli*.” *The Journal of Biological Chemistry* 270(22):12980–83.
- Chesters, J. K., L. Petrie, and H. Vint. 1989. “Specificity and Timing of the Zn<sup>2+</sup> Requirement for DNA Synthesis by 3T3 Cells.” *Experimental Cell Research* 184(2):499–508.
- Chuang, Yu-Min, Nirmalya Bandyopadhyay, Dalin Rifat, Harvey Rubin, Joel S. Bader, and Petros C. Karakousis. 2015. “Deficiency of the Novel Exopolyphosphatase Rv1026/PPX2 Leads to Metabolic Downshift and Altered Cell Wall Permeability in *Mycobacterium Tuberculosis*.” *MBio* 6(2):e02428.
- Cioffi, Federica, Rayan Hassan Ibrahim Adam, and Kerensa Broersen. 2019. “Molecular Mechanisms and Genetics of Oxidative Stress in Alzheimer’s Disease.” *Journal of Alzheimer’s Disease* 72(4):981–1017.
- Cordeiro, Ciro D., Michael A. Ahmed, Brian Windle, and Roberto Docampo. 2019. “NUDIX Hydrolases with Inorganic Polyphosphate Exo- and Endopolyphosphatase Activities in the Glycosome, Cytosol and Nucleus of *Trypanosoma Brucei*.” *Bioscience Reports* 39(5).
- Cremers, Claudia M., Daniela Knoefler, Stephanie Gates, Nicholas Martin, Jan Ulrik Dahl, Justine Lempart, Lihan Xie, Matthew R. Chapman, Veronica Galvan, Daniel R. Southworth, and Ursula Jakob. 2016. “Polyphosphate: A Conserved Modifier of Amyloidogenic Processes.” *Molecular Cell*.
- Docampo, Roberto, Wanderley de Souza, Kildare Miranda, Peter Rohloff, and Silvia N. J. Moreno. 2005. “Acidocalcisomes - Conserves from Bacteria to Man.” *Nature Reviews*.
- Fisher, David I., Stephen T. Safrany, Peter Strike, Alexander G. McLennan, and Jared L. Cartwright. 2002. “Nudix Hydrolases That Degrade Dinucleoside and Diphosphoinositol Polyphosphates Also Have 5-Phosphoribosyl 1-Pyrophosphate (PRPP) Pyrophosphatase Activity That Generates the Glycolytic Activator Ribose 1,5-



- Bisphosphate." *The Journal of Biological Chemistry* 277(49):47313–17.
- Frazzini, V., E. Rockabrand, E. Mocchegiani, and S. L. Sensi. 2006. "Oxidative Stress and Brain Aging: Is Zinc the Link?" *Biogerontology* 7(5–6):307–14.
- Frick, D. N., D. J. Weber, C. Abeygunawardana, A. G. Gittis, M. J. Bessman, and A. S. Mildvan. 1995. "NMR Studies of the Conformations and Location of Nucleotides Bound to the Escherichia Coli MutT Enzyme." *Biochemistry* 34(16):5577–86.
- Gerasimaitė, Rūta and Andreas Mayer. 2017. "Ppn2, a Novel Zn<sup>2+</sup>-Dependent Polyphosphatase in the Acidocalcisome-like Yeast Vacuole." *Journal of Cell Science* 130(9):1625–36.
- Gerasimaite, Ruta, Igor Pavlovic, Samanta Capolicchio, Alexandre Hofer, Andrea Schmidt, Henning J. Jessen, and Andreas Mayer. 2017. "Inositol Pyrophosphate Specificity of the SPX-Dependent Polyphosphate Polymerase VTC." *ACS Chemical Biology* 12(3):648–53.
- Gerasimaitė, Rūta, Shruti Sharma, Yann Desfougères, Andrea Schmidt, and Andreas Mayer. 2014. "Coupled Synthesis and Translocation Restrains Polyphosphate to Acidocalcisome-like Vacuoles and Prevents Its Toxicity." *Journal of Cell Science* 127(Pt 23):5093–5104.
- Gray, Michael J. and Ursula Jakob. 2015. "Oxidative Stress Protection by Polyphosphate-New Roles for an Old Player." *Current Opinion in Microbiology* 24:1–6.
- Gray, Michael J., Wei-Yun Wholey, Nico O. Wagner, Claudia M. Cremers, Antje Mueller-Schickert, Nathaniel T. Hock, Adam G. Krieger, Erica M. Smith, Robert A. Bender, James C. A. Bardwell, and Ursula Jakob. 2014. "Polyphosphate Is a Primordial Chaperone." *Molecular Cell* 53:689–99.
- Grudzien-Nogalska, Ewa, Xinfu Jiao, Man-Gen Song, Ronald P. Hart, and Megerditch Kiledjian. 2016. "Nudt3 Is an mRNA Decapping Enzyme That Modulates Cell Migration." *RNA*

- (New York, N.Y.) 22(5):773–81.
- Härd, Torleif, Alexey Rak, Peter Allard, Lars Kloo, and Maria Garber. 2000. "The Solution Structure of Ribosomal Protein L36 from *Thermus Thermophilus* Reveals a Zinc-Ribbon-like Fold." *Journal of Molecular Biology* 296(1):169–80.
- Harding, Marjorie M., Matthew W. Nowicki, and Malcolm D. Walkinshaw. 2010. "Metals in Protein Structures: A Review of Their Principal Features." *Crystallography Reviews* 16(4):247–302.
- Harold, Franklin M. 1966. *Inorganic Polyphosphates in Biology: Structure, Metabolism, and Function*. Vol. 30.
- Hassanian, S. M., A. Avan, and A. Ardeshirylajimi. 2017. "Inorganic Polyphosphate: A Key Modulator of Inflammation." *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH* 15(2):213–18.
- Hicks, S. E. and J. C. Wallwork. 1987. "Effect of Dietary Zinc Deficiency on Protein Synthesis in Cell-Free Systems Isolated from Rat Liver." *The Journal of Nutrition* 117(7):1234–40.
- Hill, Shannon E., Elaine Nguyen, Chiamaka U. Ukachukwu, Dana M. Freeman, Stephen Quirk, and Raquel L. Lieberman. 2017. "Metal Ion Coordination in the E. Coli Nudix Hydrolase Dihydroneopterin Triphosphate Pyrophosphatase: New Clues into Catalytic Mechanism." *PLoS ONE* 12(7).
- Holmström, Kira M., Nephtali Marina, Artyom Y. Baev, Nicholas W. Wood, Alexander V Gourine, and Andrey Y. Abramov. 2013. "Signalling Properties of Inorganic Polyphosphate in the Mammalian Brain." *Nature Communications*.
- Hothorn, Michael, Heinz Neumann, Esther D. Lenherr, Mark Wehner, Vladimir Rybin, Paul O. Hassa, Andreas Uttenweiler, Monique Reinhard, Andrea Schmidt, Jeanette Seiler, Andreas G. Ladurner, Christian Herrmann, Klaus Scheffzek, and Andreas Mayer. 2009. "Catalytic Core of

- Amembrane-Associated Eukaryotic Polyphosphate Polymerase." *Science* 324(5926):513–16.
- Huh, Won Ki, James V. Falvo, Luke C. Gerke, Adam S. Carroll, Russell W. Howson, Jonathan S. Weissman, and Erin K. O'Shea. 2003. "Global Analysis of Protein Localization in Budding Yeast." *Nature* 425(6959):686–91.
- Jimenez-Nuñez, Maria D., David Moreno-Sanchez, Laura Hernandez-Ruiz, Alicia Benítez-Rondán, Ana Ramos-Amaya, Beatriz Rodríguez-Bayona, Francisco Medina, José Antonio Brieva, and Felix A. Ruiz. 2012. "Myeloma Cells Contain High Levels of Inorganic Polyphosphate Which Is Associated with Nucleolar Transcription." *Haematologica* 97(8):1264–71.
- Keasling, J. D. 1997. "Regulation of Intracellular Toxic Metals and Other Cations by Hydrolysis of Polyphosphate." Pp. 242–49 in *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 829. Blackwell Publishing Inc.
- Kennedy, Christopher H., Harvey I. Pass, and James B. Mitchell. 2003. "Expression of Human MutT Homologue (HMTH1) Protein in Primary Non-Small-Cell Lung Carcinomas and Histologically Normal Surrounding Tissue." *Free Radical Biology and Medicine* 34(11):1447–57.
- Kilari, Rajagopal S., Jeremy D. Weaver, Stephen B. Shears, and Stephen T. Safrany. 2013. "Understanding Inositol Pyrophosphate Metabolism and Function: Kinetic Characterization of the DIPPs." *FEBS Letters* 587(21):3464–70.
- Kim, Insook, Eun Ji Park, Jeho Seo, Suk Jin Ko, Jinu Lee, and Chul Hoon Kim. 2011. "Zinc Stimulates Tau S214 Phosphorylation by the Activation of Raf/Mitogen-Activated Protein Kinase-Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway." *Neuroreport* 22(16):839–44.
- Kornberg, A. 1999. *Inorganic Polyphosphate: A Molecule of Many Functions*. Vol. 23.

- Kornberg, S. R. 1956. "Tripolyphosphate and Trimetaphosphate in Yeast Extracts." *The Journal of Biological Chemistry* 218(1):23–31.
- Kornberg, S. R. 1957. "Adenosine Triphosphate Synthesis from Polyphosphate by an Enzyme from Escherichia Coli." *Biochimica et Biophysica Acta* 26(2):294–300.
- Kulaev, IS; Vagabov, VM; Kulakovskaya, TV. 2004. "No Title." Pp. 15–35 in *The biochemistry of inorganic polyphosphates*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Kulaev, I. S., I. A. Krashennnikov, and N. K. Kokurina. 1966. "On the Localization of Inorganic Polyphosphates and Nucleotides in Neurospora Crassa Mycelium." *Biokhimiya* 31(4):850–59.
- Kulaev, I. S., T. V. Kulakovskaia, N. A. Andreeva, and L. P. Lichko. 1997. "[The Evolution of the Functions of Inorganic Polyphosphates at Different Stages in the Phylogenetic Development of Living Creatures]." *Zhurnal Evoliutsionnoi Biokhimmii i Fiziologii* 33(1):74–82.
- Kulakovskaya, E. V., M. Yu. Zemskova, and T. V. Kulakovskaya. 2018. "Inorganic Polyphosphate and Cancer." *Biochemistry*.
- Kumble, K. and A. Kornberg. 1995. "Inorganic Polyphosphate in Mammalian Cells and Tissues." *The Journal of Biological Chemistry*.
- Kumble, Krishnanand D. and Arthur Kornberg. 1996. "Endopolyphosphatases for Long Chain Inorganic Polyphosphate in Yeast and Mammals." *Journal of Biological Chemistry* 271(43):27146–51.
- Lander, Noelia, Ciro Cordeiro, Guozhong Huang, and Roberto Docampo. 2016. "Inorganic Polyphosphate (PolyP) Physiology Inorganic Polyphosphate (PolyP) Physiology Polyphosphate and Acidocalcisomes." *Biochemical Society Transactions*.
- Lee, Sung Ryul. 2018. "Cellular Toxicity of Zinc Can Be

- Attenuated by Sodium Hydrogen Sulfide in Neuronal SH-SY5Y Cell." *Molecular and Cellular Toxicology* 14(4):425–36.
- Lee, Sung Ryul, Su Jin Noh, Julius Ryan Pronto, Yu Jeong Jeong, Hyoung Kyu Kim, In Sung Song, Zhelong Xu, Hyog Young Kwon, Se Chan Kang, Eun-Hwa Sohn, Kyung Soo Ko, Byoung Doo Rhee, Nari Kim, and Jin Han. 2015. "The Critical Roles of Zinc: Beyond Impact on Myocardial Signaling." *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 19(5):389–99.
- Leyhausen, G., B. Lorenz, H. Zhu, W. Geurtsen, R. Bohnensack, W. E. Müller, and H. C. Schröder. 1998. "Inorganic Polyphosphate in Human Osteoblast-like Cells." *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 13(5):803–12.
- Lichko, L. P., T. V. Kulakovskaya, E. V. Kulakovskaya, and I. S. Kulaev. 2008. "Inactivation of PPX1 and PPN1 Genes Encoding Exopolyphosphatases of *Saccharomyces Cerevisiae* Does Not Prevent Utilization of Polyphosphates as Phosphate Reserve." *Biochemistry (Moscow)* 73(9):985–89.
- Lichko, L. P., T. V. Kulakovskaya, and I. S. Kulaev. 2006. "Inorganic Polyphosphates and Exopolyphosphatases in Different Cell Compartments of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Biochemistry. Biokhimiia* 71(11):1171–75.
- Lichko, L. P., N. A. Pestov, T. V. Kulakovskaya, and I. S. Kulaev. 2003. "Effect of PPX1 Inactivation on the Exopolyphosphatase Spectra in Cytosol and Mitochondria of the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *Biochemistry. Biokhimiia* 68(7):740–46.
- Lichko, Lidia P, Tatyana V Kulakovskaya, and Igor S. Kulaev. 2003. "Nuclear Exopolyphosphatase of *Saccharomyces Cerevisiae* Is Not Encoded by the PPX1 Gene Encoding the Major Yeast Exopolyphosphatase." *FEMS Yeast Research*

3(1):113–17.

Lin, J., C. Abeygunawardana, D. N. Frick, M. J. Bessman, and A. S. Mildvan. 1996. "The Role of Glu 57 in the Mechanism of the Escherichia Coli MutT Enzyme by Mutagenesis and Heteronuclear NMR." *Biochemistry* 35(21):6715–26.

Lin, Jian, Chitrananda Abeygunawardana, David N. Frick, Maurice J. Bessman, and Albert S. Mildvan. 1997. "Solution Structure of the Quaternary MutT-M2+-AMPCPP-M2+ Complex and Mechanism of Its Pyrophosphohydrolase Action." *Biochemistry* 36(6):1199–1211.

Liuzzi, Juan P. and Robert J. Cousins. 2004. "MAMMALIAN ZINC TRANSPORTERS." *Annual Review of Nutrition* 24(1):151–72.

Lonetti, Annalisa, Zsolt Szijgyarto, Daniel Bosch, Omar Loss, Cristina Azevedo, and Adolfo Saiardi. 2011. "Identification of an Evolutionarily Conserved Family of Inorganic Polyphosphate Endopolyphosphatases." *The Journal of Biological Chemistry* 286(37):31966–74.

Lorenz, B. and H. C. Schröder. 2001. "Mammalian Intestinal Alkaline Phosphatase Acts as Highly Active Exopolyphosphatase." *Biochimica et Biophysica Acta* 1547(2):254–61.

Malaiyandi, Latha M., Olga Vergun, Kirk E. Dineley, and Ian J. Reynolds. 2005. "Direct Visualization of Mitochondrial Zinc Accumulation Reveals Uniporter-Dependent and -Independent Transport Mechanisms." *Journal of Neurochemistry* 93(5):1242–50.

Maret, Wolfgang and Harold H. Sandstead. 2006. "Zinc Requirements and the Risks and Benefits of Zinc Supplementation." *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 20(1):3–18.

Martin, J. B., T. Laussmann, T. Bakker-Grunwald, G. Vogel, and G. Klein. 2000. "Neo-Inositol Polyphosphates in the Amoeba Entamoeba Histolytica." *The Journal of Biological Chemistry*

275(14):10134–40.

McLennan, A. G. 2006. “The Nudix Hydrolase Superfamily.” *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 63(2):123–43.

Mildvan, A. S., Z. Xia, H. F. Azurmendi, V. Saraswat, P. M. Legler, M. A. Massiah, S. B. Gabelli, M. A. Bianchet, L. W. Kang, and L. M. Amzel. 2005. “Structures and Mechanisms of Nudix Hydrolases.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433(1):129–43.

Mocchegiani, Eugenio, Carlo Bertoni-Freddari, Fiorella Marcellini, and Marco Malavolta. 2005. “Brain, Aging and Neurodegeneration: Role of Zinc Ion Availability.” *Progress in Neurobiology* 75(6):367–90.

Morimoto, Daiki, Tetsuya Tomita, Shoko Kuroda, Chikahisa Higuchi, Shinichi Kato, Toshikazu Shiba, Hironori Nakagami, Ryuichi Morishita, and Hideki Yoshikawa. 2010. “Inorganic Polyphosphate Differentiates Human Mesenchymal Stem Cells into Osteoblastic Cells.” *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 28(4):418–23.

Morrissey, James H., Sharon H. Choi, and Stephanie A. Smith. 2012. “Polyphosphate: An Ancient Molecule That Links Platelets, Coagulation, and Inflammation.” *Blood* 119(25):5972–79.

Müller, Felicitas, Nicola J. Mutch, Wolfdieter A. Schenk, Stephanie A. Smith, Lucie Esterl, Henri M. Spronk, Stefan Schmidbauer, William A. Gahl, James H. Morrissey, and Thomas Renné. 2009. “Platelet Polyphosphates Are Proinflammatory and Procoagulant Mediators In Vivo.” *Cell* 139:1143–56.

Nickel, Katrin F., Göran Ronquist, Florian Langer, Linda Labberton, Tobias A. Fuchs, Carsten Bokemeyer, Guido Sauter, Markus Graefen, Nigel Mackman, Evi X. Stavrou, Gunnar Ronquist, Thomas Renné, and Renné Renné. 2015. “The Polyphosphate-Factor XII Pathway Drives Coagulation in Prostate Cancer-Associated Thrombosis Key Points.” *Blood*.

- Noh, Sujin, Sung Ryul Lee, Yu Jeong Jeong, Kyung Soo Ko, Byoung Doo Rhee, Nari Kim, and Jin Han. 2015. "The Direct Modulatory Activity of Zinc toward Ion Channels." *Integrative Medicine Research* 4(3):142–46.
- Ogawa, N., J. DeRisi, and P. O. Brown. 2000. "New Components of a System for Phosphate Accumulation and Polyphosphate Metabolism in *Saccharomyces Cerevisiae* Revealed by Genomic Expression Analysis." *Molecular Biology of the Cell* 11(12):4309–21.
- Omelson, Sidney, John Georgiou, and Wouter Habraken. 2016. "A Cautionary (Spectral) Tail: Red-Shifted Fluorescence by DAPI-DAPI Interactions." *Biochemical Society Transactions* 44(1):46–49.
- Pallerla, Srinivas Reddy, Sandra Knebel, Tino Polen, Peter Klauth, Juliane Hollender, Volker F. Wendisch, and Siegfried M. Schoberth. 2005. "Formation of Volutin Granules in *Corynebacterium Glutamicum*." *FEMS Microbiology Letters* 243(1):133–40.
- Pavlov, Evgeny, Roozbeh Aschar-Sobbi, Michelangelo Campanella, Raymond J. Turner, María R. Gómez-García, and Andrey Y. Abramov. 2010. "Inorganic Polyphosphate and Energy Metabolism in Mammalian Cells." *Journal of Biological Chemistry* 285(13):9420–28.
- Pestov, Nikolay A., Tatyana V Kulakovskaya, and Igor S. Kulaev. 2004. "Inorganic Polyphosphate in Mitochondria of *Saccharomyces Cerevisiae* at Phosphate Limitation and Phosphate Excess." *FEMS Yeast Research* 4(6):643–48.
- Portbury, Stuart D. and Paul A. Adlard. 2017. "Zinc Signal in Brain Diseases." *International Journal of Molecular Sciences* 18(12).
- Rao, Narayana N., María R. Gómez-García, and Arthur Kornberg. 2009. "Inorganic Polyphosphate: Essential for Growth and Survival." *Annual Review of Biochemistry*.
- Rao, Narayana N., Shengjiang Liu, and Arthur Kornberg. 1998.



- “Inorganic Polyphosphate in *Escherichia Coli*: The Phosphate Regulon and the Stringent Response.” *Journal of Bacteriology* 180(8):2186–93.
- Rashid, M. H., N. N. Rao, and A. Kornberg. 2000. “Inorganic Polyphosphate Is Required for Motility of Bacterial Pathogens.” *Journal of Bacteriology* 182(1):225–27.
- Reusch, R. N. 1989. “Poly-Beta-Hydroxybutyrate/Calcium Polyphosphate Complexes in Eukaryotic Membranes.” *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 191(4):377–81.
- Riley, Andrew M., Judith E. Unterlass, Vera Konieczny, Colin W. Taylor, Thomas Helleday, and Barry V. L. Potter. 2018. “A Synthetic Diphosphoinositol Phosphate Analogue of Inositol Trisphosphate.” *MedChemComm* 9(7):1105–13.
- Ruiz, Felix A., Christopher R. Lea, Eric Oldfield, and Roberto Docampo. 2004. “Human Platelet Dense Granules Contain Polyphosphate and Are Similar to Acidocalcisomes of Bacteria and Unicellular Eukaryotes.” *The Journal of Biological Chemistry* 279(43):44250–57.
- Safrany, S. T., J. J. Caffrey, X. Yang, and S. B. Shears. 1999. “Diphosphoinositol Polyphosphates: The Final Frontier for Inositide Research?” *Biological Chemistry* 380(7–8):945–51.
- Safrany, S. T., S. W. Ingram, J. L. Cartwright, J. R. Falck, A. G. McLennan, L. D. Barnes, and S. B. Shears. 1999. “The Diadenosine Hexaphosphate Hydrolases from *Schizosaccharomyces Pombe* and *Saccharomyces Cerevisiae* Are Homologues of the Human Diphosphoinositol Polyphosphate Phosphohydrolase. Overlapping Substrate Specificities in a MutT-Type Protein.” *The Journal of Biological Chemistry* 274(31):21735–40.
- Safrany, S. T. and S. B. Shears. 1998. “Turnover of Bis-Diphosphoinositol Tetrakisphosphate in a Smooth Muscle

- Cell Line Is Regulated by Beta2-Adrenergic Receptors through a CAMP-Mediated, A-Kinase-Independent Mechanism." *The EMBO Journal* 17(6):1710–16.
- Saito, Katsuharu, Ryo Ohtomo, Yukari Kuga-Uetake, Toshihiro Aono, and Masanori Saito. 2005. "Direct Labeling of Polyphosphate at the Ultrastructural Level in *Saccharomyces Cerevisiae* by Using the Affinity of the Polyphosphate Binding Domain of *Escherichia Coli* Exopolyphosphatase." *Applied and Environmental Microbiology* 71(10):5692–5701.
- Schröder, H. C., L. Kurz, W. E. G. Müller, and B. Lorenz. 2000. "Polyphosphate in Bone." *Biochemistry (Moscow)* 65(3):296–303.
- Scott, D. A. and R. Docampo. 2000. "Characterization of Isolated Acidocalcisomes of *Trypanosoma Cruzi*." *The Journal of Biological Chemistry* 275(31):24215–21.
- Seidlmayer, Lea K., Maria R. Gomez-Garcia, Lothar A. Blatter, Evgeny Pavlov, and Elena N. Dedkova. 2012. "Inorganic Polyphosphate Is a Potent Activator of the Mitochondrial Permeability Transition Pore in Cardiac Myocytes." *The Journal of General Physiology* 139(5):321–31.
- Seidlmayer, Lea K., Maria R. Gomez-Garcia, Toshikazu Shiba, George A. E. Porter, Evgeny V Pavlov, Donald M. Bers, and Elena N. Dedkova. 2018. "Dual Role of Inorganic Polyphosphate in Cardiac Myocytes: The Importance of PolyP Chain Length for Energy Metabolism and MPTP Activation Keywords: Inorganic Polyphosphate Mitochondrial Permeability Transition Pore Ischemia-Reperfusion Injury Bioenergetics Mitochondrial Metabolism ATP Synthase Metabolism Animal Models of Human Disease." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 662:177–89.
- Seki, Y., K. Nitta, and Y. Kaneko. 2014. "Observation of Polyphosphate Bodies and DNA during the Cell Division Cycle of *Synechococcus Elongatus* PCC 7942." *Plant Biology* 16(1):258–63.

- Sekler, Israel, Stefano L. Sensi, Michal Hershfinkel, and William F. Silverman. 2007. "Mechanism and Regulation of Cellular Zinc Transport." Pp. 337–43 in *Molecular Medicine*. Vol. 13.
- Sethuraman, A., N. N. Rao, and A. Kornberg. 2001. "The Endopolyphosphatase Gene: Essential in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(15):8542–47.
- Shears, S. B., N. Ali, A. Craxton, and M. E. Bembenek. 1995. "Synthesis and Metabolism of Bis-Diphosphoinositol Tetrakisphosphate in Vitro and in Vivo." *The Journal of Biological Chemistry* 270(18):10489–97.
- Shi, Xiaobing and Arthur Kornberg. 2005. "Endopolyphosphatase in *Saccharomyces Cerevisiae* Undergoes Post-Translational Activations to Produce Short-Chain Polyphosphates." *FEBS Letters* 579(9):2014–18.
- Shiba, Toshikazu, Kaori Tsutsumi, Hiroyuki Yano, Yoshiharu Ihara, Atsushi Kameda, Kan Tanaka, Hideo Takahashi, Masanobu Munekata, Narayana N. Rao, and Arthur Kornberg. 1997. "Inorganic Polyphosphate and the Induction of RpoS Expression." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(21):11210–15.
- Smith, Stephanie A., Sharon H. Choi, Julie N. R. Collins, Richard J. Travers, Brian C. Cooley, and James H. Morrissey. 2012. "Inhibition of Polyphosphate as a Novel Strategy for Preventing Thrombosis and Inflammation." *Blood* 120(26):5103–10.
- Smith, Stephanie A. and James H. Morrissey. 2007. "Sensitive Fluorescence Detection of Polyphosphate in Polyacrylamide Gels Using 4',6-Diamidino-2-Phenylindol." *Electrophoresis* 28(19):3461–65.
- Smith, Stephanie A., Nicola J. Mutch, Deepak Baskar, Peter Rohloff, Roberto Docampo, and James H. Morrissey. 2006. "Polyphosphate Modulates Blood Coagulation and

- Fibrinolysis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(4):903–8.
- Stankovic, Roger K., Roger S. Chung, and Milena Penkowa. 2007. "Metallothioneins I and II: Neuroprotective Significance during CNS Pathology." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39(3):484–89.
- Stephens, L., T. Radenberg, U. Thiel, G. Vogel, K. H. Khoo, A. Dell, T. R. Jackson, P. T. Hawkins, and G. W. Mayr. 1993. "The Detection, Purification, Structural Characterization, and Metabolism of Diphosphoinositol Pentakisphosphate(s) and Bisdiphosphoinositol Tetrakisphosphate(S)." *Journal of Biological Chemistry* 268(6):4009–15.
- Stotz, Stephanie C., Lucas Om Scott, Christopher Drummond-Main, Yosef Avchalumov, Fernando Giroto, Jörn Davidsen, Maria R. Gómez-García, Jong M. Rho, Evgeny V Pavlov, and Michael A. Colicos. 2014. *Inorganic Polyphosphate Regulates Neuronal Excitability through Modulation of Voltage-Gated Channels*.
- Szymona, M., O. Szymona, and S. Kulesza. 1962. "On the Occurrence of Inorganic Polyphosphate Hexokinase in Some Microorganisms." *Acta Microbiologica Polonica* 11:287–99.
- Szymona, M. and J. Widomski. 1974. "A Kinetic Study on Inorganic Polyphosphate Glucokinase from Mycobacterium Tuberculosis H37RA." *Physiological Chemistry and Physics* 6(5):393–404.
- Szymona, O. and T. Szumilo. 1966. "Adenosine Triphosphate and Inorganic Polyphosphate Fructokinases of Mycobacterium Phlei." *Acta Biochimica Polonica* 13(2):129–43.
- Tammenkoski, Marko, Katja Koivula, Emilio Cusanelli, Massimo Zollo, Clemens Steegborn, Alexander A. Baykov, and Reijo Lahti. 2008. "Human Metastasis Regulator Protein H-Prune Is a Short-Chain Exopolyphosphatase." *Biochemistry* 47(36):9707–13.

- Thilo, Erich. 1962. "Condensed Phosphates and Arsenates." *Advances in Inorganic Chemistry and Radiochemistry* 4(C):1-75.
- Thomas, Mark P. and Barry V. L. Potter. 2014. "The Enzymes of Human Diphosphoinositol Polyphosphate Metabolism." *FEBS Journal* 281(1):14-33.
- Travers, R. J., S. A. Smith, and J. H. Morrissey. 2015. "Polyphosphate, Platelets, and Coagulation." *International Journal of Laboratory Hematology* 37(S1):31-35.
- Trilisenko, L. V., V. M. Vagabov, and I. S. Kulaev. 2002. "The Content and Chain Length of Polyphosphates from Vacuoles of *Saccharomyces Cerevisiae* VKM Y-1173." *Biochemistry (Moscow)* 67(5):592-96.
- Vallee, B. L. and K. H. Falchuk. 1993. "The Biochemical Basis of Zinc Physiology." *Physiological Reviews* 73(1):79-118.
- Wang, Lihong, Cresson D. Fraley, Jesika Faridi, Arthur Kornberg, and Richard A. Roth. 2003. *Inorganic Polyphosphate Stimulates Mammalian TOR, a Kinase Involved in the Proliferation of Mammary Cancer Cells.*
- Werner, Thomas P., Nikolaus Amrhein, and Florian M. Freimoser. 2005. "Novel Method for the Quantification of Inorganic Polyphosphate (IPoP) in *Saccharomyces Cerevisiae* Shows Dependence of IPoP Content on the Growth Phase." *Archives of Microbiology* 184(2):129-36.
- Wild, Rebekka, Ruta Gerasimaite, Ji-Yul Jung, Vincent Truffault, Igor Pavlovic, Andrea Schmidt, Adolfo Saiardi, Henning Jacob Jessen, Yves Poirier, Michael Hothorn, and Andreas Mayer. 2016. "Control of Eukaryotic Phosphate Homeostasis by Inositol Polyphosphate Sensor Domains." *Science (New York, N.Y.)* 352(6288):986-90.
- Wurst, H. and A. Kornberg. 1994. "A Soluble Exopolyphosphatase of *Saccharomyces Cerevisiae*. Purification and Characterization." *Journal of Biological Chemistry* 269(15):10996-1.

