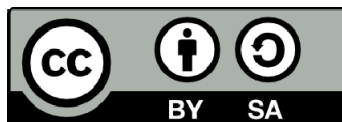




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Regulació i funció en resposta a diferents tipus d'estrès de la CaMKK Ckk2

Edgar Martin Ramos



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartigual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartigual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0. Spain License.**

Programa de Doctorat en Biomedicina



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Regulació i funció en resposta a diferents tipus d'estrès de la CaMKK Ckk2

Tesi presentada per
Edgar Martin Ramos

Per optar al grau de
Doctor en Biomedicina

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció de la Dra. **Rosa Aligué Alemany**, en el Departament de Biomedicina de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat de Barcelona.

Barcelona, Abril 2021

A les dones de la meva vida,
Ariadna, el meu amor,
Tina, la meva mare,
Núria, la meva àvia,
I Gala, el meu futur.

Agraïments

Durant aquesta tesi m'han passat moltes coses, a mi i a tothom. En aquests quatre anys i poc he pogut marxar de casa i m'he mudat dues vegades. També ha sigut la tesi de la diabetis, ja que se'm va diagnosticar cap al segon any, amb el canvi de l'estil de vida que he hagut de fer com a conseqüència de la malaltia mentre feia la tesi i una mica l'estrès i la psicosi que comporta mantenir els nivells de sucre a la sang en uns intervals estables. Més endavant va aparèixer el coronavirus, amb els dos mesos que vam estar tancats a casa, que aparentment he passat cap símptoma greu; i per acabar, l'embaràs que va coincidir amb l'escriptura de la tesi. Per mi tot això m'ha suposat una càrrega mental important que crec que potser s'ha vist reflectida en la meva actitud i les meves relacions personals. Al final del dia sempre penso que hi ha molta gent que ho ha passat o està pitjor que jo, i no hi ha cap justificació per la meva actitud, pel que crec que primer de tot és millor demanar disculpes abans d'agrair a tota la gent que heu estat al meu costat. És complicat reconèixer en un text el paper de les persones a les que tinc que agrair que m'hagin donat suport, no parlo ja durant la tesi, si no en la vida en general, perquè moltes vegades, les paraules no li fan justícia. Intentaré en aquest text, transmetre la meva gratitud a totes les persones possibles i espero no oblidar-me de ningú.

En primer lloc m'agradaria agrair a la gent que hi ha al laboratori 31. A Rosa, vull agrair-li que hagi dipositat la seva confiança en mi per dur a terme el projecte de tesi. Que m'hagis escollit m'ha permès incrementar la meva maduresa científica com personal, m'has donat la oportunitat de participar en diferents congressos científics i fins i tot, travessar l'Atlàntic per aprendre lo que més m'agrada, que és més ciència. També m'has donat el teu suport per realitzar la tesi, m'has permès formular-te les meves teories i hem mantingut discussions molt constructives. Espero que amb aquesta tesi t'hagi pogut retornar la confiança dipositada.

Julia, el primer día que nos conocimos ya me di cuenta que somos unos personajes bastante curiosos. A pesar de eso, nos hemos llevado de puta madre y nos hemos amoldado cada uno a nuestras personalidades. Se que mi orden en el caos te ponía muy nerviosa y agradezco que hayas puesto tu TOC al lado (dato divertido: de pequeño me llevaron al psicólogo porque era demasiado ordenado, ahí me rompieron, *sorry*). Que sepas que admiro mucho tu capacidad para meterte en un sitio y encajar en menos de cinco minutos (para mí eso es imposible) y tu perseverancia cuando te propones algo. Por eso, estoy seguro que vas a conseguir todo lo que quieras y más, y vas a llegar súper lejos.

Me lo he pasado muy bien en el laboratorio y he trabajado con gente espectacular. Debo agradecer a Laura que haya trabajado conmigo y me haya intentado ayudar a desarrollar la tesis. Tu ayuda me permitió superar un escollo muy importante. Hemos hecho muchas tertulias en las que hemos hablado con Rodrigo y Julia sobre muchos temas, algunos espinosos y otros políticos, y lo hemos pasado genial. También he disfrutado mucho con Carla, con su contagioso optimismo y con la que hemos jugado a juegos como el de Marvel un porrón de horas. Y Jon, que, aunque no participaras mucho en estas cosas, en los pequeños ratos que podías dedicar cada día nos hemos divertido. Sois la ostia y llegaréis muy lejos.

Tampoc aquest bon ambient del laboratori hauria sigut possible sense en Ramon, la Judit i la Tula. Gràcies a tots tres per mostrar un ambient de treball sa i dinàmic. També agraeixo a la Tula tot el treball que ha fet que ha donat base a la meva tesi i els consells que m'ha donat aquests quatre anys. La convivència amb el seu grup i amb el grup de la Xus i l'Oriol ha sigut genial. Ha sigut bo conèixer també a l'Eduarne i la Serena. I també vull agrair una de les feines més importants del laboratori, que és la d'assegurar-se que tot rutlla i no falta de res, i que la feia Sara de manera perfecta. Voldria mencionar també al Toni, Jose Àngel i Gemma, que, tot

i que van venir més tard, van rejuvenir el laboratori i van aportar nous projectes i noves ganes.

Gràcies a la tesi, he compartit laboratori amb estudiants de treball de fi de grau o màster, i els he d'agrair les experiències que m'han aportat: Lluc (el meu àrbitre preferit), Joel, Lavinia, Lucía, Jandro. Tinc un record també pels estudiants dels quals vaig dirigir (espero que bé) treballs dirigits o de fi de grau, gràcies a vosaltres vaig aprendre coses sobre mi de les que no em creia capaç i espero que vosaltres hagueu après coses de mi també. Us ho agraijo, Júlia, Mònica i Gerard. Per últim, vull agrair a les "secres", la Núria, la Carme i la Mercè, per encarregar-se de tots els tràmits administratius i resoldre tots els problemes burocràtics que en passaven.

Durant la meva formació universitària he conegut una gran quantitat de gent. Puc afirmar que la època universitària ha sigut probablement l'època en la que m'ho he passat millor en la vida. Fent Genètica vaig conèixer l'Albert, l'Adri, el Fran, el Joan, el Miquel i el Víctor i vam fer molta pinya. Vam muntar un grup de WhatsApp que encara fem servir com locos i ens hem anomenat de 50 maneres diferents, de safranories roïnes a corckscrews, fins a Cangrejos de Rio, tots sorgits d'anècdotes divertides que hem passat junts. La veritat es que hem compartit molt de temps junts; hem jugat a videojocs fins a les tantes de la matinada mentre xerràvem pels auriculars i hem fet coses junts que ens han permès crear records espectaculars. Guardo aquests records amb orgull i amb un somriure. He de reconèixer també a la gent que vaig conèixer al màster en la meva estada de pràctiques, a en Pep i a la Rosi, persones de les que més vaig aprendre en tota la meva formació.

Vull deixar un pensament per la gent amb la que he mantingut amistat amb el llarg del temps. Amistats que duren des de l'institut com la del Diego o l'Ana, que ens han acompanyat tots aquests anys. Amb el Diego

he compartit institut, universitat i més endavant, li he donat classe encara que sigui de pràctiques. Qué loca es la vida.

Després vull parlar de la meva família. Als meus pares els hi dec ser com soc, en les coses que vam fer quan estaven junts i en les que vam fer quan estaven separats. El meu pare va ser dels primers que em va voler estimular intel·lectualment, aprofitant l'hora del bany per ensenyar-me les lletres i paraules amb cartolines i dibuixets que ell muntava; també em va ensenyar les taules de multiplicar abans que les aprenguéssim a classe. Un cop els meus pares es van separar, vam començar a viure la mare i jo amb la meva àvia. Ens va donar un sostre i ens va permetre a mi i a la meva mare reconstruir les nostres vides. La meva mare torna a ser feliç gràcies a en Jaume, que ja és un més de la família. Estic molt content per ella perquè es qui més ha posat en educar-me i en treure'm endavant. Ha passat molts anys amb moltes dificultats per poder donar-me la possibilitat de poder dedicar-me sense distraccions a estudiar. I fins aquí he arribat, amb el doctorat. T'estimo mama.

Para acabar tengo que hablar de mi pareja, mi compañera de viaje, Ariadna. Ya llevamos más de 10 años juntos y creo que esta unión nos ha hecho mejorar como personas. Te quiero agradecer que te hayas mantenido a mi lado en las buenas y en las malas. Hemos pasado miles de cosas juntos y hemos compartido momentos mágicos. Me gustaría haber disfrutado todos los momentos del embarazo contigo y debido al COVID y a la tesis no he estado por ti todo lo que debería haber estado, te agradezco que hayas tenido la comprensión en esos momentos que seguro fueron duros para ti. Ahora acabo un proyecto personal importante para mí y no sé lo que me depara el futuro. Lo que sí sé es que ahora vamos a empezar un proyecto compartido que será mucho más importante que lo que hayamos hecho hasta ahora, que es el de educar a Gala. Me hace mucha ilusión que me hayas elegido como compañero y ahora como padre. Para mi eres la única persona con la que compartiría este trozo de

vida. Seguro que nos saldrá una niña genial. Os quiero mucho, Ariadna y Gala.

Y de nuevo, MUCHAS GRACIAS A TODOS.

Edgar Martin Ramos

Índex

Introducció.....	1
1. Homeòstasi del calci.....	1
2. Proteïnes quinasa dependents de calci-calmodulina.....	5
2.1. CAMKK.....	7
2.2. Substrats de la CaMKK.....	10
2.3. CaMKK/CaMKI/CaMKIV i càncer.....	17
3. Integració de senyals nutricionals.....	18
3.1. mTOR.....	18
3.2. PKA.....	23
3.3. EIF3.....	24
4. Schizosaccharomyces pombe: el model.....	26
4.1. <i>S. pombe</i> : CaMK(K).....	28
5. Deprivació nutricional a <i>S. pombe</i>	34
5.1. El complex TOR (TORC).....	36
5.2. El complex PKA.....	49
5.3. eIF3e/Int6.....	59
Antecedents de la quinasa Ckk2.....	62
Objectius.....	69
Material i mètodes.....	73
1. Material i mètodes de <i>S. pombe</i>	73
1.1. Soques utilitzades.....	73
1.2. Medis i condicions de cultiu.....	74
1.3. Transformació.....	77
1.4. Integració de productes de PCR.....	78
1.5. Creuament de soques i assaig de diferenciació.....	79
1.6. Tractaments d'estrès i deprivació.....	79
1.7. Sobre-expressió.....	80
1.8. Assaig de sensibilitat.....	80
1.9. Assaig de supervivència.....	81
2. Material i mètodes d' <i>E. coli</i>	82
2.1. Medis i condicions de cultiu.....	82
2.2. Transformació.....	82

3.	Tècniques de manipulació de DNA	83
3.1.	Aïllament del DNA plasmídic	83
3.2.	PCR.....	83
3.3.	Clonatge	85
3.4.	Mutagènesi	85
3.5.	Electroforesi de DNA	86
3.6.	Purificació de fragments de DNA	86
3.7.	Plasmidis utilitzats	87
3.8.	Oligonucleòtids utilitzats	87
4.	Tècniques de manipulació de proteïnes	88
4.1.	Extracció de proteïnes	88
4.2.	Quantificació de proteïnes.	90
4.3.	Electroforesis de proteïnes en condicions desnaturalizants.	90
4.4.	Western Blot	92
4.5.	Tinció amb blau de Coomassie	93
4.6.	Immunoprecipitació.....	94
4.7.	Anticossos.....	94
5.	Creació d'una proteïna Ckk2 analog-sensitive	94
5.1.	Quinases analog-sensitive (as).	94
5.2.	Expressió i purificació de proteïnes <i>in vitro</i>	96
5.3.	Assaig quinasa <i>in vitro</i>	98
6.	Tècniques de manipulació de RNA	99
6.1.	Extracció de RNA.	99
6.2.	Retrotranscripció.....	99
6.3.	Real-Time PCR (PCR quantitativa, qPCR).....	100
7.	Microscopi.	101
7.1.	Presca d'imatges.	101
7.2.	Anàlisi d'imatges.....	101
8.	Anàlisi de dades.....	101
	Resultats.....	105
1.	Funció i regulació de la Ckk2 en resposta a estrès nutricional. .	105
1.1.	Anàlisi de la funció de Ckk2 en resposta a estrès nutricional.	105

1.2.	Estudi de la via Ckk2-Cmk1 en resposta a diferents tipus d'estrès.	109
1.3.	Estudi de sumoilació de ckk2.	111
1.4.	Estudi de l'expressió de <i>ckk2</i>	115
1.5.	Els nivells de Ckk2 en deprivació de nitrogen estan regulats per Gaf1.	117
1.6.	Ckk2 és inhibida en condicions normals per TORC1.	118
1.7.	L'expressió de Ckk2 quan TORC1 està inhibida està regulada per Gaf1.	120
1.8.	Ckk2 també està regulada negativament per TORC2.	121
1.9.	Interacció genètica entre Ckk2 i TORC.	122
2.	Identificació de substrats de Ckk2.	123
2.1.	Cgs1/Pka1	123
2.2.	Int6	134
2.3.	Gad8	139
3.	Nou anàlisi de substrats de la quinasa Ckk2.	145
3.1.	Identificació dels substrats de Ckk2 activada pel calci.	145
3.2.	Identificació dels substrats de Ckk2 en resposta a la deprivació de nitrogen.	147
3.3.	Identificació dels substrats de Ckk2 sense estrès.	148
3.4.	Anàlisi dels residus identificats en l'assaig de fosfoproteòmica en els substrats estudiats.	149
4.	Ckk2 i el citoesquelet d'actina.	151
4.1.	Anàlisi de la distribució de actina en mutants $\Delta ckk2$	151
4.2.	Caracterització de l'efecte del tractament de Latrunculina B.	153
	Discussió.	161
1.	Ckk2 i la deprivació nutricional	161
1.1.	Funció de Ckk2 en deprivació nutricional.	161
1.2.	Estudi de la via Ckk2-Cmk1 en resposta a diferents tipus d'estrès.	163
1.3.	La regulació de Ckk2	165
1.4.	Ckk2, Gaf1 i TORC1	167
1.5.	Ckk2 i TORC2	171
2.	Validació dels substrats de Ckk2.	171
2.1.	Cgs1/Pka1 i Ckk2.	171

2.2. Ckk2 i Int6.....	177
2.3. Ckk2 i Gad8.	180
2.4. Anàlisi de l'assaig de fosfoproteòmica.....	184
3. Ckk2 i el citoesquelet.	189
3.1. Ckk2 i l'endocitosi.	191
Conclusions	197
Bibliografia	201
Annex.....	231

Índex d'abreviatures

AKAP	<i>A-kinase anchoring proteins</i>
AMP	adenosina monofosfat
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ATP	adenosina trifosfat
Ca ²⁺	calci
Ca ²⁺ /CaM	complex calci-calmodulina
CaM	calmodulina
CAMK	<i>Ca²⁺/CaM-stimulated protein kinase</i>
CAMKK	<i>Ca²⁺/CaM-stimulated protein kinase kinase</i>
cAMP	AMP cíclic
CDK5	<i>Cyclin dependent kinase 5</i>
CDRE	<i>Calcineurin-dependent responsive element</i>
CIP	<i>Cell Integrity Pathway</i>
Ckk2-as	<i>Ckk2 analog-sensitive</i>
CREB	<i>Cyclic AMP Element Binding Protein</i>
DAG	diacilglicerol
Deptor	<i>DEP domain containing mTOR interacting protein</i>
eIF	<i>Eukaryotic initiation factor</i>
eIF4E-BP1	<i>eIF4E binding protein 1</i>
GEF	<i>Guanine Exchange Factor</i>
GSK-3 β	<i>Glycogen Synthase Kinase 3β</i>
IP3	inositol trifosfat
LKB1	<i>liver kinase B1</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKAP	<i>MAP kinase-activated proteins</i>
MEF2	<i>monocyte enhancer factor 2A</i>
MLCK	<i>myosin light chain kinase</i>
mLST8	<i>mammalian lethal with Sec13 protein 8</i>
MPN	<i>Mpr1-Pad1 N-terminal</i>
mRNA	ARN missatger
mTORC1	<i>mTOR complex 1</i>
mTORC2	<i>mTOR complex 2</i>
PCI	<i>Proteasome, COP9, eiF3</i>
PDPK1	<i>PI3K-dependent kinase-1</i>
PGC-1 α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor c coactivator-1α</i>
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinase</i>
PIKK	<i>PI3K-related kinases</i>
PIP2	<i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
PIP3	<i>phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate</i>
PKA	<i>c-AMP-dependent protein kinase A</i>
PKB	proteina quinasa B
PKC	proteina quinasa C

PRAS40	<i>proline-rich Akt substrate of 40 kDa</i>
Prz1	<i>Ppb1-responsive zinc finger protein</i>
Raptor	<i>Regulatory protein associated with mTOR</i>
Rictor	<i>rapamycin insensitive companion of mTOR</i>
ROR	<i>retinoid orphan receptor</i>
SGK	<i>serum and glucocorticoid-inducible protein kinase</i>
T3	triiidotironina
	<i>transforming growth factor β (TGF-β)-activated kinase</i>
TAF1	<i>1</i>
tRNA	ARN de transferència
ULK1	<i>UNC-51-like kinase</i>

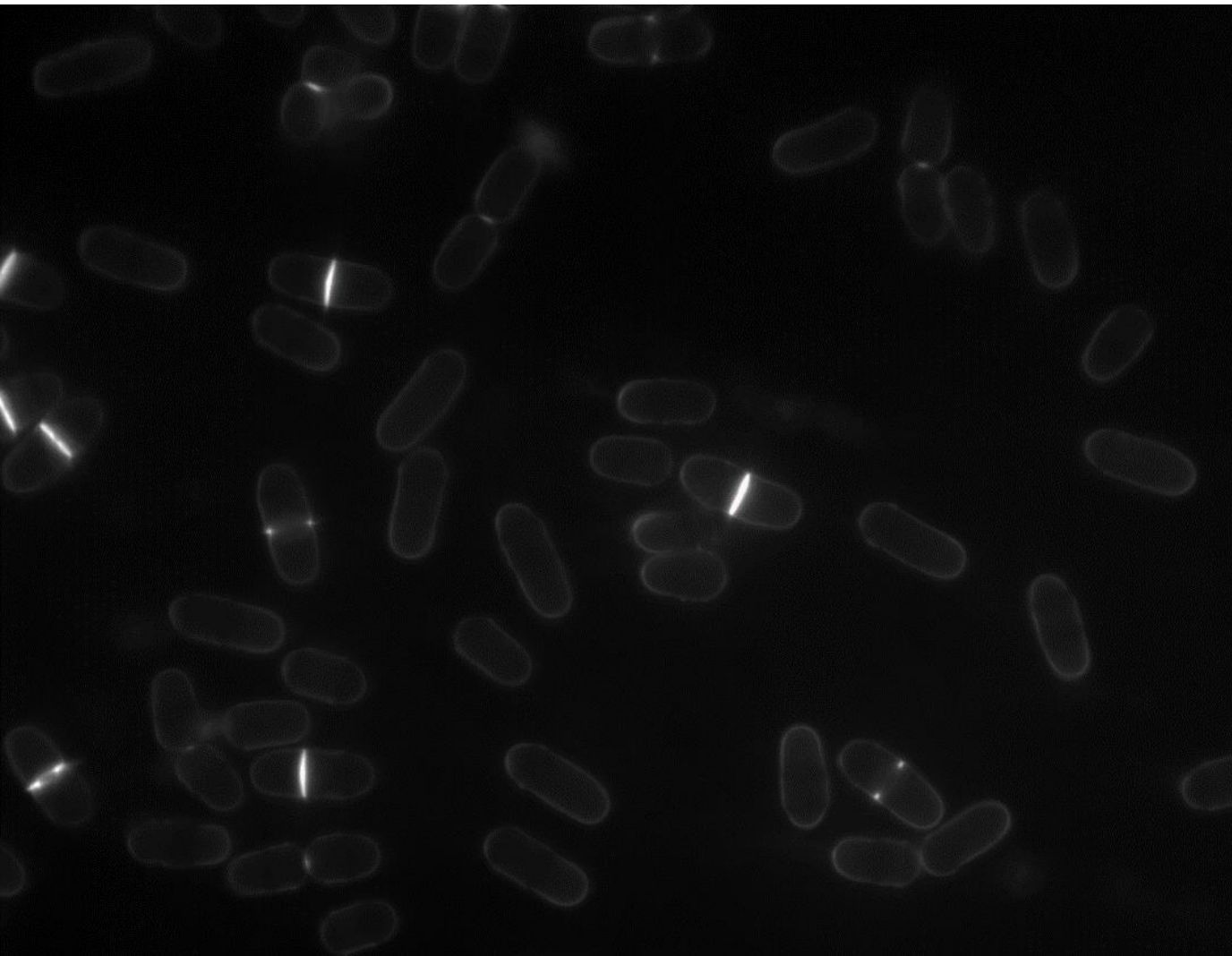
Índex de taules i figures

Figura 1. Control de l'homeòstasi del calci.	2
Figura 2. Regulació de la funció de la calmodulina	4
Taula 1. Motius d'unió a calmodulina.	5
Figura 3. Funcions de la via de senyalització CaMKK/CaMK.	7
Figura 4. Senyalització d'AMPK per CaMKK.	15
Figura 5. Senyalització d'AKT per CaMKK	17
Figura 6. Estructura de mTORC1.	19
Figura 7. Regulació de l'activitat de mTORC1	21
Figura 8. Estructura del complex mTORC2.	22
Figura 9. Regulació de l'activitat mTORC2.	23
Figura 10. Cicle vegetatiu i sexual de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	27
Figura 11. El cicle cel·lular de <i>S. pombe</i> .	28
Figura 12. Control per Ssp1 i Pom1 de la mida de la cel·lula i la mitosi.	29
Figura 13. Srk1 bloqueja el cicle cel·lular en resposta a estrès osmòtic.	33
Figura 14. Estructura del complex TORC1	37
Figura 15. Funcions associades a l'activació i la inhibició de TORC1.	38
Figura 16. Components del complex TOR2.	43
Figura 17. Regulació de l'activitat del complex TORC2.	44
Figura 18. La interacció entre les funcions dels complexos TORC regula la diferenciació sexual.	48
Figura 19. Regulació de l'activitat de Pka1 a través del cAMP.	50
Taula 2. Els diferents complexos que forma eIF3 a <i>S. pombe</i> .	60
Figura 20. Anàlisi de l'expressió de proteïna Ckk2 en resposta a privació de nitrogen a diferents intervals de temps.	63
Figura 21. Disminució de la intensitat de la banda Ckk2 d'alt pes molecular en una soca sense SUMO ($\Delta pmt3$).	64
Figura 22. Motius de sumoilació obtinguts de l'anàlisi de la proteïna Ckk2.	64
Figura M1. Funcionament de l'assaig quinasa.	96
Figura R1. La deleció de Ckk2 i Cmk1 no afecta a la viabilitat de la soca en absència de nitrogen.	106
Figura R2. La deleció de Ckk2 no afecta a la viabilitat de la soca en absència de glucosa.	106
Figura R3. Petita reducció de la viabilitat en la soca $\Delta ckk2$ en un cultiu deprivat de glucosa.	107
Figura R4. La deleció de Ckk2 alenteix el reinici del creixement en reposar el nitrogen.	108
Figura R5. La deleció de Ckk2 causa un increment de mating en condicions de privació nutricional.	108
Figura R6. Els nivells de Cmk1 es redueixen en resposta a la privació de nitrogen.	109
Figura R7. La soca $\Delta cmk1$ es resistent a latrunculina B.	110
Figura R8. Les soques $\Delta ckk2$ i $\Delta cmk1$ son resistents a tiabendazol.	110
Figura R9. La deleció de prz1 recupera el fenotip salvatge en soques $\Delta ckk2$.	111
Figura R10. La mutació K202R no evita l'aparició de la banda Ckk2-Sumo.	112
Figura R11. La soca Ckk2:TP continua mostrant la banda d'alt pes molecular.	113
Figura R12. La banda inespecífica es troba en una soca salvatge sense epítot HA.	114

Figura R13. L'increment de proteïna Ckk2 desapareix en retornar al medi mínim amb nitrogen.	115
Figura R14. Identificació de seqüències consens de factors de transcripció.	116
Figura R15. Els nivells de Ckk2 es mostren reduïts a la soca Δ <i>gaf1</i> .	117
Figura R16. El tractament amb rapamicina causa un increment en el nivell de proteïna Ckk2.	118
Figura R17. El tractament amb Torin1 causa un increment en el nivell de proteïna Ckk2.	119
Figura R18. El tractament amb Torin1 causa un major increment en el nivell de proteïna Ckk2 que el tractament de rapamicina.	119
Figura R19. La mutació en la proteïna Tor2 causa un increment en els nivells de proteïna Ckk2.	120
Figura R20. L'increment de Ckk2 causat per la inhibició de TORC1 es deu parcialment a la funció de Gaf1.	121
Figura R21. La eliminació genètica de TORC2 causa un increment en els nivells de Ckk2.	121
Figura R22. El doble mutant <i>tor2.51</i> Δ <i>ckk2</i> mostra una reducció de viabilitat.	122
Figura R23. La deleció de <i>Ssp1</i> no redueix la viabilitat de la soca <i>tor2.51</i> .	122
Figura R24. L'eliminació de <i>Pka1</i> redueix la viabilitat de la soca Δ <i>ckk2</i> en resposta a un estrès de calci.	124
Figura R25. L'eliminació de <i>Pka1</i> redueix la viabilitat de la soca Δ <i>ckk2</i> en resposta a una privació de glucosa.	125
Figura R26. Ckk2 redueix l'expressió de <i>fbp1</i> .	126
Figura R27. El calci i una concentració molt baixa de glucosa causen un increment en els nivells de <i>Cgs1</i> .	127
Figura R28. <i>Pka1</i> es veu incrementada en resposta a calci i disminuïda en privació de glucosa.	127
Figura R29. L'eliminació de Ckk2 redueix la viabilitat en fase estacionària.	128
Figura R30. Identificació del residu gate-keeper en la proteïna Ckk2.	129
Figura R31. Prova d'inducció d'expressió de pGEX- <i>ckk2</i> -as.	131
Figura R32. Purificació de la proteïna Ckk2-as.	131
Figura R33. La proteïna Ckk2-as fosforila <i>Cmk1</i> in vitro.	132
Figura R34. La proteïna Ckk2-as no fosforila <i>Cgs1</i> in vitro.	133
Figura R35. Int6 té un paper en la resposta al calci.	135
Figura R36. La deleció de <i>Int6</i> redueix la viabilitat de la soca Δ <i>ckk2</i> .	135
Figura R37. Els nivells de <i>Int6</i> es mantenen estables en resposta a estrès de calci o privació de glucosa.	136
Figura R38. Ckk2 es veu augmentada en la soca Δ <i>int6</i> .	136
Figura R39. Ckk2 es veu augmentada en inhibir el proteosoma.	137
Figura R40. <i>Int6</i> regula l'expressió d' <i>Atf1</i> en resposta a un estrès de calci.	138
Figura R41. <i>Int6</i> no és fosforilat per Ckk2-as in vitro.	139
Figura R42. El residu T387 es troba dins la seqüència consens de fosforilació per CaMKK de <i>Gad8</i> .	140
Figura R43. La fosforilació del residu T387 en resposta a calci es redueix en absència de Ckk2	140
Figura R44. La pèrdua de <i>Gad8</i> causa la pèrdua de la resistència de la soca Δ <i>ckk2</i> .	141
Figura R45. La fosforilació del residu T387 en resposta a la privació de glucosa i nitrogen es manté invariable independentment de la presència de Ckk2.	142

Figura R46. La recuperació de la fosforilació del residu S546 en resposta a la deprivació de glucosa es més ràpida en la soca $\Delta ckk2$.	142
Figura R47. La fosforilació del residu S546 no varia en resposta a la deprivació de nitrogen.	143
Figura R48. L'increment de mating observat en la soca $\Delta ckk2$ es deu a un increment en la fosforilació de Gad8-S546.	144
Figura R49. Anàlisi de la viabilitat del mutant <i>gad8-T387A</i> .	144
Taula R1. Classificació dels substrats identificats segons el procés biològic en l'activació per calci.	146
Taula R2. Classificació dels substrats identificats segons la localització cel·lular en l'activació per calci.	146
Taula R3. Classificació dels substrats identificats segons el procés biològic en resposta a la deprivació de nitrogen.	147
Taula R4. Classificació dels substrats identificats segons la localització cel·lular en resposta a la deprivació de nitrogen.	148
Taula R5. Classificació dels substrats identificats segons el procés biològic.	149
Taula R6. Classificació dels substrats identificats segons la localització cel·lular.	149
Figura R50. Ckk2 no regula la funció del citoesquelet d'actina en resposta a calci.	152
Figura R51. La deleció de <i>ckk2</i> desorganitza les acumulacions d'actina del còrtex cel·lular.	152
Figura R52. Ckk2 no es veu afectada per l'exposició aguda a latrunculina B.	153
Figura R53. Organització del citoesquelet en resposta a latrunculina B.	154
Figura R54. La soca $\Delta ckk2$ mostra una reducció en l'índex de septació.	154
Figura R55. La soca $\Delta ckk2$ mostra una desregulació de la divisió nuclear.	155
Figura R56. La sensibilitat de $\Delta ckk2$ a latrunculina B es reverteix en afegir sorbitol.	156
Figura D1. Model de la regulació de l'expressió de Ckk2 en resposta a la deprivació de nitrogen.	169
Taula D1. Proteïnes que interactuen físicament amb Cgs1	175
Taula D2. Proteïnes que interaccionen físicament amb Int6.	180

INTRODUCCIÓ



Introducció

1. Homeòstasi del calci.

Les cèl·lules són màquines biològiques dinàmiques que perceben estímuls del exterior i són capaces d'adaptar el seu funcionament intern per tal de respondre'ls. Els estímuls són detectats gràcies a la presència de receptors situats a la superfície de la cèl·lula, causant canvis en aquests receptors que es poden transmetre a proteïnes intracel·lulars de manera successiva, fins que arriba a una proteïna efectora que donarà lloc a la resposta fisiològica. Aquest fenomen d'integració d'una senyal per convertir-la en una resposta s'anomena transducció del senyal, que mitjançant l'ús de segons missatgers, pot convertir un estímul petit en una gran resposta cel·lular, afectant a l'expressió gènica de terceres proteïnes, causant canvis en el funcionament energètic de la cèl·lula o en la mobilitat del citoesquelet. Dins del grup dels segons missatgers, es poden trobar molècules com l'AMP cíclic (cAMP), l'inositol trifosfat (IP₃), diacilglicerol (DAG) i el calci (Ca²⁺).

Coneixem el calci com un macronutrient necessari per la generació i manteniment del teixit ossi de les dents i els ossos dels humans. La ingesta insuficient de calci està associada amb l'aparició d'osteoporosi en les persones d'avançada edat, ja que els ossos actuen com un reservori de calci i es destrueix teixit ossi per alliberar-lo (Nordin, 1997). La importància del reservori es que el calci també realitza funcions a nivell cel·lular i de proteïnes: està implicat en la neurotransmissió, la transmissió del potencial de membrana en neurones, l'exocitosi, la contracció en cèl·lules musculars, l'apoptosi i l'expressió gènica.

Degut a aquesta varietat de funcions, la cèl·lula té mecanismes de control que fan que es pugui mantenir la concentració de calci del citosol (100 nM) fins a 20.000 més baixa que al medi extracel·lular. Aquests mecanismes

INTRODUCCIÓ

disfruten d'una certa flexibilitat que permet causar un increment transitori de la concentració de Ca^{2+} de 10 a 100 vegades, de manera que la senyal es pot amplificar de manera molt ràpida gràcies a la unió cooperativa dels ions de calci amb les proteïnes efectores. Entre els mecanismes encarregats de mantenir l'homeòstasi del calci, hi ha l'emmagatzematge en el reticle endoplasmàtic o sarcoplasmàtic a concentracions elevades; que permeten aquests pics de Ca^{2+} intracel·lular en alliberar tot el seu contingut al citosol. També existeixen proteïnes transmembrana com les bombes de calci que son capaces d'expulsar el calci del citosol un cop es produeixen aquests augments (Figura 1) (Zheng *et al.*, 2015) (Clapman, 2007).

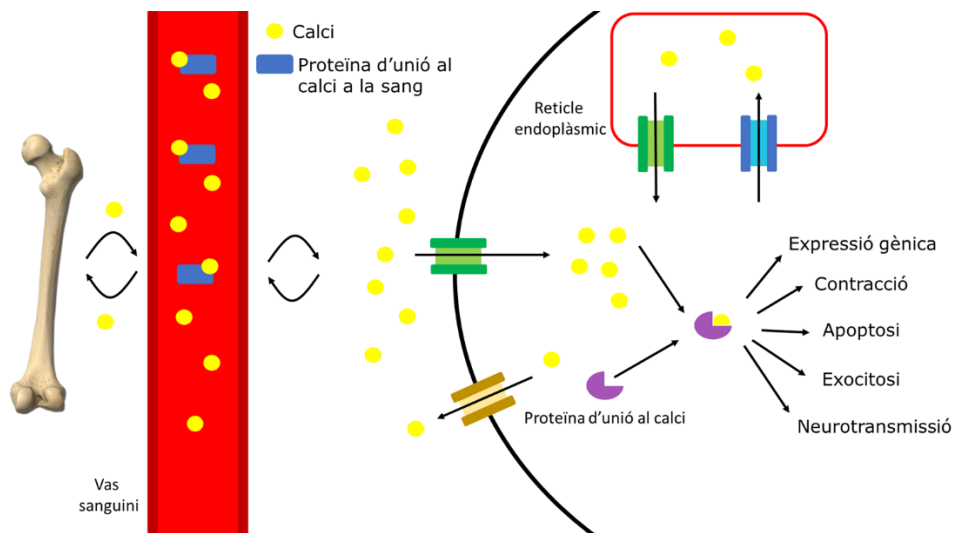


Figura 1. Control de l'homeòstasi del calci. El calci surt del reservori ossi i pot circular per la sang de forma lliure (Ca^{2+}) o unida a una proteïna d'unio com la albúmina sèrica. A través de la sang pot entrar als teixits i ser introduït a la cèl·lula per transportadors de calci. Dins la cèl·lula pot ser emmagatzemat dins del reticle endoplasmàtic o es pot unir a proteïnes d'unio al calci com la calmodulina per la realització de les funcions efectores.

Les proteïnes que exerceixen la resposta a calci poden presentar motius d'unio al calci o dominis que permeten la unió d'una altra proteïna quan aquesta segona està formant un complex amb el calci. Aquestes proteïnes d'unio presenten en la seva seqüència dominis d'unio a Ca^{2+} , que en unir-se el Ca^{2+} , causarà canvis conformacionals en la seva estructura que

INTRODUCCIÓ

permetran la seva unió amb la proteïna efectora. Entre les proteïnes d'unió més conegudes es troben la calmodulina (CaM), la troponina C i la proteïna quinasa C (*protein kinase C*, PKC).

La calmodulina és una proteïna bastant conservada evolutivament, el paper de la qual és essencial ja que en alguns organismes eucariotes com *Drosophila melanogaster* (Heiman *et al.*, 1996), *Saccharomyces cerevisiae* (Davis *et al.*, 1986) i *Schizosaccharomyces pombe* (Takeda & Yamamoto, 1987); l'eliminació del gen resulta letal. Per solucionar aquest possible problema, algunes espècies han desenvolupat mecanismes com la duplicació gènica. A *Homo sapiens*, s'ha generat fins a 3 còpies idèntiques del gen situades a parts diferents del genoma, així que es poden donar casos on es perdi la funció d'una de les còpies sense que hi hagi conseqüències greus (Jensen *et al.*, 2018).

L'estructura de la calmodulina presenta dos dominis globulars als extrems de la seqüència on es troba el motiu d'unió al calci *EF Hand*, un motiu que pot unir fins a dos ions de Ca^{2+} de manera que en la calmodulina es poden tenir fins a 4 molècules de Ca^{2+} . La unió del calci es cooperativa, és a dir, la unió d'un catió de Ca^{2+} facilita la unió del següent. Un cop s'han unit tots els ions, es genera el complex calci-calmodulina (Ca^{2+} -CaM), i la calmodulina es ara una proteïna totalment diferent, ja que ha patit canvis conformacionals que han exposat els seus residus hidrofòbics, implicats en el reconeixement de regions amfipàtiques de les proteïnes diana. La unió amb la proteïna diana es produeix com una abraçada (Figura 2), ja que els extrems de la proteïna envoltaran la proteïna diana, i genera canvis conformacionals en aquesta que poden canviar la seva activitat o promoure la seva unió a nous substrats (Clapperton *et al.*, 2002) (Clapman, 2007).

INTRODUCCIÓ

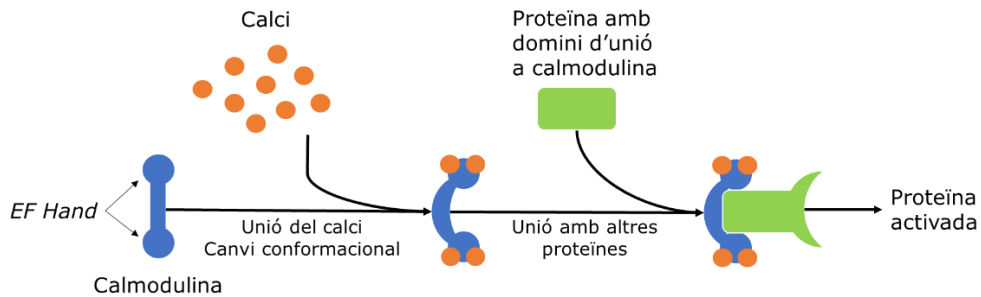


Figura 2. Regulació de la funció de la calmodulina. La calmodulina, de color blau, presenta uns dominis globulars als seus extrems, de forma esfèrica a la imatge, anomenats *EF Hand*, que poden unir fins a dos ions de calci, representat en color taronja. La unió del calci causa canvis en la calmodulina que permeten la unió d'aquesta a proteïnes que presenten dominis d'unió a calmodulina. Un cop s'uneix la calmodulina, es produeixen canvis conformationals en la proteïna diana que causen canvis en la seva activitat.

Hi ha varies proteïnes que presenten aquests dominis d'unió per la calmodulina. N'hi ha proteïnes, com la neurogranina, que poden unir-se a la calmodulina sense que sigui necessària la presència del Ca^{2+} . No obstant, la majoria són dependents de la unió del complex $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$: entre les quals es poden trobar la cadena lleugera de les miosines, la fosfatasa calcineurina i les quinases dependents de calci i calmodulina (*Ca²⁺/CaM-dependent kinases*, CAMK) (Kaleka *et al.*, 2012).

En les proteïnes d'unió a calmodulina es troben els dominis d'unió que són seqüències consens, que presenten aminoàcids hidrofòbics en determinats llocs de la seqüència (Taula 1). Per exemple, les proteïnes que es poden unir a la calmodulina sense calci, presenten un motiu IQ en el que uns determinats aminoàcids es troben a les posicions 1, 2, 5, 6, 11 y 14. Altres proteïnes presenten motius *IQ-like* en els que s'hi poden trobar uns altres. D'altra banda, en les proteïnes d'unió dependent de calci, s'hi ha identificat seqüències de longitud variable flanquejades pels mateixos residus hidrofòbics, en la que s'hi pot trobar una gran variabilitat de residus intermedis o algun residu hidrofòbic entremig.

Ca ²⁺ dependent	
1-10	[FILVW]xxxxxxxx[FILVW]
1-5-10	[FILVW]xxx[FAILVW]xxxx[FILVW]
Basic 1-5-10	[RK][RK][RK][FAILVW]xxx[FILV]xxxx[FILVW]
1-12	[FILVW]xxxxxxxxxx[FILVW]
1-14	[FILVW]xxxxxxxxxxx[FILVW]
1-8-14	[FILVW]xxxxxx[FAILVW]xxxxx[FILVW]
1-5-8-14	[FILVW]xxx[FAILVW]xx[FAILVW]xxxx[FILVW]
Basic 1-8-14	[RK][RK][RK][FILVW]xxxxxx[FAILVW]xxxxx[FILVW]
1-16	[FILVW]xxxxxxxxxxxxxx[FILVW]
Ca ²⁺ independent	
IQ	[FILV]Qxxx[RK]Gxxx[RK]xx[FILVWY]
IQ-like	[FILV]Qxxx[RK]xxxxxxxx
IQ-2A	[IVL]QxxxRxxxx[VL][KR]xW
IQ-2B	[IL]QxxCxxxxKxRxW
IQ unconventional	[IVL]QxxxRxxxx[RK]xx[FILVWY]

Taula 1. Motius d'unió a calmodulina. Els números en els noms dels motius d'unió calci dependents indiquen les posicions en les que es troben els residus hidrofòbics. Entre els claudàtors es troben els residus que poden formar part de la mateixa posició i la x representa un residu qualsevol (Mruk *et al.*, 2014).

2. Proteïnes quinasa dependents de calci-calmodulina.

Les proteïnes quinasa dependents de calci es classifiquen segons l'especificitat de substrat: es consideren restrictives quan només tingui un o pocs substrats com la fosforilasa quinasa o la *myosin light chain kinase* (MLCK) o multifuncionals, si tenen un gran varietat de substrats que poden regular múltiples funcions (Skelding & Rostas, 2020). Si poden arribar a intervenir en tants processos, necessiten estar regulades a diferents nivells: el primer seria l'homeòstasi del Ca²⁺ de la qual he parlat abans i el segon seria per modificacions com una fosforilació que activen l'activitat catalítica de la quinasa, o per alteracions puntuals que la poden convertir en una quinasa activa de manera autònoma sense tornar a necessitar de la presència de Ca²⁺/CaM (Racioppi & Means, 2012). A més, segons la

INTRODUCCIÓ

localització (teixit o cèl·lules concretes) o el moment del cicle, es poden generar múltiples interaccions entre la quinasa i proteïnes d'unió específiques que poden regular la funció quinasa (Skelding & Rostas, 2020).

En les quinases multifuncionals es troba un domini regulador i un domini catalític. L'homologia de les estructura ens permet classificar-les en dues famílies: una defineix a les caseïna quinases, que presenten un domini catalític bastant conservat i molta variabilitat en el domini regulador. L'altra família es la de les proteïnes *Ca²⁺/CaM-stimulated protein kinase kinase* (CaMKK) i las *Ca²⁺/CaM-stimulated protein kinase I, II y IV* (CaMKI, CaMKII, CaMKIV).

Les CaMKK/CaMK son serina-treonina quinases, és a dir, fosforilen els residus de serina o treonina de les seves proteïnes diana. Tenen una regió auto-inhibidora que es troba unida en el centre actiu de la quinasa, impeding la seva funció. Aquesta regió està parcialment solapada amb el domini d'unió del complex Ca^{2+}/CaM , que quan s'uneix causa un canvi conformacional de la CaMK(K) que desplaça el domini auto-inhibidor del centre actiu i torna activa a la quinasa. L'activitat de la CaMK(K) pot ser modulada *a posteriori* per fosforilació (Skelding & Rostas, 2020).

Les proteïnes d'aquesta família, excepte CaMKII, formen part d'una cascada de senyalització (Figura 3). La via CaMKK/CaMK participa en processos com la formació de la memòria, el desenvolupament del cerebel, la proliferació, l'apoptosi, l'adipogènesi, la captació de glucosa, la gluconeogènesi o la resposta immune (Racioppi & Means, 2012) (Brzozowski & Skelding, 2019).

La CaMKK estaria en la part superior de la cascada i es responsable de la fosforilació de CaMKI i CaMKIV (però no de CaMKII) (Tokumitsu *et al.*, 1995). Es necessària també la unió del complex Ca^{2+}/CaM a CaMKK i CaMK

per mantenir l'activitat de la cascada al seu màxim nivell (Tokumitsu *et al.*, 1995). Tot i això, la CaMKK en mamífers participa en la fosforilació d'altres substrats independents: com pot ser l'activació de la AMPK (*AMP-activated protein kinase*) dependent de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ i AMP (Hawley *et al.*, 1995) i en la fosforilació de la proteïna quinasa B (PKB) (Yano *et al.*, 1998).

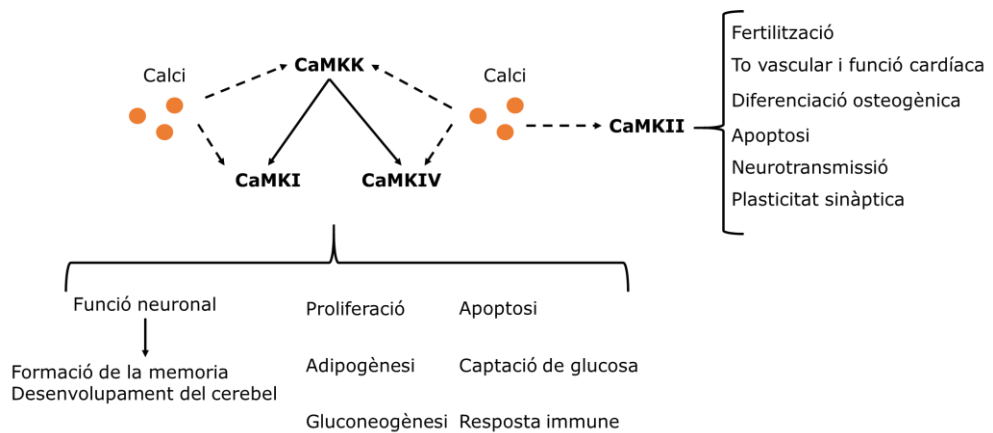


Figura 3. Funcions de la via de senyalització CaMKK/CaMK. CaMKI i CaMKIV necessiten ser activades per CaMKK i la presència de calci. L'activació de CaMKII és independent de calci.

2.1. CAMKK

A mamífer, s'hi troben dos gens independents que codifiquen per la CaMKK (CAMKK1 i CAMKK2) que donen lloc a les proteïnes CaMKK α i CaMKK β respectivament. Es troben principalment al sistema nerviós central (cervell, bulb raquídi, cerebell, hipocamp, hipotàlem i amígdala), i en nivells més baixos, al tim, melsa, pulmons i testicles (Racioppi & Means, 2012) (Brzozowski & Skelding, 2019).

2.1.1. CaMKK α

El gen caracteritzat com CAMKK1, es troba al cromosoma 17 i té 34.577 parells de bases, codifica per la proteïna CaMKK α , que té 505 aminoàcids. La seva activitat depèn totalment del complex $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ i està regulada

INTRODUCCIÓ

negativament per fosforilació per la *c-AMP-dependent protein kinase* (PKA) (Matsushita & Nairn, 1999) als residus serina (S) 52, S74, treonina (T) 108, S458 i S475.

La manera en la que l'activitat depèn del complex $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ es perquè la unió de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ bloqueja els quatre primers llocs de fosforilació, mentre que d'altra banda s'observa un increment en la fosforilació de S475 (Okuno *et al.*, 2001). La presència de fosforilacions en els llocs S74, T108 i S548 inhibeixen l'activitat de la proteïna, especialment la última ja que pot bloquejar la unió amb la $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Wayman *et al.*, 1997). Una altra combinació de fosforilacions, la de S74 i S475 per PKA, es necessària per la unió de la 14-3-3 i també regularia negativament l'activitat de la CaMKK (Ichimura *et al.*, 2008) i bloquejaria la defosforilació de la T108 per la *protein phosphatase 2A* (PP2A) (Davare *et al.*, 2004).

A part dels substrats tradicionals de CaMKK mencionats amb anterioritat, es possible que tinguí altres dianes que no s'ha identificat encara. La sobre-activació de la CaMKK α en el teixit muscular incrementa la captació de glucosa, de manera AMPK i PKB independent (Witzak *et al.*, 2007). S'ha identificat seqüències de localització cel·lular entre els aminoàcids 456-474 que permeten la translocació al nucli, i la seva funció està associada a l'activació de monòcits i la regulació de l'expressió de CD86, CD11b, TNF α i IL-10 en aquest tipus cel·lular (Guest *et al.*, 2008).

2.1.2. CaMKK β

L'altre gen de la CAMKK (CAMKK2) es troba en el cromosoma 12 i codifica per la proteïna CaMKK β . Aquest gen es molt més gran de mida, tenint més de 40.000 parells de bases en la seva seqüència i presenta 18 exons i 17 introns. La presència dels introns li permet generar transcrits diferents per *splicing* alternatiu:

- Isoforma β_1 , que conté tots els exons (amb 588 aminoàcids);

- Isoforma β_2 , en el que s'ha eliminat el darrer exó (amb 532 aminoàcids).

Però no s'han detectat diferències en l'activitat quinasa o en l'afinitat de substrats entre les dues isoformes. Tot i això, si que s'ha identificat transcrits β_1 en els que s'ha escindit l'exó 14 o el 16 en major proporció en cèl·lules de tumors cerebrals. En el cas de l'exó 14, es delectonarien fins a 43 residus i donaria lloc a una CaMKK β inactiva; i en el cas de l'exó 16, causa l'aparició d'un codó STOP prematur per un desplaçament en el marc de lectura sense que hi hagi canvis en l'activitat quinasa (Hsu *et al.*, 2001).

L'activitat de la PKA també és necessària per la funció de la CaMKK β . S'ha identificat la fosforilació dels residus S100, S495 i S511 (Racioppi & Means, 2012). Més recentment però, s'ha identificat també com substrat de PKA el residu T144, important per al control de l'autonomia de la proteïna: en ser fosforilada, CaMKK β es converteix en una quinasa dependent de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. La importància d'aquest residu es tal, que també pot ser fosforilat en menor mesura per altres quinases com la AMPK (Nakanishi *et al.*, 2017) (Takabatake *et al.*, 2019), i pot ser defosforilat també per les fosfatases PP1 y PP2A (Takabatake *et al.*, 2020). L'activació de la PKA causada per la forskolina, causa l'escissió de l'exó 16 en el control de la diferenciació neuronal (Cao *et al.*, 2011). Així doncs, PKA pot controlar l'activitat de CaMKK β mitjançant diversos mecanismes.

S'ha identificat altres mecanismes per controlar l'autonomia de la CaMKK β que han permès distingir el seu paper en el desenvolupament de les neurites. La fosforilació de S137 per la *Cyclin dependent kinase 5* (CDK5) primer, seguida de la fosforilació de part de la *Glycogen Synthase Kinase 3 β* (GSK-3 β) de S129 y S133, regula negativament l'activitat autònoma de la CaMKK β restringint la resposta a estímuls de calci i li confereix una major estabilitat augmentant la seva vida mitjana (Green *et al.*, 2011).

INTRODUCCIÓ

La pròpia CaMKK β pot regular també l'autonomia per auto-fosforilació del residu T482 de la regió auto-inhibidora, podent incrementar la seva activitat independent de Ca²⁺/CaM (Tokumitsu et al., 2011). També es pot unir a la proteïna 14-3-3, reduint també la defosforilació de la proteïna però a diferència de la CaMKK α , no es produeixen alteracions de l'activitat quinasa (Psekanova et al., 2018).

Entre les dues proteïnes CaMKK no hi ha diferències en el tipus de substrats, però s'ha observat que la CaMKK β té fins a nou vegades més afinitat per la AMPK que la CaMKK α . La diferència en afinitat es deguda a variacions en els residus de regions conservades del subdomini VIII, situat després del centre catalític: la CaMKK α té una isoleucina (I) a la posició 322 mentre que la CaMKK β té una leucina (L) a la posició 358. La substitució I322L a CaMKK α , causa un increment de la seva afinitat per AMPK (Fujiwara et al., 2016).

2.2. Substrats de la CaMKK

2.2.1. CAMK

2.2.1.1. CAMKI

Hi ha quatre gens que codifiquen per la CAMKI a *Homo sapiens*: CAMK1 (CaMK1 α), PNCK (CaMK1 β /pnck), CAMK1D (CaMK1 δ) i CAMK1G (CaMK1 γ). Com en el cas de la CaMKK, la seva expressió es superior al sistema nerviós central que a la resta de teixits. Tot i això, s'han descrit canvis d'expressió espaitemporals entre les diferents CaMK1 durant el desenvolupament neuronal (Kamada et al., 2007). Les CaMKI tenen funcions en el cicle cel·lular, en el control de la sinapsina en les terminals nervioses, el creixement de l'axó, l'expressió de l'aldosterona sintasa, la diferenciació dels osteoclast i la resorció òssia (l'eliminació de teixit ossi per alliberar calci a la sang) (Brzozowski & Skelding, 2019) (Skelding & Rostas, 2020). La CaMKI es pot mutar per generar isoformes inactives de

la quinasa o pot ser desactivada per l'inhibidor KN-93. D'aquesta manera s'ha pogut veure que la inactivació de CaMKI bloqueja el cicle cel·lular prevenint l'activació de la Cdk4 i la híper-fosforilació de pRb (Kahl & Means, 2004).

L'activitat de les CaMKI depèn de dos factors: el primer, la unió del complex $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. El segon, la fosforilació en el residu T177, altament conservat en l'evolució, per la CaMKK (Haribabu *et al.*, 1995), com a conseqüència, CaMK1 amplia el seu repertori de substrats (Hook *et al.*, 1999). Existeix una excepció, però, en el cas de la CaMK1 δ . La resta de les quinases son defosforilades quan la concentració intracel·lular de calci es redueix, però la CaMK1 δ és resistent a les fosfatases, otorgant-li una capacitat de resposta més ràpida a nous canvis en la concentració de calci (Senga *et al.*, 2015).

La localització de CaMK1 pot variar entre citoplasma i nucli, ja que en la seva seqüència es poden trobar seqüències d'importació i exportació al nucli. La importació no estaria regulada per l'activitat quinasa, però l'exportació depèn d'una seqüència situada a la regió reguladora de la proteïna i està mediada per XPO1 (exportina 1 o CRM1). La interacció CaMK1-XPO1 podria estar associada a l'activació de la CaMK1, ja que augmenta quan s'afegeix calci en el medi (Stedman *et al.*, 2004).

2.2.1.2. CAMKIV

Aquesta proteïna està codificada per un únic gen CAMK4, que dona lloc a dos isoformes (CaMK4 α y CaMK4 β) per *splicing* alternatiu, on la isoforma β presenta uns 28 aminoàcids extra a l'extrem N-terminal, dels que es desconeix la funció (Sakagami & Kondo, 1993). L'expressió de la CaMK4 està concentrada en el sistema nerviós central (especialment en les cèl·lules granulars del cerebel), els testicles i els ovaris.

INTRODUCCIÓ

CAMK4 participa en la regulació del *Cyclic AMP Element Binding Protein* (CREB), el creixement de neurites, la generació de memòria, respostes immunes i inflamatòries, acumulació de proteïna tau i control del cicle cel·lular (Brzozowski & Skelding, 2019).

La unió de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ i la fosforilació per CaMKK a la T200 es necessària per activar la CaMKIV. Una característica que diferencia a aquesta quinasa de la resta de les CaMK, es que pot convertir-se en una quinasa autònoma per l'auto-fosforilació de la S12 i la S13 i actuar amb independència de la presència de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Chatila *et al.*, 1996). Hi ha altres posicions com la S322 que poden ser auto-fosforilades per evitar la unió de la calmodulina fins que son defosforilades per la fosfatasa PP2A (Swulius & Waxham, 2008).

La regulació de l'activitat de CaMKIV pot interferir en la seva distribució cel·lular, ja que la falta d'activitat catalítica impedeix l'entrada de CaMK4 al nucli (Lemrow *et al.*, 2004). Durant l'espermioogènesi, l'etapa final de l'espermatogènesi en la que les espermatòides es converteixen en espermatozous, la fosforilació de la CaMKIV és important perquè li permet entrar al nucli per fosforilar les seves proteïnes diana. La prova de la importància d'aquesta translocació es que la disminució en la fosforilació de les dianes de CaMKIV està associada a problemes d'esterilitat en ratolins (Wu *et al.*, 2000).

Dins de les dianes de la CaMKIV, es troben factors de transcripció com els CREB que he mencionat amb anterioritat, *cyclic-AMP response element modulator a* (CREM α), la histona deacetilasa 4, el *monocyte enhancer factor 2A* (MEF2) i el *retinoid orphan receptor* (ROR). Aquests factors estan participant en el desenvolupament i funció del sistema immune regulant la senyalització cel·lular, la secreció de citoquines i la diferenciació de cèl·lules T (Ferretti *et al.*, 2018).

2.2.1.3. CAMKII

Hi ha quatre gens que codifiquen per les CaMKII: CAMK2A, CAMK2B, CAMK2G, CAMK2D; que codifiquen per les proteïnes CaMKII α , CaMKII β , CaMKII γ i CaMKII δ respectivament i, a més, poden patir processos de *splicing* que generen més variants de la proteïna (Cook *et al.*, 2018). L'expressió és ubíqua, i participen en la regulació de la fertilització, el manteniment del to vascular i la funció cardíaca, la diferenciació osteogènica i l'apoptosi. Però on la seva expressió es més elevada es en el sistema nerviós central on participa en els processos de neurotransmissió, l'extensió de neurites i la plasticitat sinàptica relacionada amb la memòria i el aprenentatge (Brzozowski & Skelding, 2019).

La CaMKII presenta una estructura a l'extrem C-terminal que li permet associar-se amb altres CaMKII formant un multímer. Llavors, els seus centres catalítics dimeritzen i estan units amb la regió reguladora de manera que eviten l'entrada del substrat i de l'ATP. Només amb l'arribada de Ca²⁺/CaM o es separaran els centres catalítics i s'activarà la proteïna (Thaler *et al.*, 2009)(Skelding & Rostas, 2020). Posteriorment es produeix una auto-fosforilació de T286, un residu situat prop del punt que evitava l'entrada del substrat, i aleshores CaMKII adquireix una elevada afinitat per la calmodulina, permetent la unió fins i tot a concentracions basals de calci (Meyer *et al.*, 1992), el que la fa que es mantingui activa i seguir fosforilant substrats encara en absència de CaM (Strack & Colbran, 1998). El que no necessita es l'activitat d'una CaMKK, per tant, l'activitat de CaMKII es independent de la CaMKK (Figura 3).

2.2.2. Altres substrats de CAMKK

2.2.2.1. AMPK

La *AMP-activated protein kinase* (AMPK) forma part de la cascada quinasa de CaMKK. La subunitat α es fosforilada a la T172 tant per la CaMKK β

INTRODUCCIÓ

(Hawley *et al.*, 2005) como per la *liver kinase B1* (LKB1) o el *transforming growth factor β (TGF- β)-activated kinase 1* (TAK1). L'activitat de la AMPK està associada al control de l'homeòstasi energètica de l'organisme, donat que la seva activació està associada a una millora en la sensibilitat a la insulina i a la regulació d'hormones relacionades amb el metabolisme de la glucosa i els lípids. També causa canvis en l'expressió gènica relacionats amb la regulació de factors de transcripció i remodeladors de cromatina, que estan associats a processos de diferenciació i apoptosi (Neumann & Viollet, 2019).

L'activació d'AMP per les quinases mencionades en el paràgraf anterior està restringida a determinades condicions. Per exemple, la quinasa LKB1 es veu activada per un augment en la proporció entre AMP/ATP, mentre que la CaMKK es veu activada per condicions que causen canvis en la concentració intracel·lular de calci, com la hipòxia (Dengler, 2020). La participació de la via CaMKK β /AMPK ha sigut descrita en les següents situacions (Figura 4):

- La inhibició de CaMKK a l'hipotàlem evita l'activació d'AMPK i la inducció del neuropèptid Y. En conseqüència, s'ha observat com la inhibició de CaMKK causa una pèrdua de la gana i de pes; i que els ratolins amb deleció del gen CaMKK β estan protegits de l'augment de pes, resistència a insulina i intolerància a la glucosa causada per una dieta rica en greixos (Anderson *et al.*, 2008).
- L'activació de *peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α* (PGC-1 α) a través de AMPK y SIRT1 en miòcits (Iwabu *et al.* 2010). PGC-1 α es un regulador de la massa i funció mitocondrial, que es troba activat en condicions d'exercici, exposició al fred o restricció calòrica. Aquesta interacció permetria enllaçar l'estímul fisiològic i la biogènesi mitocondrial (Zamora & Villena, 2014).
- Inducció de la triiodotironina (T3) per activar AMPK i promoure la oxidació dels àcids grassos (Yamauchi *et al.*, 2008).

- La deprivació d'aminoàcids essencials causa un increment de calci que activaria la via CaMKK β /AMPK. L'activació causa la fosforilació de UNC-51-like kinase (ULK1) a la S555 i l'inici de l'apoptosi. Si s'elimina CaMKK es redueixen els successos d'apoptosi (Ghislat *et al.*, 2012).
- Implicat en alguns processos tumorals, per exemple, en el càncer de pròstata, la via controla la migració de cèl·lules canceroses mediada pel receptor d'andrògens (Frigo *et al.*, 2011).

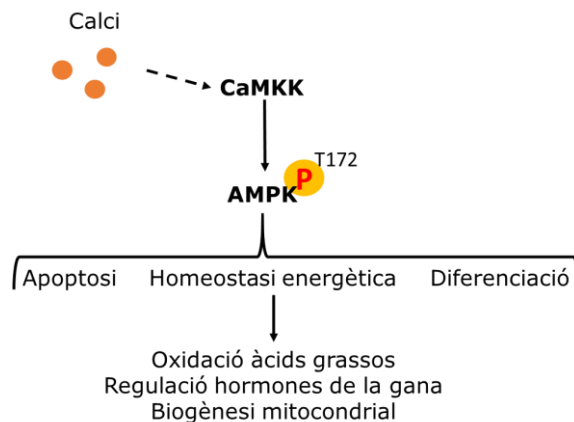


Figura 4. Senyalització d'AMPK per CaMKK. Els canvis de concentració de calci causen l'activació de CaMKK i la posterior fosforilació d'AMPK en el residu T172. L'activació d'AMPK està relacionada amb els processos indicats.

2.2.2.2. AKT/PKB

La proteïna quinasa B, de 57 kDa, està codificada per tres gens a *Homo sapiens*: AKT1, AKT2 y AKT3. Aquesta proteïna es reclutada a la membrana per *phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate* (PIP3) en resposta a una senyal integrada per la *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K), que transforma la *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate* (PIP2) en PIP3. Quan AKT s'uneix a la membrana, sofreix canvis estructurals que permeten la seva activació per la *PI3K-dependent kinase-1* (PDK1) mitjançant la fosforilació de T308 (Iida *et al.*, 2020). Aquesta fosforilació és essencial per l'activitat quinasa, però també se n'ha identificat una altra fosforilació per part del complex Rictor-mTOR a la S473 necessària per l'activitat quinasa màxima (Sarbasov *et al.*, 2005). Les proteïnes AKT

INTRODUCCIÓ

estan considerades com a oncogens perquè la seva sobre-activació pot transformar cèl·lules normals en cèl·lules canceroses (Iida *et al.*, 2020).

La PKB s'ha identificat com a substrat de les CaMKK, però el residu identificat es el mateix (T308) que es fosforilat per la PDPK1 (Yano *et al.*, 1998). La inhibició de CaMKK2 està associada amb una menor fosforilació en aquest residu, i té un efecte additiu amb la inhibició de PDPK1 (Gocher *et al.*, 2017). Per tant, semblaria que les dues quinases estan intervenint en la fosforilació d'aquest residu.

Les tres formes d'AKT es troben a tots els teixits (Figura 5). AKT1 es la més expressada a la majoria de teixits, AKT2 participa en els teixits metabòlics que responen a insulina i AKT al cervell (Manning & Toker, 2017).

- AKT1 modula el creixement cel·lular i la proliferació, intervenint també en l'apoptosi. La deficiència d'AKT1 als ratolins causa deficiències en el desenvolupament i el creixement (Chen *et al.*, 2001) (Heron-Milhavet *et al.* 2011).
- AKT2 participa en la via de senyalització de la insulina, en la diferenciació de cèl·lules musculars i en la transició epiteli-mesènquima. Els ratolins deficients en AKT2 presenten un síndrome semblant a la diabetis mellitus (Cho *et al.* 2001) (Heron-Milhavet *et al.*, 2011).
- AKT3 participa en el desenvolupament del cervell, la seva deleció causa una reducció en la mida cerebral (Easton *et al.*, 2005).

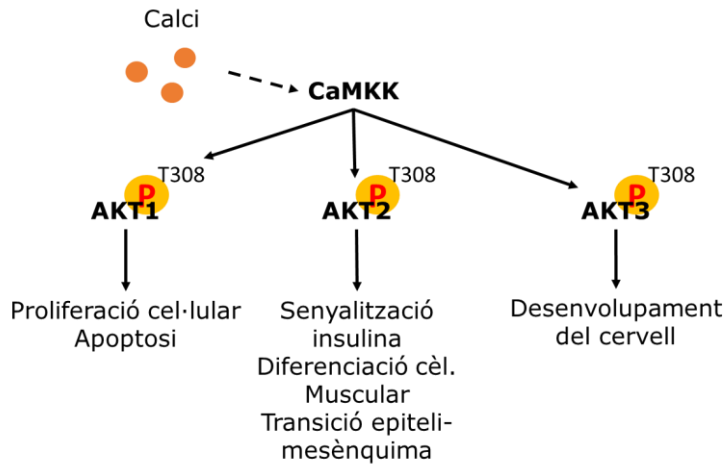


Figura 5. Senyalització d'AKT per CaMKK. Les tres formes d'AKT són fosforilades per CaMKK en resposta a variacions de la concentració de calci, intervenint en diversos processos.

2.3. CaMKK/CaMKI/CaMKIV i càncer

S'ha trobat sobre-expressada la CaMKK β en multitud de tumors: gàstrics, gliomes, ovàrics i prostàtics (Brzozowski & Skelding, 2019). La recerca sobre CaMKK β i càncer s'ha centrat en el càncer de pròstata on es troben la majoria de les investigacions. La CaMKK β es regulada pel receptor d'andrògens en línies cel·lulars de càncer de pròstata resistents a la castració i dependents d'androgen. La seva activació en aquest context afavoreix la proliferació de cèl·lules tumorals per l'activació de glicòlisis a través d'AMPK i la seva migració a teixits adjacents (Massie *et al.* 2011) (Frigo *et al.*, 2011). Tanmateix, es pot associar l'increment d'expressió amb la progressió del càncer de pròstata (Massie *et al.*, 2011), o amb un menor supervivència en pacients de glioma (Liu *et al.*, 2016). En línies cel·lulars tumorals, CaMKK β regula positivament la proliferació, migració i invasió (Brzozowski & Skelding, 2019). El silenciament mitjançant siRNA o la inhibició farmacològica de CaMKK β inhibeix la proliferacions en cèl·lules de tumors prostàtics, gliomes i tumors gàstrics (Brzozowski & Skelding, 2019).

INTRODUCCIÓ

La participació de CaMKI és necessària per la progressió del cicle cel·lular en la línia cel·lular de càncer de mama MCF-7 (Rodríguez-Mora *et al.*, 2005). La inhibició de CaMKI prolonga la supervivència de ratolins xenotransplantats amb cèl·lules de leucèmia mieloide aguda, paralitzant el desenvolupament de la malaltia (Kang *et al.*, 2018). La via CaMKK/CaMKI participa en la regulació de la migració en el medul·loblastoma, doncs l'ús de formes dominants negatives de CaMKK i CaMKI bloqueja la migració intermediada per β PIX/Rac1 (Davare *et al.*, 2010).

S'ha detectat un increment de l'activitat quinasa de CaMKIV en tumors hepàtics, pulmonars i endometrials (Brzozowski & Skelding, 2019). De fet, una alta expressió de CaMKIV es considera un marcador de pronòstic dolent per pacients de carcinoma d'endometri (Shang *et al.*, 2003) i de leucèmia mieloide aguda, on també s'ha observat una inhibició de la leucèmia *in vivo* i *in vitro* en inhibir CaMKIV (Kang *et al.*, 2018). En tumors hepàtics, la via CaMKK/CaMK4 regula l'activitat quinasa del complex mTOR1 per controlar la síntesi proteica. A més, la major expressió de CaMKK i CaMKIV estava associada amb un pitjor pronòstic. En aquests tumors, la inhibició d'aquesta via és capaç de reduir el creixement del tumor (Lin *et al.*, 2015).

Per aquests indicis, és interessant veure com CaMKK controla una gran varietat de processos de proliferació i metàstasi en tumors, pel que podria convertir-se en una diana per futurs tractaments contra el càncer.

3. Integració de senyals nutricionals

3.1. mTOR

El *mammalian target of rapamycin* (mTOR) es una proteïna que forma part d'un complex que regula la coordinació del creixement cel·lular i el metabolisme mitjançant la integració de senyals externes, provinents de

nutrients o de factors de creixement (Saxton & Sabatini, 2017). Es una serina treonina quinasa de la família de les *PI3K-related kinases* (PIKK) que és la subunitat catalítica de dos complexos diferents: *mTOR complex 1* (mTORC1) i *mTOR complex 2* (mTORC2).

3.1.1. mTORC1

El mTORC1 està format per mTOR, per Raptor (*Regulatory protein associated with mTOR*) i per mLST8 (*mammalian lethal with Sec13 protein 8*). En aquest complex, Raptor s'encarrega de reclutar els substrats mitjançant el reconeixement d'un motiu TOS (*TOR signaling motif*) en la seva seqüència (Nojima *et al.*, 2003). mLST8 estabilitza el centre actiu de mTOR per garantir l'activitat quinasa del complex (Kakumoto *et al.*, 2015).

A banda d'aquestes proteïnes que formen el core de mTORC1, existeixen proteïnes que poden regular la seva activitat, com es pot veure a la Figura 6. PRAS40 (*proline-rich Akt substrate of 40 kDa*) s'uneix a Raptor i inhibeix el reclutament de substrats (Yang *et al.*, 2017). DEPTOR (*DEP domain containing mTOR interacting protein*) inhibeix l'activitat quinasa de la proteïna mTOR (Caron *et al.*, 2018).

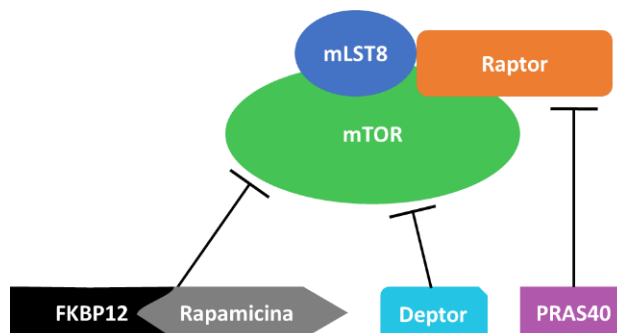


Figura 6. Estructura de mTORC1 i els seus possibles interactors.

INTRODUCCIÓ

L'activitat de mTORC1 es pot inhibir farmacològicament amb la rapamicina. La unió de la rapamicina amb la proteïna FKBP12 forma un complex que li permet unir-se a TORC1, per inhibir la seva activitat i en conseqüència, s'inhibeix la transducció de senyal i la proliferació cel·lular (Saxton & Sabatini, 2017).

L'amplia disponibilitat de nutrients al medi permet que les cèl·lules puguin créixer i dividir-se amb major freqüència. Per poder fer això, mTORC1 s'encarrega de potenciar l'anabolisme, de manera que es produeixen més lípids, proteïnes i nucleòtids, i es bloqueja el catabolisme inhibint l'autofàgia i l'apoptosi (Saxton & Sabatini, 2017). Aquesta activitat està restringida a la presència de nutrients en el medi, però també ajuda a la cèl·lula a combatre situacions d'estrès, com és el cas de l'absència de glucosa. Aquest tipus d'estrès nutricional és detectat per mecanismes com el *ratio* AMP/ATP, que indiquen a la cèl·lula la disponibilitat de fonts d'energia, i causen l'activació de AMPK. AMPK llavors, inhibeix mTORC1 per fosforilació de Raptor (Gwinn *et al.*, 2008) o pot inhibir-la indirectament per l'activació de TSC2 a través de la inhibició de RHEB (Figura 7)(Inoki *et al.*, 2003).

L'apoptosi es un procés que està activat la falta de nutrients en el medi. Una manera de provocar-la es per la deprivació d'aminoàcids essencials. En resposta a aquest estrès es produeix un increment de calci citosòlic, la activació de la via CaMKK β /AMPK i la inhibició de mTORC1. La quelació del calci intracel·lular i la inhibició de CaMKK β , causen una menor inhibició de mTORC1, i en conseqüència, menys apoptosi (Ghislat *et al.*, 2012). Per altre costat, l'activitat de CaMKK α pot contribuir a l'activitat mTORC1, però no resulta indispensable (Ferey *et al.*, 2014).

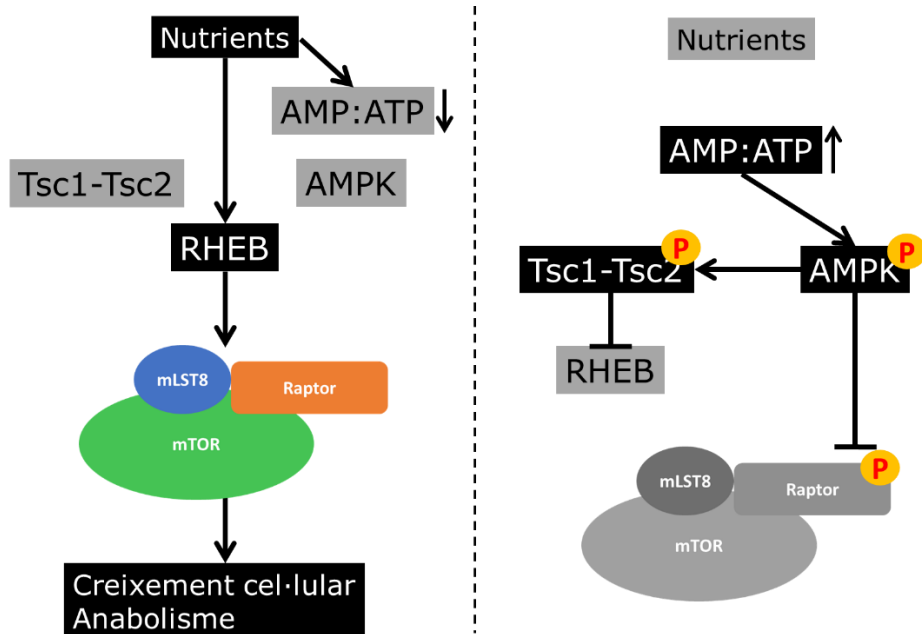


Figura 7. Regulació de l'activitat de mTORC1. A l'esquerra està representada una situació amb disponibilitat de nutrients. En color gris estan representades les proteïnes que en cada condició queden inactivades o amb una activitat reduïda.