- Wurst, H., T. Shiba, and A. Kornberg. 1995. "The Gene for a Major Exopolyphosphatase of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Journal of Bacteriology* 177(4):898–906.
- Xiong, Yan, Xiao-Peng Jing, Xin-Wen Zhou, Xiu-Lian Wang, Yang Yang, Xu-Ying Sun, Mei Qiu, Fu-Yuan Cao, You-Ming Lu, Rong Liu, and Jian-Zhi Wang. 2013. "Zinc Induces Protein Phosphatase 2A Inactivation and Tau Hyperphosphorylation through Src Dependent PP2A (Tyrosine 307) Phosphorylation." *Neurobiology of Aging* 34(3):745–56.
- Yang, X., S. T. Safrany, and S. B. Shears. 1999. "Site-Directed Mutagenesis of Diphosphoinositol Polyphosphate Phosphohydrolase, a Dual Specificity NUDT Enzyme That Attacks Diadenosine Polyphosphates and Diphosphoinositol Polyphosphates." *The Journal of Biological Chemistry* 274(50):35434–40.
- Zhang, Bin, Weidong Wang, Chonghui Li, and Rong Liu. 2018. "Inositol Polyphosphate-4-Phosphatase Type II Plays Critical Roles in the Modulation of Cadherin-Mediated Adhesion Dynamics of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas." *Cell Adhesion and Migration* 12(6):548–63.

## *Anexos*

---







## Polyphosphate is a key factor for cell survival after DNA damage in eukaryotic cells



Samuel Bru<sup>a,1</sup>, Bàrbara Samper-Martín<sup>a,1</sup>, Eva Quandt<sup>a,1</sup>, Sara Hernández-Ortega<sup>a</sup>,  
Joan M. Martínez-Laínez<sup>a</sup>, Eloi Garí<sup>b</sup>, Marta Rafel<sup>b</sup>, Javier Torres-Torronteras<sup>c,d</sup>, Ramón Martí<sup>c,d</sup>,  
Mariana P.C. Ribeiro<sup>a</sup>, Javier Jiménez<sup>a,\*</sup>, Josep Clotet<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRBLleida), Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, Lleida, Spain

<sup>c</sup> Research Group on Neuromuscular and Mitochondrial Disorders, Vall d'Hebron Institut de Recerca, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Saccharomyces  
Mammalian cells  
Human dermal fibroblasts  
Polyphosphate  
DNA damage  
Repair

### ABSTRACT

Cells require extra amounts of dNTPs to repair DNA after damage. Polyphosphate (polyP) is an evolutionary conserved linear polymer of up to several hundred inorganic phosphate (Pi) residues that is involved in many functions, including Pi storage. In the present article, we report on findings demonstrating that polyP functions as a source of Pi when required to sustain the dNTP increment essential for DNA repair after damage. We show that mutant yeast cells without polyP produce less dNTPs upon DNA damage and that their survival is compromised. In contrast, when polyP levels are ectopically increased, yeast cells become more resistant to DNA damage. More importantly, we show that when polyP is reduced in HEK293 mammalian cell line cells and in human dermal primary fibroblasts (HDFa), these cells become more sensitive to DNA damage, suggesting that the protective role of polyP against DNA damage is evolutionary conserved. In conclusion, we present polyP as a molecule involved in resistance to DNA damage and suggest that polyP may be a putative target for new approaches in cancer treatment or prevention.

### 1. Introduction

Cells devote a substantial amount of resources to keep their genetic information unaltered. They are armed with a diverse array of mechanisms directly involved in repairing DNA when it is modified or damaged by one of many enabling factors [1–3]. It has been reported that when DNA is damaged in yeast, the amount of triphosphate deoxynucleotides (dNTPs) present in the cells increases sharply, a response that is essential for cell survival [4]. The molecular mechanism supporting the rise in dNTPs is derived from the downregulation of ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 [5] and the upregulation of *RNR* (Ribonucleotide reductase, responsible for the conversion of nucleoside diphosphate to deoxynucleoside diphosphate) genes [6,7]. Importantly, dNTPs increase directly correlates with tolerance to DNA damage [8] and has been associated with promoting either replication fork progression or translation [9]. Similarly, Ynk1 activity (the yeast nucleoside diphosphate kinase in charge of introducing the third phosphate, yielding the dNTP molecule—see Fig. 1) is also needed to

support dNTP synthesis during DNA damage, as suggested by the increased mutation rate after UV treatment observed in the *ynk1* mutant [10]. In metazoan cells, the increase of dNTPs levels after DNA damage, although present, is less pronounced, probably because it is restricted to foci in which DNA damage has been produced [11], yielding a locally high concentration that appears diluted in the overall cellular concentration.

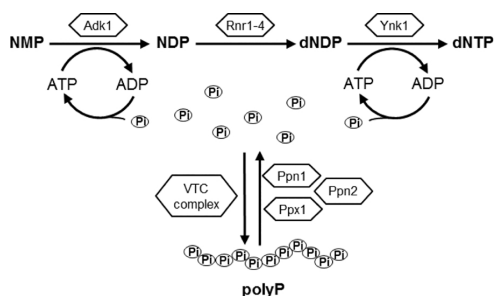
Synthesis of dNTPs also takes place every time a cell undergoes duplication, specifically, at the S phase, just before and during the duplication of DNA. It has recently been described that dNTPs synthesis produces a high consumption of Pi, which is provided, at least in part, by the degradation of polyphosphate (see below and Fig. 1) [12].

The homeostasis of Pi is tightly controlled by cells due to the fact that Pi is a crucial structural component in extremely important molecules such as phospholipids, nucleic acids, and proteins, but it is also a regulator of biochemical pathways. For this reason, many cells are equipped with sophisticated systems to monitor, control, and respond to small variations in intracellular Pi concentration in order to maintain

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [jjimenez@uic.es](mailto:jjimenez@uic.es) (J. Jiménez), [jclotet@uic.cat](mailto:jclotet@uic.cat) (J. Clotet).

<sup>1</sup> Contributed equally to this work.



**Fig. 1.** The dNTPs synthesis pathway.

Inorganic phosphate (Pi) is required for the synthesis of triphosphate deoxy-Nucleotides (dNTPs), both in the conversion from Nucleotide MonoPhosphate (NMP) to Nucleotide DiPhosphate (NDP) and in the conversion from deoxy-Nucleotide DiPhosphate (dNDP) to deoxy-Nucleotide TriPhosphate (dNTP). The enzymatic activities involved in these conversions in yeast are shown. Phosphate is stored in the cell in the form of polyP, which can be turned back into phosphate by the polyphosphates Ppn1 and Ppx1, and vice versa by the VTC complex.

the balance between Pi usage and intake. Yeast uses a complex system of Pi transporters responsible for intake [13–17], the expression of which, in most cases, is tightly monitored and controlled by the PHO pathway [18]. The PHO pathway responds to Pi internal concentration and becomes responsible for the control of Pi homeostasis (for a review on the PHO pathway see [19,20]).

In an additional control mechanism, and probably also as a back-up system for situations of scarcity, Pi is stored in the form of a molecule called polyphosphate (polyP) in the vacuole [21]. polyP is a linear chain comprised of anywhere between 3 and thousands of Pi residues present in all living organisms [22], including yeast and mammals [23]. The advantage of Pi storage in the form of polyP is to avoid the osmotic effect of housing large pools of Pi in the cytoplasm, but with the extra flexibility of having access to a source of Pi when needed [21], muffling any external limiting conditions that may transiently occur [24]. In yeast, polyP is a source of Pi used for sudden dNTPs demand in DNA duplication [12,25] (see Fig. 1).

In yeast, polyP is mainly synthesised and stored in the vacuoles by the vacuolar transporter chaperone (VTC) complex. The VTC complex is composed of the polyP polymerase Vtc4 and several regulatory subunits: Vtc1, Vtc2, Vtc3 [26], and Vtc5 [27]. In the opposite reaction, polyP is hydrolysed to Pi by 3 polyphosphatases: Ppn1 (an endopolyphosphatase that cleaves long chains of polyP into shorter ones), Ppn2 (a vacuolar endopolyphosphatase [28]) and Ppx1 (an cytoplasmic exopolyphosphatase that could be in charge of releasing orthophosphate from the ends of polyP chains) (see Fig. 1) [29].

In mammals, polyP is present in different tissues and in different subcellular compartments (nuclei, mitochondria, membranes and acidocalcisomes) [23,30,31]. A whole range of regulatory roles played by extracellular polyP in mammals is now emerging, including regulation of blood coagulation [32,33], bone mineralization [34], cell differentiation [35], and gene expression [36]. However, only a few reports describe functions for the intracellular polyP (functionality of cardiomyocytes [37] and control of the RNA polymerase I [38]), suggesting that many functions for polyP in mammalian cells remain unknown. One of the reasons for this lack of knowledge is the fact that the enzymes that control polyP metabolism in mammalian cells have not yet been identified.

In the present article, we show that polyP represents an important factor in sustaining the rise in dNTPs synthesis when DNA damage must be repaired. As our findings show, yeast mutants without available polyP produce reduced amounts of dNTPs upon DNA damage and their survival is compromised. In contrast, when polyP levels are ectopically increased, yeast cells become more resistant to DNA damage. More importantly, we demonstrate here that when polyP is artificially

reduced in HEK293 mammalian cell line cells and in human dermal primary fibroblast (HDFa), they become more sensitive to UV damage, suggesting that the protective role of polyP against DNA damage is evolutionary conserved. In conclusion, we present polyP as a molecule involved in the resistance to DNA damage.

## 2. Material and methods

### 2.1. Yeast growth conditions and strains

Yeast cells were grown in either YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, and 2% glucose) or complete synthetic dextrose (SD) medium (0.67% yeast nitrogen base, 0.5%  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ , and 2% glucose) supplemented with amino acids for auxotrophic requirements. The genetic background of the yeast in all experiments was BY4741 [39]. Mutant strains were constructed using the toolbox system [40]: YSB075 (*vtc4:kanMX*), YSB098 (*ppn1:KanMX*, *ppx1:LEU2*), YSB083 (*dun1:KanMX*), YSB088 (*adk1:KanMX*), YSB89 (*ynk1:KanMX*) and YSB074 (*vtc1:KanMX*). *ppn1Δ*, *ppn2Δ*, *ppx1Δ* triple mutant is from [28].

### 2.2. Cell cycle synchronization and flow cytometry analysis

To synchronize yeast cells, cultures were grown exponentially in YPD at a density of  $1 \times 10^7$  cells/ml. Cells were treated with  $\alpha$ -factor (Biomedal) to a final concentration of 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . After 2 h of treatment, cells were collected by centrifugation, washed with pre-warmed fresh media, and released to resume cell cycle progression. Approximately  $1 \times 10^7$  cells were collected and processed as described previously [41]. DNA was stained with SYBR green and subsequently analysed in a FACS Calibur cytometer (Becton Dickinson) [42].

### 2.3. Immunoblot analysis

The primary antibodies used were anti tubulin 1:200 (Sigma T5168), anti FLAG 1:500 (Sigma F3165), anti Rad53 1:700 (Santa Cruz, sc-6749), and anti-G6PDH 1:500 (Sigma, A9521). The secondary antibodies used were sheep anti-mouse HRP 1:30,000, donkey anti-goat-HRP 1:20,000, and goat anti-rabbit-HRP 1:25,000 (all from Jackson laboratories). Immunoblots were developed using Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore) and images were taken with GeneSnap (Syngene) and quantified with Image Studio Lite (Li-Cor).

### 2.4. Microscopy

Once transfected, cells were washed three times with PBS, fixed using 4%-paraformaldehyde for 15 min, washed twice with PBS, incubated with Hoechst 33342 (Thermo Scientific Pierce) for 5 min, washed twice with PBS and mounted using Fluoromount-G provided by Southernbiotech. The microscope was a Nikon Eclipse Ti equipped with a Andor DSD camera. The constructs for Ppx1 nuclear observation were cloned in the plasmid pCDNA3.1 and consist of a fusion of the *Ppx1* gene from *S. cerevisiae* followed by the *eGFP* gene (amplified by PCR from plasmid pEGFP-C1 by Clontech) and a NLS sequence from the SV40 virus described in [43]. Two glycine residues were inserted between *eGFP* and NLS to ensure the functioning of the latter.

### 2.5. Quantification and visualization of polyP

PolyP extraction and purification was performed as previously described [44]. Briefly,  $1 \times 10^7$  ( $0.7 \text{ OD}_{660}$ ) cells were pelleted and suspended in 40  $\mu\text{l}$  of SDS (20%) and 300  $\mu\text{l}$  of phenol, boiled at 65 °C for 10 min, and, subsequently, 300  $\mu\text{l}$  of chloroform was added. After centrifugation, the supernatant was treated with a DNase/RNase solution for 1 h at 37 °C and applied to Qiagen PCR purification columns. After washing, polyP was eluted in 50  $\mu\text{l}$  of MQ  $\text{H}_2\text{O}$  and quantified using a malachite green method as previously described [45]. A

microplate spectrophotometer (Synergy HT, Bio Tek Instruments) was used at 600 nm and compared with phosphate standards (0–500  $\mu\text{M}$   $\text{P}_i$ ). polyP visualization by PAGE was as described in [44].

## 2.6. Measurement of dNTPs levels

Deoxynucleotides extraction was performed as previously described [4]. Amounts were measured by means of a polymerase-based method as previously described [46].

## 2.7. PolyP overproduction

Intracellular polyP content was increased in wild-type cells by 2 different methods. First, transforming the cells with a pRS426 episomal vector in which the *VTC4* yeast gene had been previously cloned. Second, wild-type cells were submitted to overloading conditions [45]. Cells were grown in SD low-phosphate media for 6 h, then collected by centrifugation and suspended in SD 2 mM phosphate content for 15 min (1X), 30 min (2X) and 1 h (3X). After the incubation, polyP was measured to assess the content.

## 2.8. Measurement of UV DNA damage sensitivity in yeast

To measure UV sensitivity,  $0.5 \times 10^3$  cells were spread on YPD plates and irradiated with the indicated doses. Cells were grown at 30 °C in darkness for 48 h. Colonies were counted automatically using the GeneTools (Syngene) software. Wild-type viability was considered to be 100% survival for the experiment and was used to normalize the survival percentage.

## 2.9. MMS sensitivity in yeast

Exponentially growing yeast cells ( $\text{OD}_{\lambda 660}$  0.2) were exposed to 0.033% MMS (Methyl Methane Sulfonate) from Sigma for 4 h and plated in YPD plates. The control was performed using the same cell exposed to the vehicle (DMSO) in which MMS was dissolved. Cells were grown at 30 °C in darkness for 48 h. Resulting colonies were automatically counted using the GeneTools (Syngene) software. Wild-type viability was considered to be 100% and used to normalize the survival percentage.

## 2.10. 4-NQO treatment in yeast

4-NQO is a molecule generally used when the DNA damage experiments are performed in liquid media [47] to mimic UV damage. Exponentially growing cells ( $\text{OD}_{\lambda 660}$  0.4) were exposed to 4-NQO (4-Nitroquinoline) 0.4 mg/l from Sigma. Aliquots were taken at the desired time to analyse the amount of dNTPs, polyP, or some proteins, as described in other parts of this section.

## 2.11. Measurement of DNA damage sensitivity in HEK293 cells

Human embryonic kidney HEK293 cells were grown in DMEM (Sigma) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Gibco), 2-mM L-glutamine (Sigma), 4 units/ml of penicillin, and 20 mg/ml of streptomycin (Gibco). Cells were transfected with 20  $\mu\text{g}$  of the desire construct using the calcium phosphate method. At 16 h after transfection, the medium was replaced with the initial culture medium. The efficiency of overexpression of the different genes was assessed by immunoblot analysis, which demonstrated maximal effects at 48 h.

Transfected HEK293 cells carrying the pIRES2-eGFP empty vector, *scPPX1* or NLS-*scPPX1*, were seeded after 48 h of transfection on a 48-well plate at  $7.5 \times 10^4$  cells/well by six-fold. At 24 h, the medium was removed, cells were irradiated with 8 mJ UV, and the medium was replaced. At 23 h, MTT at a final concentration of 0.2 mg/ml was added to each well and 1 h later the medium was removed and cells were lysed

in the presence of DMSO. Absorbance was determined at 570 nm.

## 2.12. Lentiviral transduction

Lentiviral transduction was carried out following the manufacturer's instructions (Invitrogen). Briefly, HEK293T cells were used for virus production. HEK293T cells ( $5 \times 10^6$ ) were transfected with lentivirus and packaging (gag-pol, vsvg, rev) plasmids (Addgene) using the calcium phosphate method. Viruses were harvested 72 h post-transfection and concentrated using ultracentrifugation.

## 2.13. Measurement of DNA damage sensitivity in HDFa

HDFa cells were grown in M106 (Life technologies) supplemented with Low Serum Growth Supplement (Gibco), 4 units/ml of penicillin, 20 mg/ml of streptomycin (Gibco), and 10  $\mu\text{g}$ /ml of gentamicin (Gibco). Cells were infected with the desired lentivirus: pLenti6/V5-DEST, pLenti6/V5-DEST-scPPX1, or pLenti6/V5-DEST-NLS-scPPX1 with 8  $\mu\text{g}$ /ml of polybrene. At 24 h after infection, medium was replaced with fresh culture medium. The efficiency of overexpression of the different genes was assessed by immunoblot assay, which demonstrated maximal effects at 48 h.

Infected HDFa cells carrying the pLenti6/V5-DEST empty vector, *scPPX1*, or NLS-*scPPX1* were seeded after 48 h of infection on a 12-well plate at  $46 \times 10^3$  cells/well by four-fold. At 24 h, the medium was removed, cells were irradiated with 6 mJ UV, and the medium was replaced. At 23 h, MTT at a final concentration of 0.2 mg/ml was added to each well and 1 h later the medium was removed and cells were lysed with DMSO. Absorbance was determined at 570 nm.

## 2.14. Statistical analysis

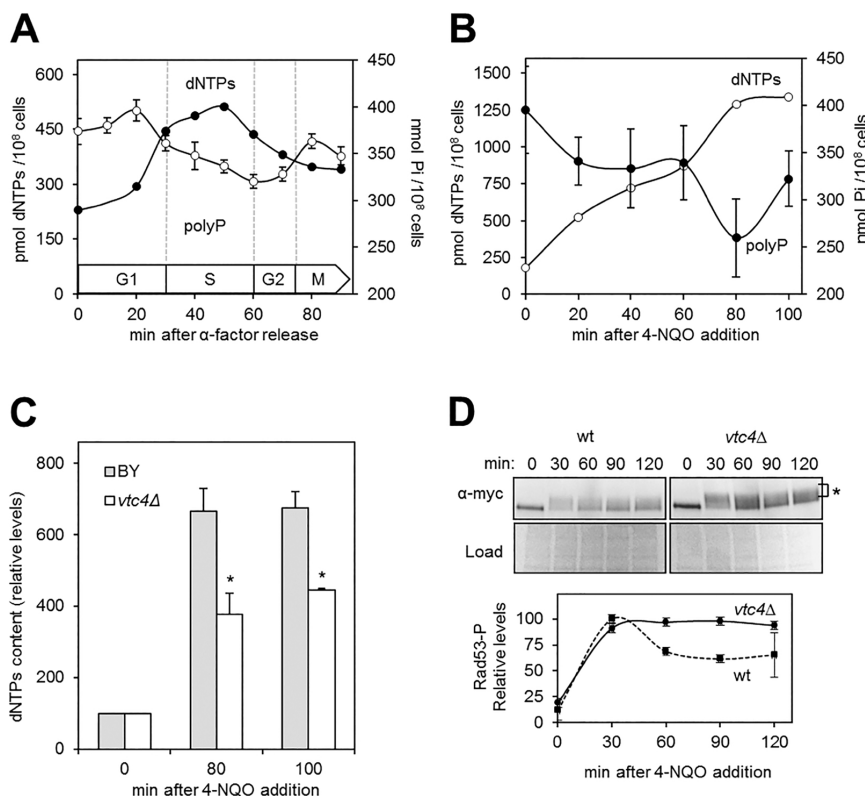
At least 3 independent experiments were performed. Data were expressed as mean value  $\pm$  standard error of the mean (SEM). For variables not following a normal distribution, statistical significance was determined using the Mann-Whitney *U* test. For variables in a group not following a normal distribution Anova test was used.  $p < 0.05$  was considered significant and noted using one asterisk; 2 asterisk are for  $p < 0.01$  and 3 for  $p < 0.001$ .

## 3. Results

### 3.1. polyP is degraded after DNA damage

Among its many functions, polyP is a source of  $\text{P}_i$  for biosynthesis purposes. Recently, we showed that polyP is also involved in providing  $\text{P}_i$  for the massive synthesis of dNTPs that takes place when a yeast genome is about to be replicated [12,25] and Fig. 2A.

In addition to its role as an essential component for DNA synthesis, dNTPs are also needed for DNA repair after damage and, consequently, dNTPs concentration suddenly increase when DNA damage occurs in order to maintain cell viability [4]. This scenario led us to hypothesize that this increment may be supported, to some extent, by the hydrolysis of polyP. To test this hypothesis, we measured polyP and dNTPs levels before and after inducing DNA damage to exponentially growing yeast cells by adding 0.4 mg/l of 4-nitroquinoline (4-NQO), a molecule that mimics the UV radiation effect [48]. As predicted, after DNA damage we observed an increase in dNTPs levels that correlated with a reduction in polyP content (Fig. 2B). To further investigate the involvement of polyP as the supplier of  $\text{P}_i$  after DNA damage, we induced DNA damage by adding 4-NQO to *vtc4* $\Delta$  cells, which do not contain polyP [12]. The results, presented in Fig. 2C, show that *vtc4* $\Delta$  cells produced significantly less dNTPs than wild-type cells. Accordingly, the DNA damage persisted for longer in the *vtc4* $\Delta$  cells as denoted by the extended phosphorylation of Rad53 (Fig. 2D), a readout generally used to show the presence of DNA damage [49].



**Fig. 2.** dNTPs and polyP levels change upon DNA damage.

(A) Correlation between polyP and dNTP levels during the yeast cell cycle. Wild-type yeast cells were synchronized in G<sub>1</sub> with  $\alpha$ -factor and released into fresh YPD medium. At the indicated times, samples were taken to measure polyP and dNTP. For polyP, data are presented as mean  $\pm$  SEM from 4 independent experiments. The dNTP data was obtained from a single experiment, and the values represent the sum of the levels of the 4 dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, and dGTP). The indicated length of each phase was determined by flow cytometry analysis. (B) Correlation between polyP and dNTP levels upon DNA damage. 4-NQO at a final concentration of 0.4 mg/l was added to exponentially and non-synchronously growing wild-type yeast cells. At the indicated times, samples were taken to measure polyP and dNTP levels. For polyP, data are presented as mean  $\pm$  SEM from 4 independent experiments. The dNTP data was obtained from a single experiment, and the values represent the sum of the levels of the 4 dNTPs. (C) Relative dNTPs content in cells without polyP after DNA damage. The same experiment was performed as in B, but it included a *vtc4* $\Delta$  mutant strain that was unable to synthesize polyP. The asterisk represents statistically significant differences ( $p < 0.05$ ). Values were relative to time 0. (D) DNA damage lasts longer in *vtc4* $\Delta$  cells. The same experiment was performed as in B, with samples taken for analysis of electrophoretic migration of the protein Rad53-9myc by Western Blot using anti myc specific antibodies. Ponceau staining of the membrane was used as a loading control.

The asterisk is to mark the signal considered as phosphorylated Rad53 and subjected to the quantification showed in the panel below. In the quantification all the intensities were normalized according to the highest. Three independent experiments were quantified.

### 3.2. *polyP* mutants are more sensitive to DNA damage

If Pi sourced from polyP hydrolysis is involved in the rise of dNTPs after DNA damage, as described above, we deduced that polyP mutants should be more sensitive to DNA damage. To confirm or refute this, we plated the different yeast polyP mutant strains in rich medium and immediately induced DNA damage by UV irradiation. As presented in Fig. 3A, the mutant *vtc4* $\Delta$  (without polyP) and *ppn1* $\Delta$  *ppx1* $\Delta$  or *ppn1* $\Delta$  *ppn2* $\Delta$  *ppx1* $\Delta$  (unable to degrade polyP) showed a 50% reduction in viability after UV irradiation. On the basis of these findings, we reasoned that mutants in the dNTP synthesis pathway (e.g. *adk1* $\Delta$  and *ynk1* $\Delta$ ) should also be more sensitive to DNA damage, and indeed this was the case (Fig. 3A). We measured the polyP content upon DNA damage conditions in the polyphosphatases mutants and, as expected, and on the contrary to the wild-type strain, the amount of polyP remains unaltered (Fig. 3C). We also provide with the visualization of the polyP in PAGE gels where the same phenomenon can be observed (Fig. 3C right panel). Interestingly, but as already reported in [28] the polyP in the triple mutant is barely visible. We obtained similar viability results when the damaging agent used was MMS (Fig. 3B), suggesting that the protective effect of polyP is more general and not restricted to the UV damage only.

### 3.3. Accumulation of polyP protects yeast cells from DNA damage

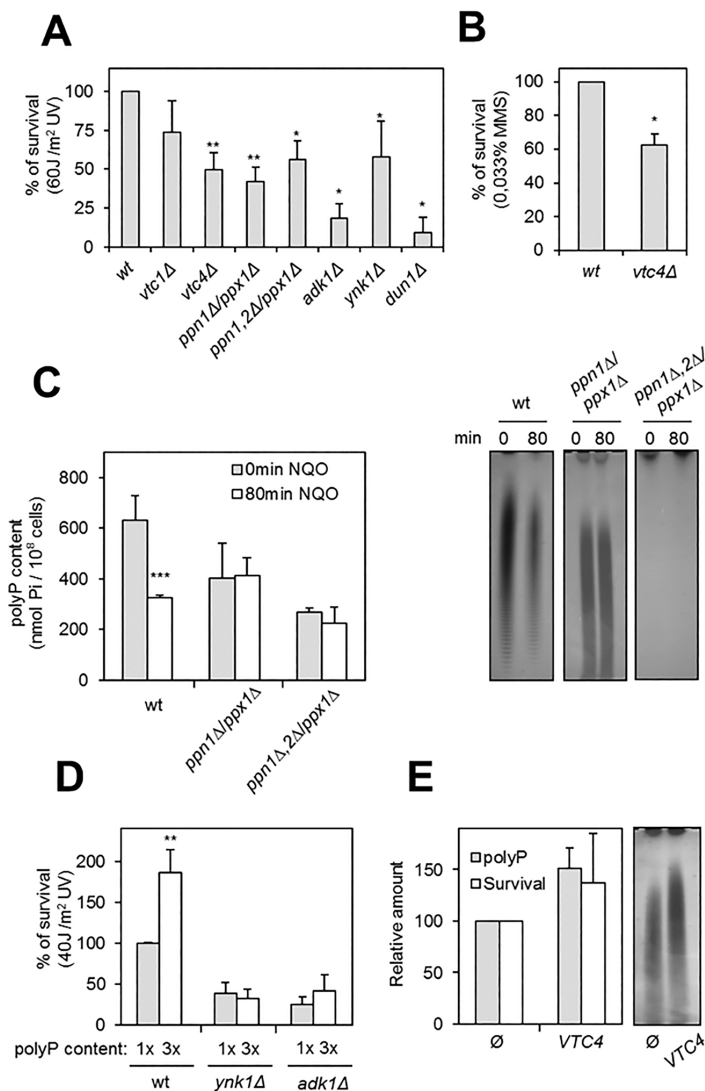
To achieve further insight on the role of polyP in cell survival after DNA damage, we performed the opposite experiment, increasing the starting quantities of polyP in wild-type cells through an overloading

protocol [45]. Using this experimental setup, we found a statistically significant correlation between the quantity of polyP and the percentage of survival cells upon irradiation (Fig. 3D) effect that is not observed in *ynk1* $\Delta$  or *adk1* $\Delta$  cells with the dNTP synthesis pathway impaired.

Accordingly, when the quantity of the protein Vtc4 was increased in cells by overexpressing the *VTC4* gene from the episomal pRS426 plasmid, leading a polyP increase of approximately 20% (both by biochemical quantification and visualization analysis), we also observed greater resistance to UV radiation when compared to cells bearing the empty plasmid (Fig. 3E). This Taken together, these experiments firmly suggest that polyP is somehow involved in the process of DNA repair and cell survival after DNA damage.

### 3.4. *polyP* is an important factor for mammalian cells survival after DNA damage

To further our investigation, we aimed to determine whether the protective role of polyP after DNA damage is conserved in mammalian cells. Due to the fact that the mammalian enzymes responsible for the synthesis and degradation of polyP have not yet been identified, several authors have used the overexpression of the yeast gene *PPX1* as an efficient method to deplete polyP in cultured human cells [50]. Indeed, HEK293 cells overexpressing *PPX1* present reduced amounts of polyP both by biochemical quantification and by PAGE followed by DAPI visualization (Fig. 4A) and, importantly, lower viability after UV radiation (Fig. 4B). In metazoan cells, dNTPs increase during UV recovery is most likely restricted to the foci where the DNA damage took place



**Fig. 3.** polyP is involved in the survival of yeast cells after DNA damage.

(A) Strains that cannot use (or do not have) polyP are more sensitive to UV stress. Exponentially growing cells of the different mutants tested were plated on YPD plates and UV irradiated (60 J/m<sup>2</sup>). The plates were incubated at 30 °C for 48 h and the resulting colonies were automatically counted. Strains with defects in dNTP synthesis were included in the experiment (*ynk1*, *dun1*, and *adk*). Mean  $\pm$  SEM from 4 independent experiments is shown. The asterisks indicate statistically significant differences (\* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01). (B) *vtc4Δ* cells with no polyP are more sensitive to MMS stress. Wild-type and *vtc4Δ* exponentially growing cells in synthetic medium were incubated with 0.033% MMS during 4 h, then plated on YPD plates. The plates were incubated at 30 °C for 48 h and the resulting colonies were automatically counted. Mean  $\pm$  SEM from 3 independent experiments is shown. The asterisk indicates statistically significant differences ( $p$  < 0.05). (C) polyP content of cells unable to mobilize the polyP after DNA damage induction by incubation with 0.4 mg/l 4-NQO for 80 min. polyP was measured both by malachite green method (left panel) and PAGE followed by DAPI staining (right panel). Mean  $\pm$  SEM from 3 independent experiments is shown. The asterisks indicate statistically significant differences (\*\* $p$  < 0.001). (D) In wild-type cells, a higher level of polyP correlates with greater survival after UV stress. Noted cells were overloaded with polyP by changing the growing conditions (see Materials and Methods). Under these special conditions, cells present 3 times more polyP than cells growing under normal conditions (measured by malachite green method). The cells were plated in YPD and irradiated with 40 J/m<sup>2</sup>. The plates were incubated at 30 °C for 48 h and the resulting colonies were automatically counted. Mean  $\pm$  SEM from 3 independent experiments is shown. The asterisk indicates statistically significant differences (\* $p$  < 0.01). (E) Overexpression of *VTC4* confers resistance to UV stress. *VTC4* was cloned in a multicopy pRS426 vector and transformed in a wild-type strain. Cells with an empty vector or with pRS426-*VTC4* were plated in YPD and irradiated with 60 J/m<sup>2</sup>. The plates were incubated at 30 °C for 48 h and the resulting colonies were automatically counted. polyP content was measured by malachite green method (left panel) and visualized by PAGE and DAPI staining (right panel). The values presented are relative to those found when cells were transformed with the empty vector. Mean  $\pm$  SEM from 3 independent experiments is shown. The asterisk indicates statistically significant differences ( $p$  < 0.05).

[11], suggesting that the important fraction of polyP during DNA damage response in metazoan cells might be nuclear. Interestingly, HEK293 cells bearing the *PPX1-eGFP* gene fused to a nuclear localization signal able to drive Ppx1 to the nucleus (Fig. 4C) were still sensitive to UV radiation, indicating to the nuclear polyP fraction as a possible resistance factor against UV damage in cultured cell lines.

Finally, we challenged the idea of the protective role of polyP in a more physiological model. UV sunlight reaches the dermis in human skin and induces chemical damage in dermal fibroblasts [51]. We transduced primary cultures of human dermal fibroblasts (HDFa) with a lentivirus carrying the 2 previously mentioned versions of *PPX1*. Dermal fibroblasts expressing *PPX1* were more sensitive to UV radiation than control cells (Fig. 4D), suggesting that polyP may act as a protective factor against UV damage in human skin.

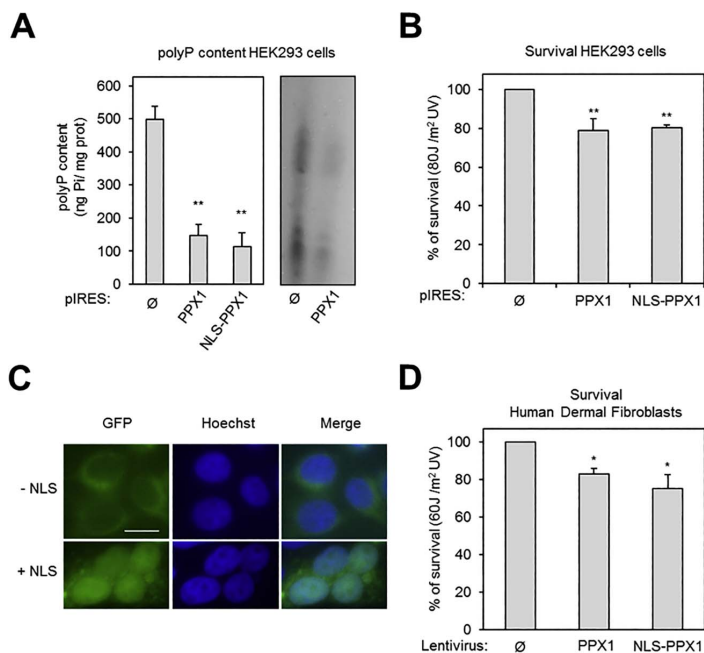
## 4. Discussion

### 4.1. polyP is needed for survival after DNA damage

polyP has a broad array of functions, both in bacteria and in eukaryotic cells. It has recently been demonstrated that yeast polyP is a source of Pi for the synthesis of nucleotides during the DNA replication process. [12]. The hypothesis explored in the present work is centred on addressing whether polyP could also be necessary to sustain the synthesis of the extra amounts of dNTPs that appear during DNA repair after damage [4].

This hypothesis has been very much supported, at least in prokaryotes [52]. It has been reported that polyP is degraded after UV damage in cyanobacteria [53], polyP has also been found to regulate the activity of *E. coli* Y-family polymerases [54]. Indeed, the lesion-bypass activity of these polymerases has been observed to be lost when cells are unable to synthesize polyP [55]. In addition, polyP has also been reported to be





**Fig. 4.** polyP depletion reduces survival rates of mammalian cells after DNA damage.

(A) *PPX1* and *NLS-PPX1* overexpression produces polyP depletion in HEK293 cells. *PPX1* and a version in which a Nuclear Localization Signal (NLS) was added to *PPX1* were cloned in a piRES vector and transfected in HEK293 cells before measuring the amount of polyP. polyP was also visualized by PAGE and DAPI staining (right panel). Mean  $\pm$  SEM from 3 independent experiments is shown. The asterisks indicate statistically significant differences (\*\* $p < 0.01$ ). (B) Low levels of polyP decrease resistance to UV stress in mammalian cell line cultures. HEK293 cells were transfected with the same plasmid as in (A). Cultured cells were irradiated with 80 J/m<sup>2</sup> and viability was assessed by MTT assay. Mean  $\pm$  SEM from 3 independent experiments is shown. The asterisks indicate statistically significant differences (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ). (C) Ppx1-eGFP and Ppx-eGFP-NLS are expressed in transfected HEK293. Nuclear localization of the noted constructs was checked by fluorescence microscopy. The bar represents 100  $\mu$ m. (D) Low levels of polyP decrease the resistance to UV stress in primary HDFa cells. A primary culture of Human Dermal Fibroblasts (HDFa) transfected with the indicated lentivirus was irradiated with 60 J/m<sup>2</sup>. Viability was assessed by the MTT method after 24 h. Mean  $\pm$  SEM from 5 independent experiments is shown. The asterisk indicates statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

required for the transcriptional induction of *E. coli* RecA (a protein that regulates DNA protective mechanisms) following DNA damage [56], indicating that polyP could perform this protective role through diverse molecular mechanisms.

In the present work, we have demonstrated that polyP in yeast is needed for cell viability after DNA damage. One of the reasons for this effect is that polyP sustains the correct increase of dNTPs levels after DNA damage. However, looking carefully at these results, it is striking that the 40% reduction in dNTPs levels in the polyP mutants during the first 80 min (Fig. 2C) could produce such remarkable effect in terms of survival (Figs. 3A and B), perhaps because either the reduction in dNTPs concentration trespasses an enzymatic activity threshold, partially inactivating the DNA repair polymerase, or other molecular mechanisms may be involved in sustaining this viability. Indeed, polyP may be necessary for maintaining energy in the form of the ATP needed for repairing damaged DNA in several organisms [57–59]. In metazoans, the protein Nudix5 produces ATP from ADP-ribose and pyrophosphate [60], opening up the question of whether polyP may be the source of Pi for both dNTPs and the energy burst required to repair damaged DNA.

The fact that yeast polyP is needed for cell survival after DNA damage leads us to a new interpretation of some unconnected pieces of information that were not completely understood in the field of polyP. For example, the fact that the polyphosphatase Ppn1 moves from the vacuole to the cytoplasm when dNTPs synthesis is inhibited by hydroxyurea [61], and that *vtc4* mutants are also sensitive to hydroxyurea [62]. Both phenotypes may be integrated into a scenario in which polyP plays a role in DNA repair.

#### 4.2. polyP maintains the pi homeostasis needed for DNA damage repair

Cells growing in rich media (with Pi largely available) are equipped with low affinity Pi transporters that can easily cope with internal Pi demand [14,16]. Interestingly, the role of polyP as Pi supplier in DNA repair is clearly evident, even in Pi-rich medium, suggesting that when cells face a high and unexpected demand of Pi, they prefer to obtain Pi

by hydrolysing polyP rather than use the relatively slow process of expressing, synthesizing, and locating high affinity Pi transporters in the membrane. This idea is supported by numbers: in rich media, a yeast cell has an estimated Pi transport activity of between  $4.6 \times 10^6$  and  $7.8 \times 10^7$  molecules/min [14,63,64], which is approximately the amount of phosphate needed to support the constant synthesis of RNA and phospholipids (based on our previous calculation, [12]) and subsequent extra demands must be managed differently. Since DNA damage cannot be predicted by cells, they cannot equip themselves with alternative fast response mechanisms other than polyP.

In this context it must be noted that the polyP function in tackling the unexpected demands of phosphate has also been found in a different scenario: the switch from low glucose to high glucose media [65,66]. This transition implies a sudden activation of glycolysis, resulting in a massive Pi consumption in a very short period of time. polyP is therefore essential in muffling sudden internal variations due to periodic situations such as glycolysis onset [65,66], DNA replication [12,25], and DNA repair, the subject of the present work.

#### 4.3. polyP, a new UV protection factor in mammalian cells

The results presented here point to polyP as an important factor in the recovery from DNA damage in HEK293 renal cells and, more importantly, also in primary cultures of human dermal fibroblasts. Dermal fibroblast protection by polyP is especially relevant because these cells are components of the skin and thus they are the most exposed and vulnerable cells to UV insults in the human body [51]. Although our results indicate that polyP plays a protective role by sustaining dNTPs synthesis, the underlying molecular mechanism remains unknown.

DNA damage and the correct levels of dNTPs are important factors that are directly related to cancer [67–70]. Here we present results supporting the hypothesis of the protective role of polyP against malignant transformation. Consequently, polyP and the molecular machinery involved in its metabolism, which remains unknown, have the potential to become targets for cancer treatment or prevention, like other repair mechanisms or pathways [71,72]. However, further

advancements in this field are needed to identify and describe the biochemical machinery involved in mammalian polyP metabolism, a project that our laboratory is fully engaged in.

## 5. Conclusions

- 1 polyP in yeast is consumed during DNA repair after damage
- 2 polyP is involved in providing Pi for the extra synthesis of the dNTPs needed for DNA repair in yeast.
- 3 Yeast and mammalian cells without polyP are more sensitive to DNA damage.

## Conflict of interest

None.

## Acknowledgments

We would like to thank all the members of our group (E. Bállega, O. Mirallas, M. Ribeiro, A. Sánchez, B. Semper, and R. Carballar) for day-to-day talks, and Marta Pérez for technical assistance. The yeast *ppn1Δ*, *ppn2Δ*, *ppx1Δ* strain is a kind gift from A Mayer (Université de Lausanne). This work was supported by funding from the Spanish Government, with a MINECO grant (Ref: BFU 2013-44189-P) awarded to J. Clotet and a MICINN grant (Ref: BFU 2013-42895-P) awarded to E. Garí. J.M.M. was the recipient of a post-graduate Junior Faculty Fellowship from the UIC and l'Obra Social la Caixa.

## References

- [1] A. Sancar, L.A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kacmaz, S. Linn, Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints, *Annu. Rev. Biochem.* 73 (2004) 39–85, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723>.
- [2] C.P. Spampinato, Protecting DNA from errors and damage: an overview of DNA repair mechanisms in plants compared to mammals, *Cell. Mol. Life Sci.* (2016) 1693–1709, <http://dx.doi.org/10.1007/s00118-016-2436-2>.
- [3] N. Hustedt, D. Durocher, The control of DNA repair by the cell cycle, *Nat. Cell Biol.* 19 (2016) 1–9, <http://dx.doi.org/10.1038/ncb3452>.
- [4] A. Chabes, B. Georgieva, V. Domkin, X. Zhao, R. Rothstein, L. Thelander, Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase, *Cell* 112 (2003) 391–401, <http://dx.doi.org/10.1016/S0092867403000758>.
- [5] X. Zhao, A. Chabes, V. Domkin, L. Thelander, R. Rothstein, 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 (2001) 3544–3553, <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/20.13.3544>.
- [6] S.J. Elledge, Z. Zhou, J.B. Allen, Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, *Trends Biochem. Sci.* 17 (1992) 119–123, [http://dx.doi.org/10.1016/0968-0004\(92\)90249-9](http://dx.doi.org/10.1016/0968-0004(92)90249-9).
- [7] O. Tsaponina, E. Barsoum, S.U. Astrom, A. Chabes, Ixr1 is required for the expression of the ribonucleotide reductase Rnr1 and maintenance of dNTP pools, *PLoS Genet.* 7 (2011) e1002061, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1002061>.
- [8] A. Chabes, B. Stillman, 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 (2007) 1183–1188, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0610585104>.
- [9] M. Fasullo, O. Tsaponina, M. Sun, A. Chabes, Elevated dNTP levels suppress hyper-recombination in *Saccharomyces cerevisiae* S-phase checkpoint mutants, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 1195–1203, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkp1064>.
- [10] M. Yang, S.G. Jarrett, R. Craven, D.M. Kaetzel, YNK1, the yeast homolog of human metastasis suppressor NM23, is required for repair of UV radiation- and etoposide-induced DNA damage, *Mutat. Res.* 660 (2009) 74–78, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.09.015>.
- [11] H. Niida, Y. Katsuno, M. Sengoku, M. Shimada, M. Yukawa, M. Ikura, T. Ikura, K. Kohno, H. Shima, H. Suzuki, S. Tashiro, M. Nakanishi, Essential role of Tip60-dependent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage sites in DNA repair during G1 phase, *Genes Dev.* 24 (2010) 333–338, <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1863810>.
- [12] J.M. Bru, E. Hernandez-Ortega, R.R. Torres-Torronteras, D. Marti, J. Canadell, S. Arino, J. Sharma, J. Clotet, Polyphosphate is involved in cell cycle progression and genomic stability in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Microbiol.* 101 (3) (2016) 367–380, <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.13396>.
- [13] N. Ogawa, J. DeRisi, P.O. Brown, New components of a system for phosphate acquisition and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis, *Mol. Biol. Cell* 11 (2000) 4309–4321.
- [14] D.D. Wykoff, E.K. O'Shea, Phosphate transport and sensing in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* 159 (2001) 1491–1499.
- [15] B.L. Persson, J.O. Lagerstedt, J.R. Pratt, J. Pattison-Granberg, K. Lundh, S. Shokrollahzadeh, F. Lundh, Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Genet.* 43 (2003) 225–244, <http://dx.doi.org/10.1007/s00294-003-0400-9>.
- [16] D.D. Wykoff, A.H. Rizvi, J.M. Raser, B. Margolin, E.K. O'Shea, Positive feedback regulates switching of phosphate transporters in *S. cerevisiae*, *Mol. Cell.* 27 (2007) 1005–1013, [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(07\)00495-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(07)00495-9).
- [17] D. Secco, C. Wang, B.A. Arpat, Z. Wang, Y. Poirier, S.D. Tyerman, P. Wu, H. Shou, J. Whelan, The emerging importance of the SPX domain-containing proteins in phosphate homeostasis, *New Phytol.* 193 (2012) 842–851.
- [18] Y.S. Lee, K. Huang, F.A. Quiocho, E.K. O'Shea, Molecular basis of cyclin-CDK-CKI regulation by reversible binding of an inositol pyrophosphate, *Nat. Chem. Biol.* 4 (2008) 25–32, <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.2007.52>.
- [19] D. Huang, H. Friesen, B. Andrews, Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast, *Mol. Microbiol.* 66 (2007) 303–314, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05914.x>.
- [20] J. Jimenez, N. Ricco, C. Grijota-Martinez, R. Fado, J. Clotet, Redundancy or specificity? the role of the CDK Pho85 in cell cycle control, *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 4 (2013) 140–149.
- [21] A. Kornberg, Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions, *Prog. Mol. Subcell Biol.* 23 (1999) 1–18.
- [22] I.S. Kulaev, V.M. Vagabov, Polyphosphate metabolism in micro-organisms, *Adv. Microb. Physiol.* 24 (1983) 83–171.
- [23] K.D. Kumble, A. Kornberg, Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 5818–5822.
- [24] M.R. Thomas, E.K. O'Shea, An intracellular phosphate buffer filters transient fluctuations in extracellular phosphate levels, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 9565–9570, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0501122102>.
- [25] J. Jimenez, S. Bru, M.P. Ribeiro, J. Clotet, Polyphosphate Popping up from oblivion, *Curr. Genet.* (2016) 15–18, <http://dx.doi.org/10.1007/s00294-016-0611-5>.
- [26] M. Hothorn, H. Neumann, E.D. Lenher, M. Wehner, V. Rybin, P.O. Hassa, A. Uttenweiler, M. Reinhardt, A. Schmidt, J. Seiler, A.G. Ladurner, C. Herrmann, K. Scheffzek, A. Mayer, Catalytic core of a membrane-associated eukaryotic polyphosphate polymerase, *Science* 324 (2009) 513–516, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1168120>.
- [27] Y. Desfougères, R.U. Gerasimaite, H.J. Jessen, A. Mayer, Vtc5, a novel subunit of the vacuolar transporter chaperone complex, regulates polyphosphate synthesis and phosphate homeostasis in yeast, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 22262–22275, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M116.746784> [pii].
- [28] R. Gerasimaite, A. Mayer, Ppn2, a novel Zn<sup>2+</sup>-dependent polyphosphatase in the acidocalcisome-like yeast vacuole, *J. Cell Sci.* 130 (2017) 1625–1636, <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.201061>.
- [29] N.A. Andreeva, T.V. Kulakovskaya, I.S. Kulaev, High molecular mass exopolyphosphate from the cytosol of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by the PPN1 gene, *Biochemistry (Moscow)* 71 (2006) 975–977, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochem.2006.09.011>.
- [30] B. Lorenz, J. Munkner, M.P. Oliveira, A. Kuuskalu, J.M. Leita, W.E. Muller, H.C. Schroder, Changes in metabolism of inorganic polyphosphate in rat tissues and human cells during development and apoptosis, *Biochim. Biophys. Acta* 1335 (1997) 51–60, [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165\(96\)00121-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165(96)00121-3).
- [31] R. Docampo, W. de Souza, K. Miranda, P. Rohloff, S.N. Moreno, Acidocalcisomes – conserved from bacteria to man, *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (2005) 251–261, <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1097>.
- [32] S.A. Smith, N.J. Mutch, D. Baskar, P. Rohloff, R. Docampo, J.H. Morrissey, Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 903–908, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0510157103>.
- [33] F. Muller, N.J. Mutch, W.A. Schenk, S.A. Smith, L. Esterl, H.M. Spronk, S. Schmidbauer, W.A. Gahl, J.H. Morrissey, T. Renne, Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo, *Cell* 139 (2009) 1143–1156, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.001>.
- [34] S. Omelon, J. Georgioud, Z.J. Heneman, L.M. Wise, B. Sukhu, T. Hunt, C. Wynnycyk, D. Holmyard, R. Bielecki, M.D. Grynpas, Control of vertebrate skeletal mineralization by polyphosphates, *PLoS One* 4 (2009) e5634, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005634>.
- [35] D. Morimoto, T. Tomita, S. Kuroda, C. Higuchi, S. Kato, T. Shiba, H. Nakagami, R. Morishita, H. Yoshikawa, Inorganic polyphosphate differentiates human mesenchymal stem cells into osteoblastic cells, *J. Bone Miner. Metab.* 28 (2010) 418–423, <http://dx.doi.org/10.1007/s00774-010-0157-4>.
- [36] W.E. Muller, X. Wang, B. Diehl-Seifert, K. Kropf, U. Schlossmacher, I. Lieberwirth, G. Glasser, M. Wiens, H.C. Schroder, Inorganic polymeric phosphate/polyphosphate as an inducer of alkaline phosphatase and a modulator of intracellular Ca<sup>2+</sup> level in osteoblasts (SaOs-2 cells) in vitro, *Acta Biomater.* 7 (2011) 2661–2671, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2011.03.007>.
- [37] L.K. Seidlmayer, M.R. Gomez-Garcia, L.A. Blatter, E. Pavlov, E.N. Dedkova, Inorganic polyphosphate is a potent activator of the mitochondrial permeability transition pore in cardiac myocytes, *J. Gen. Physiol.* 139 (2012) 321–331, <http://dx.doi.org/10.1085/jgp.201210788>.
- [38] M.D. Jimenez-Nunez, D. Moreno-Sanchez, L. Hernandez-Ruiz, A. Benitez-Rondan, A. Ramos-Amaya, B. Rodriguez-Bayona, F. Medina, J.A. Brieve, F.A. Ruiz, Myeloma cells contain high levels of inorganic polyphosphate which is associated with nucleolar transcription, *Haematologica* 97 (2012) 1264–1271, <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2011.051409>.
- [39] C.B. Brachmann, A. Davies, G.J. Cost, E. Caputo, J. Li, P. Hieter, J.D. Boeke, Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288c: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications, *Yeast* 14 (1998) 115–132, [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199810\)14:2<115::AID-YEA204>3.0.CO;2-2](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199810)14:2<115::AID-YEA204>3.0.CO;2-2) [pii].
- [40] C. Janke, M.M. Magiera, N. Rathfelder, C. Taxis, S. Reber, H. Maekawa, A. Moreno-

- Borchart, G. Doenges, E. Schwob, E. Schiebel, M. Knop, A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes, *Yeast* 21 (2004) 947–962, <http://dx.doi.org/10.1002/yea.1142>.
- [41] S.B. Haase, S.I. Reed, Improved flow cytometric analysis of the budding yeast cell cycle, *Cell Cycle* 1 (2002) 132–136.
- [42] J. Clotet, X. Escote, M.A. Adrover, G. Yaakov, E. Gari, M. Aldea, E. de Nadal, F. Posas, Phosphorylation of Hs1 by Hog1 leads to a G2 arrest essential for cell survival at high osmolarity, *EMBO J.* 25 (2006) 2338–2346, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601095>.
- [43] B. St-Pierre, X.T. Kha Liu, L. Zhu, X. Ryan, O. Jiang, Z. Zacksenhaus, Conserved and specific functions of mammalian ssu72, *Nucleic Acids Res.* 33 (2) (2005) 464–477, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gki171>.
- [44] S. Bru, J. Jimenez, D. Canadell, J. Arino, J. Clotet, Improvement of biochemical methods of polyP quantification, *Microbial Cell* 4 (1) (2017) 6–15, <http://dx.doi.org/10.15698/mic2017.01.551>.
- [45] T.P. Werner, N. Amrhein, F.M. Freimoser, Novel method for the quantification of inorganic polyphosphate (iPoP) in *Saccharomyces cerevisiae* shows dependence of iPoP content on the growth phase, *Arch. Microbiol.* 184 (2005) 129–136, <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-005-0031-2>.
- [46] E. Gonzalez-Vioque, J. Torres-Torronteras, A.L. Andreu, R. Marti, Limited dCTP availability accounts for mitochondrial DNA depletion in mitochondrial neuro-gastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE), *PLoS Genet.* 7 (2011) e1002035, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1002035>.
- [47] B.L. Taliec, A. Peyroche, Using DNA damage sensitivity phenotypes to characterize mutations affecting proteasome function, *Methods Mol. Biol.* 832 (2012) 363–371, [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-474-2\\_25](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-474-2_25).
- [48] R.L. Ornstein, R. Rein, Molecular models of induced DNA premutational damage and mutational pathways for the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide and its metabolites, *Chem. Biol. Interact.* 30 (1980) 87–103 0009-2797(80)90117-9.
- [49] S.J. Lee, M.F. Schwartz, J.K. Duong, D.F. Stern, Rad53 phosphorylation site clusters are important for Rad53 regulation and signaling, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 6300–6314.
- [50] L. Wang, C.D. Fraley, J. Faridi, A. Kornberg, R.A. Roth, Inorganic polyphosphate stimulates mammalian TOR, a kinase involved in the proliferation of mammary cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 11249–11254, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1534805100>.
- [51] C.S. Sander, H. Chang, S. Salzmann, C.S. Muller, S. Ekanayake-Mudiyanselage, P. Elsner, J.J. Thiele, Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo, *J. Invest. Dermatol.* 118 (2002) 618–625 1708.
- [52] S. Gon, R. Napolitano, W. Rocha, S. Coulon, R.P. Fuchs, Increase in dNTP pool size during the DNA damage response plays a key role in spontaneous and induced-mutagenesis in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 19311–19316, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1113664108>.
- [53] N.P. Noyma, T.P. Silva, H. Chiarini-Garcia, A.M. Amado, F. Roland, R.C. Melo, Potential effects of UV radiation on photosynthetic structures of the bloom-forming cyanobacterium *Cylindrocapsa raciborskii* CYRP-01, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 1202, <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.01202>.
- [54] J.D. Stumpf, P.L. Foster, Polyphosphate kinase regulates error-prone replication by DNA polymerase IV in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 57 (2005) 751–761 MMI4724.
- [55] P.L. Foster, Stress-induced mutagenesis in bacteria, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* (2007) 373–397 782797248.
- [56] M. Tsutsumi, T. Munekata, Involvement of inorganic polyphosphate in expression of SOS genes, *Biochim. Biophys. Acta* 1493 (2000) 73–81 S0167-4781(00)00165-2.
- [57] Y. Seki, K. Nitta, Y. Kaneko, Observation of polyphosphate bodies and DNA during the cell division cycle of *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Plant. Biol. (Stuttg.)* 16 (2014) 258–263, <http://dx.doi.org/10.1111/plb.12008>.
- [58] C. Gartner, E.A. Waldstein, U. Hagen, Mechanism of the ATP effect in the DNA repair synthesis of gamma-irradiated *Escherichia coli* cells, *Biochim. Biophys. Acta* 607 (1980) 247–255.
- [59] S. Seki, S. Mori, A. Nakashima, T. Oda, Effects of ATP and other nucleotides on DNA repair synthesis in bleomycin-pretreated permeable mouse sarcoma cells, *Carcinogenesis* 8 (1987) 1391–1394.
- [60] R.H. Wright, A. Lioutas, F. Le Dily, D. Soronellas, A. Pohl, J. Bonet, A.S. Nacht, S. Samino, J. Font-Mateu, G.P. Vicent, M. Wierer, M.A. Trabado, C. Schelhorn, C. Carolis, M.J. Macias, O. Yanes, B. Oliva, M. Beato, ADP-ribose-derived nuclear ATP synthesis by NUDIX5 is required for chromatin remodeling, *Science* 352 (2016) 1221–1225, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1249335>.
- [61] J.M. Tkach, A. Yimit, A.Y. Lee, M. Riffle, M. Costanzo, D. Jäschob, J.A. Hendry, J. Ou, J. Moffat, C. Boone, T.N. Davis, C. Nislow, G.W. Brown, Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress, *Nat. Cell Biol.* 14 (2012) 966–976, <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2549>.
- [62] W. Niu, Z. Li, W. Zhan, V. Iyer, E. Marcotte, Mechanisms of cell cycle control revealed by a systematic and quantitative overexpression screen in *S. cerevisiae*, *PLoS Genet.* 4 (7) (2008) e1000120.
- [63] F. Giots, M.C. Donat, J.M. Thevelein, 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 (2003) 1163–1181 3365.
- [64] R.A. Zvyaginskaya, F. Lundh, D. Samyn, J. Pattison-Granberg, J.M. Mouillon, Y. Popova, J.M. Thevelein, B.L. Persson, Characterization of the Pho89 phosphate transporter by functional hyperexpression in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Res.* 8 (2008) 685–696, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00408.x>.
- [65] J.H. van Heerden, F.J. Bruggeman, B. Teusink, Multi-tasking of biosynthetic and energetic functions of glycolysis explained by supply and demand logic, *Bioessays* 37 (1) (2014) 34–45, <http://dx.doi.org/10.1002/bies.201400108>.
- [66] J.H. van Heerden, M.T. Wortel, F.J. Bruggeman, J.J. Heijnen, Y.J. Bollen, R. Planque, J. Hulshof, T.G. O'Toole, S.A. Wahl, B. Teusink, Lost in transition: start-up of glycolysis yields subpopulations of nongrowing cells, *Science* 343 (2014) 1245114, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1245114>.
- [67] P. Reichard, Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis, *Annu. Rev. Biochem.* 57 (1988) 349–374, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.002025>.
- [68] B.A. Kunz, S.E. Kohalmi, T.A. Kunkel, C.K. Mathews, E.M. McIntosh, J.A. Reidy, International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability, *Mutat. Res.* 318 (1994) 1–64.
- [69] R. Kohnken, K.M. Kodigepalli, L. Wu, Regulation of deoxynucleotide metabolism in cancer: novel mechanisms and therapeutic implications, *Mol. Cancer* 14 (2015), <http://dx.doi.org/10.1186/s12943-015-0446-6> 176-015-0446-6.
- [70] A.C. Bester, M. Roniger, Y.S. Oren, M.M. Im, D. Sarni, M. Chaoat, A. Bensimon, G. Zamir, D.S. Shewach, B. Kerem, Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development, *Cell* 145 (2011) 435–446, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.044>.
- [71] T. Helleday, E. Petermann, C. Lundin, B. Hodgson, R.A. Sharma, DNA repair pathways as targets for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer* 8 (2008) 193–204, <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2342>.
- [72] M.R. Kelley, D. Logsdon, M.L. Fishel, Targeting DNA repair pathways for cancer treatment: what's new? *Future Oncol.* 10 (2014) 1215–1237, <http://dx.doi.org/10.2217/fo.14.60>.

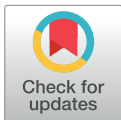


## RESEARCH ARTICLE

Comprehensive and quantitative analysis of G<sub>1</sub> cyclins. A tool for studying the cell cycleElisabet Bállega<sup>1</sup>, Reyes Carballar<sup>1</sup>, Bàrbara Samper, Natalia Ricco, Mariana P. Ribeiro, Samuel Bru, Javier Jiménez<sup>1</sup>\*, Josep Clotet\*

Basic Sciences Department, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain

\* These authors contributed equally to this work.