3.1.2. mTORC2

mTORC2 conté mTOR i mLST8, però en aquest cas, conté Rictor (*rapamycin insensitive companion of mTOR*), proteïna que faria una funció similar a la de Raptor. La presència de Rictor fa que aquest complex no pugui ser inhibit per un tractament agut de rapamicina. Tot i això, sí que s'ha observat que un tractament prolongat afectaria la seva activitat, perquè la rapamicina afectaria la formació de nous mTORC2 (Saxton & Sabatini, 2017).

Altres proteïnes poden formar part del complex en certs moments, com DEPTOR, Sin1 i Protor1/2 (Figura 8). Sin1 tindria una funció similar a Rictor en el reclutament de substrats, però també pot regular l'activitat de mTORC2 mitjançant la proteïna Ras (Hua *et al.*, 2017) (Lone *et al.*, 2019). La presència de Protor no és necessària per l'estabilitat del complex, però

INTRODUCCIÓ

pot afectar l'activitat quinasa de mTORC2 sobre els seus substrats (Pearce *et al.*, 2011).

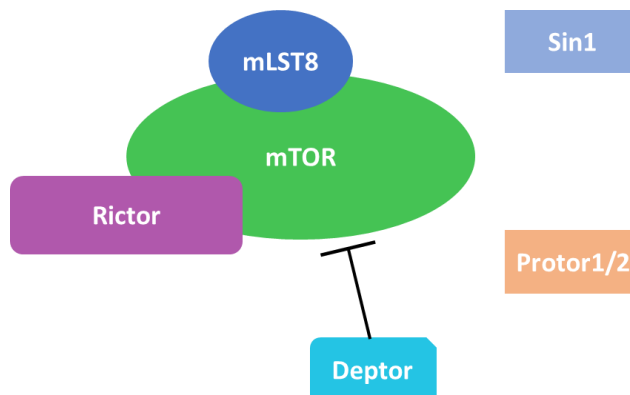


Figura 8. Estructura del complex mTORC2 i els seus interactors.

mTORC2 s'encarrega de controlar la proliferació i la supervivència mitjançant la fosforilació de membres de la família AGC com AKT, la proteïna quinasa C (PKC) i SGK (*serum and glucocorticoid-inducible protein kinase*). L'activació de AKT per mTORC2 regula la supervivència i proliferació mitjançant la fosforilació del factor de transcripció FoxO1/3a, la quinasa GSK3 β , SGK1 i l'inhibidor TSC2 (Saxton & Sabatini, 2017). L'activació de la senyalització per mTORC2 respon a la via de senyalització d'insulina-PI3K i pot ser regulada per un *feedback* positiu en el que AKT, parcialment activat, fosforila Sin1 i causa un increment d'activitat de mTORC2 que dona lloc a l'activació total de AKT (Figura 9) (Yang *et al.*, 2015).

En càncer, s'ha observat una sobre-activació dels dos complexos. mTORC1, com és un efector de vies com la PI3K o Ras/Raf/MEK/ERK, es troba hiperactivat en molts càncers d'humans. Donat que AKT dirigeix processos de proliferació, també s'ha identificat que l'activitat de mTORC2 està relacionat amb alguns casos de càncer (Saxton & Sabatini, 2017).

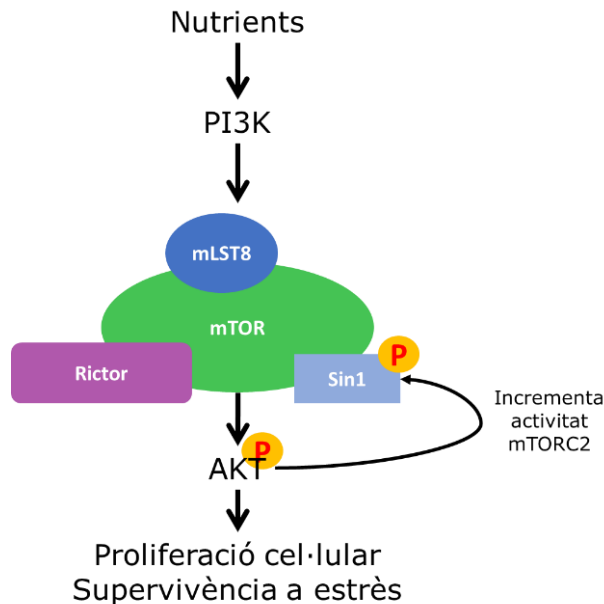


Figura 9. Regulació de l'activitat mTORC2. L'activació de AKT per mTORC2 genera una resposta de *feedback* positiu en la que es fosforila Sin1 i causa un increment en l'activitat de mTORC2.

3.2. PKA

La proteïna quinasa A (PKA) és un complex enzimàtic que té activitat serina-treonina quinasa. Està format per dues subunitats catalítiques (C) i dues subunitats reguladores (R). Existeixen diferents gens que codifiquen per aquestes subunitats. Per exemple, s'ha identificat fins a 4 gens C (α , β , γ , χ) i 4 gens R, que poden formar fins a dos tipus diferents d'holoenzims PKA (I i II). El gen PRKACA codifica per la subunitat catalítica Ca. Parlaré exclusivament d'aquesta isoforma perquè es la predominant i s'expressa a la majoria dels teixits. Presenta 10 exons que donen lloc a una proteïna de 40 kDa (351 aminoàcids) i dona lloc a 3 transcrits diferents (Turnham & Scott, 2018).

El complex PKA està inactiu fins que s'uneixen dues molècules d'AMP cíclic (cAMP) de manera cooperativa amb les subunitats R, causant un canvi conformacional que allibera les subunitats C, permetent-li realitzar la seva

INTRODUCCIÓ

funció quinasa. La concentració de cAMP, es veu molt incrementada en resposta a nutrients. Així doncs, l'activació de PKA està relacionada amb la presència de nutrients. A les subunitats R, s'hi troben unides AKAP (*A-kinase anchoring proteins*) (Welch *et al.*, 2010). AKAP permet situar PKA en varies localitzacions cel·lulars pròximes a proteïnes efectores, optimitzant la transducció del senyal. Hi ha AKAP que poden unir tant PKA com fosfatasa PP2B, permetent que l'acció de la quinasa i la fosfatasa tingui lloc en la mateixa localització (Coghlan *et al.*, 1995).

Una de les principals dianes de PKA son les CREB (*cAMP response element binding*). Aquestes proteïnes es troben unides a seqüències dels promotors, i en ser fosforilades, permeten la inducció de l'expressió gènica (Sapio *et al.*, 2014). Així es com l'activació de PKA està associada amb el metabolisme de carbohidrats i lípids, l'expressió gènica, la plasticitats sinàptica, l'estimulació sinàptica del múscul cardíac, l'angiogènesi i l'apoptosi (Jung *et al.*, 2017) (Gold, 2019). Un dels seus substrats és la CaMKK β , que la fosforila en el residu T144 i la converteix en un enzim dependent de calci i calmodulina (Tatabatake *et al.*, 2019).

3.3. EIF3

La síntesi proteica es un procés altament coordinat en el que es produeixen múltiples interaccions entre el ribosoma i els factors relacionats. Consisteix en una sèrie de passos que comença amb la traducció de ARN missatger (mRNA), continua amb l'elongació de la traducció, la terminació, i acaba amb el plegament, el targeting i el control de qualitat. El ribosoma, gràcies a les proteïnes eIF (*Eukaryotic initiation factor*), recluta i processa el mRNA. El mRNA forma un complex amb eIF4E, que aleshores s'uneix amb eIF4G, donant lloc a eIF4F. Aquest tipus d'iniciació de la traducció es coneix com *cap-dependent*. El complex eIF4F, a continuació, s'uneix amb **eIF3**, facilitant la unió amb el complex de pre-iniciació 43S. És en aquest complex 43S on es troben els ribosomes 40S, alguns ARN de transferència

(tRNA) i altres proteïnes eIF. Un cop s'ha unit, el ribosoma rastreja el mRNA en busca del codó d'iniciació, i quan el troba, procedeix a la unió amb la subunitat del ribosoma 60S, generant un ribosoma 80S actiu (Wolf *et al.*, 2019).

En els mamífers, el complex **eIF3** està format per 13 subunitats. 6 d'elles formen part del complex de manera habitual, i d'aquestes, 3 d'elles estan evolutivament bastant conservades (eIF3a, eIF3b i eIF3c), mentre que les altres 3 no (eIF3e, eIF3f i eIF3h). La subunitat eIF3b es imprescindible per la formació del complex, ja que actua de nucli, i sense eIF3b no es forma (Gomes-Duarte *et al.*, 2017). La resta de subunitats formen un octàmer generant una estructura de PCI/MPN ((*Proteasome, COP9, eiF3*)/ (*Mpr1-Pad1 N-terminal*)). El PCI (format per les subunitats a, c, e, l, k, m) està estructurat en forma d'arc, mentre que les subunitats MPN (subunitats f, h) s'uneixen entre elles. La unió entre PCI i MPN es fa a través de la interacció eIF3f-eIF3m. Un cop es produeix la unió PCI/MPN, es pot unir amb el ribosoma 40S, i les subunitats eIF3c, d y e, s'uneixen amb eIF4G per reclutar el mRNA al ribosoma (Villa *et al.*, 2013).

La presència de nutrients en el medi estimula la síntesi proteica a través de mTORC1. La proteïna eIF4E-BP1 (*eIF4E binding protein 1*) és activada per mTORC1, que allibera a la eIF4E i li permet fer la seva funció. Només quan mTORC1 es troba inhibida, es produeix la inhibició de la síntesi proteica (Hara *et al.*, 1998).

La via CaMKK/CaMKI podria participar en la regulació d'aquest complex de síntesi proteica. CaMKI fosforila a la eIF4GII en cèl·lules HeLa a la S1156 (Qin *et al.* 2003). El tractament amb l'inhibidor de CaMKK STO-609 i la mutació en el residu S1156, redueix el reclutament i la formació de la proteïna eIF4F, indicant que la CaMKK/CaMKI participa en la iniciació de la traducció *cap-dependent* (Srivastava *et al.*, 2012).

INTRODUCCIÓ

4. **Schizosaccharomyces pombe: el model.**

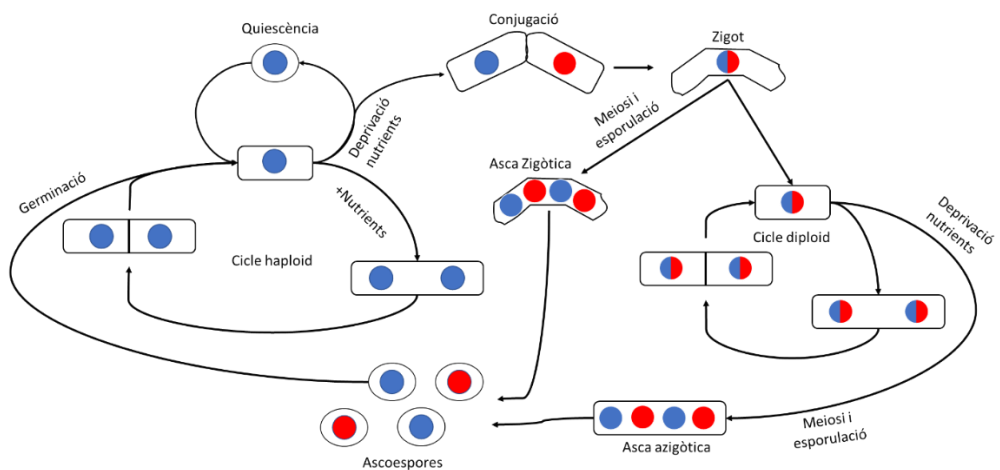
El llevat s'ha convertit en un organisme model per fer estudis científics. Juntament amb *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), més conegut, *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) ha esdevingut també important com organisme model.

Això es degut a que les característiques pròpies de l'organisme permeten la seva fàcil manipulació. Són organismes eucariotes unicel·lulars, que poden créixer en un elevat nombre en cultiu. La composició del cultiu o les condicions de creixement es poden modificar per identificar gens que participen en una gran varietat de processos. *S. pombe* pot ser haploide (un joc de cromosomes) o diploide (dos jocs de cromosomes), de manera que utilitzar soques haploides permetria analitzar l'efecte d'al·lels mutants sense que es vegin dissimulats per la presència d'un al·lel salvatge (sense mutar) en una soca diploide. Això facilita l'estudi funcional d'un gen mitjançant delecions o mutacions puntuals. La modificació del genoma és senzilla perquè els llevats tenen sistemes de recombinació homòloga que s'activen quan s'introdueix DNA modificat linealitzat, de manera que la seqüència pot ser inserida per homologia. Un altre tipus d'estudi que es pot fer es la introducció de plasmidis, principalment de sobre-expressió, per fer anàlisis funcionals (Hoffman *et al.*, 2015).

Els primers investigadors que van treballar amb *S. pombe* van començar a mitjans del segle XX de manera independent. Per una banda, Urs Leopold va identificar que les diferències en el comportament en la reproducció sexual de *S. pombe* són degudes a diferents al·lels del mateix locus. D'altra banda, Murdoch Mitchinson va identificar unes proteïnes que s'acumulaven en determinades fases del cicle cel·lular, que més tard es van conèixer com ciclines (Hoffman *et al.*, 2015). Però les contribucions més importants de *S. pombe* van ser les de Paul Nurse, per les que va guanyar el premi Nobel l'any 2001, on va identificar processos i proteïnes de *S. pombe*, que

contribuirien a descriure el control del cycle cel·lular als eucariotes (Nurse *et al.*, 1976). Un any més tard, l'any 2002, Valerie Wood publicaria la primera seqüència del genoma de *S. pombe* (Wood *et al.*, 2002). A data del 2020, existeix moltíssima informació sobre *S. pombe*, que ha permès la creació d'una base de dades anomenada PomBase, que indexa tota la informació publicada en articles científics i proporciona als investigadors dades comprensives i actualitzades sobre totes les proteïnes de *S. pombe* (Wood *et al.*, 2012).

El cycle vital de *S. pombe* es pot dividir en una fase vegetativa (o asexual) i una fase sexual (Figura 10). La fase vegetativa es produeix quan el creixement es realitza en condicions d'àmplia disponibilitat de nutrients. En aquesta fase, les cèl·lules tenen forma cilíndrica i es van allargant a mesura que avança el cycle. Quan arriba a una longitud determinada, té lloc una mitosi tancada, sense que es trenqui la membrana nuclear al centre de la cèl·lula, i a continuació es forma un septe al mig de la cèl·lula. Aquest septe, en digerir-se, dona lloc a dues cèl·lules filles de mides molt similars. La replicació es produeix immediatament després de la mitosi, així doncs, hi ha una fase G₁ molt curta i una fase S que coincideix amb la presència del septe. Un cop es produeix la septació, les cèl·lules filles es troben en G₂, la fase més llarga del cycle ocupant $\frac{3}{4}$ parts del temps d'aquest (Figura 11), fins la propera mitosi.



INTRODUCCIÓ

Figura 10. Cicle vegetatiu i sexual de *Schizosaccharomyces pombe*. Adaptat de <https://joelhuberman.net/HubermanLabArchives/BIR572/Fig3YeastGenetics.html>

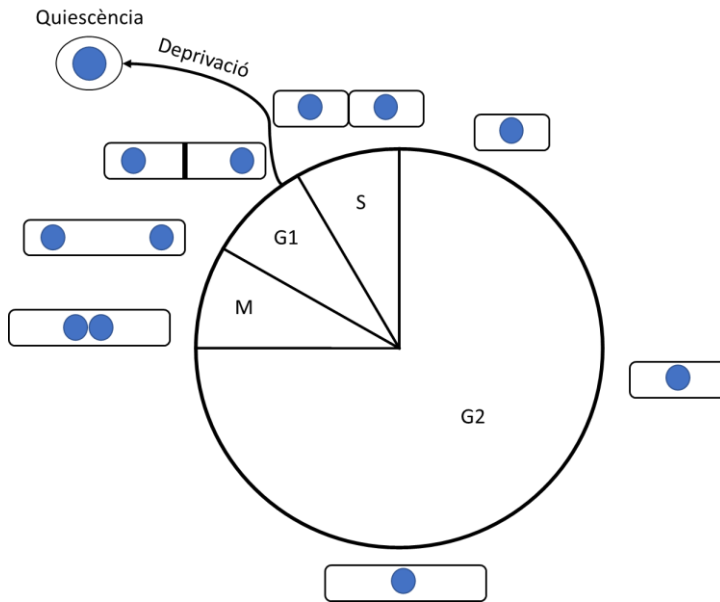


Figura 11. El cicle cel·lular de *S. pombe*. Adaptat de Gomez & Forsburg (2004).

4.1. *S. pombe*: CaMK(K)

A *S. pombe*, la calmodulina també és la responsable d'unir el calci. Només hi ha un gen que codifica per la calmodulina, *cam1*, la deleció del qual es letal (Takeda & Yamamoto, 1987). També s'ha identificat, per homologia de seqüència, proteïnes que presenten similitud amb les quinases dependents de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$: similars a CaMKKs s'ha identificat Ckk2 (o Ppk34) i Ssp1; i amb similitud a CaMKs: Cmk1, Cmk2 i Srk1.

4.1.1. Ssp1

El gen *ssp1* va ser el primer identificat com a CaMKK, ja que tenia la major similitud de seqüència entre les proteïnes descrites fins aleshores a *S. pombe* amb les CaMKK de mamífer. També presenta un domini d'unió a calmodulina, però fins ara no s'ha pogut observar experimentalment aquesta unió. (Hanyu *et al.*, 2009). Una altra similitud observada en el

mateix treball, es que com les CaMKK de mamífers, es pot unir a les proteïnes 14-3-3 de *S. pombe*, Rad24 i Rad25.

A *S. pombe*, aquesta proteïna de 74 kDa va ser primer identificada participant en la regulació del creixement polaritzat. Per sobre dels 36°C, les cèl·lules sense *ssp1* no poden créixer (Matsusaka *et al.*, 1995) i es mantenen bloquejades en patrons de creixement monopolar, és a dir, només s'allarguen per un dels pols de la cèl·lula (Koyano *et al.*, 2010). Això és degut a que Ssp1 manté, per una banda, el funcionament del cycle cel·lular mantenint la fosfatasa Cdc25 activada mitjançant la inhibició de Srk1 en aquestes temperatures, i per una altra, la polaritat a través de la seva interacció amb la twinfilina (*twf1*), una proteïna que inhibeix la nucleació de filaments d'actina (Gómez-Hierro *et al.*, 2015). El paper de Ssp1 en regulació de la polaritat s'ha associat preferentment a la fosforilació del residu T299 de Kin1, una quinasa que modula el canvi de creixement de bipolar a monopolar (Lee *et al.* 2018).

La proteïna Cdr2 és l'encarregada d'inhibir la quinasa Wee1 amb l'objectiu de permetre la mitosi. No obstant, gràcies al control de Ssp1 i Pom1, l'activitat de Cdr2 depèn de la mida de la cèl·lula (Figura 12). Quan la cèl·lula és petita, Pom1 es troba als extrems i pot fosforilar Cdr2 que es troba cap al centre. Aquesta fosforilació redueix la capacitat de Ssp1 de fosforilar Cdr2 i activar-la. A mesura que va creixent la cèl·lula, i els seus extrems es van allunyant, la fosforilació de Pom1 es redueix, permetent que Ssp1 pugui fosforilar Cdr2 a la T166 per activar-la i permetre l'entrada a mitosi (Deng *et al.*, 2014) (Facchetti *et al.*, 2019). Aquest residu també és defosforilat per les fosfatases de la família PP2A (Deng *et al.*, 2017).

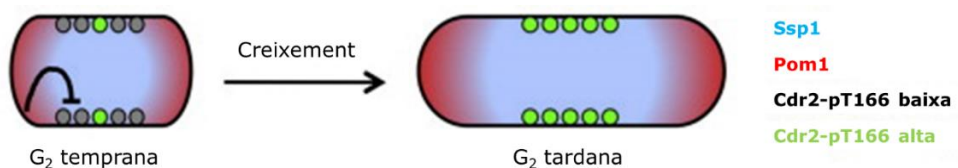


Figura 12. Control per Ssp1 i Pom1 de la mida de la cèl·lula i la mitosi. La figura prové del treball de Deng *et al.*, 2014.

INTRODUCCIÓ

Ssp1 també està implicada en respostes a estrès nutricional per privació. Presenta una regió de seqüència molt conservada amb les CaMKK humanes que es necessària pel creixement a concentracions molt baixes de glucosa (Hanyu *et al.*, 2009). La seva funció és necessària per reduir la mida cel·lular en aquestes condicions però no per la supervivència a fase G₀ (Yanagida *et al.*, 2011). Quan soques que creixen en medi mínim són privades de glucosa, les cèl·lules deixen de créixer durant el temps en que es produeixen entre una i dues generacions per posteriorment tornar-se a dividir (Saitoh & Yanagida, 2014). A més, les soques sense Ssp1 mostren una reducció en el consum de glucosa quan creixen a concentracions baixes de glucosa en cultiu. Això es a causa de que Ssp1 regula la localització del repressor amb la fosfatasa Sds23, enviant-lo al citoplasma i permetent l'expressió del transportador d'hexoses Ght5 (Saitoh *et al.* 2014).

En les situacions que s'han descrit al paràgraf anterior, Ssp1 fosforila a la proteïna Ssp2, la subunitat catalítica del complex AMPK a *S. pombe*, el residu conservat T189. Aquesta fosforilació causa que Ssp2 pugui entrar al nucli i fosforili factors de transcripció com Mei2, que participa en els processos de conjugació i esporulació. En conseqüència, les soques sense Ssp1 o Ssp2, mostren una reducció considerable en la formació d'espores (Valbuena & Moreno, 2012). L'activació d'aquesta via, a més, està facilitada per Epe1, un regulador de la cromatina que pot inhibir la síntesis d'àcids grassos (Chen *et al.*, 2017).

La fosforilació del residu T189 en privació de glucosa està causada exclusivament per Ssp1 (Deng *et al.*, 2017). Tot i això, s'ha observat que mentre que es necessària una primera fosforilació de Ssp1 per la funció de Ssp2, una segona fosforilació en el mateix residu per part de Ckk2 es afegida durant els primers 30 minuts de privació de nitrogen (Davie *et al.* 2015). Quan es torna a unes condicions òptimes de creixement, la fosfatasa *ppe1* elimina el fosfat del residu T189 (Deng *et al.* 2017).

Durant l'estrès osmòtic, Ssp1 es relocalitza ràpidament a la membrana. Aquesta relocalització és important ja que s'ha observat que les soques sense Ssp1 no poden créixer en medis amb alta osmolaritat ni pH àcid (3,5)(Rupeš et al. 1999). La proteïna 14-3-3 no es necessària en la relocalització, però si que s'ha observat que la sobre-expressió de Rad24 redueix la presència de Ssp1 a la membrana (Freitag *et al.* 2011). L'activació de Ssp2 per Ssp1 s'ha descrit per diversos estressos osmòtics, però no per estrès de calci (Schutt & Moseley, 2017).

L'expressió de Ssp1 podria estar regulada pel gen *mog1*, que forma part d'un complex Ran GTPasa, ja que la sobre-expressió de Ssp1 pot revertir la sensibilitat a la temperatura observada en els mutants termosensibles *mog1-3* (Oki *et al.* 2007).

4.1.2. Cmk1

Cmk1 es una proteïna de 38 kDa que presenta una identitat de seqüència propera al 40% amb la CaMK1 de mamífers. Presenta 5 exons i té seqüències d'unió a la calmodulina. El residu T192, diana de la CaMKK també s'hi troba en la seva seqüència, i la falta de fosforilació observada en mutants d'aquest residu ens permet veure que és necessari per assolir una major activitat.

L'expressió a nivell de mRNA es baixa durant el cicle, i s'observa un pic d'expressió durant la transició G₁/S. L'activació constitutiva de Cmk1 redueix la proliferació cel·lular (Rasmussen, 2000). La deleció de Cmk1 s'ha associat també a un patró monopolar de creixement a altes temperatures (Koyano *et al.*, 2010).

En resposta a calci, es produeix un increment a nivell de mRNA i a nivell de proteïna, on també es veu fosforilada. L'increment de mRNA està causat pel factor de transcripció Prz1 (*Ppb1-responsive zinc finger protein*)

INTRODUCCIÓ

(Cisneros-Barroso *et al.*, 2014). L'activitat de Prz1 està regulada per la fosfatasa calcineurina, que en resposta a estímuls de calci, la defosforila i permet l'entrada de Prz1 per fer la funció de transcripció (Hirayama *et al.*, 2003). Tanmateix, Prz1 està sota control d'un feedback negatiu, donat que Cmk1 la fosforila, causant que retorni al citoplasma. La falta de Cmk1 causa el manteniment de l'activitat de Prz1 al llarg del temps i que les cèl·lules continuïn creixent sota un estrès de calci. Això es deu a que Cmk1 és responsable de l'aturada del cicle en resposta a calci per fosforilació de la fosfatasa Cdc25 (Cisneros-Barroso *et al.*, 2014).

4.1.3. Srk1

Srk1 és una altra proteïna amb similitud de seqüència amb CaMK però funcionalment homòloga a les MAPKAP (*MAP kinase-activated proteins*) quinases. És una proteïna de 66 kDa, la funció de la qual en resposta a un estrès tèrmic, osmòtic i oxidatiu depèn de la MAPK de *S. pombe*, Sty1. A la seva estructura s'hi ha identificat motius d'unió a les MAPK, als que es pot unir Sty1 estigui Srk1 fosforilada o no. La unió amb Sty1 no causa canvis en l'activitat de la MAPK, però permet la fosforilació de Srk1 per Sty1 en resposta a estrès (Smith *et al.*, 2002) al residu T463 (Lopez-Avilés *et al.*, 2008). El nostre grup també ha observat que Srk1 necessita estar unida a Sty1 per evitar la seva degradació. Un cop l'estrès osmòtic causa la fosforilació de Srk1 per Sty1, el complex Sty1-Srk1 entra al nucli i aleshores es dissocia. Srk1 llavors es dissocia de Sty1, que fosforila altres dianes com factors de transcripció (Asp *et al.*, 2008), el que redueix l'estabilitat i li dona un interval de temps molt curt per fosforilar les seves proteïnes diana abans de degradar-se (Lopez-Avilés *et al.*, 2008).

Srk1 pot inhibir la fosfatasa Cdc25 per fosforilació en el seu extrem N-terminal en resposta a un estrès osmòtic per induir un bloqueig del cicle cel·lular en una fase G₂ tardana. Fosforilada, Cdc25 es trasllada al citoplasma unida amb Rad24, la qual la protegeix de la degradació (Figura

13) (Lopez-Avilés *et al.*, 2005) (Lopez-Avilés *et al.*, 2008). En soques Δ srk1, on no es produeix aquest bloqueig del cicle en G₂, s'observa una entrada molt més ràpida en el cicle meiótic que en les soques salvatges, com a conseqüència d'aquest fet (Smith *et al.*, 2002). No obstant, també existeixen mecanismes que permeten localitzar Cdc25 independentment de la presència de Srk1 (Paul *et al.*, 2018).

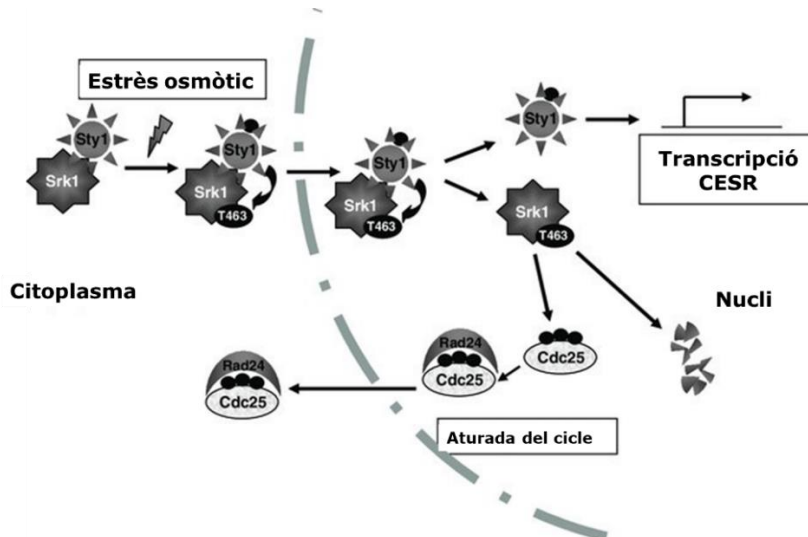


Figura 13. Srk1 bloqueja el cicle cel·lular en resposta a estrès osmòtic. La figura ha sigut extreta de Lopez-Avilés *et al.*, 2008.

La regulació del cicle està conservada en mamífer, doncs s'ha descrit que la MAPKAP-2 quinasa, homòloga de Srk1 en *H. sapiens*, és capaç de fosforilar Cdc25 per bloquejar el cicle (Manke *et al.*, 2005). També és aprofitada per la proteïna R del virus de la immunodeficiència humana tipus I (HIV-1, proteïna Vpr) per induir l'arrest del cicle en G₂ tant a *S. pombe* com en humans per obra de la interacció amb Srk1 o el gen MK2 humà. En conseqüència, es capaç de prevenir la expansió clonal de limfòcits T (Huard *et al.*, 2008).

Per acabar, en el nostre grup hem identificat que Ssp1 actua com un sensor que assegura una correcta polaritat i mida cel·lular que inhibeix Srk1 per evitar el bloqueig del cicle (Gómez-Hierro *et al.*, 2015).

INTRODUCCIÓ

4.1.4. Cmk2

Cmk2 és una serina-treonina quinasa de 57 kDa que presenta elevats percentatges d'identitat amb les proteïnes RCK1 y RCK2 de *S. cerevisiae* i les CaMKI/CaMKII de mamífers. Aquest gen participa en la resposta a l'estrès oxidatiu i es fosforilat per Sty1 en el residu T411 (Sánchez-Piris *et al.*, 2002). El nostre grup ha identificat la importància de Cmk2 en aquesta resposta, en el cas de l'estrès oxidatiu causat per arsènic, ja que s'ha observat que regula negativament la traducció de proteïnes gràcies a una interacció amb la quinasa Cpc2, que forma part de la subunitat petita del ribosoma (Sanchez-Marinás *et al.*, 2018).

L'expressió de Cmk2 oscil·la durant el cicle cel·lular, amb un increment després de l'anafase mitòtica i un descens quan s'entra en la fase G₂. Podria ser que la seva funció sigui bloquejar l'entrada a mitosis a través de la inhibició de Cdc2 (Alemany *et al.*, 2002). Així mateix, es veu incrementada en ser exposada a estrès osmòtic (Alao *et al.*, 2010). Podria estar participant en la regulació de la polaritat cel·lular, donat que la seva deleció causa un increment en cèl·lules exposades a altes temperatures de cèl·lules en creixement monopolar (Koyano *et al.*, 2010). També podria participar en les respostes a concentracions baixes de glucosa, ja que en soques sense Cmk2 s'ha identificat un descens de la producció de coenzim Q, un component de la cadena de transport d'electrons que s'indueix en concentracions baixes de glucosa i està regulat negativament pel complex PKA (Nishida *et al.*, 2019)

5. Deprivació nutricional a *S. pombe*

Quan comencen a faltar nutrients al medi (*nutrient starvation*), una cèl·lula haploide té dues opcions, segons si troba parella o no:

- Si hi ha cèl·lules del tipus d'aparellament contrari, s'aparella, entra al cicle sexual i realitza la conjugació (*mating*).

Abans d'entendre el concepte de tipus d'aparellament, hem d'entendre que *S. pombe* pot ser homotàl·lic o heterotàl·lic. Es consideren homotàl·liques aquelles soques que no tenen sexes diferents, i heterotàl·liques les que sí els tenen.

En aquest procés està implicat el gen *mat1*, que pot tenir dos al·lells diferents P (h^+) o M (h^-). En les soques heterotàl·liques, les cèl·lules només poden conjuguar amb aquelles cèl·lules que no tinguin el mateix al·lel. L'expressió d'aquest gen promou la diferenciació sexual i el *mating*; i quan co-expressen els dos al·lells al zigot, la meiosi i l'esperulació. En les cèl·lules homotàl·liques (h^{90}), aquesta necessitat no existeix, perquè tenen la capacitat de canviar d'al·lel, de manera que en un mateix cultiu poden existir cèl·lules amb l'al·lel P i cèl·lules amb l'al·lel M. Aquestes soques poden fer això perquè contenen uns gens silenciats *mat2-P* i *mat3-M*, que representen als al·lells P i M, respectivament, que poden ser intercanviats pel gen *mat1* (Maki *et al.* 2018).

Durant la conjugació es forma una cèl·lula única amb dos nuclis, que posteriorment es fusionen per formar el zigot diploide. A continuació, comença la meiosi i es formen 4 cèl·lules haploides, al voltant de les quals es forma una paret gruixuda i es genera una asca (*S. pombe* es un fong ascomicet) que conté les quatre espores (Figura 10). Aquesta asca es una estructura resistent que perdura en condicions extremes o de restricció de nutrients durant bastant de temps. Quan comença a detectar nutrients, l'asca es trenca i allibera les espores, que germinen al medi i entren en fase vegetativa.

- Si no hi ha cèl·lules del tipus d'aparellament contrari, la cèl·lula entra en quiescència (fase G_0).

Quan s'elimina el nitrogen del medi, les cèl·lules es divideixen dos vegades ràpidament abans de quedar-se aturades en fase G_0 des de la fase G_1 (Costello *et al.* 1986), adquirint una morfologia petita i rodona. Malgrat no

INTRODUCCIÓ

dividir-se més, aquestes cèl·lules continuen sent metabòlicament actives, consumint glucosa de manera més moderada i reciclant nutrients gràcies a mecanismes cel·lulars com l'autofàgia (Hajiki *et al.*, 2018). És gràcies a això que les cèl·lules en fase G_0 , poden resistir setmanes i mesos sense nitrogen i són més resistents a estrès per calor. A continuació, poden tornar a entrar al cicle quan es reposa el nitrogen al medi (Su *et al.*, 1996). Fins ara, s'ha identificat 85 gens necessaris per poden entrar en fase G_0 , entre els que es troben gens implicats en autofàgia i gens que codifiquen per fosfatases (Hajiki *et al.*, 2018).

D'altra banda, amb independència de l'aparellament, hi ha descrites varies vies metabòliques que participen en la resposta a la deprivació de nutrients, entre les que es troben les que impliquen el complex TOR i les que impliquen a la proteïna PKA.

5.1. El complex TOR (TORC)

Com en els mamífers, *S. pombe* presenta dos complexos TORC. Les seves funcions resulten similars, però la particularitat que té *S. pombe* es que la subunitat catalítica pot estar formada per dues proteïnes Tor diferents, anomenades Tor1 i Tor2. A més, els dos complexos juguen papers oposats en la diferenciació sexual com a resposta a la deprivació de nitrogen.

5.1.1. TORC1

El complex TOR 1 (TORC1) està format per la quinasa Tor2; l'ortòleg de Raptor, Mip1; l'ortòleg de mLST8, Pop3; i la subunitat Tco89 (Hayashi *et al.*, 2007) (Figura 14). Tor2 es un gel essencial, el que significa que la seva absència és letal per la cèl·lula *pombe*. Per treballar amb alteracions de Tor2 es treballa amb mutants Tor2 que presenten una mutació puntual en la seva seqüència que redueix l'activitat de Tor2 a un mínim que permet a la cèl·lula créixer a temperatures permissives. No obstant, l'exposició d'aquest mutant a una temperatura superior tornaria a generar un fenotip

letal. En el cas de *tor2*, s'ha generat el mutant *tor2-51*, que a temperatures superiors a 32°C no son funcionals i presenten un fenotip semblant al de les cèl·lules deprivades de nitrogen, a més de veure's induïda l'expressió d'inhibidors del cicle i gens de resposta a deprivació de nitrogen. D'altra banda, la sobre-expressió d'aquesta subunitat impedeix la diferenciació sexual i l'aparellament. Per tant, Tor2 estaria garantint el creixement cel·lular en condicions òptimes mitjançant la inhibició d'inhibidors del cicle i de gens de resposta a estrès com els implicats en la diferenciació sexual (Alvarez & Moreno, 2006).

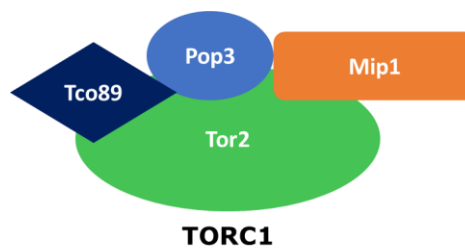


Figura 14. Estructura del complex TORC1. Mip1 és el homòleg de Raptor en *S. pombe*, Pop3 es l'homòleg de mLST8 en *S. pombe*.

TORC1 pot ser inhibit per la rapamicina, de fet, els mutants de *tor2* són molt sensibles a aquesta droga (Hayashi *et al.*, 2007). La rapamicina inhibeix la diferenciació sexual en deprivació de nitrogen però no es capaç d'aturar el creixement en condicions òptimes (Weisman *et al.*, 1997). Com que es possible que la inhibició de TORC1 no sigui total, la combinació de rapamicina i cafeïna s'ha descrit capaç d'aturar el creixement i d'induir autofàgia (Takahara & Maeda, 2012). En aquest cas, el tractament de rapamicina i cafeïna prolonga l'esperança de vida en medi ric (Rallis *et al.*, 2013). Tanmateix, també existeixen altres inhibidor com Torin-1 que poden inhibir tant TORC1 com TORC2. En conseqüència, el tractament amb Torin1 atura el creixement sense que hi hagi mort cel·lular. De fet, la inhibició de TORC1 sembla accelerar l'entrar a mitosi abans d'aturar el cicle, a través de la reducció de nivells de Wee1 (Atkin *et al.*, 2014).

INTRODUCCIÓ

La funció de TORC1 es realitza per mitjà de fosforilació d'una gran quantitat de substrats que trobareu resumida en la figura 15. A continuació, anirem explicant quins substrats són i en quins processos estan participant.

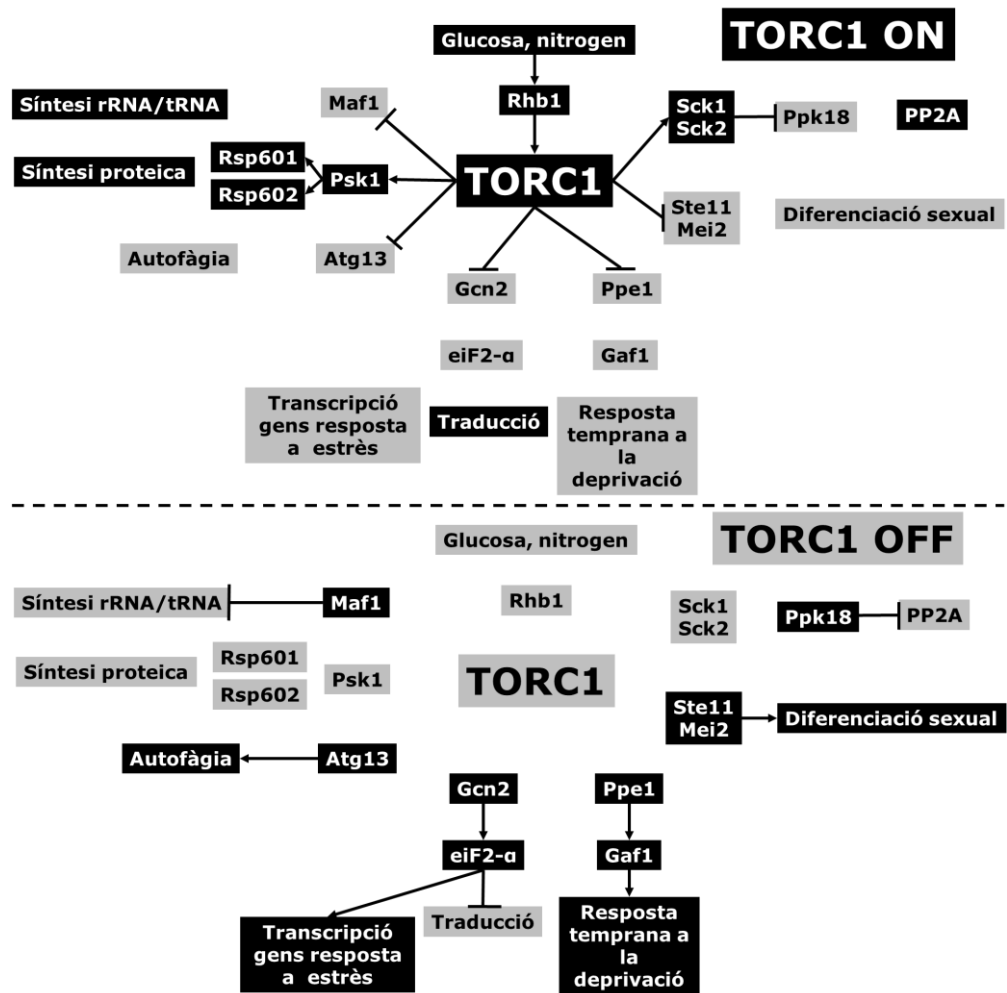


Figura 15. Funcions associades a l'activació i la inhibició de TORC1. A la part de dalt es presenten les funcions associades a l'activació, i a la part de baix, les associades a la inhibició. En color negre estan representats els nutrients, les proteïnes i les funcions activades en cada condició. De color gris, aquelles funcions o proteïnes desactivades o menys actives.

Control de la síntesi proteica:

La fosforilació de la proteïna S6 quinasa Psk1 a la T392 i T415 promou la síntesi proteica quan hi ha fonts de nitrogen i glucosa al medi de cultiu

INTRODUCCIÓ

(Nakashima *et al.*, 2012). L'activació de Psk1 causa la fosforilació de la proteïna ribosoma S6, representada a *S. pombe* per Rps601 i Rps602 (Nakashima *et al.*, 2010).

La fosforilació del repressor Maf1 en condicions òptimes de creixement permet a TORC1 regular-lo negativament. Gràcies a això, la síntesi de RNA estructurals com els ribosòmics o els de transferència a través de RNA polimerasa III (RNA pol III) es manté activada (Du *et al.*, 2012). Quan Maf1 està defosforilat, en canvi, la transcripció de RNA pol III queda detinguda (Otsubo *et al.*, 2017).

TORC1 controla negativament l'activitat de la quinasa Gcn2, que s'encarrega de fosforilar eIF2a. Quan està activat, eIF2a es manté defosforilada, i com a conseqüència, es manté la traducció. Es quan TORC1 s'inactiva, que s'activa Gcn2 i fosforila eIF2a a la S52, inhibint la traducció i activant la transcripció de gens de resposta a estrès (Valbuena *et al.*, 2012).

TORC1 pot controlar l'aportació de nitrogen a la cèl·lula, ja que pot controlar la localització i l'expressió dels transportadors d'aminoàcids. Per exemple, la sobre-activació de Tor2 en deprivació de nitrogen impedeix la translocació de transportadors d'aminoàcids com Agp3 (Liu *et al.*, 2015).

La localització del factor de transcripció Gaf1 està regulada per TORC1. La inhibició de TORC1 causa la ràpida translocació al nucli de Gaf1, on promou la transcripció de transportadors d'aminoàcids (Ma *et al.*, 2016). L'estat de fosforilació de Gaf1 regula la seva localització: en condicions òptimes de creixement, Gaf1 es troba fosforilat al citoplasma. Quan es produeix la deprivació d'aminoàcids, Gaf1 és defosforilada per la fosfatasa Ppe1 i es transloca al nucli. L'activació de Ppe1 en deprivació es deu a que TORC1 deixa d'inhibir-la. Per tant, quan TORC1 està inactiu, Ppe1 defosforila Gaf1, qui pot entrar al nucli i exercir la seva activitat (Laor *et al.*, 2015) regulant

INTRODUCCIÓ

l'expressió de fins a 200 gens (Rodríguez-Lopez *et al.*, 2020). No obstant, l'activitat de Gaf1 es troba limitada a les primeres hores de deprivació de nitrogen, en les que inhibeix l'expressió de Ste11, un factor de transcripció importantíssim en el "mating" i la meiosi (Kim *et al.*, 2012) i estimula l'expressió de Isp7, un regulador de la importació d'aminoàcids (Laor *et al.*, 2015).

Control de la mida cel·lular

Les quinases Sck1 i Sck2 son activades per TORC1 en resposta a nutrients (Nakashima *et al.*, 2012) i tenen funcions redundants a les de la proteïna Pka1 (Jin *et al.*, 1995) (Fujita & Yamamoto, 1999). La sobre-expressió de Sck2 causa l'increment de la transcripció de gens implicats en el creixement cel·lular (Weston *et al.*, 2017).

Sck2 fosforila Ppk18 per inhibir la via Greatwall-Endosulfina. En presència de nutrients, aleshores, aquesta via es veu inhibida, de manera que la fosfatasa PP2A es manté activa i evita l'entrada en mitosi mitjançant l'activació de Wee1. Quan falten els nutrients, s'activa la Ppk18 i s'inhibeix la PP2A, i les cèl·lules entren en mitosi tot i que tinguin una mida més petita (Chica *et al.*, 2016). Sck2 també regula a través de Pmt1, la metilació de RNA de transferència (Becker *et al.*, 2012).

Inhibició de l'autofàgia

TORC1 fosforila Atg13 per inhibir l'autofàgia. La inactivació de TORC1 per mutants termosensibles o per deprivació de nitrogen causa la desaparició de la fosforilació d'Atg13 i l'inducció de l'autofàgia (Kohda *et al.*, 2007) (Otsubo *et al.*, 2017).

Inhibició de la reproducció sexual

Existeixen diferents maneres per les que TORC1 pot regular negativament la diferenciació sexual.

TORC1 controla la localització cel·lular de factors de transcripció que controlen la reproducció sexual. Ste11 és responsable de l'expressió de gens necessaris per la reproducció sexual. TORC1 evita l'acumulació de Ste11 en condicions òptimes de creixement, per evitar que faci la seva funció (Valbuena & Moreno, 2010).

D'altra banda, TORC1 evita la inducció de l'expressió de Mei2 (Matsuo *et al.*, 2007). Mei2 participa en el canvi de cicle mitòtic a meiòtic. TORC1 regula la fosforilació de Mei2 en condicions òptimes, ja que la fosforilació de Mei2 comporta una reducció en la seva estabilitat. En deprivació de nitrogen, quan TORC1 es inactiu, la estabilitat de Mei2 es més elevada i li permet fer la seva funció (Otsubo *et al.*, 2014).

Un altre factor de transcripció regulat per Tor2 seria Fhl1, que regula positivament gens implicats en el procés d'esperulació, donat que s'ha observat que els dos regulen el mateix subconjunt de gens i que la sobre-expressió de Fhl1 permet suprimir el fenotip d'esperulació observat en els mutants termosensibles de Tor2 (Pataki *et al.*, 2017).

Altres funcions

TORC1-PP2A regula l'obtenció d'energia per fermentació alcohòlica en absència d'oxigen (Watanabe *et al.*, 2018).

¿Com es produeix la integració de senyals?

Hi ha diferents proteïnes que, de manera paral·lela, estimulen a TORC1 contínuament mentre hi hagi nutrients al medi. Així és com TORC1 es converteix en el complex que aglutina diferents senyals nutricionals.

La GTPasa Rhb1 activa TORC1 en resposta a l'estímul nutricional (Urano *et al.*, 2007). Tanmateix, també s'ha descrit Bhd1 com activador de la via (Van Slegtenhorst *et al.*, 2007). Però la sobre-activació de TORC1 resulta

INTRODUCCIÓ

tòxica, pel que existeix un complex format per les proteïnes Gtr1/Gtr2, la localització del qual està regulada pel complex GATOR1, que participa en la atenuació de la senyalització TORC1 en condicions nutricionals òptimes (Chia et al., 2017) (Fukuda & Shiozaki, 2018).

La reducció de nitrogen està associada a variacions en el *ratio* ATP/AMP, que activen la AMPK de *S. pombe* Ssp2, per inhibir TORC1 durant els primers minuts de deprivació de dues maneres: directament (Davie et al., 2015) o a través de l'activació del complex format pel dímer Tsc1/Tsc2, que inhibeix Rhb1 (Aspuria et al., 2007) (Forte et al., 2019). A més de AMPK, la quinasa Gsk3 també pot actuar com un regulador negatiu de TORC1 en resposta a estrès (Rallis et al., 2017).

La disponibilitat de certs aminoàcids pot controlar l'activitat de TORC1, ja que alguns com la glutamina, la aspargina, l'aspartat i l'arginina són els que activen més ràpidament TORC1 un cop es treu el cultiu d'una situació de deprivació de nitrogen. La falta d'enzims que participen en la síntesi d'aquest aminoàcids, com és el cas de Caa1, que es troba a la ruta biosintètica de l'aspartat, evita l'activació total de TORC1 (Reidman et al., 2019).

El control de qualitat de proteïnes de la cèl·lula també pot afectar a l'activitat de TORC1. Hi ha drogues com la brefeldina A que causen estrès del reticle endoplasmàtic. En resposta a aquest estrès, TORC1 és inactivat gràcies a la quinasa Ppk32 per inhibir la síntesi proteica. Ppk32 també inhibeix TORC1 durant la diferenciació sexual (Kowalczyk & Petersen, 2016).

5.1.2. TORC2

El segon complex està format per la quinasa Tor1; Pop3; l'ortòleg de Protor, Bit61; la proteïna d'interacció Sin1 i l'ortòleg de Rictor, Ste20 (Ikai et al., 2011) (Figura 16).

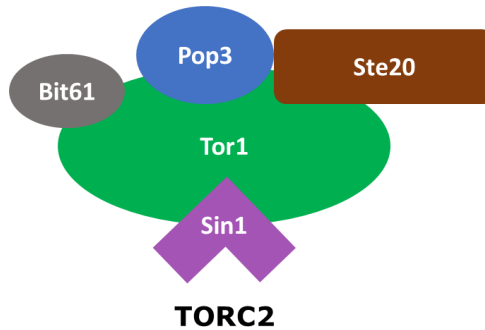


Figura 16. Components del complex TORC2. En forma part Tor1, Pop3 (homòleg de mLST8), Ste20 (homòleg de Rictor), Bit61 i Sin1.

El principal substrat de l'activitat d'aquest complex es Gad8, un membre de la família de les AGC quinases que presenta similituds amb les proteïnes AKT i SGK quinases dels mamífers (Du *et al.*, 2016). La interacció entre Gad8 i TORC2 està mediada per Sin1, que s'encarrega del reconeixement de les regions CRIM dels substrats del complex TORC2 (Tatebe *et al.*, 2017). D'altra banda, perquè TORC2 pugui fosforilar Gad8, es necessari que sigui fosforilada Pop3 (Ahamad *et al.*, 2018).

Regulació de la via TORC2-Gad8

Gad8 presenta en la seva seqüència diferents llocs de fosforilació: Tor1 fosforila S527 i S546; i Ksg1 fosforila T387 (Figura 17)(Matsuo *et al.*, 2003). La fosforilació en la posició T387 és essencial perquè la mutació a alanina d'aquest residu dona lloc a una Gad8 catalíticament inactiva. L'activació de Gad8 es fonamental, ja que exerceix una resposta de feedback negatiu en la que fosforil·la a Tor1 en el residu T1972 i redueix l'activitat quinasa de Tor1. La reducció d'aquesta activitat quinasa es un procés que es produeix en els primers 5 minuts de deprivació de nitrogen i és necessària per a que es produeixi la diferenciació sexual (Hálová *et al.*, 2013).

A la seqüència de Gad8 s'hi troba també un residu altament conservat en les SGK de mamífer, el residu T6, que controla la regulació recíproca entre

INTRODUCCIÓ

Tor1 i Gad8, ja que la seva fosforilació impedeix la interacció física entre Gad8 i Tor1. Aquest residu es troba en la seqüència consens de les PKC, i podria ser fosforilat per Pck2, ja que la sobre-expressió de Pck2 presenta fenotips similars a soques que presenten mutacions fosfomimètiques del residu T6 (gad8-T6D) (Du *et al.*, 2016).

La fosforilació de Gad8 per Tor1 va canviant segons les condicions de cultiu. S'ha observat una reducció de la fosforilació en el residu S546, que causa una menor activitat de Gad8 cap al seu substrat Fkh2 en condicions d'estrès osmòtic i de deprivació de glucosa. La presència de glucosa, de fet, és essencial per aconseguir la màxima activitat de Tor1 i requereix de la via PKA (Cohen *et al.*, 2014). L'eliminació de glucosa causa una reducció de l'activitat de Tor1 en els instants inicials de la deprivació (Hatano *et al.*, 2015).

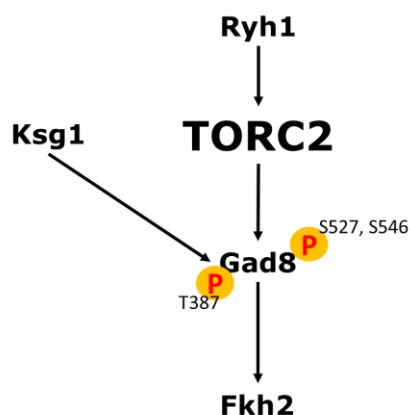


Figura 17. Regulació de l'activitat del complex TORC2. La presència de glucosa causa l'activació de Ryh1 i la fosforilació de TORC2. Un cop activat, TORC2 fosforila Gad8 en els residus S527 i S546, que ha sigut prèviament fosforilada per Ksg1 en el residu T387. L'activitat de Gad8 causa l'activació de la funció transcripcional del factor de transcripció Fkh2.

Per l'activitat de TORC2, és necessari la integració de les senyals de glucosa per Ryh1 a través del complex GEF format per Sat1-Sat4 (Tatebe *et al.*, 2010). Quan deixa d'haver glucosa a la cèl·lula Ryh1 es queda inactivat, donant lloc a la menor activitat de TORC2. La inactivació de Ryh1 per la Pmk1 ha sigut descrita en condicions de deprivació de glucosa

(Cohen *et al.*, 2014) i quan s'activa el *Cell Integrity Pathway* (CIP) per una alteració de la paret cel·lular (Madrid *et al.*, 2016). Tot i això, la reintroducció de glucosa en soques sense Ryh1 torna a activar TORC2, indicant que existeixen mecanismes independents de Ryh1 per activar TORC2 en presència de glucosa (Hatano *et al.*, 2015).

Funcions de TORC2-Gad8

Tot i que no és necessari pel creixement en medi ric, TORC2 es necessari per les respostes a estrès i la reproducció sexual. Les cèl·lules sense Tor1 ($\Delta tor1$) no poden créixer en situacions d'estrès nutricional, osmòtic o oxidatiu, i son incapaces de fer reproducció sexual (Weisman & Choder, 2001). També un estrès tèrmic o la inhibició de la senyalització de calci/calmodulina i la calcineurina impedeix el creixement de cèl·lules $\Delta tor1$ (Kawai *et al.*, 2001).

L'activitat de TORC2 pot ser inhibida en condicions de deprivació nutricional, amb TORC1 ja inactiu, amb rapamicina, reduint la capacitat de les cèl·lules per captar aminoàcids. Per tant, TORC2 actua incrementant la captació d'aminoàcids en resposta a un estrès nutricional (Weisman *et al.*, 2005). Existeixen altres inhibidors més efectius com Torin1, que poden inhibir l'activitat quinasa de TORC1 i TORC2 (Atkin *et al.*, 2014).

La captació de glucosa en condicions de deprivació nutricional està regulada per Tor1. La localització del transportador Ght5 a la membrana, que té una elevada afinitat per la glucosa i li permet captar-la a concentracions molt baixes, està regulada positivament per Tor1 (Saito *et al.*, 2015).

És possible que TORC2 participi en l'entrada a mitosi ja que les cèl·lules $\Delta tor1$ són més allargades que les cèl·lules salvatges en medi ric (Kawai *et al.*, 2001). La reducció en la mida de la cèl·lula causada per l'entrada en la deprivació de glucosa es depenent de Tor1 i Ssp1 (Yanagida *et al.*, 2011)

INTRODUCCIÓ

i de Tor1 en deprivació de nitrogen (Petersen & Nurse, 2007). Aquesta funció és independent de la presència dels components de TORC2 Ste20 i Sin1. En concret, sembla que Tor1 forma un pseudocomplex TORC1 amb Mip1 de TORC1, per intervenir en l'entrada a mitosi (Hartmuth & Petersen, 2009).

Una altra funció que regularia TORC2 en la resposta a estrès es l'expressió de gens implicats en la supervivència a llarg termini. El mutant $\Delta tor1$ pot sobreviure durant més temps en cultius en fase de saturació (Ohtsuka *et al.*, 2013).

Hi ha evidències de que TORC2 participa en el cicle cel·lular en diversos moments: és capaç de regular positivament la re-entrada al cicle, l'estabilitat de l'anell contràctil i el canvi de polaritat durant el creixement.

La re-entrada del cicle cel·lular des de la fase G_0 depèn de l'activitat de TORC2, ja que les cèl·lules que presenten una menor activitat de TORC2 tarden més en reprendre el cicle a través de la defosforilació de Cdc2 (Ikai *et al.*, 2011).

TORC2 participa en la regulació del citoesquelet. La inactivació de TORC2 fa que s'alenteixi l'aparició del fus mitòtic i que s'acumuli actina de manera excessiva (Ikai *et al.*, 2011). S'ha observat que Ste20 permet la unió de TORC2 a l'anell d'actina durant la citocinesi per fosforilar Acp1. D'aquesta manera, es controla l'estabilitat del complex Acp1-Acp2 i el *timing* de la formació i estabilitat de l'anell (Baker *et al.*, 2016).

TORC2 també regula el canvi de creixement monopolar a bipolar. Una menor activitat de TORC2 evita el canvi de patró de creixement a bipolar (Du *et al.*, 2016) perquè Gad8 fosforila la miosina Myo1 al residu S742, i li causa canvis en la seva afinitat per la Cam2: en lloc de necessitar dues

molècules Cam2, la forma fosforilada només en necessitarà una (Baker et al., 2019).

TORC2 pot controlar l'estabilitat genòmica i la resposta a drogues que afecten al DNA. Intervé en la regulació de la cromatina, regulant el silenciament gènic i la longitud dels telòmers. La senyalització per Gad8 promou el desbloqueig del cicle després del dany al DNA a través de la defosforilació de Cdc2 (Schonbrun *et al.*, 2009). Alteracions en qualsevol punt de la via TORC2 estan associats amb una elevada sensibilitat a drogues que afecten el DNA, major dany al DNA i més inestabilitat genòmica (Schonbrun *et al.*, 2013).

TORC2 pot interactuar directament amb la cromatina i associar-se al complex MBF (format per Res1, Res2 i Cdc10). L'associació es necessària per a que aquest complex interactuï amb els promotors dels gens als que controla i facilitar l'expressió de gens diana com *cig2* o *cdt2* en resposta a dany del DNA (Cohen *et al.*, 2016).

La integritat de les vacuoles està controlada per la via TORC2-Gad8, ja que en mutants sense Tor1 o Gad8, s'observen vacuoles molt petites i fragmentades, el que podria estar relacionat amb la seva sensibilitat al calci i l'estrès osmòtic (Tatebe *et al.*, 2010).

5.1.3. Interacció entre complexos TORC

Els dos TORC es poden regular entre ells. S'ha observat que la reducció en l'activitat de TORC2, causa un increment en l'activitat de TORC1, observat com un increment en la fosforilació de la proteïna ribosomal S6 (Ikai *et al.*, 2011). També passa en el cas contrari, TORC1 causa un increment en l'activitat de TORC2 (Rallis *et al.*, 2013).

INTRODUCCIÓ

Com he mencionat abans TORC1 inhibeix la diferenciació sexual en condicions òptimes de creixement i TORC2 la promou quan hi ha baixa disponibilitat de nutrients. En realitat, les dues vies convergeixen en el mateix punt, la fosforilació de Gad8 en el residu S546, per regular el *mating* (Figura 18). En medi ric, l'activació per TORC2 inhibeix la via Greatwall-Endosulfina, pel que la fosfatasa PP2A es troba activa. Aquesta fosfatasa es necessària per l'inhibició de la diferenciació sexual, perquè quan es delectona s'observa un fenotip amb una alta taxa d' esporulació i un increment en la fosforilació de Gad8 per Tor1. De fet, PP2A controla la defosforilació de Gad8 S546 en condicions òptimes (Martín *et al.*, 2017). Com el canvi a un medi deprivat de nutrients causa l'inactivació de TORC1, i després, la inhibició de PP2A per la via Greatwall-Endosulfina, s'observa un increment en la fosforilació de S546 (Chica *et al.*, 2016). Per tant, TORC1 i TORC2 controlen la diferenciació sexual a través del mateix residu.

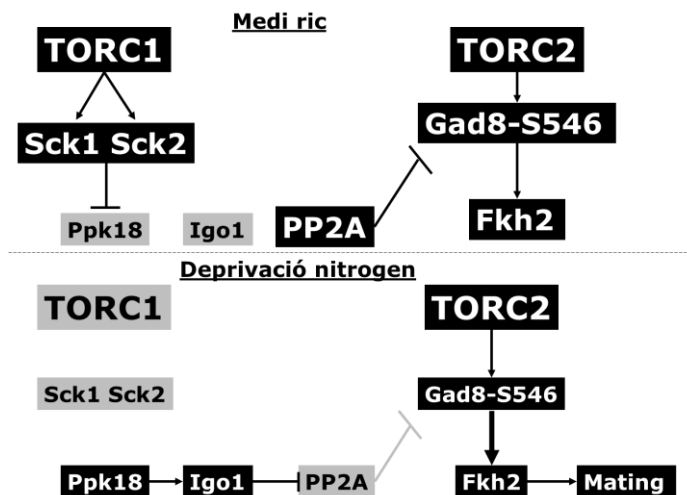


Figura 18. La interacció entre les funcions dels complexos TORC regula la diferenciació sexual. En negre es troben les proteïnes activades en cada condició. En color gris, les proteïnes inactivades en cada condició.

El complex SAGA està implicat en la transcripció de gens implicats en el desenvolupament del cycle cel·lular, la resposta a estrès i la diferenciació sexual. En aquest cas, els TORCs també poden regular com actua SAGA. Per una banda, TORC1 causa la inhibició dels transcrits a través de la

subunitat Gcn5 de SAGA i la defosforilació de Taf12 per PP2A. Per l'altra banda, en resposta a la deprivació de nitrogen, Gad8 fosforila Taf12 i inhibeix parcialment la diferenciació sexual (Laboucarié *et al.*, 2017).

L'activació de Pmk1 a través de la síntesi de Pck2 en condicions de deprivació de glucosa i després de tractaments que alteren la paret cel·lular està promoguda tant per TORC2 a través de Gad8 (Madrid *et al.*, 2015) com per TORC1 a través de Psk1 (Madrid *et al.*, 2016).

La fosforilació de les proteïnes S6 ribosomals com Rps602 és resultat de l'activitat de TORC1, però també es necessària l'activitat de TORC2, ja que la deleció d'una de les seves subunitats causa un descens en la fosforilació de Rps602, i és possible que també depengui de Gad8 ja que co-precipita amb ella (Du *et al.*, 2012).

Els canvis en les concentracions d'aminoàcids causats per Isp7, el regulador dels transportadors d'aminoàcids que està regulat negativament per TORC1, pot causar una reducció en l'activitat de Gad8 (Laor *et al.*, 2014).

També els transportadors d'aminoàcids estan regulats pels dos complexos ja que en medi ric, TORC1 inhibeix l'expressió de permeases i TORC2 la permet. En deprivació de nitrogen, amb l'inhibició de TORC1, com TORC2 continua activa, l'expressió de permeases es veu incrementada amb l'objectiu d'augmentar la captació d'aminoàcids del medi extracel·lular (Ma *et al.*, 2015).

5.2. El complex PKA

A *S. pombe*, el complex PKA està format per dues subunitats: la subunitat catalítica, codificada per la proteïna Pka1 (Maeda *et al.*, 1994) i la subunitat reguladora Cgs1 (Kawamukai *et al.*, 1991).

INTRODUCCIÓ

L'activitat catalítica de Pka1 consisteix en inhibir respostes i adaptacions de la cèl·lula a condicions d'estrès mentre la cèl·lula tingui disponibilitat de nutrients al medi. Quan es produeix una situació d'estrès i la cèl·lula deixa de tenir nutrients, Pka1 s'inactiva i permet al seus substrats realitzar les seves funcions. Per aquest motiu, Pka1 necessita un mecanisme que la informi de l'estat nutricional de la cèl·lula. Aquest mecanisme està proporcionat pels nivells de cAMP (Figura 19).

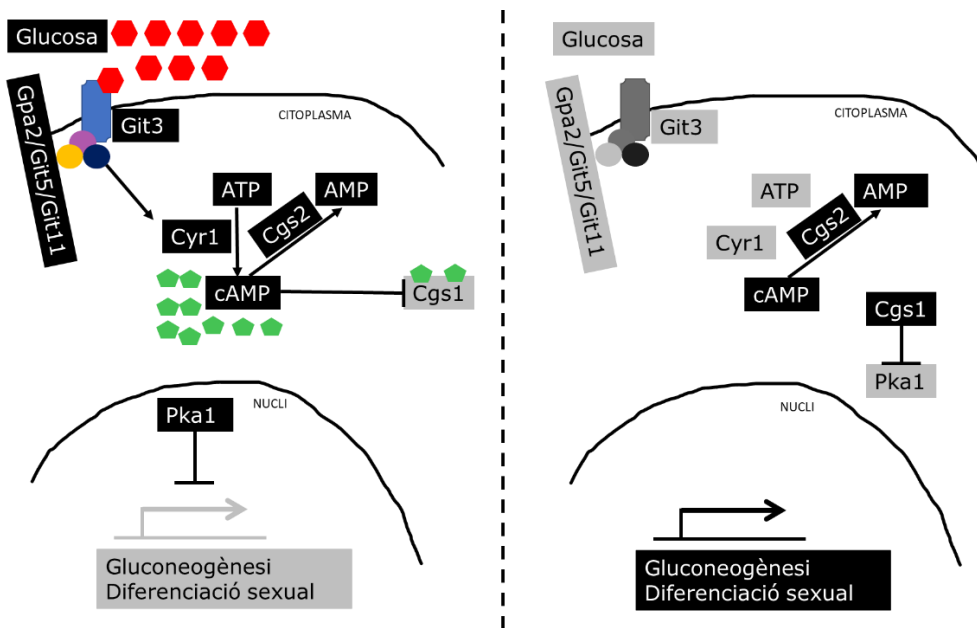


Figura 19. Regulació de l'activitat de Pka1 a través del cAMP. A l'esquerra condicions d'àmplia disponibilitat de glucosa, i a la dreta, condicions de deprivació. En gris es troben les proteïnes inhibides en cada situació.

La formació de cAMP es produeix quan hi ha nutrients al medi. La presència de glucosa activa el receptor Git3 a la membrana, i en resposta, s'activa un heterotrímer de proteïna G format per Gpa2, Git5 i Git11 (Welton & Hoffman, 2000) que posteriorment activa l'adenilat ciclasa Cyr1, que produeix cAMP (Byrne & Hoffman, 1993).

Els nivells de cAMP estaran alts quan hi hagi una alta disponibilitat de nutrients, però quan comencin a escassejar comencen a disminuir gràcies

a la fosfodiesterasa Cgs2. Quan no s'hi troba aquesta fosfodiesterasa, s'observen nivells molt elevats de cAMP (Wang *et al.*, 2005).

La proteïna Cgs1 permet a la Pka1 llegir els canvis de concentració de cAMP. Quan Pka1 es troba activa, es troba al nucli, però quan necessita ser inactivada es mou al citoplasma per un mecanisme que és dependent de la presència de Cgs1 (Matsuo *et al.*, 2008). En condicions de disponibilitat òptima de nutrients, quan Pka1 es troba activa, Cgs1 està unida a cAMP. Quan hi ha una reducció dels nivells de cAMP, Cgs1 queda lliure, s'uneix a Pka1 i la trasloca al citoplasma per a que no pugui fer la seva funció (Gupta *et al.*, 2011a) i afavorir la seva híper-fosforilació (McInnis *et al.*, 2010) (Gupta *et al.*, 2011b).

Per tant, la presència de cAMP és un regulador positiu de l'activitat de la Pka1, ja que eliminar el cAMP o la Pka1 causa el mateix efecte, una repressió de l'activitat PKA i l'inducció de l'expressió de gens normalment inhibits per Pka1. En canvi, la inhibició de Pka1 en condicions de deprivació depèn de la presència de Cgs1, ja que en soques sense Cgs1 ($\Delta cgs1$), Pka1 continua activa en aquestes condicions (Hoffman & Winston, 1991). La inhibició de Pka1 en condicions de deprivació és necessària en la fase estacionària perquè les soques $\Delta cgs1$ són molt sensibles als canvis en les condicions de cultiu i moren ràpidament quan arriben a la fase estacionària (DeVoti *et al.*, 1991).

L'activitat de Pka1 també està regulada a través de fosforilació. La quinasa Ksg1 la fosforila al residu T356. Aquesta fosforilació es molt important, ja que en soques amb la mutació T356A, que no poden ser fosforilades en aquest residu, la Pka1 es catalíticament inactiva i causen que la soca es pugui diferenciar sexualment en medi ric (Tang & McLeod, 2004).

La pròpia activitat de Pka1 és necessària per controlar la transcripció dels components del complex PKA, ja que soques amb l'activitat Pka1

INTRODUCCIÓ

constitutivament activada mostren una reducció en els nivells de transcrits de Pka1 i Cgs1 (Stiefel *et al.*, 2004).

Abans s'ha mencionat que Pka1 inhibeix les respostes a situacions estressants en condicions òptimes de creixement. En condicions d'estrès, Pka1 estaria inhibida i permetria l'expressió de les proteïnes a les que inhibeix.

Inhibició de la resposta sexual

La presència de nutrients al medi fa que no calgui desenvolupar formes de resistència per sobreviure a aquestes situacions. Per aquest motiu, Pka1 inhibeix la meiosi. Les soques sense Pka1 ($\Delta pka1$) son capaces de diferenciar-se sexualment, fins i tot, en condicions òptimes (Maeda *et al.*, 1994). La sobre-activació de Pka1 mitjançant la deleció de Cgs1 o per la sobre-expressió de Pka1, genera soques estèrils (DeVoti *et al.*, 1991) (Yu *et al.*, 1994).

La deprivació de nitrogen causa una reducció dels nivells de cAMP intracel·lulars (Mochizuki & Yamamoto, 1988), pel que es redueix l'activitat de Pka1 i es desinhibeixen totes les seves proteïnes diana.

L'activació de les proteïnes Ste11 i Mei2 és necessària per a la diferenciació sexual. Pka1 s'encarrega que aquestes proteïnes quedin inhibides en condicions òptimes. La inhibició de Pka1 està associada amb una major expressió de Ste11 i Rst2 (DeVoti *et al.*, 1991) (Kunitomo *et al.*, 2000).

L'expressió de Ste11 està controlada pels factors de transcripció Atf1 i Rst2. En resposta a una deprivació de nitrogen, la inducció de Ste11 i Fbp1 està sota el control del dímer Atf1-Pcr1 (Takeda *et al.*, 1995) (Watanabe & Yamamoto, 1996). És probable que aquest control sigui indirecte, ja que no s'ha identificat llocs d'unió per Atf1-Pcr1 en el promotor de Ste11 (Eshaghi *et al.*, 2010). En qualsevol cas, el control de l'activitat

transcripcional d'Atf1 està sotmés sota el control de Pka1 i la MAPK Sty1 (Kano *et al.*, 1996). En condicions òptimes, es troba inhibida per Pka1, però en condicions de deprivació, Pka1 s'inactiva i s'activa la via Sty1, que la fosforila per activar-la, sent necessària per la inducció de Ste11 i Fbp1 (Stettler *et al.*, 1996).

Qui si presenta llocs d'unió en el promotor de Ste11 és el factor de transcripció Rst2, que regula la transcripció de *ste11* (Higuchi *et al.*, 2002). L'activitat d'aquest factor de transcripció està inhibida per Pka1 (Kunitomo *et al.*, 2000). PKA i TORC1 participen conjuntament en la inhibició de la meiosi, es necessita la inhibició de les dues pel control de la localització de Ste11 al nucli i per la inducció de Ste11 i la meiosi a través de Rst2 en condició de deprivació nutricional (Valbuena & Moreno, 2010).

Els anàlisis transcripcionals han mostrat que la inhibició de Pka1 es necessària per la transcripció de gens induïts per la deprivació de nitrogen, i la reactivació de Pka1 per reprimir-la un cop es reintrodueix el nitrogen al medi de cultiu (Liu *et al.*, 2015).

Inhibició de les respostes a estrès

La presència de glucosa al medi fa necessari la inactivació de vies anabòliques de producció de glucosa. La Pka1, en aquest cas, pot inhibir la transcripció de Fbp1, un enzim implicat en la gluconeogènesi (Hoffman & Winston, 1990), a través de la fosforilació de Rst2, impedit la seva translocació al nucli (Higuchi *et al.*, 2002).

El paper de Pka1 sobre la senyalització del TORC2 en presència de glucosa es una qüestió de controvèrsia. Per una banda, en un treball es va determinar que en les soques $\Delta pka1$, la fosforilació de Gad8 per Tor1 desapareix, mentre que en soques amb Pka1 hiperactivada, Gad8 acaba defosforilada (Cohen *et al.*, 2014). Per l'altra banda, en treballs posteriors no es va identificar aquest descens de fosforilació en els mateixos mutants,

INTRODUCCIÓ

el que es va atribuir al no ús de còctels d'inhibidors en el primer treball (Hatano *et al.*, 2015).