\* [jjimenez@uic.es](mailto:jjimenez@uic.es) (JJ); [jclotet@uic.cat](mailto:jclotet@uic.cat) (JC)

## OPEN ACCESS

**Citation:** Bállega E, Carballar R, Samper B, Ricco N, Ribeiro MP, Bru S, et al. (2019) Comprehensive and quantitative analysis of G<sub>1</sub> cyclins. A tool for studying the cell cycle. PLoS ONE 14(6): e0218531. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218531>

**Editor:** Michael Polymenis, Texas A&M University College Station, UNITED STATES

**Received:** December 21, 2018

**Accepted:** June 4, 2019

**Published:** June 25, 2019

**Copyright:** © 2019 Bállega et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All data are included in the manuscript.

**Funding:** RC was awarded with a Generalitat de Catalunya grant. JC received a grant from the Spanish Government (MINECO Grant Ref: BFU 2013-44189-P and PGC2018-096597-B-I00). JJ received a grant from the Spanish Government (PGC2018-096597-B-I00). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

## Abstract

In eukaryotes, the cell cycle is driven by the actions of several cyclin dependent kinases (CDKs) and an array of regulatory proteins called cyclins, due to the cyclical expression patterns of the latter. In yeast, the accepted pattern of cyclin waves is based on qualitative studies performed by different laboratories using different strain backgrounds, different growing conditions and media, and different kinds of genetic manipulation. Additionally, only the subset of cyclins regulating Cdc28 was included, while the Pho85 cyclins were excluded. We describe a comprehensive, quantitative and accurate blueprint of G<sub>1</sub> cyclins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* that, in addition to validating previous conclusions, yields new findings and establishes an accurate G<sub>1</sub> cyclin blueprint. For the purposes of this research, we produced a collection of strains with all G<sub>1</sub> cyclins identically tagged using the same and most respectful procedure possible. We report the contribution of each G<sub>1</sub> cyclin for a broad array of growing and stress conditions, describe an unknown role for Pcl2 in heat-stress conditions and demonstrate the importance of maintaining the 3'UTR sequence of cyclins untouched during the tagging process.

## Introduction

The cell cycle—the basis for perpetuating life—can be described as a set of events unfolding in a cell that result in the generation of two new cells that are virtually identical to the original. Cell cycle processes are tightly controlled to produce viable cells as nearly identical as possible to the original. Cell cycle control is mastered by a family of proteins called cyclin dependent kinases (CDKs), responsible for the phosphorylation of many different substrates directly involved in processes that successfully multiply cells [1–5]. Despite their structural similarity, not all CDKs are involved in cell cycle progression [6].

The main focus of this work is not CDKs as such but cyclins, a family of proteins capable of making specific complexes with the CDKs and in charge of controlling their activity [7–11]. Cyclins are so called because of their oscillatory presence in the cell cycle, due to specific sequences and regulators in both their promoters and the three prime untranslated regions

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

(3'UTR) (for reviews see [12, 13]) and to post-translational regulation [14]. The diversity and oscillation of cyclins are thought to be crucial for substrate selection by the CDKs and, consequently, in triggering the orderly succession of events that is essential for faithful cell cycle progression and cell multiplication [15]. Nevertheless, increasingly available experimental data indicate a more complex scenario in the orderly regulation of cell cycle events than mere succession in cyclin expression. A quantitative model has been proposed based on increasing CDK activity along the cell cycle and using different thresholds in the affinity of the different cell cycle phase substrates to be phosphorylated [16–18]. Intermediate kinase/phosphatase ratio models have also been described based on balancing CDK phosphorylation activity and counteracting phosphatase activity [19].

Cyclins are grouped into families according to different criteria. Based on temporal expression and action, we can distinguish between G<sub>1</sub> cyclins [20, 21], S-phase cyclins [22, 23], G<sub>2</sub> cyclins and M-phase cyclins [24]. Specific cyclin families modulate the activity of Cdc28, the main CDK in *S. cerevisiae* [21, 25], and other cyclin families are specifically related to the other CDK involved in cell cycle progression in the G<sub>1</sub> phase in budding yeast, namely Pho85 [15, 26]. Cdc28 is modulated by two families of cyclins that are also structurally different, namely, Cln1-Cln3 and Clb1-Clb6, while Pho85 is regulated by Pcl1-Pcl10 and Pho80. Cdc28 cyclins bear two conserved sequences called the 'cyclin box', responsible for cyclin-CDK physical interaction; in contrast, Pho85 cyclins have only one conserved sequence [26, 27]. Temporal expression and correlation between expression and cell cycle phases for Cdc28 and Pho85 has been documented to be as follows: in G<sub>1</sub>, Cdc28 is modulated by Cln1, Cln2 and Cln3, whereas Pho85 is activated by Pcl1 and Pcl2; in the S-phase, Cdc28 is modulated by Clb5 and Clb6 and Pho85 is (probably) activated by Pcl7; in G<sub>2</sub>, Cdc28 is modulated by Clb3 and Clb4; and finally, in the M-phase, Cdc28 is controlled by Clb2 and Clb1 while Pho85 is (apparently) controlled by Pcl9 [19, 28, 29].

The complex scenario of several CDKs and cyclins governing the cell cycle is even more intricate in the case of mammalian cells [30–32]. A long-standing question is why so many CDK/cyclin complexes are needed at a particular moment of the cell cycle; in other words, are they redundant or are they specific? [28, 29].

Regarding cyclin expression, limited quantitative information is available, although it has been established that Cln3 expression is low compared to that of other Clns; in one study, a set of tagged Clns with the 3'UTR intact was produced in an attempt to understand the difference in Cln3 regulation compared to Cln1 and Cln2 regulation [33]. Subsequently described was an analysis of all Cdc28 cyclins in a set of strains where the 3'UTR was deleted [34]. Overall, the general picture of cyclin demeanour comes from a patchwork of data obtained in different laboratories that have used different strain backgrounds, different growing conditions, different detection systems and different kinds of genetic manipulation. As for the Pho85 cyclins, only qualitative data are available regarding the cell cycle phase where these are expressed [26, 28]. To date, therefore, no research has comprehensively quantified and studied all the G<sub>1</sub> cyclins (both Clns and Pcls) together.

In an attempt to inject some coherence into the data on the *S. cerevisiae* G<sub>1</sub> cyclins, we designed and produced a set of strains and identically tagged the different cyclins in order to comparatively analyse their levels of expression. We selected a clean tagging system, respectful of the 3'UTR sequence and designed to avoid some of the artefacts detected in an earlier phase of our research (these artefacts, which are not considered in the current G<sub>1</sub> cyclin expression model, are discussed further below). We used our set of strains to shed some light on the question of the specificity or redundancy of cyclins and CDKs in different environmental conditions and identified a previously unreported role for Pcl2 in cell cycle progression at high temperatures. Below we describe a tool, in the form of a set of identically tagged strains, for

studying the G<sub>1</sub> phase and how cell cycle progression may be affected by environmental stress conditions or external treatments such as chemotherapeutic drugs.

## Results

### G<sub>1</sub> cyclin tagging

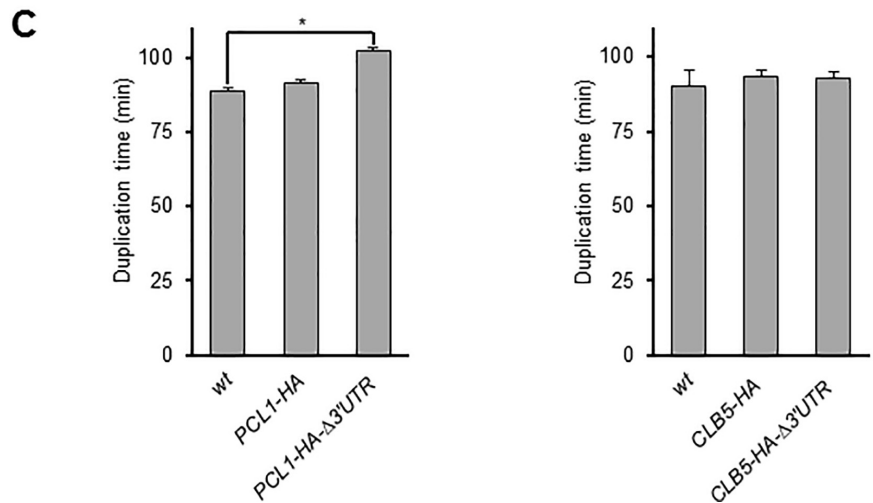
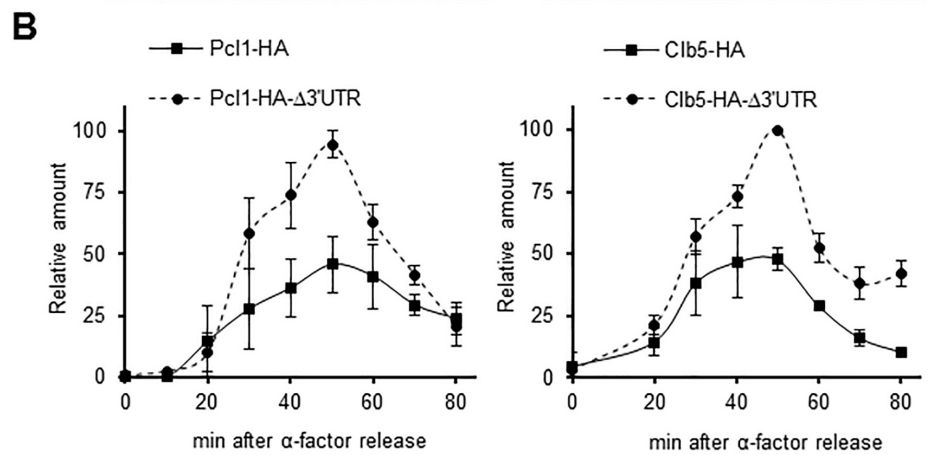
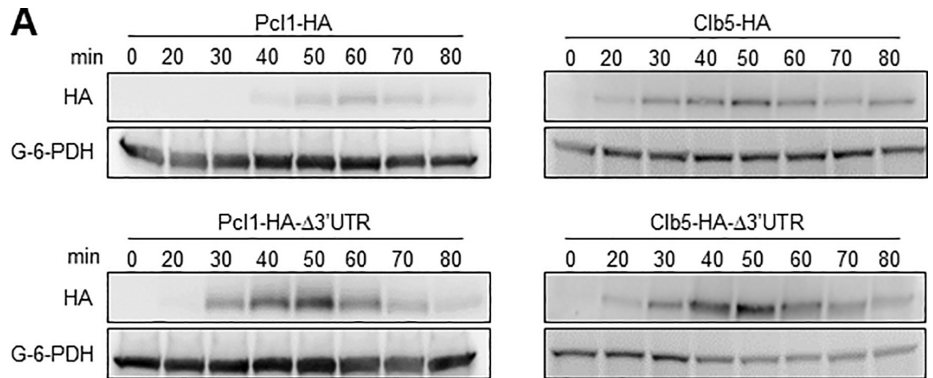
In our endeavour to provide the cell cycle community with a unified and comprehensive study of the pattern of expression of all G<sub>1</sub> cyclins in *S. cerevisiae*, we investigated the G<sub>1</sub> cyclins in exactly the same growing conditions, using exactly the same tagging strategy and using a single and widely used *S. cerevisiae* genetic background, namely, BY4741.

Cyclin amounts have frequently been evaluated by tagging the cyclins at their C-terminus and inserting a marker for the selection of transformants; this separates the 3'UTR from the gene and eliminates its putative regulatory function. However, growing evidence points to the importance of the 3'UTR for gene expression and protein amount regulation in both mammalian cells [35, 36] and yeast [37] (for a recent review see [38]). Therefore, before we tagged all the cyclins, we evaluated the influence of the 3'UTR sequence on two different G<sub>1</sub> cyclins. We did so by monitoring the amount and timing of Pcl1 expression in a *PCL1-3HA* tagged strain where the 3'UTR sequence was replaced by a selection marker (*KanMX*) as an inherent feature of the tagging strategy (as done in the classical strategy). We then compared this to a *PCL1-3HA* strain in which the 3'UTR was not altered using a strategy called *delitto perfetto* [39]. *Delitto perfetto* permits a DNA sequence to be tampered with while leaving no trace other than the desired modification (see [Materials and Methods](#)). [Fig 1A](#) and [Fig 1B](#) show that the amount of Pcl1-3HA was notably higher in the classically tagged strain. Similar results were obtained when the same approach was applied to *CLB5*, indicating that integrity of the 3'UTR might be key to cell regulation of the amount of cyclins and may, consequently, be a requirement for correct evaluation of the G<sub>1</sub> cyclin blueprint.

To reduce interference with the amount of the protein as much as possible, we performed an analysis aimed at determining the most appropriate tag to use. TAP (a large tag) and 3HA (a small tag) detected the cyclins reasonably well. Although our results indicated that tag size does have a minor impact on the amount of Clb5, applying Occam's razor principle for simplicity sake, we nevertheless decided to use the smaller 3HA tag. In the course of our research, it has been reported [40] that the 3HA module developed by Longtine et al. [41] uses a linker between the protein to be tagged and the 3HA epitope that greatly affects the stability of the tagged protein. In our research we used the tool-box system [42], which uses a different linker that does not affect protein stability [40].

Altering the level of cyclins is usually detrimental to normal cell cycle progression [43]. To check whether a variation in the amount of cyclins as determined by the presence or absence of the 3'UTR had any physiological impact, we studied the duplication time of cells bearing cyclins with or without the 3'UTR. As can be appreciated in [Fig 1C](#), eliminating the *PCL1* 3'UTR produced a statistically significant increase in duplication time (from 89 to 102 min), which confirms that the extra amount of Pcl1 alters cell physiology. Interestingly, an increase in the amount of Clb5 in the strain *CLB5-3HA-Δ3'UTR* did not produce any significant difference in duplication time (in standard growing conditions at least); this is consistent with the existence of differential compensatory mechanisms depending on which cyclins are affected.

In view of the above results, we tagged each G<sub>1</sub> cyclin in a separate strain (since tagging several cyclins in the same strain could have resulted in the additive effect of small perturbations) in the most respectful way possible, i.e., maintaining their 3'UTR intact and using the 3HA tag from the tool-box module. We also tagged Clb5 and Sic1 using the same strategy and used them as landmark cairns to assess the biochemical border for G<sub>1</sub>-S transition.



**Fig 1. The 3'UTR sequence of cyclin genes is important for protein levels.** A) Protein amounts for Clb5 (right) and Pcl1 (left), Cdc28 and Pho85 cyclins, respectively. The genes of both cyclins were modified to introduce the 3HA tag sequence, either eliminating or retaining the 3'UTR sequence. Cells were grown to the exponential phase in YPD (see [Materials and Methods](#)), synchronized in G<sub>1</sub> with  $\alpha$ -factor and released in fresh YPD medium. At specific times, samples were taken and protein amounts were determined by western blot analysis using Image Studio Lite software. Representative western blot images are depicted. Although the blots for cyclins with and without 3'UTR are presented as separate images, they were realized, analysed and developed in the same membrane. B) Quantification of the amount of Pcl1-3HA and Clb5-3HA with and without 3'UTR. As in A), the signal from the western blots was quantified using Image Studio Lite software. Values were standardized using loading control and were relativized to the maximum expression amounts. Mean $\pm$ SEM values for three and four independent experiments for Clb5 and Pcl1, respectively, are shown. C) Duplication time of strains bearing *PCL1-3HA* or *CLB5-3HA* with or without the 3'UTR sequence. Cells were grown overnight in YPD at 30°C, diluted to OD = 0.4 in fresh medium and incubated in a water shaker at 30°C. Samples were taken every 10 min over 420 min. Optical density (wavelength 660 nm) was used as a measure of cell density. Mean $\pm$ SEM values for three independent experiments are shown. An asterisk indicates a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218531.g001>

## Monitoring seven G<sub>1</sub> cyclins

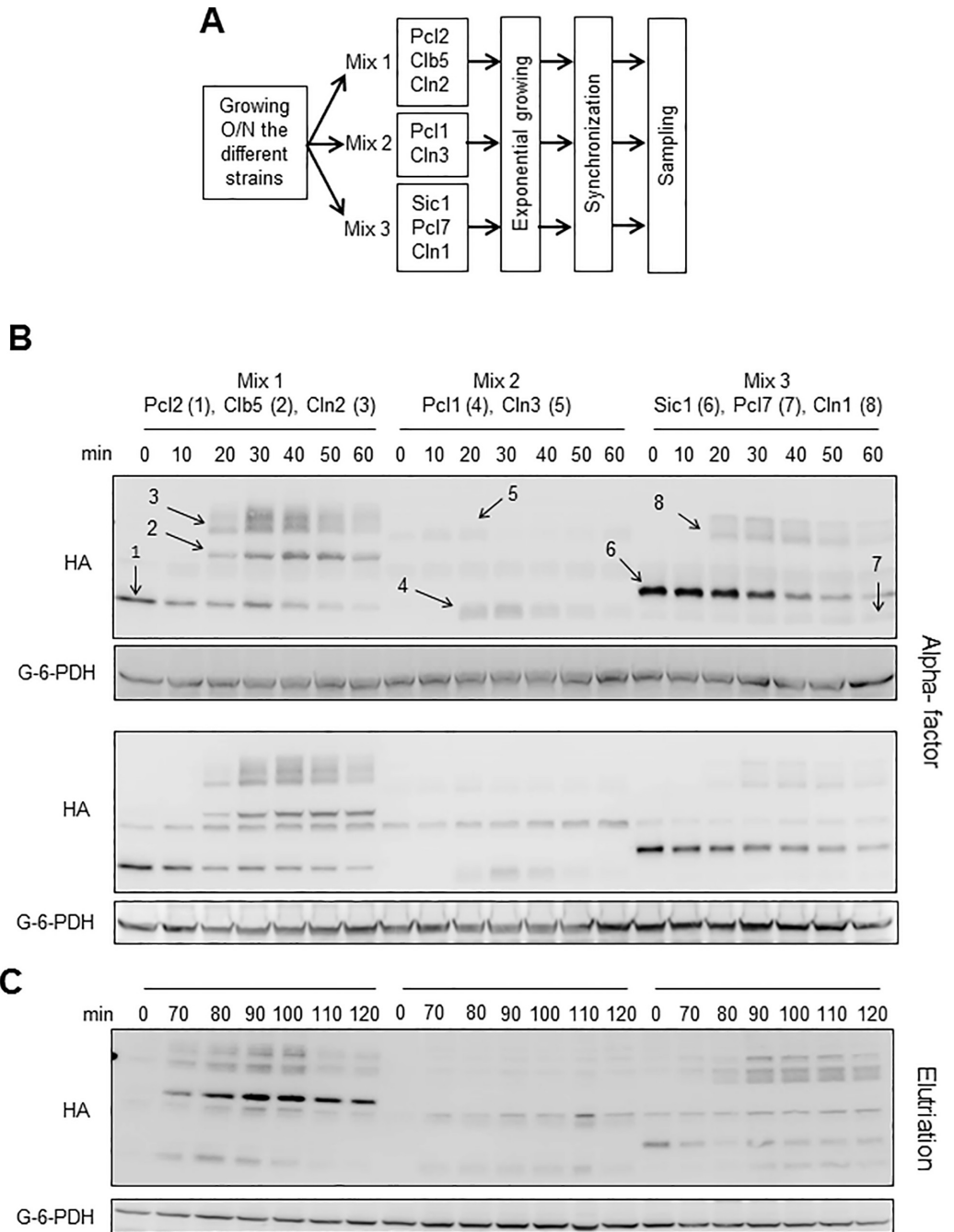
To reliably and efficiently monitor the seven selected proteins, we pooled the tagged strains in groups (see below). To do this, we first checked whether all the strains grew at the same rate, by growing them simultaneously in a microtiter plate at 30°C under agitation in a spectrophotometer, which permitted us to continuously monitor optical density. No statistically significant differences were detected in their duplication times ([S1A Fig](#)). Furthermore, to better validate the pooling strategy, under a microscope, we counted the cells of all the separately growing strains at different moments of the experiment and also counted the proportion of budding at 35 min after  $\alpha$ -factor release. In all cases all the separately growing strains behaved very similarly ([S1B and S1C Fig](#)). Finally, using western blot we monitored all cyclins from the separately growing strains, finding that the pattern of expression was very similar to the pattern observed when the strains were pooled (see below and see [S1D Fig](#)).

Overnight cultures of cells with the different tagged cyclins were pooled in strictly controlled quantities in three mixes, designed according to the size of the cyclins to ensure correct detection of all cyclins in the same blot (see [Fig 2A](#)). The mixes were grown exponentially for 3 h, synchronized in G<sub>1</sub> by incubation with  $\alpha$ -factor and released synchronously into the cell cycle. To minimize experimental noise, expression of all G<sub>1</sub> cyclins was monitored in a single western blot (see representative images in [Fig 2B](#)). The specificity of signals was checked using a non-tagged strain. Note that, for the two western blot images from independent experiments included in [Fig 2A](#), we obtained reproducible data on the relative amounts and the appearance-disappearance dynamics of the different G<sub>1</sub> cyclins. This information can be considered accurate and reliable, as the cells were grown at the same time, in the same incubator, using the same polyacrylamide gel for the electrophoresis, using the same transfer conditions and the same transfer device and using the same antibody solution, developed and exposed in an identical way. Since  $\alpha$ -factor synchronization produces intrinsic artefacts, we repeated the analysis using elutriation as a very different synchronization method, with the results depicted in [Fig 2C](#).

In our analysis, we also included the cyclins specific for the Pho85 CDK (Pcl1, Pcl2 and Pcl7). This meant that we could obtain evidence on the relative importance of the Cln and Pcl sets of cyclins, so as to hypothesize regarding the contribution of their respective CDKs (Cdc28 and Pho85) to G<sub>1</sub> progression in both normal growing conditions and, more importantly, in environmentally different growing conditions (explained further below).

## A cyclin map for G<sub>1</sub>/S-phase transition in *S. cerevisiae*

We quantified at least three independent experiments (in the case of  $\alpha$ -factor synchronization)–like those depicted in [Fig 2B](#)–to produce cyclin blueprints that included both amplitude



**Fig 2. Experimental setup for determining G<sub>1</sub> cyclin amounts.** A) Workflow and pooling scheme. Strains were grown overnight in YPD at 30°C in a water shaker, diluted in fresh medium, mixed in three different sets according to the molecular weight of the tagged proteins, grown in the exponential phase, synchronized, released in fresh medium and subjected to the designed stress or treatment (see [Materials and Methods](#)). B) Two representative and independent western blot images (to show reproducibility) used to quantify G<sub>1</sub> cyclin amounts. Cells were synchronized using  $\alpha$ -factor and samples were obtained as described in A), separated by SDS-PAGE and blotted and developed (see [Materials and Methods](#)). The different cyclins are indicated by numbers in the upper image. C) Same procedure as in B), except that cells were synchronized by elutriation, with time 0 corresponding to the moment the cells were retrieved from the elutriation device, after which the cells were incubated under agitation at 30°C.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218531.g002>

(temporal expression) and height (protein expression) of the G<sub>1</sub> cyclin waves. To simplify visualization, the Cdc28 and Pho85 cyclins (Clns and Pcls, respectively) are shown in different graphs. We also used Clb5 and Sic1 levels together with the budding index (virtually identical for all the strains; see [S1C Fig](#)) to establish the precise moment of START, defined as the moment in which Clb5 and Sic1 amounts are identical (see [Materials and Methods](#) and [Fig 3](#)). All together, these produced an accurate picture of the G<sub>1</sub> cyclin universe in a yeast cell ([Fig 3](#)).

We found some differences between the two synchronization methods, specifically, the presence of Pcl2 with  $\alpha$ -factor synchronization, as previously reported [26], a slightly delay in the expression of Cln1 compared to Cln2 and an increased level of Clb5 in elutriation. We also found some similarities: the low level of Cln3 (although higher for elutriation than for  $\alpha$ -factor) and the bulk of Cln1 and 2 expression taking place after START. At this point, we decided to perform the rest of our experiments using  $\alpha$ -factor synchronization method rather than centrifugal elutriation, which, although it has been used to study cyclin expression on several occasions [44, 45], is a more complex method for the purposes of the research described in this article.

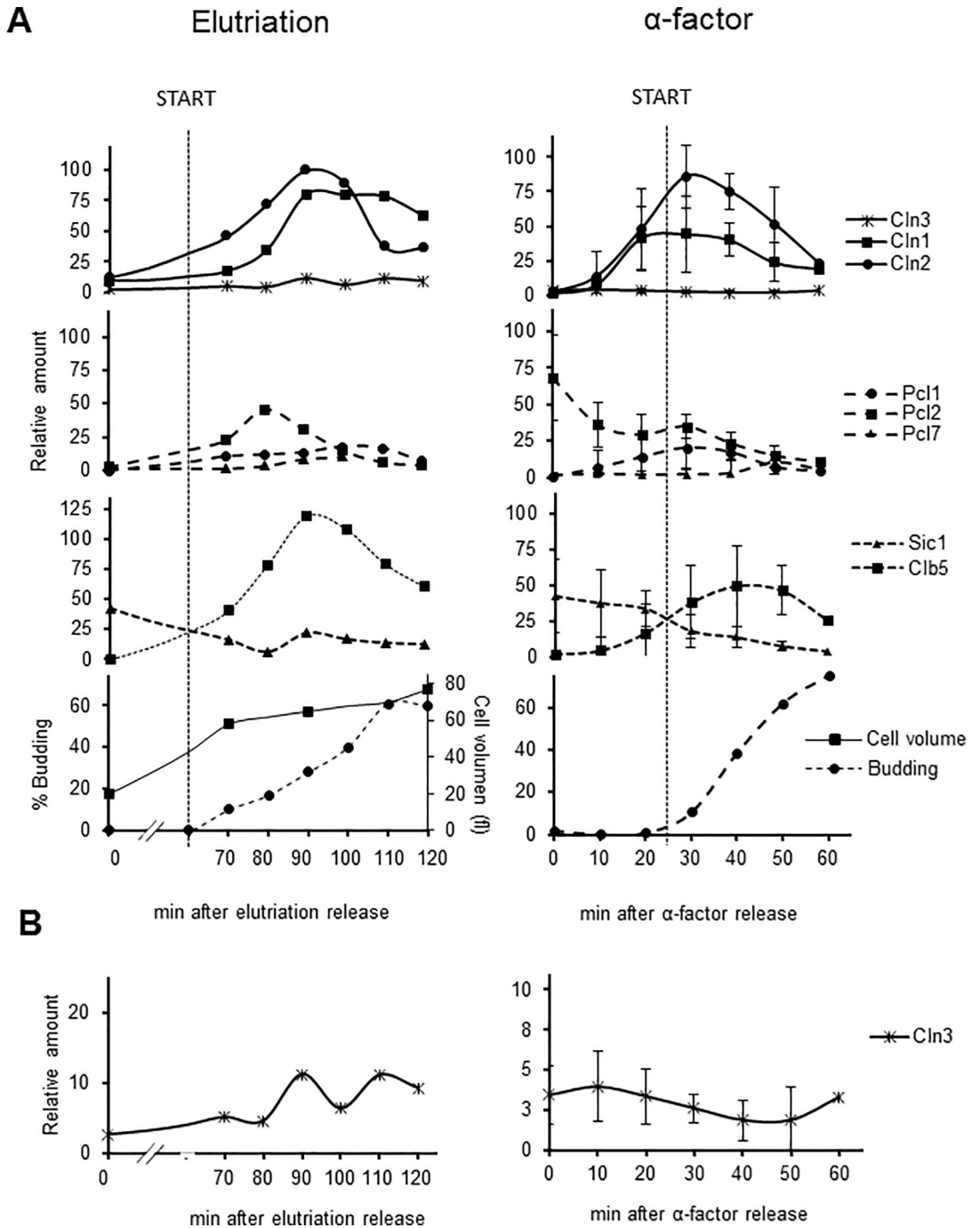
Looking at the cyclin pattern resulting from  $\alpha$ -factor synchronization, we can first confirm very low-level and slightly cyclic Cln3 behaviour [33]. Second, Cln1 and Cln2, which are typically plotted as a single curve (for simplification sake), are present in different amounts, as already reported for expression from plasmids [46] and for interference with 3'UTR sequences [47]. Third, our temporal map of Cln expression in relation to START is noticeably different to the current widely used model, with the maximum level reached in the S-phase ([Fig 3A](#)). Finally, for the first time, Pcl cyclins are included in the G<sub>1</sub> cyclin picture ([Fig 3A](#)).

### Cyclin and cyclin family amounts in different conditions and stresses

The amounts of specific cyclins depend on the environmental stress conditions to which cells are exposed. Some examples are Cln2 in response to osmotic shock [48], Cln1 in response to glucose [49] and Cln1, Cln2, Cln3 and Clb5 in response to heat shock [50]. However, those studies feature some of the drawbacks mentioned above, mainly, modification of the 3'UTR and failure to include all the cyclins. To obtain a more accurate description of cyclin behaviour in stress conditions, we used the strains and setup described above, synchronized the cells using  $\alpha$ -factor and released them under four different stress conditions: heat shock (37°C), osmotic stress (0.4M NaCl), reductive stress (100 mM N-acetyl cysteine) and oxidative stress (10  $\mu$ M menadione). We also tested cyclin levels when cells were growing in different mediums: SD at 30°C and malt-based medium (as a more physiological growth medium for yeast) at 30°C and at 37°C. The corresponding analyses pointed to variations in the expression pattern of the G<sub>1</sub> cyclins with respect to standard lab growing conditions (i.e., YPD at 30°C). Western blots of all the conditions and stresses analysed, along with quantifications and graphical representations of all the G<sub>1</sub> cyclins in the different conditions, are depicted in [S2–S5 Figs](#).

To produce a more comprehensive view of changes, we depicted the contribution of each G<sub>1</sub> cyclin in single graphs that showed cyclin amounts from  $\alpha$ -factor release to START (see [Fig 4A](#) for an example). In our experimental setup, Clns and Pcls were expressed at similar levels







**Fig 3. Cyclin waves in *S. cerevisiae* growing in normal lab conditions (YPD at 30°C).** G<sub>1</sub> cyclin waves as determined in this research. From top to bottom, the panels show the Cdc28 G<sub>1</sub> cyclins, the Pho85 G<sub>1</sub> cyclins and the different molecular markers (Clb5 and Sic1) and morphological markers (budding percentage and size for elutriation). START, determined as the moment in which Sic1 and Clb5 amounts were identical, is extrapolated as a dashed line to all the panels. A) Cells were synchronized by centrifugal elutriation (left panels) or  $\alpha$ -factor (right panels). Time 0 corresponds to the moment of cell removal from the elutriation device or  $\alpha$ -factor removal, after which cells were incubated under agitation at 30°C. Note that the time elapsed before the cells resumed the cell cycle was greater after elutriation than after  $\alpha$ -factor treatment. B) Since the amount of Cln3-3HA is very low, it is plotted both with the other Clns and individually so as to clearly represent levels. In the case of  $\alpha$ -factor synchronization, at least three independent western blot experiments as in Fig 2B were quantified, standardized using loading control and related to the maximum expression amounts (Cln2). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218531.g003>

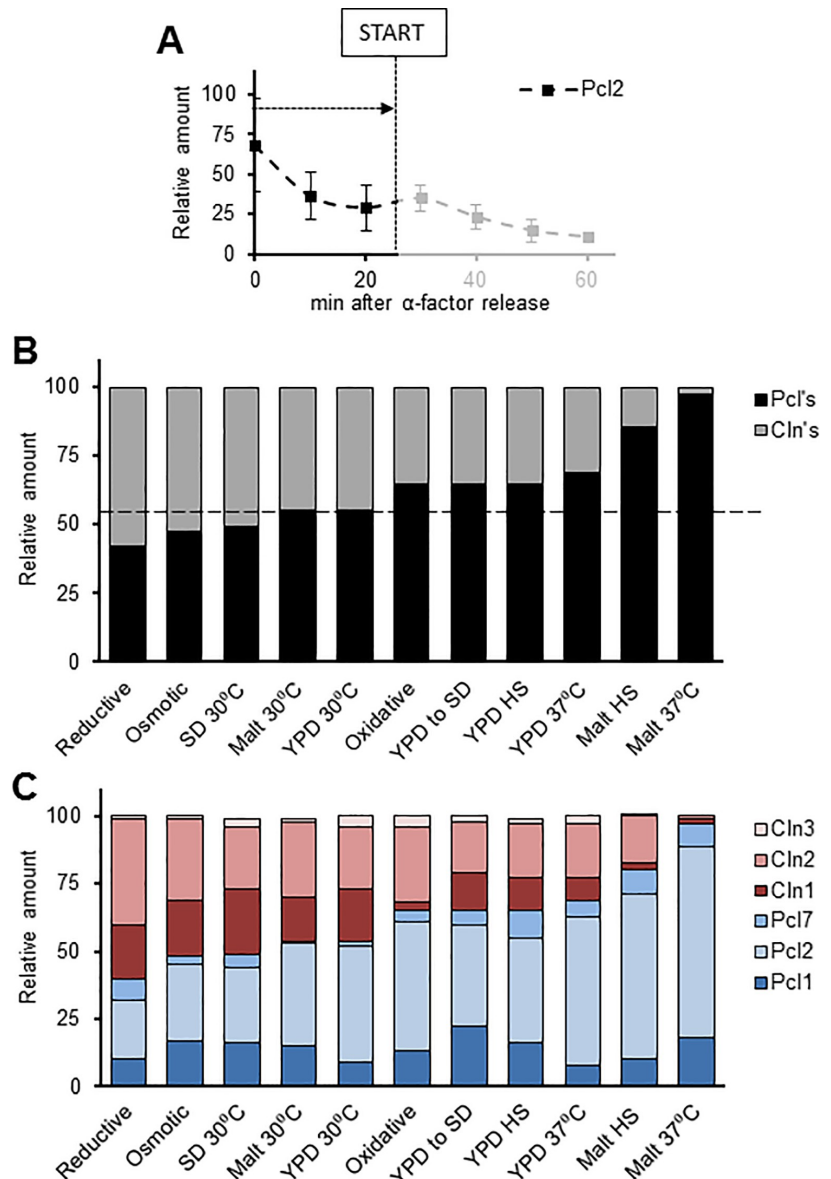
in most of the tested conditions (Fig 4B), reinforcing the idea that both groups of cyclins are necessary for correct cell cycle passage through the G<sub>1</sub> phase. This scenario was generally maintained, except for heat shock and the malt-based medium: for the cells growing at a high temperature (37°C) in the malt-based medium, Pho85 cyclin amounts rose to 80% and even 90% (Fig 4B).

### Variations in cyclin family components

Another level of complexity is represented in Fig 4C, which shows the contribution of each cyclin to the overall picture (also see Fig 4A). Noticeable is the prominent presence of Pcl2, most significantly for the malt-based medium at a high temperature. On the basis of these results we speculated that *pcl2* $\Delta$  cells might face difficulties in surpassing START when released from  $\alpha$ -factor arrest at 37°C. The FACS analysis of cell cycle progression revealed this to be the case: *pcl2* $\Delta$  cells showed some cell cycle progression difficulties in heat-shock conditions (Fig 5A), but no difficulties in other conditions such as, for instance, osmotic stress. To evaluate the relevance of the role played by Pcl2 in high temperature conditions, we repeated the analysis using elutriation as the synchronization method (S6 Fig). Since we did not detect any notable increase in the level of Pcl2 in these conditions, we conclude that the role of Pcl2 in thermal stress is restricted to  $\alpha$ -factor conditions.

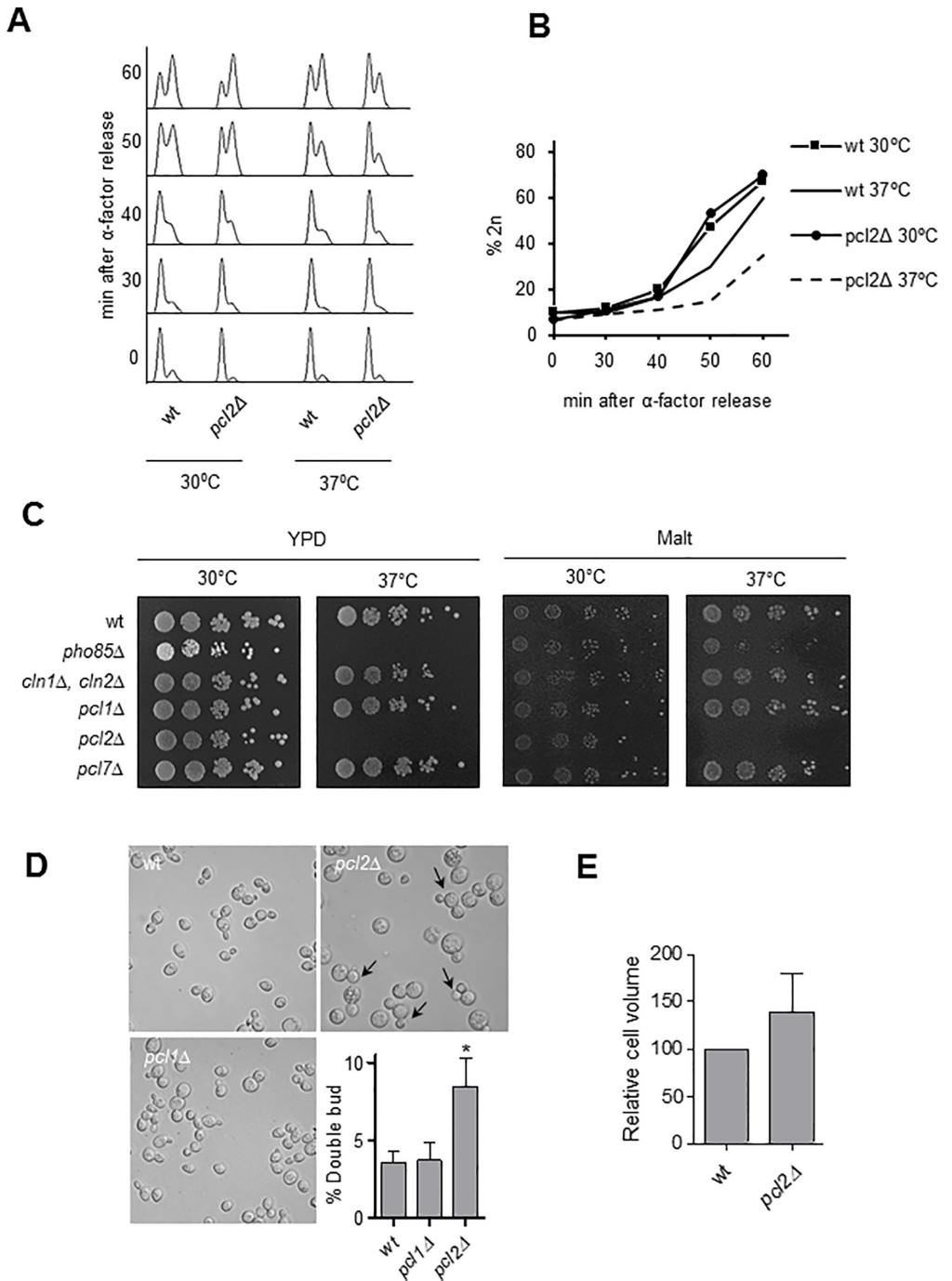
Interestingly, the magnitude of the *pcl2* $\Delta$  cell cycle phenotype depended on the genetic background. Despite cell cycle impairment, in a spotting assay using the BY4741 background we were unable to find a growth phenotype that is clearly present in the W303 background (Fig 5C). Our results corroborate *pho85* $\Delta$  thermosensitivity, as other studies have also documented *pho85* $\Delta$  difficulties in growing at 37°C [51, 52]. Additionally, the inclusion of the different Pcl mutant strains in the dot assay growing analysis suggests that the thermosensitivity of *pho85* $\Delta$  might be determined by the regulation exerted by Pcl2, since Pcl2 deletion is the only deletion leading to thermosensitivity (Fig 5C), at least in the W303 background. Focusing on the *pcl2* $\Delta$  thermosensitive phenotype, we detected an interesting trait in the appearance of a significant proportion of *pcl2* $\Delta$  cells showing a ‘mickey mouse’ phenotype consisting of double-budded cells (Fig 5D) appearing after incubation for 5 h at 37°C. This phenotype was not present when Pcl1, another cyclin from the Pcl family, was deleted. Note that, despite the apparent increase in size of the *pcl2* $\Delta$  cells, we found no statistically significant differences when volumes were calculated using the Scepter cell counter (Millipore) or when cell diameter was directly measured under the microscope (Fig 5E).

We present the correlation between the change in Pcl2 amounts and particular physiological consequences as a proof of principle for the potential usefulness of our set of tagged strains, whether to unveil the physiological relevance of cyclins in specific environmental settings or to analyse cell cycle progression in different types of treatments (including chemotherapeutic drugs). However, Pcl2 is not the only cyclin that changes; important differences can also be appreciated in many other cyclins—e.g., Cln2 and Cln1, which clearly increase in response to reductive stress or in the SD medium (Fig 4B). These notable changes in expression will be analysed in detail in future research.



**Fig 4. Cyclin amounts in different conditions and stresses.** Strains were grown and processed as described in Fig 2B. Western blots were quantified, values were standardized using loading control, relativized to the maximum expression amounts and plotted as in Figs 1B and 3B. A) Cyclin amounts in particular environmental or stress conditions were obtained by calculating the area under the curve from  $\alpha$ -factor release to START. B) Pcl and Cln amounts were calculated as for A). Conditions are ordered according to increasing amounts of Pcl. C) Same procedure as in A) but with the different members of the two cyclin families separated. Conditions are ordered according to increasing amounts of Pcl. Values are expressed as means of at least three independent experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218531.g004>



**Fig 5. Cell cycle progression and thermosensitivity of *pcl2Δ* cells.** A) FACS analysis of wild-type and *pcl2Δ* cells from the BY4741 background. Cells were grown exponentially at 30°C in YPD, synchronized in G<sub>1</sub> with  $\alpha$ -factor and released in fresh YPD medium at 30°C or 37°C. B) Quantification of cells with 2n DNA content from A). C) Spot assay. W303 background cells were grown in YPD or a malt-based medium to the exponential phase and diluted to an optical density of 0.05 (wavelength 660 nm). Spotted on plates were 5  $\mu$ l of tenfold sequential dilution for incubation at the indicated temperature. D) Nomarski images of the strains after 5 h at 37°C. Arrows indicate cells showing a 'mickey mouse' phenotype and the bar represents 10  $\mu$ m. The 'mickey mouse' cells were quantified (mean $\pm$ SEM) for three different experiments. E) Relative cell volume (mean $\pm$ SEM), based on measurement of some 30 cells from each of the three independent experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218531.g005>

## Discussion

Several studies have been carried out to produce a view of gene expression and the proteome of yeast cells, for instance, a gene expression assay depending on the cell cycle [53]. However, despite the great value of that study, since it was designed to provide data on variations in the amount of mRNA in all genes (including G<sub>1</sub> cyclins) relative to initial expression, it tells us very little about the level of expression of a particular protein relative to other proteins. For this reason, while it is useful for assessing the temporal framework of cyclin expression, it yields little information regarding relative amounts of the G<sub>1</sub> cyclins.

In addition to transcriptomic analysis, efforts have been invested in analysing the proteome of yeast cells under many different conditions [54–56] and also in proteome variations throughout the cell cycle [57]. Unfortunately, however, the dynamic range of proteome approaches greatly limits the detection of low abundance proteins [58] like cyclins. Another systematic study of Cdc28 cyclins used a collection of strains in which 3'UTR was deleted [34]. However, we have not been able to find data in the literature regarding the relative amounts of the different G<sub>1</sub> cyclins in *S. cerevisiae* throughout the cell cycle. A direct consequence is that, to date, no quantitative picture of the G<sub>1</sub> cyclin waves including Pcls has been available.

### 3'UTR sequence in cyclins

Apart from the issues mentioned above, the current Cln wave model is seriously affected by technical artefacts; not only was it produced in different labs using different tags, it is also affected by the tags used and the genetic modifications inherent to the tagging procedure. The effect of using different tags (even though they had little influence in our case) has been recently pointed out for high-throughput analyses [54–56]. In the course of our research, an artefact was reported to affect the tagging of proteins [40], specifically, that a dramatic reduction occurred in the stability of tagged proteins due to the presence of a particular linker sequence in the 3HA module used for the Longtine system [41], for which it was reported that the use of a different linker sequence (as in our case) had less impact on the amount of proteins. It should be noted that a seminal study on the level of Clns [33] published by the Futcher laboratory did not use the Longtine tagging system but a genomic tagging approach [59] that also keeps 3'UTR sequences intact.

Importantly, our results demonstrate a role for 3'UTR sequences in cyclin genes in the amount of the proteins coded by them. The regulatory role of this gene sequence in stabilizing the mRNA and, consequently, in regulating protein levels [60, 61]—and also in relation to the proteins involved in the cell cycle [43]—is well known. We have shown that disrupting the 3'UTR of cyclins appears to have no effect either on expression timing or cyclin destruction, which may suggest that 3'UTR disruption affects mRNA stability more than promoter regulation or destruction mechanisms. However, although an interesting topic, it was not our aim to understand the molecular mechanisms behind cyclin level regulation by the 3'UTR. What is relevant to our research is the fact that the 3'UTR role points to an important issue in cyclin analysis. As one example, if the level of Clb5 is altered by affecting the 3'UTR, and this level, relative to the CDK inhibitor Sic1, is essential to defining S-phase entry, then relocating this

landmark would appear to be necessary. Changes like this are likely to have a major impact on modelling studies.

The fact that it has been reported for a G<sub>2</sub> cyclin that protein increases when the 3'UTR sequence is eliminated [54] would suggest a more general scenario rather than one confined to yeast. The deletion of the 3'UTR in cyclins D, B and CCND1 in mammalian cells leads to significant upregulation of the proteins [62–64]. The translational repression of the 3'UTR in cyclin B, among many other genes, has also been demonstrated for *Xenopus* oocytes [65], although the opposite has also been reported, namely, a role for the 3'UTR in the stabilization of cyclin E [66].

## A quantitative blueprint of G<sub>1</sub> cyclins

To perform a cell cycle analysis like that performed for this research, the cells must first be synchronized. Several methods for doing this exist, each with their intrinsic strengths and weaknesses [67, 68]. Choosing a method therefore results in a limitation inherent to the experimental design. We chose  $\alpha$ -factor synchronization—while accepting the limitation of synchronizing cells in the late G<sub>1</sub> phase—for several reasons: first,  $\alpha$ -factor arrest is a physiological situation for yeast, especially when they are growing in nature, but is not the case for most of the remaining systems (drugs, temperature sensitive mutants, elutriation, etc); second, since  $\alpha$ -factor arrest has been commonly used for cell cycle studies, a great deal of evidence is available regarding its use, so a comparison with the existing model should be performed using the same approach; and finally,  $\alpha$ -factor arrest is easy to perform and is highly reproducible. With the aim of generating a more general view that considers synchronization artefacts, we also investigated cyclin waves using elutriation synchronization. Some differences with the  $\alpha$ -factor method included the higher amount of Clb5, the delayed expression of Cln1 and the already documented different behaviour of Pcl2 [26] (very elevated at the moment of  $\alpha$ -factor release but reflecting a more typical cyclin wave pattern in elutriation). We also found some similarities in the two methods: the previously documented low level of Cln3, the shifted expression peak of Cln1 and Cln2 with respect to START and the very low levels of Pcl1 and Pcl7. In sum, our comparison of data from different synchronization methods suggest that cyclin wave studies need to be interpreted with care and should bear in mind the synchronization method.

Another important assumption on which our research is based is that we used the biochemical definition of START: the moment in which relative amounts of Clb5 and Sic1 are the same [69, 70]. Our evidence indicate that this definition is in good agreement with the budding index, a morphological parameter for assessing START [71, 72]. Note that this definition also reflects a subcellular definition of START as the exit from the nucleus of the main START repressor Whi5, which is strictly necessary for the Cln1 and Cln2 positive feedback loop and S-phase entry [73].

Taking into account the above facts (or limitations), our results nevertheless demonstrate, first, that most Cln1 and Cln2 are actually produced significantly beyond START and well into the S-phase. This is not entirely surprising, given their morphogenetic role in the polarized growth taking place over a significant period of time within the S-phase [74–76]. Second, we detected substantially differing expression for Cln1 and Cln2 than proposed elsewhere for systems where the 3'UTR was respected [33] or not [46, 47]. Bearing in mind the similarity of the SBF boxes in the promoters of both genes and, consequently, their fairly similar levels of mRNA, it is tempting to speculate that the molecular nature of their differential regulation may depend on the protein sequences, as already suggested elsewhere [14]. Finally, it is interesting to note that our analysis corroborates the very low levels of Cln3—in comparison with the rest of the cyclins—reported years ago [33, 77].

## Pcls: The overlooked cyclins

The Pho85 CDK is not considered essential in standard lab growing conditions, which may explain why its cyclins have never been represented in cyclin blueprints. Nevertheless, the fact that the presence of several families of CDKs controlling passage through G<sub>1</sub> has been conserved through evolution to mammals [78] would point to the importance of these CDKs. One of our goals was to account for the corresponding knowledge gap by producing a full map of the G<sub>1</sub> cyclins that included Pcls and, in this way, to throw some light on the problem of the redundancy of the different CDK/cyclin complexes [29]. Analysis of the Pcls led to the findings discussed below.

First, in the release from  $\alpha$ -factor arrest, the relative amount of Pcls is surprisingly high, bearing in mind that Pcls are regulators of a 'non-essential' CDK. In practically all tested conditions, Pcls accounted for over 50% of total cyclins (taking into account the definition of START used by us). This could be interpreted in terms of an understated role for Pho85-Pcls in the biology of yeast cells. The role of master cell cycle regulator has deservedly been attributed to Cdc28 (Cdk1 in mammals), with a secondary, redundant or supporting role attributed to Pho85 as the other CDK involved in cell cycle progression. Nevertheless, according to a basic cell economy principle, the high level of expression of the Pho85 cyclins would point to a more active role for Pho85, at least when cells are released from  $\alpha$ -factor arrest (a situation which, as mentioned before, is absolutely physiological for yeast in a natural environment). Second, contributions in terms of amounts of Clns and Pcls are clearly dependent on environmental conditions, and interestingly, Pcls seem to be very important in general terms, since they are always noticeably present; even more importantly, Pcls clearly take the lead in high temperature or heat-shock conditions.

Does this mean, therefore, that the two CDKs are more specific than redundant? That the absence of one cannot be fully compensated for by the presence of the other? And, regarding a different layer of regulation, do subtleties in cell cycle control result from the interaction of each CDK with different cyclins?

In addition to providing an accurate blueprint of the G<sub>1</sub> cyclins, therefore, we also pondered the fundamental question of why eukaryotic cells have or need more than one CDK to control cell cycle progression and also more than one cyclin to control each CDK. We propose two possible explanations. One is that cell cycle machinery may incorporate a certain degree of redundancy in order to gain robustness. The other is that the different apparently redundant elements may have specific functions—related to the broad array of eventualities that all cells must cope with during their life—that are only apparent when cells are growing in particular conditions (whether in terms of stress or specific nutrients). The results reported here support the second possibility.

## Pcl2 and thermal control

Our analysis suggests specific roles for certain cyclins depending on the environmental conditions to which cells are exposed. The most striking finding was the increase in Pcl2 during both heat shock and permanent growing at a high temperature, especially when the cells grew in a more 'natural' condition (in a malt-based medium). As predicted by the increased amount of Pcl2, *pcl2* $\Delta$  cells had problems progressing through START and the S-phase in the malt-based medium and at 37°C (that is, the conditions in which this cyclin is highly expressed). While this effect was only slightly evident in the BY4741 background, when the same analysis was done in the W303 background, the phenotype of absent Pcl2 was striking, not only in cell cycle progression but also in thermosensitivity terms, as revealed by the dot assay. In view of this observation, we performed the dot assay for other, less widely used genetic backgrounds,

such as YPH499 [79] and 1700, derived from 1783 [80] and, again, we detected partial thermosensitivity.

While we have no clear explanation for the enhanced thermosensitivity, we venture that it may depend on differences in the relative level of expression of the cyclins in the different backgrounds. Leaving aside background differences, microscopic inspection of the *pcl2Δ* cells revealed a ‘mickey mouse’ phenotype based on double-budded cells. This phenotype has been described in the absence of the GPI-anchored wall protein Gas1 [81]. Expression of Gas1, which is essential for normal cell wall synthesis, is regulated during the G<sub>1</sub> phase [82, 83]. The null mutant shows a thermosensitive phenotype and reduced viability at 37°C [84–86]. Altogether, it is possible to speculate that regulation of Gas1 in G<sub>1</sub> by Pcl2 in thermal stress conditions cannot be supplanted by any other G<sub>1</sub> cyclin. Finally, we detected no increment in Pcl2 when we used elutriation; nevertheless, we were able to find phenotypes in *pcl2Δ* cells for heat shock in conditions where  $\alpha$ -factor was not present, indicating a role for Pcl2 in thermal stress independently of the synchronization method used.

We found other remarkable variations in the amount of cyclins in different stress conditions. One was the increase in Cln1 and Cln2 in response to osmotic or reductive stress. Although we attempted to determine whether those increases were reflected in the appearance of a phenotype when the cyclins were deleted, we found no differences in either dot assays or growing kinetics. This result leads us to suggest the following. First, another cyclin could take over the work of Cln1 and Cln2 in dealing with these stresses, given that Cln3 alone is able to drive cell cycle progression showing only a minor G<sub>1</sub> delay [33]. Second, since the variation we detected in the tested conditions was not sufficient to produce a phenotype, a more sensitive analysis is needed to reveal the importance of Cln1 and Cln2 responses to osmotic and reductive stress. Finally, although consistent in the different replications of the experiment, the variations in Cln1 and Cln2 in the tested conditions were not reflected biologically.

### A new tool for assessing G<sub>1</sub>

G<sub>1</sub> allows cells time to check internal and external environments and to ensure that conditions are appropriate and preparations are complete before major cellular processes are undertaken in the S- and M-phases. G<sub>1</sub> is important for cells to decide their fate: to enter in quiescence, to sporulate, to wait for better nutrient conditions, to check their size, or to acquire confidence about successful transit through cell division and not perform this process blindly. In metazoans, misregulated G<sub>1</sub> can lead to developmental problems and disease [87]. Yeast cells represent a good model for testing drugs or treatments affecting cell cycle progression in G<sub>1</sub>. Our set of strains can be used both as a tool for accurately assessing G<sub>1</sub> cell cycle progression and as a testing bench for gaining biochemical insights into the mechanisms by which a compound could affect the expression patterns of cyclins and, consequently, cell cycle progression.

To sum up, we produced a set of strains tagged in the most respectful way possible so as to produce a quantitative and accurate picture of the G<sub>1</sub> cyclins for a broad array of environmental conditions. We propose using this set of strains to monitor G<sub>1</sub> cell cycle progression and to study the molecular mechanisms sustaining cell cycle effects, the use of drugs, treatments, compounds, stresses, etc. All the strains are fully available upon request.

## Materials and methods

### Yeast strains

Yeast background (except when otherwise mentioned) was always BY4741 [88]. A list of all the strains used in this work is provided in [Table 1](#). For tagging, we followed a system based on *delitto perfetto* [39]. Briefly, for a protein to be tagged, we first deleted the complete open

Table 1. Yeast strains.

Name	Background	Genotype	Source
BY4741	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leuΔ200 met15Δ0 ura3Δ0</i>	[88]
YJ1024	W303-1a	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15</i>	[89]
YPC502	YPH499	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ</i>	[79]
1700	1700	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-1 his4 can1</i>	This study
YEB27	W303-1a	<i>PCL1-3HA</i>	This study
YEB56	W303-1a	<i>PCL1-3HA-KanMX4</i>	This study
YEB53	BY4741	<i>CLB5-3HA-KanMX4</i>	This study
YEB11	BY4741	<i>sic1::URA3-kanMX4-3HA</i>	This study
YEB112	BY4741	<i>PCL1-3HA</i>	This study
YEB113	BY4741	<i>PCL2-3HA</i>	This study
YEB114	BY4741	<i>PCL7-3HA</i>	This study
YEB116	BY4741	<i>CLN1-3HA</i>	This study
YEB117	BY4741	<i>CLN2-3HA</i>	This study
YEB118	BY4741	<i>CLN3-3HA</i>	This study
YEB119	BY4741	<i>CLB5-3HA</i>	This study
YEB120	BY4741	<i>SIC1-3HA</i>	This study
YEB182	BY4741	<i>CLB5-TAP</i>	This study
YEB181	BY4741	<i>pcl2::URA3</i>	This study
YEB189	W303-1a	<i>cln1::URA3-KanMX4 cln2::URA3</i>	This study
YEB184	W303-1a	<i>pcl2::URA3</i>	This study
YEB32	W303-1a	<i>pcl1::URA3-hyg</i>	This study
YEB30	W303-1a	<i>pcl7::URA3-KanMX4</i>	This study
YNR60	W303-1a	<i>pho85::KanMX4</i>	This study

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218531.t001>

reading frame (ORF) and replaced it with a *URA3-KanMX4-3HA* double marker and tag. We then transformed the deleted cells using a DNA fragment containing the eliminated ORF and fused the fragment to the previously introduced tag (3HA) sequence using 40 nucleotide flanking tails so as to allow the recombination (integration) process to take place. To eliminate the possibility of different recombination events—due to the presence of the three times repeated sequence of the HA tag potentially leading to proteins tagged with different numbers of HA repetitions—we modified the 3HA DNA sequence but maintained the amino acid sequence. The 3HA sequence was as follows (underlined are the bases changed to ensure the desired integration): 5' TCAGCACTGAGCAGCGTAGTCTGGGACGTCATACGGATAGGATCCTGCGTAA TCTGGGACGTCATACGGATAGCCCGCATAGTCAGGAACATCGTATGGGTA3'. Tagging, furthermore, was always checked by tag sequencing. Knock-ins were grown in plates containing 1mg/ml of the antimetabolite 5-fluoroorotic acid (5-FOA; Sigma) and were confirmed by replica plating in plates containing geneticine 0.4 mg/ml (Gibco). Selected were colonies able to grow in 5-FOA and not in geneticine.

Classical tagging to obtain the strains *PCL1-3HA-Δ3'UTR* and *CLB5-3HA-Δ3'UTR* was performed using the tool-box system [42] (a variation of a method developed previously [90, 91]), in which the original 3'UTR of the gene to be tagged is interrupted (and consequently inactivated) by the tagging (3HA in our case), the 3'UTR from *ADHI* and the selection marker.

## Growth conditions

The growing media used were yeast extract-peptone-dextrose (YPD: 1% yeast extract, 2% peptone and 2% dextrose) and complete synthetic (SD) medium (0.67% yeast nitrogen base, 0.5%



NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 2% glucose, supplemented with amino acids for auxotrophic requirements). For solid media, 2% of agar-agar (w/v) was added and melted during the autoclave process. For the malt-based medium plates, 1 g of malt medium from Bulldog Brews was dissolved in 7.69 ml of distilled water. For the 5-FOA plates, SD with all the required amino acids was supplemented with 5-FOA 1 mg/ml, sterilized by filtering, and added to the medium just before plating. Cells were always grown, except when otherwise specified, at 30°C under vigorous agitation (200 rpm) in water shakers. To reduce experimental variability, the overnight yeast cultures were always inoculated in strictly controlled conditions: the cells to be inoculated were obtained from a fresh colony and the number of cells to be inoculated was always constant (OD<sub>660</sub> = 0.01).

### Cell synchrony, flow cytometry analysis and size measure

To synchronize the cells in G<sub>1</sub>, yeast cultures were grown exponentially in YPD or SD at a density of 1×10<sup>7</sup> cells/ml, treated with α-factor (Biomedal) to a final concentration of 20 μg/ml; after 100 min, the cells were collected, washed and released into fresh medium to resume the cell cycle in a synchronous manner. Afterwards, aliquots were collected and processed as described elsewhere [92]. DNA was stained with propidium iodide and analysed in a FACS Calibur cytometer (Becton Dickinson) as described elsewhere [93].