El gluconat és una de les fonts de carboni alternatives a *S. pombe* que s'utilitza quan comença a faltar glucosa al medi. Pka1 s'encarrega de regular negativament la presència de transportadors de gluconat a la membrana en presència de glucosa, al no ser necessari en aquell moment (Caspari, 1997).

Quan un cultiu no es dilueix i les cèl·lules continuen creixent arribant a la fase estacionaria. En aquesta fase, la disponibilitat de nutrients com la glucosa i el nitrogen cada cop es va reduint més. De fet, com més concentració de glucosa hi hagués en el medi, menor era la supervivència, ja que la presència de glucosa contribueix al procés d'envelliment cel·lular (*aging*) (Roux *et al.*, 2009). En aquest procés, es necessari que Pka1 estigui inactiu, ja que en una soca que manté Pka1 constitutivament activa, com és la soca $\Delta cgs1$, les cèl·lules moren ràpidament quan arriben a la fase estacionària (DeVoti *et al.*, 1991). De fet, és la continua senyalització de presència de glucosa a través de Pka1 la que contribueix a l'envelliment cel·lular i la menor supervivència en la fase estacionaria (Roux *et al.*, 2009).

En canvi, les cèl·lules de la soca $\Delta pka1$ poden sobreviure bastant de temps en aquesta fase, ja que els mecanismes cel·lulars que acostuma a inhibir Pka1 l'ajuden a lluitar contra els processos d'envelliment. La inhibició s'associa de Pka1 a una menor acumulació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i menys successos d'apoptosis a la fase estacionària (Roux *et al.*, 2006). No obstant, altres estudis han trobat que les cèl·lules $\Delta pka1$ consumeixen més oxigen (Zuin *et al.*, 2010), i durant la fase exponencial produeixen més ROS i tenen una major sensibilitat a rotenona, una droga que indueix l'aparició de ROS (Wang *et al.*, 2010). És possible aleshores que la falta de Pka1 pugui aclimatar a la cèl·lula abans de l'estrès o que el

canvi observat en la fase estacionària no causi molts canvis en la cèl·lula $\Delta pka1$.

Una proteïna important en la supervivència en fase estacionaria és Sds23, que es fosforilada tant per Sty1 com Pka1 en el residu S391, i a més per Pka1 a la S18. Aquesta fosforilació justament quan comença la fase estacionaria és important per mantenir la viabilitat del cultiu (Jang *et al.*, 2013).

En resposta a fase estacionaria, s'ha observat en cèl·lules $\Delta pka1$ la inducció de factors de transcripció implicats en la resposta a concentracions molt baixes de glucosa al medi, com es el cas de Rsv1 (Hao *et al.*, 1997) o de Phx1, relacionat amb la fermentació (Kim *et al.*, 2014); i l'expressió de gens associats a supervivència a llarg termini com Ecl1 (Ohtsuka *et al.*, 2008). La inducció de Rsv1, activada per Rst2, té com a objectiu inhibir l'entrada de glucosa en la via de les pentoses fosfat (Fraile *et al.*, 2020).

La inactivació de la Pka1 causa l'exportació de mRNA del nucli al citoplasma en resposta a la deprivació nutricional (Whalen *et al.*, 1999).

L'activitat de Pka1 necessita reduir-se a altes temperatures. Aquest fet s'observa quan es delecta el regulador negatiu de Pka1, Cgs1. Les cèl·lules $\Delta cgs1$ són altament sensibles a altes temperatures (Férrnandez *et al.*, 1997). En resposta a l'estrès tèrmic, s'indueix la síntesi de xaperones i s'acumula trehalosa, actuacions que permeten a la cèl·lula tolerar millor la temperatura. Pka1 és qui inhibeix l'acumulació de trehalosa a temperatures òptimes, i la permet a altes temperatures quan és inactivada (Ribeiro *et al.*, 1997). L'acumulació de trehalosa mediada per Pka1 també s'associa a un estrès oxidatiu (Férrnandez *et al.*, 1998). La causa molecular és que Pka1 regula negativament l'expressió de Tpp1 (Franco *et al.*, 2000) i fosforila Ntp1 al residu S71 (Franco *et al.*, 2005), proteïnes implicades

INTRODUCCIÓ

en la prevenció de l'acumulació de trehalosa, i de les quals, l'activitat de Ntp1 es calci-dependent (Franco *et al.*, 2003).

Durant l'estrès osmòtic, però, el comportament és diferent a la resta d'estressos perquè Pka1 necessita estar actiu per mantenir la viabilitat del cultiu. En aquest procés, les cèl·lules $\Delta cgs1$ mantenen la seva viabilitat, al contrari que les cèl·lules $\Delta pka1$, que es mostren especialment sensibles a aquest estrès (Yang *et al.*, 2003).

Davant les situacions d'estrès, es formen grànuls citoplasmàtics on s'acumulen molècules de mRNA i factors de traducció, per salvaguardar-les fins que es repregui el creixement (Cabrera *et al.*, 2020). Aquest comportament s'ha identificat en l'estrès osmòtic, l'estrès tèrmic i la privació de glucosa. L'adició de calci durant la privació de glucosa, potencia la formació d'aquest grànuls de manera dependent a Pka1, ja que en soques $\Delta pka1$ no es formen (Nilsson & Sunnerhagen, 2011).

La presència de Pka1 es necessària per mantenir la viabilitat en resposta a l'estrès de calci. Durant les primeres hores de l'estrès es troba al nucli i amb el pas del temps es trasllada al citoplasma. El fenotip associat $\Delta pka1$ sembla estar associat al factor de transcripció Prz1. S'ha vist que l'activació de Pka1 en resposta a cAMP està associada a una menor activitat transcripcional per part de Prz1 (Koike *et al.*, 2012). Però també s'ha observat un increment de transcripció de *cmk1* en soques $\Delta pka1$ de *S. japonicus* (Papp *et al.*, 2017) i de *prz1* en soques $\Delta pka1$ de *S. pombe* en condicions òptimes (Matsuo & Kawamukai, 2017). No obstant, els nivells de proteïna Cmk1 es mantenen estables i mostren una menor fosforilació en resposta a calci en absència de Pka1 (Cisneros-Barroso, 2014). Per acabar, quan s'elimina Prz1 d'una soca $\Delta pka1$, adquireix una major sensibilitat al calci que en els mutants simples (Matsuo & Kawamukai, 2017).

En resposta a una deprivació de fosfats, l'activació de la fosfatasa Pho1 a través de Pka1 és necessària, ja que en mutants $\Delta pka1$ no s'ha observat un increment de la activitat fosfatasa en resposta a la falta de fosfats (Henry *et al.*, 2011) o de nucleòtids com la adenina (Estill *et al.*, 2015).

Progressió del cicle cel·lular

Durant el desenvolupament del cicle cel·lular, l'activitat de la Pka1 va fluctuant per regular la seva progressió. Té un paper en la transició G₂-M, doncs la sobreexpressió de Pka1 causa un arrest en fase G₂ (Tallada *et al.*, 2002). També s'ha observat una reducció de la mida cel·lular en cèl·lules $\Delta pka1$ en el moment que es produeix la divisió (Navarro & Nurse, 2012).

Pom1, una quinasa que regula la polaritat i la citocinesi (Lee *et al.*, 2018), és relocalitzada al còrtex de la cèl·lula per Tea4 en un procés que està regulat per Pka1. La localització de Tea4 a través del complex CLASP, que controla l'estabilitat dels microtúbuls, és inhibida per Pka1 (Kelkar & Martin, 2015).

El complex ciclosoma 20S, que s'encarrega de la degradació de ciclins i la separació de les cromàtides germanes en la transició a anafase està regulat negativament també per la Pka1 (Yamashita *et al.*, 1996).

L'activitat de tant TORC1 com Pka1 evita l'arrest del cicle en G₁ en condicions òptimes de creixement, donat que el doble mutant *tor2.51* $\Delta pka1$ mostra un major nombre de cèl·lules en G₁ després de la inactivació per temperatura de Tor2 (Valbuena & Moreno, 2010).

Altres funcions

L'activitat de Pka1 participa en l'estabilitat genòmica. Quan es deleciona *pka1*, s'observa un increment de la degradació de DNA i RNA respecte a una soca salvatge (Nakashima *et al.*, 2002). Les soques sense Pka1

INTRODUCCIÓ

mostren també una elevada sensibilitat a drogues com la camptotecina que causen trencaments de cadena senzilla al DNA (Deshpande *et al.*, 2009).

El funcionament del citoesquelet també està afectat per l'activitat de Pka1. La integració de la senyalització per glucosa pot afectar a processos com la transició de creixement monopolar a bipolar, ja que les cèl·lules $\Delta pka1$ tenen un major percentatge de cèl·lules monopolars que les cèl·lules *wild-type* (Koyano *et al.*, 2010) i una major sensibilitat a drogues que bloquegen la polimerització de microfilaments d'actina com Latrunculina A (Asadi *et al.*, 2016). La segregació dels cromosomes també està afectada per la interacció amb la proteïna d'unió als microtúbuls Mal3 (Tanabe *et al.*, 2019).

El proteosoma és un orgànul cel·lular encarregat de la digestió de proteïnes, l'activitat del qual pot ser inhibida amb bortezomib. Les soques sense Pka1 mostren una elevada sensibilitat a la inhibició del proteosoma amb bortezomib, pel que també podria estar associada la Pka1 a la funció del proteosoma (Takeda *et al.*, 2011).

La síntesi d'ergosterol, un component de la membrana plasmàtica en fongs, es la diana de drogues antifúngiques com el clotrimazol. Quan s'exposa al clotrimazol, les soques $\Delta pka1$ tenen una menor viabilitat que les soques salvatges, per tant, es possible que Pka1 participi en el procés de biosíntesi de l'ergosterol (Fang *et al.*, 2012).

La producció de Coenzim Q10 (CoQ₁₀), un element de la cadena de transport d'electrons, està regulada negativament per Pka1 en medi ric. Condicions com la deprivació de glucosa o l'eliminació de Pka1, causen un increment en la seva expressió (Nishida *et al.*, 2019).

5.3. eIF3e/Int6

Un dels complexos que regula la síntesi de proteïnes a *S. pombe* és EIF3. Pot presentar dues conformacions, formades per 11 subunitats diferents: una nucleada per la proteïna eIF3m (*tif313*) i un altre que conté eIF3e (*int6*) (Zhou *et al.*, 2005). La funció d'aquest complex està conservada, i es pot observar que les subunitats d'aquest complex co-sedimenten amb el complex de pre-iniciació 43S (Bandyopadhyay *et al.*, 2000) i amb el ribosoma 40S (Akiyoshi *et al.*, 2001).

La funció de les diferents conformacions del complex, però, és diferent: els conjunts de mRNA que estan associats al complex format per *tif313* tenen un paper en la traducció global, mentre que els associat al complex format per *int6* estan relacionats amb un conjunt més restringit de transcrits (Zhou *et al.*, 2005) (Taula 2). Així, la deleció de *tif313* és inviable (Kim *et al.*, 2010), mentre que les soques $\Delta int6$ no tenen problemes per iniciar la traducció basal en medi ric, però sí per iniciar-la en medi mínim (Akiyoshi *et al.*, 2001), sobreviure a drogues com la cafeïna o diferenciar-se sexualment (Bandyopadhyay *et al.*, 2000). D'altra banda, la sobreexpressió de Int6 confereix resistència a múltiples drogues a través de l'increment d'activitat del factor de transcripció Pap1 (Crane *et al.*, 2000) (Jenkins *et al.*, 2005).

La falta d'iniciació de la traducció que s'observa en les soques $\Delta int6$ quan creixen en medi mínim està causat per una reducció del reclutament de ribosomes sobre el mRNA. Dins del conjunt de gens que son traduïts per *int6*, es troben gens associats a la biogènesi dels ribosomes, transport d'aminoàcids i la fosforilació oxidativa. En conseqüència, en cèl·lules sense *int6*, no es produeix la respiració i sí un augment de glicòlisi (Shah *et al.*, 2016).

INTRODUCCIÓ

Complex eIF3e	<i>H. sapiens</i>	Complex eIF3m
Tif301	eIF3a	Tif301
Tif302	eIF3b	Tif302
Tif303	eIF3c	Tif303
Moe1	eIF3d	-
Int6	eIF3e	-
Tif306	eIF3f	Tif306
Tif307	eIF3g	Tif307
-	eIF3h	Tif308
Sum1	eIF3i	Sum1
-	eIF3j	Tif310
-	eIF3m	Tif313

Taula 2. Els diferents complexos que forma eIF3 a *S. pombe*. En la columna del mig es troben els ortòlegs de les proteïnes en humans. Adaptada de Zhou *et al.*, 2005 i Ray *et al.*, 2008.

Int6 és necessari per augmentar la captació d'aminoàcids com la leucina (Matsumoto *et al.*, 2002) o la histidina. En aquestes condicions, l'activació de Sty1 és necessària per la supervivència de la cèl·lula a causa de l'estrès oxidatiu causat per la deprivació. No obstant, tot i l'activació de Sty1, la soca $\Delta int6$ és sensible a la deprivació d'histidina perquè *int6* controla la síntesi y estabilitat del factor de transcripció Atf1 (Udagawa *et al.*, 2006). Les soques $\Delta int6$ són sensibles també a l'estrès oxidatiu, però el tractament amb antioxidant facilita el seu creixement davant d'un estrès oxidatiu o una deprivació d'aminoàcids. Per tant, *int6* és necessari per reduir l'estrès oxidatiu intracel·lular (Nemoto *et al.*, 2010).

Tal com s'ha comentat, Int6 forma part del nucli del segon complex eIF3 juntament amb Moe1 (eIF3d) formant un heterodímer. La presència d'aquest heterodímer és necessària per l'acoblament i la funció de eIF3. La deleció d'un o altre gen dona lloc als mateixos fenotips (Bandyopadhyay *et al.*, 2002).

D'altra banda, Int6 regula negativament l'estabilitat dels microtúbuls perquè les cèl·lules mostren una menor afectació en fenotips relacionats

INTRODUCCIÓ

amb una baixa estabilitat del microtúbuls com l'aparició de cèl·lules corbades o la sensibilitat a baixes temperatures, fins i tot, davant de l'ús de drogues desestabilitzadores. A la vegada, la interacció de les funcions del dímer Moe1/Int6 amb Ras1 controla la segregació dels cromosomes (Yen & Chang, 2000). La interacció entre les dues vies es produeix perquè Ras1 activa Cdc42, que interacciona con el Guanine Exchange Factor (GEF) Scd1 (Von Arnim & Chamovitz, 2003), que també interacciona amb l'heterodímer Int6/Moe1. Aquesta interacció es necessària per la correcta formació del fus mitòtic (Chen *et al.*, 1999).

L'estructura de Int6 presenta en el seu extrem carboxil terminal un domini PCI, comú amb proteïnes que es troben en el proteosoma i proteïnes del signalosoma COP9 (Von Arnim & Chamovitz, 2003). El domini PCI podria possibilitar la interacció entre Int6 i Moe1 amb la subunitat Rpn5 del proteosoma, i permetre aleshores la translocació de Rpn5 al nucli a través de la importina Sal3 (Sha *et al.*, 2009) per formar el proteosoma, en un procés també dependent de Ras1. En conseqüència, els mutants de Int6 tenen una menor activitat proteosòmica, ja que s'observa una acumulació de proteïnes poli-ubiquitinades i una elevada sensibilitat a drogues que activen el proteosoma. Per tant, Int6 estaria regulant positivament l'activitat del proteosoma (Yen *et al.*, 2003).

L'associació del proteosoma amb *int6* es necessària pel control de qualitat de proteïnes al reticle endoplasmàtic. Int6 forma un complex amb Cdc48, que reconeix les proteïnes aberrants poliubiquitinades per dirigir-les cap al proteosoma. Aquesta interacció és necessària també per la correcta segregació dels cromosomes (Otero *et al.*, 2010).

Antecedents de la quinasa Ckk2

Tal com hem comentat anteriorment, Ckk2 presenta homologia de seqüència amb les CaMKK. En *S. pombe*, inicialment anomenada Ppk34, va ser identificada com una proteïna quinasa de funció desconeguda, i va ser associada a través de *screenings* genòmics a funcions associades al citoesquelet, ja que en absència de Ppk34, les cèl·lules mantenen una major proporció de cèl·lules en creixement bipolar (Koyano *et al.*, 2010). Altres estudis emprant la hidroxürea, una droga que inhibeix la replicació, han identificat la Ppk34 en possibles funcions en la resposta al dany del DNA, ja que les cèl·lules $\Delta ppk34$ en mostren sensibilitat (Pan *et al.*, 2012).

El grup de la Dra. Aligué ha centrat els seus estudis en la Ppk34 després d'identificar-la com la quinasa responsable de la fosforilació de Cmk1 en resposta a estrès de calci, anomenant-la Ckk2, per la seva homologia funcional amb la CaMKK2 de mamífer. D'altra banda, els anàlisis comparatius de les seqüències de Ckk2 amb les altres CaMKK identificades a *S. pombe* i *H. sapiens* han revelat la presència en el domini catalític de la Ckk2 de seqüències consens trobades en totes les CaMK(K) (Yance-Chávez, 2015) i una major homologia amb la CaMKK2 (Cisneros-Barroso *et al.*, 2014).

Posteriorment, es va comprovar que Ckk2 es podia unir al complex calci-calmodulina i que era capaç de fosforilar Cmk1 *in vitro* (Yance-Chávez, 2015). L'activació de Cmk1 a través de Ckk2 es necessària per detenir el creixement de les cèl·lules en resposta a calci a través de la fosforilació i estabilització de Cdc25, que atura el cicle cel·lular. En conseqüència, tant les cèl·lules $\Delta cmk1$ com les $\Delta ckk2$, son incapaces d'aturar el creixement i continuen creixent a concentracions elevades de calci, al contrari que les cèl·lules *wild-type* (Cisneros-Barroso *et al.*, 2014).

INTRODUCCIÓ

Estudis anteriors del grup van indicar que el paper de Ckk2 no està restringit solament en la resposta a calci. En situacions d'estrès nutricional causat per deprivació de glucosa o de nitrogen causen un increment en els nivells de proteïna Ckk2 (Figura 20), indicant que podria tenir un paper en aquestes condicions (Yance-Chávez, 2015).

Conjuntament amb l'increment en els nivells de proteïna Ckk2, es va observar una altra banda, situada prop dels 66 kDa, que també incrementava amb la Ckk2 de manera proporcional al temps de deprivació. Degut a la diferència de mida respecte a la Ckk2, que fa 40 kDa, es va pensar que podria ser sumoilació, una modificació post-traduccional que consisteix en la unió d'una proteïna SUMO, que en el cas de *S. pombe*, s'anomena Pmt3. La sumoilació pot alterar la funció de la proteïna directament o través de la interacció amb una tercera proteïna, regulant processos com la transcripció, el transport nuclear, la resposta al dany del DNA, l'organització de la cromatina o la maduració de mRNA (Boulanger *et al.*, 2021). També es possible que fos una poliubiquïtinització però els anticossos anti-ubiquïtina van donar resultats negatius, pel que es va descartar (Yance-Chávez, 2015).

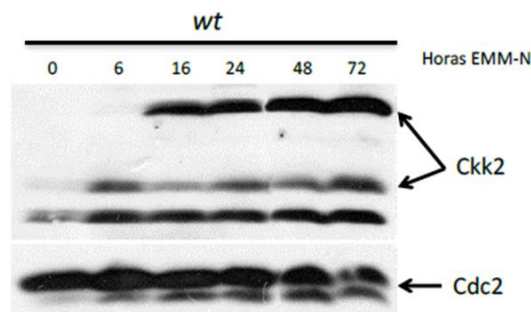


Figura 20. Anàlisi de l'expressió de proteïna Ckk2 en resposta a deprivació de nitrogen a diferents intervals de temps. S'observa una doble banda: la banda inferior pertany a la proteïna Ckk2 i la superior seria la banda que postulem que podria ser Ckk2 modificada post-traduccionalment amb la proteïna SUMO. Figura extreta de Yance-Chávez, 2015.

Com la mida molecular (segons Pombase) de Pmt3 és d'uns 13 kDa, es va pensar que podria tractar-se d'una doble sumoilació de Ckk2. Un fet que

INTRODUCCIÓ

ens va dirigir cap a aquesta teoria va ser l'anàlisi de la proteïna Ckk2 en una soca que no presenta la proteïna SUMO ($\Delta pmt3$). La proteïna Ckk2 es continuava observant en aquesta soca però la presència de la banda modificada d'alt pes molecular es veia molt reduïda en les condicions de privació de nitrogen (Figura 21).

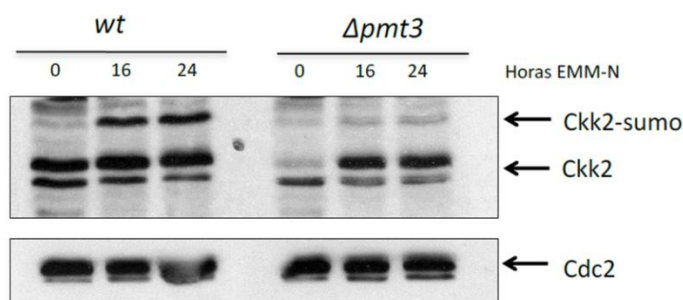


Figura 21. Disminució de la intensitat de la banda Ckk2 d'alt pes molecular en una soca sense SUMO ($\Delta pmt3$). S'observa una doble banda: la banda inferior pertany a la proteïna Ckk2 i la superior seria la banda que postulem que podria ser Ckk2 modificada post-traduccionalment amb la proteïna SUMO. Figura extreta de Yance-Chávez, 2015.

La recerca de llocs putatius d'unió de la proteïna SUMO en la proteïna Ckk2 amb diversos programes bioinformàtics va establir a la lisina de la posició K202 (Figura 22), com un residu amb la major probabilitat de ser sumoilat, a més d'identificar residus com K72 i K251, que tenien una probabilitat una mica menor. Si la proteïna Ckk2 es sumoilada, encara es desconeix quin seria el significat d'aquesta modificació per la funció o regulació de la proteïna Ckk2.

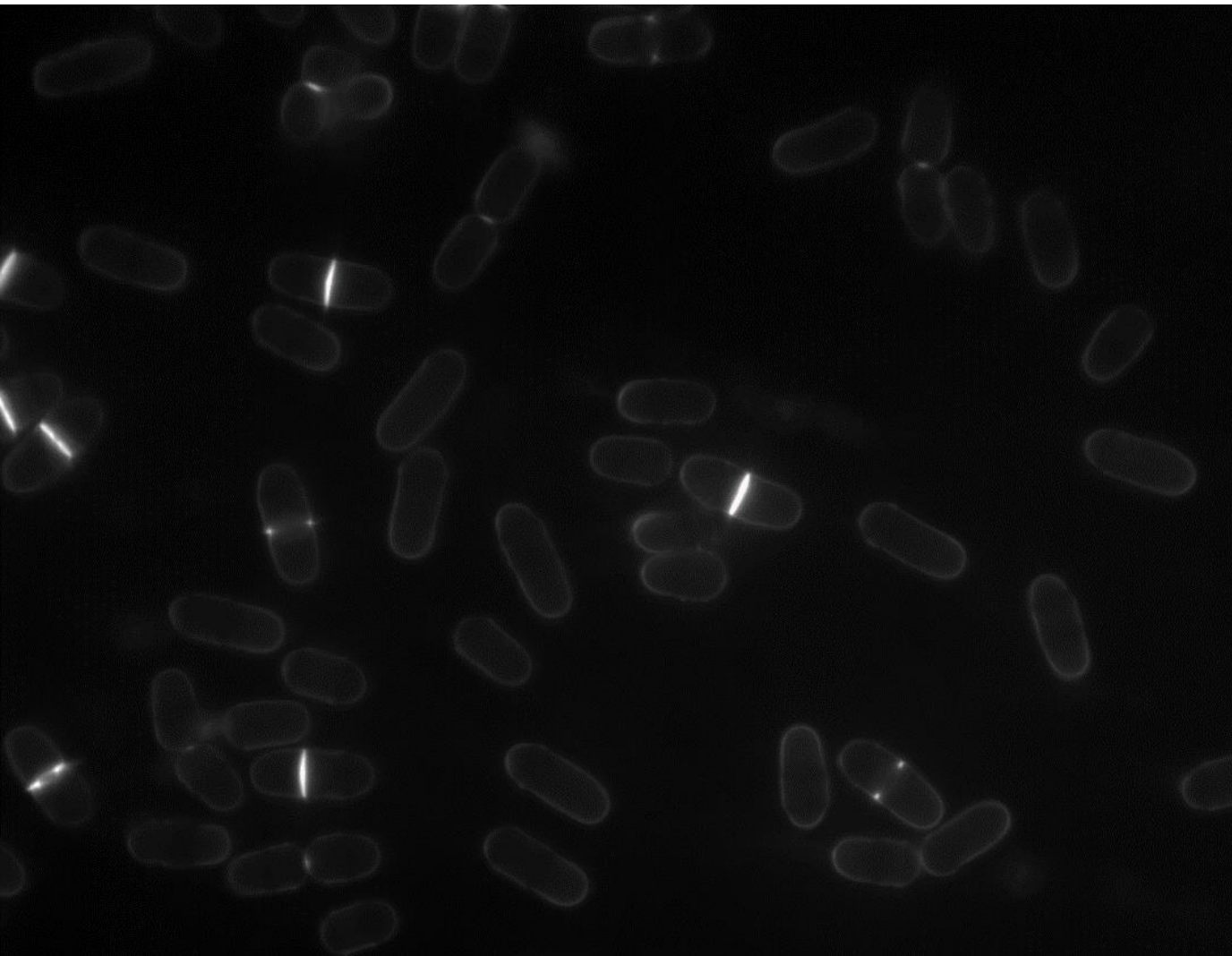
Results for putatifs SUMO site								
Position K	Sequence	Best PS	Consensus direct			Consensus Inverted		
			Type	PSd	DB Hit	Type	PSi	DB Hit
K43	EGPLLKQYRLKNNMLGYGACST	None	None	None	1	None	None	1
K69	DVSTNIEYAIKEFKKTSLRRR	None	None	None		None	None	2
K72	TNIEYAIKEFKKTSLRRREKF	Low	None	None	3	None	Low	1
K73	NIEYAIKEFKKTSLRRREKFR	None	None	None		None	None	3
K202	HGKGVIHARDIKPDNILFKENN	Low	Strong Consensus	Low		Consensus inv	Low	10
K251	MAPELFDNELKKIKGKPLDIW	Low	None	None	1	None	Low	3
K292	ILDMINVIKGSLSMIPAYCNS	None	None	None	1	None	None	1
K306	IPAYCNSDLRKLLERCLEKNP	None	None	None	3	None	None	

Figura 22. Motius de sumoilació obtinguts de l'anàlisi de la proteïna Ckk2. L'anàlisi es va realitzar amb el programa JASSA (Beauclair et al., 2015). La figura s'ha extret de Yance-Chávez, 2015).

D'altra banda, també s'ha vist que les cèl·lules $\Delta ckk2$ són sensibles a drogues que alteren el citoesquelet d'actina com la Latrunculina B i resistents a calcofluor (Yance-Chávez, 2015). Aquests resultats preliminars podrien indicar un paper de la Ckk2 associat al citoesquelet i/o a la morfologia cel·lular.

Per identificar els substrats implicats en les noves funcions indicades per Ckk2 es va realitzar un assaig de fosfoproteòmica que consistia en l'enriquiment de la fracció fosforilada de cultius wt y $\Delta ckk2$, exposats a diferents situacions d'estrès. L'anàlisi d'aquesta fracció ha permès la identificació de pèptids fosforilats en soques wt que no ho estaven en les cèl·lules $\Delta ckk2$, com possibles substrats de la proteïna Ckk2. En aquest assaig, s'ha identificat diferents proteïnes com Cgs1, Gad8 o Int6 (Yance-Chávez, 2015). L'estudi per validar els possibles substrats identificats serà part d'aquesta tesi.

OBJECTIUS

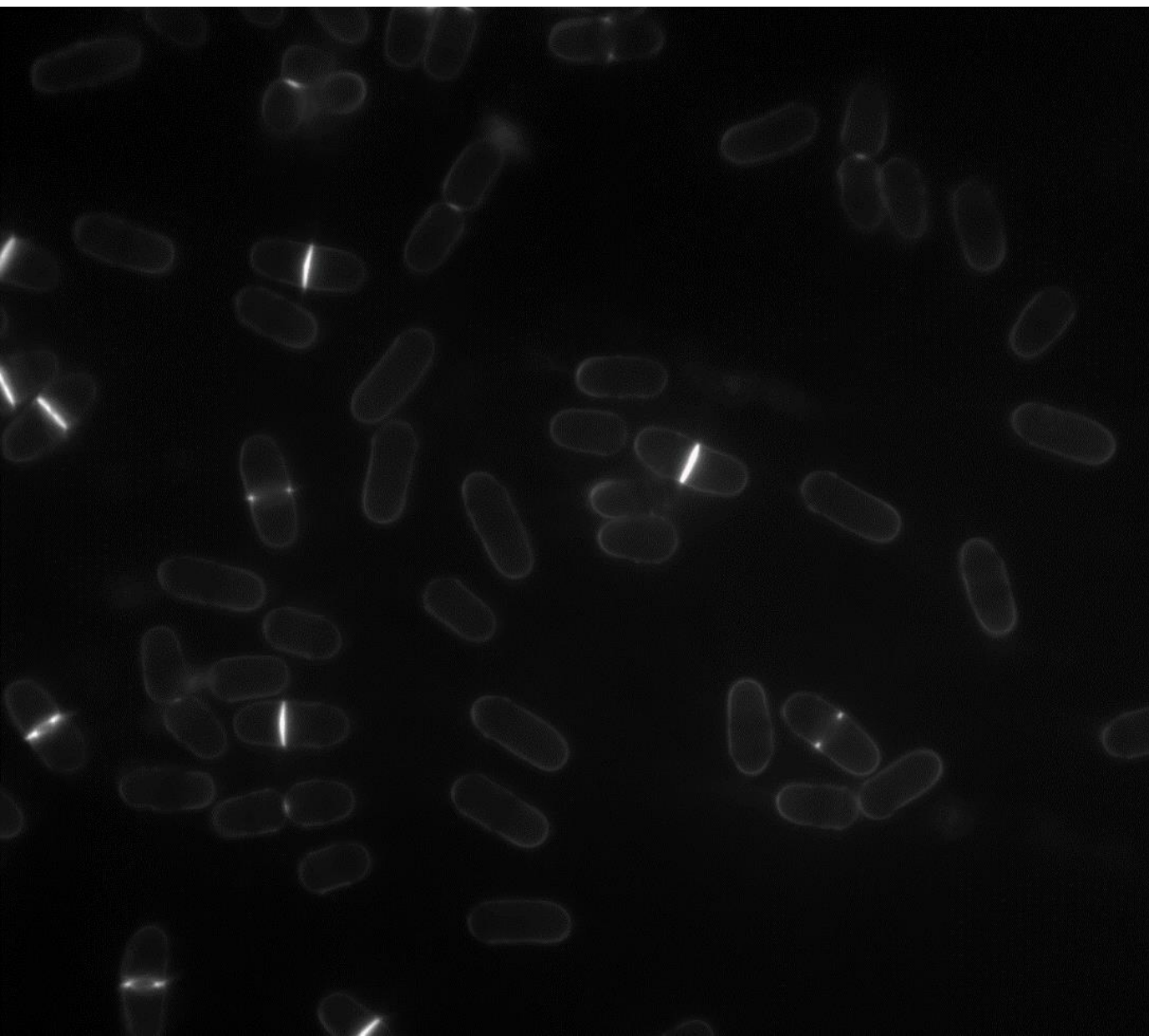


Objectius

Per tal d'estudiar les noves funcions de Ckk2 i els mecanismes que les regulen s'han plantejat els següents objectius:

1. Estudiar la funció i regulació de Ckk2 en resposta a estrès nutricional.
 - a. Identificar funcions de Ckk2 en resposta a estrès nutricional.
 - b. Estudiar la via Ckk2-Cmk1 en resposta a diferents tipus d'estrès.
 - c. Comprovar la sumoilació de *ckk2* en resposta a estrès nutricional.
 - d. Analitzar l'expressió de *ckk2*.
 - e. Observar les interaccions gèniques entre Ckk2 i la via de senyalització TORC.
2. Analitzar els substrats de Ckk2.
 - a. Cgs1/Pka1.
 - b. Int6.
 - c. Gad8.
3. Identificar nous substrats de Ckk2.
4. Estudiar la relació entre Ckk2 i el citoesquelet d'actina.

MATERIAL I MÈTODES



Material i mètodes

1. Material i mètodes de *S. pombe*.

1.1. Soques utilitzades

Referència	Genotip	Origen
RA2227	h ⁻	Lab stock
RA3380	h ⁺ <i>cmk1-HA:kan</i>	Lab stock
RA4240	h [?] <i>cmk1-HA:kan ckk2::ura4 ura4-D18</i>	Aquest treball
RA3658	h ⁻ <i>ckk2::hph</i>	Aquest treball
RA3375	h ⁺ <i>cmk1::hph</i>	Lab stock
RA27¿?	h [?] <i>prz1::kan</i>	Lab stock
RA4577	h [?] <i>ckk2::hph prz1::kan</i>	Aquest treball
RA3354	h [?] <i>ckk2-HA:hph</i>	Lab stock
RA3350	h ⁺ <i>ckk2-HA:hph gaf1::kan</i>	Lab stock
RA3527	h ⁻ <i>ckk2-HA:kan</i>	Lab stock
RA3532	h ⁻ <i>ckk2-K202R-HA:kan</i>	Aquest treball
RA3642	h ⁻ <i>ckk2-TP-HA:kan (K72R, K202R, K251R)</i>	Aquest treball
RA4436	h [?] <i>ckk2-HA:kan tor2-51:ura4+ ura4-D18</i>	Aquest treball
RA1876	h ⁺ <i>tor2-51:ura4+ ura4-D18</i>	Lab stock
RA1879	h ⁻ <i>tor1::ura4+</i>	Lab stock
RA3876	h [?] <i>tor1::ura4+ ckk2::hph</i>	Aquest treball
RA3878	h [?] <i>tor2-51:ura4+ ckk2::hph ura4-D18</i>	Aquest treball
RA¿¿??	h [?] <i>tor2-51:ura4+ ssp1::hph ura4-D18</i>	Aquest treball
RA3652	h ⁻ <i>ssp1::hph</i>	Aquest treball
RA3656	h [?] <i>ssp1::hph ckk2::kan</i>	Aquest treball
RA3664	h ⁻ <i>ssp1-HA:kan</i>	Aquest treball
RA3822	h [?] <i>ssp1-HA:kan ckk2::hph</i>	Aquest treball
RA3849	h [?] <i>ssp1::hph ckk2-HA:kan</i>	Aquest treball
RA3646	h ⁻ <i>cgs1::hph</i>	Aquest treball
RA3659	h ⁻ <i>pka1::kan</i>	E. Hidalgo
RA3677	h [?] <i>cgs1::hph ckk2::kan</i>	Aquest treball
RA3713	h [?] <i>pka1::kan ckk2::hph leu-</i>	Aquest treball
RA3636	h ⁻ <i>cgs1-HA:kan</i>	Aquest treball
RA3707	h [?] <i>cgs1-HA:kan ckk2::hph</i>	Aquest treball
RA3701	h ⁻ <i>pka1-HA:kan</i>	Aquest treball
RA3720	h [?] <i>pka1-HA:kan ckk2::hph</i>	Aquest treball

MATERIAL I MÈTODES

Referència	Genotip	Origen
RA3647	<i>h⁻ int6::hph</i>	Aquest treball
RA3649	<i>h⁻ int6::hph ckk2::kan</i>	Aquest treball
RA3218	<i>h⁺ ckk2::kan</i>	Lab stock
RA3834	<i>h⁻ int6::hph cmk1::kan</i>	Aquest treball
RA3026	<i>h⁻ atf1-HA:hph ura-</i>	Lab stock
RA4244	<i>h⁺ atf1-HA:hph ckk2::ura</i>	Aquest treball
RA4041	<i>h⁺ atf1-HA:hph int6::kan</i>	Aquest treball
RA1752	<i>h⁻ atf1::kan</i>	Lab stock
RA4008	<i>h⁺ atf1::kan ckk2::hph</i>	Aquest treball
RA4012	<i>h⁺ atf1::kan int6::hph</i>	Aquest treball
RA4365	<i>h⁻ gad8::ura4+</i>	YRGC
RA4375	<i>h⁺ gad8::ura4+ ckk2::hph</i>	Aquest treball
RA0743	<i>h⁹⁰</i>	Lab stock
RA3662	<i>h⁹⁰ ckk2::hph</i>	Aquest treball
RA3559	<i>h⁹⁰ gad8-S546A-kan</i>	J. Petersen
RA4479	<i>h⁹⁰ gad8-S546A-kan ckk2::hph</i>	Aquest treball
RA4423	<i>h⁺ act1-Lifeact-mCherry</i>	Aquest treball
RA4425	<i>h⁺ act1-Lifeact-mCherry ckk2::hph</i>	Aquest treball

1.2. Medis i condicions de cultiu.

Les cèl·lules de *S. pombe* van ser sembrades en medi líquid o sòlid de diferents composicions. Segons la necessitat de l'experiment, van ser crescudes a les temperatures de 25°C, 32°C o 37°C. Els cultius van ser recollits durant la fase exponencial de creixement (de entre 0,5-0,8 OD a 595 nm).

La composició dels medis utilitzats és la següent:

Yeast Extract with Supplements (YES): és el medi ric en el que es donen les condicions més òptimes pel creixement de *S. pombe*.

Reactius	Concentració
Extracte de llevat	0,5%
Glucosa	3%
Aminoàcids*	225 mg/L

*Aminoàcids: Adenina, Histidina, Leucina, Lisina i Uracil.

Edinburgh Minimal Medium (EMM) és el medi que conté els nutrients mínims perquè *S. pombe* pugui créixer. Durant aquesta tesis se'l referirà com a medi mínim.

Reactius	Concentració
Hidrogenftalat de Potassi ($C_8H_5KO_4$)	3 g/L
Clorur d'amoni (NH_4Cl)	5 g/L
Fosfat de sodi dibàsic (Na_2HPO_4)	2,2 g/L
Glucosa	2%
Aminoàcids* (Només Lisina, la resta opcionals)	225 mg/L
Sals**	20 mL/L
Vitamines***	1 mL/L
Minerals****	0,1 mL/L

Opcionalment, els medis mínims es poden suplementar amb altres aminoàcids. En aquestes ocasions, el nom del medi canvia. Per exemple, un medi mínim suplementat amb uracil, histidina i leucina, s'anomenarà UHA. Aquests medis mínims ajuden a la selecció de soques que presenten auxotrofies, és a dir, soques que presenten alteracions en vies que produeixen aquests mateixos aminoàcids.

En els experiments de deprivació se li van treure determinats components al medi EMM.

EMM-N: Medi mínim sense nitrogen → Se li ha tret el clorur d'amoni.

EMM-G: Medi mínim sense glucosa → S'ha reduït la concentració de glucosa a 0,1% i s'ha afegit glicerol a una concentració del 3%.

** Sals:

Reactius	Concentració
Clorur de magnesi hexahidratat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	52,5 g/L
Clorur de calci hidratat ($CaCl_2 \cdot H_2O$)	0,735 g/L

MATERIAL I MÈTODES

Clorur de potassi (KCl)	50 g/L
Sulfat de sodi (Na₂SO₄)	2 g/L

***Vitamines

Reactius	Concentració
Àcid pantotènic (C₉H₁₇NO₅)	1 g/L
Àcid nicotínic (C₆H₅NO₂)	10 g/L
Mio-inositol (C₆H₁₂O₆)	10 g/L
Biotina (C₁₀H₁₆N₂O₃S)	10 mg/L

****Minerals

Reactius	Concentració
Àcid bòric (H₃BO₃)	5 g/L
Sulfat de manganès (MnSO₄)	4 g/L
Sulfat de zinc heptahidratat (ZnSO₄·7H₂O)	4 g/L
Clorur de ferro hexahidratat (FeCl₂·6H₂O)	2 g/L
Àcid molíbdic (MoO₃·H₂O)	0,4 g/L
Iodur de potassi (KI)	1 g/L
Sulfat de coure pentahidratat (CuSO₄·5H₂O)	0,4 g/L
Àcid cítric (C₆H₈O₇)	10 g/L

SSA: El medi utilitzat per causar l'esperulació i fer els creuaments de soques.

Reactiu	Concentració
Dextrosa	10 g/L
Àcid aspàrtic	0,5 g/L
KH₂PO₄	2 g/L
Na₂HPO₄	0,2 g/L
MgSO₄·7H₂O	0,5 g/L
CaCl₂·2H₂O	0,1 g/L

Reactiu	Concentració
(NH₄)₂SO₄	2 g/L
NaOH 1N	4,2 mL/L
*Aminoàcids	225 mg/L
***Vitamines	1 mL/L
****Minerals	0,1 mL/L

Per les plaques de medi sòlid, es va afegir agar (15 g/L) als medis. En experiments d'exposició a estrès o drogues en medi sòlid, s'han afegit els reactius després d'autoclavar.

Per la selecció de resistències antibiòtiques es van utilitzar els antibiòtics següents:

- G418 Sulfate (Calbiochem) a una concentració de 100 µg/mL per seleccionar soques que tinguin o que hagin incorporat fragments que continguin el gen que confereix resistència a kanamicina.
- Hygromycin B Gold (Invivogen) a una concentració de 100 µg/mL per seleccionar soques que tinguin o que hagin incorporat fragments que continguin el gen que confereix resistència a higromicina.

1.3. Transformació.

La transformació és la tècnica que permet la introducció d'un DNA exogen (format fora de la cèl·lula receptora) en una cèl·lula de llevat. Aquest DNA posteriorment es pot integrar en el genoma o mantenir-se de forma episomal com passa en el cas dels plasmidis.

A *S. pombe*, el mètode que he utilitzat es la electroporació. Aquesta tècnica consisteix en l'aplicació d'un camp elèctric que causa una despolarització de la membrana que augmenta la seva permeabilitat, permetent l'entrada del DNA que es troba en suspensió amb aquestes cèl·lules.

El protocol següent es el següent:

1. Preparar un cultiu de 50 mL en fase exponencial de la soca a transformar, centrifugar 5 minuts a 3000 rpm i descartar el sobrenadant.
2. Rentar les cèl·lules amb aigua i centrifugar 5 minutos a 3000 rpm i descartar el sobrenadant.

MATERIAL I MÈTODES

3. Rentar les cèl·lules amb 1 mL de sorbitol 1M frí i centrifugar 2 minuts a 3000 rpm, descartar el sobrenadant i resuspendre en 1 mL de sorbitol.
4. Preparar alíquotes de 150 µL de cèl·lules i afegir el DNA a insertar.
5. Transferir l'alíquota a una cubeta de 0.2 cm d'ample (Sigma-Aldrich).
6. Aplicar un pols elèctric de 1.500V a la cubeta amb el Eppendorf Eporator ® (Eppendorf).
7. Plaquejar el contingut de la cubeta:
 - a. Si es una integració, en medi ric.
 - b. Si es un plasmidi, directament en el medi de selecció.

1.4. Integració de productes de PCR.

Les modificacions en el genoma de *S. pombe* como la delecio (eliminació del gen) o la adició d'un epítóp es poden fer per PCR.

Els oligonucleòtids utilitzats en aquesta PCR han de tenir una mida d'uns 100 nucleòtids, i contenir unes seqüències homòlogues al gen d'interès que es vol modificar i seqüències comunes a un conjunto de plasmidis, que son utilitzats com a motlle. La gran varietat de plasmidis que presenten aquestes seqüències comunes permeten generar una gran varietat de combinacions d'epítops i marcadors de selecció, el que li dona molta versatilitat. El producte de la PCR es transforma dins la soca de *S. pombe* a la que li volem introduir aquesta modificació i es sembra en una placa de medi ric (YES). Al dia següent, es fa una rèplica en una placa de medi ric amb antibiòtic per seleccionar aquelles que hagin inclòs el nostre insert.

A mesura que passin els dies, aniran creixen colònies resistents que seran replaquejades en plaques de medi ric i replicades successivament en medis rics i de selecció per escollir aquelles soques que hagin inclòs l'insert de manera estable. Per assegurar l'integració, es genotipen les soques mitjançant una Colony PCR.

1.5. Creuament de soques i assaig de diferenciació.

El creuament de soques consisteix en l'aparellament de soques h^- amb h^+ . Durant l'aparellament, es produeix la recombinació homòloga generant diferents combinacions de mutacions: es poden canviar les auxotrofies o es poden generar mutants amb deleccions de dos gens (coneguts com dobles mutants) o més.

Pels creuaments, es barreja una quantitat similar de les dues soques en una placa de SSA i s'incuben a 25°C de 2 a 3 dies. Si l'aparellament ha funcionat, es formen asques de 4 espores en el seu interior (ascoespores). A continuació, les cèl·lules es resuspenen en 1 mL d'aigua i es tracten amb 5 µL de glusulasa (NEE154001EA, Perkin Elmer), durant la nit a temperatura ambient i en rotació. L'endemà, es sembren les espores en medi ric perquè germinin. Un cop han crescut les colònies, es fan rèpliques en els medis de selecció per poder seleccionar els fenotips que ens interessin.

Els assajos de diferenciació s'han realitzat sembrant soques h^{90} en plaques SSA. Després de dos dies de creixement a 25°C, s'ha realitzat el comptatge de cèl·lules fins a 300, considerant zigots, tetràdes i cèl·lules sense aparellar, per calcular l'índex d'aparellament utilitzant la següent equació:

$$\text{Índex d'aparellament} = \frac{(\text{Zigots} + \text{Tètrades}) * 2}{[(\text{Zigots} + \text{Tètrades}) * 2] + \text{Cèl·lules no aparellades}} * 100$$

1.6. Tractaments d'estrès i deprivació.

El tractament d'estrès a cèl·lules en cultiu ens permet observar l'efecte *in vivo* que tenen els reactius sobre l'estabilitat, les modificacions i els nivells de determinades proteïnes.

- Pels experiments d'exposició a estrès, el reactiu o droga s'afegeix al cultiu en creixement durant la fase exponencial.

MATERIAL I MÈTODES

- Pels experiments de deprivació nutricional, las cèl·lules van ser cultivades en medi mínim (EMM). Per deprivar les cèl·lules es van centrifugar durant 5 minuts per eliminar el medi, i posteriorment es van rentar 2 o més vegades amb aigua i una darrera amb el propi medi de deprivació, per després resuspendre-les en aquest medi i incubar-les a 25°C durant el temps de l'experiment.

1.7. Sobre-expressió.

Els assajos de sobre-expressió causen un increment de l'expressió d'una proteïna per observar l'efecte causat sobre funcions cel·lulars o en altres proteïnes de la cèl·lula.

En aquest treball s'ha utilitzat el plasmidi pREP1-Cck2. Aquest plasmidi expressa el gen sota el control del promotor *nmt* (*no message in thiamine*), que com indica el seu nom, permet la repressió de l'expressió del gen quan es tracta el cultiu amb tiamina (vitamina B1). Les cèl·lules es cultiven en un medi que permet la selecció de les cèl·lules que contenen el plasmidi a través d'un marcador metabòlic present en aquest. A continuació, s'elimina la tiamina del medi de cultiu per induir la sobre-expressió de la proteïna d'interès, que adquireix uns nivells adequats un cop passades les 16 hores de l'eliminació de la tiamina.

Aquests plasmidis també presenten variacions en el seu promotor que causen diferències en els nivells d'inducció de la proteïna: per exemple, la inducció de la proteïna en el *nmt1* es elevada, mentre que en el *nmt81* la inducció es molt menys potent i els nivells de proteïna son molt més baixos.

1.8. Assaig de sensibilitat

Els assajos de sensibilitat permeten inferir el paper de determinats mutants en la resposta a certs estressos com el tractament amb reactius o la deprivació nutricional. S'ha identificat com a mutant sensible aquell

que presenta un menor creixement o viabilitat en resposta a un estrès en comparació amb la soca salvatge; i com a mutant resistent aquell que té un major creixement o viabilitat respecte a la soca wt.

Per aquest assajos, les cèl·lules es cultiven en cultius a una temperatura de 25-32°C segons les necessitat de determinades soques. Un cop les cèl·lules arriben a una densitat òptica (OD) entre 0,3 i 0,4, es plaqueja la mateixa quantitat de cèl·lules a la primera columna d'una placa de 96 pouets. A continuació, en les 5 columnes següents, s'aplica una dilució seriada 1:5 del cultiu, de manera que tenim a la primera columna sense diluir, una segona columna amb una dilució 1:5, una tercera amb una dilució 1:25... Una cop fetes les dilucions, es plaquegen les cèl·lules amb el *Replica Plater* (Sigma Aldrich) en plaques de medi sòlid que continguin els reactius a diferents concentracions.

Els reactius o drogues utilitzats han sigut els següents:

Reactiu	Concentració
Latrunculina B	1-2 μ M
Clorur de calci	100 mM
Rapamicina	200 ng/ μ L
Torin1	5 mM
Bortezomib	50 μ M

1.9. Assaig de supervivència

L'assaig de supervivència consisteix en la mesura de la supervivència d'una soca al llarg del temps en ser exposada a unes condicions determinades. Es mesura a través del recompte de cèl·lules provinents d'un cultiu que ha crescut en les condicions que volem analitzar, en una placa de medi ric. Es plaquegen sempre el mateix nombre de cèl·lules. Les cèl·lules que creixen en el dia 0, són establertes com el 100% de supervivència, i les que creixen els dies següents es comparen amb el punt 0 per establir la supervivència relativa.

MATERIAL I MÈTODES

2. Material i mètodes d'*E. coli*.

2.1. Medis i condicions de cultiu.

Les cèl·lules d'*E. coli* es creixen en medi LB* a 37°C. En funció del marcador de selecció del plasmidi o de les cèl·lules utilitzades, el medi pot estar complementat amb antibiòtics com l'ampicil·lina (50 mg/L) o el cloramfenicol (20 mg/L). En el cas de les cèl·lules DH5α, s'utilitzava només ampicil·lina; i en el cas de les cèl·lules BL21 Rosetta, s'utilitzava ampicil·lina i cloramfenicol a la vegada.

Per les plaques de medi sòlid, s'afegeix agar (15 g/L) als medis, que també poden ser suplementats amb ampicil·lina i/o cloramfenicol.

*La composició del medi LB és la següent:

Reactiu	Concentració
Triptona	10 g/L
Extracte de llevat	5 g/L
NaCl	10 g/L

2.2. Transformació.

Per la transformació de cèl·lules d'*E. coli*, de les soques DH5α o BL21 Rosetta s'ha utilitzat el mètode del xoc tèrmic. Per a ser transformades, cal que siguin competents. Per assolir la competència, es segueixen els següents passos:

1. Deixar créixer les cèl·lules fins a assolir la fase exponencial.
2. Centrifugar les cèl·lules durant 5 minuts a 5.000 rpm i 4°C, i resuspendre-les en 50 mL de MgCl₂ 100 mM fred.
3. Incubar 30 minuts en gel.
4. Centrifugar les cèl·lules durant 5 minuts a 5000 rpm a 4°C i resuspendre-les en 10 mL de CaCl₂ 100 mM fred.
5. Incubar 30-90 minuts en gel.

6. Centrifugar les cèl·lules durant 5 minuts a 5000 rpm a 4°C i resuspendre-les en 20 mL d'una solució 100 mM CaCl₂ i 15% glicerol.
7. Fer alíquotes de 300 µL i guardar-les a -80°C.

Un cop s'han obtingut les cèl·lules competents, es pot iniciar el protocol de transformació.

1. Incubar el DNA plasmídic amb 50 µL de cèl·lules DH5α o BL21 Rosetta en gel durant 30 minuts.
2. Aplicar un xoc tèrmic de 42°C durant 30-45 segons.
3. Incubar en gel durant 2 minuts.
4. Afegir 1 mL de LB per començar la recuperació de les cèl·lules i incubar durant 1 hora a 37°C.
5. Concentrar las cèl·lules en un volum més petit i plaquejar-les en el medi de selecció apropiat.
6. Comparar al dia següent amb un control negatiu (sense DNA) el creixement de colònies en la placa de selecció.

3. Tècniques de manipulació de DNA

3.1. Aïllament del DNA plasmídic

Un cop transformades i seleccionades les colònies que han estat transformades amb un plasmidi, es pot obtenir el DNA plasmídic d'aquestes colònies. Per fer-ho, cal fer créixer les cèl·lules *overnight* en un volum petit d'entre 3-5 mL. A l'endemà, es fa l'extracció del DNA plasmídic mitjançant el kit *Nucleospin® Plasmid Quickpure* (Macherey-Nagel), seguint les instruccions del fabricant.

3.2. PCR

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) es una tècnica de biologia molecular que permet l'amplificació d'un fragment específic de DNA. L'especificitat

MATERIAL I MÈTODES

de la tècnica depèn de l'ús de seqüències de DNA petites anomenades oligonucleòtids (o *primers*) que permeten delimitar la regió que serà amplificada per la Taq polimerasa.

En aquest treball s'ha utilitzat la PCR en diferents estudis per:

- Generar fragments de DNA que s'han d'inserir en el genoma de *S. pombe*.
- Amplificar fragments per ser clonats en plasmidis.
- Introduir dianes de restricció en l'extrem d'una seqüència.
- Introduir mutacions en la seqüència d'un gen.
- Genotipar soques.
- Comprovació de clonatge.

Normalment, el DNA motlle utilitzat es troba en suspensió en medi líquid i es pot realitzar la PCR utilitzant el kit iTaq™ *DNA Polymerase*, seguint el protocol aportat pel fabricant. No obstant, hi ha casos on el DNA motlle provenia d'una colònia d'una placa, el que es coneix com *Colony PCR*.

En l'extracció de DNA d'una colònia, el DNA s'extreu de manera ràpida. Amb aquest objectiu, amb una punta de micropipeta es poden agafar les cèl·lules i es dilueixen en aigua. A continuació, es posen a bullir les mostres durant 10 minuts a 95°C, i s'afegeixen 2 µL a la barreja de la reacció de PCR. En aquest cas, també s'utilitza la iTaq, però el protocol del termociclador varia lleugerament:

	94°C	3 minuts
40 cicles	94°C	1 minut
	55°C	1 minut
	72°C	4 minuts
	72°C	10 minuts

3.3. Clonatge

El clonatge es un procés a través del qual un fragment de DNA s'insereix en un vector. El vector acostuma a ser un plasmidi que conté unes característiques que ajudaran a seleccionar la seva integració, sigui un gen que confereix resistència a un antibiòtic o un gen que participa en la biosíntesi d'algun aminoàcid essencial.

El fragment clonat es pot obtenir mitjançant una PCR en la que s'han introduït les seqüències que son reconegudes pels enzims de restricció o per la digestió d'un vector que ja conté el fragment amb enzims de restricció. El vector al qual se li ha d'introduir el fragment de DNA també s'ha de tractar amb els mateixos enzims de restricció. Cal tenir en compte que cada enzim funciona en unes condicions determinades pels fabricants. Un cop digerit, els fragments són purificats pel kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up* (Macherey-Nagel).

Els fragments d'insert i vector digerits i purificats són, posteriorment, fusionats a través del procés de lligació amb la T4 DNA ligasa durant tota la nit a 16°C. Posteriorment, el producte de lligació és transformat en cèl·lules de *E. coli*. Per incrementar la eficiència de lligació es recomana l'ús d'entre 3 i 6 vegades més molècules d'insert que de vector. L'èxit de la lligació es pot comprovar amb una PCR o amb la digestió del fragment clonat.

3.4. Mutagènesi

La mutagènesi es el procés pel que es generen mutacions en la seqüència de DNA. En aquest treball, hem utilitzat el kit QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies) per introduir les mutacions de *ckk2* al plasmidi *pGEX-ckk2*.

MATERIAL I MÈTODES

3.5. Electroforesi de DNA

L'electroforesi es una tècnica que separa molècules de DNA a través de l'aplicació d'un camp elèctric. En aplicar el camp elèctric, les molècules es mouen segons la seva mida: com més petites siguin, més ràpid es mouran.

La separació de les molècules es produeix en un gel fet d'agarosa. Aquest gel es prepara dissolent agarosa sòlida en un tampó TAE*. La quantitat d'agarosa utilitzada defineix la resolució del gel, ja que defineix la mida dels porus a través dels quals passen les molècules.

A les mostres que s'han de córrer en el gel se'ls hi afegeix un tampó de càrrega**. El tampó conté un reactiu que fa més dens el DNA que el tampó TAE en el que s'aplica el camp elèctric i també conté un colorant que deixa observar l'avanç de la mostra en el gel. Paral·lelament, es carrega també un patró de molècules de mides conegudes, que ens ajudarà a determinar la mida dels fragments de DNA que es trobin a les mostres.

A la solució del gel d'agarosa s'afegeix GelRed® (Biogen), un agent intercalant que s'introdueix entre les cadenes de DNA i permet la visualització de les mostres en exposar el gel a una radiació ultraviolada. Les imatges del gel s'han pres en el Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad). Quan es volen escindir bandes del gel per ser digerides, es tallen amb un bisturí sobre un transiluminador. Posteriorment, el bloc de gel escindit es purifica utilitzant el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel) per obtenir el fragment de DNA desitjat.

*TAE = Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM.

**Tampó de càrrega 6x = Orange G 0,25% Glicerol 30% en agua.

3.6. Purificació de fragments de DNA

Els fragments de DNA i de digestió es purifiquen directament de la reacció o d'un gel d'agarosa després d'una electroforesi amb el kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up* (Macherey-Nagel).

3.7. Plasmidis utilitzats

Plasmidi	Origen
pFA6a-HA-kan	Lab stock
pFA6a-Ckk2-HA-kan	Lab stock
pFA6a-Ckk2-K202R-HA-kan	Aquest treball
pFA6a-Ckk2-K72R,K202R,K251R-HA-kan	Aquest treball
pFA6a-hph	Lab stock
pGEX-ckk2	Lab stock
pGEX-ckk2-L152G	Aquest treball

3.8. Oligonucleòtids utilitzats

Nom	Seqüència	Origen
Ckk2-L152G fwd	CACTAACACAATTAGTCGGCACTACTGTCCTGGTGAAAG TTG	Aquest treball
Ckk2-L152G rev	CAACTTCCACCAGGACAGTAGTTGCCGACTAATTGTTGTTA GTG	Aquest treball
Ckk2-K72R fwd	GGCTATCAAAGAATTTAGAAAGACAAGTCTTAGGAGG	Aquest treball
Ckk2-K72R rev	CCTCCTAAGACTTGTCTTTCTAAATCTTTGATAGCC	Aquest treball
Ckk2-K202R fwd	GGAGTTATTCACCGAGATATTAGACCGGATAATATTTTGTTTA AGG	Aquest treball
Ckk2-K202R rev	CCTTAAACAAAATATTATCCGGTCTAATATCTCGGTGAATAAC TCC	Aquest treball
Ckk2-K251R fwd	GAACTCTTCGATAATGAGCTGAGAAAAATTAAGGGTAAACC	Aquest treball
Ckk2-K251R rev	GGTTTACCCTTAATTTTTCTCAGCTCATTATCGAAGAGTTC	Aquest treball
Int6 tag fwd	CAAAGTCATTAAGTTTTGAAAGTCAAACCTGGAGCAATCTCT TGCTAAAAGCATTTCGGAGTTAAAGCATGCTACTGTTCCGGAT CCCCGGGTTAATTAA	Aquest treball
Int6 del/tag rev	GATATTCAATGAGCACGTTTTCTTTAAATAGGAAAGTACACAG TCATCTTCTACAATAACGAGTTGTTTAAAATACAAAAGAATT CGAGCTCGTTTAAAC	Aquest treball
Int6 check tag fwd	GTAATAATCCTTCAGTTGCCGC	Aquest treball
Int6 del fwd	GGGCTACTACTAGAGTTTTGGGTGAGTTGTGCTATCCTCCCC ACACCACGCACTTTTTTTTTGCGTGAACATATCAGATCGGAT CCCCGGGTTAATTAA	Aquest treball
Int6 check del fwd	TTTTGTACGAACATTGCTGACC	Aquest treball

MATERIAL I MÈTODES

Nom	Seqüència	Origen
Cgs1 tag fwd	ATCAACCTCGTGCCAGGATGGGAATGGATAATGAGTATGGT GACCAATCTTTCATAGGTACCTCCATCAACTAAAGCACGG ATCCCCGGGTTAATTAA	Aquest treball
Cgs1 del fwd	ACCGCGAGATTGTGATTCACTGAGAGTAAGAAACAAAAACC GCATTTTTTGAAAGAAAGGCACGTAAACTTTAGGAGACCGGA TCCCCGGGTTAATTAA	Aquest treball
Cgs1 del/tag rev	GAATAAGTAAATTATTCCAGGGATAATGGTAAACAATCACAT GCATGCATGACCAATATGAAAAGTTAGAAGGCAAACAGAAT TCGAGCTCGTTTAAAC	Aquest treball
Cgs1 check tag fwd	GCCTTGACAAATATCAACGACA	Aquest treball
Cgs1 check del fwd	CATCTCAACCGTAACAAACGAA	Aquest treball
Pka1 tag fwd	AATTTGACGCTTATGCTGATGTAGCTACGGATTATGGAACAT CTGAAGATCCTGAATTTACTTCTATCTTTAAGGACTTTCGGAT CCCCGGGTTAATTAA	Aquest treball
Pka1 tag rev	ACTGAAGCCAATATTGGTGAATTGCAAATCAGTGCTACAAA CGTCACTTGCATTGCACTAAATCAATAGGCATTCGTTGAATT CGAGCTCGTTTAAAC	Aquest treball
Pka1 check tag fwd	ATATCCTTGAAGGCAAGGTCAA	Aquest treball
Kan CO18 rev	GTCACATCATGCCCTGAGC	Lab stock
Hph rev	TATCCACGCCCTCCTACATC	Lab stock
Act1 RT fwd	CGCCGAACGTGAAATTGTTTCGTGA	Lab stock
Act1 RT rev	TCAAGGAGGAAGATTGAGCAGCA	Lab stock
Fbp1 RT fwd	GCCTGGTAAAGAAATGGTTGC	Lab stock
Fbp1 RT rev	TCGCCAATATCAGTGTCCAAG	Lab stock
Ckk2 del fwd	TTAATTTTGCTTTATATTTGAATATCCATTCCATCGCTGTGCG GTGAAGTCACTGCATTAACAAGAACCCAAAAATCACCCGGAT CCCCGGGTTAATTAA	Aquest treball
Ckk2 del rev	CAAGCTTGAAAAATTAGATGTGTAAGTAATGAGGTTGAAGCT ATTAATGAAGAATGGAGAAAATTAAGAGCAACAAAAGAAT TCGAGCTCGTTTAAAC	Aquest treball
Ckk2 check del fwd	GCTACCAATAGCGCCATAACTT	Aquest treball

4. Tècniques de manipulació de proteïnes

4.1. Extracció de proteïnes.

Les cèl·lules es recullen després dels experiments, abocant el cultiu en una rampa de buit (PALL Corporation). El líquid passa a través d'una membrana d'èsters mixtos de cel·lulosa d'un diàmetre de 25 mm amb un

MATERIAL I MÈTODES

porus de 0,45 μm . Sobre la superfície d'aquesta membrana es queden adherides les cèl·lules. La membrana es transfereix a un tub de rosca de 2 mL amb tap. Segons el propòsit de la extracció:

- Western Blot → Es renta la membrana amb 1 mL d'àcid tricloroacètic (TCA) (*Sigma-Aldrich*) 20%. El TCA s'utilitza per proteïnes inestables i de baixes concentracions com Ckk2, ja que inactiva proteases i fosfatases que la podrien degradar. Després es centrifuga durant 1 minut a 4000 rpm i es descarta el sobrenedant. El pellet es renta amb 1 mL de Trizma base (*Sigma-Aldrich*) per neutralitzar l'àcid i es centrifuga 1 minut a 4000 rpm i es descarta el sobrenedant. El pellet es guarda a -80°C .
- Immunoprecipitacions → Es renta la membrana amb 1 mL de STOP buffer*. Es centrifuga durant 1 minut a 4000 rpm i es descarta el sobrenedant. El pellet es guarda a -80°C .

*STOP Buffer: 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 10 mM EDTA y 1 mM NaN_3 .

Després de la obtenció del pellet de cèl·lules es procedeix amb el lisat de les mateixes.

Pel Western Blot, s'ha resuspès el pellet en 100 μL una solució de buffer de lisi** i s'ha recobert el líquid amb *glass beads* (*Sigma-Aldrich*).

Per a la immunoprecipitació, s'ha resuspès el pellet en 200 μL d'una solució de buffer de lisis IP** i es recobreix el líquid amb *glass beads* (*Sigma-Aldrich*)

**Buffer de lisis: Tris-HCl 67 mM pH 6,8 y 2% SDS que conté un *cocktail* de inhibidors de proteases (Complete Mini EDTA-free, Roche).

***Buffer de lisis IP: 50 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 2,5 mM EDTA, 0,002 % NP-40, 50 mM NaF i un *cocktail* de inhibidors (Complete Mini EDTA-free, Roche)

Després de re-suspendre les cèl·lules en el seu buffer corresponent, es col·loquen els tubs en la Mini-Beadbeater-16 (*Biospec Products*), per

MATERIAL I MÈTODES

realitzar 4 polsos d'agitació d'un minut de duració a 4°C. Aquests polsos causen la ruptura mecànica de la paret i la membrana cel·lular i l'alliberament del contingut de les cèl·lules en el buffer de lisi. A partir d'aquest moment, les cèl·lules s'han de mantenir a 4°C per evitar l'activació de proteases que causin la seva degradació. Després dels polsos, es practica un forat a la part inferior del tub i es fa un spin curt per obtenir l'extracte. A continuació, l'extracte es centrifuga durant 2 minuts a 4°C i s'obté una fracció soluble, on es troben la major part de proteïnes i un pellet.

4.2. Quantificació de proteïnes.

La quantificació de proteïnes s'ha realitzat mitjançant la reacció de Lowry, un mètode colorimètric, que es basa en la quantificació del canvi de color que es produeix després de la reacció, i es mesura l'absorbància a una longitud d'ona de 750 nm. El canvi de color que es produeix es proporcional a la concentració de proteïnes del lisat i es pot correlacionar a una recta patró obtinguda a partir de concentracions conegudes de l'albumina sèrica bovina (BSA). La reacció de Lowry es du a terme sota les especificacions del fabricant del kit *DC™ Protein Assay* (Bio-Rad) i la mesura de l'absorbància es fa amb un lector de plaques mitjançant el *software* Gen5 (BioTek), que llavors ens permetrà extrapolar la concentració.

4.3. Electroforesis de proteïnes en condicions desnaturalizants.

L'electroforesi es pot utilitzar també per separar les proteïnes segons el pes molecular. Les mostres circulen a través d'un gel format per una matriu d'acrilamida/bis-acrilamida, que està dividida en dues parts:

- La part superior empaquetadora (*stacking*), té una baixa concentració d'acrilamida i permet l'apilament de les proteïnes de

la mostra abans de passar al segon gel. La composició del gel empaquetador és la següent:

- Acrilamida, persulfat d'amoni i TEMED.
- 0,75M Tris-HCl a pH 8,8 i un 0,2% de SDS.
- La part inferior és la resolutive (*resolving*), que separa les proteïnes segons la seva massa molecular, amb una resolució determinada pel percentatge d'acrilamida utilitzat. Una concentració més alta fa que la mida dels porus sigui més petita, i donarà més resolució en la separació de proteïnes de menor pes molecular. La solució d'aquest gel està formada per:
 - Una quantitat d'acrilamida variable que determinarà la resolució, persulfat d'amoni i TEMED.
 - 0,25M Tris-HCl a pH 6,8 i un 0,2% de SDS.

Els reactius de persulfat d'amoni i TEMED que s'afegeixen als gels serveixen per promoure la iniciació de la polimerització de l'acrilamida.

La desnaturalització de les mostres s'obté amb l'addició del tampó de mostra*, que conté SDS, un agent químic que confereix càrrega negativa a les proteïnes; i DTT, un agent reductor que trenca els ponts disulfur. Quan les mostres són sotmeses a un camp elèctric, es desplacen cap al pol positiu a una velocitat inversament proporcional a la massa molecular: les molècules més petites es desplaçaran més ràpidament. Prèviament a la càrrega en el gel, es bullen les mostres a 95°C durant 5 minuts.

El camp elèctric s'aplica al gel submergit en un tampó electròlit** fins que el front arribi al final del gel o fins que hi hagi prou resolució en un rang de proteïnes que interressi. Per determinar el pes molecular de les mostres, s'afegeix un marcador de pes molecular, com: *Unstained Low Range* (Bio-Rad) o el *Precision Plus All Blue* (Bio-Rad).

*Tampó de mostra 4x = 40 mM tampó fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} / \text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$); 40% glicerol; 10% SDS; 0,2% DTT; 0,05% blau de bromofenol.

MATERIAL I MÈTODES

**Tampó electrolític: 192 mM Glicina; 25 mM Tris; 0,1% SDS.

4.4. Western Blot.

El Western Blot és la tècnica que consisteix en la identificació d'una proteïna determinada mitjançant l'ús d'un anticòs específic contra aquesta proteïna o un epítop que s'ha afegit a aquesta proteïna. La tècnica està dividida en dues parts: l'electrotransferència i la immunodetecció.

4.4.1. Electrotransferència.

Consisteix en la transferència de les proteïnes que estan en el gel de poliàcrilamida a una membrana de nitrocel·lulosa (Bio-Rad) en aplicar un camp elèctric. El gel està situat en el pol negatiu, i l'electricitat farà que les proteïnes, que tenen càrrega negativa, circulin cap al pol positiu, unint-se a la membrana de nitrocel·lulosa. Al final, s'obté una membrana amb les proteïnes situades a la seva superfície.

Per aplicar el camp elèctric, l'estructura necessita estar submergida en un tampó de transferència* a 4°C, per evitar un sobrecaentament durant l'aplicació del camp elèctric.

*Tampó de transferència: 25 mM Tris-HCl; Glicina 150 mM; SDS 0,02%; 20% etanol.

4.4.2. Immunodetecció.

La immunodetecció és la detecció de la proteïna mitjançant l'ús d'un anticòs. La detecció de la proteïna es fa de manera indirecta, doncs s'ha d'utilitzar dos anticossos.

La membrana s'incuba amb una solució de bloqueig durant 1 hora a temperatura ambient per evitar la unió inespecífica d'anticossos a la membrana. La solució té una composició de 5% de llet en pols o BSA dissolt en TBS-T*

*TBS-T: TBS** +0,1% Tween-20 (Sigma-Aldrich).

**TBS: 20 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; pH 7,5.

Després de bloqueig, la membrana s'incuba amb l'anticòs primari, en les condicions que determini el fabricant. Aquest anticòs s'encarrega de reconèixer específicament els epítops de la proteïna i segons el seu origen serà monoclonal o policlonal.

Quan s'acaba la incubació, es renta la membrana per eliminar les restes de l'anticòs. Es fan 3 rentats de 5 minuts a temperatura ambient amb TBS-T. Posteriorment, la membrana s'incuba amb una solució de bloqueig que conté l'anticòs secundari. La funció de l'anticòs secundari és reconèixer l'anticòs primari en una regió constant per tots els anticossos produïts per la mateixa espècie. S'ha d'aplicar un anticòs secundari que reconeixi l'epítop de l'espècie en la que s'ha generat l'anticòs primari.

Abans de revelar l'anticòs, cal fer 2 rentats de 10 minuts amb TBS-T i un de 10 minuts amb TBS per eliminar les unions inespecífiques de l'anticòs.

L'anticòs secundari porta conjugada una peroxidasa (HRP), que reacciona amb els reactius de revelat del kit EZ-ECL (Biological Industries), generant-se una senyal lumínica que ens indica on es troben les proteïnes. Aquesta senyal pot ser detectada per plaques de fotografia (AGFA) o mitjançant el *ChemiDoc* (Bio-Rad).

4.5. Tinció amb blau de Coomassie.

Per visualitzar les proteïnes directament en el gel de poliacrilamida, es pot tenyir el gel amb blau de Coomassie. Immediatament després de córrer el gel, s'incuba amb una solució de Coomassie* durant 15 minuts a temperatura ambient. El pigment de blau de Coomassie formarà complexos estables amb les proteïnes de manera proporcional a la seva presència en la mostra. Posteriorment a la tinció, s'incuba el gel amb una solució

MATERIAL I MÈTODES

destenyidora** per eliminar l'excés de colorant de les regions on no hi ha proteïna.

*Solució de Coomassie: 2,5 mg de blau de Coomassie; 45% metanol; 10% àcid acètic.

**Solució destenyidora: 50% metanol; 10% àcid acètic.

4.6. Immunoprecipitació.

La immunoprecipitació consisteix en l'aïllament d'una proteïna específica d'un extracte proteic mitjançant l'ús d'un anticòs específic contra la proteïna d'interès. En el meu cas, he utilitzat l'anticòs contra l'epítop HA conjugat a *beads* d'agarosa *Pierce Anti-HA Agarose* (Thermo Fisher).

4.7. Anticossos.

Anticòs	Casa Comercial	Secundari
Anti-HA	Roche	Mouse
Anti-PSTAIR	Cell signaling	Rabbit
Anti-GST		Mouse
Anti-tiofosfat ester	Abcam	Rabbit

5. Creació d'una proteïna Ckk2 analog-sensitive.

5.1. Quinases analog-sensitive (as).

Les quinases tenen un domini en forma de butxaca que els hi permet unir ATP. La mida d'aquestes butxaques depèn d'un residu que forma part d'aquesta estructura anomenat *gate-keeper*. La modificació d'aquest residu, doncs, pot alterar l'afinitat de la quinasa per reconèixer ATP, donant-li una major afinitat per inhibidors competitiu d'ATP o per formes modificades d'ATP en el seu lloc. La identificació d'aquest residu *gate-*

keeper en quinases s'ha fet mitjançant l'alineament de la proteïna d'interès amb la proteïna c-Src de *Homo sapiens*, de la qual es va identificar el residu *gate-keeper* (Lopez *et al.*, 2014). El residu *gate-keeper* serà el que estigui alineat amb la treonina 341 de s-Src. Aquest residu es pot modificar per alterar l'afinitat de la proteïna de dues maneres diferents:

- La més recomanada es la modificació a glicina (conegut com l'al·lel as1), que genera la major diferència en la mida de la butxaca del bucle d'ATP, però a vegades és possible que aquesta mutació elimini per complet l'activitat quinasa de la proteïna mutada.
- Alternativament, existeix la mutació a alanina (l'al·lel as2), en la que s'ha observat el manteniment de l'activitat quinasa (Lopez *et al.*, 2014).