Centrifugal elutriation was performed as described elsewhere [94], using a Beckman-Coulter J-26XPI centrifuge equipped with a JE-5.0 elutriator rotor. Briefly, one litre of cells was incubated in YPD under continuous agitation at 30°C during 16 h, to arrival at an optical density of around 6 (660 nm wavelength). The culture was brought into the elutriator using a peristaltic pump and equilibrated at 1900 rpm at 20°C. The G<sub>1</sub> cells were then obtained from the elutriator by increasing the pump flow (total elutriation process time was 2 h). Synchrony was checked in situ by microscopic inspection. The different unbudded fractions were collected and mixed until the needed number of cells was obtained. Cells were diluted in YPD to an optical density of 1. Synchrony was checked by FACS analysis. Cells were immediately incubated in an agitated water bath at 30°C and aliquots were taken for western blot analysis.

The size of the elutriated cells was assessed using a Scepter Cell Counter (Millipore) and strictly following manufacturer indications. Briefly, cells to be measured were diluted in PBS buffer at a final concentration of around 10<sup>5</sup> cells/ml.

### Cell extract and immunoblot

One ml of the yeast cell culture (1×10<sup>7</sup> cells) was treated with 10 M trichloroacetic acid (TCA) to a final concentration of 20% (v/v) for 10 min and centrifuged at full speed for 1 min. The resulting pellets were dissolved in 100 μl of 0.5% SDS, 42 mM Tris-HCl at pH 6.8. Then 300 μl of glass beads (Sartorius, BBI-8541701) were added, bead-beaten twice at maximum force for 30 sec and boiled for 5 min. Around 40 μg to 60 μg of protein from each sample was separated at 90 V (10% polyacrylamide/SDS gel) and transferred to PVDF membranes (Immobilon-P; Millipore). The primary antibodies used were anti-HA 1:100 (12CA5), anti-PAP 1:4.000 (Sigma, P1291), anti-PSTAIRES 1:5000 (Abcam, ab10345) and anti-G6PDH 1:500 (Sigma, A9521). The secondary antibodies used were donkey anti-goat-HRP, donkey anti-mouse-HRP and goat anti-rabbit-HRP 1:25000 (all from Jackson Laboratories). Immunoblots were developed using Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore) and images were taken using GeneSnap (Syngene) and quantified using Image Studio Lite (Li-Cor).

### Measuring relative amounts of cyclins

To detect all cyclins in the same blot, we mixed different strains in the same test tube. Due to their different levels of expression we included different quantities as follows: in mix 1, 0.1 OD

of each strain to a final cell concentration of  $OD_{660} = 0.3$  (0.3 ODs); in mix 2, 0.1 OD and 0.2 OD from the strains bearing *PCL1-3HA* and *CLN3-3HA*, respectively; and in mix 3, 0.05 OD from *CLN1-3HA*, 0.1 OD from *PCL7-3HA* and 0.15 OD from *SIC1-3HA*. Note that we inoculated the same number of cells for the overnight culture and before mixing the strains, and we also checked that all cells had grown to the same extent to ensure that culture phase influence was minimized (see Fig 2A). The different quantities of cells included in the mixes were mathematically corrected after western blot quantification to revert any differences introduced in mixing.

The sampling and sample processing for separation by SDS-PAGE was as described above and in Fig 2A and Fig 2B. The bands were quantified using Image Studio Lite (Li-Cor), the amounts were corrected according to mixing (see immediately above), normalized according to load control, and relativized to the maximum signal in the blot. Using this data, we produced plots representing the relative amounts of cyclins in relation to time after release.

To produce the bar graphs representing the total amounts of the cyclins, we used the plots representing relative amounts over time, determined the START point (defined as the moment when Sic1 and Clb5 amounts were identical) and integrated the area under the curve up to START using GraphPad Prism 5 software. The obtained values represent the amounts of each cyclin at START.

### Growth curves and duplication time

Strains were grown in YPD medium overnight and were diluted to  $OD_{660} = 0.01$ . Culture cell density at 660 nm wavelength was measured continuously for 24 h under agitation at 30°C in a spectrophotometer (Biotek Synergy HT). Once cultures were growing in the exponential phase, data were plotted and duplication time was calculated.

### Dot assays

Strains were grown in YPD medium overnight, diluted to  $OD_{660nm} = 0.05$  and tenfold sequentially diluted in fresh YPD. Spotted in the appropriate plates were 5  $\mu$ l of culture for incubation at the desired temperature for 24 h or 48 h.

### Statistical analysis

Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (mean  $\pm$  SEM). Statistical significance was determined using the Mann-Whitney U test. A *p* value of less than 0.05 was considered significant.

### Supporting information

**S1 Fig. Validation of the pooling strategy.** A) The presence of the 3HA tag (obtained by *delitto perfetto*, then keeping the 3'UTR intact) does not significantly alter duplication time in any of the strains used. Cells were grown overnight in YPD at 30°C, diluted to  $OD = 0.1$  in fresh medium and incubated at 30°C in a thermostated spectrophotometer under constant agitation. Optical density (wavelength 660nm) constantly measured for 420 min was used as a measure of cell density. Mean  $\pm$  SEM values for three independent experiments are shown. B) Number of cells, counted in a Newbauer chamber for four independent experiments, at indicated moments of the experiment (immediately after the O/N culture dilution, before  $\alpha$ -factor addition for synchronization and at the moment of  $\alpha$ -factor release). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM for four independent experiments. C) Proportion of cells budding 35 min after  $\alpha$ -factor release, reported as mean  $\pm$  SEM values for four independent experiments. D)

Comparison of western blot signals obtained from pooled and individually growing strains. Exponentially growing cultures were synchronized and release and aliquots were taken at the indicated times. E) Quantification of D). Note that, other than the fact that the amount of protein could be affected by using different blots, there was no difference in expression time of the cyclins depending on the pooling strategy.

(PDF)

**S2 Fig. Cyclin amounts in different growing media.** Representative western blot for the different mixes of cells growing in different culture media (YPD, SD and malt). Experiments were performed as described in [Fig 2A](#) and [Fig 2B](#). Mean±SEM values quantify at least three independent experiments.

(PDF)

**S3 Fig. Cyclin amounts in different growing media in heat-shock or high temperature conditions.** Same procedure as for [S2 Fig](#). In heat-shock conditions, cells were grown at 30°C and then moved to 37°C on  $\alpha$ -factor release. In heat-stress conditions, cells were exponentially grown at 37°C and temperature was kept constant after  $\alpha$ -factor release. A representative western blot is depicted. The graphs show mean±SEM values for at least three independent experiments.

(PDF)

**S4 Fig. Cyclin amounts in different stress conditions.** Same procedure as for [S2 Fig](#). Cells were subjected to different stresses on  $\alpha$ -factor release: osmotic stress (0.4 M NaCl), reductive stress (100 mM N-acetyl cysteine), and oxidative stress (10  $\mu$ M menadione). A representative western blot is depicted. The graphs show mean±SEM values for at least three independent experiments.

(PDF)

**S5 Fig. Cyclin amounts after change to growing medium.** Same procedure as for [S2 Fig](#). Cells were grown in YPD and released from  $\alpha$ -factor arrest into an SD medium. A representative western blot is depicted. The graphs show mean±SEM values quantifying at least three independent experiments.

(PDF)

**S6 Fig. Cyclin amount after elutriation in normal lab conditions and upon heat shock.** The noted strains were grown as described in methods section. Cells were synchronized by centrifugal elutriation. Time 0 corresponds to the moment of obtaining the cells from the elutriation device. After this moment, cells were incubated under agitation at 30°C (upper panel) or 37°C (lower panel). We took aliquots at the indicated times and processed them for western blot analysis as in the rest of the  $\alpha$ -factor experiments.

(PDF)

## Acknowledgments

We thank F. Storici for the *delitto perfetto* plasmids, F. Posas, H. Martín and J. Ayté for antibodies, M. Aldea for helpful discussion and F. Posas (and his team) for sharing the elutriator. We thank all the members of our group (S. Hernández-Ortega, O. Mirallas, L. Gasa, A. Sánchez, E. Quandt, and N. Massip) for day-by-day discussions, and Marta Pérez for technical assistance. This work was supported by funding from the Spanish Government (MINECO Grant Ref: BFU 2013-44189-P) to J Clotet. The funders had no role in study design, data collection or interpretation, or in the decision to submit the work for publication. The authors declare no conflict of interest. Ailish Maher edited the English in a version of the manuscript.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Javier Jiménez, Josep Clotet.

**Funding acquisition:** Josep Clotet.

**Investigation:** Elisabet Bállega, Reyes Carballar, Bàrbara Samper, Samuel Bru.

**Project administration:** Natalia Ricco.

**Supervision:** Mariana P. Ribeiro, Samuel Bru, Javier Jiménez, Josep Clotet.

**Validation:** Josep Clotet.

**Writing – original draft:** Javier Jiménez.

## References

1. Nurse P, Bissett Y. Gene required in G<sub>1</sub> for commitment to cell cycle and in G<sub>2</sub> for control of mitosis in fission yeast. *Nature*. 1981. 292(5823): 558–560. <https://doi.org/10.1038/292558a0> PMID: 7254352
2. Reed SI, Hadwiger JA, Lorincz AT. Protein kinase activity associated with the product of the yeast cell division cycle gene CDC28. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985. 82(12): 4055–4059. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.12.4055> PMID: 3889921
3. Reed SI, Wittenberg C. Mitotic role for the Cdc28 protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990. 87(15): 5697–5701. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.15.5697> PMID: 2165600
4. Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*. 1990. 344(6266): 503–508. <https://doi.org/10.1038/344503a0> PMID: 2138713
5. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature*. 1995. 374(6518): 131–134. <https://doi.org/10.1038/374131a0> PMID: 7877684
6. Liu J, Kipreos ET. Evolution of cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK-activating kinases (CAKs): Differential conservation of CAKs in yeast and metazoa. *Mol Biol Evol*. 2000. 17(7): 1061–1074. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026387> PMID: 10889219
7. Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*. 1983. 33(2): 389–396. 0092-8674(83)90420-8. PMID: 6134587
8. Pines J, Hunt T. Molecular cloning and characterization of the mRNA for cyclin from sea urchin eggs. *Embo J*. 1987. 6(10): 2987–2995. PMID: 2826125
9. Standart N, Minshull J, Pines J, Hunt T. Cyclin synthesis, modification and destruction during meiotic maturation of the starfish oocyte. *Dev Biol*. 1987. 124(1): 248–258. 0012-1606(87)90476-3. PMID: 15669148
10. Swenson KI, Farrell KM, Ruderman JV. The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell*. 1986. 47(6): 861–870. 0092-8674(86)90801-9. PMID: 2946420
11. Mendenhall MD, Hodge AE. Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998. 62(4): 1191–1243. PMID: 9841670
12. de Bruin RA, Kalashnikova TI, Wittenberg C. Stb1 collaborates with other regulators to modulate the G<sub>1</sub>-specific transcriptional circuit. *Mol Cell Biol*. 2008. 28(22): 6919–6928. <https://doi.org/10.1128/MCB.00211-08> PMID: 18794370
13. Bertoli C, Skotheim JM, de Bruin RA. Control of cell cycle transcription during G<sub>1</sub> and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013. 14(8): 518–528. <https://doi.org/10.1038/nrm3629> PMID: 23877564
14. Quilis I, Igual JC. Molecular basis of the functional distinction between Cln1 and Cln2 cyclins. *Cell Cycle*. 2012. 11(16): 3117–3131. <https://doi.org/10.4161/cc.21505> PMID: 22889732
15. Andrews B, Measday V. The cyclin family of budding yeast: Abundant use of a good idea. *Trends Genet*. 1998. 14(2): 66–72. PMID: 9520600
16. Stern B, Nurse P. A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genet*. 1996. 12(9): 345–350. S0168-9525(96)80016-3. PMID: 8855663

17. Swaffer MP, Jones AW, Flynn HR, Snijders AP, Nurse P. CDK substrate phosphorylation and ordering the cell cycle. *Cell*. 2016. 167(7): 1750–1761.e16. S0092-8674(16)31606-3. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.034> PMID: 27984725
18. Coudreuse D, Nurse P. Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. *Nature*. 2010. 468(7327): 1074–1079. <https://doi.org/10.1038/nature09543> PMID: 21179163
19. Uhlmann F, Bouchoux C, Lopez-Aviles S. A quantitative model for cyclin-dependent kinase control of the cell cycle: Revisited. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2011. 366(1584): 3572–3583. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0082> PMID: 22084384
20. Hadwiger JA, Wittenberg C, Richardson HE, de Barros Lopes M, Reed SI. A family of cyclin homologs that control the G<sub>1</sub> phase in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989. 86(16): 6255–6259. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6255> PMID: 2569741
21. Wittenberg C, Sugimoto K, Reed SI. G<sub>1</sub>-specific cyclins of *S. cerevisiae*: Cell cycle periodicity, regulation by mating pheromone, and association with the p34CDC28 protein kinase. *Cell*. 1990. 62(2): 225–237. 0092-8674(90)90361-H. PMID: 2142620
22. Schwob E, Nasmyth K. CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*. 1993. 7(7A): 1160–1175. <https://doi.org/10.1101/gad.7.7a.1160> PMID: 8319908
23. Epstein CB, Cross FR. CLB5: A novel B cyclin from budding yeast with a role in S phase. *Genes Dev*. 1992. 6(9): 1695–1706. <https://doi.org/10.1101/gad.6.9.1695> PMID: 1387626
24. Surana U, Robitsch H, Price C, Schuster T, Fitch I, Futcher AB, et al. The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell*. 1991. 65(1): 145–161. 0092-8674(91)90416-V. PMID: 1849457
25. Pines J, Hunter T. Isolation of a human cyclin cDNA: Evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2. *Cell*. 1989. 58(5): 833–846. 0092-8674(89)90936-7. PMID: 2570636
26. Measday V, Moore L, Retnakaran R, Lee J, Donoviel M, Neiman AM, et al. A family of cyclin-like proteins that interact with the Pho85 cyclin-dependent kinase. *Mol Cell Biol*. 1997. 17(3): 1212–1223. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.3.1212> PMID: 9032248
27. Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci*. 2005. 30(11): 630–641. S0968-0004(05)00276-8. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.09.005> PMID: 16236519
28. Huang D, Friesen H, Andrews B. Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast. *Mol Microbiol*. 2007. 66(2): 303–314. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05914.x> PMID: 17850263
29. Jimenez J, Ricco N, Grijota-Martinez C, Fado R, Clotet J. Redundancy or specificity? the role of the CDK Pho85 in cell cycle control. *Int J Biochem Mol Biol*. 2013. 4(3): 140–149. PMID: 24049669
30. Malumbres M. Physiological relevance of cell cycle kinases. *Physiol Rev*. 2011. 91(3): 973–1007. <https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2010> PMID: 21742793
31. Malumbres M BM. Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009. 9(3): 153–66. <https://doi.org/10.1038/nrc2602> PMID: 19238148
32. Doonan JH, Kitsios G. Functional evolution of cyclin-dependent kinases. *Mol Biotechnol*. 2009. 42(1): 14–29. <https://doi.org/10.1007/s12033-008-9126-8> PMID: 19145493
33. Tyers M, Tokiwa G, Futcher B. Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G<sub>1</sub> cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. *Embo J*. 1993. 12(5): 1955–1968. PMID: 8387915
34. Cross FR, Archambault V, Miller M, Klovstad M. Testing a mathematical model of the yeast cell cycle. *Mol Biol Cell*. 2002. 13(1): 52–70. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-05-0265> PMID: 11809822
35. Jackson RJ. Cytoplasmic regulation of mRNA function: The importance of the 3' untranslated region. *Cell*. 1993. 74(1): 9–14. 0092-8674(93)90290-7. PMID: 7687524
36. Matoulkova E, Michalova E, Vojtesek B, Hrstka R. The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biol*. 2012. 9(5): 563–576. <https://doi.org/10.4161/rna.20231> PMID: 22614827
37. Tuller T, Ruppin E, Kupiec M. Properties of untranslated regions of the *S. cerevisiae* genome. *BMC Genomics*. 2009. 10: 391-2164-10-391. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-391> PMID: 19698117
38. Geissler R, Grimson A. A position-specific 3'UTR sequence that accelerates mRNA decay. *RNA Biol*. 2016. 13(11): 1075–1077. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1225645> PMID: 27565004
39. Storicci F, Lewis LK, Resnick MA. In vivo site-directed mutagenesis using oligonucleotides. *Nat Biotechnol*. 2001. 19(8): 773–776. <https://doi.org/10.1038/90837> PMID: 11479573

40. Saiz-Baggetto S, Mendez E, Quilis I, Igual JC, Bano MC. Chimeric proteins tagged with specific 3xHA cassettes may present instability and functional problems. *PLoS One*. 2017. 12(8): e0183067. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183067> PMID: 28800621
41. Longtine MS, McKenzie A, 3rd, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachet A, et al. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 1998. 14(10): 953–961. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199807\)14:10<953::AID-YEA293>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199807)14:10<953::AID-YEA293>3.0.CO;2-U) PMID: 9717241
42. Janke C, Magiera MM, Rathfelder N, Taxis C, Reber S, Maekawa H, et al. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*. 2004. 21(11): 947–962. <https://doi.org/10.1002/yea.1142> PMID: 15334558
43. Tam WY, Lai MC. Translational control of cyclins. *Cell Div*. 2011. 6(1): 5–1028-6-5. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-6-5> PMID: 21314915
44. Thorburn RR, Gonzalez C, Brar GA, Christen S, Carlile TM, Ingolia NT, et al. Aneuploid yeast strains exhibit defects in cell growth and passage through START. *Mol Biol Cell*. 2013. 24(9): 1274–1289. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-07-0520> PMID: 23468524
45. Zapata J, Dephore N, Macdonough T, Yu Y, Parnell EJ, Mooring M, et al. PP2A<sup>Rts1</sup> is a master regulator of pathways that control cell size. *J Cell Biol*. 2014. 204(3): 359–376. <https://doi.org/10.1083/jcb.201309119> PMID: 24493588
46. Quilis I, Igual JC. A comparative study of the degradation of yeast cyclins Cln1 and Cln2. *FEBS Open Bio*. 2016. 7(1): 74–87. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12157> PMID: 28097090
47. Ball DA, Marchand J, Poulet M, Baumann WT, Chen KC, Tyson JJ, et al. Oscillatory dynamics of cell cycle proteins in single yeast cells analyzed by imaging cytometry. *PLoS One*. 2011. 6(10): e26272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026272> PMID: 22046265
48. Gonzalez-Novo A, Jimenez J, Clotet J, Nadal-Ribelles M, Caverro S, de Nadal E, et al. Hog1 targets Whi5 and Msa1 transcription factors to downregulate cyclin expression upon stress. *Mol Cell Biol*. 2015. 35(9): 1606–1618. <https://doi.org/10.1128/MCB.01279-14> PMID: 25733686
49. Flick K, Chapman-Shimshoni D, Stuart D, Guaderrama M, Wittenberg C. Regulation of cell size by glucose is exerted via repression of the CLN1 promoter. *Mol Cell Biol*. 1998. 18(5): 2492–2501. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.5.2492> PMID: 9566870
50. Li X, Cai M. Recovery of the yeast cell cycle from heat shock-induced G(1) arrest involves a positive regulation of G(1) cyclin expression by the S phase cyclin Clb5. *J Biol Chem*. 1999. 274(34): 24220–24231. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.34.24220> PMID: 10446197
51. Sambuk EV, Popova I, Fizikova AI, Padkina MV. Genetic analysis of pleiotropic effects of pho85 mutations in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetika*. 2003. 39(8): 1039–1045. PMID: 14515459
52. Sambuk EV, Fizikova AY, Savinov VA, Padkina MV. Acid phosphatases of budding yeast as a model of choice for transcription regulation research. *Enzyme Res*. 2011. 2011: 356093. <https://doi.org/10.4061/2011/356093> PMID: 21785706
53. Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, Iyer VR, Anders K, Eisen MB, et al. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell*. 1998. 9(12): 3273–3297. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.12.3273> PMID: 9843569
54. Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephore N, et al. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*. 2003. 425(6959): 737–741. <https://doi.org/10.1038/nature02046> PMID: 14562106
55. Horak CE, Snyder M. Global analysis of gene expression in yeast. *Funct Integr Genomics*. 2002. 2(4–5): 171–180. <https://doi.org/10.1007/s10142-002-0065-3> PMID: 12192590
56. Ho B, Baryshnikova A, Brown GW. Unification of protein abundance datasets yields a quantitative *Saccharomyces cerevisiae* proteome. *Cell Syst*. 2018. S2405–4712(17)30546-X.
57. Flory MR, Lee H, Bonneau R, Mallick P, Serikawa K, Morris DR, et al. Quantitative proteomic analysis of the budding yeast cell cycle using acid-cleavable isotope-coded affinity tag reagents. *Proteomics*. 2006. 6(23): 6146–6157. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600159> PMID: 17133367
58. Zubarev RA. The challenge of the proteome dynamic range and its implications for in-depth proteomics. *Proteomics*. 2013. 13(5): 723–726. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200451> PMID: 23307342
59. Field J, Nikawa J, Broek D, MacDonald B, Rodgers L, Wilson IA, et al. Purification of a RAS-responsive adenyllyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Mol Cell Biol*. 1988. 8(5): 2159–2165. <https://doi.org/10.1128/mcb.8.5.2159> PMID: 2455217
60. Kuersten S, Goodwin EB. The power of the 3' UTR: Translational control and development. *Nat Rev Genet*. 2003. 4(8): 626–637. <https://doi.org/10.1038/nrg1125> PMID: 12897774
61. Andreassi C, Riccio A. To localize or not to localize: mRNA fate is in 3'UTR ends. *Trends Cell Biol*. 2009. 19(9): 465–474. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.06.001> PMID: 19716303

62. Deshpande A, Pastore A, Deshpande AJ, Zimmermann Y, Hutter G, Weinkauf M, et al. 3'UTR mediated regulation of the cyclin D1 proto-oncogene. *Cell Cycle*. 2009. 8(21): 3592–3600. <https://doi.org/10.4161/cc.8.21.9993> PMID: [19823025](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19823025/)
63. Schnerch D, Follo M, Felthaus J, Engelhardt M, Wasch R. The 3' untranslated region of the cyclin B mRNA is not sufficient to enhance the synthesis of cyclin B during a mitotic block in human cells. *PLoS One*. 2013. 8(9): e74379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074379> PMID: [24058555](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24058555/)
64. Slotta-Huspenina J, Koch I, Richter M, Bink K, Kremer M, Specht K, et al. Cyclin D1 positive multiple myeloma: Predominance of the short, 3'UTR-deficient transcript is associated with high cyclin D1 mRNA levels in cases with t(11;14) translocation, but does not correlate with proliferation rate or genomic deletions. *Leuk Res*. 2008. 32(1): 79–88. S0145-2126(07)00240-8. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2007.05.021> PMID: [17629555](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17629555/)
65. Radford HE, Meijer HA, de Moor CH. Translational control by cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* oocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2008. 1779(4): 217–229. <https://doi.org/10.1016/j.bbtagrm.2008.02.002> PMID: [18316045](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18316045/)
66. Slevin MK, Gourronc F, Hartley RS. ElrA binding to the 3'UTR of cyclin E1 mRNA requires polyadenylation elements. *Nucleic Acids Res*. 2007. 35(7): 2167–2176. gkm084. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm084> PMID: [17355986](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17355986/)
67. Juanes MA. Methods of synchronization of yeast cells for the analysis of cell cycle progression. *Methods Mol Biol*. 2017. 1505: 19–34. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6502-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6502-1_2) PMID: [27826853](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27826853/)
68. Rosebrock AP. Methods for synchronization and analysis of the budding yeast cell cycle. *Cold Spring Harb Protoc*. 2017. 2017(1): pdb.top080630. <https://doi.org/10.1101/pdb.top080630> PMID: [28049810](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28049810/)
69. Barberis M, Klipp E, Vanoni M, Alberghina L. Cell size at S phase initiation: An emergent property of the G1/S network. *PLoS Comput Biol*. 2007. 3(4): e64. 06-PLCB-RA-0291R4. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030064> PMID: [17432928](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17432928/)
70. Adrover MA, Zi Z, Duch A, Schaber J, Gonzalez-Novo A, Jimenez J, et al. Time-dependent quantitative multicomponent control of the G(1)-S network by the stress-activated protein kinase Hog1 upon osmotic stress. *Sci Signal*. 2011. 4(192): ra63. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002204> PMID: [21954289](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21954289/)
71. Charvin G, Oikonomou C, Siggia ED, Cross FR. Origin of irreversibility of cell cycle start in budding yeast. *PLoS Biol*. 2010. 8(1): e1000284. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000284> PMID: [20087409](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20087409/)
72. Doncic A, Falleur-Fettig M, Skotheim JM. Distinct interactions select and maintain a specific cell fate. *Mol Cell*. 2011. 43(4): 528–539. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.025> PMID: [21855793](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21855793/)
73. Cross FR, Tinkelenberg AH. A potential positive feedback loop controlling CLN1 and CLN2 gene expression at the start of the yeast cell cycle. *Cell*. 1991. 65(5): 875–883. 0092-8674(91)90394-E. PMID: [2040016](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2040016/)
74. Lew DJ, Reed SI. Morphogenesis in the yeast cell cycle: Regulation by Cdc28 and cyclins. *J Cell Biol*. 1993. 120(6): 1305–1320. <https://doi.org/10.1083/jcb.120.6.1305> PMID: [8449978](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8449978/)
75. Benton BK, Tinkelenberg AH, Jean D, Plump SD, Cross FR. Genetic analysis of cln/Cdc28 regulation of cell morphogenesis in budding yeast. *Embo J*. 1993. 12(13): 5267–5275. PMID: [8262069](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8262069/)
76. Cross FR. Starting the cell cycle: What's the point? *Curr Opin Cell Biol*. 1995. 7(6): 790–797. 0955-0674(95)80062-X. PMID: [8608009](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8608009/)
77. Levine K, Huang K, Cross FR. *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins differ in their intrinsic functional specificities. *Mol Cell Biol*. 1996. 16(12): 6794–6803. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.12.6794> PMID: [8943334](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8943334/)
78. Hydrbring P, Malumbres M, Sicinski P. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016. 17(5): 280–292. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.27> PMID: [27033256](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27033256/)
79. Sikorski RS, Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1989. 122(1): 19–27. PMID: [2659436](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2659436/)
80. Lee KS, Irie K, Gotoh Y, Watanabe Y, Araki H, Nishida E, et al. A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol Cell Biol*. 1993. 13(5): 3067–3075. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.5.3067> PMID: [8386319](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8386319/)
81. Popolo L, Vai M, Gatti E, Porello S, Bonfante P, Balestrini R, et al. Physiological analysis of mutants indicates involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-anchored protein gp115 in morphogenesis and cell separation. *J Bacteriol*. 1993. 175(7): 1879–1885. <https://doi.org/10.1128/jb.175.7.1879-1885.1993> PMID: [8458831](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8458831/)
82. Popolo L, Alberghina L. Identification of a labile protein involved in the G1-to-S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984. 81(1): 120–124. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.1.120> PMID: [6364132](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6364132/)



83. Popolo L, Cavadini P, Vai M, Alberghina L. Transcript accumulation of the GGP1 gene, encoding a yeast GPI-anchored glycoprotein, is inhibited during arrest in the G<sub>1</sub> phase and during sporulation. *Curr Genet*. 1993. 24(5): 382–387. PMID: [8299152](#)
84. Sinha H, David L, Pascon RC, Clauder-Munster S, Krishnakumar S, Nguyen M, et al. Sequential elimination of major-effect contributors identifies additional quantitative trait loci conditioning high-temperature growth in yeast. *Genetics*. 2008. 180(3): 1661–1670. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.092932> PMID: [18780730](#)
85. Auesukaree C, Damnernasawad A, Kruatrachue M, Pokethitiyook P, Boonchird C, Kaneko Y, et al. Genome-wide identification of genes involved in tolerance to various environmental stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Genet*. 2009. 50(3): 301–310. <https://doi.org/10.1007/BF03195688> PMID: [19638689](#)
86. Ruiz-Roig C, Vieitez C, Posas F, de Nadal E. The Rpd3L HDAC complex is essential for the heat stress response in yeast. *Mol Microbiol*. 2010. 76(4): 1049–1062. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07167.x> PMID: [20398213](#)
87. Johnson A, Skotheim JM. Start and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol*. 2013. 25(6): 717–723. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.07.010> PMID: [23916770](#)
88. Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, et al. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*. 1998. 14(2): 115–132. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980130\)14:2<115::AID-YEA204>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980130)14:2<115::AID-YEA204>3.0.CO;2-2) PMID: [9483801](#)
89. Thomas BJ, Rothstein R. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*. 1989. 56(4): 619–630. 0092-8674(89)90584-9. PMID: [2645056](#)
90. Wach A, Brachat A, Pohlmann R, Philippsen P. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 1994. 10(13): 1793–1808. PMID: [7747518](#)
91. Wach A, Brachat A, Alberti-Segui C, Rebischung C, Philippsen P. Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 1997. 13(11): 1065–1075. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19970915\)13:11<1065::AID-YEA159>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19970915)13:11<1065::AID-YEA159>3.0.CO;2-K) PMID: [9290211](#)
92. Haase SB, Reed SI. Improved flow cytometric analysis of the budding yeast cell cycle. *Cell Cycle*. 2002. 1(2): 132–136. PMID: [12429922](#)
93. Yaakov G, Duch A, Garcia-Rubio M, Clotet J, Jimenez J, Aguilera A, et al. The stress-activated protein kinase Hog1 mediates S phase delay in response to osmostress. *Mol Biol Cell*. 2009. 20(15): 3572–3582. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09-02-0129> PMID: [19477922](#)
94. Gordon CN, Elliott SC. Fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* cell populations by centrifugal elutriation. *J Bacteriol*. 1977. 129(1): 97–100. PMID: [318655](#)





# Intertwined control of the cell cycle and nucleocytoplasmic transport by the cyclin-dependent kinase Pho85 and RanGTPase Gsp1 in *Saccharomyces cerevisiae*



Oriol Mirallas, Elisabet Ballega, Bàrbara Samper-Martín, Sergio García-Márquez, Reyes Carballar, Natalia Ricco, Javier Jiménez\*, Josep Clotet\*

Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Cell cycle  
Pho85  
Gsp1  
RAN-GTP  
*Saccharomyces cerevisiae*

## ABSTRACT

Deciphering the molecular mechanisms that connect cell cycle progression and nucleocytoplasmic transport is of particular interest: this intertwined relationship, once understood, may provide useful insight on the diseases resulting from the malfunction of these processes. In the present study we report on findings that indicate a biochemical connection between the cell cycle regulator CDK Pho85 and Ran-GTPase Gsp1, an essential nucleocytoplasmic transport component. When Gsp1 cannot be phosphorylated by Pho85, the cell cycle progression is impaired. Accordingly, a nonphosphorylatable version of Gsp1 abnormally localizes to the nucleus, which impairs the nuclear transport of molecules, including key components of cell cycle progression. Furthermore, our results suggest that the physical interaction of Gsp1 and the Kap95 karyopherin, essential to the release of nuclear cargoes, is altered. Altogether, the present findings point to the involvement of a biochemical mechanism in the interlocked regulation of the cell cycle and nuclear transport.

## 1. Introduction

In all eukaryotic cells, the nucleocytoplasmic transport of proteins greater than ~40 kDa is an energy-dependent process requiring the participation of a very complex group of proteins governed by Ran-GTPase (Nachury and Weis, 1999), which cycles between GTP-bound and GDP-bound states (Pemberton and Paschal, 2005). Besides Ran-GTPase, the nucleocytoplasmic traffic is supported by a family of proteins generally known as karyopherins (Radu et al., 1995) that includes importins ( $\alpha$  and  $\beta$ ) (Gorlich et al., 1994) and exportins (Stade et al., 1997), as well as many adaptors and helping proteins (Chook and Blobel, 2001; Chook and Suel, 2011; Conti and Izaurralde, 2001; Conti et al., 2006; Gorlich and Kutay, 1999; Madrid and Weis, 2006; Mosammaparast and Pemberton, 2004; Pemberton and Paschal, 2005; Stewart, 2007) as briefly described below.

In the import process, the importin- $\beta$ -family of proteins—Kap95 being the most relevant, although others are found in *Saccharomyces cerevisiae*—specifically recognizes and binds itself to nuclear localization signals (NLSs) present in the cargoes to be imported (Kalderson et al., 1984; Lange et al., 2007). Helped by importin- $\alpha$  (Srp1 in *S. cerevisiae*), importin- $\beta$  proteins carry NLS-containing proteins through the nuclear pore complex into the nucleus. Once in the nucleus, they bind

with Ran-GTPase (Gsp1 in *S. cerevisiae*) in GTP form and destabilize the importin-cargo complex, releasing the cargo into the nucleus (Pemberton and Paschal, 2005; Stewart, 2007). In the export process, the exportin (Xpo1 in *S. cerevisiae*) forming a complex with the Ran-GTPase in its GTP form, binds to the nuclear export signal (NES) present in the cargoes to be exported (Chook and Suel, 2011), and this process is aided by adaptor proteins (Yrb2 in *S. cerevisiae*). The complex goes through the nuclear pore complex into the cytoplasm, where Ran-GTPase changes into its GDP form to allow for cargo release (Weis, 2003), a process that is also helped by other proteins such as Yrb1 (Oki and Nishimoto, 2000) and Mog1 (Oki and Nishimoto, 1998).

As mentioned above, the keystone in nucleocytoplasmic transport relays on the GTP/GDP cycle of the Ran-GTPase, a cycle that is catalysed by the nuclear GEF (GTP Exchanging Factor) Prp20 (also known as Srm1) in *S. cerevisiae* (Akhtar et al., 2001; Vijayraghavan et al., 1989) and the cytoplasmic GAP (GTPase Activating Protein) Rna1 in *S. cerevisiae* (Becker et al., 1995). In *S. cerevisiae*, Ran-GTPase Gsp1 is an essential protein with a paralog, Gsp2 which is very little expressed (Belhumeur et al., 1993). The overexpression of Gsp1 has a pleiotropic phenotype: abnormal cell cycle progression in G<sub>1</sub> (Stevenson et al., 2001), altered chromosome stability (Ouspenski et al., 1999), decreased telomeric silencing (Clement et al., 2006), and decreased vegetative

\* Corresponding author at: Universitat Internacional de Catalunya, Avda. Dr. Trueta S/N, 08195, Sant Cugat del Vallès, Barcelona, Spain.  
E-mail addresses: [jjimenez@uic.es](mailto:jjimenez@uic.es) (J. Jiménez), [jclotet@uic.cat](mailto:jclotet@uic.cat) (J. Clotet).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.10.008>

Received 19 July 2017; Received in revised form 9 October 2017; Accepted 17 October 2017

Available online 26 October 2017

0944-5013/© 2017 Elsevier GmbH. All rights reserved.

**Table 1**  
Yeast strains used in this study.

Strain	Background	Genotype	Source
W303-1a	W303-1a	MATA leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15	(Thomas and Rothstein, 1989)
YJJ1091	W303-1a	GSP1-wt-KanMX, gsp2Δ:LEU2	This Study
YJJ1092	W303-1a	gsp1-S181A-KanMX, gsp2Δ:LEU2	This Study
YEB145	W303-1a	GSP1-wt-KanMX, WHI51-eGFP-HIS3	This Study
YEB146	W303-1a	gsp1-S181A-KanMX, WHI5-eGFP-HIS3	This Study
YEB147	W303-1a	GSP1-wt-KanMX, MBP1-eGFP-HIS3	This Study
YEB148	W303-1a	gsp1-S181A-KanMX, MBP1-eGFP-HIS3	This Study
YJJ1081	W303-1a	GSP1-wt-KanMX, MIG1-eGFP-HIS3	This Study
YJJ1082	W303-1a	gsp1-S181A-KanMX, MIG1-eGFP-HIS3	This Study
YJJ1117	W303-1a	NAT pADH-yeGFP GSP1-wt-KanMX	This Study
YJJ1118	W303-1a	NAT pADH-yeGFP gsp1-S181A KanMX	This Study
YEB159	W303-1a	GSP1-wt-KanMX, gsp2Δ:LEU2, PHO85-eGFP	This Study
YEB160	W303-1a	gsp1-S181A- KanMX, gsp2Δ:LEU2, PHO85-eGFP	This Study

growth (Sopko et al., 2006).

From a structural point of view, several components of the transport machinery have been well characterized, including crystal structures of the Ran-GTPase, karyopherins, and other components of the complex, information that is essential to understanding the steric changes that allow the assembling and disassembling of different import and export complexes (Forwood et al., 2010; Lee et al., 2005; Stewart, 2007).

The transport of molecules to and from the nucleus has been shown to correlate with cell cycle progression machinery. Cell cycle repressors, such as Whi5, are excluded from the nucleus at the appropriate time point (Costanzo et al., 2004; Taberner et al., 2009), checkpoint protein localization is regulated (Kobayashi and Matsuura, 2013), and cell cycle activators are introduced so that the cycle may proceed (e.g. Mbp1, Swi4, and Sw6) (Koch et al., 1993). Phosphorylation of consensus sites around NLS signals have been shown to modulate the activity of the NLS in question. CDK-dependent phosphorylation of NLS confers cell cycle-dependent nucleocytoplasmic shuttling of proteins such as Swi5, Swi6, and Mcm3 (Kosugi et al., 2009). Taken together, these findings provide evidence that cell cycle machinery has a certain level of control over the nucleocytoplasmic traffic of molecules.

Cell cycle machinery is mastered by a family of cyclin-dependent kinases (CDKs) (Nurse and Bissett, 1981; Nurse, 1990; Reed et al., 1985; Reed and Wittenberg, 1990) (for a more recent review see (Malumbres, 2014)), enzymes that contain a serine/threonine-specific catalytic core and carry out activity that is modulated by their interaction with oscillatory regulatory subunits known as cyclins (Evans et al., 1983; Pines and Hunt, 1987; Standart et al., 1987; Swenson et al., 1986). Several models have been proposed to explain how CDKs control the cell cycle (Coudreuse and Nurse, 2010; Stern and Nurse, 1996; Swaffer et al., 2016), but the most accepted is based on the different substrate specificities of the CDK, which are determined by the cyclin the CDK interacts with (Andrews and Measday, 1998; Jimenez et al., 2013a). It is also important to note that these proteins fine-tune a multitude of biological pathways through phosphorylation (Hydbring et al., 2016).

The yeast *S. cerevisiae* has 2 CDKs that control cell cycle events: the essential CDK Cdc28, which is believed to be responsible for the major processes in cell cycle progression, and the relatively superfluous CDK Pho85, which has been described as playing essential roles under specific environmental conditions (Jimenez et al., 2013a) and fine-tuning many different processes during the normal cell cycle (Huang et al., 2007). To understand the nuances of cell cycle regulation, our group has focused on the role of Pho85 in cellular processes that, in one way or another, must correlate with cell cycle progression.

Pho85 essentially plays 2 types of roles depending on the family of cyclins that are attached to it (Huang et al., 2007). When attached to Pho80 family cyclins, Pho85 controls phosphate metabolism (Lee et al., 2008) and as a consequence cell cycle (Truman et al., 2012; Menoyo et al., 2013; Jimenez et al., 2013b). When it binds cyclins from the Pcl1,2 family, meanwhile, it is involved in cell cycle control (Espinoza

et al., 1994; Huang et al., 2007; Schneider et al., 1994).

In the present work, we report on findings related to the relationship between cell cycle control and nucleocytoplasmic transport. We will show that Pho85-Pcl1, but not Pho85-Pho80, is able to phosphorylate, at least in vitro, Ran-GTPase Gsp1 at Ser181. The nonphosphorylatable *gsp1* mutant shows a reduced nuclear intensity, as do some of the nuclear cargoes, and the interaction with the karyopherin Kap95 appears to be clearly impaired. Phenotypically, cells bearing the nonphosphorylatable version of *gsp1* show impaired cell cycle progression, which compromises its behaviour in culture.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Yeast strains and growth conditions

Yeast cells were grown in either rich yeast peptone dextrose (YPD) medium (1% yeast extract, 2% peptone, and 2% glucose) or complete synthetic dextrose (SD) medium (0.67% yeast nitrogen base and 2% glucose) containing the auxotrophic amino acid requirements (76 mg/l except for leucine and adenine, which are present at 380 mg/l and 150 mg/l, respectively).

The yeast strains and plasmids used in the present study are listed in Tables 1 and 2, respectively. All gene modifications in yeast were achieved by homologous recombination at the chromosomal loci using the toolbox system (Janke et al., 2004), with the exception of *gsp2:LEU2*, in which the Ydp plasmid system was used (Berben et al., 1991). All constructed strains were verified by PCR, and the tagged strains were additionally confirmed by Western blot analysis.

### 2.2. Genomic site-directed mutation of GSP1

We designed a PCR-based system for genomic site-directed mutation

**Table 2**  
Plasmids used in this study.

Name	Relevant characteristics	Source
pJC1159	pGEX6P1-empty	This Study
pJC1168	pGEX6P1-PHO85 (Cloned in <i>Bam</i> HI)	This Study
pJC1177	pGEX6P1-PCL1 (Cloned in <i>Bam</i> HI)	This Study
pJC1406	pGEX6P1-GSP1 (Cloned between <i>Bam</i> HI and <i>Eco</i> RI)	This Study
pJC1407	pGEX6P1-gsp1-S181A (Cloned between <i>Bam</i> HI and <i>Eco</i> RI)	This Study
pJC1974	pRSETA-KAP95 (Cloned between <i>Bam</i> HI and <i>Eco</i> RI)	This Study
pJC2007	pRSETA-YRBI (Cloned between <i>Bam</i> HI and <i>Eco</i> RI)	This Study
pFT043	pRS416-NLS-4GFP	(Fernandez-Cid et al., 2012b)

**Table 3**

Oligonucleotides used for the genomic site-directed mutation of *GSP1* underlined are the mutation. In upper case, sequence corresponding to the *GSP1* locus. In lower case, KanMX gene from pYM14 toolbox plasmid.

Name	Sequence 5'-3'
F1wt	CAGAAAATTGGCTGGTAACCCACAATTAGAATTTGGTCTCTCCAGCTT
F1A	CAGAAAATTGGCTGGTAACCCACAATTAGAATTTGGTCTCTCCAGCTT
R1	cccggcggggacgaggaagctTTAGACAAGCCAAATACGTT
F2	AACGTATTTGGCTTGCTAAAgcttgcctgcccgccggg
R2	GCTTGCTTTGGTATGCCTTAACGCAAGTTGAAGGAGACGaaactggatggcggcgttag

of serine 181 to alanine (S181A), system that maintains intact 250 bases downstream from the ORF of the gene. For a first PCR reaction, two pairs of oligonucleotides were designed (Table 3); two forward primers (named F1 wt and F1A) containing the wild-type or the S181A mutation of the *GSP1* gene, and a reversal oligonucleotide (R1) designed 250 bp downstream the genomic sequence of *GSP1* gene (in order to respect the gene termination signals) and including an additional tail of 15 nucleotides hybridizing to the 5' end of the KanMX gene in the pYM14 plasmid from the toolbox (Janke et al., 2004). PCR reactions, using as template genomic DNA from W303 strain and combining the different forward primers (producing wild-type or mutant version) and the reverse oligonucleotide, were performed to obtain DNA fragments corresponding to the 3' end part of *GSP1* gene containing or not the desired mutation.

To add the KanMX selection marker to the cassette, we first amplify the KanMX gene bearing the appropriate hanging tails as follows: we performed a PCR using a F2 forward primer (hybridizing 250 base-pair downstream the 3' end of *GSP1* gene) and including a 3'tail hybridizing to the 5' end of the KanMX sequence included in pYM14 from toolbox (Janke et al., 2004) and a R2 reversal primer including a sequence hybridizing 300 bp downstream the *GSP1* gene and a sequence for the 3' end part of the KanMX sequence included in pYM14.

Finally, to produce the recombination cassette we performed a PCR reaction using F1 (wt or A) and R2 primers. As template, we used an equimolar mix of the *GSP1* PCR fragment generated as described above (wild-type and mutant) and the KanMX PCR fragment.

The wild-type and S181A mutation cassettes were transformed in wild-type W303 strain. The *GSP1* locus was totally sequenced in all the strains to assure that not mutations further than the desired one was included during the PCR reactions.

### 2.3. Recombinant protein purification

For expression of glutathione S-transferase (GST) or 6xHIS fusion proteins, the *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) (Stratagene) was transformed with the corresponding plasmids. Protein expression was induced with 1 mM isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 5 h at 25 °C. Cells were collected by centrifugation, resuspended in 10 ml of cold extraction buffer A (50 mM Tris, pH: 8, 15 mM EDTA, 15 mM EGTA, and 0.1% Triton X-100) containing protease inhibitors (2 mg/ml of pepstatin, 2 mg/ml of leupeptin, 1 mM pepstatin leupeptin phenylmethylsulfonyl fluoride, or PMSF, and 1 mM benzamidine), phosphatase inhibitors (10 mM sodium orthovanadate, 25 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM sodium pyrophosphate, and 10 mM sodium fluoride), and 2 mM DTT. Cells were ruptured by sonication on ice, lysates were removed by centrifugation (1000 rpm for 1 min at 4 °C), and the supernatants were purified using glutathione-sepharose column chromatography for GST-fused proteins and nickel-chelating resin (Ni-NTA) for 6xHIS-fused proteins as described in each manufacturer's instructions. After incubation for 1 h at 4 °C with rotation, the beads were collected by centrifugation (1000 rpm for 1 min at 4 °C) and washed with buffer A 3 times. The elution was performed by adding 10 mM glutathione or 250 mM imidazole.

### 2.4. In vitro kinase assays

Kinase assays were performed mainly as previously described (Hernandez-Ortega et al., 2012). GST-Pho85, GST-Pcl1, GST-Pho80, GST-Gsp1, and GST-*gsp1*-S181A were purified from bacteria. Phosphorylated proteins were detected using the Pro-Q Diamond phosphoprotein gel stain kit (Invitrogen).

### 2.5. Cell extracts and immunoblot analysis

Proteins were isolated from yeast strains by treating cell culture samples with trichloroacetic acid at a final concentration of 20% for 1 h. Next, pellets were dissolved in PAGE-SDS sample buffer (100  $\mu$ l of 50% SDS, 42 mM Tris-HCl at pH 6.8), lysed using glass beads, and boiled for 5 min. Anti-glucose-6-phosphate dehydrogenase antibody (anti-G6PDH; Sigma) was used at 1:500, anti-Clb5 polyclonal antibody (Santa Cruz, sc-6704) was used at 1:100, and anti-Gsp1 polyclonal antibody (Abnova Ref: PAB12340) was used at 1:1000. The secondary antibodies used were donkey anti-goat-HRP 1:2000 and goat anti-rabbit-HRP 1:25000 (both from Jackson laboratories). Immunoblots were developed using Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore) and images were taken with a GeneSnap (Syngene) and quantified with Image Studio Lite (Li-Cor).

### 2.6. Co-immunoprecipitation assays

Exponential-phase yeast cells were harvested (500 ml at 0.8 OD<sub>600nm</sub>) and resuspended in 5 ml of cold extraction buffer A (50 mM Tris, pH8, 15 mM EDTA, 15 mM EGTA, 0.1% Triton X-100) containing protease inhibitors (2  $\mu$ g/ml of pepstatin, leupeptin, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and benzamidine) and phosphatase inhibitors (10 mM sodium orthovanadate and 250 mM  $\beta$ -glycerophosphate). Cells were ruptured by vortexing with glass beads, and the resulting extract was centrifuged at 4 °C for 15 min at 13,000 rpm. Three-mg samples of crude extract were incubated overnight at 4 °C with 25  $\mu$ l of GFP-Trap (ChromoTek). After washing with extraction buffer, the proteins bound to the beads were resuspended in 30  $\mu$ l of SDS-PAGE sample buffer, heated at 95 °C for 5 min, and loaded onto SDS-PAGE gels.

### 2.7. Cell synchronization and cytometry analysis

To synchronize the cells, yeast cultures were grown exponentially in YPD at a density of  $1 \times 10^7$  cells/ml. For G<sub>1</sub> arrest, cells were treated with  $\alpha$ -factor (Biomedical) to a final concentration 20  $\mu$ g/ml; after 2 h, cells were collected, washed twice with fresh YPD, and released to resume the cell cycle. Next, samples were collected and processed as previously described (Haase and Reed, 2002). DNA was stained with propidium iodide and analysed in a FACS Calibur cytometer (Becton Dickinson) as detailed in (Yaakov et al., 2009).

### 2.8. Fluorescence microscopy

Strains tagged with eGFP or yeGFP were grown overnight with SD complete medium plus adenine to a final concentration of 120  $\mu$ g/ml to

avoid autofluorescence. Cells were diluted in the same medium to  $OD_{660nm} = 0.4$  and allowed to grow to a mid-log phase for approximately 2 h at 30 °C; next, cells were centrifuged at 1500 rpm for 1 min and resuspended in the appropriate volume of medium to produce the optimal cell concentration for the observation. Five  $\mu$ l of cells were placed onto a slide and mounted with a coverslip. The intensity of the GFP signal was measured using NIS-Elements software as follows: a circular area in the nucleus was selected and the intensity was measured, and the same area was measured in different nuclei. The same was carried out to measure cytoplasmic fluorescence; in this case, areas with low intensity were ruled out to avoid areas or organelles where the proteins were excluded.

### 2.9. Protein binding assay

All full-length proteins used were purified from bacteria as stated above, except for Gsp1 or *gsp1*-S181A, which were left attached to the Sepharose beads. After 4 washes with buffer A, Gsp1 and *gsp1*-S181A were washed with 1 ml of buffer 1 (PBS containing 10 mM EDTA, 1 mM PMSF, and 1 mM DTT) twice and left rotating at 4 °C for 1 h. Next, beads were washed twice with 1 ml of buffer 2 (PBS containing 10 mM  $Mg^{+2}$ , 1 mM PMSF, 1 mM DTT, and 1 mM GTP). Fifty  $\mu$ g of RanGTP were added with 70  $\mu$ g of importin- $\beta$  or Xpo1 and Yrb1, based on the binding assay, with buffer 2 in the same eppendorf tube at a final volume of 50  $\mu$ l. The mixture was incubated for 1 h at 30 °C and the beads were centrifuged at 1500 rpm and washed 3 times with buffer 2. The beads were resuspended with 5  $\mu$ l of PAGE-SDS sample buffer concentrated 5 times and heated at 95 °C for 5 min, loaded onto SDS-PAGE gels, and stained with Bio-Safe Coomassie stain.

### 2.10. Statistical analysis

Data were expressed as mean value  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical significance was determined using the Mann-Whitney U test. A *p* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. The biochemical relationship between Gsp1 and Pho85

To investigate the molecular mechanisms that account for the necessary coordination between the cell cycle and nucleocytoplasmic transport, we reviewed the literature in search for clues about such a relationship and found that in a genome-wide search for phosphorylation events in *S. cerevisiae*, Gsp1 had been proposed as a substrate for the CDK Pho85 (Ptacek et al., 2005). This led us to the question of whether nucleocytoplasmic transport might be regulated by the availability of phosphate and/or the cell cycle, processes that involve Pho85. This prompted us to ask what activity is responsible for Gsp1 phosphorylation, either Pho85-Pho80 suggesting that the availability of phosphate could regulate nucleocytoplasmic transport, or, alternatively, Pho85-Pcl1, which would suggest a regulation by cell cycle. Our first approach involved producing all the proteins in a bacterial system and performing in vitro kinase assays using both kinase complexes to address whether nutrients (through Pho80) or cell cycle (through Pcl1) were responsible for the phosphorylation process that had been previously described (Ptacek et al., 2005). Our result shows that Pho85-Pcl1, and not Pho85-Pho80, is responsible for in vitro phosphorylation of Gsp1, suggesting that the cell cycle regulates nucleocytoplasmic transport through the CDK Pho85 (Fig. 1A and B). Gsp1 bears a single S/PT (Ser181) that is site-specific for CDK phosphorylation; we directly mutated it to Ala and, according to the result shown in Fig. 1A, in vitro phosphorylation disappears, thus demonstrating that Ser181 is the residue targeted by Pho85-Pcl1 in Gsp1.

To obtain in vivo evidence about Pho85-Pcl1/Gsp1 regulation, we

performed co-immuno-precipitation assays in which Pho85-eGFP was pulled down and Gsp1 presence was determined by an anti-Gsp1-specific antibody. The transient nature of the kinase-substrate physical interaction is well known, and this could be the reason for very low co-precipitation of Gsp1 and Pho85 (Fig. 1C). However, since kinases interact more strongly when their substrates cannot be phosphorylated (Belozherov et al., 2014), we decided to pull down Pho85 in a strain carrying the nonphosphorylatable version of Gsp1. In this experiment, we obtained a clear increase in the pulled-down amount of *gsp1*-S181A (Fig. C), indicating that Gsp1 and Pho85 in vivo interact in *S. cerevisiae*.

### 3.2. The involvement of Gsp1 in the cell cycle

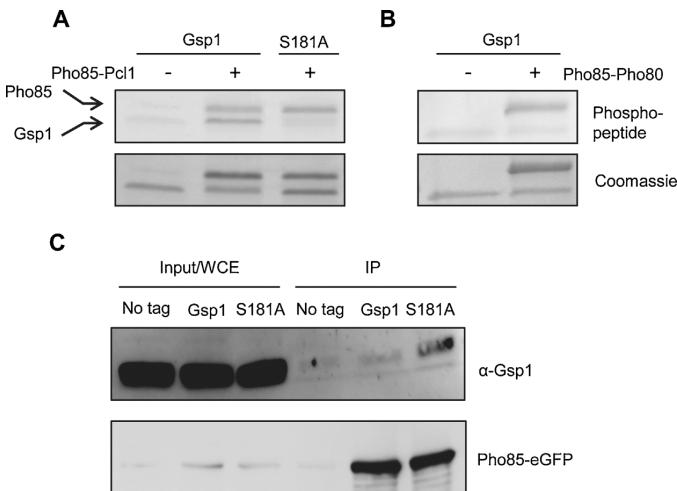
The next question we asked was directed toward understanding the role of Gsp1 in the cell cycle, which was prompted by our biochemical experiments. Since Pho85-Pcl1 is known to play several roles in  $G_1$  progression and  $G_1/S$  transition (Huang et al., 2007; Jimenez et al., 2013a), we decided to synchronize cells bearing a genomic *gsp1*-S181A mutation (see Materials and Methods) at late  $G_1$  by incubating them with alpha-factor. We performed this analysis, and those that followed, in a yeast strain deleted for the orthologue *GSP2* to avoid unexpected interference by the presence of this very similar although non-expressing orthologue. The release of these cells into the cell cycle showed a faster entrance into the S-phase in the mutant strain, which began 40–45 min after release in the nonphosphorylatable *gsp1* cells, while in the wild-type cells the replication began 45–50 min after release, as shown by FACS analysis (Fig. 2A). This impairment in the progression of the cell cycle, while relatively small, was consistent and statistically significant. Fig. 2B shows the quantification of 4 independent experiments.

To confirm that the nonphosphorylatable *gsp1* mutant affects cell cycle progression, we analysed the appearance of the cyclin Clb5, which has been described as a biochemical marker for the  $G_1/S$ -phase transition (Skowyra et al., 1997), by Western blot using specific antibodies. In Fig. 2C we present a representative time course of Clb5 after alpha-factor synchronization and release and the quantification of 4 different Western blot experiments (Fig. 2D), which provides biochemical evidence to support the faster cell cycle progression we found by measuring DNA content by FACS analysis.

To further confirm our cell cycle impairment findings, and to avoid artefacts from the alpha-factor treatment of the cells, we decided to analyse the growth of nonphosphorylatable *gsp1* cells in long-term experiments. We placed exponentially growing cells on a microtiter plate and incubated them with constant shaking and controlled temperature in a spectrophotometer to continuously measure the optical density of the culture and thus measure growth. The resulting data, seen in Fig. 2E, is coherent with the faster progression during the  $G_1/S$ -phase transition we observed, showing that *gsp1*-A181S grows slightly faster and therefore arrives faster to the stationary phase than wild-type strains when both are grown in a liquid culture with constant monitoring of the culture cell density. Interestingly, when monitored for longer periods under these conditions (24 h), the wild-type culture reached a final concentration of  $3.7 \times 10^7$  cells/ml, while the mutant concentration was consistently lower at  $3.3 \times 10^7$  cells/ml.

### 3.3. The subcellular localization of nonphosphorylatable *gsp1*

Gsp1 travels from the cytoplasm to the nucleus and vice versa to assist in the transit of different cargo molecules. To confirm the effect of the S181A mutation in nucleocytoplasmic transport, we investigated the subcellular localization of Gsp1 and *gsp1*-S181A. The importance of the C terminal part of Gsp1 in the functionality of the protein had previously been described (Lee et al., 2005; Nilsson et al., 2001). This was confirmed when we were unable to obtain a viable cell with a C-terminus GFP-tagged Gsp1 (not shown). However, the N terminus tagging of Gsp1 permitted us to follow the in vivo localization and



**Fig. 1.** Gsp1 biochemically interacts with Pho85/Pcl1.

A) and B), *in vitro* kinase assays. Recombinant Pho85 and GST-Pcl1 or GST-Pho80 purified from bacteria was incubated with GST-Gsp1, either with the wild-type or the indicated mutation versions (see Materials and Methods). The arrows indicate the specific proteins. Coomassie staining of the membrane is presented as a load control. B) Coimmunoprecipitation assay. YJJ1117 (pADH-yeGFP-GSP1), YJJ1118 (pADH-yeGFP-gsp1-S181A), and a non-tagged strain, all in the exponential growing phase, underwent protein extraction. The extracts were pull-down using GFP-Trap beads. Whole cell extracts (WCE) show the quantity of Gsp1 and Pho85 used in the assay and IP shows the immuno-precipitated samples. The proteins trapped in the GFP-beads after extensive washing were re-suspended in SDS-PAGE sample buffer, boiled, and electrophoretically separated. Gsp1 was detected by using anti-Gsp1-specific polyclonal antibodies.

dynamics of Gsp1. We took exponentially growing cells and analysed the subcellular localization of yeGFP-Gsp1 by fluorescence microscopy in both wild-type and S181A mutant cells. In both cases, we obtained a signal that was coherent with nuclear localization. By means of *in vivo* video-microscopy assays in alpha-factor-synchronised cells, we did not find any apparent differences in the dynamics of Gsp1 and *gsp1*-S181A (data not shown). But a careful quantification of the GFP intensity signal revealed a lower nuclear amount of *gsp1*-S181A than in the wild-type strain (Fig. 3A) and a higher intensity of the mutant in the cytoplasm (Fig. 3B). It is important to note that according to Western blot analysis, the amount of both proteins, (wild-type and S181A) is roughly the same (Fig. 3C).

#### 3.4. Localization of cargo proteins in the nonphosphorylatable *gsp1* mutant

To determine whether *gsp1*-S181A functionality is affected, we analysed the intensity of the nuclear localization of some well-described cargoes in which nuclear localization depends on Gsp1. To this end, we tagged *WHI5*, *MBP1*, *MIG1* at their genomic loci with eGFP and used a plasmid bearing an NLS (Nuclear Localization Signal) tagged with 4 GFP copies (Fernandez-Cid et al., 2012a). In all cases, we could detect a different intensity in the GFP-tagged proteins when comparing the nonphosphorylatable mutant of Gsp1 and the wild-type strain (Fig. 3D), thus revealing impaired nuclear localization of the cargo and suggesting either difficulties in the cargo entrance or a more efficient cargo export.