La nova quinasa *analog sensitive*, gràcies a la mutació al residu *gate-keeper* presenta una major afinitat per inhibidors competitiu d'ATP *in vivo* com 3MB-PP1 a *S. pombe* (Cipak *et al.*, 2011). També existeixen molècules d'ATP modificades com l'ATPγS (Abcam), que poden unir-se a la butxaca d'unió de l'ATP i es poden utilitzar per avaluar l'activitat quinasa (Allen *et al.*, 2007). Aquest tipus de molècules no poden travessar la paret cel·lular, però si que poden ser utilitzats *in vitro* amb la quinasa *analog sensitive* per realitzar un assaig quinasa.

Com a resultat de l'assaig, l'ATPγS s'utilitza per tiofosforilar el substrat. A continuació, es fa una reacció d'alquilació amb l'addició de p-Nitrobenzyl mesylate (PNBM, Abcam) (Figura M1). Com a conseqüència de l'alquilació es genera un grup tiofosfat ester en la molècula substrat que pot ser reconegut amb l'anticòs *tiophosphate ester* (Abcam), de manera que es poden detectar les fosforilacions *in vitro* amb un Western Blot.

MATERIAL I MÈTODES

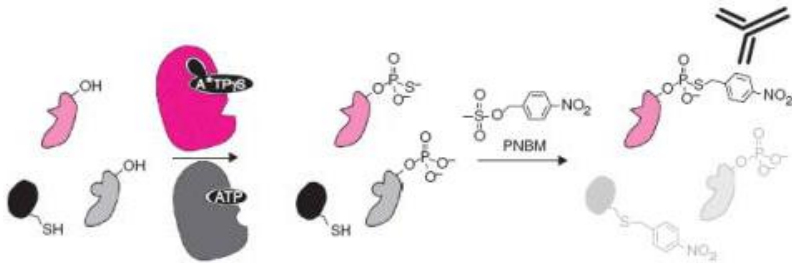


Figura M1. Funcionament de l'assaig quinasa. En color rosa, s'observa la quinasa analog sensitive, que pot tiofosforilar els seus substrats amb ATPγS. En un segon pas, el tractament amb PNBM permet la fosforilació de tiofosfats ester que poden ser reconegudes per les IgG de l'anticòs. D'aquesta manera, només es detecten els substrats que són fosforilats per la quinasa as. Figura extreta d'Allen *et al.*, 2007.

5.2. Expressió i purificació de proteïnes *in vitro*.

Per expressar les proteïnes existeixen diferents vectors i soques de *E. coli*. En aquest treball, s'ha utilitzat la soca BL21 Rosetta (Novagen), que està dissenyada per potenciar l'expressió de proteïnes de codons que s'utilitzen poc a *E. coli* per les diferències en el codi genètic i el vector pGEX-KG, que té un promotor que pot ser induït amb *isopropyl β-D-1-thiogalactoside* (IPTG), un anàleg de la lactosa. El mecanisme pel qual s'indueix en afegir IPTG consisteix en que el promotor es troba silenciats pel gen *lacI*, inclòs en el propi insert, fins que s'afegeix IPTG al medi. Una altra característica del vector es que permet clonar la proteïna fusionada a la glutatió-S-transferasa (GST).

Per optimitzar les condicions necessàries per amplificar el rendiment de l'extracció i purificació de la proteïna es realitzen unes proves per determinar la concentració d'IPTG i la temperatura d'inducció més òptimes. Un cop definides les condicions, es comença l'expressió i purificació de la proteïna:

Dia 1:

1. Créixer un cultiu de gran volum de BL21 Rosetta transformat amb el vector d'expressió, a fase exponencial.

MATERIAL I MÈTODES

2. Afegir la concentració òptima de IPTG al cultiu i incubar-lo a la temperatura òptima, condicions definides per les proves d'inducció anteriors.
3. Centrifugar durant 10 minuts a 6.000 rpm i a 4°C i guardar el precipitat de cèl·lules a -80°C.

Dia 2:

4. Descongelar el pellet en gel i resuspendre en un volum de 10 mL de NET-N^[1] fred
5. Transferir la suspensió a un tub de 50 mL i sonicar-la durant 10 segons 4 vegades. El sonicat es fa en gel i la mostra es deixa reposar en gel entre els sonicats per evitar un augment de la temperatura massa pronunciat.
6. Centrifugar el producte del sonicat durant 15 minuts a 13.000 rpm a 4°C.
7. Separar la fracció líquida del sonicat de la sòlida.
8. Equilibrar la resina que conté les beads de glutatió-sefarosa (GE Healthcare) amb rentats de PBS^[4] fred una vegada, i dues vegades amb NET-N
9. Incubar la fracció líquida amb la resina de glutatió-sefarosa durant al menys 16 hores. En aquesta incubació, les proteïnes de fusió amb GST quedaran unides a la resina.

[1] NET-N: NET ^[2]; Igepal 0,5%; inhibidors de proteases ^[3].

[2] NET: 20 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; pH 8.

[3] Inhibidors de proteases: 10 mg/mL aprotinina; 5 mg/mL leupeptina; 1 mM PMSF.

[4] PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM NaHPO₄; 2 mM KH₂PO₄; pH 7,4.

Dia 3:

10. Rentar la resina amb NET-N fred tres vegades i NET fred dues vegades per eliminar les unions inespecífiques amb la resina.
11. Incubar la resina amb 1 mL de tampó d'elució 1^[5] i 30 mM de Glutatió/DTT durant 1 hora a 4°C en rotació. Aquest tampó

MATERIAL I MÈTODES

trencarà la majoria de les unions de la proteïna de la fusió amb la resina.

12. Centrifugar durant 5 minuts a 3.000 rpm a 4°C per obtenir dos fraccions. A la fracció líquida se l'anomenarà eluït 1, i contindrà la major part de la proteïna de fusió, i es pot guardar a -80°C.
13. La fracció sòlida, la resina, es incubada amb 1 mL de tampó d'elució 2^[6] i 30 mM de Glutatió/DTT durant 1 hora a 4°C en rotació.
14. Centrifugar durant 5 minuts a 3.000 rpm a 4°C per obtenir dues fraccions. La fracció líquida es guardarà com eluït 2 a -80°C.
15. Fer una incubació final de la resina amb 1 mL de tampó d'elució 2 i 40 mM de Glutatió/DTT durant tota la nit a 4°C en rotació.

[5] Tampó de elució 1: 50 mM Tris-HCl; 250 mM NaCl; pH 8,5

[6] Tampó de elució 2: 50 mM Tris-HCl; 120 mM NaCl; pH 9,6

Dia 4:

16. Centrifugar durant 5 minuts a 3.000 rpm a 4°C per obtenir amb dues fraccions. La fracció líquida es guardarà com eluït 3 a -80°C.

A mesura que avança el protocol s'agafin petites alíquotes per comprovar l'eficiència de la purificació. Aquestes alíquotes es corren en un gel de poliacrilamida i es tenyeixen amb Coomassie per veure la purificació de la proteïna.

5.3. Assaig quinasa *in vitro*.

En un assaig quinasa, es transfereix un grup fosfat d'un ATP a un substrat per part d'una proteïna quinasa. Aquests assajos s'utilitzen per determinar si una quinasa fosforila a un substrat.

En aquest treball s'ha utilitzat la Ckk2-as, la forma *analog sensitive* de Ckk2, i l'ATPyS com a donador del grup tiofosfat. S'ha utilitzat 1 µg de Ckk2-as i 1 µg de substrat; 0,5 µg de calmodulina; tampó quinasa* 1x i

100 ng ATPγS. Com treballem amb quinases dependents del complex $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, s'ha afegit 5 mM CaCl_2 com a font de calci, i s'ha afegit 30 mM d'EGTA per fer un control negatiu. L'assaig quinasa es fa a una temperatura de 37°C durant 30 minuts.

Després de l'assaig, s'afegeixen 2,5 mM de PNBM a cada assaig quinasa, i es deixa fer la reacció d'alquilació durant 2 hores. S'afegeix tampó de mostra per aturar la reacció i carregar-la a un gel de poliacrilamida per fer un Western Blot. La incubació amb l'anticòs tiofosfat ester (Abcam) permet reconèixer aquelles proteïnes que han sigut fosforilades per la Ckk2-as.

6. Tècniques de manipulació de RNA

6.1. Extracció de RNA.

El procés d'extracció de RNA s'ha d'efectuar amb molta precaució, doncs es molt sensible a la contaminació i a la degradació del RNA per les exonucleases RNAses. Per aquest motiu, s'ha de garantir l'esterilitat amb guants nets i puntes de filtre, i la manipulació sempre s'ha de fer a baixes temperatures.

Abans d'aïllar el RNA, es lisen les cèl·lules de manera mecànica amb les *glass beads* utilitzant el Beadbeater-16. La fracció líquida del lisat es sotmet al kit *High Pure RNA Isolation* (Roche) seguint les instruccions del fabricant. La concentració i qualitat del RNA obtingut es quantifica amb el Nanodrop 1000 (Thermo Fisher).

6.2. Retrotranscripció.

Amb la retrotranscripció es genera DNA complementari (cDNA) a partir de RNA, gràcies a l'ús de la transcriptasa reversa o retrotranscriptasa (RT). El RNA aïllat es va retrotranscriure utilitzant el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems).

MATERIAL I MÈTODES

6.3. Real-Time PCR (PCR quantitativa, qPCR).

La PCR quantitativa permet analitzar com es transcriuen el gens amb l'objectiu de comparar l'expressió gènica a temps real en diferents situacions.

Es una variació de la PCR convencional en la que a mesura que es produeix l'amplificació del DNA, s'uneix un fluoròfor de manera proporcional a la quantitat de DNA que hi ha present a la mostra. D'aquesta manera, al final de cada cicle de la PCR, es quantifica l'absorbància d'aquest fluoròfor, es pot traçar una corba d'amplificació i es pot extrapolar a la quantitat de DNA que es troba present. Aquesta quantitat de DNA però, es una quantitat absoluta, i s'ha de relativitzar amb un gen control que mantingui la seva expressió constant en les diferents condicions. Aquest control de càrrega permet saber si les diferències que es puguin observar en l'expressió es poden deure a variacions en la càrrega de la PCR.

La PCR s'ha dut a terme al termociclador Mx3000p qPCR (Stratagene) amb el kit Express SYBR® Green ERTM qPCR Supermix Universal (Invitrogen). La reacció s'ha fet en les següents condicions:

	95°C	10 minuts
40 cicles	95°C	30 segons
	60°C	30 segons
	72°C	1 minut

S'ha utilitzat els oligonucleòtids indicats en la secció 3.8 amb les lletres RT per realitzar la Real-Time, utilitzant el gen Act1 com gen normalitzador de l'expressió.

7. Microscopi.

7.1. Presa d'imatges.

Les cèl·lules han estat observades amb el microscopi HAL100 (Zeiss) amb roda de filtres de fluorescència, i les imatges han estat preses amb el programa Slidescope.

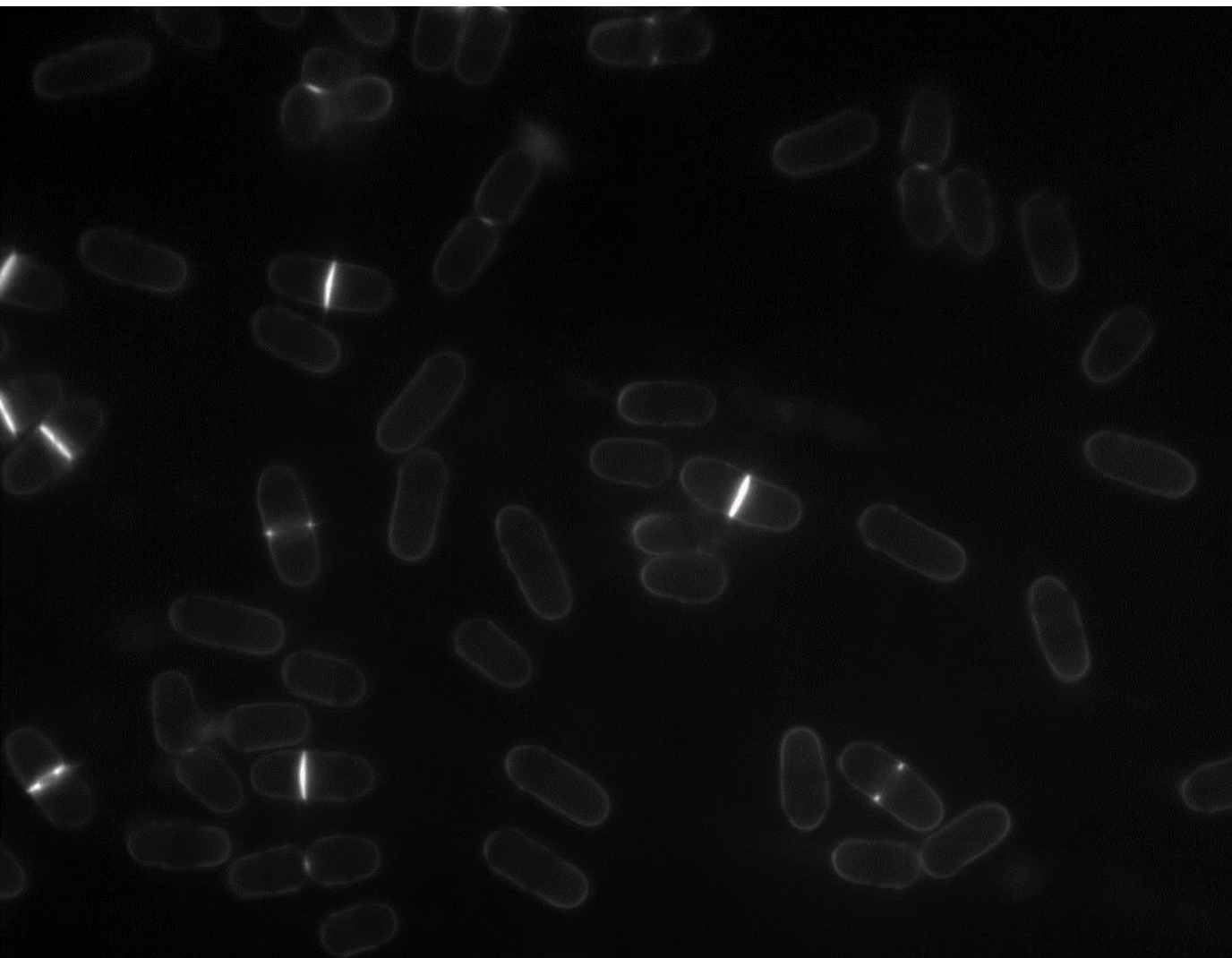
7.2. Anàlisi d'imatges.

Les imatges han sigut processades amb Photoshop (Adobe) o ImageJ per crear les figures o comptar els nuclis.

8. Anàlisi de dades.

S'ha utilitzat Excel (Microsoft) i Graphpad (Prism) per analitzar dades, generar gràfiques i realitzar tests estadístics.

RESULTATS



Resultats

1. Funció i regulació de la Ckk2 en resposta a estrès nutricional.

1.1. Anàlisi de la funció de Ckk2 en resposta a estrès nutricional.

1.1.1. Anàlisi de la supervivència en estrès nutricional.

L'augment dels nivells de Ckk2 observat en estudis anteriors del nostre grup condicions de deprivació nutricional ens va portar a preguntar-nos si aquest augment es produïa perquè Ckk2 fos necessari per sobreviure en aquestes situacions o perquè fos necessari per entrar en quiescència en el cas de la deprivació de nitrogen.

Es va analitzar la viabilitat de cultius $\Delta ckk2$ deixant-los créixer durant varies setmanes en un medi sense nitrogen i es comparava amb la viabilitat d'una soca salvatge. Es va seleccionar unes 4 setmanes perquè l'increment de proteïna Ckk2 es donava ja en el primer dia i vam creure que podríem observar, si existia un fenotip, ja en la primera setmana. La recuperació es va fer en forma d'assaig de viabilitat d'aquestes soques en medi ric. Cap a les quatre setmanes, les soques han mantingut el mateix ritme de creixement i presenten una reducció de la viabilitat (Figura R1), però no s'han observat diferències entre elles. Per tant, Ckk2 no seria important per la supervivència en deprivació de nitrogen a llarg termini.

Es va analitzar també la supervivència en deprivació de glucosa. El fet que Ckk2 també veu els seus nivells de proteïna augmentats en resposta a la deprivació de glucosa, ens va portar a preguntar si era necessari per a la supervivència. Per respondre a aquesta qüestió, es va analitzar la viabilitat en plaques de medi ric que contenien una concentració molt reduïda de

RESULTATS

glucosa (0,01%) i es va observar que no hi havia diferències en el creixement (Figura R2). Tot i això, és possible que les diferències en viabilitat no siguin molt grans i no es puguin observar en l'assaig de sensibilitat en placa. Per tal de realitzar un assaig de sensibilitat molt més quantitatiu vàrem determinar el percentatge de colònies que creixen després de plaquejar un nombre determinat de cèl·lules que han estat creixent en un cultiu de medi ric a una concentració de glucosa de 0,1%. Es va mesurar la densitat òptica a les primeres hores de privació per esbrinar si es produïrien diferències en la velocitat de creixement, però les dues soques van mostrar un patró de creixement similar (Figura R3, dreta). En el cas de la supervivència, es va observar una tendència de reducció de la supervivència a partir del segon dia (Figura R3, esquerra), que és estadísticament inferior en la soca $\Delta ckk2$. Això ens indicaria que Ckk2 no estaria participant en la divisió cel·lular però sí en el manteniment de la viabilitat en restricció calòrica.

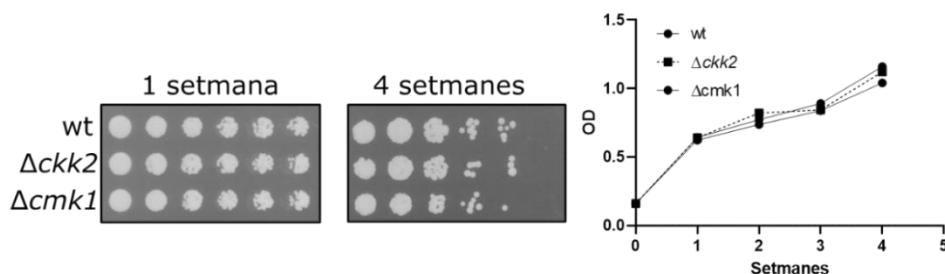


Figura R1. La deleció de Ckk2 i Cmk1 no afecta a la viabilitat de la soca en absència de nitrogen. Les soques wt (RA2227), $\Delta ckk2$ (RA3658) i $\Delta cmk1$ (RA3375) van ser crescudes en medi mínim abans de ser deprivades de nitrogen.

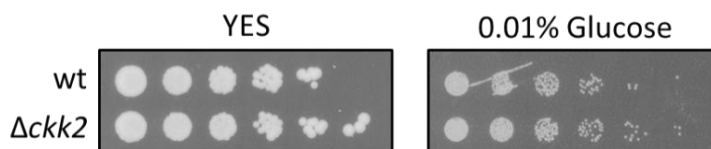


Figura R2. La deleció de Ckk2 no afecta a la viabilitat de la soca en absència de glucosa. Les soques wt (RA2227) i $\Delta ckk2$ (RA3658) van ser crescudes en medi ric i es van plaquejar en una placa amb una concentració de 0,01% de glucosa.

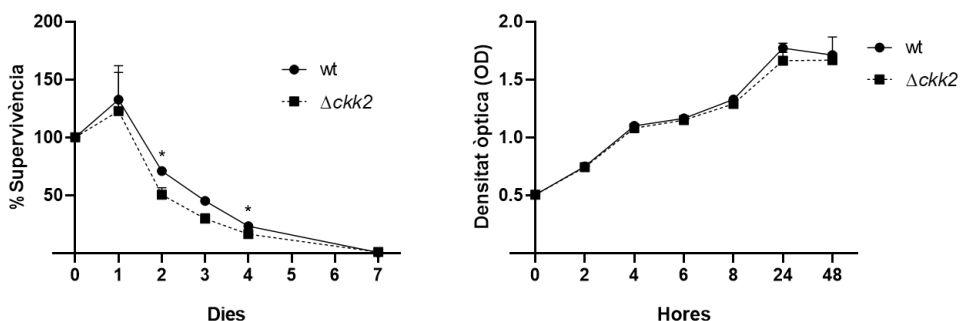


Figura R3. Petita reducció de la viabilitat en la soca $\Delta ckk2$ en un cultiu deprivat de glucosa. Les soques wt (RA2227) i $\Delta ckk2$ (RA3658) van ser crescudes en medi ric i es van transferir a un medi ric a una concentració de 0,1% de glucosa. A l'esquerra, mesura del percentatge de cèl·lules supervivents en cultiu de medi ric deprivat de glucosa. A la dreta, mesura de la densitat òptica cada dues hores. En la gràfica * significa $p < 0,05$. Les barres d'error representen mitjana \pm SEM. N = 3 experiments.

1.1.2. Anàlisi de la re-entrada al cicle cel·lular

Per esbrinar si Ckk2 podria ser necessari en la re-entrada al cicle cel·lular, es va analitzar el creixement de les cèl·lules de les soques wt i $\Delta ckk2$ un cop es retornaven a un medi amb font de nitrogen després d'estar-ne durant 24 hores sense. Es van anotar els paràmetres de densitat òptica i l'índex de septació per tenir en compte tant el creixement com la divisió cel·lular durant les 4 primeres hores des de la recuperació (Figura R4). El creixement cel·lular ja s'observa a la primera hora després de la recuperació, mentre que la divisió s'activa entre les 3 i 4 hores. No hi havia diferències en el establiment de la divisió cel·lular, però les cèl·lules $\Delta ckk2$ començaven a créixer amb un ritme més baix durant les dues primeres hores, el que ens diu que Ckk2 podria estar implicat en l'inici del creixement quan es retorna al cicle cel·lular.

1.1.3. Anàlisi de la diferenciació sexual

Una de les funcions associades a la deprivació nutricional és la diferenciació sexual a espores. Per veure si aquesta funció està associada a l'increment de Ckk2 en condicions de deprivació de nitrogen, es va analitzar la capacitat de les soques wt i $\Delta ckk2$ per formar espores. S'ha realitzat una quantificació del nombre de zigots i tètredes resultat de la

RESULTATS

meiosi del total de cèl·lules analitzades i aquesta dada s'ha representat en l'índex d'aparellament. L'índex d'aparellament de la soca $\Delta cck2$ és superior al de la soca salvatge (Figura R5), indicant que Cck2 podria participar en la regulació negativa de la meiosi en privació de nitrogen.

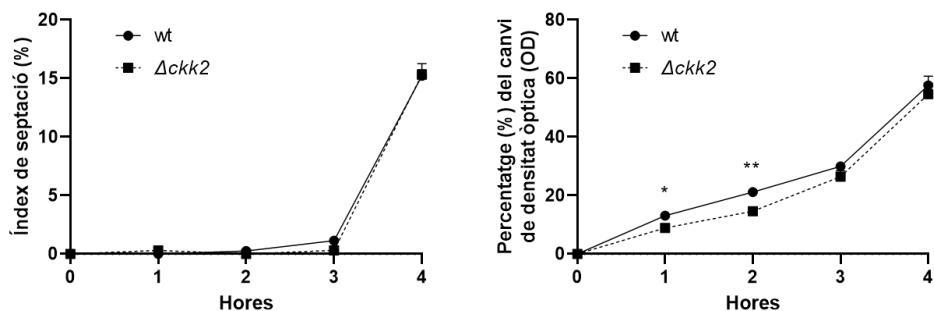


Figura R4. La deleció de Cck2 alenteix el reinici del creixement en reposar el nitrogen. Les soques wt (RA2227) i $\Delta cck2$ (RA3658) van ser creixudes en medi mínim abans de ser deprivades de nitrogen. Després de 1 dia creixent en aquest medi, s'han retornat al medi mínim i s'ha mesurat l'índex de septació i la densitat òptica durant les 4 hores posteriors. A l'esquerra es troba la gràfica que representa l'índex de septació (cèl·lules septant/cèl·lules totals) i a la dreta, la gràfica que representa el *fold change* de la densitat òptica. Aquest experiment s'ha realitzat dues vegades i s'ha fet anàlisis estadístic t de Student per determinar si les diferències observades eren significatives. * indica $p < 0.05$ i ** $p < 0.005$.

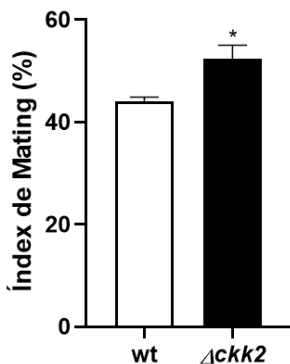


Figura R5. La deleció de Cck2 causa un increment de mating en condicions de privació nutricional. Les soques heterotàliques h^{90} wt (RA0743); $\Delta cck2$ (RA3662); han sigut plaquejades en plaques SSA durant 48 hores i després s'ha quantificat el nombre d'espores per calcular l'índex d'aparellament.

1.2. Estudi de la via Ckk2-Cmk1 en resposta a diferents tipus d'estrès.

El nostre grup ha descrit en treballs anteriors l'activació de la via CaMKK-CaMK a *S. pombe*, a través de la fosforilació de Cmk1 per Ckk2 al residu T192. L'activació de la via per calci causa l'aturada de la divisió cel·lular a través de la fosforilació de la Cdc25 (Cisneros-Barroso et al., 2014).

Per tal de determinar si la via Ckk2-Cmk1 també funciona en estrès nutricional i si es produeix un increment de proteïna Cmk1, tal com passa amb Ckk2, es van analitzar els nivells de proteïna Cmk1 en privació de nitrogen. Les soques Cmk1:HA i Cmk1:HA $\Delta ckk2$ han sigut exposades a un medi mínim sense nitrogen durant 24 hores. Els nivells de Cmk1 es mostren reduïts en absència d'una font de nitrogen en el medi (Figura R6), resultat que es repeteix també en absència de *ckk2*. Aquest resultat ens estaria indicant que la regulació de Cmk1 en privació de nitrogen és diferent a la regulació de la Ckk2.

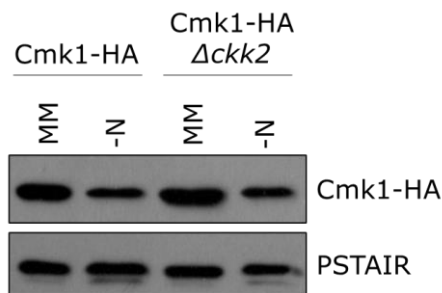


Figura R6. Els nivells de Cmk1 es redueixen en resposta a la privació de nitrogen. Les soques Cmk1:HA (RA3380) i Cmk1:HA $\Delta ckk2$ (RA4240) van ser incubades a una temperatura de 25°C.

Anteriorment en el nostre grup, s'ha observat que l'absència de Ckk2 generava canvis de viabilitat amb respecte a la soca wild-type en determinades situacions d'estrès no nutricional, com els estressos causats per drogues com la latrunculina B (LatB), el tiabendazol (TBZ) i el calcofluor. En aquest treball, s'ha volgut intentar observar si era

RESULTATS

necessària l'activació de la via Ckk2-Cmk1 en resposta a aquestes drogues.

En el tractament amb latrunculina B, la soca $\Delta ckk2$ mostra una major sensibilitat a la droga comparada amb la viabilitat de la soca wt. A la mateixa concentració, no obstant, la soca $\Delta cmk1$ mostra resistència, ja que té major viabilitat que la soca wt. Al ser tractades amb calcofluor, les soques van mostrar un creixement similar (Figura R7). I en el tractament amb tiabendazol, els mutants eren resistents respecte a la soca wt, sent el mutant $\Delta cmk1$ més viable que la soca $\Delta ckk2$ (Figura R8). Això ens mostra que Ckk2 i Cmk1 actuarien a través de vies de senyalització diferents en el cas de la Latrunculina B, i probablement la via Ckk2-Cmk1 si estigui activada en resposta al TBZ.

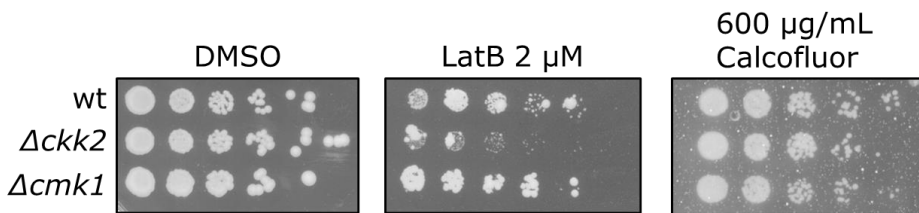


Figura R7. La soca $\Delta cmk1$ es resistent a latrunculina B. Les soques wt (RA2227), $\Delta ckk2$ (RA3658) i $\Delta cmk1$ (RA3375) van ser creixudes en medi ric (YES) líquid i es van fer assajos de viabilitat en plaques de medi ric YES que contenien dimetilsulfòxid (DMSO) o 2 μM de latrunculina B (LatB) o 600 μg/mL de calcofluor. Els assajos es van deixar créixer durant 3 dies a 32°C abans de prendre la imatge.

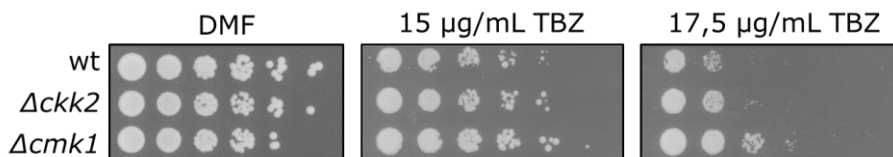


Figura R8. Les soques $\Delta ckk2$ i $\Delta cmk1$ son resistents a tiabendazol. Les soques wt (RA2227), $\Delta ckk2$ (RA3658) i $\Delta cmk1$ (RA3375) van ser creixudes en medi ric (YES) líquid i es van fer assajos de viabilitat en plaques de medi ric YES que contenien N,N-dimetilformamida (DMF) o diverses concentracions de tiabendazol (TBZ). Els assajos es van deixar créixer durant 3 dies a 32°C abans de prendre la imatge.

Prz1 es un regulador transcripcional de Cmk1. Per esbrinar si Ckk2 es troba sota el mateix control transcripcional he generat el doble mutant $\Delta ckk2$

Aprz1, per comparar la seva resposta amb els mutants simples *Δckk2* i *Δprz1* (Figura R9). En un assaig de viabilitat en resposta al calci, el doble mutant *Δckk2 Δprz1* mostrava una viabilitat més elevada que el mutant simple *Δprz1* a una concentració de 25 mM, mentre que a concentracions més elevades ja perd la viabilitat a concentracions on encara creixen la soca wt i la soca *Δckk2*. Per tant, com els dos genotips donen lloc a un fenotip intermedi, segurament la regulació de Ckk2 en resposta a un estrès de calci no és deguda a Prz1.

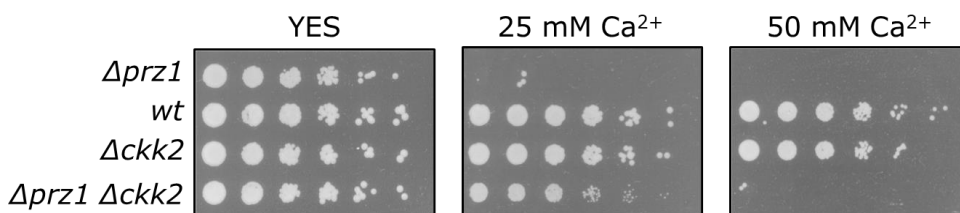


Figura R9. La deleció de *prz1* recupera el fenotip salvatge en soques *Δckk2*. Les soques wt (RA2227), *Δckk2* (RA3658), *Δprz1* (RA2705) i *Δckk2 Δprz1* (RA4577) han crescut en medi ric (YES) líquid i es van fer assajos de viabilitat en plaques de medi ric YES que contenien diverses concentracions de clorur de calci (CaCl₂). Els assajos es van deixar créixer durant 3 dies a 32°C abans de prendre la foto.

1.3. Estudi de sumoïlació de *ckk2*.

Per analitzar si Ckk2 era sumoïlada en condicions de privació de nitrogen, vàrem dissenyar un mutant de Ckk2 que no pogués ser sumoïlat. Com s’ha mencionat en l’apartat d’antecedents, es van identificar residus de lisina que podrien estar implicats en la sumoïlació de la proteïna Ckk2. Primer de tot, es va mutar només el residu K202 a arginina (R), per destruir el lloc consens de sumoïlació i substituir-lo per un aminoàcid semblant, ja que els dos estan carregats positivament, per evitar alterar massa la funció de la proteïna.

Aquesta mutació es va realitzar en un plasmidi que contenia el gen *ckk2* fusionat amb l’epítot HA, utilitzant oligonucleòtids que presenten una seqüència del gen *ckk2* amb una única mutació del residu 202 de lisina a arginina (*ckk2*-K202R fwd i rv). Un cop validada per seqüenciació, aquest plasmidi es va tractar amb l’enzim de restricció per linealitzar-lo i integrar-

RESULTATS

lo en el genoma de *S. pombe* per recombinació homòloga. La integració de la mutació es va validar per Colony PCR i seqüenciació. D'ara en endavant, aquest mutant serà anomenat Ckk2-K202R.

Per comprovar si la mutació del residu 202 evita la sumoilació, es van analitzar els nivells de proteïna Ckk2 en resposta a la privació de nitrogen a la soca Ckk2-K202R i es van comparar amb els de la soca sense mutar. Es van escollir punts en el temps on el tractament per privació ja mostra una bona intensitat de la banda Ckk2-Sumo, entre les 16 i 24 hores. La presència de la mutació K202R en la proteïna Ckk2, no causava canvis importants en els nivells de proteïna Ckk2 i no elimina la presència de la banda Ckk2-SUMO que s'observa en la soca salvatge (Figura R10). Això ens indicaria que el residu 202 no és el responsable de la possible sumoilació de Ckk2.

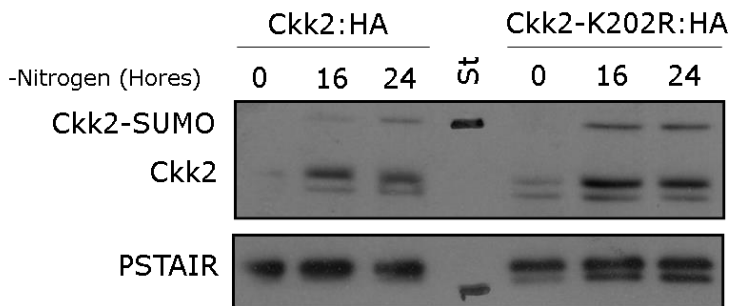


Figura R10. La mutació K202R no evita l'aparició de la banda Ckk2-Sumo. Les soques Ckk2:HA (35#27) i Ckk2-K202R:HA (35#32) van ser exposades a un medi mínim sense nitrogen i es van analitzar els extractes a les hores indicades a la imatge. St representa el patró de pes molecular.

Davant d'aquest resultat ens vam plantejar que potser la sumoilació d'altres residus era necessària, encara que en els anàlisis informàtics no fossin preferents. Per tant, es va generar una soca que presentava mutants els tres llocs de sumoilació que s'havien identificat en el treball anterior. Es van utilitzar els oligos Ckk2-K72R i Ckk2-K251R, per generar un plasmidi amb aquestes tres mutacions. En aquest cas, però, la introducció de les triples mutacions per la recombinació homòloga es va realitzar per PCR, ja que el tractament amb l'enzim de restricció feia que

no s'introduís el residu K72R. Al mutant que presentava les mutacions K72R, K202R i K251R a la proteïna Ckk2 de *S. pombe*, l'hem anomenat Ckk2-TP.

Amb la soca Ckk2-TP, s'ha realitzat el mateix anàlisi indicat anteriorment. En aquest cas, es torna a veure que els nivells de Ckk2 en resposta a la privació de nitrogen no varien en presència d'aquestes mutacions (Figura R11), i que la modificació traduccional de Ckk2 es continua observant, i a més, amb una intensitat més forta. Això ens indica que o bé s'ha de trobar altres residus de sumoilació o bé, que la proteïna no es sumoilica i aquesta banda que s'està observant és una altra modificació.

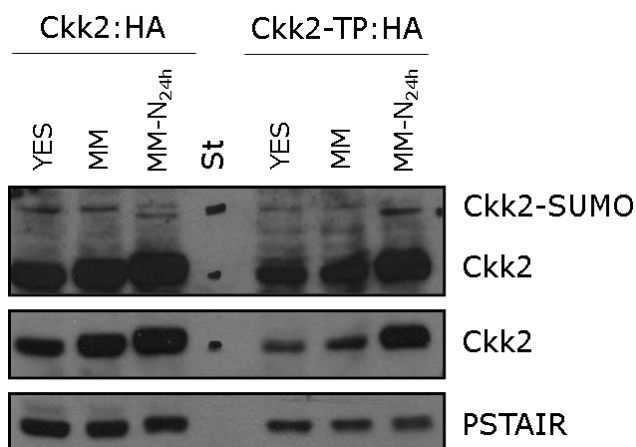


Figura R11. La soca Ckk2:TP continua mostrant la banda d'alt pes molecular. Les soques Ckk2:HA (RA3527) i Ckk2-TP:HA (RA3642) van ser exposades a les condicions de cultiu indicades a la figura.

Després d'observar aquests resultats obtinguts de les mutacions, es va intentar obtenir evidències per altres vies de que hi havia sumoilació de la Ckk2. Una de les maneres va ser utilitzant anticossos de mamífer contra la proteïna SUMO. Aquests anticossos acostumen a funcionar quan l'epítip que reconeix la proteïna està bastant conservat evolutivament, com és el cas de l'anticòs PSTAIR, que reconeix les seqüències del mateix nom que es troben tant a les quinases dependents de ciclina de mamífer com a les de *S. pombe*. No obstant, la hibridació de la membrana amb l'anticòs anti-SUMO no ens va mostrar resultats (imatges no mostrades).

RESULTATS

Una altra aproximació que es va realitzar va ser la immunoprecipitació. Com s'ha mencionat amb anterioritat, la proteïna homòloga de SUMO a *S. pombe* és la proteïna Pmt3. Es va generar una soca Pmt3:HA que presentava a més la proteïna Ckk2 conjugada amb l'epítot myc. Si la nostra hipòtesi de que Ckk2 es troba sumoilada es compleix, les dues proteïnes haurien de co-precipitar. Tot i això, la immunoprecipitació de Pmt3:HA no ens va sortir (imatges no mostrades), indicant que la modificació observada podria no ser una sumoilació.

Una de les explicacions era que fos una banda inespecífica generada per les condicions d'estrès nutricional en les que estàvem treballant. L'evidència que ens va indicar de que es podria tractar d'una banda inespecífica, va ser l'anàlisi en condicions de deprivació de nitrogen durant 24 hores d'una soca sense epítot HA. En aquestes condicions, a la soca sense epítot apareixien varies bandes inespecífiques (Figura R12): una prop dels 45 kDa que es trobava sota de la banda específica de la proteïna Ckk2; i una altra banda inespecífica, que només es manifestava en condicions de deprivació de nitrogen, a una alçada propera als 66 kDa que és la que ens pensàvem que podria ser la proteïna Ckk2 sumoilada. Per tant, aquesta banda observada no estaria representant una sumoilació de la Ckk2, si no que és una banda inespecífica específica causada per la deprivació de nitrogen.

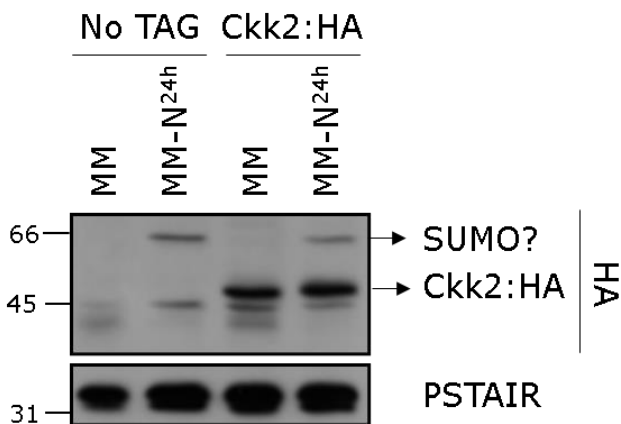


Figura R12. La banda inespecífica es troba en una soca salvatge sense epítot HA. Les soques wt (RA2227) i Ckk2:HA (RA3527) es van exposar a deprivació de nitrogen en el període de temps indicat a la imatge.

Aquest tipus de banda inespecífica no l'havíem detectat amb anterioritat i creiem que s'observa en condicions on l'epítip no dona molta senyal. La proteïna Ckk2 per ser detectada per *Western Blot* necessita ser carregada en grans quantitats (50 µg d'extracte proteic) i incubada amb anticòs molt concentrat (1:500-1000). En aquesta mateixa línia, aquesta banda inespecífica no s'observa en altres proteïnes també conjugades en HA i exposades a les mateixes condicions, però que necessiten molt menys extracte proteic i una dilució més gran d'anticòs per ser observades per *Western Blot*.

1.4. Estudi de l'expressió de *ckk2*.

L'increment de l'expressió de Ckk2 en resposta a l'estrès nutricional (Yance-Chávez, 2015) ens va generar l'interès per esbrinar com es regula la seva expressió.

Per tal d'estudiar la dinàmica de la proteïna Ckk2, es van analitzar els nivells de proteïna abans, durant i després de la deprivació de nitrogen, fins 24 hores després de la deprivació (Figura R13). El que es va observar és que l'increment durant la deprivació de nitrogen, és ràpidament reduït un cop es torna a introduir el nitrogen al cultiu. Això vol dir que la inducció de Ckk2 es reprimeix un cop la cèl·lula torna a créixer en condicions mínimament òptimes.

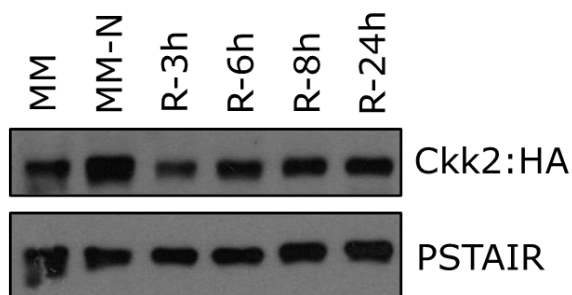


Figura R13. L'increment de proteïna Ckk2 desapareix en retornar al medi mínim amb nitrogen. La soca Ckk2:HA (RA3527) va ser crescuda en medi mínim abans de ser deprivada de nitrogen durant 24 hores. Posteriorment, es va retornar al medi mínim durant 24 hores més. Els carrils que comencen amb R indiquen les hores en les que es va prendre l'extracte després de la reintroducció del nitrogen al medi.

RESULTATS

Amb l'objectiu d'identificar quines vies podrien estar implicades en la inducció de l'expressió, s'ha proposat l'estudi de la regió promotora del gen *ckk2*. L'anàlisi de la seqüència anterior al gen *ckk2* (Figura R14) de la base de dades Pombase, mostra la presència de dues seqüències consens de factors de transcripció:

- **TGATAA** (de la posició -417 a la -412) → a la que es poden unir dos tipus de factors de transcripció diferents:
 - o El factor de transcripció Gaf1 que reconeix les seqüències consens *Gata box* WGATAR on la W indicaria que aquesta posició pot ser ocupada per una A o una T i la R indicaria que pot ser una A o una G.
 - o Els factors de transcripció Atf1 y Fep1 que reconeixen seqüències consens del *iron repressed GATA element* WGATAA.
- **CCAAT** (de la posició -213 a la -209) → a la que es poden unir els factors de transcripció Php2, Php3, Php4 y Php5, que reconeixen els motius CCAAT.

D'altra banda, a diferència del gen *cmk1* no s'han identificat motius del CDRE (*calcineurin-dependent responsive element*, AGCCTC) dins la seqüència (Cisneros-Barroso *et al.*, 2014), indicant que la transcripció de *ckk2* no es depenent a la presència de calcineurina.

>Ckk2 length:709 includes:5'UTR upstream:500

```
ATCGCCAATGCATATATTTTCCAGTTCGGTGGTTTCTGCCACTTGTCTGCTAGTGTTGT
TTTTCCAGTACTAGGGAAAAAGTTAGTTAATAAAAAAATTCAAGTCATTGAAAACTCTG
AAAGCGATTAATAGCTTCTATTTTCGCCATTTATAGCGTACATACCCAGGTGTACCACAG
ATTATAATATTCGGAAGCTCTCTTTCTTCATTACCCATAGTAAACGTTTTTATTTAAATAAA
ACAAGAAAAAGGGAATTAAGTATGTGTTTAAGGGTTGAAAAAATCTCCTTGATAACAA
AAGTTGCAGACTGCTGAAATGTGAAAAATTTATTTACTTCGACGTTGTGTAAGAACAT
GATTTTAAAAAACAGCACATATCTAGAACTTAATAATTATAAGGCTTGTGGGCCTCATTT
TGTATAAATTTTTAAATTAATTGAAAGCAAATAGTATAAACTTTGGTACATAGGTTTATA
TGCTTTTACGCTACCAATAGCGCCATAACTTCCAAATACAGTATGATCATTGATTCTACC
TAACCTATACATTTTCAATGATATTAAGCCATTGTTGAATCCCTGTAAATGAACCTATA
```

AAATATCACCATTTACCTGAAGAACTTAATTTTGCTTTATATTTGAATATCCATTCCATCG
 CTGTGCGGTGAAGTCACTGCATTAACAAGAACCCAAAAATCACC

Figura R14. Identificació de seqüències consens de factors de transcripció. La seqüència de 500 parells de bases anterior al promotor s'ha obtingut de la base de dades Pombase i s'han marcat les seqüències consens en negreta: **TGATAA** de color vermell i **CCAAT** de color blau.

1.5. Els nivells de Ckk2 en privació de nitrogen estan regulats per Gaf1.

Com s'ha observat que l'expressió de Ckk2 es veu incrementada en privació nutricional i retorna als seus nivells basals en re-introduir els nutrients; s'ha identificat una seqüència consens del factor de transcripció Gaf1 en el promotor de Ckk2; i s'ha descrit l'activitat de Gaf1 es produeix en les primeres hores de privació de nitrogen (Ma *et al.*, 2016) s'ha pensat que Gaf1 estaria regulant la inducció de l'expressió de Ckk2 en resposta a privació de nitrogen.

Per comprovar aquesta hipòtesi, s'han analitzat els nivells de Ckk2 en absència de *gaf1* en condicions de privació de nitrogen. En comparació amb les soques wt, on els nivells de Ckk2 s'incrementen a mesura que s'allarga el temps de privació (Figura R15), a la soca Δ *gaf1* s'observen uns nivells basals de proteïna Ckk2 més baixos, i una inducció de Ckk2 en resposta a l'absència de nitrogen bastant més reduïda. Aquest resultat ens estaria demostrant que l'expressió de Ckk2 en privació de nitrogen és deguda parcialment al factor de transcripció Gaf1.

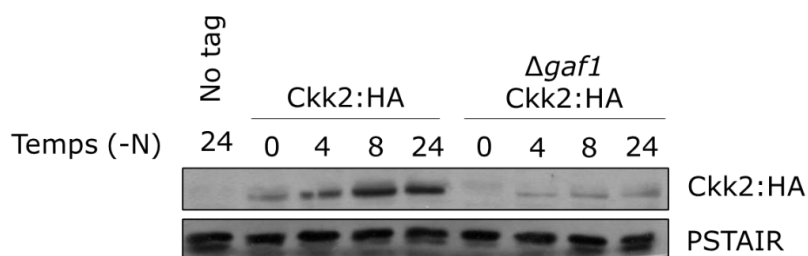


Figura R15. Els nivells de Ckk2 es mostren reduïts a la soca Δ *gaf1*. La soca Ckk2:HA (RA3354) i Ckk2:HA Δ *gaf1* (RA3350) van créixer en medi mínim (MM) i es van privar de nitrogen durant 24 hores. Es van agafar extractes a les 4, 8 i 24 hores de privació. Tots els cultius van ser incubats a una temperatura de 25°C.

RESULTATS

1.6. Ckk2 és inhibida en condicions normals per TORC1.

TORC1 integra les senyals nutricionals i les tradueix per a que la cèl·lula continui creixent en condicions normals. En absència d'aquestes senyals, com és el cas de la deprivació nutricional, deixa d'estar inactiva i deixa d'inhibir proteïnes relacionades amb la resposta a estrès com Gaf1. Després de veure que Gaf1 era necessari per la inducció de Ckk2 en resposta a la deprivació de nitrogen, vàrem estudiar si TORC1 podia regular els nivells de proteïna de Ckk2 mitjançant el tractament amb els inhibidors farmacològics del complex TORC1: la rapamicina i Torin1 (que també inhibeix el complex TORC2).

En el tractament amb rapamicina s'observa un lleuger increment en els nivells de Ckk2 cap a les 2 hores (Figura R16). Amb el tractament de Torin1, s'observa un increment més potent dels nivells de Ckk2, que es capaç de ser observat fins i tot en una hora de tractament (Figura R17). Per tant, els complexos TORC podrien estar regulant negativament l'expressió de Ckk2.

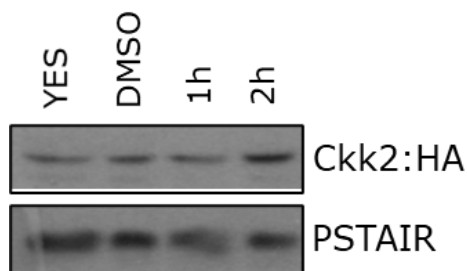


Figura R16. El tractament amb rapamicina causa un increment en el nivell de proteïna Ckk2. La soca Ckk2:HA (RA3527) va ser crescuda en medi ric YES i va ser tractada amb DMSO i rapamicina (200 ng/mL) fins a dues hores a 25°C. Es van fer extractes a la primera i segona hora.

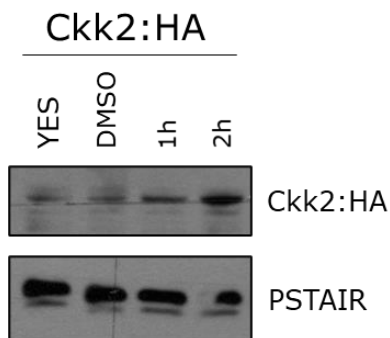


Figura R17. El tractament amb Torin1 causa un increment en el nivell de proteïna Ckk2. La soca Ckk2:HA (RA3527) va ser crescuda en medi ric YES i va ser tractada amb DMSO i Torin1 (5 mM) fins a dues hores a 25°C. Es van fer extractes a la primera i segona hora.

Per tal de comparar aquests increments en el mateix punt, es van comparar els nivells de Ckk2 en el tractament de rapamicina i en el tractament de Torin1 a les dues hores d'exposició (Figura R18). S'observa que l'increment de Ckk2 es major en el tractament amb Torin1 que en el tractament de rapamicina.

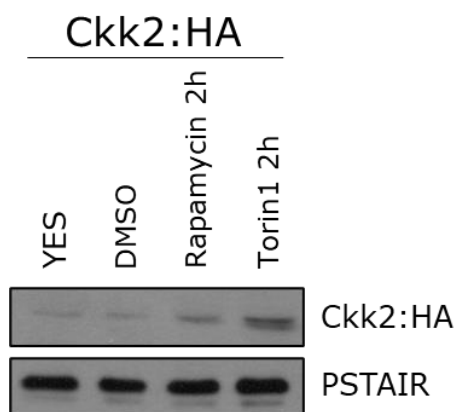


Figura R18. El tractament amb Torin1 causa un major increment en el nivell de proteïna Ckk2 que el tractament de rapamicina. La soca Ckk2:HA (RA3527) va ser crescuda en medi ric YES i va ser tractada amb DMSO, rapamicina (200 ng/mL) i Torin1 (5 mM) durant dues hores a 25°C.

Davant la inducció de l'expressió de Ckk2 observada en la inhibició farmacològica del complex TORC1, es va voler comprovar si passaria el mateix en mutants genètics d'aquest complex. Com *tor2* es un gen essencial per *S. pombe*, es va treballar amb el mutant termosensible *tor2.51*, el creixement del qual es veu compromès a una temperatura restrictiva de 37°C i es veu molt reduït a temperatura semi-permissiva de

RESULTATS

30°C. En aquest mutant, s'observa un increment en els nivells de Ckk2, comparats amb els nivells observats a la soca wt, tant a temperatura permissiva de 25°C com a temperatura restrictiva de 37°C (Figura R19). Això ens indica que una menor activitat del complex TORC1 està associada a un increment de l'expressió de Ckk2. Com a nota curiosa, l'expressió de Ckk2 mostra una reducció dels seus nivells en el tractament a 37°C, tant al mutant com a la soca salvatge.

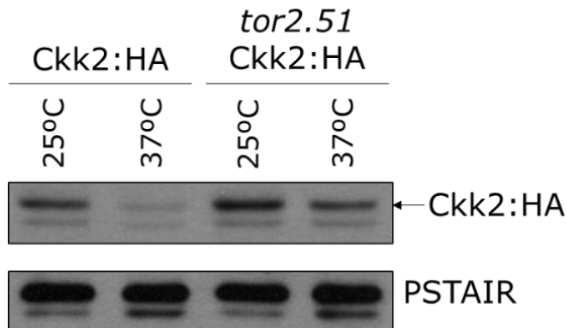


Figura R19. La mutació en la proteïna Tor2 causa un increment en els nivells de proteïna Ckk2. La soca Ckk2:HA (RA3527) i la soca *tor2.51* Ckk2:HA (RA4436) van créixer en medi ric YES a 25°C. Pel canvi de temperatura, van ser crescudes a 37°C durant 4 hores.

1.7. L'expressió de Ckk2 quan TORC1 està inhibida està regulada per Gaf1.

S'ha observat en els apartats anteriors que Gaf1 regula l'expressió de Ckk2 en condicions com la deprivació de nitrogen, i que la inhibició de TORC1 causa un increment de l'expressió de Ckk2. Per saber si aquest increment de l'expressió de Ckk2 quan s'inhibeix TORC1 està realment causat per la funció de Gaf1, hem tractat una soca salvatge i una soca Δ *gaf1* amb l'inhibidor de TORC1 rapamicina per analitzar els nivells de Ckk2 (Figura R20). En resposta a rapamicina, observem l'increment en l'expressió de Ckk2 a la soca salvatge, però en la soca delecionada per *gaf1*, no es produeix. Això ens indica que l'increment en el nivell de proteïna Ckk2 que s'observa en la inactivació de TORC1 està explicat parcialment per la funció del factor de transcripció Gaf1.

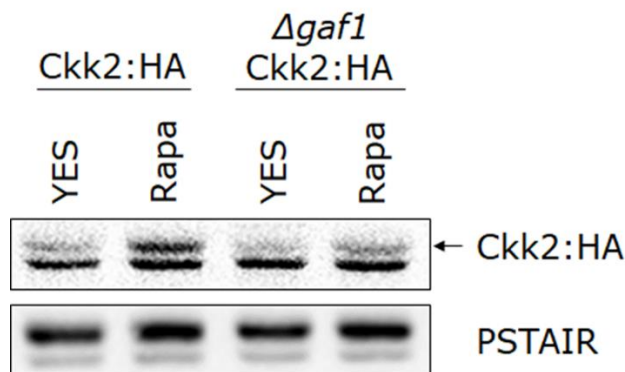


Figura R20. L'increment de Ckk2 causat per la inhibició de TORC1 es deu parcialment a la funció de Gaf1. Les soques Ckk2:HA (RA3354) i Ckk2:HA Δ gaf1 (RA3350) han crescut en medi ric a 25°C i se les ha tractat dues hores amb rapamicina (200 ng/mL).

1.8. Ckk2 també està regulada negativament per TORC2.

Per veure si la eliminació genètica de components del complex TORC2 afectava també l'expressió de Ckk2, he analitzat els nivells de proteïna Ckk2 en una soca delecionada pel gen *tor1* (Δ *tor1*). En medi ric, els nivells de Ckk2 en la soca Δ *tor1* es veuen elevats (Figura R21). D'altra banda, l'eliminació del substrat de TORC2 Gad8 (soca Δ gad8) causa una reducció en l'expressió de Ckk2 amb respecte a la soca salvatge. Aquest resultat ens indicaria que Tor1 podria estar inhibint també l'expressió de Ckk2 en medi ric, ja que en la soca Δ *tor1*, s'observa un increment en els nivells de Ckk2, mentre que la soca Δ gad8, que presenta la delecio de Gad8, que regula negativament l'activitat de Tor1, els presenta molt reduïts, possiblement per una major activitat de Tor1.

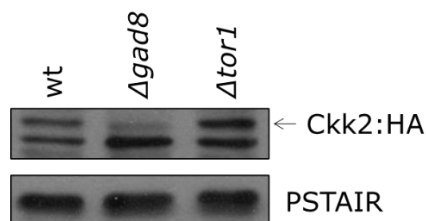


Figura R21. La eliminació genètica de TORC2 causa un increment en els nivells de Ckk2. Les soques Ckk2:HA (RA4131); Δ gad8 Ckk2:HA (RA4548); Δ tor1 Ckk2:HA (RA4550) van créixer en medi ric YES a 25°C.

RESULTATS

1.9. Interacció genètica entre Ckk2 i TORC.

Per veure quin és l'efecte de l'absència de la funció de Ckk2 en situacions on l'activitat dels complexos TORC es troben reduïdes vaig generar dobles mutants $\Delta ckk2 \Delta tor1$ y $\Delta ckk2 tor2.51$ i vaig analitzar la seva viabilitat. La manca de Ckk2 per mutants del complex TORC2 ($\Delta tor1$) no causa variacions de la viabilitat, mentre que en el cas del complex TORC1, el doble mutant $\Delta ckk2 tor2.51$, mostra una menor viabilitat en medi ric a la temperatura permissiva de 25°C (Figura R22).

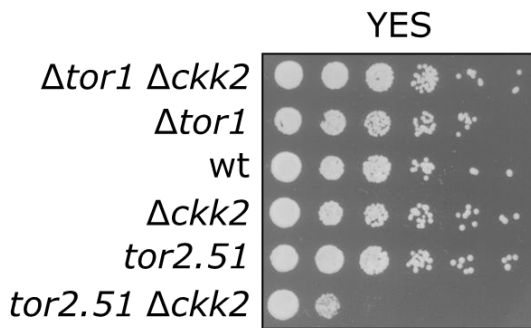


Figura R22. El doble mutant $tor2.51 \Delta ckk2$ mostra una reducció de viabilitat. Les soques wt (RA2227), $\Delta ckk2$ (RA4268), $\Delta tor1$ (RA1869), $\Delta tor1 \Delta ckk2$ (RA3876), $tor2.51$ (RA1875) i $tor2.51 \Delta ckk2$ (RA3878) han crescut en medi ric (YES) líquid a 25°C i es van fer assajos de viabilitat en plaques de medi ric YES que es van deixar creixent a 25°C entre 3-4 dies abans de prendre la imatge.

El doble mutant de les quinases CaMKK i Tor2 ($tor2.51 \Delta ckk2$) és sintètic letal. Per tal d'analitzar si el doble mutant de l'altra CaMKK de *S. pombe* $ssp1$ i $tor2$ mostraria el mateix fenotip, es va generar el doble mutant $tor2.51 \Delta ssp1$. En aquest cas, la deleció de $ssp1$ en un *background* $tor2.51$, no mostra una reducció en la viabilitat de la soca (Figura R23).

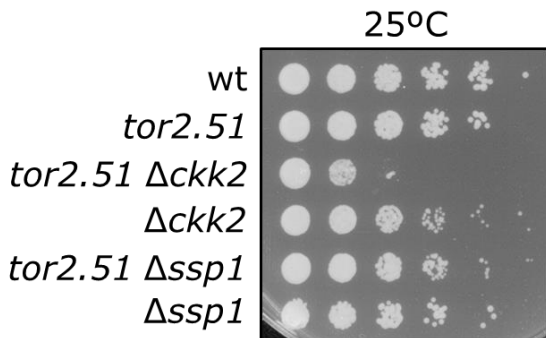


Figura R23. La deleció de $Ssp1$ no redueix la viabilitat de la soca $tor2.51$. Les soques wt (RA2227), $\Delta ckk2$ (RA4268), $\Delta ssp1$ (RA), $\Delta ssp1 tor2.51$ (RA), $tor2.51$ (RA1875) i $tor2.51 \Delta ckk2$ (RA3878) han crescut en medi ric (YES) líquid a 25°C i es van fer assajos de viabilitat en plaques de medi ric YES que es van deixar creixent a les temperatures indicades entre 3-4 dies abans de prendre la foto.

2. Identificació de substrats de Ckk2.

2.1. Cgs1/Pka1

Cgs1 va ser una de les proteïnes identificades en l'assaig de fosfo-proteòmica fet en extractes proteics de soques *wt* i $\Delta ckk2$ com un possible substrat de la Ckk2 en resposta a estrès de calci (Yance-Chávez, 2015). Hem pensat que aquesta és una de les proteïnes més interessants ja que exerceix com a regulador negatiu de l'homòleg de la PKA en *S. pombe*, Pka1. Com s'ha descrit durant la introducció, el paper de la Pka1 és molt important, ja que actua com un regulador negatiu de la resposta a estrès. És a dir, la seva activitat es produeix quan la cèl·lula està en condicions òptimes de creixement, inhibint substrats com Atf1 per fosforilació. Quan la cèl·lula és exposada a una absència de nutrients, la concentració de cAMP dins la cèl·lula és redueix i allibera a Cgs1. Aleshores Cgs1 s'uneix a Pka1 i impedeix que realitzi la seva activitat quinasa. Fins ara, no s'ha identificat cap procés en el que la funció de Ckk2 i Cgs1-Pka1 estiguin relacionats. El que sí s'ha vist es que el complex PKA s'encarrega de la inhibició de CaMKK a *H. sapiens* (Matsushita 1999). Per aquests motius, hem analitzat les possibles interaccions genètiques que hi puguin haver entre Ckk2 i Cgs1 o Pka1.

2.1.1. Anàlisi de la interacció genètica entre Cgs1/Pka1 i Ckk2

Per investigar la relació genètica entre Ckk2 i Cgs1 es va analitzar les interaccions genètiques que podrien donar-se entre ambdós gens en situacions d'estrès per calci, perquè causa l'activació de la Ckk2, o la privació de glucosa, pel paper que juga Cgs1 en aquesta resposta. També es va analitzar la interacció amb Pka1, tenint en compte la seva relació estreta amb Cgs1.

RESULTATS

La deleció de *Cgs1* ($\Delta cgs1$) mostra un patró de creixement similar al de la soca wild-type en resposta a un estrès de calci (Figura R24), mentre que el doble mutant $\Delta cgs1 \Delta ckk2$ mostra major viabilitat que wt, com en el mutant senzill $\Delta ckk2$. En el cas de $\Delta pka1$, s'observa una major sensibilitat al calci que la soca wt i a una concentració baixa; i en el doble mutant, aquesta sensibilitat es veu incrementada de manera que la viabilitat de la soca $\Delta pka1 \Delta ckk2$ es encara més baixa.

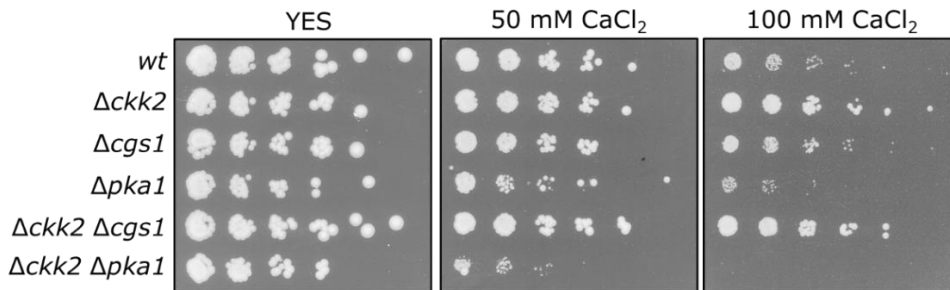


Figura R24. L'eliminació de Pka1 redueix la viabilitat de la soca $\Delta ckk2$ en resposta a un estrès de calci. Les soques wt (RA2227); $\Delta ckk2$ (RA3658); $\Delta cgs1$ (RA3646); $\Delta pka1$ (RA3659); $\Delta ckk2 \Delta cgs1$ (RA3677) i $\Delta pka1 \Delta ckk2$ (RA3713) van créixer en medi ric YES a 25°C. Es van efectuar els assajos de viabilitat en plaques de medi ric YES que tenien les concentracions de clorur de calci indicades, i es van deixar durant 3-4 dies a 32°C abans de prendre la foto.

Donat que Pka1 participa en la inhibició de components necessaris per a la resposta a l'estrès en condicions normals de creixement, vàrem voler veure si existia interacció genètica en condicions de privació de glucosa (Figura R25). Els mutants senzills $\Delta ckk2$ i $\Delta pka1$, son capaces de seguir creixent a baixes concentracions de glucosa. En canvi, com en el cas de l'estrès de calci, el doble mutant $\Delta pka1 \Delta ckk2$ mostra una menor viabilitat, sent en aquest cas un fenotip sintètic letal. D'altra banda, el doble mutant $\Delta cgs1 \Delta ckk2$ presenta la mateixa sensibilitat que el mutant senzill $\Delta cgs1$ en resposta a la privació de glucosa.

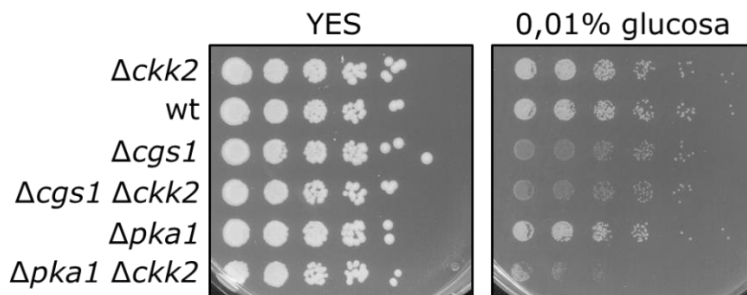


Figura R25. L'eliminació de Pka1 redueix la viabilitat de la soca $\Delta cck2$ en resposta a una privació de glucosa. Les soques wt (RA2227); $\Delta cck2$ (RA3658); $\Delta cgs1$ (RA3646); $\Delta pka1$ (RA3659); $\Delta cck2 \Delta cgs1$ (RA3677) i $\Delta pka1 \Delta cck2$ (RA3712) van créixer en medi ric YES a 25°C. Es van efectuar els assajos de viabilitat en plaques de medi ric YES que tenien una concentració de glucosa normal (3%) i una amb una concentració de 0,01%. Les plaques es van deixar durant 3-4 dies a 32°C abans de prendre la foto.

2.1.2. Anàlisi de l'activitat de Pka1.

En observar el fenotip de la soca doble mutant $\Delta cck2 \Delta pka1$, es va voler comprovar si la falta de Cck2 podria afectar l'activitat de Pka1. Una manera d'analitzar l'activitat de Pka1 és mesurar l'expressió de *fbp1* a nivell de mRNA. La transcripció d'aquest gen es troba reduïda quan Pka1 es troba activa, en condicions normals de creixement (Higuchi *et al.*, 2002). Es va utilitzar la soca $\Delta pka1$ com a control positiu de l'expressió de *fbp1*, i en analitzar l'expressió de *fbp1* en la soca $\Delta cck2$, es va observar que la seva expressió es troba lleugerament incrementada. Això ens podria estar indicant que, o bé Pka1 té una menor activitat inhibidora en la soca $\Delta cck2$ o que Cck2 de manera independent també regula negativament l'expressió de *fbp1*.

També es va mesurar l'expressió de *fbp1* en el doble mutant $\Delta pka1 \Delta cck2$ i es va observar un increment en els nivells de *fbp1* encara més gran, encara que no significativament diferent de l'increment observat en la soca $\Delta pka1$ (Figura R26). Aquest resultat ens estaria indicant, per una part, que la regulació de l'expressió de *fbp1* estaria dominada per la via de la Pka1, i per una altra, que l'efecte del sintètic letal no estaria associat a la regulació de l'expressió de *fbp1*.

RESULTATS

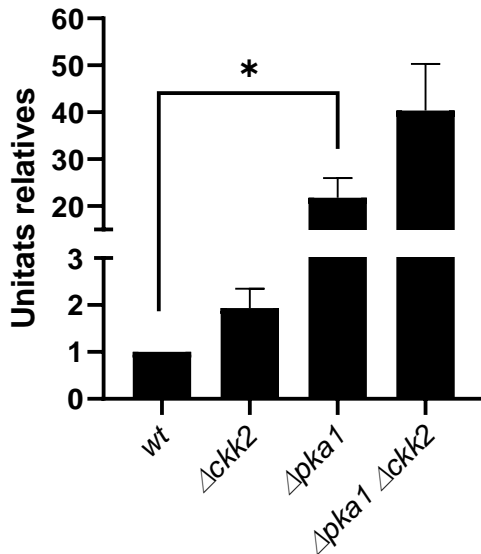


Figura R26. Ckk2 redueix l'expressió de *fbp1*. Les soques wt, $\Delta cck2$, $\Delta pka1$ i $\Delta pka1 \Delta cck2$ han crescut a 25°C. S'ha analitzat els nivells de transcrit de *fbp1* per Real Time PCR i s'ha normalitzat la seva expressió amb l'actina.

2.1.3. Anàlisi dels nivells de proteïna de Cgs1 i Pka1 en resposta a estrès i en absència de Ckk2.

Davant les interaccions genètiques observades en les condicions de privació de glucosa o estrès de calci de les soques $\Delta cgs1$ i $\Delta pka1$ es van analitzar com variaven els nivells d'aquestes proteïnes en resposta a estressos aguts.

En el cas de Cgs1, s'han generat soques que presentaven el gen *cgs1* fusionat amb l'epítot HA en un *background* wt o $\Delta cck2$ per analitzar possibles canvis en l'expressió o modificacions post-traduccionals (Figura R27). Cgs1 veu els seus nivells augmentats en resposta a un estrès agut de calci i també en concentracions molt baixes de glucosa. Aquestes variacions observades en el nivell de Cgs1 no depenen de la presència de Ckk2, tal com ens mostrava l'anàlisi de viabilitat.

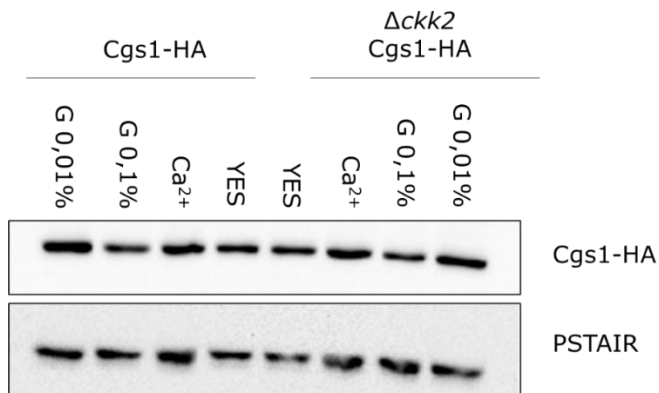


Figura R27. El calci i una concentració molt baixa de glucosa causen un increment en els nivells de Cgs1. Les soques Cgs1:HA (RA3636) i Cgs1:HA $\Delta cck2$ (RA3707) van ser crescudes a 25°C i després van ser tractades amb 100 mM CaCl₂ durant 1 hora o van ser exposades a les concentracions indicades de glucosa en medi ric durant 6 hores abans de prendre la mostra.

S'han generat soques també que presenten el gen *pka1* fusionat a l'epítotop HA i es van analitzar canvis en els nivells de proteïna o modificacions post-traduccionals comparant cèl·lules wt amb cèl·lules sense *cck2*. L'exposició al calci causa un lleuger increment en els nivells de Pka1 (Figura R28), mentre que unes baixes concentracions de glucosa causen una reducció en els nivells de Pka1 de manera proporcional al canvi de concentració. No s'observen canvis dependents de la presència de Cck2 en els nivells ni en l'estat de fosforilació de Pka1.

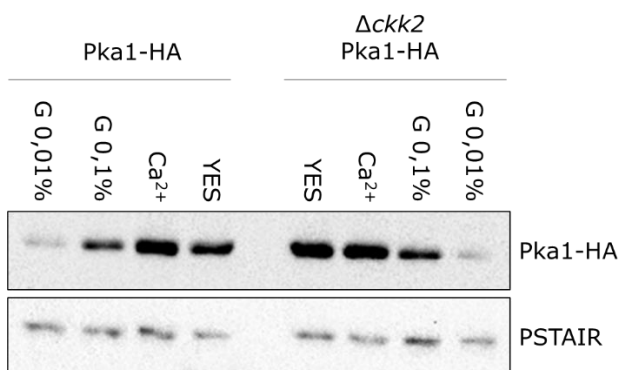


Figura R28. Pka1 es veu incrementada en resposta a calci i disminuïda en privació de glucosa. Les soques Pka1:HA (RA3701) i Pka1:HA $\Delta cck2$ (RA3720) van ser crescudes a 25°C i després van ser tractades amb 100 mM CaCl₂ durant 1 hora o van ser exposades durant 6 hores a concentracions més baixes de glucosa abans de prendre la mostra.