#### 3.5. The physical interaction of Gsp1 with the karyopherin Kap95

The experiments described above suggested that the interaction capabilities of Gsp1 wild-type and the nonphosphorylatable mutant may be different and responsible for the altered cargo localization shown in Fig. 4. For this reason, we decided to analyse the *in vitro* binding ability of the *gsp1*-S181A mutant to the karyopherin Kap95, which is needed for the nuclear import of cargoes, as well as its binding ability to Yrb1, one of the proteins involved in the export traffic of cargoes to the cytoplasm. To perform these experiments, all the proteins were produced in *E. coli* bearing the tags needed for attachment to agarose beads, (see Materials and Methods and Fig. 4 legend). Our binding experiments showed a drastic reduction in the ability of non-phosphorylatable *gsp1* to bind with Kap95, while we detected a very similar level of interaction with Yrb1. These results are shown in Fig. 4A and B.

## 4. Discussion

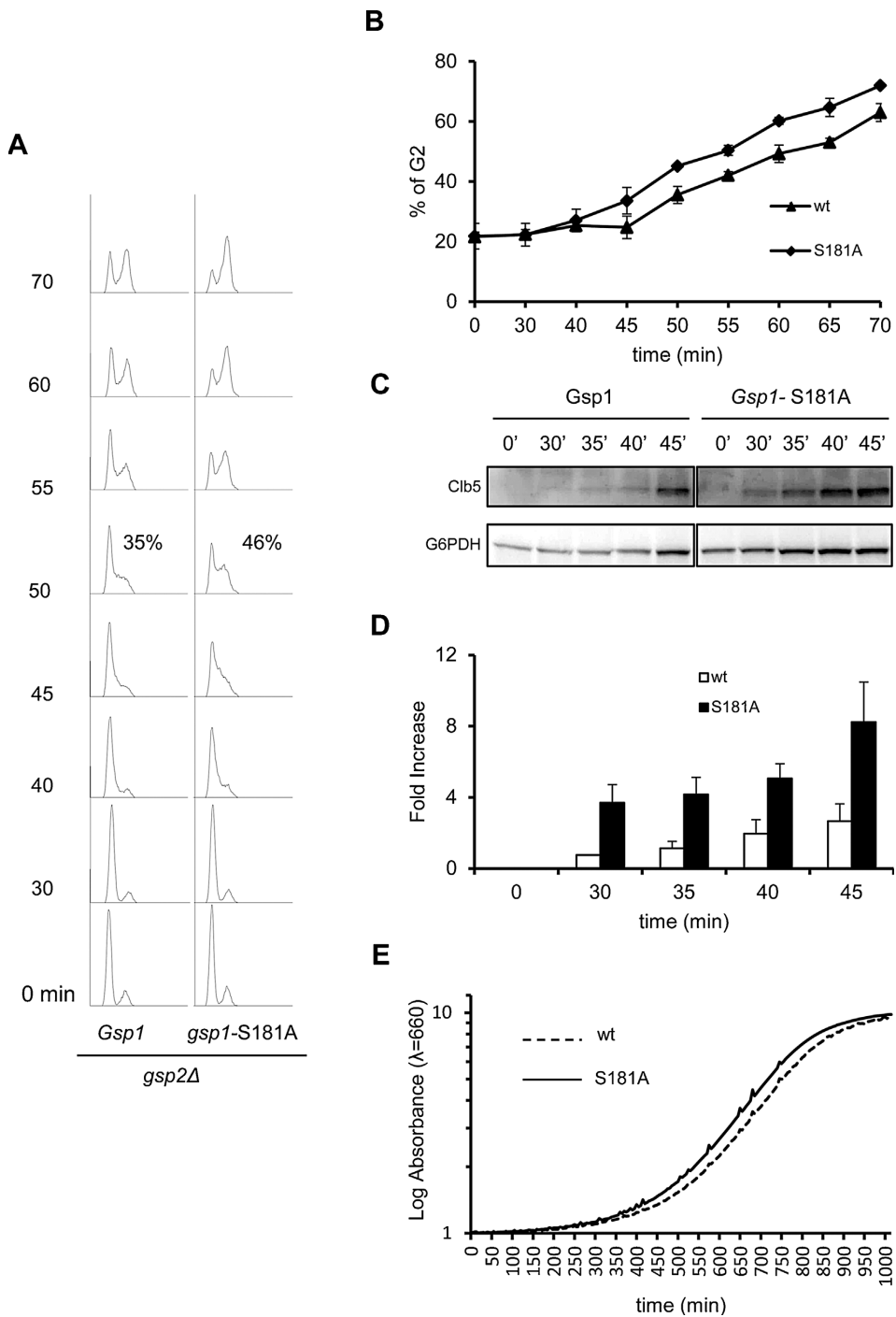
The development of separate compartments for gene expression and protein synthesis in eukaryotic cells, while an evolutionary advantage, has the disadvantage of requiring a tightly controlled system to move molecules in and out of these compartments. However, this aspect gives also room to new possibilities for the regulation of the main cell processes, including signal transduction, gene expression, and cell cycle progression, among many others. The present work adds another piece to the puzzle of the cell cycle and nucleocytoplasmic transport and their intertwined regulation by identifying a biochemical relationship, very probably involving phosphorylation, between a CDK in charge of cell cycle control (Pho85-Pcl1) and the master regulator of in-and-out nuclear transport, Ran-GTPase Gsp1.

#### 4.1. Cell cycle control on transport and vice versa

Our biochemical results suggest that cell cycle machinery controls the nucleocytoplasmic apparatus, and when this control is disturbed it produces an alteration in the amount of at least some of the cargoes. Impairment of the amount of cargoes in the nucleus may be explained by a reduced nuclear amount of Ran-GTPase or impaired interaction with the karyopherin- $\beta$  (importin- $\beta$ ) Kap95. Our binding assays support the latter; *gsp1*-S181A was shown to barely bind to Kap95. Although we do not know the extent of this effect in a physiological context, phenotypic analysis of the nonphosphorylatable *gsp1* mutant showed a defect in cell cycle progression, suggesting that nucleocytoplasmic transport has some control over the cell cycle. The 2 possibilities are not mutually exclusive and may suggest a close interaction between the 2 processes. It is important to note that cell cycle machinery affects traffic, including traffic of cell cycle regulators such as the transcription factors Swi4 and Swe6, and the repressor Whi5.

#### 4.2. The cell cycle is faster in nonphosphorylatable *gsp1*

All phenotypic analysis carried out in our study clearly demonstrates that *gsp1*-S181A mutant cells proceed faster through G<sub>1</sub>/S-phase. Two possibilities could explain this: on one hand, impaired transport may tamper with a checkpoint mechanism in charge of the quality control of G<sub>1</sub>/S-phase processes, including START, while on the other hand, the altered localization of cell cycle repressors such as Whi5 allows for an unscheduled entry into S-phase. In both cases, one might expect that this faster cycling would produce viability problems in the

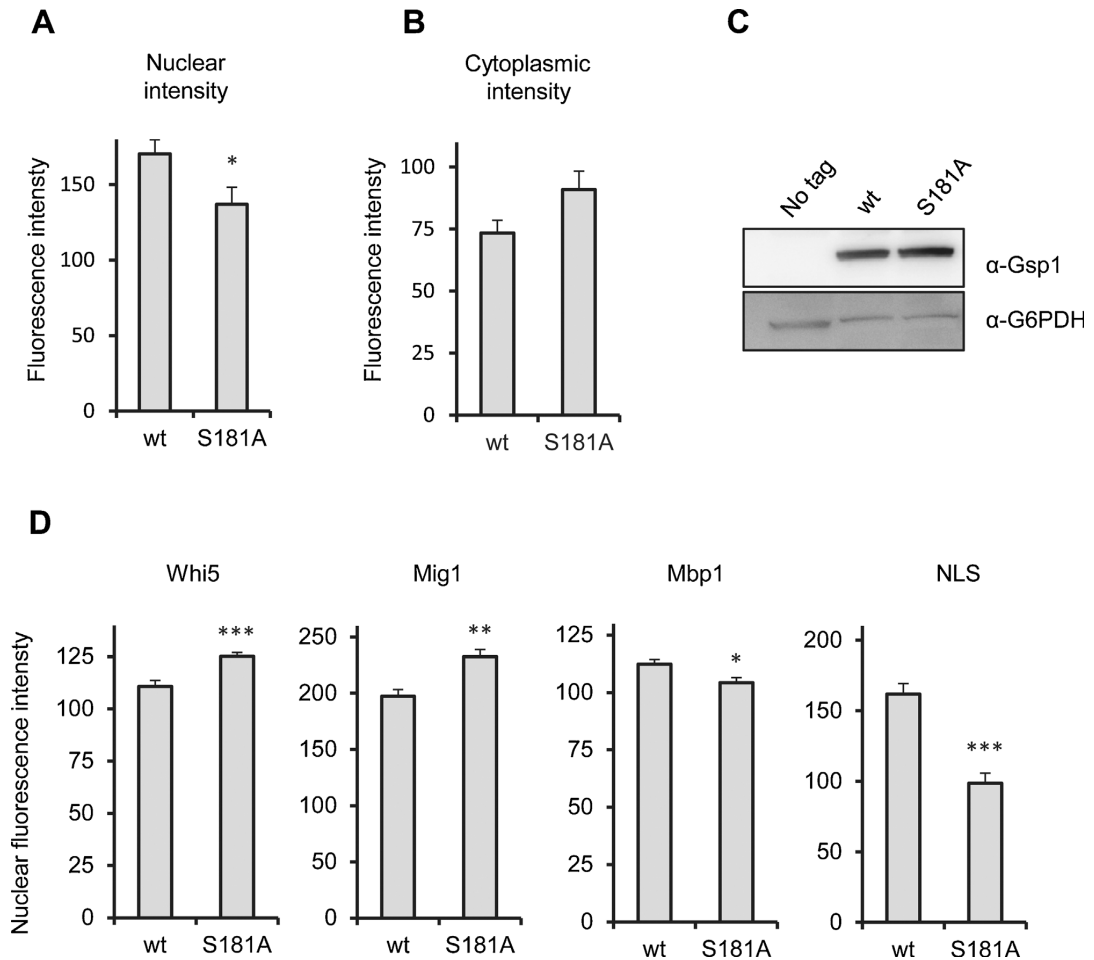


(caption on next page)



**Fig. 2.** Cell cycle progression and the culture behaviour of *gsp1*-S181A mutant cells.

A) Cell cycle progression of YJJ1091 (wild-type) and YJJ1092 (*gsp1*-S181A), both in a *gsp2Δ* background. Wild-type and *gsp1* mutant cells were synchronized in G<sub>1</sub> using alpha-factor and released in YPD medium at 30 °C. Samples were taken at the indicated times and processed to measure DNA content by FACS analysis. The proportion of 2n cells is indicated in the relevant time point. B) Quantification of 2n DNA content cells. The amount of 2n cells for each time point was calculated using WinMDI free software. The quantification of 4 independent experiments is shown (mean ± SEM). C) Clb5 protein amount in YJJ1091 (wild-type) and YJJ1092 (*gsp1*-S181A). Cells were treated as in A). Aliquots were taken at the indicated times and proteins were extracted for PAGE-SDS and immunoblotting using specific anti-Clb5 antibodies. D) The quantification of 4 independent experiments, like that of C), is shown (mean ± SEM). Protein amount was normalized using G6PDH and standardized to the amount of protein in the wild-type strain at time 0. E) YJJ1091 (wild-type) and YJJ1092 (*gsp1*-S181A) strains were grown in YPD medium overnight, diluted to OD<sub>660nm</sub> = 0.01, and followed for 24 h at 30 °C and when agitated in a spectrophotometer to continuously measure culture cell density. The mean result of 3 independent experiments is shown. Note that the large number of time points makes error bar representation impossible.



**Fig. 3.** Subcellular localization of *gsp1*-S181A and different cargoes.

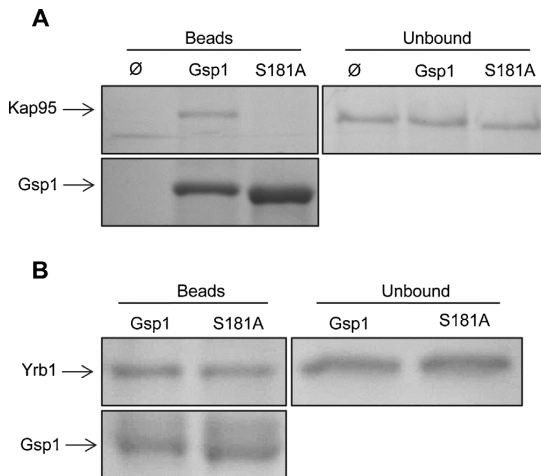
A and B) YJJ1117 (*pADH-yeGFP-GSP1*) and YJJ1118 (*pADH-yeGFP-gsp1*-S181A) strains were grown in SD at 30 °C. After 3 h of growth in the exponential phase, the nuclear and cytoplasmic GFP signal intensity was measured using the NIS-Elements software. The quantification of more than 100 cells obtained from 3 independent experiments is shown (mean ± SEM). The asterisk indicates a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ). C) Cell extracts from YJJ1117 (*pADH-yeGFP-GSP1*), YJJ1118 (*pADH-yeGFP-gsp1*-S181A), and a no-tag strain were grown as described in A), with the exception that YPD was used. After 3 h of exponential growth, the protein concentration was assessed by immunoblotting. D) Nuclear intensity of the indicated proteins in YJJ1091 (*GSP1* wild-type) and YJJ1092 (*gsp1*-S181A) strains. Cells were treated and analysed as in A). At least 100 cells from 3 independent experiments were quantified (mean ± SEM). In all cases the GFP tagging was in the genomic (see Table 1) locus except for the NLS in which YJJ1091 (*GSP1* wild-type) and YJJ1092 (*gsp1*-S181A) were transformed with the pFT043 plasmid bearing a NLS-4GFP sequence. The asterisks indicate a statistically significant difference ( $p < 0.05$ , 0.01, and 0.001).

long term. Indeed, we detected a repetitive and consistent reduction in cellular density during the stationary phase in the nonphosphorylatable mutant that may have been a reflection of cell cycle impairment. Other explanations are possible, like for example metabolic difficulties during the stationary phase. It is worth mentioning that nucleocytoplasmic transport is essential for the proper movement of energy metabolism regulators such as Mig1 and Mig2, which are involved in the repression

of galactose metabolism genes in the presence of glucose (Fernandez-Cid et al., 2012a; Fernandez-Cid et al., 2012b).

#### 4.3. Ser181: an important residue for *Gsp1*/*Kap95* interaction

Our binding results point to the residue Ser181 as a participant in the modulation of the interaction between *Gsp1* and the importin β



**Fig. 4.** In vitro binding assays of Gsp1 and *gsp1*-S181A with Kap95 and Yrb1. A) GST-Gsp1, GST-*gsp1*-S181A proteins, and 6xHis-Kap95 purified from bacteria. The GST tag proteins were kept attached to glutathione agarose beads and incubated for 1 h at 30 °C with Kap95 before washing 3 times. The attached proteins were eluted by adding PAGE-SDS sample buffer and boiling for 5 min. The proteins were electrophoretically separated and stained using Coomassie. Gsp1 (lower panel) is shown as a loading control. The input amount of Kap95 is shown in B) (left panel), which used the same approach as in A) but involved 6xHis-Yrb1 and 6xHis-Xpo1 (Xpo1 was included in the assay because it is important in the Gsp1-Yrb1 complex formation). Gsp1 (lower panel) is presented as a loading control.

Kap95. Mimicking mammalian Ran/Kap95 interaction, the yeast Gsp1 could produce the key salt bridge interactions between Arg29 and Asn154, or the hydrogen bonding interaction between Lys37 and 152, with the C-terminal domain of Kap95. The presence of a serine residue in position 181 of Gsp1 could produce another hydrogen bond, not yet described, that may be playing an important interactive role together with Kap95. In this context, the Stewart group (Lee et al., 2005; Stewart, 2007) has described mutations Lys37Asp/Lys152Asp or Gln69Lys, finding them not sufficient to displace Kap95 from Gsp1. Therefore, Gsp1 Ser181 may be responsible for the previously predicted additional hydrogen bond interaction which, when phosphorylated, increases the disassociation rate of the complex. Such a role would represent a putative cornerstone in the regulation of Gsp1-Kap95 interaction, and thus in nuclear in-and-out cargo traffic. The evidence obtained from our in vitro binding experiments is limited, however, and could lead to overestimating physiological conditions. Further research must be carried out to confirm this hypothesis. In future, binding experiments should be performed in conjunction with the already known mutations of Gsp1 involved in Kap95 interaction in order to determine what residues are essential to this synergy.

Ser181 is not conserved in the human Ran-GTPase, although the homology between Gsp1 and Ran is very high (83% at amino acid level); we might argue that this is due to the complexity of the CDK family in mammalian cells, which is vast when compared to yeast (Malumbres, 2014). This suggests different regulation mechanisms in different types of organisms. Interestingly, however, the same Ser181 residue is conserved in another mammalian small GTPase, Q/Rab30, which is involved in the intracellular membrane trafficking (Kelly et al., 2012). This opens up the question of whether this function may also be controlled by cell cycle machinery in metazoans.

The present study is not the first report describing the role of the karyopherin Kap95 in cell cycle progression; Kap95 has been shown to be involved in the nuclear localization of the cell-cycle-related transcription factors Swi4 and Swi6 (Taberner and Igual, 2010).

#### 4.4. A model for Pho85-Gsp1 interaction

Our collected data suggest that the CDK Pho85-Pcl1 involved in the cell cycle biochemically regulates the Ran GTPase Gsp1. According to our results, this phosphorylation may serve as the fine-tuning mechanism necessary for the correct nuclear localization of Gsp1 as well as several other cargoes involved in cell cycle progression, an effect that is mediated by interaction with the importin- $\beta$  Kap95. We propose that alterations in the nucleocytoplasmic transport of cell cycle regulators may be responsible for the cell cycle impairment we observed in cells that do not have this regulation system. In other words, to phosphorylate Gsp1 during G1/S-phase transition, it is important for the cells to have sufficient time to obtain appropriate levels of cell cycle regulators in the appropriate subcellular location. While it is true that the effect of this mutation in laboratory conditions is subtle, research carried out in physiological situations will lead to a clearer picture of its role.

#### Acknowledgements

We thank all the members of the lab for their continuous support and scientific contributions, especially M. Pérez for technical assistance, Dr P. Belhumeur for strains, and F. Moreno for the plasmid GFP-NLS. This work was made possible by a UIC grant to O.M. and a grant from the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) project in Spain (ref. BFU 2013-44189-P) awarded to J.C.

#### References

- Akhtar, N., Hagan, H., Lopilato, J.E., Corbett, A.H., 2001. Functional analysis of the yeast Ran exchange factor Prp20p: in vivo evidence for the RanGTP gradient model. *Mol. Genet. Genomics* 265, 851–864.
- Andrews, B., Measday, V., 1998. The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea. *Trends Genet.* 14, 66–72.
- Becker, J., Melchior, F., Gerke, V., Bischoff, F.R., Ponstingl, H., Wittinghofer, A., 1995. RNA1 encodes a GTPase-activating protein specific for Gsp1p, the Ran/TC4 homologue of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 270, 11860–11865.
- Belhumeur, P., Lee, A., Tam, R., DiPaolo, T., Fortin, N., Clark, M.W., 1993. GSP1 and GSP2, genetic suppressors of the prp 20-1 mutant in *Saccharomyces cerevisiae*: GTP-binding proteins involved in the maintenance of nuclear organization. *Mol. Cell. Biol.* 13, 2152–2161.
- Belozorov, V.E., Ratkovic, S., McNeill, H., Hilliker, A.J., McDermott, J.C., 2014. In vivo interaction proteomics reveal a novel p38 mitogen-activated protein kinase/Rack1 pathway regulating proteostasis in *Drosophila* muscle. *Mol. Cell. Biol.* 34, 474–484.
- Berben, G., Dumont, J., Gilliquet, V., Bolle, P.A., Hilger, F., 1991. The YDp plasmids: a uniform set of vectors bearing versatile gene disruption cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7, 475–477.
- Chook, Y.M., Blobel, G., 2001. Karyopherins and nuclear import. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 703–715.
- Chook, Y.M., Suel, K.E., 2011. Nuclear import by karyopherin-betas: recognition and inhibition. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 1593–1606.
- Clement, M., Deshaies, F., de Repentigny, L., Belhumeur, P., 2006. The nuclear GTPase Gsp1p can affect proper telomeric function through the Sir4 protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 62, 453–468.
- Conti, E., Izaurralde, E., 2001. Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 310–319.
- Conti, E., Muller, C.W., Stewart, M., 2006. Karyopherin flexibility in nucleocytoplasmic transport. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 237–244.
- Costanzo, M., Nishikawa, J.L., Tang, X., Millman, J.S., Schub, O., Breitkreuz, K., Dewar, D., Rupes, I., Andrews, B., Tyers, M., 2004. CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast. *Cell* 117, 899–913.
- Coudreuse, D., Nurse, P., 2010. Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. *Nature* 468, 1074–1079.
- Espinosa, F.H., Ogas, J., Herskowitz, I., Morgan, D.O., 1994. Cell cycle control by a complex of the cyclin HCS26 (PCL1) and the kinase PHO85. *Science* 266, 1388–1391.
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D., 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.
- Fernandez-Cid, A., Riera, A., Herrero, P., Moreno, F., 2012a. Glucose levels regulate the nucleocytoplasmic distribution of Mig2. *Mitochondrion* 12, 370–380.
- Fernandez-Cid, A., Vega, M., Herrero, P., Moreno, F., 2012b. Yeast importin-beta is required for nuclear import of the Mig2 repressor. *BMC Cell Biol.* 13 (31–2121-13-31).
- Forwood, J.K., Lange, A., Zachariae, U., Marfori, M., Preast, C., Grubmüller, H., Stewart, M., Corbett, A.H., Kobe, B., 2010. Quantitative structural analysis of importin-beta flexibility: paradigm for solenoid protein structures. *Structure* 18, 1171–1183.
- Gorlich, D., Kutay, U., 1999. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 607–660.
- Gorlich, D., Prehn, S., Laskey, R.A., Hartmann, E., 1994. Isolation of a protein that is



- essential for the first step of nuclear protein import. *Cell* 79, 767–778.
- Haase, S.B., Reed, S.I., 2002. Improved flow cytometric analysis of the budding yeast cell cycle. *Cell Cycle* 1, 132–136.
- Hernandez-Ortega, S., Bru, S., Ricco, N., Ramirez, S., Casals, N., Jimenez, J., Isasa, M., Crosas, B., Clotet, J., 2012. Defective in mitotic arrest 1 (Dma1) ubiquitin ligase controls G1 cyclin degradation. *J. Biol. Chem.* 288 (7), 4704–4714.
- Huang, D., Friesen, H., Andrews, B., 2007. Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast. *Mol. Microbiol.* 66, 303–314.
- Hydbring, P., Malumbres, M., Sicinski, P., 2016. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 280–292.
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., Knop, M., 2004. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21, 947–962.
- Jimenez, J., Ricco, N., Grijota-Martinez, C., Fado, R., Clotet, J., 2013a. Redundancy or specificity? The role of the CDK Pho85 in cell cycle control. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 4, 140–149.
- Jimenez, J., Truman, A.W., Menoyo, S., Kron, S.J., Clotet, J., 2013b. The yin and yang of cyclin control by nutrients. *Cell Cycle* 12, 865–866.
- Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D., Smith, A.E., 1984. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39, 499–509.
- Kelly, E.E., Giordano, F., Horgan, C.P., Jollivet, F., Raposo, G., McCaffrey, M.W., 2012. Rab30 is required for the morphological integrity of the Golgi apparatus. *Biol. Cell.* 104, 84–101.
- Kobayashi, J., Matsuura, Y., 2013. Structural basis for cell-cycle-dependent nuclear import mediated by the karyopherin Kap121p. *J. Mol. Biol.* 425, 1852–1868.
- Koch, C., Moll, T., Neuberg, M., Ahorn, H., Nasmyth, K., 1993. A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G1 to S phase. *Science* 261, 1551–1557.
- Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M., Yanagawa, H., 2009. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 10171–10176.
- Lange, A., Mills, R.E., Lange, C.J., Stewart, M., Devine, S.E., Corbett, A.H., 2007. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J. Biol. Chem.* 282, 5101–5105.
- Lee, S.J., Matsuura, Y., Liu, S.M., Stewart, M., 2005. Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP. *Nature* 435, 693–696.
- Lee, Y.S., Huang, K., Quiocho, F.A., O'Shea, E.K., 2008. Molecular basis of cyclin-CDK-CKI regulation by reversible binding of an inositol pyrophosphate. *Nat. Chem. Biol.* 4, 25–32.
- Madrid, A.S., Weis, K., 2006. Nuclear transport is becoming crystal clear. *Chromosoma* 115, 98–109.
- Malumbres, M., 2014. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* 15, 122.
- Menoyo, S., Ricco, N., Bru, S., Hernandez-Ortega, S., Escote, X., Aldea, M., Clotet, J., 2013. Phosphate-activated CDK stabilizes G1 cyclin to trigger cell cycle entry. *Mol. Cell Biol.* 33 (7), 1273–1284.
- Mosammaparast, N., Pemberton, L.F., 2004. Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends Cell Biol.* 14, 547–556.
- Nachury, M.V., Weis, K., 1999. The direction of transport through the nuclear pore can be inverted. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 9622–9627.
- Nilsson, J., Askjaer, P., Kjems, J., 2001. A role for the basic patch and the C terminus of RanGTP in regulating the dynamic interactions with importin beta, CRM1 and RanBP1. *J. Mol. Biol.* 305, 231–243.
- Nurse, P., Bissett, Y., 1981. Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature* 292, 558–560.
- Nurse, P., 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344, 503–508.
- Oki, M., Nishimoto, T., 1998. A protein required for nuclear-protein import, Mog1p, directly interacts with GTP-Gsp1p, the *Saccharomyces cerevisiae* ran homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15388–15393.
- Oki, M., Nishimoto, T., 2000. Yrb1p interaction with the gsp1p C terminus blocks Mog1p stimulation of GTP release from Gsp1p. *J. Biol. Chem.* 275, 32894–32900.
- Ouspenski, I.I., Elledge, S.J., Brinkley, B.R., 1999. New yeast genes important for chromosome integrity and segregation identified by dosage effects on genome stability. *Nucleic Acids Res.* 27, 3001–3008.
- Pemberton, L.F., Paschal, B.M., 2005. Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic* 6, 187–198.
- Pines, J., Hunt, T., 1987. Molecular cloning and characterization of the mRNA for cyclin from sea urchin eggs. *EMBO J.* 6, 2987–2995.
- Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., Guo, H., Jona, G., Breitkreutz, A., Sopko, R., McCartney, R.R., Schmidt, M.C., Rachidi, N., Lee, S.J., Mah, A.S., Meng, L., Stark, M.J., Stern, D.F., De Virgilio, C., Tyers, M., Andrews, B., Gerstein, M., Schweitzer, B., Predki, P.F., Snyder, M., 2005. Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* 438, 679–684.
- Radu, A., Blobel, G., Moore, M.S., 1995. Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 1769–1773.
- Reed, S.I., Wittenberg, C., 1990. Mitotic role for the Cdc28 protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 5697–5701.
- Reed, S.I., Hadwiger, J.A., Lorince, A.T., 1985. Protein kinase activity associated with the product of the yeast cell division cycle gene CDC28. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 4055–4059.
- Schneider, K.R., Smith, R.L., O'Shea, E.K., 1994. Phosphate-regulated inactivation of the kinase PHO80-PHO85 by the CDK inhibitor PHO81. *Science* 266, 122–126.
- Skowyra, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J., Harper, J.W., 1997. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 91, 209–219.
- Sopko, R., Huang, D., Preston, N., Chua, G., Papp, B., Kafadar, K., Snyder, M., Oliver, S.G., Cyert, M., Hughes, T.R., Boone, C., Andrews, B., 2006. Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression. *Mol. Cell* 21, 319–330.
- Stade, K., Ford, C.S., Guthrie, C., Weis, K., 1997. Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* 90, 1041–1050.
- Standart, N., Minshull, J., Pines, J., Hunt, T., 1987. Cyclin synthesis, modification and destruction during meiotic maturation of the starfish oocyte. *Dev. Biol.* 124, 248–258.
- Stern, B., Nurse, P., 1996. A quantitative model for the cdc2 cycle of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genet.* 12, 345–350.
- Stevenson, L.F., Kennedy, B.K., Harlow, E., 2001. A large-scale overexpression screen in *Saccharomyces cerevisiae* identifies previously uncharacterized cell cycle genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3946–3951.
- Stewart, M., 2007. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 195–208.
- Swaffler, M.P., Jones, A.W., Flynn, H.R., Snijders, A.P., Nurse, P., 2016. CDK substrate phosphorylation and ordering the cell cycle. *Cell* 167, 1750–1761 (e16).
- Swenson, K.L., Farrell, K.M., Ruderman, J.V., 1986. The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell* 47, 861–870.
- Taberner, F.J., Igual, J.C., 2010. Yeast karyopherin Kap95 is required for cell cycle progression at Start. *BMC Cell Biol.* 11 (47–2121-11-47).
- Taberner, F.J., Quilis, I., Igual, J.C., 2009. Spatial regulation of the start repressor Whi5. *Cell Cycle* 8, 3010–3018.
- Thomas, B.J., Rothstein, R., 1989. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* 56 (4), 619–630.
- Truman, A.W., Kristjansdottir, K., Wolfgeher, D., Hasin, N., Polier, S., Zhang, H., Perrett, S., Prodromou, C., Jones, G.W., Kron, S.J., 2012. CDK-dependent Hsp70 phosphorylation controls G1 cyclin abundance and cell-cycle progression. *Cell* 151, 1308–1318.
- Vijayraghavan, U., Company, M., Abelson, J., 1989. Isolation and characterization of pre-mRNA splicing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 3, 1206–1216.
- Weis, K., 2003. Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* 112, 441–451.
- Yaakov, G., Duch, A., Garcia-Rubio, M., Clotet, J., Jimenez, J., Aguilera, A., Posas, F., 2009. The stress-activated protein kinase Hog1 mediates S phase delay in response to osmotic stress. *Mol. Biol. Cell* 20, 3572–3582.