RESULTATS

La implicació de la Pka1 s'ha descrit en estudis de creixement cel·lular en fase estacionària (Zuin *et al.*, 2010). En fase estacionària, les cèl·lules canvien metabòlicament per adaptar-se a l'esgotament de la disponibilitat dels nutrients. Per comprovar si Ckk2 té un paper en la resposta de la fase estacionària, es van deixar créixer les cèl·lules wt, $\Delta ckk2$, $\Delta cgs1$, $\Delta pka1$ i els dobles mutants $\Delta cgs1 \Delta ckk2$ i $\Delta pka1 \Delta ckk2$ en medi ric durant una setmana. L'absència de *cgs1* redueix la viabilitat de cèl·lules en fase estacionària tal com estava descrit i també en el doble mutant $\Delta cgs1 \Delta ckk2$ en els primers tres dies (Figura R29). D'altra banda, la deleció de *pka1* augmenta la viabilitat dels cultius en fase estacionària, independentment de la presència de Ckk2, mantenint-la més temps que la soca wild-type. La soca $\Delta ckk2$, d'altra banda, mostra una menor viabilitat respecte a la soca wt cap als 3 dies de creixement en fase estacionària. Els resultats d'aquest assaig ens indiquen que Ckk2 és necessària per a la viabilitat de cèl·lules en fase estacionària però no sembla independent de Cgs1 ni Pka1.

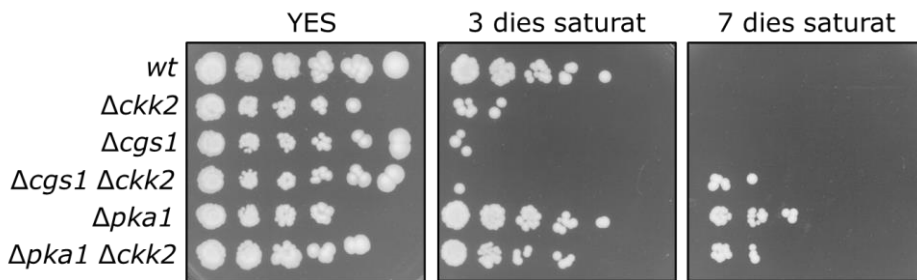


Figura R29. L'eliminació de Ckk2 redueix la viabilitat en fase estacionària. Les soques wt (RA2227); $\Delta ckk2$ (RA3658); $\Delta cgs1$ (RA3646); $\Delta pka1$ (RA3659); $\Delta ckk2 \Delta cgs1$ RA3677) i $\Delta pka1 \Delta ckk2$ (RA3712) van créixer en medi ric YES a 32°C sense ser diluïdes. Amb aquests cultius es van realitzar els assajos de viabilitat als dies de saturació indicats.

2.1.4. Validació *in vitro* de la fosforilació de Cgs1 o Pka1.

Per realitzar la validació *in vitro* de la fosforilació de Cgs1 o Pka1 per part de Ckk2 s'ha de realitzar un assaig quinasa. En l'assaig quinasa, la Ckk2 transmet un grup fosfat aportat per una molècula d'ATP al seu substrat. Els assajos quinasa tradicionals són radioactius, on la molècula d'ATP està marcada per un fòsfor radioactiu (^{32}P) que després es pot detectar per

autorradiografia. No obstant, aquests assajos depenen molt de com de fresc sigui el fòsfor i a més, la radioactivitat comporta un cert perill per la salut. En els darrers anys, s’ha desenvolupat una tecnologia alternativa, que permet realitzar assajos quinasa amb un ATP modificat i veure el resultat de l’assaig per mitjà de Western Blot sense utilitzar cap material radioactiu. Aquesta tecnologia consisteix en l’ús de quinases analog sensitive.

Creació del mutant Ckk2 *analog-sensitive* (as).

La tecnologia per crear mutants analog-sensitive (as) aprofita l’estructura de la quinasa. En les quinases es troben estructures en forma de butxaca que permeten la unió d’ATP. La mida d’aquestes butxaques depèn d’un residu anomenat gate-keeper, que, en ser modificat por alterar l’afinitat d’aquesta quinasa per reconèixer ATP i permet la unió de inhibidors competitiu d’ATP o de molècules modificades d’ATP. Aquestes formes modificades de quinases han sigut utilitzades tant in vivo com in vitro en treballs de *S. pombe* per identificar substrats d’altres quinases (Lee *et al.*, 2018). En el nostre cas, s’ha aprofitat aquesta tecnologia per desenvolupar una proteïna Ckk2 analog sensitive que uneix una molècula modificada d’ATP (ATPyS) i ens permeti la realització d’assajos quinasa, que després puguin ser analitzats en un Western Blot.

Identificació del residu *gate-keeper* i generació de mutants.

La identificació del residu gate-keeper es va fer mitjançant l’alineament de la seqüència de la proteïna c-Src humana amb la de la proteïna Ckk2 de *S. pombe* (Figura R30). L’alineament del bucle d’unió a ATP mostra que el residu alineat amb la treonina 341 de c-Src es la leucina 152 de Ckk2.

c-Src	E---PIYIVTEYMSKGSLLDF	352
Ckk2	DYKDSL ¹⁵² CMV ¹⁵³ LN ¹⁵⁴ YCPGGK ¹⁵⁵ LASV	163
	: : : * : * * . * . .	

Figura R30. Identificació del residu *gate-keeper* en la proteïna Ckk2. S’ha comparat la seqüència de c-Src de *H. sapiens* amb la Ckk2 de *S. pombe* amb el programa Clustal Omega del EBI.

RESULTATS

A continuació, s'ha generat el mutant Ckk2 analog-sensitive (Ckk2-as) mitjançant la mutació de la leucina 152 a glicina (L152G) en el plasmidi pGEX-ckk2. Posteriorment, es va transformar el plasmidi en cèl·lules *BL21 Rosetta* de *E. coli*. La mutació es va comprovar per selecció i seqüenciació.

Obtenció de la proteïna Ckk2-as.

Un cop obtingut el plasmidi mutat i transformat, cal procedir a la validació de la Ckk2-as com a quinasa que fosforila els mateixos substrats ja coneguts i validats de la Ckk2, com la Cmk1.

Per començar, es pot fer una prova d'inducció per determinar quines són les millors condicions per obtenir la màxima inducció de l'expressió de la proteïna del plasmidi. La prova consisteix en tractar petits cultius amb diferents concentracions d'IPTG i fer-los créixer a temperatures diferents.

La prova ofereix la següent informació (Figura R31):

- La proteïna de fusió Ckk2-as-GST presenta una mida aproximada a les 66 kDa, consistent amb el sumatori de les masses moleculars de Ckk2 (40 kDa) i GST (26 kDa).
- Les condicions òptimes per la inducció són una temperatura de 32°C i una concentració de IPTG de 0,3 mM.

Sota les anteriors condicions, es va purificar la proteïna de les cèl·lules *BL21 Rosetta* de *E. coli*. A cada pas de la purificació es van prendre alíquotes de mostra per avaluar l'eficiència de purificació amb una tinció d'un gel SDS-PAGE (Figura R32). La proteïna va ser purificada amb èxit, ja que la major part de la proteïna s'ha concentrat en els eluïts.

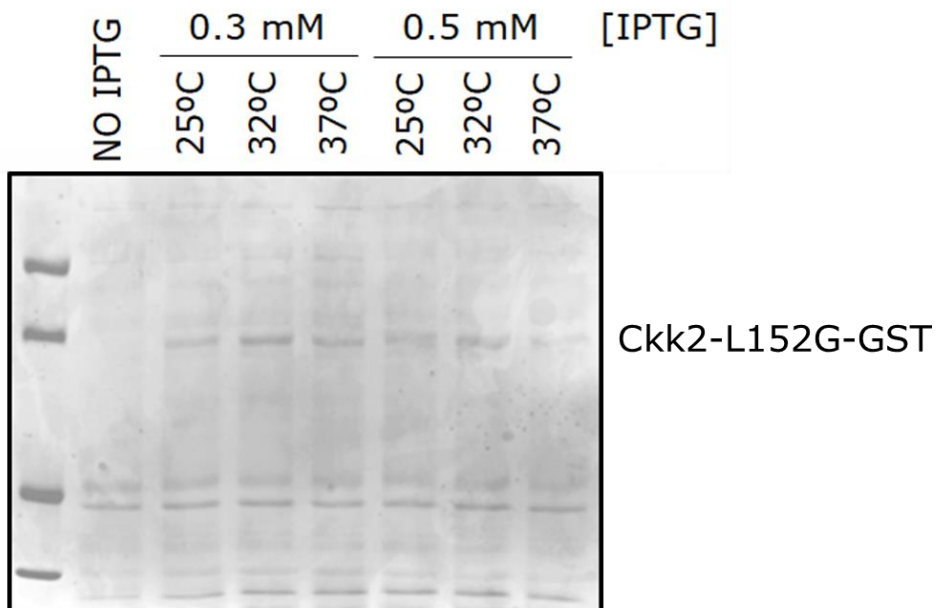


Figura R31. Prova d'inducció d'expressió de pGEX-ckk2-as. Es compara mostres tractades amb diferents concentracions d'IPTG i exposades a varies temperatures amb un control negatiu en el que no s'ha induït l'expressió amb IPTG. Les mostres s'han corregut en un gel SDS-PAGE i després s'ha tenyit aquest gel amb blau de Coomassie.

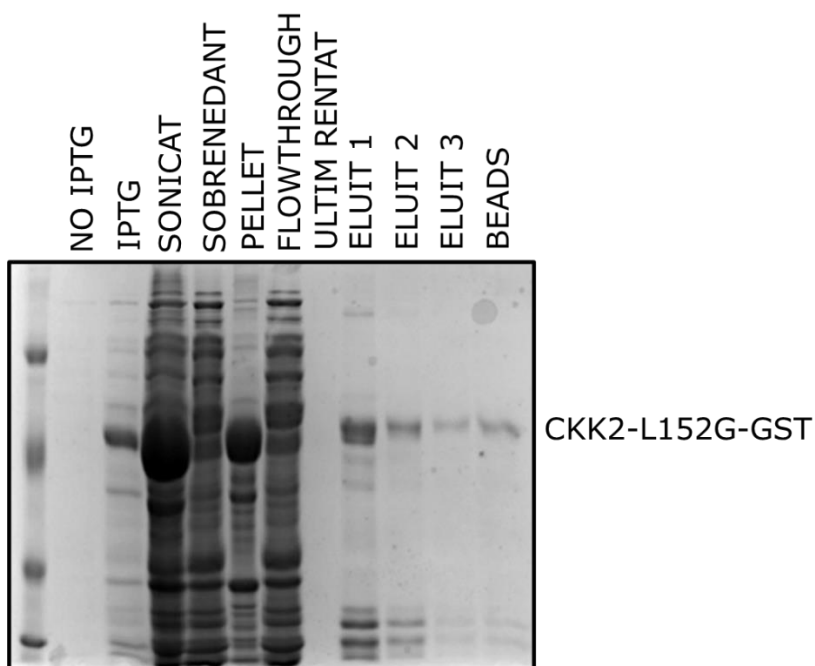


Figura R32. Purificació de la proteïna Cck2-as. S'han pres alíquotes a diferents parts del protocol i s'han corregut en un gel SDS-PAGE que després s'ha tenyit amb blau de Coomassie.

RESULTATS

Validació Ckk2-as.

Un cop purificada la proteïna, el següent pas va ser validar l'ús de Ckk2-as per utilitzar en assajos quinasa, mitjançant la fosforilació d'un substrat ja conegut de Ckk2 com Cmk1, el qual es fosforilat *in vitro* per Ckk2, com ja s'ha vist en treballs anteriors del grup. Per tal de descartar que la fosforilació sigui causada per l'activitat intrínseca de Cmk1, es va utilitzar la Cmk1-KA, una proteïna que presenta una mutació de lisina a alanina en el centre catalític que deixa a la quinasa inactiva. Com a control negatiu, es va utilitzar la Cmk1-KATA, que a més de la mutació en el centre catalític, presenta una mutació que converteix la treonina fosforilada per Ckk2 a alanina, de manera que s'elimina la diana de fosforilació. L'assaig es va realitzar afegint $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ perquè Ckk2 es una quinasa dependent de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, i, d'altra banda, s'ha utilitzat EGTA, un quelant de calci com control negatiu de la reacció. Els resultats de l'assaig demostren que Ckk2-as fosforila *in vitro* Cmk1 i Cmk1-KA en presència de calci (Figura R33). La proteïna mutada Cmk1-KATA, no mostra la fosforilació, per tant, la Ckk2-as fosforila a la Cmk1 en la treonina descrita.

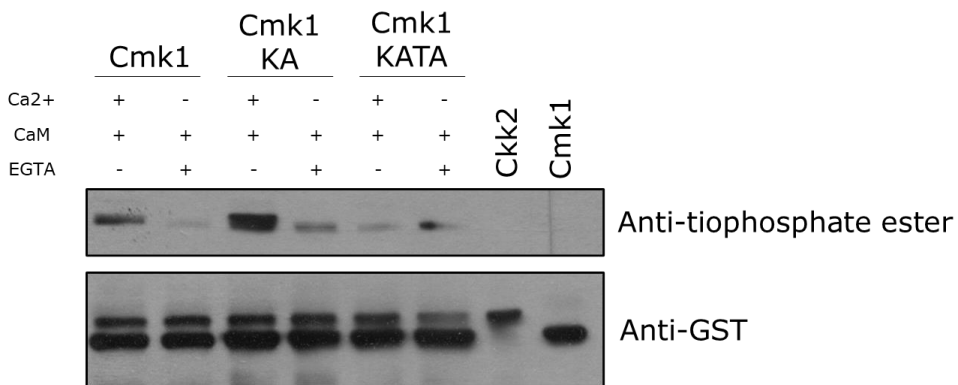


Figura R33. La proteïna Ckk2-as fosforila Cmk1 *in vitro*. S'ha fet un assaig quinasa utilitzant la proteïna quinasa Ckk2 i les diferents formes de la proteïna Cmk1 (wt, KA i KATA). Cada assaig quinasa s'ha fet amb calci o amb EGTA com a control negatiu.

Assaig quinasa de Cgs1 amb Ckk2-as.

Per identificar si es produïa fosforilació de Cgs1 per part de Ckk2, hem realitzat un assaig quinasa utilitzant com a substrat l'immunoprecipitat

obtingut de la soca Cgs1:HA. La raó d'utilitzar l'immunoprecipitat és que en l'assaig de fosfoproteòmica no es poden identificar només substrats directes, sinó que també indirectes com a conseqüència de la falta de Ckk2. Per tant, vam utilitzar-lo per si es produïen fosforilacions en proteïnes que co-precipitaven amb Cgs1, que potser van ser les causants de l'identificació de Cgs1 com a substrat en primer lloc. La proteïna Cgs1:HA es va immunoprecipitar, però no es va fosforilar per Ckk2-as (Figura R34). El que sí que es va identificar es una banda situada prop dels 75 kDa que només es troba en els carrils en els que no s'ha afegit EGTA, indicant que la seva aparició es producte de la fosforilació per Ckk2-as. Per tant, hi ha proteïnes que co-precipiten amb Cgs1 que són fosforilades per Ckk2-as. Es va intentar també la immunoprecipitació de la proteïna Pka1:HA per realitzar l'assaig quinasa, però no es va poder immunoprecipitar, tot i que es van utilitzar les mateixes condicions que es van utilitzar per immunoprecipitar Cgs1.

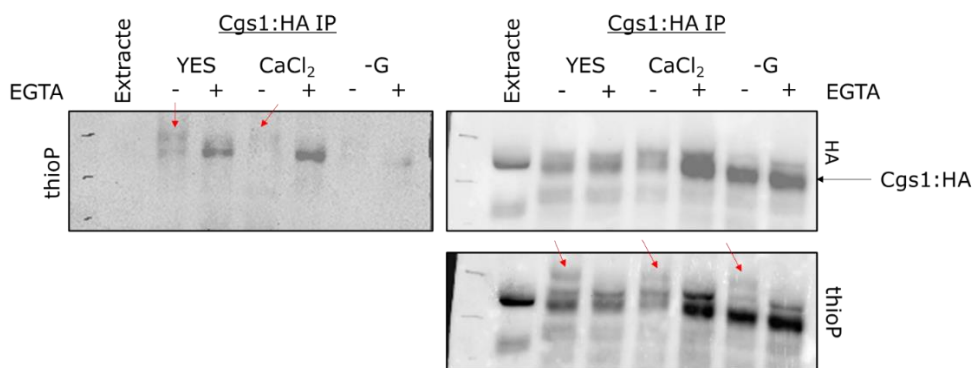


Figura R34. La proteïna Ckk2-as no fosforila Cgs1 *in vitro*. S'ha fet un assaig quinasa utilitzant la proteïna quinasa Ckk2 i la proteïna immunoprecipitada Cgs1:HA. La presència de Cgs1 s'ha marcat amb una fletxa negra. Els símbols - i + indiquen si s'ha afegit EGTA a l'assaig quinasa. En vermell he marcat les bandes que apareixen només en absència de EGTA. El volum en el que es va realitzar l'assaig s'ha dividit entre dues membranes: la membrana de la dreta es va blotejar primer amb l'anticòs HA (sobre) i després amb l'anticòs tiofosfat ester (sota).

RESULTATS

2.2. Int6

En l'assaig de fosfo-proteòmica mencionat als antecedents (Yance-Chávez, 2015) es va identificar Int6 com un possible substrat de Ckk2 en resposta a una deprivació nutricional per nitrogen. Aquesta proteïna representa la subunitat E del complex eIF3 de *S. pombe*. El complex eIF3 està implicat en la síntesi de proteïnes i eIF3e es la subunitat necessària per formar un sub-complex que està encarregat de la síntesi de proteïnes en condicions d'estrès (Shah *et al.*, 2016). Encara no s'ha descrit si existeix una interacció entre les vies de Ckk2 i Int6 a *S. pombe*, però s'ha descrit que la inhibició de la CaMKK en mamífers, redueix l'inici de la traducció cap-depenent (Srivastava *et al.*, 2012). Amb aquestes evidències, ens hem preguntat si la síntesi de proteïnes podria estar afectada per l'activitat de Ckk2 en condicions d'estrès.

2.2.1. Anàlisi de la interacció genètica entre Ckk2 i Int6.

Per analitzar si existeix una interacció funcional entre Int6 i Ckk2 es van realitzar estudis d'interaccions genètiques entre aquests dos gens. Per assolir aquest objectiu, es va analitzar la viabilitat de mutants simples i mutants dobles de *int6* i *ckk2* en resposta a diferents estressos.

En resposta a un estrès de calci, la soca $\Delta int6$ mostra una reducció en la viabilitat, mentre que la deleció de Ckk2 mostra resistència a l'estrès de calci respecte a la soca wt (Figura R35). La eliminació de *ckk2* en la soca $\Delta int6$ no mostra canvis de viabilitat respecte al mutant senzill $\Delta int6$, i continua mostrant una major sensibilitat al calci, indicant que la funció de Int6 és dominant o que Int6 juga un paper necessari per la resistència de les cèl·lules $\Delta ckk2$.

També es va analitzar la interacció genètica del substrat de Ckk2 en resposta al calci, Cmk1. La deleció de *cmk1* en la soca $\Delta int6$ dona lloc a

l'aparició d'un fenotip intermedi, indicant que Cmk1 i Int6 responen al estrès de calci de manera independent.

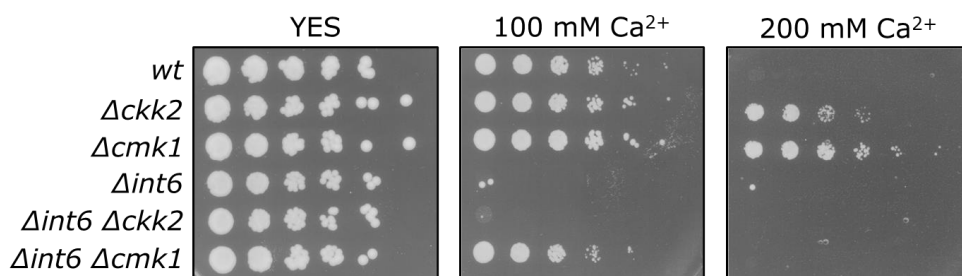


Figura R35. Int6 té un paper en la resposta al calci. Les soques wt (RA2227); $\Delta cck2$ (RA3658); $\Delta cmk1$ (RA3375); $\Delta int6$ (RA3647); $\Delta cck2 \Delta int6$ (RA3649) i $\Delta cmk1 \Delta int6$ (RA3834) van créixer en medi ric YES a 25°C. Es van efectuar els assajos de viabilitat en plaques de medi ric YES que tenien les concentracions de clorur de calci indicades, i es van deixar durant 3-4 dies a 32°C abans de prendre la foto.

Int6 està implicat en la síntesi de proteïnes implicades en el transport d'electrons a la mitocòndria, i en la seva absència, les cèl·lules canvien a un metabolisme glucolític (Shah *et al.*, 2016). Per aquest motiu, en concentracions molt baixes de glucosa, la soca $\Delta int6$ mostra una reducció en la viabilitat (Figura R36). La deleció de $cck2$ en aquesta soca no causa canvis en la seva viabilitat, indicant que la funció de Int6 és necessària i és dominant sobre la funció de Cck2 en resposta a la privació de glucosa.

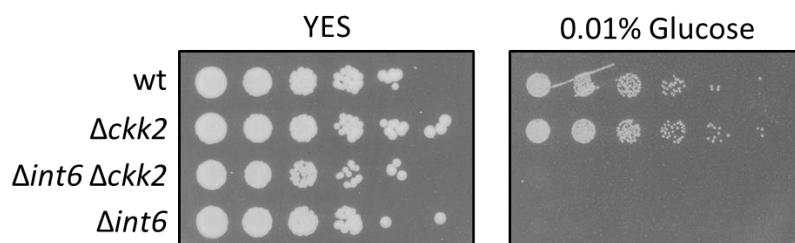


Figura R36. La deleció de Int6 redueix la viabilitat de la soca $\Delta cck2$. Les soques wt (RA2227); $\Delta cck2$ (RA3658); $\Delta int6$ (RA3647) i $\Delta cck2 \Delta int6$ (RA3649) van créixer en medi ric YES a 25°C. Es van efectuar els assajos de viabilitat en plaques de medi ric YES que tenien una concentració de glucosa normal (3%) i una amb una concentració de 0,01%. Les plaques es van deixar durant 3-4 dies a 32°C abans de prendre la foto.

2.2.2. Anàlisi de l'expressió de Int6 en absència de Cck2.

Després de veure la importància de Int6 per la resposta a estrès de calci i privació de glucosa, es va analitzar l'impacte d'aquests estressos sobre els nivells de proteïna de Int6 (Figura R37). En resposta a calci i a glucosa,

RESULTATS

els nivells de Int6 no varien, ni s'observen alteracions post-traduccionals com fosforilació.

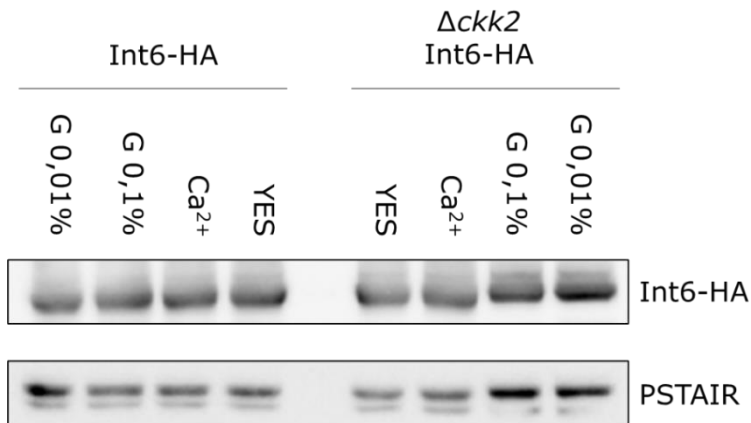


Figura R37. Els nivells de Int6 es mantenen estables en resposta a estrès de calci o deprivació de glucosa. Les soques Int6:HA (RA3670) i Int6:HA $\Delta ckk2$ (RA3708) van ser crescudes a 25°C i després van ser tractades amb 100 mM CaCl₂ durant 1 hora o van ser deprivades durant 6 hores en baixes concentracions de glucosa abans de prendre la mostra.

2.2.3. Anàlisi dels nivells de Ckk2 dependent de Int6

Si tenim en compte els fenotips observats en estrès de calci i deprivació de glucosa, sembla que l'absència o presència de Ckk2 és indiferent per la soca $\Delta int6$. Aquesta situació podria estar causada per una possible regulació dels nivells de Ckk2 per part de Int6. Ja hem mencionat amb anterioritat que els nivells de Atf1 estan regulats per l'activitat iniciadora de la traducció associada a eIF3 (Udagawa et al., 2006). La pregunta que ens vam fer, doncs, és si Int6 regula l'expressió de proteïna de Ckk2. S'ha observat que la deleció de Int6 causa un increment en els nivells de proteïna Ckk2, indicant que Int6 regula de manera negativa els nivells de Ckk2 (Figura R38).

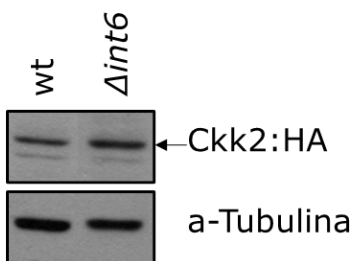


Figura R38. Ckk2 es veu augmentada en la soca $\Delta int6$. Les soques Ckk2:HA (RA3527) i Ckk2:HA $\Delta int6$ (RA3865) van ser crescudes a 25°C i després van ser tractades amb 100 mM CaCl₂ durant 1 hora.

L'increment d'expressió de Ckk2 no encaixa amb la funció de síntesi de proteïnes associada al complex eIF3. La subunitat Int6 està associada a la traducció de transcrits més específics de resposta a estrès (Zhou *et al.*, 2005) però també és necessària per la funció del proteosoma (Yen *et al.*, 2003). Per tant, l'increment de Ckk2 observat en la soca $\Delta int6$ podria ser degut a un descens en l'activitat del proteosoma. Per comprovar això, es van tractar les cèl·lules Ckk2:HA amb bortezomib (BT), un inhibidor del proteosoma que ja s'ha utilitzat amb anterioritat a *S. pombe* (Takeda *et al.*, 2011) (Figura R39) i es va observar un increment de proteïna Ckk2 en les mostres tractades amb aquesta droga. Per tant, la funció del proteosoma regula negativament els nivells de Ckk2.

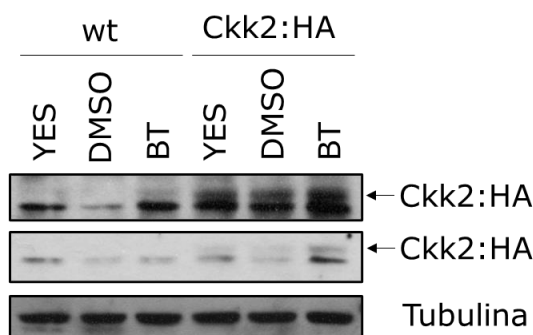


Figura R39. Ckk2 es veu augmentada en inhibir el proteosoma. Les soques wt (RA2227) i Ckk2:HA (RA3527) van ser crescudes a 25°C i després van ser tractades amb 50 μ M de bortezomib durant 3 hores.

2.2.4. Anàlisi de l'efecte de l'absència de Ckk2 sobre la funció de Int6.

Int6 va ser descrit com un substrat de Ckk2. Com no s'havia identificat cap modificació en la proteïna Int6 dependent de la presència de Ckk2, ens vam preguntar si Ckk2 podria afectar a la funció de Int6, mirant si es veia afectada la traducció d'algun substrat ja descrit. El substrat de Int6 que es va escollir va ser Atf1, ja que la seva síntesi es dependent de Int6 (Udagawa *et al.*, 2006). Per fer això, el gen *atf1* va ser fusionat amb l'epítot HA i els nivells d'aquesta proteïna es van analitzar en soques wt,

RESULTATS

$\Delta ckk2$ i $\Delta int6$ (Figura R40). Els nivells d'Atf1 no varien en resposta a un estrès de calci durant 2 hores en la soca wt ni en la soca $\Delta ckk2$. En canvi, en la soca $\Delta int6$ s'observa una reducció en condicions normals, però un cop s'afegeix el calci, la reducció és encara més gran, indicant que la traducció d'Atf1 en resposta al calci depèn de la funció de Int6.

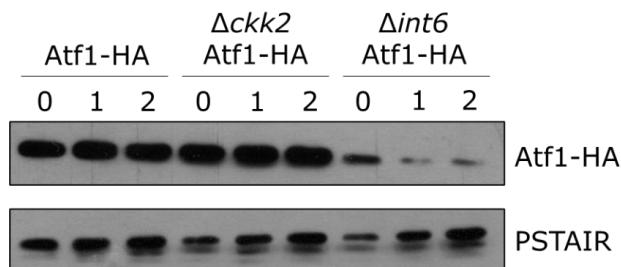


Figura R40. Int6 regula l'expressió d'Atf1 en resposta a un estrès de calci. Les soques Atf1:HA (RA3026); Atf1:HA $\Delta ckk2$ (RA4244) i Atf1:HA $\Delta int6$ (RA4041) van ser crescudes a 25°C i després van ser tractades amb 100 mM $CaCl_2$. Es van prendre mostres a les 1 i 2 hores d'exposició.

2.2.5. Assaig quinasa de Int6.

Per determinar si Ckk2 fosforilava directament a Int6, es va immunoprecipitar aquesta proteïna fusionada a l'epítot HA (Int6-HA), i es va realitzar un assaig quinasa utilitzant la proteïna quinasa recombinant Ckk2-as. El resultat de l'assaig mostra que Ckk2 no fosforila directament a Int6 (Figura R41). D'altra banda, es va detectar una banda en l'immunoprecipitat sense estrès situat en un rang d'entre 37 i 50 kDa, que podria indicar una proteïna que co-precipita amb Int6 que es fosforilada per Ckk2.

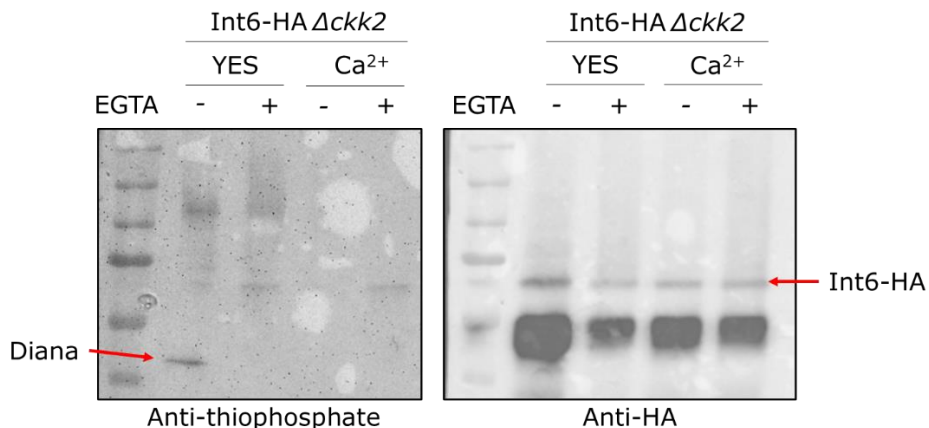


Figura R41. Int6 no és fosforilat per Ckk2-as *in vitro*. Assaig quinasa utilitzant la proteïna Ckk2-as com a quinasa i l'immunoprecipitat de Int6-HA amb epítops HA com a substrat. L'extracte per l'immunoprecipitat es va obtenir de cultius crescuts en medi ric i cultius tractats amb clorur de calci. L'assaig quinasa es va realitzar afegint clorur de calci o EGTA com a control negatiu.

2.3. Gad8

Gad8 és una quinasa que ha sigut identificada com a substrat de Ckk2 en un assaig de fosfopèptids en condicions d'estrès de calci (Yance-Chávez, 2015). Aquesta proteïna és l'homòloga de AKT de *H. sapiens* a *S. pombe* i és substrat de TORC2. El residu identificat com a fosforilat en aquest assaig va ser la treonina 387 d'aquesta proteïna.

En treballs anteriors del grup, s'ha descrit una seqüència consens de fosforilació per la CaMKK (LX**T**XCG[T/S]PXY), on la primera treonina de la seqüència, que es troba en el bucle catalític de les quinases substrat, es la que resulta fosforilada (Yance-Chávez, 2015). Gad8 també presenta el consens de fosforilació per CaMKK, quan s'alinea amb substrats ja identificats de CaMKK (Figura R42) com la Cmk1 de *S. pombe* T192 i la T177 de CaMKI de *H. sapiens*. En aquest consens, s'identifica de nou la T387 de Gad8.

RESULTATS

```

SpGad8      EFNVIYRDLKPENILL---DYTGHIALCDFGLCKLNMAK-TDRTNTFCGTPEYLAPPELLL    401
HsCaMKI     DLGIVHRDLKPENLLYYSLDEDSKIMISDFGLSKMEDPG--SVLSTACGTPGYVAVEVLA    191
Cmk1        DNGIVHRDLKPENLLYRSKDPNSDLLIADFGLSHFYEDSQYYMLMTACGTPEYMAPEVFR    206
           :  .:::*****:*      *  .::: ..****.::      *  ***** *:****.::

```

Figura R42. El residu T387 es troba dins la seqüència consens de fosforilació per CaMKK de Gad8. S'ha alineat la seqüència de Gad8, Cmk1 i la CaMKI de *H. sapiens* amb el programa bioinformàtic Clustal Omega.

Per tant, el residu T387 s'ha identificat com un possible residu diana de la Ckk2 a la proteïna Gad8. Altres grups han desenvolupat anticossos específics que poden detectar la fosforilació d'aquest residu. Per identificar si la fosforilació d'aquest residu en resposta a un estrès de calci depèn de la presència de Ckk2, es va analitzar la fosforilació de Gad8 en soques wt i $\Delta ckk2$ (Figura R43). La fosforilació d'aquest residu es veu incrementada en resposta a una exposició aguda a calci. L'increment de la fosforilació en resposta a calci, però, es veu una mica reduït en la soca $\Delta ckk2$.

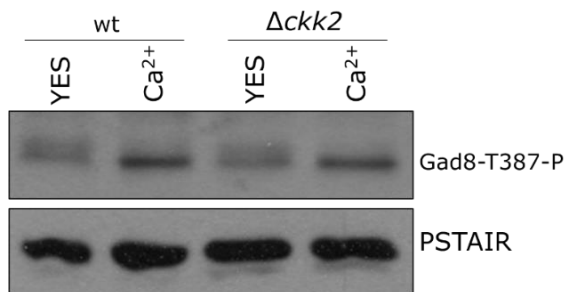


Figura R43. La fosforilació del residu T387 en resposta a calci es redueix en absència de Ckk2. Les soques wt (RA2227) i $\Delta ckk2$ (RA3658) han crescut en medi ric a 25°C i després s'han tractat o no amb clorur de calci 100 mM durant 1 hora.

2.3.1. Anàlisi de la interacció genètica entre Gad8 i Ckk2 en resposta a calci.

Després de veure l'efecte de l'absència de Ckk2 sobre la fosforilació de Gad8, es va voler identificar l'efecte de la pèrdua de Gad8 i del seu activador *upstream* Tor1, en un assaig de viabilitat de resposta a estrès de calci (Figura R44). La pèrdua de Gad8 i de Tor1 fa que $\Delta ckk2$ perdi el fenotip de resistència a l'estrès de calci respecte a la soca wt que tenia, i

fins i tot, adquireixi una major sensibilitat. Tot i que la pèrdua de viabilitat es major en la soca $\Delta gad8$.

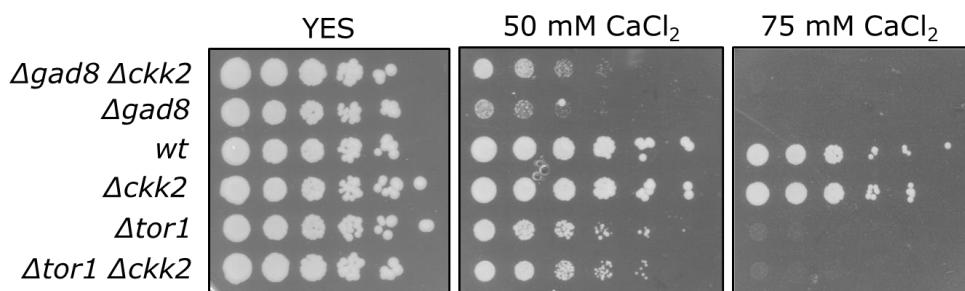


Figura R44. La pèrdua de Gad8 causa la pèrdua de la resistència de la soca $\Delta cck2$. Les soques wt (RA2227); $\Delta cck2$ (RA3658); $\Delta gad8$ (RA4365); $\Delta gad8 \Delta cck2$ (RA4375); $\Delta tor1$ (RA1869) i $\Delta tor1 \Delta cck2$ (RA3876) han crescut en medi ric a 25°C. Es van efectuar els assajos de viabilitat en plaques de medi ric YES que tenien les concentracions de clorur de calci indicades, i es van deixar durant 3-4 dies a 32°C abans de prendre la foto.

2.3.2. Anàlisi de la fosforilació de Gad8 en deprivació nutricional en absència de Cck2.

La quinasa Gad8 està implicada en la resposta nutricional, i a través del residu S546, controla el procés de diferenciació sexual (Martín et al., 2017). Com s'ha analitzat la diferenciació sexual en la soca $\Delta cck2$ i s'ha observat que Cck2 participaria en la inhibició de la esporulació, i que Cck2 incrementa els seus nivells de proteïna en resposta a deprivació nutricional, ens vam si Cck2 podria participar o regular la fosforilació dels residus de Gad8, tant T387 com S546, en resposta a estrès nutricional.

Els nivells de fosforilació del residu T387 es mantenen constants en els 120 minuts de deprivació de glucosa i de nitrogen independentment de la presència de Cck2 (Figura R45).

També es va analitzar la fosforilació en el residu S546 de gad8, el qual es fosforila pel complex TORC2 en soques wt i $\Delta cck2$. La fosforilació en el residu S546 desapareix en els primers minuts de deprivació de glucosa, i es comença a recuperar de manera molt paulatina a partir dels 30 minuts (Figura R46). Per altra banda, en absència de Cck2, la proteïna sembla

RESULTATS

estar més fosforilada a temps 0 i, a més, la recuperació de la fosforilació encara que també comença a partir dels 30 minuts, es més ràpida que la recuperació en la soca wt.

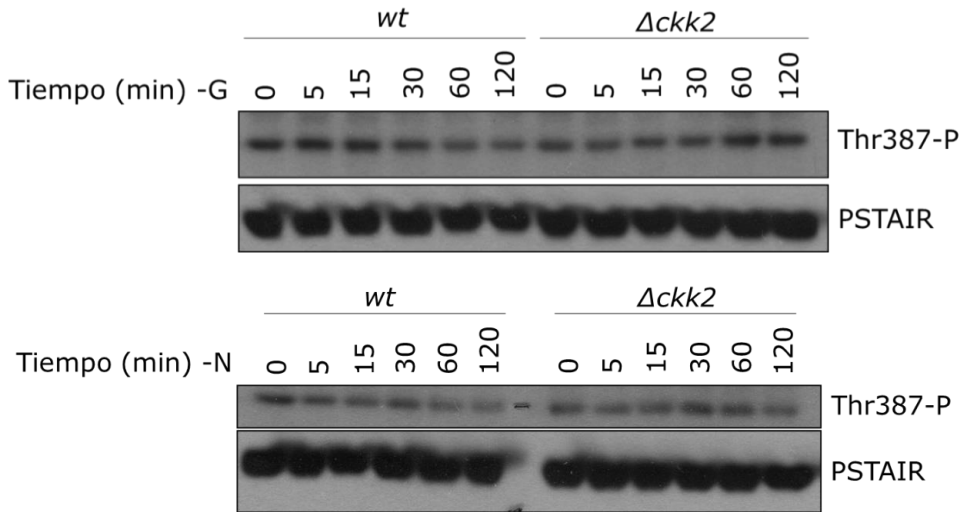


Figura R45. La fosforilació del residu T387 en resposta a la deprivació de glucosa i nitrogen es manté invariable independentment de la presència de Ckk2. Les soques wt (RA2227) i $\Delta cck2$ (RA3658) han crescut en medi mínim a 25°C i després s'han fet els canvis de medi per deprivar de nitrogen o glucosa durant dues hores.

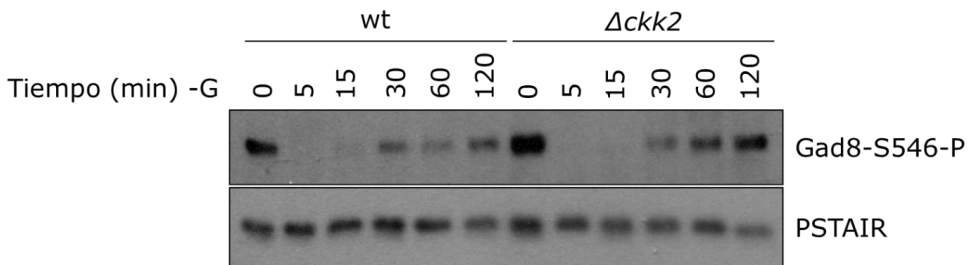


Figura R46. La recuperació de la fosforilació del residu S546 en resposta a la deprivació de glucosa es més ràpida en la soca $\Delta cck2$. Les soques wt (RA2227) i $\Delta cck2$ (RA3658) han crescut en medi mínim a 25°C i després s'han fet els canvis de medi per deprivar glucosa durant dues hores.

Es va realitzar el mateix anàlisi en absència de nitrogen. Els nivells de fosforilació de S546 presenten petites fluctuacions en els seus nivells independentment de la presència de Ckk2 (Figura R47). D'altra banda, també s'observa una major fosforilació d'aquest residu en el temps 0 en absència de Ckk2.

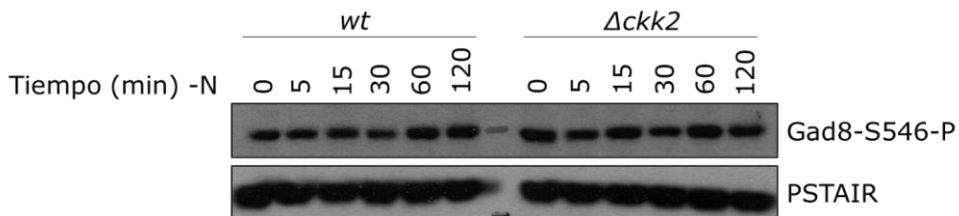


Figura R47. La fosforilació del residu S546 no varia en resposta a la deprivació de nitrogen. Les soques wt (RA2227) i $\Delta cck2$ (RA3658) han crescut en medi mínim a 25°C i després s'han fet els canvis de medi per deprivar de nitrogen durant dues hores.

S'ha descrit que la fosforilació de S546 es necessària pel procés de diferenciació sexual. El resultat de l'increment d'aparellament en la soca $\Delta cck2$ i l'increment de fosforilació del residu S546 a temps 0, va portar a preguntar si l'augment de l'índex d'aparellament observat es deu a l'increment de fosforilació observat del residu S546. Per respondre la pregunta, es van utilitzar soques que presenten mutacions en aquest residu de Gad8 que eviten la seva fosforilació per TORC2 (*gad8-S546A*) i es va generar un doble mutant *gad8-S546A Δcck2* (Figura R48). La mutació S546A es capaç de reduir la diferenciació sexual i també converteix en mínima la diferenciació sexual en la soca $\Delta cck2$, indicant que l'increment de l'aparellament en la soca $\Delta cck2$ és degut a l'increment de la fosforilació del residu S546 de Gad8.

Davant aquests resultats que impliquen alteracions en els dos residus fosforilables de Gad8, es va analitzar la interacció genètica del doble mutant d'aquests residus de fosforilació amb $\Delta cck2$. Es va analitzar la viabilitat d'aquests dobles mutants en deprivació de glucosa i en estrès de calci (Figura R49). També es va introduir el mutant *ksg1-208*, ja que tal com s'ha indicat a la introducció, la quinasa Ksg1 fosforila el residu T387 de Gad8. En resposta a concentracions molt baixes de glucosa, els fenotips generats per les mutacions dels residus de Gad8 són dominants en els dobles mutants. 2. Aquests resultats ens indicarien que per la resposta de glucosa és absolutament necessària la fosforilació de Gad8 en el residu T387 i que aquesta no es veu afectada per Cck2. En resposta a calci, però,

RESULTATS

en els dobles mutants s'observa un fenotip intermedi entre els mutants dels residus de Gad8 i $\Delta cck2$, indicant que la funció de Ckk2 i Gad8 en la resposta a calci s'efectua a través de vies diferents.

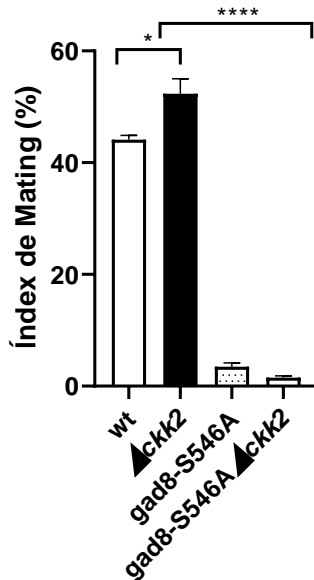


Figura R48. L'increment de *mating* observat en la soca $\Delta cck2$ es deu a un increment en la fosforilació de Gad8-S546. Les soques heterotàliques h⁹⁰ wt (RA0743); $\Delta cck2$ (RA3662); gad8-S546A (RA3559) i gad8-S546A $\Delta cck2$ (RAXX) han sigut plaquejades en plaques SSA durant 48 hores i després s'ha quantificat el nombre d'espores per calcular l'índex de *mating*. * indica p-valor < 0,05 i **** indica p-valor < 0,0001.

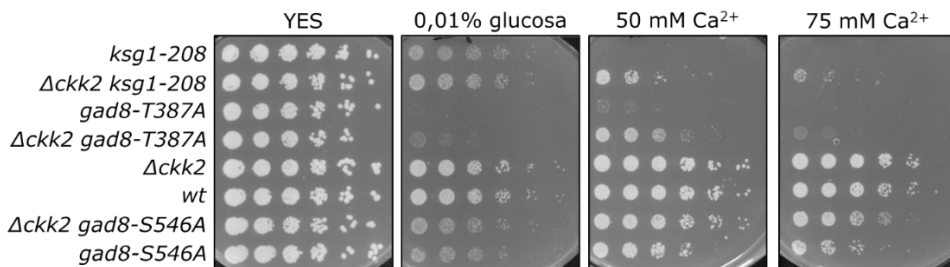


Figura R49. Anàlisi de la viabilitat del mutant *gad8-T387A*. Les soques wt (RA2227); $\Delta cck2$ (RA3658); *gad8-T387A* (RA3558); *gad8-T387A* $\Delta cck2$ (RA4605); *gad8-S546A* (RA3559); *gad8-S546A* $\Delta cck2$ (RA4479); *ksg1-208* (RA3561); *ksg1-208* $\Delta cck2$ (RA3920) han crescut en medi ric a 25°C. Es van efectuar els assajos de viabilitat en plaques de medi ric YES que tenien les concentracions de clorur de calci indicades, i es van deixar durant 3-4 dies a 32°C abans de prendre la foto.

3. Nou anàlisi de substrats de la quinasa Ckk2.

Paral·lelament a l'anàlisi dels substrats identificats en un primer assaig de fosfopèptids depenents de Ckk2, es va repetir l'assaig de fosfopèptids.

Es van obtenir els extractes proteics de soques wt i $\Delta ckk2$ en diferents situacions: sense estrès, en estrès de calci i en privació de nitrogen. Els extractes proteics van ser digerits i llavors es va fer un enriquiment de fosfopèptids. La fracció enriquida es va analitzar per espectrometria de masses (Proteòmica del Parc Científic).

Les dades obtingudes es van analitzar exhaustivament, centrant-se en els residus identificats més que en les proteïnes enriquides. Els llistats sencers dels residus identificats que es trobaven fosforilats a la soca wt i no en la soca $\Delta ckk2$ es troben en les taules de l'annex. La llista de substrats obtinguda s'ha analitzat amb el programa DAVID per identificar aquells conjunts de gens que estan sobre-representats, amb respecte del total de processos i proteïnes.

3.1. Identificació dels substrats de Ckk2 activada pel calci.

Els extractes analitzats van ser incubats en medi ric i van ser exposades durant una hora amb calci. Es van identificar aquells residus que es trobaven fosforilats a la soca wt i no estan fosforilats a la soca $\Delta ckk2$, detectant-se 748 pèptids en 524 proteïnes diferents (Taula Annex 1). Es van identificar proteïnes implicades en una gran varietat de processos, i entre els més sobre-representats es troben la transducció de senyals, l'endocitosi, l'organització de l'actina, la regulació de l'activitat GTPasa, la polaritat, la regulació de la transcripció i la transició G2/M (Taula R1).

RESULTATS

Biological Process GO Term
GO:0007165~signal transduction
GO:0035556~intracellular signal transduction
GO:0006897~endocytosis
GO:0043087~regulation of GTPase activity
GO:0000917~barrier septum assembly
GO:0071963~establishment or maintenance of cell polarity regulating cell shape
GO:0045944~positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
GO:0000147~actin cortical patch assembly
GO:0010971~positive regulation of G2/M transition of mitotic cell cycle
GO:0043547~positive regulation of GTPase activity

Taula R1. Classificació dels substrats identificats segons el procés biològic en l'activació per calci. La llista s'ha obtingut de l'anàlisi funcional del *Biological Process* pel programa DAVID. En aquesta taula s'observen els 10 processos més sobre-representats amb major significació estadística.

Les proteïnes identificades com a substrat es troben ubicades a diferents localitzacions (Taula R2), trobant-se la majoria al citoplasma (36%). No obstant, hi ha altres proteïnes que es localitzen en el punt de divisió cel·lular (anell contràctil o septe) o a l'extrem de la cèl·lula.

Cellular Compartment GO Term
GO:0032153~cell division site
GO:0051286~cell tip
GO:0015630~microtubule cytoskeleton
GO:0030428~cell septum
GO:0005826~actomyosin contractile ring
GO:0030479~actin cortical patch
GO:0005737~cytoplasm
GO:0051285~cell cortex of cell tip
GO:0035839~non-growing cell tip
GO:0035838~growing cell tip

Taula R2. Classificació dels substrats identificats segons la localització cel·lular en l'activació per calci. La llista s'ha obtingut de l'anàlisi funcional del *Cellular Compartment* del programa DAVID. En aquesta taula s'observen les 10 localitzacions més sobre-representats amb major significació estadística.

3.2. Identificació dels substrats de Ckk2 en resposta a la privació de nitrogen.

Els cultius de les soques wt i $\Delta ckk2$ es van créixer en medi mínim i després es van transferir a un medi sense nitrogen. A les 24 hores es van prendre les mostres. Dels extractes proteics obtinguts es van identificar els residus que estaven fosforilats en wt durant la privació de nitrogen i no ho estaven en la soca $\Delta ckk2$.

Es van detectar 453 pèptids fosforilats en wt que no estaven fosforilats a la soca $\Delta ckk2$ en 374 proteïnes diferents (Taula Annex 2). S'ha identificat proteïnes implicades en una gran varietat de processos, i entre els més sobre-representats es troben l'acoblament dels nodes d'actina del còrtex, l'organització dels filaments d'actina, la transcripció l'endocitosi i la transducció de senyals (Taula R3).

Biological Process GO Term
GO:0000147~actin cortical patch assembly
GO:0006351~transcription, DNA-templated
GO:0006897~endocytosis
GO:0007015~actin filament organization
GO:0007165~signal transduction
GO:0006355~regulation of transcription, DNA-templated
GO:0006886~intracellular protein transport
GO:0030100~regulation of endocytosis
GO:0043087~regulation of GTPase activity
GO:0006357~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter

Taula R3. Classificació dels substrats identificats segons el procés biològic en resposta a la privació de nitrogen. La llista s'ha obtingut de l'anàlisi funcional del *Biological Process* pel programa DAVID. En aquesta taula s'observen els 10 processos més sobre-representats amb major significació estadística.

Les proteïnes identificades com a substrat es troben ubicades a diferents localitzacions (Taula R4): l'extrem cel·lular, el patch cortical d'actina, el lloc de divisió cel·lular, l'anell contràctil, el complex Arp2/3, l'endosoma i el citoplasma.

RESULTATS

Cellular Compartment GO Term
GO:0051286~cell tip
GO:0030479~actin cortical patch
GO:0032153~cell division site
GO:0015630~microtubule cytoskeleton
GO:0005826~actomyosin contractile ring
GO:0005885~Arp2/3 protein complex
GO:0035838~growing cell tip
GO:0005768~endosome
GO:0005737~cytoplasm
GO:0010494~cytoplasmic stress granule

Taula R4. Classificació dels substrats identificats segons la localització cel·lular en resposta a la privació de nitrogen. La llista s'ha obtingut de l'anàlisi funcional del Cellular Compartment del programa DAVID. En aquesta taula s'observen les 10 localitzacions més sobre-representats amb major significació estadística.

3.3. Identificació dels substrats de Ckk2 sense estrès.

Els extractes analitzats han crescut en condicions de cultiu de medi ric i hem identificat aquells residus que no es trobaven fosforilats a la soca wt i si estan fosforilats a la soca $\Delta ckk2$.

Es van detectar fins a 389 pèptids fosforilats en wt que no estaven fosforilats a la soca $\Delta ckk2$ en 335 proteïnes diferents (Taula Annex 3). Es van identificar proteïnes implicades en una gran varietat de processos, i entre els més sobre-representats es troben la regulació de la transcripció i remodelació de la cromatina, la localització cel·lular, l'acoblament i localització del patch cortical d'actina, la via MAPK, la polaritat i el plegament de proteïnes *de novo* (Taula R5).

Les proteïnes identificades com a substrat (Taula R6) es troben a la cromatina, l'extrem de la cèl·lula, l'anell contràctil i el lloc on es produeix la divisió, el patch cortical d'actina, el fus mitòtic i els microtúbuls.

Biological Process GO Term
GO:0006355~regulation of transcription, DNA-templated
GO:0006351~transcription, DNA-templated
GO:0034613~cellular protein localization
GO:0006338~chromatin remodeling
GO:0000147~actin cortical patch assembly
GO:0051403~stress-activated MAPK cascade
GO:0016569~covalent chromatin modification
GO:0071963~establishment or maintenance of cell polarity regulating cell shape
GO:0051666~actin cortical patch localization
GO:0051083~'de novo' cotranslational protein folding

Taula R5. Classificació dels substrats identificats segons el procés biològic. La llista s'ha obtingut de l'anàlisi funcional del *Biological Process* pel programa DAVID. En aquesta taula s'observen els 10 processos més sobre-representats amb major significació estadística.

Cellular Compartment GO Term
GO:0000790~nuclear chromatin
GO:0051286~cell tip
GO:0005826~actomyosin contractile ring
GO:0032153~cell division site
GO:0035838~growing cell tip
GO:0030479~actin cortical patch
GO:0005886~plasma membrane
GO:0044732~mitotic spindle pole body
GO:0051285~cell cortex of cell tip
GO:0015630~microtubule cytoskeleton

Taula R6. Classificació dels substrats identificats segons la localització cel·lular. La llista s'ha obtingut de l'anàlisi funcional del *Cellular Compartment* del programa DAVID. En aquesta taula s'observen les 10 localitzacions més sobre-representats amb major significació estadística.

3.4. Anàlisi dels residus identificats en l'assaig de fosfoproteòmica en els substrats estudiats.

Hem creuat els substrats que estàvem intentant validant del primer assaig de fosfoproteòmica amb els resultats obtinguts en aquest assaig. A

RESULTATS

continuació es presenten els possibles llocs de fosforilació de Ckk2 en els substrats estudiats.

3.4.1. Cgs1/Pka1 i substrats relacionats amb Cgs1/Pka1

La fosforilació de Cgs1 en el residu S52 ha sigut identificada en l'activació de Ckk2 per calci.

La fosforilació de Pka1 en el residu S350 ha sigut identificada sense aplicar cap estrès al cultiu i en l'activació per calci. Una altra fosforilació en la posició S17 s'ha identificat en la resposta a la deprivació de nitrogen.

S'ha analitzat la fosforilació de components que participen en l'activació de la Pka1. L'adenilat ciclasa Cyr1, fosforila S1572 en condicions de creixement sense estrès i T1568 i S1579 en condicions de deprivació de nitrogen. Git11, que forma part de la proteïna G trimèrica que activa Cyr1, està fosforilada en els residus S43 i S45.

3.4.2. Int6 i substrats relacionats amb Int6

No s'ha detectat la fosforilació de Int6 en cap de les condicions. Si que s'ha identificat la fosforilació del residu S92 de Moe1, la proteïna que co-precipita amb Int6.

3.4.3. Gad8 i substrats relacionats amb Gad8

La fosforilació de Gad8 s'ha detectat només en condicions d'activació per calci en els residus S41 i S44.

El substrat de Gad8, Fkh2, en condicions de cultiu sense estrès, presenta fins a 5 fosforilacions en els residus T366, T369, T378, S430, S435. Les fosforilacions de S430 i S435 es descriuen també en condicions d'estrès de calci.

4. Ckk2 i el citoesquelet d'actina.

4.1. Anàlisi de la distribució de actina en mutants $\Delta ckk2$.

Les latrunculines són un compost que s'ha utilitzat per analitzar la divisió cel·lular des del punt de vista dels microfilaments d'actina, ja que són capaces de inhibir la polimerització dels monòmers d'actina en microfilaments a *S. pombe* (Chen et al., 2008) (Chen et al., 2015). Degut a que, en estudis inicials es va observar que les cèl·lules $\Delta ckk2$ són sensibles a latrunculina i el fet que s'han identificat components implicats en l'organització del citoesquelet d'actina en estudis de fosfo-proteòmica, es va decidir realitzar estudiar el possible paper que té Ckk2 en el funcionament del citoesquelet d'actina.

Per observar si Ckk2 causava canvis en la distribució d'actina es va generar la soca $\Delta ckk2$ *act1-Lifeact-mCherry*, que ens permetria observar en el microscopi de fluorescència el citoesquelet d'actina i es compararia amb una soca wt *act1-Lifeact-mCherry*. En aquest treball, es van exposar ambdues soques a un estrès de calci i una deprivació de nitrogen. En resposta a l'activació per calci (Figura R50), no s'observen diferències en la formació dels cables d'actina entre la soca wt i la soca $\Delta ckk2$.

La deprivació de nitrogen durant 24 hores provoca l'aturada de la divisió cel·lular, i en analitzar l'organització de l'actina, s'observa en la soca wt l'acumulació en pocs focus intensos i situats al còrtex. Aquests focus es coneixen com *patches* corticals d'actina (*actin cortical patches*). D'altra banda, en deleccionar *ckk2*, l'actina es concentrava en focus més petits i dispersos per la cèl·lula (Figura R51).

RESULTATS

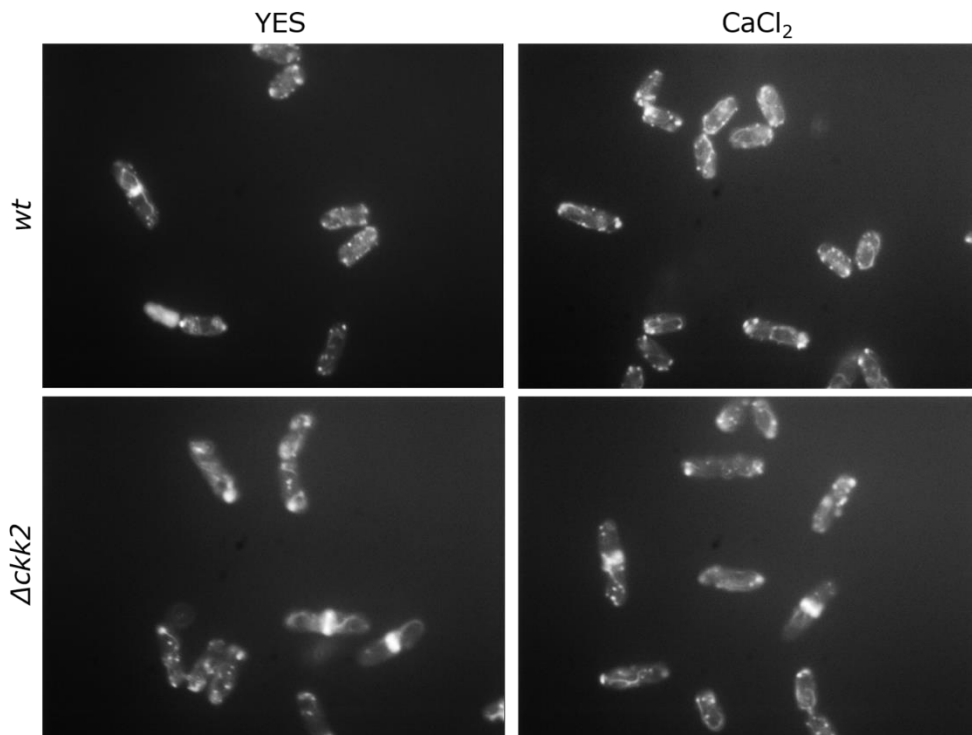


Figura R50. Ckk2 no regula la funció del citoesquelet d'actina en resposta a calci. Les soques act1-Lifeact-mCherry (RA4423) i $\Delta ckk2$ act1-Lifeact-mCherry (RA4425) han crescut en medi ric a 25°C i després s'han tractat o no amb clorur de calci 100 mM durant 1 hora.

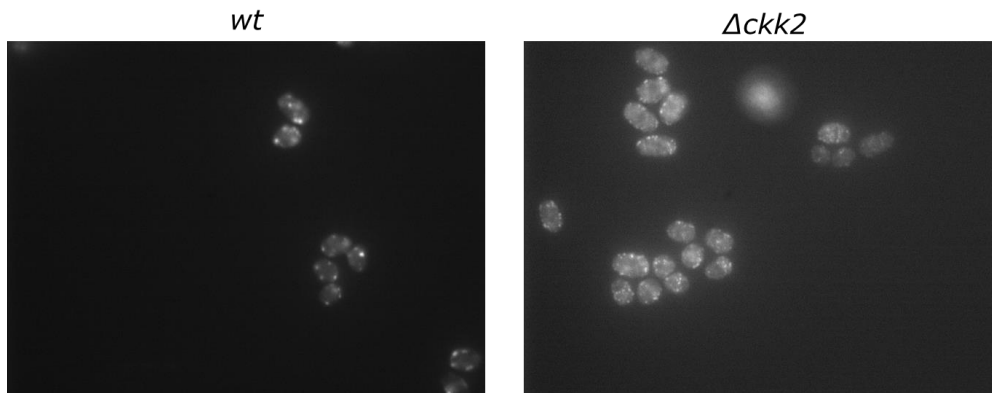


Figura R51. La deleció de *ckk2* desorganitza les acumulacions d'actina del còrtex cel·lular. Les soques act1-Lifeact-mCherry (RA4423) i $\Delta ckk2$ act1-Lifeact-mCherry (RA4425) han crescut inicialment en medi mínim a 25°C i després s'han transferit a un medi sense nitrogen, on han crescut durant 24 hores a 25°C.

4.2. Caracterització de l'efecte del tractament de Latrunculina B.

Davant la sensibilitat a latrunculina B observada en la soca $\Delta ckk2$, ens vam preguntar si la Ckk2 sofriria canvis en els seus nivells o estat. No obstant, el tractament agut durant 1 hora amb latrunculina B no es van observar canvis en els nivells de Ckk2 (Figura R52).

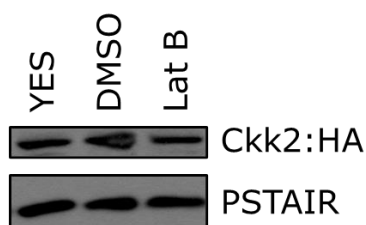


Figura R52. Ckk2 no es veu afectada per l'exposició aguda a latrunculina B. La soca Ckk2:HA (RA3527) ha crescut en medi ric a 25°C i després s'ha tractat o no amb Latrunculina B (10 μ M) o DMSO durant 1 hora.

En l'apartat anterior hem observat com l'activació amb calci no impedeix la formació de cables d'actina i l'acumulació d'aquesta en els pols. En tractar amb diferents concentracions de latrunculina B, l'actina deixa de formar cables i passa a disposar-se en petits focus o *patches* situats per tot el citoplasma (Figura R53). També s'observa com s'està intentant formar l'anell contràctil cap al centre de la cèl·lula. No hi ha gaires diferències entre la soca salvatge i la $\Delta ckk2$.

Per veure l'efecte de la latrunculina en la divisió cel·lular de les cèl·lules $\Delta ckk2$, es van tenyir les cèl·lules de les soques wt i $\Delta ckk2$ amb calcofluor, un agent que s'uneix als polisacàrids de la paret cel·lular, remarcant especialment aquelles zones on es formen els septes. En la soca $\Delta ckk2$ es comença a observar una reducció en la septació a una concentració de 1 μ M de LatB, (Figura R54) que arriba a la màxima diferència amb la soca wt a 2 μ M. La reducció en la septació, no s'observa en la soca salvatge fins arribar a una concentració de 3 μ M. Aquesta observació ens indica que es produeix una reducció en la divisió cel·lular en la soca $\Delta ckk2$.

RESULTATS

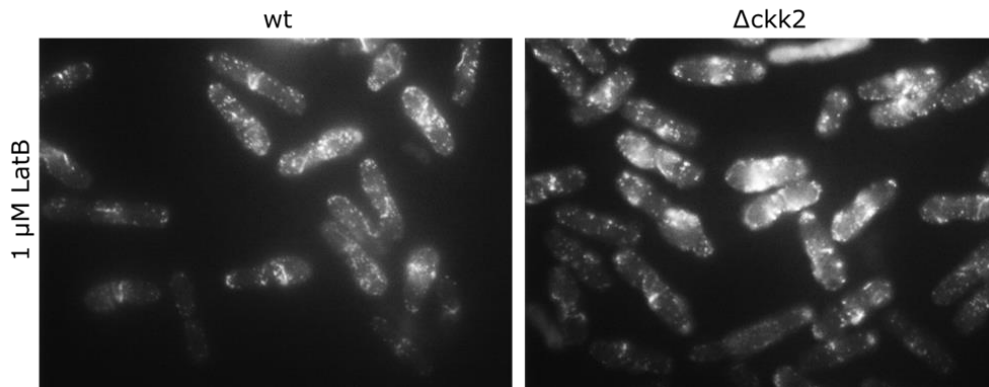


Figura R53. Organització del citoesquelet en resposta a latrunculina B. Les soques wt act1-Lifeact-mCherry (RA4423) i $\Delta ckk2$ act1-Lifeact-mCherry (RA4425) van ser crescudes en medi ric a 25°C i després van ser tractades amb latrunculina B a les concentracions indicades durant 4 hores a la mateixa temperatura. Posteriorment, es van tractar les cèl·lules amb calcofluor abans de ser observades al microscopi.

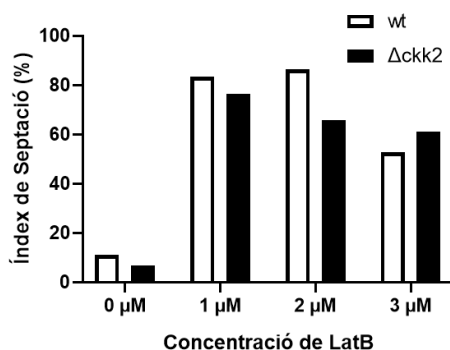
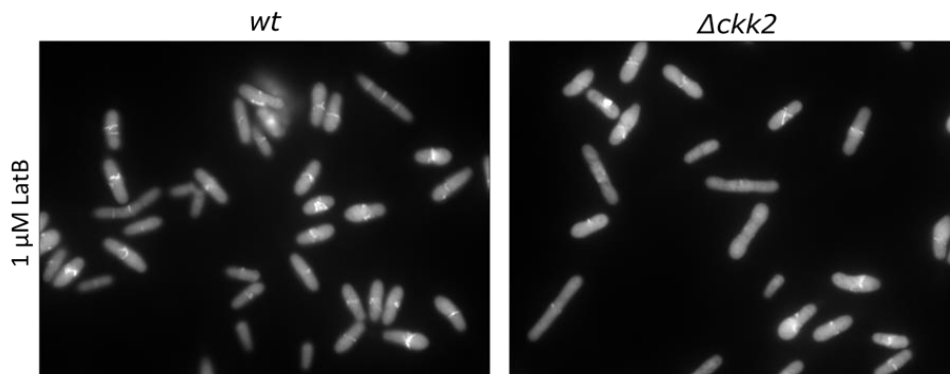


Figura R54. La soca $\Delta ckk2$ mostra una reducció en l'índex de septació. Les soques wt act1-Lifeact-mCherry (RA4423) i $\Delta ckk2$ act1-Lifeact-mCherry (RA4425) van ser crescudes en medi ric a 25°C i després van ser tractades amb latrunculina B a les concentracions indicades durant 4 hores a la mateixa temperatura. Posteriorment, es van tractar les cèl·lules amb calcofluor abans de ser observades al microscopi.

RESULTATS

També es va observar el nombre de nuclis que hi ha presents en aquestes mateixes soques (Figura R55). A la soca wt, una gran majoria de cèl·lules presenta 2 nuclis i una petita quantitat de 4 nuclis. D'altra banda, a la soca $\Delta ckk2$ es veuen també una quantitat similar de cèl·lules amb 2 nuclis, però en aquest cas, la proporció de cèl·lules tetranucleades es triplica amb respecte de la soca salvatge. Aquest resultat indica que la divisió nuclear està accelerada en la soca $\Delta ckk2$, i podria ser una evidència de la desregulació d'un *checkpoint* que es troba activat en la soca wt.

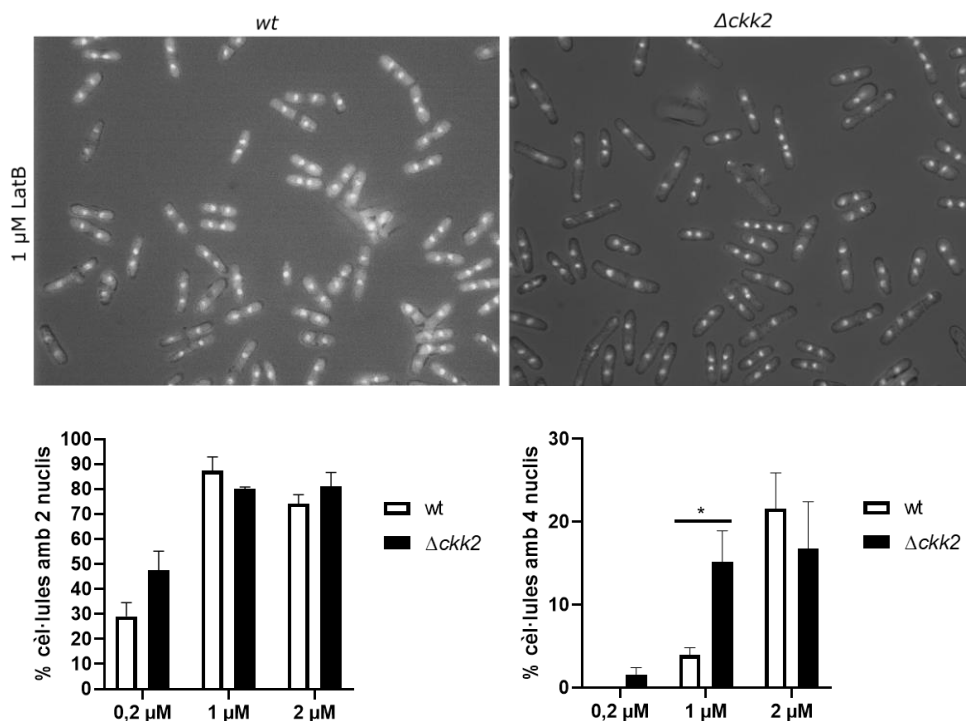


Figura R55. La soca $\Delta ckk2$ mostra una desregulació de la divisió nuclear. Les soques act1-Lifeact-mCherry (RA4423) i $\Delta ckk2$ act1-Lifeact-mCherry (RA4425) van ser crescudes en medi ric a 25°C i després van ser tractades amb latrunculina B a les concentracions indicades durant 4 hores a la mateixa temperatura. Posteriorment, es van tractar les cèl·lules amb DAPI abans de ser observades al microscopi.

RESULTATS

4.2.1. El tractament amb sorbitol reverteix el fenotip de sensibilitat a Latrunculina B en la soca $\Delta ckk2$.

En el darrer assaig de fosfo-proteòmica que s'ha dut a terme, s'ha observat una sobre-representació de dianes que estan implicades en processos com l'endocitosi o la formació de *patches* corticals d'actina. Aquests *patches* estan formats per actina proteïnes associades a l'actina que quan són mutades, afecten al procés d'endocitosi (Munn et al., 1995)(Moseley & Goode, 2006). Les drogues de la família de la latrunculina tenen la capacitat d'inhibir la endocitosi (Gachet & Hyams, 2005). Per un altre costat, el tractament amb sorbitol redueix la turgència necessària per realitzar processos d'endocitosi i és capaç de restablir-la en mutants que tenen una funció endocítica reduïda (Basu et al., 2014). Tenint en compte aquests resultats, ens vam preguntar si Ckk2 està associada a la regulació del citoesquelet d'actina o al procés d'endocitosi i si el sorbitol seria capaç de revertir la sensibilitat a latrunculina B en aquesta soca. Per esbrinar-ho, es van fer plaques que contenien latrunculina B amb i sense sorbitol.

Es va realitzar un assaig de viabilitat utilitzant una soca wt i una soca $\Delta ckk2$, i es va constatar que, mentre que l'adició de sorbitol durant l'exposició a la latrunculina incrementa la viabilitat de les dues soques, el major increment de la viabilitat s'observa en la soca $\Delta ckk2$, que ara mostra un creixement similar al de la soca salvatge, indicant que és possible que la Ckk2 tingui una funció en la endocitosi (Figura R56).

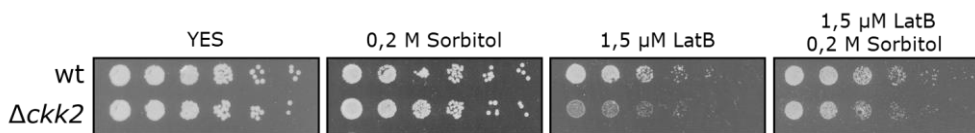
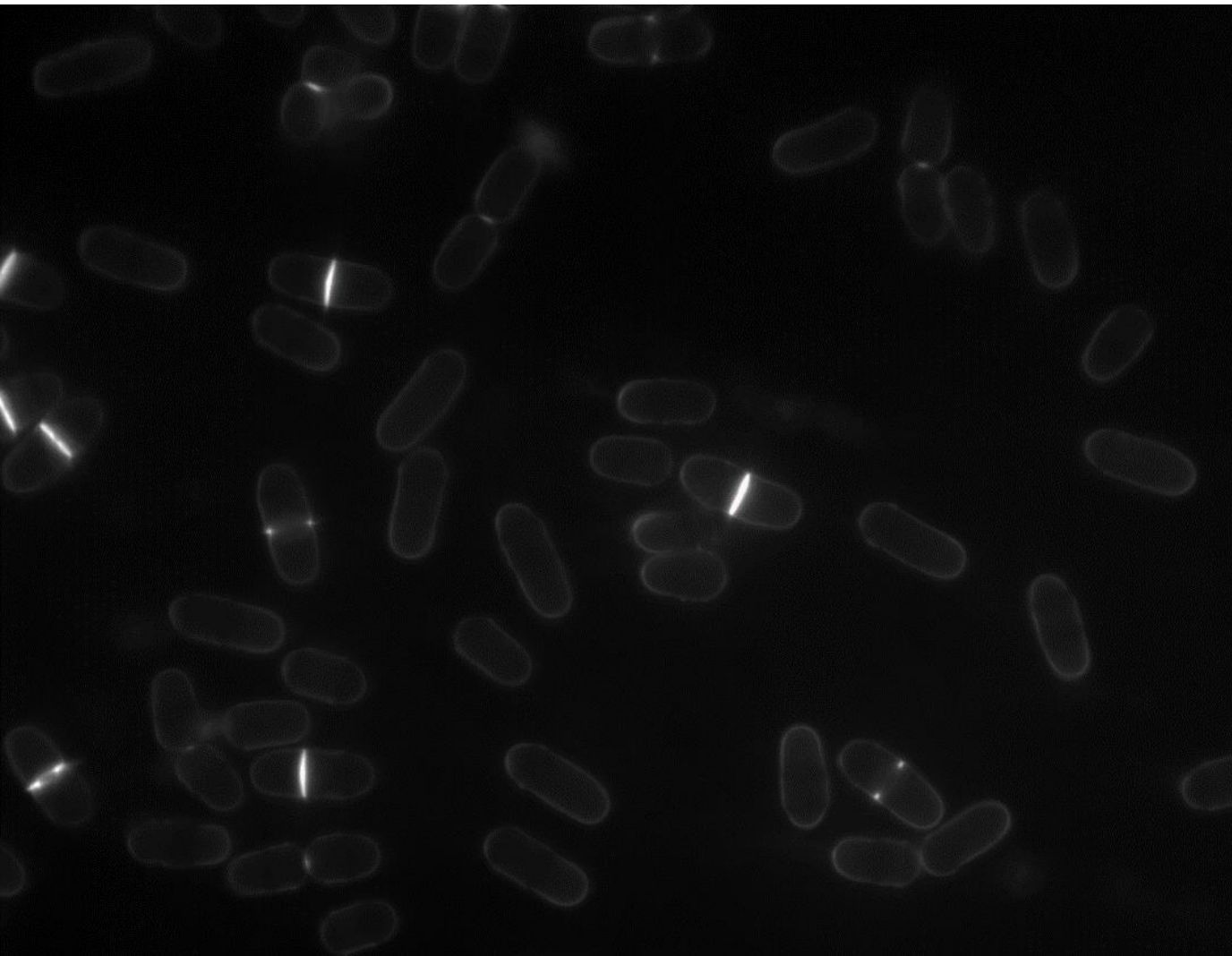


Figura R56. La sensibilitat de $\Delta ckk2$ a latrunculina B es reverteix en afegir sorbitol. Les soques wt (RA2227) i $\Delta ckk2$ (RA3658) van ser crescudes en medi ric (YES) líquid a 25°C i es van fer assajos de viabilitat en plaques de medi ric YES que contenia les concentracions indicades de sorbitol i/o latrunculina B (Lat B) o DMSO. Els assajos es van deixar créixer durant 3-4 dies a 25°C abans de prendre la imatge.

DISCUSSIÓ



Discussió

1. Ckk2 i la deprivació nutricional

1.1. Funció de Ckk2 en deprivació nutricional.

En aquest treball, s'han analitzat noves funcions de la Ckk2. L'elevat increment dels nivells de Ckk2 en condicions de deprivació nutricional ens va portar a estudiar la importància d'aquest increment. Primer, es va estudiar si la presència de Ckk2 era necessària per la supervivència o per l'entrada en la fase de quiescència, en condicions de deprivació nutricional. Els resultats ens han indicat que tant la supervivència com el ritme de creixement en deprivació de nitrogen no mostren diferències entre la soca $\Delta ckk2$ i la soca wt. Per tant, Ckk2 no està implicada en l'entrada a la quiescència, ja que l'absència de proteïnes implicades en aquest procés dona lloc a la pèrdua de viabilitat en les primeres hores de la deprivació de nitrogen (Sajiki *et al.* 2009) i tampoc és necessària per mantenir la supervivència, un cop s'entra en la fase de quiescència.

En el cas de la supervivència en condicions de deprivació de glucosa, hem observat que la supervivència de les cèl·lules $\Delta ckk2$ que s'estan incubant a una concentració de 0,01% de glucosa en medi ric és redueix. Per això, Ckk2 està participant d'alguna manera en el manteniment de la viabilitat de la soca en deprivació de glucosa. Com s'ha explicat en la introducció, en mamífers, l'activació d'AMPK per CaMKK està associat al control de la homeòstasi de glucosa. A *S. pombe*, s'ha observat una reducció en la viabilitat de les soques $\Delta ssp1$ i $\Delta ssp2$, aquesta segona sent ortòloga d'AMPK, en créixer a concentracions baixes de glucosa (Chen *et al.*, 2017). Donat que aquestes soques mostren sensibilitat a concentracions més elevades de glucosa que la soca $\Delta ckk2$ i, a més, un fenotip de reducció en la divisió cel·lular, és possible que la menor sensibilitat observada per l'absència de Ckk2 sigui causada a una menor activitat d'AMPK.

DISCUSSION

La resposta a la deprivació de glucosa per part de les cèl·lules activa mecanismes de restricció calòrica que allarguen l'esperança de vida (Zuin *et al.*, 2010) i Ckk2 podria estar implicada en la regulació d'aquests factors ja que la seva absència mostra una major sensibilitat a concentracions baixes de glucosa, ja sigui causada per una deprivació en el medi o per l'exhauriment de glucosa en cultius de fase estacionària. La prolongació del *chronological lifespan* a *S. pombe* està associat a l'activació de la MAP quinasa Sty1 o a la inactivació de vies implicades en el metabolisme de nutrients com les vies de PKA i TOR (Zuin *et al.*, 2010). Per tant, si la sensibilitat de la soca $\Delta ckk2$ està relacionada amb una desregulació dels mecanismes de restricció calòrica, podria ser deguda a una menor activació de Sty1 o a una major activitat de PKA i TOR o també, per algun altre mecanisme que encara desconeixem. Segons el que hem observat en els dobles mutants *tor2-51* $\Delta ckk2$ i $\Delta pka1$ $\Delta ckk2$, que mostren letalitat sintètica, és possible que es tracti del segon cas.

La concentració de calci podria estar afectant algun dels resultats obtinguts en l'anàlisi de la viabilitat. Per exemple, en mamífers, la disminució del calci i la inhibició de la CaMKK β està associada amb una menor inhibició de mTORC1 i un descens en l'apoptosi (Ghislat *et al.* 2012). En el medi ric no coneixem exactament la concentració de calci, ja que aquest prové de l'extracte de llevat, però en el medi mínim, la concentració és de 5 mM. La concentració de calci present en aquests casos podria no ser prou per causar l'activació de Ckk2, i per això, no s'estarien observant canvis. La solució aleshores seria afegir calci durant aquestes condicions de deprivació. O per altra banda, també és possible que estiguem subestimant l'efecte causat pel calci intracel·lular, ja que s'ha observat que es veu incrementat durant la deprivació de nitrogen en espècies d'algues (Chen *et al.*, 2014) i cianobacteris (Leganés *et al.*, 2009), així que pot ser que en el cas de *S. pombe* també passi el mateix. En aquest cas, s'hauria d'afegir un quelant de calci intracel·lular com EGTA (Su *et al.*, 2017) o

BAPTA (Ma *et al.*, 2011) per observar quin efecte tindria en soques salvatges i soques $\Delta ckk2$ en condicions de privació.

També s'ha analitzat la capacitat de les cèl·lules $\Delta ckk2$ per retornar al cicle cel·lular un cop es restitueix el nitrogen al medi de cultiu després d'exposar les cèl·lules a privació de nitrogen, i els canvis en els nivells de proteïna Ckk2 en aquest mateix procés. No hi ha canvis en l'índex de septació però sí una reducció en el canvi de densitat òptica en les cèl·lules $\Delta ckk2$ en les dues primeres hores del canvi, el que ens indica que les cèl·lules sense Ckk2 creixen més lentament en aquell espai de temps. En conseqüència, Ckk2 estaria facilitant l'inici del creixement cel·lular quan es restitueix el nitrogen.

Una altra de les respostes a la privació de nitrogen es la generació de formes de resistència com espores a través de la meiosi. En les cèl·lules $\Delta ckk2$, l'índex d'aparellament mesurat és superior al de la soca salvatge. Per tant, Ckk2 estaria participant en la regulació negativa de la meiosi, però no està clar si ho fa regulant l'activitat de factors de transcripció meiótics o l'activitat de proteïnes com TOR i PKA que també s'encarreguen de regular-la.

1.2. Estudi de la via Ckk2-Cmk1 en resposta a diferents tipus d'estrès

S'ha descrit en el nostre grup que la via Ckk2-Cmk1 és activada per calci. Després de veure l'increment de Ckk2 en resposta a la privació nutricional, es va analitzar si aquest increment també està associat a un increment de Cmk1. Però Cmk1 es comporta de manera completament oposada, i a les 24 hores d'exposició, els nivells de proteïna es veuen reduïts, indicant que la regulació de Cmk1 i Ckk2 és diferent en privació de nitrogen. Tampoc s'observa l'aparició de fosforilació de Cmk1 en resposta a la privació, ni canvis causats per l'absència de Ckk2, el que ens diu que Ckk2 no participa en la regulació dels nivells de proteïna Cmk1

DISCUSSION

en resposta a la deprivació. En qualsevol cas, la funció de Cmk1 o les CaMK en resposta a la deprivació de nitrogen és encara desconegut. Únicament s'ha descrit un augment de la transcripció de la CaMK en algues verdes (Lauritano *et al.*, 2019). Tampoc està implicada en l'entrada o supervivència en la fase estacionària ja que són igual de viables que les soques wt durant les 4 setmanes d'exposició a un medi sense nitrogen.

L'activació de la via Ckk2-Cmk1 també va ser analitzada en la resposta al tractament a diferents drogues. En estudis anteriors a aquest treball, es van identificar drogues com la latrunculina B (LatB), el tiabendazol (TBZ) i el calcofluor com drogues que causaven alteracions de la viabilitat de la soca $\Delta ckk2$. En aquest treball hem estudiat l'efecte d'aquestes drogues sobre la viabilitat de la soca $\Delta cmk1$, amb l'objectiu d'establir si la via Ckk2-Cmk1 estaria activada en aquestes condicions.

En el cas del tiabendazol (TBZ), un agent que inhibeix l'assemblatge de microtúbuls, les soques $\Delta ckk2$ i $\Delta cmk1$ mostren resistència, és a dir, mostren un major creixement a concentracions de TBZ on el creixement la soca wild-type és menor. Això ens podria estar dient que la via CaMKK/CaMK està participant en la regulació de la funció dels microtúbuls. Aquest tipus de regulació ja s'ha descrit en mamífers, on la fosforilació de MARK2 (*Microtubule Affinity Regulating Kinase 2*) per la CaMKI és necessària per la reorganització dels microtúbuls que es produeix durant el creixement de neurites (Uboha *et al.*, 2007). No sabem encara quins són els mecanismes que permeten a les cèl·lules sense Ckk2 i Cmk1 sobreviure a concentracions més elevades de TBZ, però és possible que en aquests mecanismes estigui implicada l'homòleg de la proteïna MARK2 a *S. pombe*, que és la quinasa Kin1. Un altra explicació de la resistència podria ser que Ckk2-Cmk1 estiguessin implicades en la respiració anaeròbia, ja que TBZ és un inhibidor de la fumarat reductasa, un enzim imprescindible en el procés de la respiració anaeròbia (Armson *et al.*, 1995)

La latrunculina B és una droga que inhibeix la polimerització dels microfilaments d'actina. Els resultats obtinguts indiquen que la sensibilitat de la soca $\Delta ckk2$ i la soca $\Delta cmk1$ és diferent, ja que la soca $\Delta cmk1$ mostra un creixement similar o lleugerament superior a la soca salvatge, mentre que la soca $\Delta ckk2$ és sensible. Aquest fenotip ens estaria indicant que Cmk1 no és important per mantenir la viabilitat en resposta a Latrunculina i Ckk2 sí. A més, ens mostra que la resposta que es dona a través de Ckk2 no es fa a través de la via Ckk2-Cmk1 si no que a través de substrats diferents.

1.3. La regulació de Ckk2

Pel que fa a l'increment en els nivells de proteïna Ckk2 detectat en les condicions de deprivació de nitrogen, aquest augment desapareix ja que els nivells de proteïna Ckk2 retornen als nivells inicials ràpidament quan es retorna el nitrogen al medi. Aquest resultat ens estaria dient que la inducció de l'expressió de Ckk2 és una resposta ajustada a la deprivació i que, qui està regulant Ckk2, ho fa de manera específica en la deprivació nutricional.

La inducció de l'expressió de la proteïna Ckk2 en resposta a la deprivació de nitrogen, també va ser descrita a nivell transcripcional en treballs anteriors del grup (Yance-Chávez, 2015). L'estudi de la regulació de l'expressió de Ckk2 en resposta a deprivació de nitrogen el vam iniciar analitzant la seqüència del promotor del gen *ckk2*.

El resultat ha estat la identificació del motiu WGATAR que és reconegut per Gaf1, un factor de transcripció regulat negativament per TORC1; un motiu WGATAA, que pot ser reconegut per Atf1 i Fep1; i el motiu CCAAT que pot ser reconegut pels factors Php2, Php3, Php4 i Php5.

En aquest treball, hem comprovat que Gaf1 és el factor responsable de l'increment de Ckk2 en resposta a deprivació nutricional. Gaf1 és un factor de transcripció de la família GATA que està regulat negativament per

DISCUSSIÓ

TORC1 en condicions òptimes de creixement. En inactivar-se TORC1 per la falta de nutrients, Ppe1 deixa d'estar inhibida i defosforila Gaf1, permetent la seva translocació al nucli per exercir la seva activitat (Laor *et al.*, 2015) (Ma *et al.*, 2016). La funció de Gaf1 està restringida a les primeres hores de deprivació, induint l'expressió de transportadors d'aminoàcids i la inhibició de la reproducció sexual (Kim *et al.*, 2012). Aquest mecanisme de regulació també s'observa en altres llevats com *S. cerevisiae* (Tate *et al.*, 2019). El que ens ha interessat d'aquest factor de transcripció es que la seva activitat es restringeix a les primeres hores de deprivació, justament on es produeix l'inici de la inducció de l'expressió de Ckk2. Aquesta família està conservada evolutivament en animals, plantes i fongs, però encara no s'han descrit casos on la regulació de CaMKK estigui controlada per aquests factors de transcripció. Per tant, ens sembla un resultat interessant.

Atf1 es un altre factor de transcripció que forma un heterodímer amb Pcr1, i és activat per Sty1, per induir processos com la diferenciació sexual a través de Ste11, la gluconeogènesi mitjançant Fbp1 i les respostes a estrès que són intermediades per la MAPK Sty1 (Stettler *et al.*, 1996). A *C. elegans*, s'ha observat que la síntesi de serotonina a través de ATF-7, necessita de l'activitat de CaMKII (Xie *et al.*, 2013). Però com en el cas anterior, no s'ha identificat que hi hagi regulació de la CaMKK per ATF. La regulació per Atf1 tindria que estar regulada específicament en les condicions de deprivació nutricional i caldria saber si aquesta regulació es podria estendre a altres situacions com l'estrès de calci. De moment, sabem que l'absència d'Atf1 dona una major sensibilitat al calci (Yang *et al.*, 2005), mentre que en soques $\Delta ckk2$ s'observa una major viabilitat a concentracions elevades de calci.

Fep1 és un repressor que s'uneix als promotors dels gens que s'encarreguen de la importació de ferro a la cèl·lula per evitar la sobrecàrrega d'aquest element, que resulta tòxic en elevades quantitats dins la cèl·lula. En condicions de deprivació de ferro, el complex Fra2-Grx4

inhibeix Fep1, de manera que s'allibera del promotor i permet l'expressió dels gens que està reprimint (Kim *et al.*, 2018). Cal remarcar que Fep1 també és un homòleg de la família GATA que manté la seva expressió durant la deprivació de nitrogen (Hoe *et al.*, 1995).

Les proteïnes Php2, Php3, Php4 i Php5 formen part d'un complex (*CCAAT-binding factor*) que regula l'expressió de gens d'ús i emmagatzematge del ferro. Php4 actua com una subunitat que regula la repressió d'aquests gens. Quan hi ha una concentració òptima de ferro, Grx4 s'uneix a Php4, i se l'emporta al citoplasma, permetent aleshores l'expressió de gens que codifiquen per proteïnes que utilitzen o emmagatzemen el ferro (Mercier & Labbé, 2009). Php4 també té un paper en la meiosi, ja que és necessària per optimitzar l'ús de ferro durant aquesta fase, i les cèl·lules sense Php4, sofreixen una aturada en la meiosi (Brault *et al.*, 2016). La presència d'aquests reguladors de la concentració de ferro en el promotor de Ckk2 podria indicar que la inducció de Ckk2 podria ser deguda a canvis en la concentració de ferro produïts durant la deprivació nutricional. No obstant, s'han fet ja anàlisis d'expressió de cèl·lules $\Delta php4$ mitjançant microarrays i no s'ha detectat canvis en l'expressió de Ckk2 (Brault *et al.*, 2016). Per tant, de moment es tractaria d'una hipòtesi poc probable.

1.4. Ckk2, Gaf1 i TORC1

Com l'activitat de Gaf1 està restringida a les condicions de deprivació de nitrogen (Ma *et al.*, 2016), davant la inducció de l'expressió de Ckk2 en aquestes mateixes condicions, es va estudiar Gaf1 com a responsable de la inducció de la seva expressió. Els nivells de Ckk2 en resposta a deprivació de nitrogen es veuen reduïts en la sòca $\Delta gaf1$, indicant que, efectivament, Gaf1 és responsable de l'increment de Ckk2 en aquestes condicions. Com l'expressió de nitrogen no queda del tot eliminada és possible que existeixin altres factors de transcripció que en resposta a l'absència de nitrogen estiguin implicats.

DISCUSSIÓ

Un cop determinat que Gaf1 controla l'expressió de Ckk2 en condicions de privació de nitrogen, vam analitzar si l'activitat de TORC1 era l'encarregada d'inhibir-la en condicions normals. TORC1 s'encarrega de mantenir el creixement de la cèl·lula en integrar senyals nutricionals òptimes per promoure el creixement i la divisió, i inhibir respostes a estrès. Quan es produeix una privació nutricional, TORC1 s'inactiva, de manera que deixa de promoure el creixement i la divisió, i aquelles respostes que eren inhibides per TORC1, deixen d'estar-ho, de manera que s'activen fenòmens com l'autofàgia, la diferenciació sexual i la inducció de gens de resposta a privació de nitrogen.

S'ha estudiat l'efecte de la inhibició de TORC1 emprant inhibidors químics o soques mutants. Emprar inhibidors de TORC1 com la rapamicina i Torin1 dona com a resultat un increment de l'expressió de Ckk2. L'increment observat però, és superior en el tractament amb Torin1 que en el tractament amb rapamicina. La variació podria tenir varies causes.

La primera seria que l'efecte de la dosi de rapamicina sigui inferior al de la dosi de Torin1. Hem administrat dosis de rapamicina (Weisman *et al.*, 2007) i Torin1 (Kowalczyk & Petersen, 2016) similars als utilitzats en altres estudis. De fet, en el treball de Kowalczyk & Petersen, la mateixa concentració de Torin1 no causa canvis en els nivells de Ppk32, una quinasa que regula negativament TORC1 en resposta a brefeldina A. La segona explicació seria que Torin1 pot inhibir els dos complexos TORC a *S. pombe* (Atkin *et al.*, 2014), i, per tant, l'increment d'expressió de la proteïna Ckk2 seria deguda a canvis en l'activitat dels dos complexos. La darrera causa seria que, senzillament, l'efecte de Torin1 sobre l'activitat de TORC1 sigui major (com ja s'ha vist en el treball de Atkin *et al.*, 2014)

Els nivells de Ckk2 van ser analitzats també en el mutant de *tor2-51* (complex TORC1). L'expressió de Ckk2 en el background *tor2-51* es troba lleugerament incrementada a nivells basals. En resposta al canvi a temperatura restrictiva durant 4 hores, els nivells de Ckk2 es mantenen més elevats en la soca *tor2-51* que en la soca salvatge.

L'estudi realitzat per respondre a la pregunta de si l'increment d'expressió de Ckk2 degut a la inhibició de TORC1 era causat per l'activació del factor de transcripció Gaf1 ens va indicar que Gaf1 és responsable de l'increment de l'expressió de Ckk2 quan TORC1 està inactiu (Figura D1). Per tant, emprant tant inhibidors químics com soques mutants, es demostra que TORC1 regula negativament l'expressió de proteïna Ckk2 en condicions òptimes de creixement, i és la reducció d'activitat de TORC1 causada per manca de nutrients com el nitrogen, la que causa la inducció parcial de Ckk2 a través del factor de transcripció Gaf1.

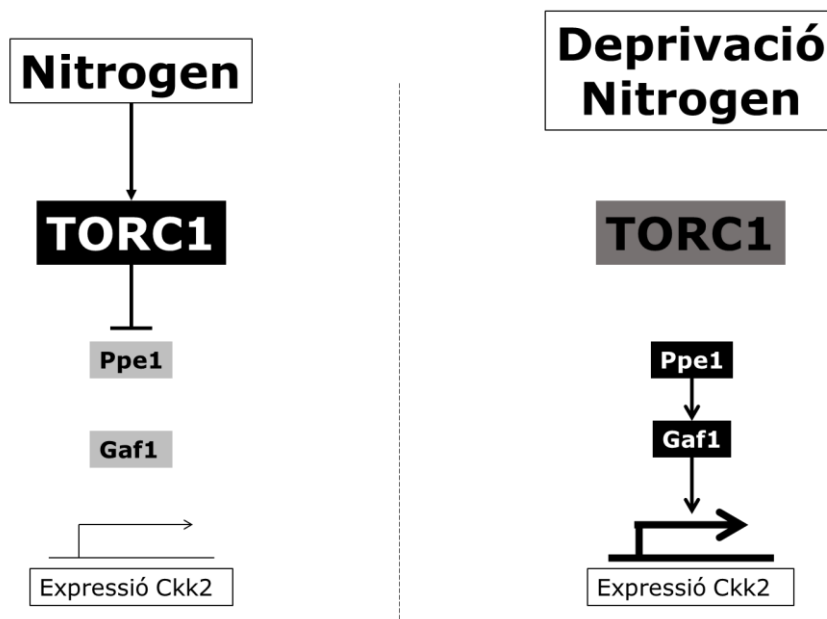


Figura D1. Model de la regulació de l'expressió de Ckk2 en resposta a la privació de nitrogen.

En l'anàlisi de la interacció gènica entre *ckk2* i *tor2*, es va observar una reducció de la viabilitat del doble mutant *tor2-51 Δckk2* a temperatura permissiva. L'explicació podria ser que l'activitat TORC1 en aquest mutant estigui una mica reduïda a temperatura permissiva i la supervivència d'aquesta soca depengui d'un major nivell i activitat de la via Ckk2. No obstant, l'activitat de *tor2-51* a temperatures permissives a través de la fosforilació de Maf1 s'observa similar a la de la proteïna salvatge (Du et

DISCUSSIÓ

al., 2012). Podria ser que l'activitat de Ckk2 sigui essencial per la funció de Tor2 quan aquesta presenta la mutació. Una altra explicació seria que la via TORC1 i Ckk2 controlin el creixement o la divisió cel·lular a través del mateix substrat. TORC1 retarda l'entrada a mitosi a través de la regulació negativa de Cdc25 (Alao & Sunnerhagen, 2020) i Ckk2 controla l'acumulació de Cdc25 en ser activada per calci (Cisneros-Barroso *et al.*, 2014). Donat que Tor2-51 encara és funcional a temperatura permissiva, és possible que sigui necessari l'activitat de Ckk2 per acumular Cdc25 per poder garantir que es produeix la divisió cel·lular.

Una altra possibilitat és que s'estiguin afectant dues vies que podrien ser importants per la viabilitat de la cèl·lula, per tant, seria normal que donés lloc a un doble mutant de viabilitat reduïda. La creació i anàlisi del doble mutant *tor2-51 Δssp1*, on Ssp1 és una quinasa homòloga a Ckk2 i imprescindible per alguns processos i respostes cel·lulars, ens va servir per descartar que fos un efecte inespecífic del doble mutant, ja que la viabilitat del doble mutant *tor2-51 Δssp1* no es veu alterada.

En qualsevol cas, que el mutant *tor2-51 Δckk2* tingui un creixement reduït ens podria indicar que la inhibició de les dues vies es capaç d'aturar o alentir la proliferació cel·lular. El tractament amb l'inhibidor de CaMKK, STO-609, pot reduir la proliferació cel·lular en tumors de pròstata (Penfold *et al.*, 2018) i redueix la viabilitat d'esferoides de cèl·lules de tumors ovàrics a través de la inhibició de l'autofàgia (Laski *et al.*, 2020). Donat que la desregulació de mTORC, com a efector de vies importants en la cèl·lula, s'ha identificat en molts tumors (Saxton & Sabatini, 2017), no seria molt precipitat combinar la inhibició de mTORC amb la inhibició de CaMKK com a tractament farmacològic, vist els resultats que hem observat a *S. pombe*. La combinació d'un inhibidor de mTORC i un altre inhibidor ha aconseguit reduir encara més la proliferació observada en els tractaments simples (Schreck *et al.*, 2020). No he trobat informació sobre cap assaig que combini inhibició de mTOR amb inhibició de la via CaMKK/CaMK, així que crec que podria ser una bona idea desenvolupar estudis que impliquin

un doble tractament amb un inhibidor de mTORC i STO-609 com inhibidor de CaMKK.

1.5. Ckk2 i TORC2

Tal com hem indicat amb anterioritat, la inhibició amb Torin1 causa un major increment de l'expressió de Ckk2 que quan s'utilitza la rapamicina, inhibidor de TORC1, i hem indicat que podria ser degut a la inhibició de l'activitat del complex TORC2. Els estudis dels nivells de Ckk2 en el mutant *Δtor1* han mostrat que l'expressió de Ckk2 es troba també incrementada en aquest mutant. També hem deletionat Gad8, el substrat de Tor1, i, en aquest cas, hem observat una reducció en els nivells de Ckk2. Aquestes observacions ens permeten deduir que l'expressió de Ckk2 també està sota control de TORC2, però no a través de Gad8, ja que si fos a través d'aquesta, aleshores observariem el mateix resultat. Com Gad8 té una activitat de *feedback* negatiu sobre Tor1 (Hálová *et al.*, 2013), podria ser que la reducció dels nivells de Ckk2 en la soca *Δgad8*, sigui causat per una forma sobre-activada de Tor1.

2. Validació dels substrats de Ckk2.

2.1. Cgs1/Pka1 i Ckk2

2.1.1. Cgs1/Pka1 en estrès de calci.

En aquest treball, s'ha tractat cultius amb calci per generar l'activació de Ckk2. En les mateixes condicions, s'han identificat en treballs anteriors, Cgs1 i Pka1 com a possibles substrats de Ckk2.

S'han analitzat les interaccions genètiques entre les deletions de *ckk2*, *cgs1* i *pka1*, en condicions d'estrès de calci, i hem observat que la soca *Δcgs1* no sofreix canvis comparada amb la soca salvatge, mentre que la soca *Δpka1* presenta una menor viabilitat en les mateixes condicions. El fenotip vist en la soca *Δcgs1* podria estar indicant que el flux de cAMP no

DISCUSSION

es veu afectat per l'exposició a calci i que Cgs1 es manté unida a cAMP. Aquest tipus de resposta contrasta amb l'observada durant un estrès osmòtic, on Cgs1 exporta Pka1 fora del nucli (Matsuo *et al.*, 2007). D'altra banda, el comportament en el calci d'aquestes dues soques coincideix parcialment amb l'observat en el treball de Matsuo i Kawamukai (2016), ja que sí que s'observa la sensibilitat de la soca $\Delta pka1$ però en la soca $\Delta cgs1$ s'observa resistència en lloc de un creixement similar al fenotip salvatge. L'explicació que hi trobem es que hi ha varies diferències en el disseny experimental: per una banda, nosaltres hem utilitzat soques protòtrofes mentre que les seves presentaven auxotrofies, i per l'altra, tot i que s'ha realitzat l'estrès en el mateix medi, cal notar que s'ha pres una foto del creixement de la placa en estrès de calci als 6 dies, i nosaltres la prenem als 3 dies.

Els resultats obtinguts en els dobles mutants, són molt diferents. El doble mutant $\Delta cgs1 \Delta ckk2$ es comporta com el mutant simple $\Delta ckk2$, mostrant resistència a calci. D'altra banda, en el doble mutant $\Delta pka1 \Delta ckk2$, hem observat una viabilitat menor que la observada en el mutant simple $\Delta pka1$. Aquest es un fenotip que ens sembla molt interessant i serà discutit més endavant.

A continuació vam analitzar com l'estrès de calci afectava als nivells de proteïna de Cgs1 i Pka1; i si depenien de l'activitat de Ckk2. En resposta a calci, hem observat augments en els nivells de proteïna Cgs1, ja observat en un altre treball (Matsuo & Kawamukai, 2016) que no depenien de la presència de Ckk2. Per tant, Ckk2 no està controlant l'expressió a nivell de proteïna de Cgs1 en resposta a calci o a nivells basals.

Els nivells de Pka1 també es veuen lleugerament incrementats en resposta a un estrès agut de calci i és mantenen en la soca $\Delta ckk2$. Per tant, Ckk2 no regula els nivells de proteïna Pka1 ni causa modificacions post-traduccionals detectables en resposta a estrès de calci. Aquest resultat també s'ha observat en el treball de Matsuo i Kawamukai (2016).

2.1.2. Cgs1/Pka1 en estrès de glucosa.

L'anàlisi de les interaccions genètiques entre Ckk2 i Cgs1/Pka1 en condicions d'estrès de glucosa, ens ha indicat que mentre els mutants simples són viables com les cèl·lules wt, en el doble mutant, $\Delta cgs1 \Delta ckk2$ presenta una reducció de la viabilitat idèntica a l'observada en la soca $\Delta cgs1$. Per tant, en deprivació de glucosa, és molt important, que l'activitat de Pka1 estigui inhibida, tant en presència com en absència de Ckk2.

Com hem explicat abans, Pka1 s'inactiva en situacions d'estrès nutricional, així que la soca $\Delta pka1$ no presenta diferències respecte la soca wt, però si es genera una situació on Pka1 està activa quan no ho hauria d'estar, com per exemple en el mutant $\Delta cgs1$, s'observa una reducció de la viabilitat. En l'anàlisi del doble mutant $\Delta pka1 \Delta ckk2$ es torna a observar una gran pèrdua de viabilitat que no s'observava en els mutants simples, que recordem que creixien igual que la soca wt. Per tant, aquest resultat és molt interessant.

Paral·lelament, s'ha estudiat si els nivells de proteïna Cgs1 i Pka1 en condicions de deprivació de glucosa. Els resultats ens han indicat que l'increment de Cgs1 i el descens de Pka1 observats no depenen de Ckk2.

Per tant, Ckk2 no causa ni alteracions post-traduccionals ni alteracions dels nivells de proteïna Cgs1 i Pka1 en resposta a situacions de deprivació de glucosa. La reducció dels nivells de Pka1 tindria sentit perquè l'activitat de Pka1 no seria necessària en aquestes condicions, però aquests resultats contradiuen el que surt en altres treballs (Gupta *et al.*, 2011a) (Gupta *et al.*, 2011b). En aquests treballs s'observa una fosforilació progressiva de Pka1 a mesura que avança el temps de deprivació de glucosa, que nosaltres no hem observat. A més aquesta fosforilació també s'observaria en els nivells de Cgs1 perquè en condicions de deprivació de glucosa s'uniria a Pka1. És estrany que no haguem observat aquest fet donat que utilitzen també una soca amb la proteïna Pka1 marcada amb l'epítotop HA. També hem realitzat l'experiment utilitzant el mateix medi i concentració

DISCUSSIÓ

de glucosa que els treballs indicats. Les úniques variacions possibles serien que la temperatura que hem utilitzat nosaltres es de 25°C enlloc dels 30°C que utilitzen ells o que s'ha utilitzat un mètode de lisi diferent: nosaltres hem utilitzat el mètode de trencament mecànic amb *glass beads* mentre que ells han utilitzat un mètode de lisi alcalina (Matsuo *et al.*, 2006).

2.1.3. El doble mutant $\Delta pka1 \Delta ckk2$.

La generació de la doble deleció $\Delta pka1 \Delta ckk2$ ens ha demostrat que les cèl·lules són capaces de créixer amb normalitat en condicions òptimes, però que en situacions d'estrès com l'estrès de calci o la deprivació de glucosa, sofreixen una reducció en la seva viabilitat. El efecte més important s'observa especialment en la deprivació de glucosa, on els mutants simples poden créixer com la soca salvatge, però el doble mutant presenta una gran reducció de viabilitat i sembla que s'ha generat una situació de letalitat sintètica. Aquesta situació segurament sigui donada perquè la via de Ckk2 i la de Pka1 convergeixen en l'activitat de una proteïna que sigui essencial per la viabilitat de la cèl·lula en aquestes condicions.

Per veure si Ckk2 afecta a l'activitat de Pka1, es va analitzar els nivells de transcripció de *fbp1*, que en condicions òptimes de creixement és inhibit per Pka1 (Higuchi *et al.*, 2002) per Real Time PCR. En absència de Ckk2, es mostra un increment de la transcripció de *fbp1*, el que pot indicar que o bé Ckk2 modula l'activitat de Pka1 de manera positiva, o que Ckk2 pot controlar la transcripció d'aquest gen de manera alternativa. Per esbrinar-ho, es va comprovar l'expressió de *fbp1* en el doble mutant $\Delta pka1 \Delta ckk2$ l'increment de l'expressió similar a la soca $\Delta pka1$. Aquest resultat ens indica que la regulació de l'expressió de *fbp1* estaria dominada per la via de la Pka1 i que l'activitat de *fbp1* no estaria associada al fenotip sintètic letal.

Per tal d'identificar substrats de l'activitat de les dues vies, ens hem plantejat transformar el doble mutant amb una llibreria de sobreexpressió

de cDNA de *S. pombe*, amb l'objectiu d'identificar supressors de la letalitat sintètica dels dobles mutants en les condicions d'estrès. En aquest assaig esperariem identificar tant *pka1* com *ckk2* com a controls positius de l'assaig.

2.1.4. Generació de Ckk2 analog-sensitive.

Un dels objectius d'aquest treball va ser generar una quinasa Ckk2 *analog-sensitive*. S'ha identificat la leucina 152 com el residu gate-keeper de Ckk2. La mutació d'aquest residu a glicina ha donat lloc a la Ckk2 analog-sensitive (Ckk2-as).

S'ha validat positivament el funcionament de la Ckk2-as mitjançant un assaig quinasa amb un substrat de Ckk2 prèviament descrit, com es el cas de Cmk1.

2.1.5. Ckk2 i la fosforilació de Cgs1.

Emprant diferents aproximacions, no hem observat fosforilació de Cgs1 per Ckk2. D'altra banda, hem detectat la fosforilació d'una proteïna que co-precipita amb Cgs1, que podria ser diana directa de Ckk2.

La banda fosforilada per Ckk2-as apareix a una alçada propera a 75 kDa i no coincideix amb la banda que representa Cgs1:HA, per tant, podem concloure que segurament Cgs1 no sigui fosforilada per Ckk2. No obstant, l'aparició de la banda específica per l'activitat de la Ckk2-as, ens indica que una de les proteïnes que co-precipita amb Cgs1 podria ser fosforilada. La següent taula indica les proteïnes en les que s'ha descrit una interacció física amb la Cgs1.

Proteïna	Pes molecular
Bdf2	81 kDa
Imp1	60 kDa
Pka1	58 kDa
Srp40	47 kDa

Taula D1. Proteïnes que interactuen físicament amb Cgs1. Dades extretes de PomBase.

DISCUSSIÓ

De les proteïnes de la taula és poc probable que sigui Pka1, ja que la interacció entre Cgs1 i Pka1 només es produeix en condicions de privació de glucosa; i, d'altra banda, el pes molecular de la proteïna és de 58 kDa.

La interacció entre Cgs1 i Srp40 s'ha descrit en un estudi per detectar les interaccions en el proteoma de *S. pombe* (Vo *et al.*, 2016). No s'ha descrit quina és la funció de la interacció de Srp40 i Cgs1, i encara hi ha poca informació de la funció de Srp40 a *S. pombe*. Si que s'ha observat a *S. cerevisiae* l'estructura proteica del seu ortòleg Srp40, que es pot localitzar al nucli o al citoplasma i es creu que la seva funció està més associada al transport (Ikonomova *et al.*, 1997). Aquesta funció transportadora podria facilitar el transport del complex Cgs1/Pka1 fora del nucli en condicions de privació nutricional, ja que Cgs1/Pka1 passen a localitzar-se al nucli després d'unes hores d'exposició (Matsuo & Kawamukai, 2017). No obstant, no sabem si la deleció de Srp40 causaria la inhibició de l'exportació de Pka1 al nucli i no creiem que Ckk2 hi intervingui, ja que Srp40 té un pes de 47 kDa i no correspondria amb la banda detectada.

Imp1 és una altra proteïna encarregada del transport entre el citoplasma i el nucli. La seva funció és important pel desacoblament del fus mitòtic (Lucena *et al.*, 2015) i meiótic (Flor-Parra *et al.*, 2018). Com el transport del factor de transcripció Php4 al nucli està parcialment explicat per la funció de Imp1 en la seva importació (Khan *et al.*, 2014), és possible que la seva interacció física amb Cgs1 permeti el transport d'aquesta última al nucli. La banda detectada en incubar amb l'anticòs anti-tiophosphate ester és possible que sigui Imp1, segons el seu pes molecular. No sabem quina és la relació que poden tenir Ckk2 i Imp1. En mamífers, la importina alfa, homòloga de Imp1, permet la translocació de CaMKIV al nucli de les neurones (Kotera *et al.*, 2005) per a que pugui ser activada per CaMKK, i posteriorment, fosforili el factor de transcripció CREB1 (Ferreti, 2018).

Bdf2 és una proteïna implicada en la regulació transcripcional mitjançant la unió amb histones acetilades. Bdf2 quan s'uneix a les histones, modula

l'estructura de la cromatina per coordinar la resposta a danys del DNA (Garabedian *et al.*, 2012). La proteïna Epe1 uneix Bdf2 en certs punts per establir "fronteres" que impedeixen la propagació de la heterocromatina i evitar així el silenciament gènic (Wang *et al.*, 2013). Encara no s'ha descrit la relació funcional que té la interacció entre Cgs1 i Bdf2. Tampoc s'ha identificat la relació entre CaMKK i les proteïnes homòlogues per Bdf2 en mamífers. D'aquesta manera es fa una mica difícil saber quina explicació tindria aquesta fosforilació.

De les tres proteïnes, la més propera a la banda observada seria Bdf2. Per decidir si alguna de les proteïnes descrites és la immunoprecipitada i fosforilada per Ckk2, hauríem de realitzar estudis directes.

També es podria donar el cas de que la banda que apareix no sigui cap de les tres proteïnes que s'ha descrit que immunoprecipiten amb Cgs1. L'anticòs anti-tiofosfat ester, aquest pot ser utilitzat en IP. Es podria realitzar una immunoprecipitació amb aquest anticòs després de realitzar l'assaig quinasa per passar el resultat per l'espectròmetre de masses i identificar tant la proteïna com el residu fosforilat.

2.2. Ckk2 i Int6.

S'ha analitzat la viabilitat de l'absència de Ckk2 i Int6 en condicions d'estrès de calci que causa l'activació de Ckk2 i en deprivació de glucosa per observar les interaccions genètiques. No s'ha analitzat en deprivació nutricional de nitrogen o de glucosa en medi mínim perquè les soques *Δint6* tenen un creixement molt reduït en medi mínim (Akiyoshi *et al.*, 2001).

2.2.1. Int6 en estrès de calci.

La soca *Δint6* presenta una reducció de la viabilitat en estrès de calci. Això ens indica que la formació de eIF3 a través de la subunitat Int6 és necessària per la resposta a calci, possiblement perquè sintetitza proteïnes

DISCUSSION

necessàries que contribueixen a aquesta resposta. El doble mutant $\Delta int6 \Delta cck2$ no mostra diferències amb el fenotip observat en el mutant simple $\Delta int6$ en la resposta a calci. Per tant, la funció de Int6 és dominant, ja que l'eliminació de Int6 en una soca $\Delta cck2$ reverteix el fenotip de resistència a calci que s'observa en el mutant simple.

S'ha determinat que la interacció genètica de Int6 i Cck2 seria independent de la interacció entre Cck2 i Cmk1, ja que en el doble mutant $\Delta int6 \Delta cmk1$ s'observa un fenotip intermedi entre els dos mutants simples $\Delta int6$ i $\Delta cmk1$. Per tant, és possible que Int6 i Cck2 puguin formar part de la mateixa via amb independència de Cmk1.

Hem observat que l'activació de Cck2 per calci no causa canvis ni modificacions post-traduccionals en la proteïna Int6, ja que en la soca $\Delta cck2$ no s'observen diferències respecte a la soca wt. Així, Cck2 no participa en la regulació dels nivells de proteïna Int6.

L'anàlisi de l'efecte de Cck2 sobre l'activitat traduccional de Int6 ens ha indicat que l'absència de Cck2 no afecta a la traducció del substrat escollit Atf1. No obstant, s'ha observat la reducció de Atf1 en absència de Int6, com ja s'havia descrit, i una reducció encara major en estrès de calci. Aquest resultat ens indica que Int6 s'encarrega de mantenir els nivells de proteïna Atf1 en aquestes condicions. Aquests resultats semblen indicar que Cck2 no estaria regulant l'activitat de Int6, al menys a nivell de Atf1. Faltaria identificar altres substrats.

2.2.2. Int6 i la resposta a glucosa.

Int6 és imprescindible per la resposta a la privació de glucosa, ja que la seva absència causa una reducció de la viabilitat tant en cèl·lules wt com $\Delta cck2$.

Els nivells de Int6 en resposta a la privació de glucosa romanen constants. És cert que s'observa un aparent increment en la soca $\Delta cck2$ a concentracions més reduïdes de glucosa que no són significatives. El fet

que els nivells de Int6 és mantinguin tant constants potser facilita que la cèl·lula sigui capaç de respondre més ràpidament a l'estrès.

2.2.3. Està regulada Ckk2 per Int6?

S'ha analitzat si els nivells de Ckk2 podrien estar regulats per Int6 de la mateixa manera que els de la proteïna Atf1. No obstant, s'ha observat en la soca $\Delta int6$ que Ckk2 presenta un increment dels nivells. Tot i el resultat contradictori, s'ha descrit que Int6 també participa en la funció del proteosoma (Yen *et al.*, 2003). Per tant, és possible que els nivells de Ckk2 es vegin incrementats en el mutant $\Delta int6$ per una menor activitat del proteosoma. El tractament amb bortezomib, un inhibidor del proteosoma, també causa un increment en els nivells de Ckk2. Per tant, és possible que Int6 estigui regulant els nivells de Ckk2 a través de la funció proteosòmica. Per acabar de comprovar-ho, s'hauria d'analitzar si hi ha variació en els nivells de Ckk2 d'una soca $\Delta int6$ tractada amb bortezomib.

2.2.4. Assaig quinasa de Int6.

Com en el cas de Cgs1, tampoc s'ha identificat la fosforilació de Int6 per part de Ckk2-as. El que s'ha identificat és una banda a una alçada d'entre 37 i 50 kDa, que es fosforila depenent de Ckk2-as. Les proteïnes que s'han detectat amb una interacció física amb Int6 a la bibliografia s'indiquen a la taula D2.

De les proteïnes presents a la taula, les que es troben en el rang que hem identificat són Tif308, Tif313 i Cwf2.

El factor eIF3 forma dos tipus de complex diferents a *S. pombe*: un del que forma part Int6 i un altre format per les proteïnes Tif308 (eIF3h) i Tif313 (eIF3m). L'estudi en el que s'ha identificat Tif308 i Tif313 com a interactors físics de Int6 es basa en la immunoprecipitació d'una subunitat comuna dels dos complexos, però no es van identificar quan es va

DISCUSSIÓ

immunoprecipitar Int6 (Zhou *et al.*, 2005). Per aquest motiu, crec que es pot descartar que siguin qualsevol d'aquestes dues proteïnes.

Proteïna	Mida
Rpn15	8 kDa
Rpn10	27 kDa
Fic1	31 kDa
Rpn12	31 kDa
Tif307	31.49 kDa
Tif306	33.25 kDa
Sum1	36.81 kDa
Tif308	40 kDa
Cwf2	44.28 kDa
Tif313	45 kDa
Rpt2	50 kDa

Proteïna	Mida
Rpn502	51.62 kDa
Moe1	62.64 kDa
Paa1	67 kDa
Far8	69.49 kDa
Ssa2	70 kDa
Tif302	84.03 kDa
Mts4	98 kDa
Scd1	99 kDa
Tif303	104 kDa
Fft3	104 kDa
Tif301	107 kDa

Taula D2. Proteïnes que interaccionen físicament amb Int6. Dades extretes de PomBase.

Cwf2 es part de l'*spliceosoma*, un complex nucleat per la proteïna Prp19 que s'encarrega de l'eliminació d'introns del RNA missatger i Int6 es una de les proteïnes que co-precipita amb Cwf2 (Ren *et al.*, 2011). El possible paper de la interacció entre Cwf2 i Ckk2 serà analitzat en el capítol 3.

2.3. Ckk2 i Gad8.

Descrita la seva activitat com a principal efector de TORC2, ens va semblar interessant establir si Gad8 podria estar regulada per Ckk2 per modular d'alguna manera la senyalització exercida a través de TORC2.

En treballs anteriors, s'ha descrit la seqüència consens que es trobaria en les quinases substrat de Ckk2. La seqüència consens (LXTXCG[T/S]PXY) es troba en el bucle catalític (Yance-Chávez, 2015). A l'alignar la seqüència de Gad8 amb la de substrats ja descrits per les CaMKK com Cmk1 de *S. pombe* i CaMKI de *H. sapiens*, es va identificar el residu T387 de Gad8 com el residu que coincideix amb la treonina de la seqüència consens.

S'ha observat una gran fosforilació del residu T387 en resposta a l'estrès de calci. L'absència de Ckk2 causa una lleugera reducció en la fosforilació de T387, però no una depleció total. Aquest residu també es fosforilat per Ksg1 (Matsuo *et al.*, 2003), així que aquesta petita reducció podria ser causada perquè, o bé Ckk2 podria estar fosforilant de manera redundant aquest residu o perquè podria estar influent en l'activitat de Ksg1.

La deleció de components de la via TORC2 com Gad8 o Tor1 generen sensibilitat a l'estrès de calci que no és depenent de la presència de Ckk2, encara que si que és cert que $\Delta gad8 \Delta ckk2$ mostra un lleuger increment de la viabilitat en comparació amb el mutant simple però no un fenotip intermedi. Una explicació a la sensibilitat per calci podria ser causada perquè TORC2 és necessari per la integritat de la vacuola (Tatebe *et al.*, 2010). Les vacuoles tenen bombes de calci com Pmc1 que són necessàries per la viabilitat de la cèl·lula en estrès per calci (Deng *et al.*, 2006). Per tant, és possible que la pèrdua d'integritat de les vacuoles per la mutació de TORC2 faci que Pmc1 no funcioni bé, i esdevingui més sensible a l'estrès de calci.

Com havíem observat que la sensibilitat de $\Delta gad8$ és més elevada que la de $\Delta tor1$ i que Ckk2 podria estar fosforilant Gad8 quan és activada per calci, es va analitzar l'efecte de l'absència de fosforilacions en Gad8 i la interacció amb Ckk2 en estrès de calci. La sensibilitat de *ksg1-208* era més elevada que la de *gad8-T387A*, indicant que Ksg1 participa en la resposta a calci a través de Gad8 i una altra quinasa, possiblement a través de Pka1, ja que hem demostrat que també presenta sensibilitat al mateix estrès. D'altra banda, els dobles mutants amb $\Delta ckk2$ mostren un fenotip de sensibilitat intermèdia mostrant-nos que afecten a la resposta de manera independent. També es possible que l'efecte de Ckk2 sobre Gad8 es produeix en un altre residu que en ser fosforilat per aquesta causi la menor fosforilació de T387.

En l'anàlisi del residu fosforilat per Tor1, la soca *gad8-S546A* presenta una sensibilitat moderada al calci, i la deleció de Ckk2 en aquest background

DISCUSSIÓ

dona lloc a un fenotip intermedi entre els dos mutants simples, per tant, les vies són independents.

2.3.1. Gad8 i la deprivació nutricional.

L'anàlisi de la fosforilació del residu T387 no ha mostrat canvis de fosforilació en deprivació de glucosa o de nitrogen i tampoc depenen de l'activitat de la Ckk2.

En canvi, en la fosforilació de S546 s'observen dos comportaments diferents. Primer, en deprivació a glucosa, s'ha constatat que la fosforilació d'aquest residu s'elimina durant els primers 15 minuts però després retorna la senyalització. El retorn d'aquesta senyalització, però, es produeix de manera més ràpida en la soca $\Delta ckk2$ que a la soca salvatge. En segon lloc, en deprivació de nitrogen, s'han observat fluctuacions en els nivells de fosforilació de S546 durant les dues primeres hores de deprivació, amb un comportament similar tant a la soca salvatge com a la soca $\Delta ckk2$.

El nivell de fosforilació del residu S546 dirigeix la diferenciació sexual. La fosforilació d'aquest residu es troba elevada en la soca $\Delta ckk2$ i s'ha observat també que l'absència de *ckk2* causa un increment de la diferenciació. Podria ser que, la major fosforilació de S546 en la soca $\Delta ckk2$ sigui la responsable de l'augment de la diferenciació sexual? La mutació que evita la fosforilació d'aquest residu, *gad8-S546A* $\Delta ckk2$, era capaç de revertir l'increment de diferenciació observat i presentava un fenotip similar al de la mutació *gad8-S546A*. Aquest resultat indicaria que Ckk2 podria ser un regulador negatiu de la meiosi en deprivació de nitrogen a través del control de la fosforilació del residu S546.

Però com es realitza aquest control encara ho desconeixem. Aquest residu està controlat per fosforilació per Tor1, i per defosforilació a través de la fosfatasa PP2A (Martín *et al.*, 2017). Una possibilitat seria que Ckk2 fos un regulador negatiu de l'activitat de Tor1 en condicions de deprivació de

nitrogen i, per això, la falta de Ckk2 causaria una sobre-activació de Tor1 en aquestes condicions que es traduiria en una major senyalització de S546. Una altra opció seria que Ckk2 inhibís la funció de la PP2A, de manera que la defosforilació del residu S546 no es produiria i els nivells de fosforilació es mantindrien alts. De fet, l'eliminació de qualsevol de les subunitats de la fosfatasa PP2A Pab1 i Ppa2 (Martín *et al.*, 2017) (Laboucarié *et al.*, 2017) causa l'aparició d'un fenotip de major diferenciació sexual. Creiem que la millor manera de comprovar si es tracta d'una menor activitat fosfatasa seria comparar la fosforilació del residu S546 entre les soques wt, $\Delta ckk2$, $\Delta pab1$ i $\Delta ckk2 \Delta pab1$. Si aquesta possibilitat fos certa, la fosforilació hauria de ser similar en les tres soques mutants. Però si en el doble mutant s'observés una major fosforilació, podria ser degut a que com la senyalització de Tor1 està sobre-activada i l'activitat fosfatasa reduïda, s'observés aquest major increment, i podria ser una altra evidència de que Ckk2 podria estar inhibint Tor1. Si s'observa aquest increment de la fosforilació, també s'observarà a nivell de diferenciació sexual en el doble mutant. En conclusió, encara faltaria saber si Ckk2 afecta a la fosforilació d'aquest residu a través de PP2A, Tor1 o de manera independent.

L'anàlisi de les interaccions genètiques en deprivació de glucosa ens va permetre observar que la viabilitat de *ksg1-208* es redueix, però s'observa una major reducció en el mutant *gad8-T387A*. Aquest resultat és diferent de l'observat en altres treballs on un mutant de Ksg1 ha demostrat ser sensible a concentracions més elevades que les utilitzades (Saitoh *et al.*, 2014). No es coneix exactament quina soca *ksg1* mutant van utilitzar en aquest estudi, però també l'assaig de viabilitat ha tingut lloc a una temperatura diferent, el nostre a 25°C mentre que el seu a 30°C. Podria ser que el creixement del seu mutant *ksg1-208* es veiés interromput per l'exposició a la temperatura de 30°C i s'hagi identificat com sensible quan no ho era. O pot ser que les nostres condicions siguin massa permissives. En qualsevol cas, si els nostres resultats fossin correctes, indicarien que

DISCUSSIÓ

aquest residu seria fosforilat per un altre quinasa, que segurament no seria Ckk2, ja que el doble mutant *ksg1-208 Δckk2* no presenta reduccions de viabilitat comparat amb *ksg1-208*.

La sensibilitat de la mutació del residu S546 a la deprivació de glucosa no es tan elevada, possiblement perquè la senyalització per Tor1 es realitza per una altra fosforilació en el residu S527, i com la quinasa continua catalíticament activa, no causa una gran reducció de la viabilitat. La impossibilitat de fosforilar el residu S546, fa que la presència de Ckk2 en aquesta resposta sigui innecessària, i per tant, el doble mutant *gad8-S546A Δckk2* presenta el mateix fenotip que el mutant *gad8-S546A*.

Si es confirma que Ckk2 regula la fosforilació de Gad8 al residu S546, s'ha de tenir en compte que seria una altra proteïna, regulada per TORC1, que estaria intervenint en la senyalització de TORC2 i una altra evidència del cross-talk que es produeix entre els dos complexos. Els pròxims passos a seguir haurien de ser esbrinar si la fosforilació d'aquest residu per part de Ckk2 està regulada a través de la PP2A, Tor1 o de manera independent.

2.4. Anàlisi de l'assaig de fosfoproteòmica.

En l'assaig de fosfoproteòmica, s'han identificat tots aquells residus que estaven fosforilats en la soca wt i no es trobaven fosforilats a la soca *Δckk2* en les mateixes condicions de cultiu. Aquests residus identificats són possibles substrats de Ckk2 en les condicions analitzades.

Primer de tot, s'han intentat validar els substrats que s'havien identificat inicialment en el primer assaig de fosfopèptids. S'han identificat fosforilacions en Cgs1, Pka1 i Gad8, però no en Int6 però aquestes fosforilacions identificades no tenien la mateixa significança estadística que altres que descriurem en l'apartat següent.

2.4.1. Nous substrats interessants identificats.

Del llistat obtingut, hem seleccionat dianes que creiem que poden ser interessants per discutir i hipotetitzar la seva relació amb Ckk2.

Cwf2

S'ha associat Cwf2 a una banda situada prop dels 40 kDa en l'assaig quinasa de la immunoprecitació de Int6. Cwf2 forma part del spliceosoma amb la proteïna Prp19, que s'encarrega del splicing del RNA missatger (Ohi & Gould, 2002). La seva funció és unir molècules petites de RNA al spliceosoma, ja que conté dominis *zinc finger* i de reconeixement del RNA (McGrail *et al.*, 2009). Una altra proteïna del complex, Cdc5, s'encarrega d'apropar el RNA al centre catalític del spliceosoma (Collier *et al.*, 2014).

L'assaig de fosfo-proteòmica ha identificat Cwf2 com un possible substrat de Ckk2 en absència d'estrès, sent fosforilada en el residu T349 en una regió prop de l'extrem C-terminal. No s'han detectat fosforilacions en altres subunitats del complex com Prp19 ni Cdc5. La deleció de Cwf2 a *S. pombe* resulta inviable (Hayles *et al.*, 2013) però encara no s'han generat mutants termosensibles viables per analitzar les interaccions genètiques entre Cwf2 i Ckk2. En mamífers, s'ha observat que l'activitat de l'ortòleg de Cwf2, Rbm22, pot dependre de la senyalització pel calci (Krebs, 2009). No obstant, encara no s'han descrit interaccions entre CaMKK ni Rbm22. El fet que l'activitat de l'ortòleg de Cwf2, Rbm22, depengui de calci, podria indicar que la de Cwf2 també en podria dependre. En aquest sentit, l'activació per calci de Ckk2 podria estar modulant l'activitat de Cwf2.

Kin1

Hem observat fins a 7 residus fosforilats de Kin1 en resposta a estrès de calci. Els residus fosforilats són els següents: S68, S91, S531, S532, S535, S598 i S741. Aquestes fosforilacions no es troben dins de dominis funcionals de la seqüència de Kin1, tot i que la fosforilació en el residu S91

DISCUSSION

ja s'ha identificat en un assaig de fosfo-proteòmica de Cdc2 (Swaffer *et al.*, 2016).

Kin1 es una quinasa de la família de les MARK (*Microtubule Affinity Regulating Kinase*) que està coordinada amb les quinases Pom1 i Ssp1 per controlar la divisió cel·lular i la citocinesi (Lee *et al.*, 2018). També regula l'organització dels microtúbuls, doncs la sobre-expressió de Kin1 causa perturbacions dels microtúbuls durant el creixement bipolar (La Carbona *et al.*, 2004). A *S. pombe* no s'ha identificat encara cap interacció amb Ckk2, però en mamífers està descrita la fosforilació de la proteïna homòloga de Kin1, MARK2, en la reorganització dels microtúbuls necessària per l'elongació de les neurites per la via CaMKK/CaMKI (Uboha *et al.*, 2007).

En aquest treball hem observat com en resposta a una droga que altera l'estabilitat dels microtúbuls com el tiabendazol, les soques $\Delta ckk2$ i $\Delta cmk1$, mostren una major viabilitat amb respecte a la soca salvatge. Una possible explicació a aquesta resistència seria que la via Ckk2-Cmk1 estigués fosforilant Kin1 per inhibir la citocinesi en resposta al tractament amb tiabendazol. La generació del doble mutant $\Delta ckk2 \Delta kin1$, ens podria servir per aclarir si es tracta d'aquesta situació.

Shd1

Shd1 és una proteïna amb la que no s'ha treballat molt a *S. pombe*. Un dels pocs treballs que la menciona situa la seva localització al "patch" cortical d'actina (Basu & Chang, 2011). A *S. cerevisiae*, Sla1 (homòloga de Shd1) té un paper coordinant la remodelació del citoesquelet d'actina i l'endocitosi (Warren *et al.*, 2002).

Hem identificat la fosforilació de Shd1 en condicions d'estrès de calci i en condicions de privació de nitrogen. Concretament, s'han identificat 7 residus fosforilats en estrès de calci, dels quals la fosforilació del residu T278, és causada per la Cdc2, però de les altres (S306, S919, S927, T928, T984 i T1152) no s'en sap la causant. En privació de nitrogen, on hem

observat la reducció dels *patches* d'actina, s'observen 4 fosforilacions (S298, S461, T923 i T928). Comparant les dues condicions, la de la posició T928 es repeteix, però la alineació amb la seqüència de *S. cerevisiae*, ens diu que la fosforilació en aquesta posició no estaria conservada.

És possible que Ckk2 tingui un paper en la fosforilació de Shd1 ja que, s'ha observat un fenotip de formació de *patches* d'actina més petits en resposta a la deprivació de nitrogen i hem identificat dianes de fosforilació en aquestes mateixes condicions. Potser la funció de Ckk2 en deprivació de nitrogen seria fosforilar Shd1 per mantenir la formació dels *patches* d'actina al còrtex.

Taf12

Taf12 forma part del complex SAGA, que s'encarrega de controlar l'expressió gènica en situacions de proliferació segons la disponibilitat de nutrients. La fosforilació de Taf12 està lligada a la inhibició de la diferenciació sexual en les primeres etapes de la deprivació nutricional, fins a una situació en que la cèl·lula considera que ja ha estat prou temps en deprivació com per iniciar la diferenciació. La fosforilació de la que parlem es produeix en tres residus T218, T221 i T283 per Gad8 en els primers instants de la deprivació, i després s'elimina per la fosfatasa PP2A quan comença el procés de conjugació (Laboucarié *et al.*, 2017).

En l'assaig de fosfo-proteòmica, s'ha identificat la fosforilació de Taf12 en el residu T242 en condicions de deprivació de nitrogen. Cal tenir en compte però, que les nostres condicions de cultiu són de deprivació de nitrogen durant 24 hores, i és possible que aquesta fosforilació s'hagi produït després del cross-talk entre Gad8 i PP2A, o que aquesta fosforilació pugui intervenir en aquest procés.

També hem identificat el residu T221, en condicions d'estrès de calci, però és possible que aquesta fosforilació observada sigui deguda a l'activitat de Gad8 en aquestes mateixes condicions, ja que la seva funció és necessària per mantenir la viabilitat en estrès de calci. És possible que la fosforilació

DISCUSSIÓ

de Taf12 en resposta a calci es produeixi per mantenir la diferenciació sexual inhibida o pot ser per regular l'expressió gènica de gens que participin en la resposta a l'estrès de calci. En altres treballs (Laboucarié et al., 2017), s'ha generat un mutant (*taf12-5A*) en el que s'evita la fosforilació d'aquest residu i 4 més. Generar un doble mutant *taf12-5A* amb $\Delta ckk2$ o $\Delta gad8$, ens podria ajudar a distingir quina de les dues proteïnes està afectant Taf12, i el mutant *taf12-5A* ens indicaria si la fosforilació en aquestes posicions es necessària per la resposta a l'estrès de calci.

Sds23

Sds23 es un inhibidor de la fosfatasa PP2A. La seva funció inhibidora és important per mantenir la simetria durant la divisió cel·lular (Schutt & Moseley, 2019). La inhibició de PP2A es produeix mitjançant la unió de Sds23 amb la subunitat Paa1 de la PP2A (Yanagida et al., 2011). Quan Sds23 inhibeix l'activitat fosfatasa de PP2A, la fosforilació de Gad8-S546 queda sobre-activada i s'observa una major diferenciació sexual (Sun et al., 2013).

Nosaltres hem observat que la soca $\Delta ckk2$ presenta una major fosforilació de Gad8 en el residu S546 i que mostra una major diferenciació sexual. Hem identificat durant l'assaig de fosfo-proteòmica la fosforilació de Sds23 en el residu S329 en condicions sense estrès, i en condicions de deprivació de nitrogen les hem detectat en els residus S399 i S402. Aquestes fosforilacions ja havien sigut descrites en cèl·lules wild-type però no s'havia determinar qui era el causant (Hanyu et al., 2009).

Tenint en compte les observacions anteriors, és possible que la fosforilació de Sds23 per part de Ckk2 causi la seva inhibició. Com hem explicat en l'apartat anterior, un dels successos que explicaria la major fosforilació de S546 seria que PP2A estigués inhibida. En absència de Ckk2 aleshores, Sds23 estaria produint una major inhibició de la PP2A i per això, s'observaria una major fosforilació de S546. Per demostrar això, la

fosforilació de S546 i la diferenciació sexual en el doble mutant $\Delta sds23 \Delta ckk2$ s'hauria de reduir tal com hauria de passar en el mutant simple $\Delta sds23$.

2.4.2. Desavantatges d'aquest mètode i alternatives.

El principal desavantatge d'aquest mètode és que no permet la identificació únicament dels substrats directes, si no que també pots detectar molts substrats indirectes. La manca d'activitat quinasa de Ckk2 pot causar una alteració en els seus substrats que alteri les proteïnes que es troben immediatament *downstream* d'aquests, de manera que es poden acabar identificant com no fosforilats en absència de Ckk2.

Una alternativa que es podria fer servir per detectar nous substrats de Ckk2 és aprofitar la tecnologia de les quinases *analog sensitive*. Es poden generar varietats de quinases analog-sensitive *in vivo* a *S. pombe* que es poden utilitzar per realitzar assajos de fosfo-proteòmica i ja s'han fet servir en altres treballs per identificar substrats de proteïnes quinases (Lee *et al.*, 2018). En aquest treball hem fet aquestes mutacions en un plasmidi per purificar la proteïna Ckk2-as i realitzar assajos quinasa *in vitro*. Es podria obtenir un extracte de cultiu en diferents condicions i realitzar un assaig quinasa amb la Ckk2-as. L'anticòs que detecta el grup tiofosfat ester, es pot utilitzar en immunoprecipitacions. L'anàlisi de l'immunoprecipitat per espectrometria de masses podria revelar nous substrats de la Ckk2.

3. Ckk2 i el citoesquelet.

La formació dels microfilaments d'actina ha sigut observada pel microscopi mitjançant el marcador fluorescent mCherry fusionat al gen de l'actina. Aquesta proteïna, en condicions de creixement òptim es pot identificar com cables, unes fibres que s'allarguen per tota la longitud de la cèl·lula; o com nòduls presents prop del còrtex (*actin cortical patches*) (Moseley & Goode,

DISCUSSIÓ

2006). La formació d'aquestes estructures és similar en les soques wt i $\Delta ckk2$. Però quan es depriva de nitrogen les cèl·lules, com s'atura la divisió i les cèl·lules es tornen petites i rodones, l'actina es distribueix per tot el còrtex (per la polaritat de la cèl·lula). No obstant, a la soca $\Delta ckk2$, la disposició dels *patches* canvia, fent-se més petits, més nombrosos i menys intensos. Aquest fenomen sembla indicar que Ckk2 participaria en el manteniment d'aquests *patches* en la resposta a la privació de nitrogen. La funció d'aquests *patches* no seria important per mantenir la viabilitat en resposta a la privació de nitrogen. De més de 500 gens necessaris en la viabilitat de fase G_0 , només 1 dels 52 gens que formen part del *patch* cortical d'actina i 5 dels 85 gens que participen en l'endocitosi, mostren fenotips de pèrdua de viabilitat en fase G_0 , segons la base de dades PomBase.

En resposta a latrunculina B, les cèl·lules $\Delta ckk2$ no mostren grans alteracions en el citoesquelet d'actina, però si mostren un menor índex de septació que indicaria un menor ritme de divisió cel·lular i una major proporció de cèl·lules amb 4 nuclis, indicant que potser hi ha hagut alguna desregulació del cicle cel·lular. A més, els nivells de Ckk2 en resposta a latrunculina no varien, indicant que l'expressió de Ckk2 no està regulada per la funció del citoesquelet.

La desregulació del cicle cel·lular ja s'havia descrit en mutants de la fosfatasa Clp1, que inhibeix la divisió en resposta a les pertorbacions del citoesquelet causades per latrunculina, observant-se cèl·lules multinucleades (Mishra *et al.*, 2004). En les cèl·lules $\Delta ckk2$, la proporció de cèl·lules amb 4 nuclis és significativament superior a la observada en la soca wt. Per tant, Ckk2 podria estar evitant la desregulació del cicle en resposta a latrunculina B.

3.1. Ckk2 i l'endocitosi.

En l'assaig de fosfo-proteòmica s'ha observat una sobre-representació de proteïnes implicades en la formació de *patches* d'actina al còrtex i en l'endocitosi. La latrunculina B està implicada en la inhibició de l'endocitosi, com demostra la no absorció del colorant FM4-64 després d'afegir latrunculina B a una concentració de 10 μ M (Gachet & Hyams, 2005). S'ha volgut comprovar si la latrunculina causava sensibilitat en la soca $\Delta ckk2$ a través de la funció endocítica.

Una aproximació ràpida ha estat afegir sorbitol, que s'utilitza per reduir la pressió de turgència i s'associa a la facilitació dels processos d'endocitosi (Proctor *et al.*, 2012). La pressió de turgència és la força de la cèl·lula que empeny la membrana plasmàtica contra la paret cel·lular. Aquesta força està causada pel flux osmòtic d'aigua i només té lloc en cèl·lules que tenen paret cel·lular. A *S. pombe*, la mesura d'aquesta pressió oscil·la prop d'1 MPa, comparat pels investigadors que ho han mesurat amb la pressió dins la roda d'una bicicleta de carreres (Basu *et al.*, 2014). Una pressió d'aquestes característiques necessita d'una gran força per generar invaginacions de la membrana, successos que ocorren quan es genera el septe durant la citocinesi o en l'endocitosi. L'addició de sorbitol causa una reducció de la pressió de turgència i facilita la formació del septe (Proctor *et al.*, 2012). També el mateix tractament de sorbitol és capaç de rescatar l'endocitosi en alguns mutants endocítics (Basu *et al.*, 2014).

S'ha observat que l'addició de sorbitol és capaç de revertir la sensibilitat a latrunculina i permet que la soca $\Delta ckk2$ creixi de manera similar a la soca wt. Per tant, el fet que la reducció de la pressió de turgència millora la viabilitat de $\Delta ckk2$ ens indica que podria estar implicat en l'endocitosi.

No sabem si la implicació de Ckk2 seria essencial per l'endocitosi ni com hi estaria relacionada ni si aquest procés és específic d'una condició. En els *patches* corticals d'actina, es troben proteïnes com *Shd1*, que interaccionen amb molècules que regulen la organització dels

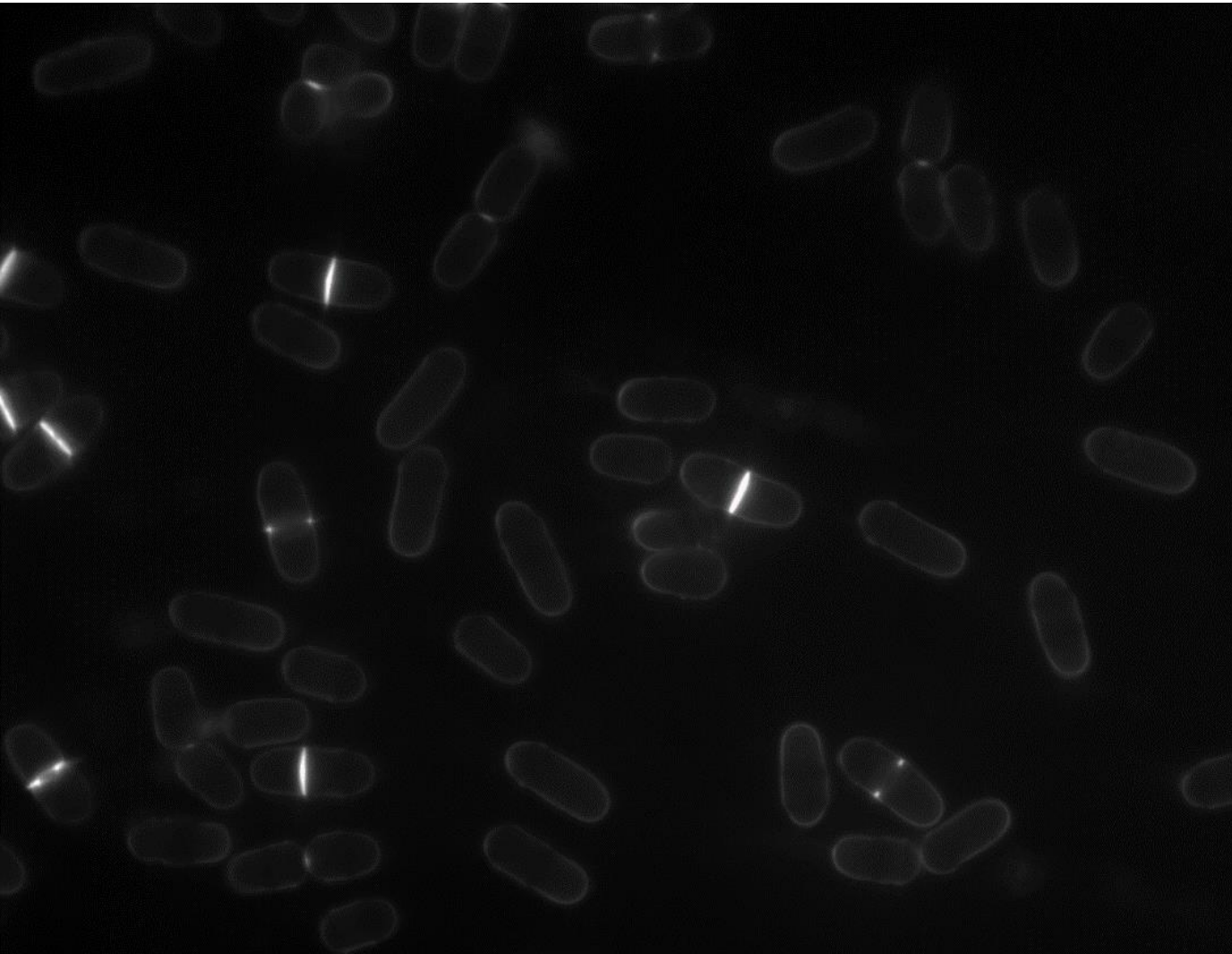
DISCUSSION

microfilaments d'actina i molècules que participen en l'endocitosi, sent la seva funció imprescindible per la coordinació dels dos processos (Warren *et al.*, 2002). Shd1 és un dels substrats identificats en l'assaig de fosfo-proteòmica d'aquest treball. Per tant, és possible que Ckk2 estigui participant en la formació dels patches o en l'endocitosi.

Com no s'han observat alteracions significatives en els microfilaments d'actina en la soca $\Delta ckk2$, seria possible que la sensibilitat sigui causada per alteracions en l'endocitosi. Hi ha gens implicats en l'endocitosi a *S. pombe* com Fim1, que també s'ha identificat com un component del patch cortical d'actina, que mostren sensibilitat a latrunculina (Chen *et al.*, 2016); o Cdc15, que participa en l'endocitosi mediada per clatrina però no és un component del *patch*, i la deleció parcial del gen causa sensibilitat a latrunculina (Mangione *et al.*, 2019).

Una altra proteïna identificada com a substrat seria Cdc15. Cdc15 és una proteïna que en l'assaig de fosfo-proteòmica hem identificat fosforilada fins a 10 vegades en condicions de privació de nitrogen en els residus S755, S763, S490, S493, S617, T440, S632, S535, S689, S693. Els *patches* d'actina en cèl·lules amb una expressió de Cdc15 reduïda acumulen menys actina (Arasada & Pollard, 2011), un fenomen similar al que hem observat en les cèl·lules $\Delta ckk2$ en privació de nitrogen. Aquest fet i la identificació de tants residus fosforilats ens porten a suggerir que, l'activitat quinasa de Ckk2 sobre Cdc15 podria ser necessària per una acumulació suficient d'actina en aquests *patches*. També s'ha observat que les mutacions en Cdc15 causen errors en la citocinesi donant lloc a cèl·lules allargades i multinucleades (Wachtler *et al.*, 2006) i la deleció parcial de Cdc15 causa un fenotip de sensibilitat a Latrunculina, tal com s'ha observat en la soca $\Delta ckk2$.

CONCLUSIONS

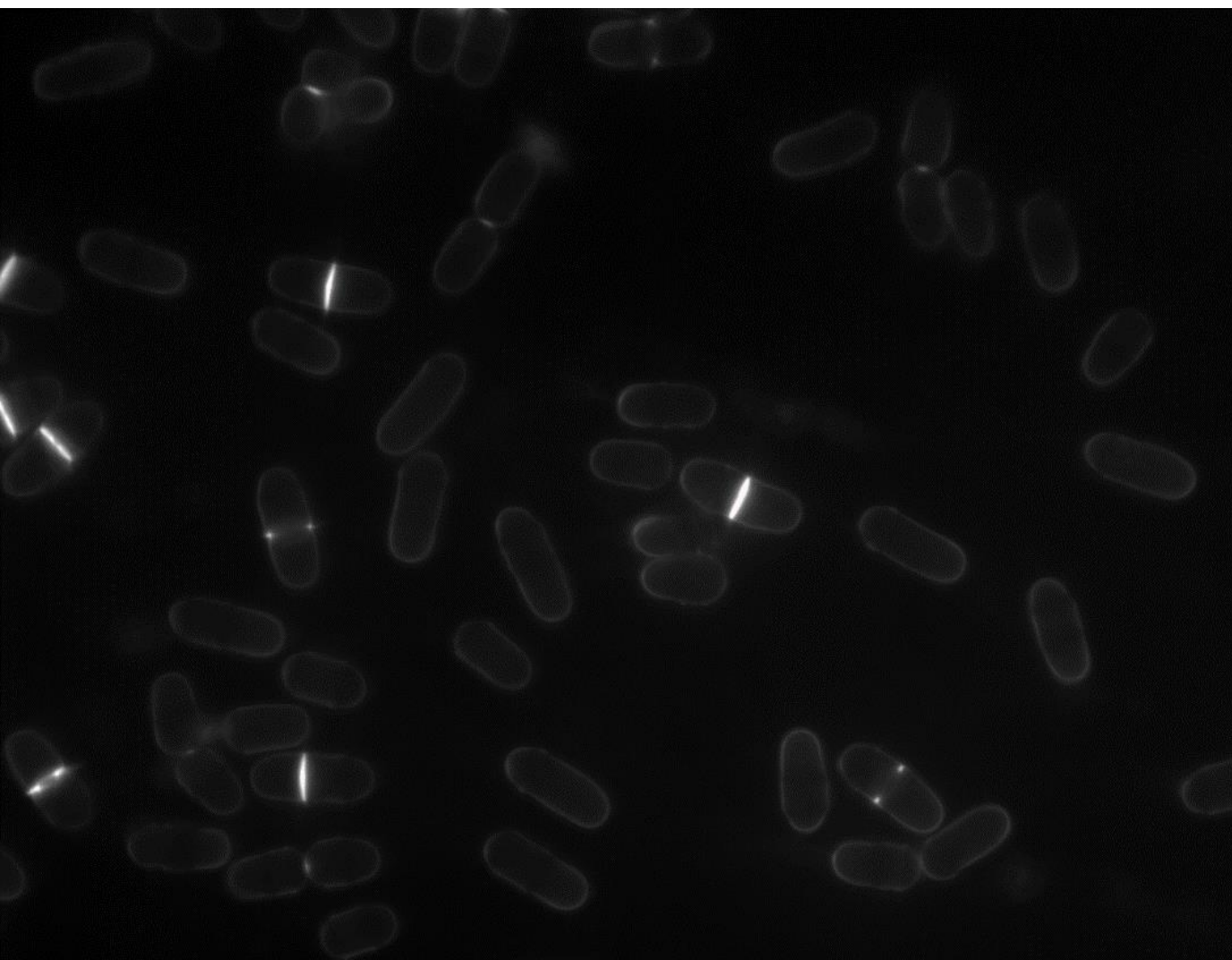


Conclusions

En aquest treball, hem determinat que:

- La quinasa Ckk2 no és necessària per la supervivència en privació de nitrogen, però sí en condicions de privació de glucosa i restricció calòrica.
- La modificació post-traduccional de Ckk2 observada en privació de nitrogen no és una sumoilació.
- L'expressió de Ckk2 està regulada positivament pel factor de transcripció Gaf1 en condicions de privació de nitrogen.
- En condicions normals, l'expressió de Ckk2 està regulada negativament per TORC1 i TORC2.
- S'ha realitzat una mutació a Ckk2 que la converteix en una quinasa *analog sensitive* capaç de fosforilar substrats de Ckk2 com, Cmk1.
- Ckk2 no és responsable directe de la fosforilació de Cgs1 i Int6, però sí que fosforila proteïnes que co-precipiten amb aquestes.
- La doble deleció de *ckk2* i *pka1* genera un mutant sintètic letal en condicions d'estrès de calci i de privació de glucosa.
- Int6 és necessària per la síntesi de proteïnes com Atf1 en la resposta a estrès de calci.
- Ckk2 participa en la regulació negativa de la fosforilació del residu S546 de Gad8.
- En el nou assaig de fosfoproteòmica, s'ha identificat una sobre-representació de proteïnes implicades en la formació dels agregats corticals d'actina, transducció de senyal, endocitosis i regulació de la transcripció, entre les categories més freqüents.
- Ckk2 està implicat en la formació dels agregats corticals d'actina en privació de nitrogen.
- Ckk2 podria tenir un paper en el procés d'endocitosis.

BIBLIOGRAFIA



Bibliografia

Ahamad, N., Sharma, T., Khan, S., Siddiqi, M. I., & Ahmed, S. (2018). Phosphorylation of Wat1, human Lst8 homolog is critical for the regulation of TORC2 -Gad8 dependent pathway in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *European journal of cell biology*, 97(4), 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2018.04.006>

Akiyoshi, Y., Clayton, J., Phan, L., Yamamoto, M., Hinnebusch, A. G., Watanabe, Y., & Asano, K. (2001). Fission yeast homolog of murine Int-6 protein, encoded by mouse mammary tumor virus integration site, is associated with the conserved core subunits of eukaryotic translation initiation factor 3. *The Journal of biological chemistry*, 276(13), 10056–10062. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010188200>

Alao, J. P., Huis In 't Veld, P. J., Buhse, F., & Sunnerhagen, P. (2010). Hyperosmosis enhances radiation and hydroxyurea resistance of *Schizosaccharomyces pombe* checkpoint mutants through the spindle checkpoint and delayed cytokinesis. *Molecular microbiology*, 77(1), 143–157. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07193.x>

Aleman, V., Sanchez-Piris, M., Bachs, O., & Aligue, R. (2002). Cmk2, a novel serine/threonine kinase in fission yeast. *FEBS letters*, 524(1-3), 79–86. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03006-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03006-5)

Allen, J. J., Li, M., Brinkworth, C. S., Paulson, J. L., Wang, D., Hübner, A., Chou, W. H., Davis, R. J., Burlingame, A. L., Messing, R. O., Katayama, C. D., Hedrick, S. M., & Shokat, K. M. (2007). A semisynthetic epitope for kinase substrates. *Nature methods*, 4(6), 511–516. <https://doi.org/10.1038/nmeth1048>

Alvarez, B., & Moreno, S. (2006). Fission yeast Tor2 promotes cell growth and represses cell differentiation. *Journal of cell science*, 119(Pt 21), 4475–4485. <https://doi.org/10.1242/jcs.03241>

Anderson, K. A., Ribar, T. J., Lin, F., Noeldner, P. K., Green, M. F., Muehlbauer, M. J., Witters, L. A., Kemp, B. E., & Means, A. R. (2008). Hypothalamic CaMKK2 contributes to the regulation of energy balance. *Cell metabolism*, 7(5), 377–388. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.02.011>

Arasada, R., & Pollard, T. D. (2011). Distinct roles for F-BAR proteins Cdc15p and Bzz1p in actin polymerization at sites of endocytosis in fission yeast. *Current biology : CB*, 21(17), 1450–1459. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.07.046>

Armson, A., Grubb, W. B., & Mendis, A. H. (1995). The effect of electron transport (ET) inhibitors and thiabendazole on the fumarate reductase (FR) and succinate dehydrogenase (SDH) of *Strongyloides ratti* infective (L3) larvae. *International journal for parasitology*, 25(2), 261–263. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(94\)e0061-g](https://doi.org/10.1016/0020-7519(94)e0061-g)

Asadi, F., Michalski, D., & Karagiannis, J. (2016). A Genetic Screen for Fission Yeast Gene Deletion Mutants Exhibiting Hypersensitivity to Latrunculin A. *G3 (Bethesda, Md.)*, 6(10), 3399–3408. <https://doi.org/10.1534/g3.116.032664>

Asp, E., & Sunnerhagen, P. (2003). Mkp1 and Mkp2, two MAPKAP-kinase homologues in *Schizosaccharomyces pombe*, interact with the MAP kinase Sty1. *Molecular genetics and genomics : MGG*, 268(5), 585–597. <https://doi.org/10.1007/s00438-002-0786-y>

BIBLIOGRAFIA

Asp, E., Nilsson, D., & Sunnerhagen, P. (2008). Fission yeast mitogen-activated protein kinase Sty1 interacts with translation factors. *Eukaryotic cell*, 7(2), 328–338. <https://doi.org/10.1128/EC.00358-07>

Aspuria, P. J., Sato, T., & Tamanoi, F. (2007). The TSC/Rheb/TOR signaling pathway in fission yeast and mammalian cells: temperature sensitive and constitutive active mutants of TOR. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 6(14), 1692–1695. <https://doi.org/10.4161/cc.6.14.4478>

Atkin, J., Halova, L., Ferguson, J., Hitchin, J. R., Lichawska-Cieslar, A., Jordan, A. M., Pines, J., Wellbrock, C., & Petersen, J. (2014). Torin1-mediated TOR kinase inhibition reduces Wee1 levels and advances mitotic commitment in fission yeast and HeLa cells. *Journal of cell science*, 127(Pt 6), 1346–1356. <https://doi.org/10.1242/jcs.146373>

Ayscough, K. R., Stryker, J., Pokala, N., Sanders, M., Crews, P., & Drubin, D. G. (1997). High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A. *The Journal of cell biology*, 137(2), 399–416. <https://doi.org/10.1083/jcb.137.2.399>

Baker, K., Gyamfi, I. A., Mashanov, G. I., Molloy, J. E., Geeves, M. A., & Mulvihill, D. P. (2019). TORC2-Gad8-dependent myosin phosphorylation modulates regulation by calcium. *eLife*, 8, e51150. <https://doi.org/10.7554/eLife.51150>

Bandyopadhyay, A., Matsumoto, T., & Maitra, U. (2000). Fission yeast Int6 is not essential for global translation initiation, but deletion of int6(+) causes hypersensitivity to caffeine and affects spore formation. *Molecular biology of the cell*, 11(11), 4005–4018. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.11.4005>

Bandyopadhyay, A., Lakshmanan, V., Matsumoto, T., Chang, E. C., & Maitra, U. (2002). Moe1 and spInt6, the fission yeast homologues of mammalian translation initiation factor 3 subunits p66 (eIF3d) and p48 (eIF3e), respectively, are required for stable association of eIF3 subunits. *The Journal of biological chemistry*, 277(3), 2360–2367. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107790200>

Basu, R., & Chang, F. (2011). Characterization of dip1p reveals a switch in Arp2/3-dependent actin assembly for fission yeast endocytosis. *Current biology : CB*, 21(11), 905–916. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.04.047>

Basu, R., Munteanu, E. L., & Chang, F. (2014). Role of turgor pressure in endocytosis in fission yeast. *Molecular biology of the cell*, 25(5), 679–687. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-10-0618>

Beauchair, G., Bridier-Nahmias, A., Zagury, J. F., Saïb, A., & Zamborlini, A. (2015). JASSA: a comprehensive tool for prediction of SUMOylation sites and SIMs. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31(21), 3483–3491. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv403>

Becker, M., Müller, S., Nellen, W., Jurkowski, T. P., Jeltsch, A., & Ehrenhofer-Murray, A. E. (2012). Pmt1, a Dnmt2 homolog in *Schizosaccharomyces pombe*, mediates tRNA methylation in response to nutrient signaling. *Nucleic acids research*, 40(22), 11648–11658. <https://doi.org/10.1093/nar/gks956>

Boulanger, M., Chakraborty, M., Tempé, D., Piechaczyk, M., & Bossis, G. (2021). SUMO and Transcriptional Regulation: The Lessons of Large-Scale Proteomic, Modifomic and Genomic Studies. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(4), 828. <https://doi.org/10.3390/molecules26040828>

- Brault, A., Rallis, C., Normant, V., Garant, J. M., Bähler, J., & Labbé, S. (2016). Php4 Is a Key Player for Iron Economy in Meiotic and Sporulating Cells. *G3 (Bethesda, Md.)*, 6(10), 3077–3095. <https://doi.org/10.1534/g3.116.031898>
- Brzozowski, J. S., & Skelding, K. A. (2019). The Multi-Functional Calcium/Calmodulin Stimulated Protein Kinase (CaMK) Family: Emerging Targets for Anti-Cancer Therapeutic Intervention. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 12(1), 8. <https://doi.org/10.3390/ph12010008>
- Byrne, S. M., & Hoffman, C. S. (1993). Six git genes encode a glucose-induced adenylate cyclase activation pathway in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of cell science*, 105 (Pt 4)(0 4), 1095–1100.
- Cabrera, M., Boronat, S., Marte, L., Vega, M., Pérez, P., Ayté, J., & Hidalgo, E. (2020). Chaperone-Facilitated Aggregation of Thermo-Sensitive Proteins Shields Them from Degradation during Heat Stress. *Cell reports*, 30(7), 2430–2443.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.077>
- Cao, W., Sohail, M., Liu, G., Koumbadinga, G. A., Lobo, V. G., & Xie, J. (2011). Differential effects of PKA-controlled CaMKK2 variants on neuronal differentiation. *RNA biology*, 8(6), 1061–1072. <https://doi.org/10.4161/rna.8.6.16691>
- Caron, A., Briscoe, D. M., Richard, D., & Laplante, M. (2018). DEPTOR at the Nexus of Cancer, Metabolism, and Immunity. *Physiological reviews*, 98(3), 1765–1803. <https://doi.org/10.1152/physrev.00064.2017>
- Caspari T. (1997). Onset of gluconate-H⁺ symport in *Schizosaccharomyces pombe* is regulated by the kinases Wis1 and Pka1, and requires the gt1⁺ gene product. *Journal of cell science*, 110 (Pt 20), 2599–2608.
- Chatila, T., Anderson, K. A., Ho, N., & Means, A. R. (1996). A unique phosphorylation-dependent mechanism for the activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type IV/GR. *The Journal of biological chemistry*, 271(35), 21542–21548. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.35.21542>
- Chen, C. R., Li, Y. C., Chen, J., Hou, M. C., Papadaki, P., & Chang, E. C. (1999). Moe1, a conserved protein in *Schizosaccharomyces pombe*, interacts with a Ras effector, Scd1, to affect proper spindle formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(2), 517–522. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.517>
- Chen, C. T., Feoktistova, A., Chen, J. S., Shim, Y. S., Clifford, D. M., Gould, K. L., & McCollum, D. (2008). The SIN kinase Sid2 regulates cytoplasmic retention of the *S. pombe* Cdc14-like phosphatase Clp1. *Current biology* : CB, 18(20), 1594–1599. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.08.067>
- Chen, H., Zhang, Y., He, C., & Wang, Q. (2014). Ca²⁺ signal transduction related to neutral lipid synthesis in an oil-producing green alga *Chlorella sp.* C2. *Plant & cell physiology*, 55(3), 634–644. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu015>
- Chen, J. S., Beckley, J. R., McDonald, N. A., Ren, L., Mangione, M., Jang, S. J., Elmore, Z. C., Rachfall, N., Feoktistova, A., Jones, C. M., Willet, A. H., Guillen, R., Bitton, D. A., Bähler, J., Jensen, M. A., Rhind, N., & Gould, K. L. (2014). Identification of new players in cell division, DNA damage response, and morphogenesis through construction of *Schizosaccharomyces pombe* deletion strains. *G3 (Bethesda, Md.)*, 5(3), 361–370. <https://doi.org/10.1534/g3.114.015701>

BIBLIOGRAFIA

- Chen, J. S., Beckley, J. R., Ren, L., Feoktistova, A., Jensen, M. A., Rhind, N., & Gould, K. L. (2016). Discovery of genes involved in mitosis, cell division, cell wall integrity and chromosome segregation through construction of *Schizosaccharomyces pombe* deletion strains. *Yeast* (Chichester, England), 33(9), 507–517. <https://doi.org/10.1002/yea.3172>
- Chen, W. S., Xu, P. Z., Gottlob, K., Chen, M. L., Sokol, K., Shiyanova, T., Roninson, I., Weng, W., Suzuki, R., Tobe, K., Kadowaki, T., & Hay, N. (2001). Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes & development*, 15(17), 2203–2208. <https://doi.org/10.1101/qad.913901>
- Chen, Y., Hu, X., Guo, C., Yu, Y., & Lu, H. (2017). Epe1 contributes to activation of AMPK by promoting phosphorylation of AMPK alpha subunit, Ssp2. *Scientific reports*, 7(1), 3208. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03442-0>
- Chia, K. H., Fukuda, T., Sofyantoro, F., Matsuda, T., Amai, T., & Shiozaki, K. (2017). Ragulator and GATOR1 complexes promote fission yeast growth by attenuating TOR complex 1 through Rag GTPases. *eLife*, 6, e30880. <https://doi.org/10.7554/eLife.30880>
- Chica, N., Rozalén, A. E., Pérez-Hidalgo, L., Rubio, A., Novak, B., & Moreno, S. (2016). Nutritional Control of Cell Size by the Greatwall-Endosulfine-PP2A-B55 Pathway. *Current biology : CB*, 26(3), 319–330. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.035>
- Cho, H., Mu, J., Kim, J. K., Thorvaldsen, J. L., Chu, Q., Crenshaw, E. B., 3rd, Kaestner, K. H., Bartolomei, M. S., Shulman, G. I., & Birnbaum, M. J. (2001). Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* (New York, N.Y.), 292(5522), 1728–1731. <https://doi.org/10.1126/science.292.5522.1728>
- Cipak, L., Zhang, C., Kovacicova, I., Rumpf, C., Miadokova, E., Shokat, K. M., & Gregan, J. (2011). Generation of a set of conditional analog-sensitive alleles of essential protein kinases in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell cycle* (Georgetown, Tex.), 10(20), 3527–3532. <https://doi.org/10.4161/cc.10.20.17792>
- Cisneros-Barroso, E., Yance-Chávez, T., Kito, A., Sugiura, R., Gómez-Hierro, A., Giménez-Zaragoza, D., & Aligue, R. (2014). Negative feedback regulation of calcineurin-dependent Prz1 transcription factor by the CaMKK-CaMK1 axis in fission yeast. *Nucleic acids research*, 42(15), 9573–9587. <https://doi.org/10.1093/nar/gku684>
- Cisneros Barroso, M. E. (2014). Caracterización funcional de la quinasa dependiente de calmodulina cmk1. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona.
- Clapham D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131(6), 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- Clapperton, J. A., Martin, S. R., Smerdon, S. J., Gamblin, S. J., & Bayley, P. M. (2002). Structure of the complex of calmodulin with the target sequence of calmodulin-dependent protein kinase I: studies of the kinase activation mechanism. *Biochemistry*, 41(50), 14669–14679. <https://doi.org/10.1021/bi026660t>
- Coghlan, V. M., Perrino, B. A., Howard, M., Langeberg, L. K., Hicks, J. B., Gallatin, W. M., & Scott, J. D. (1995). Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science* (New York, N.Y.), 267(5194), 108–111. <https://doi.org/10.1126/science.7528941>
- Cohen, A., Kupiec, M., & Weisman, R. (2014). Glucose activates TORC2-Gad8 protein via positive regulation of the cAMP/cAMP-dependent protein kinase A (PKA) pathway and negative regulation of the Pmk1 protein-mitogen-activated protein kinase pathway. *The*

Journal of biological chemistry, 289(31), 21727–21737.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.573824>

Cohen, A., Kupiec, M., & Weisman, R. (2016). Gad8 Protein Is Found in the Nucleus Where It Interacts with the MluI Cell Cycle Box-binding Factor (MBF) Transcriptional Complex to Regulate the Response to DNA Replication Stress. *The Journal of biological chemistry*, 291(17), 9371–9381. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.705251>

Cook, S. G., Bourke, A. M., O'Leary, H., Zaegel, V., Lasda, E., Mize-Berge, J., Quillinan, N., Tucker, C. L., Coultrap, S. J., Herson, P. S., & Bayer, K. U. (2018). Analysis of the CaMKII α and β splice-variant distribution among brain regions reveals isoform-specific differences in holoenzyme formation. *Scientific reports*, 8(1), 5448. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23779-4>

Collier, S. E., Voehler, M., Peng, D., Ohi, R., Gould, K. L., Reiter, N. J., & Ohi, M. D. (2014). Structural and functional insights into the N-terminus of Schizosaccharomyces pombe Cdc5. *Biochemistry*, 53(41), 6439–6451. <https://doi.org/10.1021/bi5008639>

Crane, R., Craig, R., Murray, R., Dunand-Sauthier, I., Humphrey, T., & Norbury, C. (2000). A fission yeast homolog of Int-6, the mammalian oncoprotein and eIF3 subunit, induces drug resistance when overexpressed. *Molecular biology of the cell*, 11(11), 3993–4003. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.11.3993>

Dalgin, G., Goldman, D. C., Donley, N., Ahmed, R., Eide, C. A., & Christian, J. L. (2007). GATA-2 functions downstream of BMPs and CaM KIV in ectodermal cells during primitive hematopoiesis. *Developmental biology*, 310(2), 454–469. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.08.012>

Davare, M. A., Saneyoshi, T., Guire, E. S., Nygaard, S. C., & Soderling, T. R. (2004). Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase by protein 14-3-3. *The Journal of biological chemistry*, 279(50), 52191–52199. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409873200>

Davare, M. A., Saneyoshi, T., & Soderling, T. R. (2011). Calmodulin-kinases regulate basal and estrogen stimulated medulloblastoma migration via Rac1. *Journal of neuro-oncology*, 104(1), 65–82. <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0472-6>

Davie, E., Forte, G. M., & Petersen, J. (2015). Nitrogen regulates AMPK to control TORC1 signaling. *Current biology : CB*, 25(4), 445–454. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.12.034>

Davis, T. N., Urdea, M. S., Masiarz, F. R., & Thorner, J. (1986). Isolation of the yeast calmodulin gene: calmodulin is an essential protein. *Cell*, 47(3), 423–431. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90599-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90599-4)

Deng, L., Sugiura, R., Takeuchi, M., Suzuki, M., Ebina, H., Takami, T., Koike, A., Iba, S., & Kuno, T. (2006). Real-time monitoring of calcineurin activity in living cells: evidence for two distinct Ca²⁺-dependent pathways in fission yeast. *Molecular biology of the cell*, 17(11), 4790–4800. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-06-0526>

Deng, L., Baldissard, S., Kettenbach, A. N., Gerber, S. A., & Moseley, J. B. (2014). Dueling kinases regulate cell size at division through the SAD kinase Cdr2. *Current biology : CB*, 24(4), 428–433. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.01.009>

Deng, L., Lee, M. E., Schutt, K. L., & Moseley, J. B. (2017). Phosphatases Generate Signal Specificity Downstream of Ssp1 Kinase in Fission Yeast. *Molecular and cellular biology*, 37(10), e00494-16. <https://doi.org/10.1128/MCB.00494-16>

BIBLIOGRAFIA

- Dengler F. (2020). Activation of AMPK under Hypoxia: Many Roads Leading to Rome. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2428. <https://doi.org/10.3390/ijms21072428>
- Deshpande, G. P., Hayles, J., Hoe, K. L., Kim, D. U., Park, H. O., & Hartsuiker, E. (2009). Screening a genome-wide *S. pombe* deletion library identifies novel genes and pathways involved in genome stability maintenance. *DNA repair*, 8(5), 672–679. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.01.016>
- DeVoti, J., Seydoux, G., Beach, D., & McLeod, M. (1991). Interaction between ran1+ protein kinase and cAMP dependent protein kinase as negative regulators of fission yeast meiosis. *The EMBO journal*, 10(12), 3759–3768.
- Du, W., Hálóvá, L., Kirkham, S., Atkin, J., & Petersen, J. (2012). TORC2 and the AGC kinase Gad8 regulate phosphorylation of the ribosomal protein S6 in fission yeast. *Biology open*, 1(9), 884–888. <https://doi.org/10.1242/bio.20122022>
- Du, W., Forte, G. M., Smith, D., & Petersen, J. (2016). Phosphorylation of the amino-terminus of the AGC kinase Gad8 prevents its interaction with TORC2. *Open biology*, 6(3), 150189. <https://doi.org/10.1098/rsob.150189>
- Düwel, M., & Ungewickell, E. J. (2006). Clathrin-dependent association of CVAK104 with endosomes and the trans-Golgi network. *Molecular biology of the cell*, 17(10), 4513–4525. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-05-0390>
- Easton, R. M., Cho, H., Roovers, K., Shineman, D. W., Mizrahi, M., Forman, M. S., Lee, V. M., Szabolcs, M., de Jong, R., Oltersdorf, T., Ludwig, T., Efstratiadis, A., & Birnbaum, M. J. (2005). Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Molecular and cellular biology*, 25(5), 1869–1878. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.5.1869-1878.2005>
- Eshaghi, M., Lee, J. H., Zhu, L., Poon, S. Y., Li, J., Cho, K. H., Chu, Z., Karuturi, R. K., & Liu, J. (2010). Genomic binding profiling of the fission yeast stress-activated MAPK Sty1 and the bZIP transcriptional activator Atf1 in response to H₂O₂. *PloS one*, 5(7), e11620. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011620>
- Estill, M., Kerwin-Iosue, C. L., & Wykoff, D. D. (2015). Dissection of the PHO pathway in *Schizosaccharomyces pombe* using epistasis and the alternate repressor adenine. *Current genetics*, 61(2), 175–183. <https://doi.org/10.1007/s00294-014-0466-6>
- Facchetti, G., Knapp, B., Flor-Parra, I., Chang, F., & Howard, M. (2019). Reprogramming Cdr2-Dependent Geometry-Based Cell Size Control in Fission Yeast. *Current biology : CB*, 29(2), 350–358.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.12.017>
- Fang, Y., Hu, L., Zhou, X., Jaiseng, W., Zhang, B., Takami, T., & Kuno, T. (2012). A genomewide screen in *Schizosaccharomyces pombe* for genes affecting the sensitivity of antifungal drugs that target ergosterol biosynthesis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(4), 1949–1959. <https://doi.org/10.1128/AAC.05126-11>
- Ferey, J. L., Brault, J. J., Smith, C. A., & Witczak, C. A. (2014). Constitutive activation of CaMKKα signaling is sufficient but not necessary for mTORC1 activation and growth in mouse skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 307(8), E686–E694. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00322.2014>
- Fernández, J., Soto, T., Vicente-Soler, J., Cansado, J., & Gacto, M. (1997). Heat-shock response in *Schizosaccharomyces pombe* cells lacking cyclic AMP-dependent phosphorylation. *Current genetics*, 31(2), 112–118. <https://doi.org/10.1007/s002940050183>

- Fernández, J., Soto, T., Franco, A., Vicente-Soler, J., Cansado, J., & Gacto, M. (1998). Enhancement of neutral trehalase activity by oxidative stress in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 25(2), 79–86. <https://doi.org/10.1006/fqbi.1998.1084>
- Ferretti, A. P., Bhargava, R., Dahan, S., Tsokos, M. G., & Tsokos, G. C. (2018). Calcium/Calmodulin Kinase IV Controls the Function of Both T Cells and Kidney Resident Cells. *Frontiers in immunology*, 9, 2113. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02113>
- Flor-Parra, I., Iglesias-Romero, A. B., Salas-Pino, S., Lucena, R., Jimenez, J., & Daga, R. R. (2018). Importin α and vNEBD Control Meiotic Spindle Disassembly in Fission Yeast. *Cell reports*, 23(4), 933–941. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.073>
- Forte, G. M., Davie, E., Lie, S., Franz-Wachtel, M., Ovens, A. J., Wang, T., Oakhill, J. S., Maček, B., Hagan, I. M., & Petersen, J. (2019). Import of extracellular ATP in yeast and man modulates AMPK and TORC1 signalling. *Journal of cell science*, 132(7), jcs223925. <https://doi.org/10.1242/jcs.223925>
- Fraille, R., Sánchez-Mir, L., & Hidalgo, E. (2020). A new adaptation strategy to glucose starvation: modulation of the gluconate shunt and pentose phosphate pathway by the transcriptional repressor Rsv1. *The FEBS journal*, 287(5), 874–877. <https://doi.org/10.1111/febs.15131>
- Franco, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Guillen, P. V., Cansado, J., & Gacto, M. (2000). Characterization of *tpp1(+)* as encoding a main trehalose-6P phosphatase in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of bacteriology*, 182(20), 5880–5884. <https://doi.org/10.1128/jb.182.20.5880-5884.2000>
- Franco, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Paredes, V., Madrid, M., Gacto, M., & Cansado, J. (2003). A role for calcium in the regulation of neutral trehalase activity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *The Biochemical journal*, 376(Pt 1), 209–217. <https://doi.org/10.1042/BJ20030825>
- Franco, A., Soto, T., Madrid, M., Vicente-Soler, J., Gacto, M., & Cansado, J. (2005). Functional characterization of *Schizosaccharomyces pombe* neutral trehalase altered in phosphorylatable serine residues. *Archives of microbiology*, 183(6), 394–400. <https://doi.org/10.1007/s00203-005-0005-4>
- Freitag, S. I., Wong, J., & Young, P. G. (2014). Genetic and physical interaction of Ssp1 CaMKK and Rad24 14-3-3 during low pH and osmotic stress in fission yeast. *Open biology*, 4(1), 130127. <https://doi.org/10.1098/rsob.130127>
- Frigo, D. E., Howe, M. K., Wittmann, B. M., Brunner, A. M., Cushman, I., Wang, Q., Brown, M., Means, A. R., & McDonnell, D. P. (2011). CaM kinase kinase beta-mediated activation of the growth regulatory kinase AMPK is required for androgen-dependent migration of prostate cancer cells. *Cancer research*, 71(2), 528–537. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2581>
- Fujita, M., & Yamamoto, M. (1998). *S. pombe* *sck2+*, a second homologue of *S. cerevisiae* SCH9 in fission yeast, encodes a putative protein kinase closely related to PKA in function. *Current genetics*, 33(4), 248–254. <https://doi.org/10.1007/s002940050333>
- Fukuda, T., & Shiozaki, K. (2018). The Rag GTPase-Ragulator complex attenuates TOR complex 1 signaling in fission yeast. *Autophagy*, 14(6), 1105–1106. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1444313>

BIBLIOGRAFIA

Garabedian, M. V., Noguchi, C., Ziegler, M. A., Das, M. M., Singh, T., Harper, L. J., Leman, A. R., Khair, L., Moser, B. A., Nakamura, T. M., & Noguchi, E. (2012). The double-bromodomain proteins Bdf1 and Bdf2 modulate chromatin structure to regulate S-phase stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 190(2), 487–500. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.135459>

Ghislat, G., Patron, M., Rizzuto, R., & Knecht, E. (2012). Withdrawal of essential amino acids increases autophagy by a pathway involving Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase kinase-β (CaMKK-β). *The Journal of biological chemistry*, 287(46), 38625–38636. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.365767>

Gocher, A. M., Azabdaftari, G., Euscher, L. M., Dai, S., Karacosta, L. G., Franke, T. F., & Edelman, A. M. (2017). Akt activation by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CaMKK2) in ovarian cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 292(34), 14188–14204. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.778464>

Gold M. G. (2019). Swimming regulations for protein kinase A catalytic subunit. *Biochemical Society transactions*, 47(5), 1355–1366. <https://doi.org/10.1042/BST20190230>

Gomes-Duarte, A., Lacerda, R., Menezes, J., & Romão, L. (2018). eIF3: a factor for human health and disease. *RNA biology*, 15(1), 26–34. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1391437>

Gómez, E. B., & Forsburg, S. L. (2004). Analysis of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* cell cycle. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 241, 93–111. <https://doi.org/10.1385/1-59259-646-0:93>

Green, M. F., Scott, J. W., Steel, R., Oakhill, J. S., Kemp, B. E., & Means, A. R. (2011). Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase kinase beta is regulated by multisite phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 286(32), 28066–28079. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.251504>

Guest, C. B., Deszo, E. L., Hartman, M. E., York, J. M., Kelley, K. W., & Freund, G. G. (2008). Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase kinase alpha is expressed by monocytic cells and regulates the activation profile. *PloS one*, 3(2), e1606. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001606>

Gupta, D. R., Paul, S. K., Oowatari, Y., Matsuo, Y., & Kawamukai, M. (2011a). Complex formation, phosphorylation, and localization of protein kinase A of *Schizosaccharomyces pombe* upon glucose starvation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 75(8), 1456–1465. <https://doi.org/10.1271/bbb.110125>

Gupta, D. R., Paul, S. K., Oowatari, Y., Matsuo, Y., & Kawamukai, M. (2011). Multistep regulation of protein kinase A in its localization, phosphorylation and binding with a regulatory subunit in fission yeast. *Current genetics*, 57(5), 353–365. <https://doi.org/10.1007/s00294-011-0354-2>

Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vazquez, D. S., Turk, B. E., & Shaw, R. J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell*, 30(2), 214–226. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.003>

Hálová, L., Du, W., Kirkham, S., Smith, D. L., & Petersen, J. (2013). Phosphorylation of the TOR ATP binding domain by AGC kinase constitutes a novel mode of TOR inhibition. *The Journal of cell biology*, 203(4), 595–604. <https://doi.org/10.1083/jcb.201305103>

Hanyu, Y., Imai, K. K., Kawasaki, Y., Nakamura, T., Nakaseko, Y., Nagao, K., Kokubu, A., Ebe, M., Fujisawa, A., Hayashi, T., Obuse, C., & Yanagida, M. (2009). *Schizosaccharomyces*

BIBLIOGRAFIA

pombe cell division cycle under limited glucose requires Ssp1 kinase, the putative CaMKK, and Sds23, a PP2A-related phosphatase inhibitor. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 14(5), 539–554. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2009.01290.x>

Haribabu, B., Hook, S. S., Selbert, M. A., Goldstein, E. G., Tomhave, E. D., Edelman, A. M., Snyderman, R., & Means, A. R. (1995). Human calcium-calmodulin dependent protein kinase I: cDNA cloning, domain structure and activation by phosphorylation at threonine-177 by calcium-calmodulin dependent protein kinase I kinase. *The EMBO journal*, 14(15), 3679–3686.

Harrison, J. C., Bardes, E. S., Ohya, Y., & Lew, D. J. (2001). A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint. *Nature cell biology*, 3(4), 417–420. <https://doi.org/10.1038/35070104>

Hartmuth, S., & Petersen, J. (2009). Fission yeast Tor1 functions as part of TORC1 to control mitotic entry through the stress MAPK pathway following nutrient stress. *Journal of cell science*, 122(Pt 11), 1737–1746. <https://doi.org/10.1242/jcs.049387>

Hatano, T., Morigasaki, S., Tatebe, H., Ikeda, K., & Shiozaki, K. (2015). Fission yeast Ryh1 GTPase activates TOR Complex 2 in response to glucose. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 14(6), 848–856. <https://doi.org/10.1080/15384101.2014.1000215>

Hawley, S. A., Selbert, M. A., Goldstein, E. G., Edelman, A. M., Carling, D., & Hardie, D. G. (1995). 5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca²⁺/calmodulin activates the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms. *The Journal of biological chemistry*, 270(45), 27186–27191. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.27186>

Hawley, S. A., Pan, D. A., Mustard, K. J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A. M., Frenguelli, B. G., & Hardie, D. G. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell metabolism*, 2(1), 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.009>

Hayashi, T., Hatanaka, M., Nagao, K., Nakaseko, Y., Kanoh, J., Kokubu, A., Ebe, M., & Yanagida, M. (2007). Rapamycin sensitivity of the *Schizosaccharomyces pombe* tor2 mutant and organization of two highly phosphorylated TOR complexes by specific and common subunits. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 12(12), 1357–1370. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01141.x>

Hayles, J., Wood, V., Jeffery, L., Hoe, K. L., Kim, D. U., Park, H. O., Salas-Pino, S., Heichinger, C., & Nurse, P. (2013). A genome-wide resource of cell cycle and cell shape genes of fission yeast. *Open biology*, 3(5), 130053. <https://doi.org/10.1098/rsob.130053>

Heiman, R. G., Atkinson, R. C., Andruss, B. F., Bolduc, C., Kovalick, G. E., & Beckingham, K. (1996). Spontaneous avoidance behavior in *Drosophila* null for calmodulin expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(6), 2420–2425. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.6.2420>

Henry, T. C., Power, J. E., Kerwin, C. L., Mohammed, A., Weissman, J. S., Cameron, D. M., & Wykoff, D. D. (2011). Systematic screen of *Schizosaccharomyces pombe* deletion collection uncovers parallel evolution of the phosphate signal transduction pathway in yeasts. *Eukaryotic cell*, 10(2), 198–206. <https://doi.org/10.1128/EC.00216-10>

Heron-Milhavet, L., Khouya, N., Fernandez, A., & Lamb, N. J. (2011). Akt1 and Akt2: differentiating the aktion. *Histology and histopathology*, 26(5), 651–662. <https://doi.org/10.14670/HH-26.651>

BIBLIOGRAFIA

- Higuchi, T., Watanabe, Y., & Yamamoto, M. (2002). Protein kinase A regulates sexual development and gluconeogenesis through phosphorylation of the Zn finger transcriptional activator Rst2p in fission yeast. *Molecular and cellular biology*, 22(1), 1–11. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.1.1-11.2002>
- Hirayama, S., Sugiura, R., Lu, Y., Maeda, T., Kawagishi, K., Yokoyama, M., Tohda, H., Giga-Hama, Y., Shuntoh, H., & Kuno, T. (2003). Zinc finger protein Prz1 regulates Ca²⁺ but not Cl⁻ homeostasis in fission yeast. Identification of distinct branches of calcineurin signaling pathway in fission yeast. *The Journal of biological chemistry*, 278(20), 18078–18084. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212900200>
- Hoe, K. L., Won, M. S., Yoo, O. J., & Yoo, H. S. (1996). Molecular cloning of GAF2, a *Schizosaccharomyces pombe* GATA factor, which has two zinc-finger sequences. *Biochemistry and molecular biology international*, 39(1), 127–135. <https://doi.org/10.1080/15216549600201131>
- Hoffman, C. S., & Winston, F. (1990). Isolation and characterization of mutants constitutive for expression of the *fbp1* gene of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 124(4), 807–816.
- Hoffman, C. S., & Winston, F. (1991). Glucose repression of transcription of the *Schizosaccharomyces pombe fbp1* gene occurs by a cAMP signaling pathway. *Genes & development*, 5(4), 561–571. <https://doi.org/10.1101/qad.5.4.561>
- Hoffman, C. S., Wood, V., & Fantès, P. A. (2015). An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System. *Genetics*, 201(2), 403–423. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.181503>
- Hook, S. S., Kemp, B. E., & Means, A. R. (1999). Peptide specificity determinants at P-7 and P-6 enhance the catalytic efficiency of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I in the absence of activation loop phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 274(29), 20215–20222. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.29.20215>
- Hsu, L. S., Chen, G. D., Lee, L. S., Chi, C. W., Cheng, J. F., & Chen, J. Y. (2001). Human Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta gene encodes multiple isoforms that display distinct kinase activity. *The Journal of biological chemistry*, 276(33), 31113–31123. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011720200>
- Hua, H., Kong, Q., Zhang, H., Wang, J., Luo, T., & Jiang, Y. (2019). Targeting mTOR for cancer therapy. *Journal of hematology & oncology*, 12(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0754-1>
- Ichimura, T., Taoka, M., Hozumi, Y., Goto, K., & Tokumitsu, H. (2008). 14-3-3 Proteins directly regulate Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase alpha through phosphorylation-dependent multisite binding. *FEBS letters*, 582(5), 661–665. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.01.037>
- Iida, M., Harari, P. M., Wheeler, D. L., & Toulany, M. (2020). Targeting AKT/PKB to improve treatment outcomes for solid tumors. *Mutation research*, 819–820, 111690. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2020.111690>
- Ikai, N., Nakazawa, N., Hayashi, T., & Yanagida, M. (2011). The reverse, but coordinated, roles of Tor2 (TORC1) and Tor1 (TORC2) kinases for growth, cell cycle and separase-mediated mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Open biology*, 1(3), 110007. <https://doi.org/10.1098/rsob.110007>

- Ikeda, K., Morigasaki, S., Tatebe, H., Tamanoi, F., & Shiozaki, K. (2008). Fission yeast TOR complex 2 activates the AGC-family Gad8 kinase essential for stress resistance and cell cycle control. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(3), 358–364. <https://doi.org/10.4161/cc.7.3.5245>
- Ikonomova, R., Sommer, T., & Képès, F. (1997). The Srp40 protein plays a dose-sensitive role in preribosome assembly or transport and depends on its carboxy-terminal domain for proper localization to the yeast nucleoskeleton. *DNA and cell biology*, 16(10), 1161–1173. <https://doi.org/10.1089/dna.1997.16.1161>
- Inoki, K., Zhu, T., & Guan, K. L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 115(5), 577–590. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00929-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00929-2)
- Iwabu, M., Yamauchi, T., Okada-Iwabu, M., Sato, K., Nakagawa, T., Funata, M., Yamaguchi, M., Namiki, S., Nakayama, R., Tabata, M., Ogata, H., Kubota, N., Takamoto, I., Hayashi, Y. K., Yamauchi, N., Waki, H., Fukayama, M., Nishino, I., Tokuyama, K., Ueki, K., ... Kadowaki, T. (2010). Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1. *Nature*, 464(7293), 1313–1319. <https://doi.org/10.1038/nature08991>
- Jang, Y. J., Won, M., & Yoo, H. S. (2013). Phosphorylations of Sds23/Psp1/Moc1 by stress-activated kinase and cAMP-dependent kinase are essential for regulating cell viability in prolonged stationary phase. *Yeast (Chichester, England)*, 30(10), 379–394. <https://doi.org/10.1002/yea.2958>
- Jenkins, C. C., Mata, J., Crane, R. F., Thomas, B., Akoulitchev, A., Bähler, J., & Norbury, C. J. (2005). Activation of AP-1-dependent transcription by a truncated translation initiation factor. *Eukaryotic cell*, 4(11), 1840–1850. <https://doi.org/10.1128/EC.4.11.1840-1850.2005>
- Jensen, H. H., Brohus, M., Nyegaard, M., & Overgaard, M. T. (2018). Human Calmodulin Mutations. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11, 396. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00396>
- Jin, M., Fujita, M., Culley, B. M., Apolinario, E., Yamamoto, M., Maundrell, K., & Hoffman, C. S. (1995). sck1, a high copy number suppressor of defects in the cAMP-dependent protein kinase pathway in fission yeast, encodes a protein homologous to the *Saccharomyces cerevisiae* SCH9 kinase. *Genetics*, 140(2), 457–467.
- Jung, S. H., Kong, D. H., Jeon, H. Y., Han, E. T., Park, W. S., Hong, S. H., Kim, Y. M., & Ha, K. S. (2017). Systematic investigation of protein kinase A substrate proteins using on-chip protein kinase kinetic profiling. *The Analyst*, 142(12), 2239–2246. <https://doi.org/10.1039/c6an02682f>
- Kahl, C. R., & Means, A. R. (2004). Regulation of cyclin D1/Cdk4 complexes by calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. *The Journal of biological chemistry*, 279(15), 15411–15419. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312543200>
- Kakumoto, K., Ikeda, J., Okada, M., Morii, E., & Oneyama, C. (2015). mLST8 Promotes mTOR-Mediated Tumor Progression. *PloS one*, 10(4), e0119015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119015>
- Kaleka, K. S., Petersen, A. N., Florence, M. A., & Gerges, N. Z. (2012). Pull-down of calmodulin-binding proteins. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (59), 3502. <https://doi.org/10.3791/3502>
- Kamata, A., Sakagami, H., Tokumitsu, H., Owada, Y., Fukunaga, K., & Kondo, H. (2007). Spatiotemporal expression of four isoforms of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I

BIBLIOGRAFIA

in brain and its possible roles in hippocampal dendritic growth. *Neuroscience research*, 57(1), 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2006.09.013>

Kang, X., Cui, C., Wang, C., Wu, G., Chen, H., Lu, Z., Chen, X., Wang, L., Huang, J., Geng, H., Zhao, M., Chen, Z., Müschen, M., Wang, H. Y., & Zhang, C. C. (2018). CAMKs support development of acute myeloid leukemia. *Journal of hematology & oncology*, 11(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0574-8>

Kanoh, J., Watanabe, Y., Ohsugi, M., Iino, Y., & Yamamoto, M. (1996). Schizosaccharomyces pombe gad7+ encodes a phosphoprotein with a bZIP domain, which is required for proper G1 arrest and gene expression under nitrogen starvation. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 1(4), 391–408. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1996.d01-247.x>

Kataoka, S., Furuita, K., Hattori, Y., Kobayashi, N., Ikegami, T., Shiozaki, K., Fujiwara, T., & Kojima, C. (2015). (1)H, (15)N and (13)C resonance assignments of the conserved region in the middle domain of S. pombe Sin1 protein. *Biomolecular NMR assignments*, 9(1), 89–92. <https://doi.org/10.1007/s12104-014-9550-6>

Kawai, M., Nakashima, A., Ueno, M., Ushimaru, T., Aiba, K., Doi, H., & Uritani, M. (2001). Fission yeast tor1 functions in response to various stresses including nitrogen starvation, high osmolarity, and high temperature. *Current genetics*, 39(3), 166–174. <https://doi.org/10.1007/s002940100198>

Kawamukai, M., Ferguson, K., Wigler, M., & Young, D. (1991). Genetic and biochemical analysis of the adenyl cyclase of Schizosaccharomyces pombe. *Cell regulation*, 2(2), 155–164. <https://doi.org/10.1091/mbc.2.2.155>

Kelkar, M., & Martin, S. G. (2015). PKA antagonizes CLASP-dependent microtubule stabilization to re-localize Pom1 and buffer cell size upon glucose limitation. *Nature communications*, 6, 8445. <https://doi.org/10.1038/ncomms9445>

Kim, D. U., Hayles, J., Kim, D., Wood, V., Park, H. O., Won, M., Yoo, H. S., Duhig, T., Nam, M., Palmer, G., Han, S., Jeffery, L., Baek, S. T., Lee, H., Shim, Y. S., Lee, M., Kim, L., Heo, K. S., Noh, E. J., Lee, A. R., Jang, Y. J., Chung, K. S., Choi, S. J., Park, J. Y., Park, Y., Kim, H. M., Park, S. K., Kang, E. J., Kim, H. B., Kang, H. S., Park, H. M., Kim, K., Song, K., Song, K. B., Nurse, P., & Hoe, K. L. (2010). Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *Nature biotechnology*, 28(6), 617–623. <https://doi.org/10.1038/nbt.1628>

Kim, G. R., Cho, S. N., Kim, H. S., Yu, S. Y., Choi, S. Y., Ryu, Y., Lin, M. Q., Jin, L., Kee, H. J., & Jeong, M. H. (2016). Histone deacetylase and GATA-binding factor 6 regulate arterial remodeling in angiotensin II-induced hypertension. *Journal of hypertension*, 34(11), 2206–2219. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000001081>

Kim, H. J., Lee, K. L., Kim, K. D., & Roe, J. H. (2016). The iron uptake repressor Fep1 in the fission yeast binds Fe-S cluster through conserved cysteines. *Biochemical and biophysical research communications*, 478(1), 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.07.070>

Kim, J. Y., Kim, E. J., Lopez-Maury, L., Bähler, J., & Roe, J. H. (2014). A metabolic strategy to enhance long-term survival by Phx1 through stationary phase-specific pyruvate decarboxylases in fission yeast. *Aging*, 6(7), 587–601. <https://doi.org/10.18632/aging.100682>

Kohda, T. A., Tanaka, K., Konomi, M., Sato, M., Osumi, M., & Yamamoto, M. (2007). Fission yeast autophagy induced by nitrogen starvation generates a nitrogen source that drives

adaptation processes. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 12(2), 155–170. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01041.x>

Koike, A., Kato, T., Sugiura, R., Ma, Y., Tabata, Y., Ohmoto, K., Sio, S. O., & Kuno, T. (2012). Genetic screening for regulators of Prz1, a transcriptional factor acting downstream of calcineurin in fission yeast. *The Journal of biological chemistry*, 287(23), 19294–19303. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.310615>

Kowalczyk, K. M., & Petersen, J. (2016). Fission Yeast SCYL1/2 Homologue Ppk32: A Novel Regulator of TOR Signalling That Governs Survival during Brefeldin A Induced Stress to Protein Trafficking. *PLoS genetics*, 12(5), e1006041. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006041>

Koyano, T., Kume, K., Konishi, M., Toda, T., & Hirata, D. (2010). Search for kinases related to transition of growth polarity in fission yeast. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 74(5), 1129–1133. <https://doi.org/10.1271/bbb.100223>

Krebs J. (2009). The influence of calcium signaling on the regulation of alternative splicing. *Biochimica et biophysica acta*, 1793(6), 979–984. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.12.006>

Kunitomo, H., Higuchi, T., Iino, Y., & Yamamoto, M. (2000). A zinc-finger protein, Rst2p, regulates transcription of the fission yeast *ste11(+)* gene, which encodes a pivotal transcription factor for sexual development. *Molecular biology of the cell*, 11(9), 3205–3217. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.9.3205>

Laboucarié, T., Detilleux, D., Rodriguez-Mias, R. A., Faux, C., Romeo, Y., Franz-Wachtel, M., Krug, K., Maček, B., Villén, J., Petersen, J., & Helmlinger, D. (2017). TORC1 and TORC2 converge to regulate the SAGA co-activator in response to nutrient availability. *EMBO reports*, 18(12), 2197–2218. <https://doi.org/10.15252/embr.201744942>

Laski, J., Singha, B., Wang, X., Valdés, Y. R., Collins, O., & Shepherd, T. G. (2020). Activated CAMKK β -AMPK signaling promotes autophagy in a spheroid model of ovarian tumour metastasis. *Journal of ovarian research*, 13(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s13048-020-00660-5>

Lauritano, C., De Luca, D., Amoroso, M., Benfatto, S., Maestri, S., Racioppi, C., Esposito, F., & Ianora, A. (2019). New molecular insights on the response of the green alga *Tetraselmis suecica* to nitrogen starvation. *Scientific reports*, 9(1), 3336. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39860-5>

Lee, M. E., Rusin, S. F., Jenkins, N., Kettenbach, A. N., & Moseley, J. B. (2018). Mechanisms Connecting the Conserved Protein Kinases Ssp1, Kin1, and Pom1 in Fission Yeast Cell Polarity and Division. *Current biology : CB*, 28(1), 84–92.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.034>

Leganés, F., Forchhammer, K., & Fernández-Piñas, F. (2009). Role of calcium in acclimation of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 to nitrogen starvation. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 1), 25–34. <https://doi.org/10.1099/mic.0.022251-0>

Lemrow, S. M., Anderson, K. A., Joseph, J. D., Ribar, T. J., Noeldner, P. K., & Means, A. R. (2004). Catalytic activity is required for calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV to enter the nucleus. *The Journal of biological chemistry*, 279(12), 11664–11671. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312613200>

BIBLIOGRAFIA

Lin, F., Marcelo, K. L., Rajapakshe, K., Coarfa, C., Dean, A., Wilganowski, N., Robinson, H., Sevcik, E., Bissig, K. D., Goldie, L. C., Means, A. R., & York, B. (2015). The camKK2/camKIV relay is an essential regulator of hepatic cancer. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 62(2), 505–520. <https://doi.org/10.1002/hep.27832>

Liu, D. M., Wang, H. J., Han, B., Meng, X. Q., Chen, M. H., Yang, D. B., Sun, Y., Li, Y. L., & Jiang, C. L. (2016). CAMKK2, Regulated by Promoter Methylation, is a Prognostic Marker in Diffuse Gliomas. *CNS neuroscience & therapeutics*, 22(6), 518–524. <https://doi.org/10.1111/cns.12531>

Liu, Q., Ma, Y., Zhou, X., & Furuyashiki, T. (2015). Constitutive Tor2 Activity Promotes Retention of the Amino Acid Transporter App3 at Trans-Golgi/Endosomes in Fission Yeast. *PloS one*, 10(10), e0139045. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139045>

Lone, M. U., Miyan, J., Asif, M., Malik, S. A., Dubey, P., Singh, V., Singh, K., Mitra, K., Pandey, D., Haq, W., Amita, H., Singh, P. K., Kiess, W., Kaessner, F., Garten, A., & Bhadauria, S. (2019). Direct physical interaction of active Ras with mSIN1 regulates mTORC2 signaling. *BMC cancer*, 19(1), 1236. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6422-6>

Lopez, M. S., Kliegman, J. I., & Shokat, K. M. (2014). The logic and design of analog-sensitive kinases and their small molecule inhibitors. *Methods in enzymology*, 548, 189–213. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397918-6.00008-2>

López-Avilés, S., Lambea, E., Moldón, A., Grande, M., Fajardo, A., Rodríguez-Gabriel, M. A., Hidalgo, E., & Aligue, R. (2008). Activation of *Srk1* by the mitogen-activated protein kinase *Sty1/Spc1* precedes its dissociation from the kinase and signals its degradation. *Molecular biology of the cell*, 19(4), 1670–1679. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-07-0639>

Lucena, R., Dephoure, N., Gygi, S. P., Kellogg, D. R., Tallada, V. A., Daga, R. R., & Jimenez, J. (2015). Nucleocytoplasmic transport in the midzone membrane domain controls yeast mitotic spindle disassembly. *The Journal of cell biology*, 209(3), 387–402. <https://doi.org/10.1083/jcb.201412144>

Ma, N., Liu, Q., Zhang, L., Henske, E. P., & Ma, Y. (2013). TORC1 signaling is governed by two negative regulators in fission yeast. *Genetics*, 195(2), 457–468. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.154674>

Ma, Y., Sugiura, R., Koike, A., Ebina, H., Sio, S. O., & Kuno, T. (2011). Transient receptor potential (TRP) and Cch1-Yam8 channels play key roles in the regulation of cytoplasmic Ca²⁺ in fission yeast. *PloS one*, 6(7), e22421. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022421>

Ma, Y., Ma, N., Liu, Q., Qi, Y., Manabe, R., & Furuyashiki, T. (2015). Tor Signaling Regulates Transcription of Amino Acid Permeases through a GATA Transcription Factor Gaf1 in Fission Yeast. *PloS one*, 10(12), e0144677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144677>

Madrid, M., Jiménez, R., Sánchez-Mir, L., Soto, T., Franco, A., Vicente-Soler, J., Gacto, M., Pérez, P., & Cansado, J. (2015). Multiple layers of regulation influence cell integrity control by the PKC ortholog Pck2 in fission yeast. *Journal of cell science*, 128(2), 266–280. <https://doi.org/10.1242/jcs.158295>

Madrid, M., Vázquez-Marín, B., Franco, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Gacto, M., & Cansado, J. (2016). Multiple crosstalk between TOR and the cell integrity MAPK signaling pathway in fission yeast. *Scientific reports*, 6, 37515. <https://doi.org/10.1038/srep37515>

Maeda, T., Watanabe, Y., Kunitomo, H., & Yamamoto, M. (1994). Cloning of the *pka1* gene encoding the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of biological chemistry*, 269(13), 9632–9637.

- Mangione, M. C., Snider, C. E., & Gould, K. L. (2019). The intrinsically disordered region of the cytokinetic F-BAR protein Cdc15 performs a unique essential function in maintenance of cytokinetic ring integrity. *Molecular biology of the cell*, 30(22), 2790–2801. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-06-0314>
- Manke, I. A., Nguyen, A., Lim, D., Stewart, M. Q., Elia, A. E., & Yaffe, M. B. (2005). MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation. *Molecular cell*, 17(1), 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.021>
- Manning, B. D., & Toker, A. (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*, 169(3), 381–405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>
- Martín, R., Portantier, M., Chica, N., Nyquist-Andersen, M., Mata, J., & Lopez-Aviles, S. (2017). A PP2A-B55-Mediated Crosstalk between TORC1 and TORC2 Regulates the Differentiation Response in Fission Yeast. *Current biology : CB*, 27(2), 175–188. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.037>
- Massie, C. E., Lynch, A., Ramos-Montoya, A., Boren, J., Stark, R., Fazli, L., Warren, A., Scott, H., Madhu, B., Sharma, N., Bon, H., Zecchini, V., Smith, D. M., Denicola, G. M., Mathews, N., Osborne, M., Hadfield, J., Macarthur, S., Adryan, B., Lyons, S. K., Brindle, K. M., Griffiths, J., Gleave, M. E., Rennie, P. S., Neal, D. E., Mills, I. G. (2011). The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis. *The EMBO journal*, 30(13), 2719–2733. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.158>
- Matsuo, T., Kubo, Y., Watanabe, Y., & Yamamoto, M. (2003). Schizosaccharomyces pombe AGC family kinase Gad8p forms a conserved signaling module with TOR and PDK1-like kinases. *The EMBO journal*, 22(12), 3073–3083. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdq298>
- Matsuo, T., Otsubo, Y., Urano, J., Tamanai, F., & Yamamoto, M. (2007). Loss of the TOR kinase Tor2 mimics nitrogen starvation and activates the sexual development pathway in fission yeast. *Molecular and cellular biology*, 27(8), 3154–3164. <https://doi.org/10.1128/MCB.01039-06>
- Matsuo, Y., Asakawa, K., Toda, T., & Katayama, S. (2006). A rapid method for protein extraction from fission yeast. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(8), 1992–1994. <https://doi.org/10.1271/bbb.60087>
- Matsuo, Y., McInnis, B., & Marcus, S. (2008). Regulation of the subcellular localization of cyclic AMP-dependent protein kinase in response to physiological stresses and sexual differentiation in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *Eukaryotic cell*, 7(9), 1450–1459. <https://doi.org/10.1128/EC.00168-08>
- Matsuo, Y., & Kawamukai, M. (2017). cAMP-dependent protein kinase involves calcium tolerance through the regulation of Prz1 in Schizosaccharomyces pombe. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 81(2), 231–241. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1246171>
- Matsusaka, T., Hirata, D., Yanagida, M., & Toda, T. (1995). A novel protein kinase gene *ssp1+* is required for alteration of growth polarity and actin localization in fission yeast. *The EMBO journal*, 14(14), 3325–3338.
- Matsushita, M., & Nairn, A. C. (1999). Inhibition of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I cascade by cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 274(15), 10086–10093. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.15.10086>

BIBLIOGRAFIA

- McGrail, J. C., Krause, A., & O'Keefe, R. T. (2009). The RNA binding protein Cwc2 interacts directly with the U6 snRNA to link the nineteen complex to the spliceosome during pre-mRNA splicing. *Nucleic acids research*, 37(13), 4205–4217. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp341>
- McInnis, B., Mitchell, J., & Marcus, S. (2010). Phosphorylation of the protein kinase A catalytic subunit is induced by cyclic AMP deficiency and physiological stresses in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemical and biophysical research communications*, 399(4), 665–669. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.139>
- Mercier, A., & Labbé, S. (2009). Both Php4 function and subcellular localization are regulated by iron via a multistep mechanism involving the glutaredoxin Grx4 and the exportin Crm1. *The Journal of biological chemistry*, 284(30), 20249–20262. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.009563>
- Meyer, T., Hanson, P. I., Stryer, L., & Schulman, H. (1992). Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5060), 1199–1202. <https://doi.org/10.1126/science.256.5060.1199>
- Mishra, M., Karagiannis, J., Trautmann, S., Wang, H., McCollum, D., & Balasubramanian, M. K. (2004). The Clp1p/Flp1p phosphatase ensures completion of cytokinesis in response to minor perturbation of the cell division machinery in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of cell science*, 117(Pt 17), 3897–3910. <https://doi.org/10.1242/jcs.01244>
- Miwa, Y., Ohtsuka, H., Naito, C., Murakami, H., & Aiba, H. (2011). Ecl1, a regulator of the chronological lifespan of *Schizosaccharomyces pombe*, is induced upon nitrogen starvation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 75(2), 279–283. <https://doi.org/10.1271/bbb.100607>
- Moscattelli, A., Idilli, A. I., Rodighiero, S., & Caccianiga, M. (2012). Inhibition of actin polymerisation by low concentration Latrunculin B affects endocytosis and alters exocytosis in shank and tip of tobacco pollen tubes. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 14(5), 770–782. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2011.00547.x>
- Moseley, J. B., & Goode, B. L. (2006). The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 70(3), 605–645. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-06>
- Mruk, K., Farley, B. M., Ritacco, A. W., & Kobertz, W. R. (2014). Calmodulation meta-analysis: predicting calmodulin binding via canonical motif clustering. *The Journal of general physiology*, 144(1), 105–114. <https://doi.org/10.1085/jgp.201311140>
- Munn, A. L., Stevenson, B. J., Geli, M. I., & Riezman, H. (1995). end5, end6, and end7: mutations that cause actin delocalization and block the internalization step of endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 6(12), 1721–1742. <https://doi.org/10.1091/mbc.6.12.1721>
- Mutavchiev, D. R., Leda, M., & Sawin, K. E. (2016). Remodeling of the Fission Yeast Cdc42 Cell-Polarity Module via the Sty1 p38 Stress-Activated Protein Kinase Pathway. *Current biology : CB*, 26(21), 2921–2928. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.048>
- Nakanishi, A., Hatano, N., Fujiwara, Y., Sha'ri, A., Takabatake, S., Akano, H., Kanayama, N., Magari, M., Nozaki, N., & Tokumitsu, H. (2017). AMP-activated protein kinase-mediated feedback phosphorylation controls the Ca²⁺/calmodulin (CaM) dependence of Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase kinase β. *The Journal of biological chemistry*, 292(48), 19804–19813. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.805085>

- Nakashima, A., Sato, T., & Tamanoi, F. (2010). Fission yeast TORC1 regulates phosphorylation of ribosomal S6 proteins in response to nutrients and its activity is inhibited by rapamycin. *Journal of cell science*, 123(Pt 5), 777–786. <https://doi.org/10.1242/jcs.060319>
- Nakashima, A., Otsubo, Y., Yamashita, A., Sato, T., Yamamoto, M., & Tamanoi, F. (2012). Psk1, an AGC kinase family member in fission yeast, is directly phosphorylated and controlled by TORC1 and functions as S6 kinase. *Journal of cell science*, 125(Pt 23), 5840–5849. <https://doi.org/10.1242/jcs.111146>
- Navarro, F. J., & Nurse, P. (2012). A systematic screen reveals new elements acting at the G2/M cell cycle control. *Genome biology*, 13(5), R36. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-5-r36>
- Nemoto, N., Udagawa, T., Ohira, T., Jiang, L., Hirota, K., Wilkinson, C. R., Bähler, J., Jones, N., Ohta, K., Wek, R. C., & Asano, K. (2010). The roles of stress-activated Sty1 and Gcn2 kinases and of the protooncprotein homologue Int6/eIF3e in responses to endogenous oxidative stress during histidine starvation. *Journal of molecular biology*, 404(2), 183–201. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.09.016>
- Neumann, D., & Viollet, B. (2019). AMP-Activated Protein Kinase Signalling. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 766. <https://doi.org/10.3390/ijms20030766>
- Nilsson, D., & Sunnerhagen, P. (2011). Cellular stress induces cytoplasmic RNA granules in fission yeast. *RNA (New York, N.Y.)*, 17(1), 120–133. <https://doi.org/10.1261/rna.2268111>
- Nishida, I., Yokomi, K., Hosono, K., Hayashi, K., Matsuo, Y., Kaino, T., & Kawamukai, M. (2019). CoQ10 production in *Schizosaccharomyces pombe* is increased by reduction of glucose levels or deletion of *pk1*. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(12), 4899–4915. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09843-7>
- Nojima, H., Tokunaga, C., Eguchi, S., Oshiro, N., Hidayat, S., Yoshino, K., Hara, K., Tanaka, N., Avruch, J., & Yonezawa, K. (2003). The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *The Journal of biological chemistry*, 278(18), 15461–15464. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200665200>
- Nordin B. E. (1997). Calcium and osteoporosis. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 13(7-8), 664–686. [https://doi.org/10.1016/s0899-9007\(97\)83011-0](https://doi.org/10.1016/s0899-9007(97)83011-0)
- Nurse, P., Thuriaux, P., & Nasmyth, K. (1976). Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular & general genetics : MGG*, 146(2), 167–178. <https://doi.org/10.1007/BF00268085>
- Ohi, M. D., & Gould, K. L. (2002). Characterization of interactions among the Cef1p-Prp19p-associated splicing complex. *RNA (New York, N.Y.)*, 8(6), 798–815. <https://doi.org/10.1017/s1355838202025050>
- Ohtsuka, H., Mita, S., Ogawa, Y., Azuma, K., Ito, H., & Aiba, H. (2008). A novel gene, *ecl1(+)*, extends the chronological lifespan in fission yeast. *FEMS yeast research*, 8(4), 520–530. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00379.x>
- Ohtsuka, H., Ogawa, S., Kawamura, H., Sakai, E., Ichinose, K., Murakami, H., & Aiba, H. (2013). Screening for long-lived genes identifies *Oga1*, a guanine-quadruplex associated protein that affects the chronological lifespan of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular genetics and genomics : MGG*, 288(5-6), 285–295. <https://doi.org/10.1007/s00438-013-0748-6>

BIBLIOGRAFIA

- Okuno, S., Kitani, T., & Fujisawa, H. (2001). Regulation of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase kinase alpha by cAMP-dependent protein kinase: I. Biochemical analysis. *Journal of biochemistry*, 130(4), 503–513. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003013>
- Otero, J. H., Suo, J., Gordon, C., & Chang, E. C. (2010). Int6 and Moe1 interact with Cdc48 to regulate ERAD and proper chromosome segregation. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(1), 147–161. <https://doi.org/10.4161/cc.9.1.10312>
- Otsubo, Y., Nakashima, A., Yamamoto, M., & Yamashita, A. (2017). TORC1-Dependent Phosphorylation Targets in Fission Yeast. *Biomolecules*, 7(3), 50. <https://doi.org/10.3390/biom7030050>
- Pan, X., Lei, B., Zhou, N., Feng, B., Yao, W., Zhao, X., Yu, Y., & Lu, H. (2012). Identification of novel genes involved in DNA damage response by screening a genome-wide *Schizosaccharomyces pombe* deletion library. *BMC genomics*, 13, 662. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-662>
- Papp, L., Sipiczki, M., & Miklós, I. (2017). Expression pattern and phenotypic characterization of the mutant strain reveals target genes and processes regulated by pka1 in the dimorphic fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. *Current genetics*, 63(3), 487–497. <https://doi.org/10.1007/s00294-016-0651-x>
- Pataki, E., Weisman, R., Sipiczki, M., & Miklos, I. (2017). fhl1 gene of the fission yeast regulates transcription of meiotic genes and nitrogen starvation response, downstream of the TORC1 pathway. *Current genetics*, 63(1), 91–101. <https://doi.org/10.1007/s00294-016-0607-1>
- Paul, M., Ghosal, A., Bandyopadhyay, S., G, P., Selvam, U., Rai, N., & Sundaram, G. (2018). The fission yeast MAPK Spc1 senses perturbations in Cdc25 and Wee1 activities and targets Rad24 to restore this balance. *Yeast (Chichester, England)*, 35(3), 261–271. <https://doi.org/10.1002/yea.3289>
- Pearce, L. R., Sommer, E. M., Sakamoto, K., Wullschleger, S., & Alessi, D. R. (2011). Protor-1 is required for efficient mTORC2-mediated activation of SGK1 in the kidney. *The Biochemical journal*, 436(1), 169–179. <https://doi.org/10.1042/BJ20102103>
- Penfold, L., Woods, A., Muckett, P., Nikitin, A. Y., Kent, T. R., Zhang, S., Graham, R., Pollard, A., & Carling, D. (2018). CAMKK2 Promotes Prostate Cancer Independently of AMPK via Increased Lipogenesis. *Cancer research*, 78(24), 6747–6761. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0585>
- Petersen, J., & Nurse, P. (2007). TOR signalling regulates mitotic commitment through the stress MAP kinase pathway and the Polo and Cdc2 kinases. *Nature cell biology*, 9(11), 1263–1272. <https://doi.org/10.1038/ncb1646>
- Proctor, S. A., Minc, N., Boudaoud, A., & Chang, F. (2012). Contributions of turgor pressure, the contractile ring, and septum assembly to forces in cytokinesis in fission yeast. *Current biology : CB*, 22(17), 1601–1608. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.06.042>
- Psenakova, K., Petrvalska, O., Kylarova, S., Lentini Santo, D., Kalabova, D., Herman, P., Obsilova, V., & Obsil, T. (2018). 14-3-3 protein directly interacts with the kinase domain of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK2). *Biochimica et biophysica acta. General subjects*, 1862(7), 1612–1625. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.04.006>

BIBLIOGRAFIA

- Qin, H., Raught, B., Sonenberg, N., Goldstein, E. G., & Edelman, A. M. (2003). Phosphorylation screening identifies translational initiation factor 4GII as an intracellular target of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase I. *The Journal of biological chemistry*, 278(49), 48570–48579. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308781200>
- Racioppi, L., & Means, A. R. (2012). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2: roles in signaling and pathophysiology. *The Journal of biological chemistry*, 287(38), 31658–31665. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.356485>
- Rallis, C., Codlin, S., & Bähler, J. (2013). TORC1 signaling inhibition by rapamycin and caffeine affect lifespan, global gene expression, and cell proliferation of fission yeast. *Aging cell*, 12(4), 563–573. <https://doi.org/10.1111/ace1.12080>
- Rallis, C., Townsend, S., & Bähler, J. (2017). Genetic interactions and functional analyses of the fission yeast *gsk3* and *amk2* single and double mutants defective in TORC1-dependent processes. *Scientific reports*, 7, 44257. <https://doi.org/10.1038/srep44257>
- Rasmussen C. D. (2000). Cloning of a calmodulin kinase I homologue from *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of biological chemistry*, 275(1), 685–690. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.1.685>
- Ray, A., Bandyopadhyay, A., Matsumoto, T., Deng, H., & Maitra, U. (2008). Fission yeast translation initiation factor 3 subunit eIF3h is not essential for global translation initiation, but deletion of *eif3h+* affects spore formation. *Yeast (Chichester, England)*, 25(11), 809–823. <https://doi.org/10.1002/yea.1635>
- Reidman, S., Cohen, A., Kupiec, M., & Weisman, R. (2019). The cytosolic form of aspartate aminotransferase is required for full activation of TOR complex 1 in fission yeast. *The Journal of biological chemistry*, 294(48), 18244–18255. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010101>
- Ribeiro, M. J., Reinders, A., Boller, T., Wiemken, A., & De Virgilio, C. (1997). Trehalose synthesis is important for the acquisition of thermotolerance in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular microbiology*, 25(3), 571–581. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4961856.x>
- Rodríguez-López, M., Gonzalez, S., Hillson, O., Tunnacliffe, E., Codlin, S., Tallada, V. A., Bähler, J., & Rallis, C. (2020). The GATA Transcription Factor Gaf1 Represses tRNAs, Inhibits Growth, and Extends Chronological Lifespan Downstream of Fission Yeast TORC1. *Cell reports*, 30(10), 3240–3249.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.058>
- Rodriguez-Mora, O. G., LaHair, M. M., McCubrey, J. A., & Franklin, R. A. (2005). Calcium/calmodulin-dependent kinase I and calcium/calmodulin-dependent kinase kinase participate in the control of cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer research*, 65(12), 5408–5416. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0271>
- Romano, O., & Miccio, A. (2020). GATA factor transcriptional activity: Insights from genome-wide binding profiles. *IUBMB life*, 72(1), 10–26. <https://doi.org/10.1002/iub.2169>
- Roux, A. E., Leroux, A., Alaamery, M. A., Hoffman, C. S., Chartrand, P., Ferbeyre, G., & Rokeach, L. A. (2009). Pro-aging effects of glucose signaling through a G protein-coupled glucose receptor in fission yeast. *PLoS genetics*, 5(3), e1000408. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000408>
- Rupes, I., Jia, Z., & Young, P. G. (1999). Ssp1 promotes actin depolymerization and is involved in stress response and new end take-off control in fission yeast. *Molecular biology of the cell*, 10(5), 1495–1510. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.5.1495>

BIBLIOGRAFIA

Saitoh, S., & Yanagida, M. (2014). Does a shift to limited glucose activate checkpoint control in fission yeast?. *FEBS letters*, 588(15), 2373–2378. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.04.047>

Sajiki, K., Tahara, Y., Uehara, L., Sasaki, T., Pluskal, T., & Yanagida, M. (2018). Genetic regulation of mitotic competence in G0 quiescent cells. *Science advances*, 4(8), eaat5685. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aat5685>

Sakagami, H., & Kondo, H. (1993). Cloning and sequencing of a gene encoding the beta polypeptide of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV and its expression confined to the mature cerebellar granule cells. *Brain research. Molecular brain research*, 19(3), 215–218. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(93\)90029-o](https://doi.org/10.1016/0169-328x(93)90029-o)

Saitoh, S., Mori, A., Uehara, L., Masuda, F., Soejima, S., & Yanagida, M. (2015). Mechanisms of expression and translocation of major fission yeast glucose transporters regulated by CaMKK/phosphatases, nuclear shuttling, and TOR. *Molecular biology of the cell*, 26(2), 373–386. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-11-1503>

Sajiki, K., Hatanaka, M., Nakamura, T., Takeda, K., Shimanuki, M., Yoshida, T., Hanyu, Y., Hayashi, T., Nakaseko, Y., & Yanagida, M. (2009). Genetic control of cellular quiescence in *S. pombe*. *Journal of cell science*, 122(Pt 9), 1418–1429. <https://doi.org/10.1242/jcs.046466>

Sanchez-Marinas, M., Gimenez-Zaragoza, D., Martin-Ramos, E., Llanes, J., Cansado, J., Pujol, M. J., Bachs, O., & Aligue, R. (2018). Cmk2 kinase is essential for survival in arsenite by modulating translation together with RACK1 orthologue Cpc2 in *Schizosaccharomyces pombe*. *Free radical biology & medicine*, 129, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.024>

Sánchez-Piris, M., Posas, F., Alemany, V., Winge, I., Hidalgo, E., Bachs, O., & Aligue, R. (2002). The serine/threonine kinase Cmk2 is required for oxidative stress response in fission yeast. *The Journal of biological chemistry*, 277(20), 17722–17727. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200104200>

Sapio, L., Di Maiolo, F., Illiano, M., Esposito, A., Chiosi, E., Spina, A., & Naviglio, S. (2014). Targeting protein kinase A in cancer therapy: an update. *EXCLI journal*, 13, 843–855.

Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5712), 1098–1101. <https://doi.org/10.1126/science.1106148>

Schonbrun, M., Laor, D., López-Maury, L., Bähler, J., Kupiec, M., & Weisman, R. (2009). TOR complex 2 controls gene silencing, telomere length maintenance, and survival under DNA-damaging conditions. *Molecular and cellular biology*, 29(16), 4584–4594. <https://doi.org/10.1128/MCB.01879-08>

Schonbrun, M., Kolesnikov, M., Kupiec, M., & Weisman, R. (2013). TORC2 is required to maintain genome stability during S phase in fission yeast. *The Journal of biological chemistry*, 288(27), 19649–19660. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.464974>

Schreck, K. C., Allen, A. N., Wang, J., & Pratilas, C. A. (2020). Combination MEK and mTOR inhibitor therapy is active in models of glioblastoma. *Neuro-oncology advances*, 2(1), vdaa138. <https://doi.org/10.1093/naajnl/vdaa138>

Schutt, K. L., & Moseley, J. B. (2017). Transient activation of fission yeast AMPK is required for cell proliferation during osmotic stress. *Molecular biology of the cell*, 28(13), 1804–1814. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-04-0235>

Schutt, K. L., & Moseley, J. B. (2019). The phosphatase inhibitor Sds23 regulates cell division symmetry in fission yeast. *Molecular biology of the cell*, 30(23), 2880–2889. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-05-0254>

Senga, Y., Ishida, A., Shigeri, Y., Kameshita, I., & Sueyoshi, N. (2015). The Phosphatase-Resistant Isoform of CaMKI, Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase I δ (CaMKI δ), Remains in Its "Primed" Form without Ca²⁺ Stimulation. *Biochemistry*, 54(23), 3617–3630. <https://doi.org/10.1021/bi5012139>

Sha, Z., Brill, L. M., Cabrera, R., Kleinfeld, O., Scheliga, J. S., Glickman, M. H., Chang, E. C., & Wolf, D. A. (2009). The eIF3 interactome reveals the transosome, a supercomplex linking protein synthesis and degradation machineries. *Molecular cell*, 36(1), 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.026>

Shah, M., Su, D., Scheliga, J. S., Pluskal, T., Boronat, S., Motamedchaboki, K., Campos, A. R., Qi, F., Hidalgo, E., Yanagida, M., & Wolf, D. A. (2016). A Transcript-Specific eIF3 Complex Mediates Global Translational Control of Energy Metabolism. *Cell reports*, 16(7), 1891–1902. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.006>

Skelding, K. A., & Rostas, J. (2020). Regulation of Multifunctional Calcium/Calmodulin Stimulated Protein Kinases by Molecular Targeting. *Advances in experimental medicine and biology*, 1131, 649–679. https://doi.org/10.1007/978-3-030-12457-1_26

Smith, D. A., Toone, W. M., Chen, D., Bahler, J., Jones, N., Morgan, B. A., & Quinn, J. (2002). The *Srk1* protein kinase is a target for the *Sty1* stress-activated MAPK in fission yeast. *The Journal of biological chemistry*, 277(36), 33411–33421. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204593200>

Srivastava, T., Fortin, D. A., Nygaard, S., Kaech, S., Sonenberg, N., Edelman, A. M., & Soderling, T. R. (2012). Regulation of neuronal mRNA translation by CaM-kinase I phosphorylation of eIF4GII. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(16), 5620–5630. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0030-12.2012>

Strack, S., & Colbran, R. J. (1998). Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by the NR2B subunit of the N-methyl- D-aspartate receptor. *The Journal of biological chemistry*, 273(33), 20689–20692. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.33.20689>

Stettler, S., Warbrick, E., Prochnik, S., Mackie, S., & Fantes, P. (1996). The *wis1* signal transduction pathway is required for expression of cAMP-repressed genes in fission yeast. *Journal of cell science*, 109 (Pt 7), 1927–1935.

Stiefel, J., Wang, L., Kelly, D. A., Janoo, R. T., Seitz, J., Whitehall, S. K., & Hoffman, C. S. (2004). Suppressors of an adenylate cyclase deletion in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic cell*, 3(3), 610–619. <https://doi.org/10.1128/EC.3.3.610-619.2004>

Su, S. S., Tanaka, Y., Samejima, I., Tanaka, K., & Yanagida, M. (1996). A nitrogen starvation-induced dormant G0 state in fission yeast: the establishment from uncommitted G1 state and its delay for return to proliferation. *Journal of cell science*, 109 (Pt 6), 1347–1357.

Su, Y., Yang, Y., & Huang, Y. (2017). Loss of *ppr3*, *ppr4*, *ppr6*, or *ppr10* perturbs iron homeostasis and leads to apoptotic cell death in *Schizosaccharomyces pombe*. *The FEBS journal*, 284(2), 324–337. <https://doi.org/10.1111/febs.13978>

Sun, W., Wang, Z., Jiang, H., Zhang, J., Bähler, J., Chen, D., & Murchie, A. I. (2011). A novel function of the mitochondrial transcription factor *Mtf1* in fission yeast; *Mtf1* regulates the

BIBLIOGRAFIA

nuclear transcription of *srk1*. *Nucleic acids research*, 39(7), 2690–2700. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1179>

Swulius, M. T., & Waxham, M. N. (2008). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65(17), 2637–2657. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8086-2>

Takabatake, S., Ohtsuka, S., Sugawara, T., Hatano, N., Kanayama, N., Magari, M., Sakagami, H., & Tokumitsu, H. (2019). Regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase β by cAMP signaling. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*, 1863(4), 672–680. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.12.012>

Takabatake, S., Fukumoto, Y., Ohtsuka, S., Kanayama, N., Magari, M., Sakagami, H., Hatano, N., & Tokumitsu, H. (2020). Phosphorylation and dephosphorylation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase β at Thr144 in HeLa cells. *Biochemical and biophysical research communications*, S0006-291X(20)30324-7. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.056>

Takahara, T., & Maeda, T. (2012). TORC1 of fission yeast is rapamycin-sensitive. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 17(8), 698–708. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2012.01618.x>

Takata, T., Araki, S., Tsuchiya, Y., & Watanabe, Y. (2020). Persulfide Signaling in Stress-Initiated Calmodulin Kinase Response. *Antioxidants & redox signaling*, 10.1089/ars.2020.8138. Advance online publication. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8138>

Takeda, K., Mori, A., & Yanagida, M. (2011). Identification of genes affecting the toxicity of anti-cancer drug bortezomib by genome-wide screening in *S. pombe*. *PloS one*, 6(7), e22021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022021>

Takeda, T., & Yamamoto, M. (1987). Analysis and in vivo disruption of the gene coding for calmodulin in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(11), 3580–3584. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.11.3580>

Takeda, T., Toda, T., Kominami, K., Kohnosu, A., Yanagida, M., & Jones, N. (1995). *Schizosaccharomyces pombe atf1+* encodes a transcription factor required for sexual development and entry into stationary phase. *The EMBO journal*, 14(24), 6193–6208.

Tallada, V. A., Daga, R. R., Palomeque, C., Garzón, A., & Jimenez, J. (2002). Genome-wide search of *Schizosaccharomyces pombe* genes causing overexpression-mediated cell cycle defects. *Yeast (Chichester, England)*, 19(13), 1139–1151. <https://doi.org/10.1002/yea.902>

Tanabe, T., Yamaga, M., Kawamukai, M., & Matsuo, Y. (2019). Mal3 is a multi-copy suppressor of the sensitivity to microtubule-depolymerizing drugs and chromosome mis-segregation in a fission yeast *pka1* mutant. *PloS one*, 14(4), e0214803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214803>

Tang, Y., & McLeod, M. (2004). In vivo activation of protein kinase A in *Schizosaccharomyces pombe* requires threonine phosphorylation at its activation loop and is dependent on PDK1. *Genetics*, 168(4), 1843–1853. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.032466>

Tatebe, H., Morigasaki, S., Murayama, S., Zeng, C. T., & Shiozaki, K. (2010). Rab-family GTPase regulates TOR complex 2 signaling in fission yeast. *Current biology : CB*, 20(22), 1975–1982. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.10.026>

- Tatebe, H., Murayama, S., Yonekura, T., Hatano, T., Richter, D., Furuya, T., Kataoka, S., Furuita, K., Kojima, C., & Shiozaki, K. (2017). Substrate specificity of TOR complex 2 is determined by a ubiquitin-fold domain of the Sin1 subunit. *eLife*, 6, e19594. <https://doi.org/10.7554/eLife.19594>
- Thaler, C., Koushik, S. V., Puhl, H. L., 3rd, Blank, P. S., & Vogel, S. S. (2009). Structural rearrangement of CaMKIIalpha catalytic domains encodes activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(15), 6369–6374. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901913106>
- Tokumitsu, H., Enslin, H., & Soderling, T. R. (1995). Characterization of a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase cascade. Molecular cloning and expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase. *The Journal of biological chemistry*, 270(33), 19320–19324. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.33.19320>
- Tokumitsu, H., Hatano, N., Fujimoto, T., Yurimoto, S., & Kobayashi, R. (2011). Generation of autonomous activity of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase kinase β by autophosphorylation. *Biochemistry*, 50(38), 8193–8201. <https://doi.org/10.1021/bi201005g>
- Tremblay, M., Sanchez-Ferras, O., & Bouchard, M. (2018). GATA transcription factors in development and disease. *Development (Cambridge, England)*, 145(20), dev164384. <https://doi.org/10.1242/dev.164384>
- Turnham, R. E., & Scott, J. D. (2016). Protein kinase A catalytic subunit isoform PRKACA; History, function and physiology. *Gene*, 577(2), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.11.052>
- Uboha, N. V., Flajolet, M., Nairn, A. C., & Picciotto, M. R. (2007). A calcium- and calmodulin-dependent kinase Ialpha/microtubule affinity regulating kinase 2 signaling cascade mediates calcium-dependent neurite outgrowth. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(16), 4413–4423. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0725-07.2007>
- Urano, J., Sato, T., Matsuo, T., Otsubo, Y., Yamamoto, M., & Tamanoi, F. (2007). Point mutations in TOR confer Rheb-independent growth in fission yeast and nutrient-independent mammalian TOR signaling in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(9), 3514–3519. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608510104>
- Valbuena, N., & Moreno, S. (2010). TOR and PKA pathways synergize at the level of the Ste11 transcription factor to prevent mating and meiosis in fission yeast. *PloS one*, 5(7), e11514. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011514>
- Valbuena, N., Rozalén, A. E., & Moreno, S. (2012). Fission yeast TORC1 prevents eIF2 α phosphorylation in response to nitrogen and amino acids via Gcn2 kinase. *Journal of cell science*, 125(Pt 24), 5955–5959. <https://doi.org/10.1242/jcs.105395>
- van Slegtenhorst, M., Khabibullin, D., Hartman, T. R., Nicolas, E., Kruger, W. D., & Henske, E. P. (2007). The Birt-Hogg-Dube and tuberous sclerosis complex homologs have opposing roles in amino acid homeostasis in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of biological chemistry*, 282(34), 24583–24590. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700857200>
- Villa, N., Do, A., Hershey, J. W., & Fraser, C. S. (2013). Human eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) protein binds to eIF3c, -d, and -e to promote mRNA recruitment to the ribosome. *The Journal of biological chemistry*, 288(46), 32932–32940. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.517011>

BIBLIOGRAFIA

- Vo, T. V., Das, J., Meyer, M. J., Cordero, N. A., Akturk, N., Wei, X., Fair, B. J., Degatano, A. G., Fragoza, R., Liu, L. G., Matsuyama, A., Trickey, M., Horibata, S., Grimson, A., Yamano, H., Yoshida, M., Roth, F. P., Pleiss, J. A., Xia, Y., & Yu, H. (2016). A Proteome-wide Fission Yeast Interactome Reveals Network Evolution Principles from Yeasts to Human. *Cell*, 164(1-2), 310–323. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.037>
- von Arnim, A. G., & Chamovitz, D. A. (2003). Protein homeostasis: a degrading role for Int6/eIF3e. *Current biology : CB*, 13(8), R323–R325. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(03\)00238-0](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00238-0)
- Wachtler, V., Huang, Y., Karagiannis, J., & Balasubramanian, M. K. (2006). Cell cycle-dependent roles for the FCH-domain protein Cdc15p in formation of the actomyosin ring in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular biology of the cell*, 17(7), 3254–3266. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-11-1086>
- Wang, J., Tadeo, X., Hou, H., Tu, P. G., Thompson, J., Yates, J. R., 3rd, & Jia, S. (2013). Epe1 recruits BET family bromodomain protein Bdf2 to establish heterochromatin boundaries. *Genes & development*, 27(17), 1886–1902. <https://doi.org/10.1101/qad.221010.113>
- Wang, L., Griffiths, K., Jr, Zhang, Y. H., Ivey, F. D., & Hoffman, C. S. (2005). *Schizosaccharomyces pombe* adenylate cyclase suppressor mutations suggest a role for cAMP phosphodiesterase regulation in feedback control of glucose/cAMP signaling. *Genetics*, 171(4), 1523–1533. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.047233>
- Wang, L. Y., Shimada, K., Morishita, M., & Shiozaki, K. (2005). Response of fission yeast to toxic cations involves cooperative action of the stress-activated protein kinase Spc1/Sty1 and the Hal4 protein kinase. *Molecular and cellular biology*, 25(10), 3945–3955. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.10.3945-3955.2005>
- Warren, D. T., Andrews, P. D., Gourlay, C. W., & Ayscough, K. R. (2002). Sla1p couples the yeast endocytic machinery to proteins regulating actin dynamics. *Journal of cell science*, 115(Pt 8), 1703–1715.
- Watanabe, D., Kajihara, T., Sugimoto, Y., Takagi, K., Mizuno, M., Zhou, Y., Chen, J., Takeda, K., Tatebe, H., Shiozaki, K., Nakazawa, N., Izawa, S., Akao, T., Shimoi, H., Maeda, T., & Takagi, H. (2018). Nutrient Signaling via the TORC1-Greatwall-PP2AB55δ Pathway Is Responsible for the High Initial Rates of Alcoholic Fermentation in Sake Yeast Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, 85(1), e02083-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02083-18>
- Watanabe, Y., & Yamamoto, M. (1996). *Schizosaccharomyces pombe* pcr1+ encodes a CREB/ATF protein involved in regulation of gene expression for sexual development. *Molecular and cellular biology*, 16(2), 704–711. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.2.704>
- Wayman, G. A., Tokumitsu, H., & Soderling, T. R. (1997). Inhibitory cross-talk by cAMP kinase on the calmodulin-dependent protein kinase cascade. *The Journal of biological chemistry*, 272(26), 16073–16076. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.26.16073>
- Weisman, R., Choder, M., & Koltin, Y. (1997). Rapamycin specifically interferes with the developmental response of fission yeast to starvation. *Journal of bacteriology*, 179(20), 6325–6334. <https://doi.org/10.1128/jb.179.20.6325-6334.1997>
- Weisman, R., & Choder, M. (2001). The fission yeast TOR homolog, tor1+, is required for the response to starvation and other stresses via a conserved serine. *The Journal of biological chemistry*, 276(10), 7027–7032. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010446200>

Weisman, R., Roitburg, I., Nahari, T., & Kupiec, M. (2005). Regulation of leucine uptake by tor1+ in *Schizosaccharomyces pombe* is sensitive to rapamycin. *Genetics*, 169(2), 539–550. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.034983>

Weisman, R., Roitburg, I., Schonbrun, M., Harari, R., & Kupiec, M. (2007). Opposite effects of tor1 and tor2 on nitrogen starvation responses in fission yeast. *Genetics*, 175(3), 1153–1162. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.064170>

Welch, E. J., Jones, B. W., & Scott, J. D. (2010). Networking with AKAPs: context-dependent regulation of anchored enzymes. *Molecular interventions*, 10(2), 86–97. <https://doi.org/10.1124/mi.10.2.6>

Welton, R. M., & Hoffman, C. S. (2000). Glucose monitoring in fission yeast via the Gpa2 galpha, the git5 Gbeta and the git3 putative glucose receptor. *Genetics*, 156(2), 513–521.

Weston, L., Greenwood, J., & Nurse, P. (2017). Genome-wide screen for cell growth regulators in fission yeast. *Journal of cell science*, 130(12), 2049–2055. <https://doi.org/10.1242/jcs.200865>

Whalen, W. A., Yoon, J. H., Shen, R., & Dhar, R. (1999). Regulation of mRNA export by nutritional status in fission yeast. *Genetics*, 152(3), 827–838.

Witczak, C. A., Fujii, N., Hirshman, M. F., & Goodyear, L. J. (2007). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-alpha regulates skeletal muscle glucose uptake independent of AMP-activated protein kinase and Akt activation. *Diabetes*, 56(5), 1403–1409. <https://doi.org/10.2337/db06-1230>

Wolf, D. A., Lin, Y., Duan, H., & Cheng, Y. (2020). eIF-Three to Tango: emerging functions of translation initiation factor eIF3 in protein synthesis and disease. *Journal of molecular cell biology*, 12(6), 403–409. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjaa018>

Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M. A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., Cronin, A., Davis, P., Feltwell, T., Fraser, A., Gentles, S., Goble, A., Hamlin, N., Harris, D., Hidalgo, J., Hodgson, G., Holroyd, S., Hornsby, T., Howarth, S., Huckle, E.J., Hunt, S., Jagels, K., James, K., Jones, L., Jones, M., Leather, S., McDonald, S., McLean, J., Mooney, P., Moule, S., Mungall, K., Murphy, L., Niblett, D., Odell, C., Oliver, K., O'Neil, S., Pearson, D., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Rutter, S., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Skelton, J., Simmonds, M., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Taylor, R.G., Tivey, A., Walsh, S., Warren, T., Whitehead, S., Woodward, J., Volckaert, G., Aert, R., Robben, J., Grymonprez, B., Weltjens, I., Vanstreels, E., Rieger, M., Schäfer, M., Müller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M., Düsterhöft, A., Fritz, C., Holzer, E., Moestl, D., Hilbert, H., Borzym, K., Langer, I., Beck, A., Lehrach, H., Reinhardt, R., Pohl, T.M., Eger, P., Zimmermann, W., Wedler, H., Wambutt, R., Purnelle, B., Goffeau, A., Cadieu, E., Dréano, S., Gloux, S., Lelaure, V., Mottier, S., Galibert, F., Aves, S.J., Xiang, Z., Hunt, C., Moore, K., Hurst, S.M., Lucas, M., Rochet, M., Gaillardin, C., Tallada, V.A., Garzon, A., Thode, G., Daga, R.R., Cruzado, L., Jimenez, J., Sánchez, M., del Rey, F., Benito, J., Domínguez, A., Revuelta, J.L., Moreno, S., Armstrong, J., Forsburg, S.L., Cerutti, L., Lowe, T., McCombie, W.R., Paulsen, I., Potashkin, J., Shpakovski, G.V., Ussery, D., Barrell, B.G., Nurse, P. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, 415(6874), 871–880. <https://doi.org/10.1038/nature724>

Wood, V., Harris, M. A., McDowall, M. D., Rutherford, K., Vaughan, B. W., Staines, D. M., Aslett, M., Lock, A., Bähler, J., Kersey, P. J., & Oliver, S. G. (2012). PomBase: a comprehensive online resource for fission yeast. *Nucleic acids research*, 40(Database issue), D695–D699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr853>

BIBLIOGRAFIA

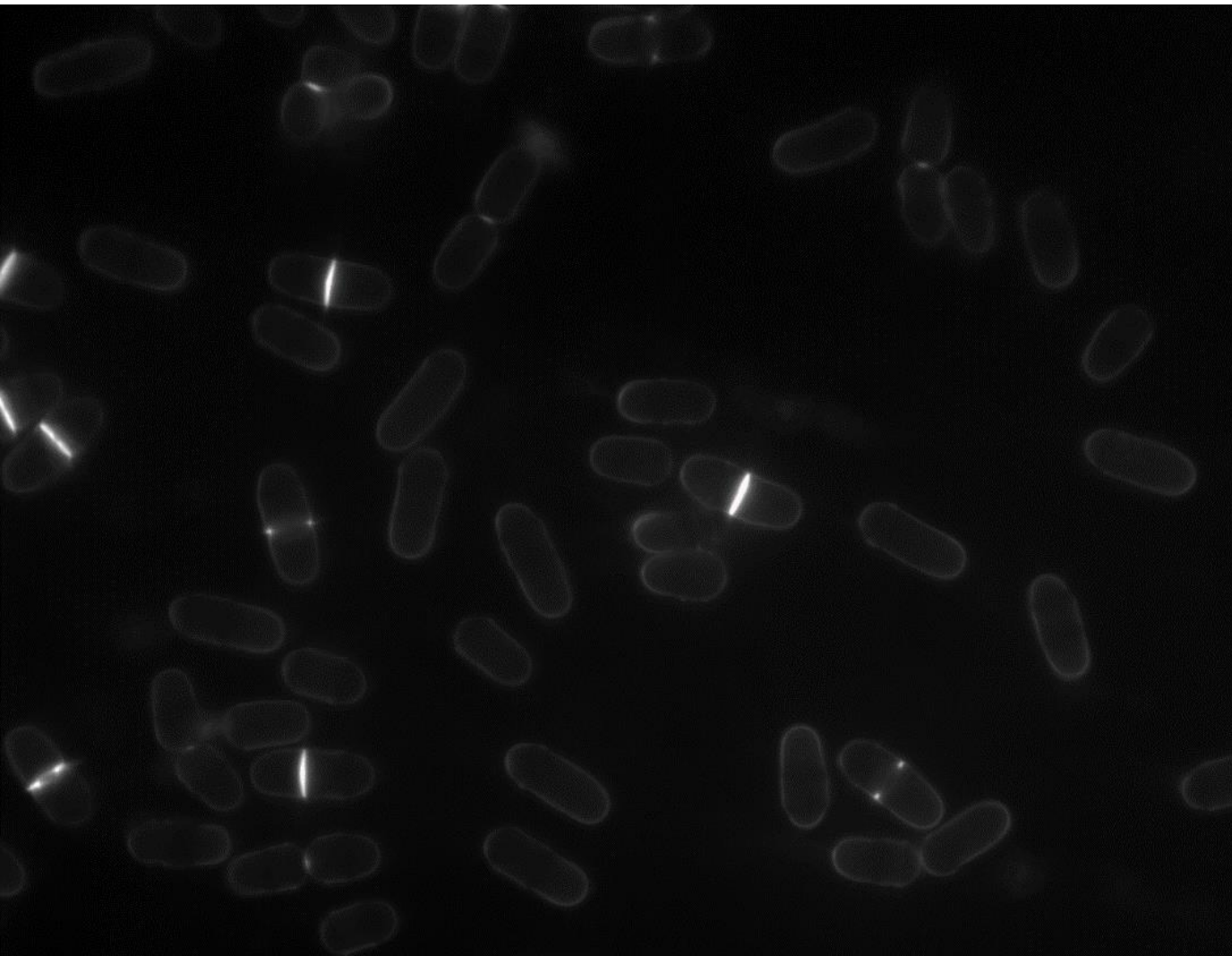
- Wu, J. Y., Ribar, T. J., Cummings, D. E., Burton, K. A., McKnight, G. S., & Means, A. R. (2000). Spermiogenesis and exchange of basic nuclear proteins are impaired in male germ cells lacking Camk4. *Nature genetics*, 25(4), 448–452. <https://doi.org/10.1038/78153>
- Yamauchi, M., Kambe, F., Cao, X., Lu, X., Kozaki, Y., Oiso, Y., & Seo, H. (2008). Thyroid hormone activates adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase via intracellular calcium mobilization and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.), 22(4), 893–903. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0249>
- Yanagida, M., Ikai, N., Shimanuki, M., & Sajiki, K. (2011). Nutrient limitations alter cell division control and chromosome segregation through growth-related kinases and phosphatases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 366(1584), 3508–3520. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0124>
- Yance-Chávez, T. (2015). Estudio y caracterización de la nueva quinasa dependiente de calmodulina: CKK2. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona. <http://hdl.handle.net/2445/102941>
- Yang, G., Murashige, D. S., Humphrey, S. J., & James, D. E. (2015). A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell reports*, 12(6), 937–943. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.016>
- Yang, H., Jiang, X., Li, B., Yang, H. J., Miller, M., Yang, A., Dhar, A., & Pavletich, N. P. (2017). Mechanisms of mTORC1 activation by RHEB and inhibition by PRAS40. *Nature*, 552(7685), 368–373. <https://doi.org/10.1038/nature25023>
- Yang, P., Du, H., Hoffman, C. S., & Marcus, S. (2003). The phospholipase B homolog Plb1 is a mediator of osmotic stress response and of nutrient-dependent repression of sexual differentiation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular genetics and genomics* : MGG, 269(1), 116–125. <https://doi.org/10.1007/s00438-003-0820-8>
- Yano, S., Tokumitsu, H., & Soderling, T. R. (1998). Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature*, 396(6711), 584–587. <https://doi.org/10.1038/25147>
- Yen, H. C., & Chang, E. C. (2000). Yin6, a fission yeast Int6 homolog, complexes with Moe1 and plays a role in chromosome segregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(26), 14370–14375. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.26.14370>
- Yen, H. C., Gordon, C., & Chang, E. C. (2003). *Schizosaccharomyces pombe* Int6 and Ras homologs regulate cell division and mitotic fidelity via the proteasome. *Cell*, 112(2), 207–217. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00043-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00043-6)
- Yu, G., Li, J., & Young, D. (1994). The *Schizosaccharomyces pombe* pka1 gene, encoding a homolog of cAMP-dependent protein kinase. *Gene*, 151(1-2), 215–220. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90659-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90659-9)
- Zamora, M., & Villena, J. A. (2014). Targeting mitochondrial biogenesis to treat insulin resistance. *Current pharmaceutical design*, 20(35), 5527–5557. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140306102514>
- Zheng, J., Zeng, X., & Wang, S. (2015). Calcium ion as cellular messenger. *Science China. Life sciences*, 58(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s11427-014-4795-y>

BIBLIOGRAFIA

Zhou, C., Arslan, F., Wee, S., Krishnan, S., Ivanov, A. R., Oliva, A., Leatherwood, J., & Wolf, D. A. (2005). PCI proteins eIF3e and eIF3m define distinct translation initiation factor 3 complexes. *BMC biology*, 3, 14. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-3-14>

Zuin, A., Carmona, M., Morales-Ivorra, I., Gabrielli, N., Vivancos, A. P., Ayté, J., & Hidalgo, E. (2010). Lifespan extension by calorie restriction relies on the Sty1 MAP kinase stress pathway. *The EMBO journal*, 29(5), 981–991. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.407>

ANNEX



Annex

Taula Annex 1. Proteïnes fosforilades a la soca wt que no estan fosforilades a la soca $\Delta ckk2$ en condicions d'estrès de calci.

Gen	ID	Proteïna	Residus fosforilats
abc2	SPAC3F10.11c	glutathione S-conjugate-exporting ATPase Abc2	S843
abo1	SPAC31G5.19	ATPase with bromodomain protein	S133
abp1	SPAPJ760.02c	cofilin/tropomyosin family, drebrin ortholog Abp1	T148, S315, S364
abp2	SPBC1861.02	unknown protein, may bind replication origins Abp2	S177
ade10	SPCPB16A4.03c	bifunctional IMP cyclohydrolase/phosphoribosylaminoimidazolecarboxamideformyltransferase	S257
adn3	SPCC1494.10	transcription factor Adn3	S688, S707, S713
ado1	SPCC338.14	adenosine kinase (predicted)	S74, S93, T111
ags1	SPCC1281.01	alpha glucan synthase Ags1	S1703, S1843
aim21	SPBC18E5.07	DUF3210 family conserved fungal protein	S212, S217, S219, T423
alp14	SPCC895.07	TOG/XMAP215 microtubule plus end tracking polymerase Alp14	S543, S548, T577
alp7	SPAC890.02c	TACC protein Alp7	S17
aly2	SPBC2D10.04	arrestin Aly1 related Aly2	S51, S65
amk2	SPCC1919.03c	AMP-activated protein kinase beta subunit Amk2	S191
aru1	SPAC3H1.07	arginase Aru1	T259, T261, T268
ase1	SPAPB1A10.09	antiparallel microtubule cross-linking factor Ase1	T668, S701
ask1	SPBC27.02c	DASH complex subunit Ask1, mug181	T136
asp1	SPCC1672.06c	inositol hexakisphosphate kinase/inositol pyrophosphate synthase (predicted)	T718
atd2	SPAC922.07c	aldehyde dehydrogenase (predicted)	T453, T483
atf1	SPBC29B5.01	transcription factor, Atf-CREB family Atf1	S140, S145, T216, S240
ath1	SPBC21B10.03c	ataxin-2 homolog	S749, S750
avt3	SPAC3H1.09c	vacuolar amino acid transmembrane transporter Avt3	S22, S24, S55, S74
bbc1	SPAC23A1.17	WIP family cytoskeletal protein Bbc1 (predicted)	S322, S589, T748, S751
bdf1	SPCC1450.02	Swr1 complex bromodomain subunit Bdf1	S23, S391
bfr1	SPCC18B5.01c	brefeldin A transmembrane transporter Bfr1	S476
bgs4	SPCC1840.02c	secondary septum 1,6 branched 1,3-beta-glucan synthase catalytic subunit Bgs4	S108, S969, S971
bir1	SPCC962.02c	survivin, Bir1	S229, T231, S244, S278, S311, S755
blt1	SPBC1A4.05	ubiquitin domain-like protein Blt1	S495
bms1	SPBC31E1.06	GTP binding protein Bms1 (predicted)	S438, S442
bop1	SPAP32A8.03c	ubiquitin-protein ligase E3, human RNF126 ortholog (predicted)	S487
bsd1	SPAC328.07c	human NEDD4 family-interacting protein ortholog (predicted)	T67
bub1	SPCC1322.12c	mitotic spindle checkpoint kinase Bub1	T423, S532
bud6	SPAC15A10.16	actin interacting protein 3 homolog Bud6	T1294
bun107	SPAC31A2.14	WD repeat protein, human WDR48 family Bun107	S688, S690
bun107	SPAC31A2.14	WD repeat protein, human WDR48 family Bun107	S655

ANNEX

byr3	SPAC13D6.02c	translational activator, zf-CCHC type zinc finger protein (predicted)	S174
byr4	SPAC222.10c	two-component GAP Byr4	S499
cch1	SPAC6F6.01	plasma membrane calcium ion import channel Cch1	S1775
cdc11	SPCC1739.11c	SIN component scaffold protein, centriolin ortholog Cdc11	S135
cdc12	SPAC1F5.04c	formin Cdc12	S126
cdc15	SPAC20G8.05c	extended Fer/CIP4 (EFC) domain protein Cdc15	S535, S546, S605, S715
cdc25	SPAC24H6.05	M phase inducer tyrosine phosphatase Cdc25	S143
cdc28	SPBC19C2.01	ATP-dependent RNA helicase Cdc28	S95
cdc37	SPBC9B6.10	Hsp90 co-chaperone Cdc37	S14, S17, S77, S79, S87
cdc8	SPAC27F1.02c	tropomyosin	S45, S47, S50
cdk9	SPBC32H8.10	P-TEFb-associated cyclin-dependent protein kinase Cdk9	S6, T572, T589
cdr2	SPAC57A10.02	serine/threonine protein kinase Cdr2	S587
cek1	SPCC1450.11c	serine/threonine protein kinase Cek1	S567, S1019
cfr1	SPAC6G9.12	exomer complex BRCT domain subunit Cfr1	T359
cgs1	SPAC8C9.03	cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit Cgs1	S52
cho2	SPBC26H8.03	phosphatidylethanolamine N-methyltransferase Cho2	S21
cip1	SPBC16A3.18	RNA-binding protein Cip1	T191, T425
cki3	SPAC1805.05	serine/threonine protein kinase Cki3	T351, S360, T363
clp1	SPAC1782.09c	Cdc14-related protein phosphatase Clp1/Flp1	S468
cnt5	SPBC17G9.08c	Centaurin Cnt5	S625, S628
cnx1	SPAC3C7.11c	calnexin Cnx1	T555
cop1	SPBPJ4664.04	coatamer alpha subunit Cop1 (predicted)	S409
coy1	SPCC364.04c	CASP family protein involved in Golgi vesicle transport Coy1 (predicted)	S407
cph1	SPAC16C9.05	Clr6 histone deacetylase associated PHD protein-1 Cph1	S65, S100
cps3	SPAC3A11.02	zf-CCCH type zinc finger protein, unknown biological role Cps3, potential makorin ortholog	S372, S376
cpy1	SPAC19G12.10c	vacuolar carboxypeptidase Y	S137
crf1	SPAC22H10.11c	TOR signaling pathway transcriptional corepressor Crf1 (predicted)	S171
crn1	SPAC23C4.02	actin binding protein, coronin Crn1	S459, S553
csi1	SPBC2G2.14	mitotic centromere-SPB clustering protein Csi1	S418
csr102	SPAC3H8.02	sec14 cytosolic factor family, phospholipid-intermembrane transfer protein Csr102 (predicted)	S77
csx1	SPAC17A2.09c	RNA-binding protein Csx1	S16, S266
cut12	SPBC649.05	spindle pole body protein Cut12	S354
cut2	SPBC14C8.01c	securin, sister chromatid separation inhibitor	S287
cut6	SPAC56E4.04c	acetyl-CoA/biotin carboxylase	S2104
cwf19	SPAC30D11.09	complexed with Cdc5 protein Cwf19	S398
cwf20	SPCC4B3.14	complexed with Cdc5 protein Cwf20	T129
cwf21	SPAC4A8.09c	complexed with Cdc5 protein Cwf21	T116, S286
cwf22	SPBC13E7.01	splicing factor Cwf22	S759, S761, S821, S823
cwf28	SPBC3B9.02c	splicing factor Cwf28	S277
cwf5	SPCC550.02c	Ppr19 complex subunit, RNA-binding Cwf5	S334

cyk3	SPAC9G1.06c	Nebulin-family actin filament anchoring protein Cyk3	S153, S154, S156, T185, S209, S213
dbp2	SPBP8B7.16c	ATP-dependent RNA helicase Dbp2	S97
dbp6	SPCC285.03	ATP-dependent RNA helicase Dbp6 (predicted)	S50, T335
dbs2	SPAC167.05	Usp (universal stress protein) family protein	S103, T106, S333, S335, T362
dca7	SPBC17D11.08	WD repeat protein, DDB1 and CUL4-associated factor Dca7 (predicted)	S10
dcn1	SPBC839.03c	neddylation protein Dcn1 (predicted)	S20
def1	SPBC354.10	RNAPII degradation factor Def1 (predicted)	S347, S406, S635, T733, S878
dep1	SPBC21C3.02c	Sds3-like family protein Dep1	S83, S223
dfr1	SPCC1223.08c	dihydrofolate reductase/ serine hydrolase family fusion protein Dfr1	S459
din1	SPAC19D5.06c	RNA pyrophosphohydrolase Din1	S214
dis3	SPBC26H8.10	3'-5' exoribonuclease subunit Dis3	S236
dis32	SPAC2C4.07c	3'-5'-exoribonuclease activity Dis3L2	T889, T897, T901
dlp1	SPAC19G12.12	decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 Dlp1	S187
dnf1	SPAC821.13c	trans-Golgi network aminophospholipid translocase (flippase), Dnf1 (predicted)	S154
dnf2	SPAC24B11.12c	P-type ATPase (predicted)	T1366, S1392, S1394
dnt1	SPBC25D12.02c	nucleolar protein Dnt1	T225
dsc2	SPAC1486.02c	Golgi Dsc E3 ligase complex subunit Dsc2	T266
edc1	SPAC18G6.09c	Dcp2-Dcp1 mRNA-decapping complex subunit Edc1	S133, S183
edc3	SPBC18E5.11c	enhancer of mRNA decapping Edc3	S135
ede1	SPBC800.10c	EPS15 repeat family actin cortical patch component (predicted)	S402, S411
efm2	SPCC338.11c	elongation factor EF2/EF3 methyltransferase lysine methyltransferase Efm2 (predicted)	T256
egd2	SPBC25H2.05	nascent polypeptide-associated complex alpha subunit Egd2	T116
eis1	SPCC63.14	eisosome assembly protein eis1	S628, S941, S997, S1018, T1058
ekc1	SPCC663.01c	protein phosphatase regulatory subunit Ekc1	S711, S737
elf1	SPAC3C7.08c	AAA family ATPase Elf1	S1041
ell1	SPBP23A10.14c	RNA polymerase II transcription elongation factor SpELL	S183, S192, S354
emc4	SPCC1281.03c	ER membrane protein complex subunit Emc4 (predicted)	S55, S57
end3	SPBC11G11.02c	actin cortical patch component End3 (predicted)	S38
enp2	SPCC330.09	rRNA processing protein Enp2 (predicted)	T526
ent1	SPCC162.07	epsin	S176, S212, T430, T521, T524, S536, T587
ent3	SPCC794.11c	ENTH/VHS domain protein Ent3 (predicted)	S228
exo2	SPAC17A5.14	exonuclease II Exo2	S1242
far8	SPBC1773.01	SIP/FAR complex striatin subunit, Far8/Csc3	S202
fas2	SPAC4A8.11c	fatty acid synthase alpha subunit Fas2	S604
fep1	SPAC23E2.01	iron-sensing transcription factor Fep1	S162
fft2	SPCC1235.05c	SMARCAD1 family ATP-dependent DNA helicase Fft2 (predicted)	T1104, S1108
fim1	SPBC1778.06c	fimbrin	S104

ANNEX

fip1	SPAC1F7.07c	plasma membrane iron permease Fip1	S338, S344, S376
fkh1	SPBC839.17c	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Fkh1	S45
fkh2	SPBC16G5.15c	forkhead transcription factor Fkh2	S430, S435
fmd1	SPBC1539.07c	glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase (predicted)	T179, T180, S219
frg1	SPBP23A10.12	FRG1 family protein, involved in mRNA splicing (predicted)	S191
frp1	SPBC1683.09c	plasma membrane ferric-chelate reductase Frp1	T554
ftp105	SPAC17A5.16	Golgi localized protein, human HID1 ortholog 3, implicated in vesicle-mediated transport	S664
fyu1	SPCC1322.04	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase Fyu1	S17
gad8	SPCC24B10.07	AGC family protein kinase Gad8	S41, S44
gaf1	SPCC1902.01	transcription factor Gaf1	S195, S500
gar2	SPAC140.02	nucleolar protein required for rRNA processing	S488
gcs2	SPCC737.06c	glutamate-cysteine ligase regulatory subunit Gcs2 (predicted)	S32
gcv3	SPBP19A11.01	glycine decarboxylase complex subunit H (predicted)	S111
gef1	SPAC24H6.09	Cdc42 RhoGEF Gef1	T97
gef2	SPAC31A2.16	RhoGEF Gef2	S736
get2	SPCC1235.06	GET complex (ER membrane insertion) subunit Get2	S38
glc8	SPAC17A5.09c	protein phosphatase regulatory subunit Glc8 (predicted)	S216
glo3	SPAC22E12.17c	ARF GTPase activating protein (predicted)	S211, T218
gnd1	SPBC660.16	phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	T479
gpd1	SPBC215.05	glycerol-3-phosphate dehydrogenase Gpd1	S376, T382
gpd3	SPBC354.12	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase Gpd3	T184
gpx1	SPBC32F12.03c	glutathione peroxidase Gpx1	S74
grc3	SPCC830.03	polynucleotide 5'-hydroxyl-kinase Grc3 (predicted)	T608
gus1	SPAC17A5.15c	cytoplasmic glutamate-tRNA ligase Gus1 (predicted)	T303, T655
gyp51	SPAC26F1.09	GTPase activating protein Gyp51 (predicted)	S219
gyp7	SPAC630.05	GTPase activating protein Gyp7 (predicted)	S235
hal4	SPAC29A4.16	serine/threonine protein kinase Hal4	S244
hba1	SPBC365.13c	Ran GTPase binding protein Hba1	S136
hem2	SPAC1805.06c	porphobilinogen synthase Hem2 (predicted)	S166, S168
hfl1	SPAC30D11.06c	Lazarus1 family transmembrane transporter	S364
hhp1	SPBC3H7.15	serine/threonine protein kinase Hhp1	S326
hip1	SPBC31F10.13c	hira protein, histone chaperone Hip1	T425
hip3	SPBC31F10.14c	HIRA interacting protein Hip3	S1542
hmg1	SPCC162.09c	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase Hmg1	S1024, T1028, S1033
hmo1	SPBC28F2.11	HMG box protein Hmo1	S194, S295, S297
hrp3	SPAC3G6.01	ATP-dependent DNA helicase Hrp3	T77, S974
hrs1	SPBC2G2.12	mitochondrial and cytoplasmic histidine-tRNA ligase Hrs1 (predicted)	S39
hsp9	SPAP8A3.04c	heat shock protein Hsp9	T18
hsr1	SPAC3H1.11	transcription factor Hsr1	S33
hta1	SPCC622.08c	histone H2A alpha	S122

htr12	SPAC23G3.12c	serine protease, involved in lipid metabolism (predicted)	T20
iec5	SPAPB1E7.14	Ino80 complex subunit Iec5	S128
ies4	SPAC23G3.04	Ino80 complex subunit Ies4	S32
imp2	SPBC11C11.02	contractile ring protein Imp2	S456, S461
imt3	SPAC17G8.11c	mannosyltransferase Imt3	S336
ino80	SPAC29B12.01	SNF2 family ATP-dependent 3' to 5' DNA helicase Ino80	S272, T529
inp53	SPAC9G1.10c	inositol polyphosphate phosphatase Inp53 (predicted)	S74, S193, S195, S211
ins1	SPCC306.05c	INSIG domain protein	S28
ipk1	SPCC4B3.10c	inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate (IP5) kinase	S338
iss1	SPAC22G7.10	mRNA cleavage and polyadenylation specificity factor complex subunit, Fip1 homolog (predicted)	S243
iss10	SPAC7D4.14c	NURS complex subunit Iss10	S328, S334, S434
kap11 1	SPAC22G7.02	karyopherin Kap111 (predicted)	S563, S566, S572
kap12 3	SPBC14F5.03c	karyopherin Kap123	T531, T535, S613
kcs1	SPCC970.08	inositol polyphosphate kinase Kcs1 (predicted)	T92, T96, S671
kgd1	SPBC3H7.03c	2-oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide) (e1 component of oxoglutarate dehydrogenase complex) (predicted)	T477
kin1	SPBC4F6.06	microtubule affinity-regulating kinase Kin1	S68, S91, S531, S532, S535, S598, S741
klp2	SPAC664.10	minus-end directed microtubule motor kinesin-14, Klp2	S44
klp3	SPAC1834.07	kinesin-like protein Klp3	S205, T214, S218
klp9	SPBC15D4.01c	kinesin-like protein Klp9	S596, S605, S611
knk1	SPBC947.01	AAA family ATPase kink, Knk1	S145, S167, S188
kri1	SPAC22G7.05	ribosome biogenesis protein Kri1 (predicted)	S225
krp1	SPBC17G9.03c	cytoplasmic lysine-tRNA ligase Krs1 (predicted)	S62
ksp1	SPBC16E9.13	serine/threonine protein kinase Ksp1 (predicted)	S322
laf1	SPAC14C4.12c	Clr6 L associated factor 1 Laf1	S136
laf2	SPCC1682.13	Clr6 associated factor 2, Laf2	S111, S114, S131
lag1	SPAC1A6.09c	sphingosine N-acyltransferase Lag1	S374
lar1	SPAC1527.03	RNA-binding protein (predicted)	S444, S449
lcp5	SPAC18B11.06	U3 snoRNP-associated protein Lcp5 (predicted)	S134
lem2	SPAC18G6.10	inner nuclear membrane protein involved in chromatin silencing Heh1/Lem2	S206
leu2	SPAC9E9.03	3-isopropylmalate dehydratase Leu2	S744
liz1	SPBC2G2.01c	plasma membrane pantothenate transmembrane transporter Liz1	T141, Y143
lsb1	SPBC119.05c	Wiskott-Aldrich syndrome homolog binding protein Lsb1 (predicted)	S121, S122
lsb4	SPAPJ696.02	actin cortical patch component Lsb4 (predicted)	S322
lsk1	SPAC2F3.15	P-TEFb-associated cyclin-dependent protein kinase Lsk1	S189, S190
ltv1	SPAC3F10.17	ribosome biogenesis protein Ltv1 (predicted)	S171, S179
mac1	SPAC13G7.04c	plasma membrane anchored protein Mac1	S256, S260, S294, S295, S298, T333, S356, T375, S523, S549, T697
mak1	SPAC1834.08	histidine kinase Mak1	S16
man1	SPAC14C4.05c	LEM domain protein Man1, Sad1 interacting factor	S312

ANNEX

mcm4	SPCC16A11.17	MCM complex subunit Mcm4/Cdc21	S58, S64, S91
mcm7	SPBC25D12.03c	MCM complex subunit Mcm7	S44
mdb1	SPACUNK4.14	BRCT domain protein Mdb1	T319, S364, S365, S366
med1	SPAC2F7.04	mediator complex subunit Med1	S8
med15	SPBC146.01	mediator complex subunit Med15	S177
meu7	SPBC16A3.13	alpha-amylase homolog Aah4	T661, T676, S678
mga2	SPAC26H5.05	PT/TIG ankyrin repeat containing transcription regulator of fatty acid biosynthesis (predicted)	T122, S524, T1000, T1002
mis3	SPBC25B2.05	rRNA processing protein Mis3	T83, T94, T97
mlo1	SPCC31H12.03c	RNA binding protein (predicted)	T125
mmb1	SPBC25B2.07c	mitochondrial microtubule binder Mmb1	S213, T359
mmi1	SPCC736.12c	nucleus specific RNA binding exosome specificity factor Mmi1	S66, T312
mnr2	SPAC17A2.14	vacuolar CorA family magnesium ion transmembrane transporter Mnr2	S165
mob2	SPCC970.04c	protein kinase activator Mob2	S29, S31
mod5	SPBC530.04	Tea1 anchoring protein Mod5	T29, S46, T55
moe1	SPAC637.07	translation initiation factor eIF3d Moe1	Y85, S92
mot1	SPBC1826.01c	TATA-binding protein associated factor Mot1 (predicted)	S244
mpd2	SPAC4F10.13c	GYF domain protein	S52, S113, S195, S505, S509, S511, S547, S562, S831, S951
mpe1	SPBP8B7.15c	mRNA cleavage ubiquitin-protein ligase E3 Mpe1 (predicted)	T458
mrđ1	SPBP22H7.02c	RNA-binding protein Mrđ1 (predicted)	S218, S248
mrt4	SPBC11G11.03	mRNA turnover and ribosome assembly protein Mrt4 (predicted)	T160
msh6	SPCC285.16c	MutS protein homolog	S128, S149, S301
mso1	SPAC1F5.05c	exocytic docking protein Mso1	T61, S105
mtl2	SPAC11G7.01	serine-rich Schizosaccharomyces specific protein	S299
mto1	SPCC417.07c	gamma tubulin complex linker Mto1	S1005, S1009
mto2	SPBC902.06	gamma tubulin complex linker Mto2	S275
mug123	SPCC16C4.17	Schizosaccharomyces specific protein Mug123	S9
mug147	SPBC56F2.06	Schizosaccharomyces specific protein Mug147	S210, S227
mug2	SPBC106.08c	mug2/mug135/meu2 family	S153
mug72	SPCC1902.02	oxidoreductase (predicted)	S567
mvd1	SPAC24C9.03	diphosphomevalonate decarboxylase mvd1 (predicted)	T117, S123, S124,
mvp1	SPAC3A11.06	sorting nexin Mvp1 (predicted)	S280, S284
ned1	SPAC1952.13	lipin, phosphatidate phosphatase Ned1	S159, S318, S321
nep2	SPBC32H8.02c	NEDD8 protease Nep2	S367
nmd3	SPAC16C9.03	export adaptor Nmd3 (predicted)	T469
nnk1	SPCC70.05c	serine/threonine protein kinase Nnk1 (predicted)	T142
nog1	SPBC651.01c	ribosome export GTP binding protein Nog1 (predicted)	S381
nop58	SPAC23G3.06	U3 snoRNP protein Nop58 (predicted)	S33, S417
nsk1	SPAC3G9.01	Clp1-interacting, microtubule plus-end binding Nsk1	S433, S441

nst1	SPAC29E6.10c	conserved fungal NST1 family protein	S358, S965
ntp1	SPBC660.07	alpha,alpha-trehalase Ntp1	S16, S71
nuc1	SPBC4C3.05c	DNA-directed RNA polymerase I complex large subunit Nuc1	S1438, S1441
nup124	SPAC30D11.04c	nucleoporin Nup124	S168, S244
nup146	SPAC23D3.06c	nucleoporin, WD repeat Nup146	T463, S479, S897
nup40	SPAC19E9.01c	nucleoporin Nup40	S27, S148
nup60	SPCC285.13c	nucleoporin Nup60	T265, T303, S305, S310, T319
nur1	SPCC4G3.11	Lem2-Nur1 complex subunit Nur1	S268
nvj2	SPBC23G7.06c	nucleus-vacuole junction protein Nvj2	S473, S668
nxt3	SPBP8B7.11	ubiquitin protease cofactor Nxt3 (predicted)	S167
obr1	SPAC3C7.14c	NAD(P)H dehydrogenase (quinone) (predicted)	S181
osh2	SPBC2F12.05c	sterol binding ankyrin repeat protein (predicted)	S394, S846, T869
oxs1	SPBC29A10.12	Oxidative stress transcription corepressor Oxs1	S88
paf1	SPAC664.03	RNA polymerase II associated Paf1 complex (predicted)	S388, S394
pal1	SPCP1E11.04c	membrane associated protein Pal1	S119, S244, S361
pan1	SPAC25G10.09c	actin cortical patch component, with EF hand and WH2 motif Pan1 (predicted)	(T463 o T499), (T573 o T622 o T688), (T668 o T734), S1039, S1053, T1758
pan3	SPAC1B1.04c	PAN complex protein phosphotransferase subunit Pan3 (predicted)	S146, S165
pap1	SPAC1783.07c	transcription factor Pap1/Caf3	T297, T313
pcf2	SPAC26H5.03	CAF assembly factor (CAF-1) complex subunit B, Pcf2	S231, S468
pcy1	SPCC1827.02c	cholinephosphate cytidyltransferase Pcy1 (predicted)	S22, S315, S318
pdi3	SPBC3D6.13c	ER associated protein disulfide isomerase Pdi3	S708
pdr16	SPCC23B6.04c	meiotic sec14 cytosolic factor family, phospholipid-intermembrane transfer protein Pdr16 (predicted)	S400, T420
peg1	SPAC3G9.12	CLASP family microtubule-associated protein	S860
pep12	SPBC31E1.04	SNARE Pep12	S197
pep7	SPAC17G6.08	prevacuole/endosomal FYVE tethering component Pep7 (predicted)	S20
pet1	SPAC22F8.04	Golgi phosphoenolpyruvate transmembrane transporter Pet1	S12, S47
pfs2	SPAC12G12.14c	mRNA cleavage and polyadenylation specificity factor complex, WD repeat protein Pfs2	T377
pho84	SPBC8E4.01c	inorganic phosphate transmembrane transporter (predicted)	S12
php4	SPBC16E9.01c	CCAAT-binding factor complex subunit Php4	S17
php5	SPBC3B8.02	CCAAT-binding factor complex subunit Php5	S62
pic1	SPBC336.15	kinetochore protein, INCENP ortholog Pic1	S156, T189, T196, S286, S475, S497, S526
pik1	SPAC22E12.16c	1-phosphatidylinositol 4-kinase Pik1	S343
pil1	SPCC736.15	eisosome BAR domain protein Pil1	S310, S313
pit1	SPAC3C7.06c	serine/threonine protein kinase, meiotic Pit1	T198, S202
pka1	SPBC106.10	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit Pka1	S350
pkd2	SPAC1F7.03	TRP-like calcium ion channel Pkd2	T653
plc1	SPAC22F8.11	phosphoinositide phospholipase C Plc1	S22

ANNEX

pmc1	SPAPB2B4.04c	vacuolar calcium transporting P-type ATPase P2 type, Pmc1	S26, T1251
pmp31	SPCC1183.09c	plasma membrane proteolipid Pmp31	S95, S97
png2	SPBC1709.11c	ING family histone acetyltransferase complex PHD-type zinc finger subunit Png2	S197, S198
pob1	SPBC1289.04c	Boi family protein	S194, S463, S652
pof1	SPAC57A10.05c	F-box/WD repeat protein Pof1	S232
pol2	SPBC25H2.13c	DNA polymerase epsilon catalytic subunit Pol2	T1763, S1770
pom1	SPAC2F7.03c	DYRK family cell polarity protein kinase Pom1	S310
pop4	SPBC1703.01c	RNase P and RNase MRP subunit	S75
ppk14	SPAC4G8.05	serine/threonine protein kinase Ppk14 (predicted)	S100, T527
ppk15	SPAC823.03	serine/threonine protein kinase Ppk15 (predicted)	T502
ppk22	SPBC1861.09	serine/threonine protein kinase Ppk22 (predicted)	S94
ppk29	SPBC557.04	Ark1/Prk1 family protein kinase Ppk29	T503, S512, S769
ppk3	SPAC15A10.13	protein kinase domain and HEAT repeat protein Ppk3	S562, S564, S571
ppk38	SPCP1E11.02	Ark1/Prk1 family protein kinase Ppk38	T400
ppp1	SPBC19F5.05c	pescadillo-family BRCT domain protein Ppp1 (predicted)	T320
prp11	SPCC10H11.01	ATP-dependent RNA helicase Prp11	T853
prp4	SPCC777.14	serine/threonine protein kinase Prp4	T80, S94
prz1	SPAC4G8.13c	calcineurin responsive transcription factor Prz1	S543
pst1	SPBC12C2.10c	Clr6 histone deacetylase complex subunit Pst1	S442, S904
ptc3	SPAC2G11.07c	MAP kinase threonine phosphatase, protein phosphatase 2c homolog Ptc3	S389
ptr2	SPBC13A2.04c	PTR family peptide transmembrane transporter Ptr2	S13, S53
pub1	SPAC11G7.02	HECT-type ubiquitin-protein ligase E3 Pub1	T153, S154
puf2	SPBP35G2.14	pumilio family RNA-binding protein Puf2	S516
puf3	SPAC1687.22c	pumilio family RNA-binding protein Puf3 (predicted)	S129
puf3	SPAC1687.22c	pumilio family RNA-binding protein Puf3 (predicted)	S156
puf6	SPCP1E11.11	pumilio family RNA-binding protein Puf6 (predicted)	S53
pus1	SPCC126.03	TruA family tRNA/ U2 snRNA pseudouridine synthase Lsp1	S24
pus7	SPBC1A4.09	pseudouridine synthase Pus7 (predicted)	S502
pwi1	SPCC825.05c	splicing coactivator Srm160 (predicted)	S209, S211
pwp2	SPBC713.04c	U3 snoRNP-associated protein Utp1 (predicted)	S105
pyp1	SPAC26F1.10c	tyrosine phosphatase Pyp1	T239
rad1	SPAC1952.07	checkpoint clamp complex protein Rad1	T318
rad4	SPAC23C4.18c	BRCT domain protein Rad4	T589, T591
rad8	SPAC13G6.01c	ubiquitin-protein ligase E3 involved in DNA repair Rad8	S25, S31
rba50	SPBC947.13	RNA polymerase II associated protein (predicted)	S233
reb1	SPBC1198.11c	RNA polymerase I transcription termination factor/ RNA polymerase II transcription factor Reb1	S141
red5	SPBC337.12	NURS complex subunit Red5	S66
reg1	SPAC227.15	protein phosphatase regulatory subunit Reg1 (predicted)	S185, S411
rei1	SPCC550.15c	ribosome biogenesis protein Rei1 (predicted)	S175

rga2	SPAC26A3.09c	RhoGAP, GTPase activating protein Rga2	S864
rga3	SPAC29A4.11	RhoGAP, GTPase activating protein Rga3	S629
rga4	SPBC28E12.03	RhoGAP, GTPase activating protein Rga4	T87, S378
rga6	SPBC354.13	RhoGAP, GTPase activating protein Rga6 (predicted)	T2, T7, T12
rga7	SPBC23G7.08c	RhoGAP, GTPase activating protein Rga7	S436, S492, S496
rga8	SPAC13A11.01c	RhoGAP, GTPase activating protein Rga8	S772
rgf1	SPCC645.07	RhoGEF for Rho1, Rgf1	S528
rgf3	SPCC645.06c	RhoGEF Rgf3	S74, S94
rib1	SPAP27G11.09c	GTP cyclohydrolase Rib1 (predicted)	S139
rix7	SPBC16E9.10c	ribosome assembly ATPase Rix7 (predicted)	S423
rna15	SPAC644.16	RNA-binding protein Rna15	T297
rnf10	SPBP8B7.23	ubiquitin-protein ligase E3 (predicted)	T600
rng10	SPAC688.07c	coiled-coil protein involved in septum formation Rng10	S238, S664, S971
rnp24	SPAC3G6.04	RNA-binding protein Rnp24	S322
rpl3201	SPBC16C6.11	60S ribosomal protein L32	S19
rpl701	SPBC18H10.12c	60S ribosomal protein L7a involved in ribosome biogenesis	S58
rpl702	SPAC3H5.07	60S ribosomal protein L7b involved in cytoplasmic translation	S29
rpl8	SPBC29A3.04	60S ribosomal protein L7a/L8 (predicted)	S33
rpn11	SPAC31G5.13	19S proteasome regulatory subunit Rpn11	T101, T128, T136
rpn1302	SPCC16A11.16c	19S proteasome regulatory subunit Rpn13b	S204, S205, S229
rpp201	SPBP8B7.06	60S acidic ribosomal protein A2	T67
rps13	SPAC6F6.07c	40S ribosomal protein S13	S32
rps901	SPAC24H6.07	40S ribosomal protein S9	S161
rps902	SPBC29A3.12	40S ribosomal protein S9 (predicted)	S161
rrp15	SPAC227.02c	rRNA processing protein Rrp15 (predicted)	S18
rrp5	SPCC1183.07	U3 snoRNP-associated protein Rrp5 (predicted)	T1391
rsc4	SPBC1734.15	RSC complex subunit Rsc4	S315
rsd1	SPAC19G12.07c	RNA-binding protein Rsd1 (predicted)	S132, S334
rsm23	SPBC29A3.15c	mitochondrial ribosomal protein subunit S23 (predicted)	S95, S101, S102
rst2	SPAC6F12.02	transcription factor Rst2	T141, S292, S369
rud3	SPBC119.12	Golgi matrix protein Rud3 (predicted)	S385
sak1	SPAC3G9.14	transcriptional activator Sak1	S224
sap114	SPAC22A12.09c	U2 snRNP subunit Sap114	S339
sap61	SPBC36.09	U2 snRNP-associated protein sap61	S360
scd1	SPAC16E8.09	RhoGEF Scd1	S639, S642
sce3	SPBC18H10.04c	translation initiation factor (predicted)	T284, T350, T357
sck1	SPAC1B9.02c	serine/threonine protein kinase Sck1	S12, S14, S21
scr1	SPBC1D7.02c	transcription factor Scr1	S275, S396, S400, S410, S424, S480
scs22	SPAC17C9.12	VAP family protein Scs22	S264
scw1	SPCC16C4.07	RNA-binding protein Scw1	S55, S68, T300, S309, T369, T375, T388, T393

ANNEX

sea3	SPAC11E3.05	ubiquitin-protein ligase E3, coatamer related complex subunit Sea3 (predicted)	T84, S103, S106
sec16	SPAC29B12.07	multidomain vesicle coat component Sec16 (predicted)	S1587
sec17	SPAC959.02	alpha SNAP (predicted)	S76
sec2	SPAC23C4.10	guanyl-nucleotide exchange factor Sec2 (predicted)	T356
sec24	SPAC22F8.08	COPII cargo receptor Sec24/Sfb2 subunit	S108
sec3	SPAC17G8.12	exocyst complex subunit Sec3	S274
sec62	SPAC17G6.09	ER protein translocation subcomplex subunit Sec62 (predicted)	S254, S257
sec74	SPAC26F1.01	guanyl-nucleotide exchange factor Sec74 (predicted)	S70
sec9	SPBC26H8.02c	SNAP-25 homologue, t-SNARE component Sec9	S141, T144, S164, T165
1-Sep	SPBC4C3.12	forkhead transcription factor Sep1	S426, S429
set2	SPAC29B12.02c	histone lysine methyltransferase Set2	S36, S37
sfh1	SPCC16A11.14	RSC complex subunit Sfh1	T60, T64
sfp47	SPAC7D4.02c	Ubp4 interactor Sfp47	S266
shd1	SPAC16E8.01	cytoskeletal protein binding protein Sla1 family, Shd1 (predicted)	T278, S306, S919, S927, T928, T984, T1152
shk1	SPBC1604.14c	PAK-related kinase Shk1	S78
sir1	SPAC10F6.01c	sulfite reductase beta subunit Sir1	S220, S712
sks2	SPBC1709.05	heat shock protein, ribosome associated molecular chaperone Sks2	S353, T421, S557
sle1	SPAC1A6.07	eisosome assembly protein Seg1	S606
sly1	SPCC74.01	SNARE binding protein Sly1 (predicted)	S36
smi1	SPBC30D10.17c	cell wall biosynthesis/ cell cycle regulator (predicted)	S72, S79, S500
snf22	SPCC1620.14c	ATP-dependent DNA helicase Snf22	S405
snf30	SPAC23G3.07c	SWI/SNF complex subunit Snf30	T239
sod22	SPAC3A11.09	plasma membrane sodium ion/proton antiporter Sod22	T674
sog2	SPBC887.09c	leucine-rich repeat protein Sog2	T358, S404, S421
sol1	SPBC30B4.04c	SWI/SNF complex subunit Sol1	S342
spo15	SPAC1F3.06c	mitotic and meiotic spindle pole body protein Spo15	S82, S617
spt2	SPCC1393.02c	non-specific DNA binding protein Spt2 (predicted)	S281
spt5	SPAC23C4.19	DSIF transcription elongation factor complex subunit Spt5	T832, T845, T872, T881, T890
spt7	SPBC25H2.11c	SAGA complex bromodomain subunit Spt7	S156
sqs1	SPBC30B4.02c	R3H and G-patch domain protein Sqs1 (predicted)	S513
srk1	SPCC1322.08	MAPK-activated protein kinase Srk1	S25
ssa1	SPAC13G7.02c	heat shock protein Ssa1 (predicted)	T36
ssa2	SPCC1739.13	heat shock protein Ssa2 (csp6, hsp70)	T36
ssn6	SPBC23E6.09	transcriptional corepressor Ssn6	S840
ssp2	SPCC74.03c	AMP-activated protein serine/threonine kinase alpha subunit Ssp2	S382
sst4	SPAC19A8.05c	sorting receptor for ubiquitinated membrane proteins, ESCRT 0 complex subunit Sst4	T302
ssz1	SPAC57A7.12	heat shock protein Ssz1 (predicted)	S131, S144
ste11	SPBC32C12.02	transcription factor Ste11	S206, S208, S250
str3	SPAC1F8.03c	siderophore-iron transmembrane transporter Str3	T6
sts5	SPCC16C4.09	cytoplasmic P body 3'-5'-exoribonuclease, Dis3L2-related (predicted)	T377

stt4	SPBC577.06c	1-phosphatidylinositol 4-kinase Stt4	T1762, S1765
sty1	SPAC24B11.06c	MAP kinase Sty1	T171
sum3	SPCC1795.11	translation initiation RNA helicase Sum3	S52, S606
sup35	SPCC584.04	cytoplasmic translation release factor class II eRF3	S71
syp1	SPBC4C3.06	F-BAR domain protein Syp1 (predicted)	S438
taf1	SPAC2G11.14	transcription factor TFIID complex subunit Taf111	S808
taf12	SPAC15A10.02	transcription factor TFIID complex subunit A/ SAGA complex subunit Taf12	T221
taf4	SPAC23G3.09	transcription factor TFIID complex subunit Taf4 (predicted)	S41
tan1	SPBC25H2.10c	tRNA acetyltransferase Tan1 (predicted)	S72
tbc13	SPAC1952.17c	GTPase activating protein, involved in vesicle- mediated transport (predicted)	S527
tcb2	SPCP31B10.06	tricalbin, C2 domain protein (phospholipid binding) ER-plasma membrane tethering protein Tcb2 (predicted)	S1061
tcb3	SPAPYUK71.03c	tricalbin, C2 domain protein (phospholipid binding) ER-plasma membrane tethering protein Tcb3	S853
tco89	SPCC162.12	TORC1 subunit Tco89	S304
tdh1	SPBC32F12.11	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Tdh1	T184
tea1	SPCC1223.06	cell end marker Tea1	S476, S503
tea2	SPBC1604.20c	kinesin family plus-end microtubule motor Tea2	S50
tea3	SPAC6G10.02c	cell end marker Tea3	S983
tea3	SPAC6G10.02c	cell end marker Tea3	S1058
tef3	SPCC417.08	translation elongation factor eEF3	S38, T127, S424, S510, S768, S783, S981
tef5	SPCC1450.04	translation elongation factor EF-1 beta subunit, guanyl-nucleotide exchange factor (eEF1B)	S8
tfg1	SPCC1620.09c	transcription factor TFIIIF complex alpha subunit Tfg1 (predicted)	T388, T390
tho1	SPCP25A2.03	THO complex subunit Tho1 (predicted)	S652
tif211	SPAC3G9.09c	translation initiation factor eIF2 alpha subunit	S303
tif224	SPAC21E11.06	translation initiation factor eIF2B delta subunit	S19, S102
tif33	SPAC4A8.16c	translation initiation factor eIF3c	S20, S162, S163
tif35	SPBC18H10.03	translation initiation factor eIF3g	S6, S189
tif471	SPAC17C9.03	translation initiation factor eIF4G	S112, S199, S501, S652, S789, S942, S1349, S1353, S1357
tif51	SPAC26H5.10c	translation elongation and termination factor eIF5A (predicted)	S75, S77
tif512	SPBC336.10c	translation elongation and termination factor eIF5A (predicted)	S87, S89
tif52	SPAC56F8.03	translation initiation factor eIF5B Tif52 (predicted)	S77, S213, S218
tif6	SPCC1919.09	translation initiation factor-like ribosome biogenesis protein	S175
tip1	SPAC3C7.12	CLIP170 family protein Tip1	S82
tmf1	SPBC365.07c	Golgi coiled-coil protein Tmf1 (predicted)	S420
top1	SPBC1703.14c	DNA topoisomerase I	S52, S111, T166
top2	SPBC1A4.03c	DNA topoisomerase II	S1363
tpr1	SPAC27D7.14c	RNA polymerase II associated Paf1 complex subunit Tpr1	S930
tps3	SPACUNK4.16c	alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase (predicted)	S163

ANNEX

trm1	SPBC25D12.05	tRNA (guanine-N2-)-methyltransferase Trm1	S93
trm401	SPAC17D4.04	tRNA (cytosine-5-)-methyltransferase (predicted)	T308, S321, T327
trr1	SPBC3F6.03	thioredoxin reductase Trr1	T49, T50, T65
trs1	SPBC25H2.02	cytoplasmic threonine-tRNA ligase Trs1 (predicted)	S242, S250, S251
trs120	SPAC6G10.05c	TRAPP complex subunit Trs120	S208, S211
tup12	SPAC630.14c	transcriptional corepressor Tup12	T180, S213
twf1	SPCC126.06	twinfilin (predicted)	S143
uap2	SPBC1289.02c	U2 snRNP-associated protein Uap2	S103
uap56	SPAC17G6.14c	TREX complex subunit, ATP-dependent RNA helicase Uap56	S44
ubp14	SPBC6B1.06c	Lys48-specific deubiquitinase Ubp14	S694
ubp16	SPCC1682.12c	ubiquitin C-terminal hydrolase Ubp16	S61
ubp6	SPAC6G9.08	ubiquitin C-terminal hydrolase Ubp6	S360
ubp7	SPAC23G3.08c	ubiquitin C-terminal hydrolase Ubp7	S337, S440, S638
ubp9	SPBC1703.12	ubiquitin C-terminal hydrolase Ubp9	S549
ubx3	SPAC343.09	UBX domain protein Ubx3, Cdc48 cofactor	T64
ulp2	SPAC17A5.07c	SUMO deconjugating cysteine peptidase Ulp2 (predicted)	S49, S90
ura1	SPAC22G7.06c	carbamoyl-phosphate synthase (glutamine hydrolyzing), aspartate carbamoyltransferase Ura1	S1866
urg1	SPAC1002.19	GTP cyclohydrolase II Urg1 (predicted)	S432
utp16	SPBP8B7.10c	U3 snoRNP-associated protein Utp16 (predicted)	S132
utp18	SPBC29A3.06	CGI-48 family Utp18 (predicted)	S140
utp22	SPBC776.08c	small-subunit processome, UTP-C complex subunit Utp22 (predicted)	T19
utp502	SPCC1450.03	ribonucleoprotein (RNP) complex Utp502 (predicted)	S231
vgl1	SPCC550.14	KH domain RNA binding protein, vigilin (predicted)	S95, T120, S122, S125, S147, S150
vma10	SPBC1289.05c	V-type ATPase V1 domain subunit G (predicted)	S93
vps1302	SPBC16C6.02c	chorein homolog Vps1302 (predicted)	T549, T562
vps5	SPCPJ732.01	retromer complex subunit Vps5	S112
vps901	SPBC4F6.10	guanyl-nucleotide exchange factor Vps902	S453
vtc2	SPAC14C4.11	vacuolar transporter chaperone (VTC) complex polyphosphate synthetase subunit, Vtc2/3 (predicted)	T529
vts1	SPBC13E7.03c	Smaug family RNA binding protein involved in CCR4-NOT dependent deadenylation (predicted)	S218, S432
win1	SPAC1006.09	MAP kinase kinase kinase Win1	S188
wis1	SPBC409.07c	MAP kinase kinase Wis1	T120, S201
yap18	SPBC19F8.03c	ENTH/VHS domain protein (predicted)	S330, S410, T414, S415, S419
yrs1	SPCC1672.05c	cytoplasmic tyrosine-tRNA ligase Yrs1 (predicted)	S393
ysh1	SPAC17G6.16c	mRNA cleavage and polyadenylation specificity factor complex endoribonuclease subunit Ysh1	S712
zds1	SPAC31F12.01	zds family protein phosphatase type A regulator Zds1 (predicted)	T600, T606, T789
zip2	SPCC126.09	vacuolar membrane zinc transmembrane transporter (predicted)	S149, S153
zuo1	SPBC1778.01c	ribosome-associated chaperone, zotin (predicted)	S281

	SPAC12G12.0 7c	conserved fungal protein	S57, S319
	SPAC1420.01c	DUF1752 family protein, involved in regulation of transcription (predicted)	S181, S236, S238
	SPAC144.05	ATP-dependent DNA helicase/ ubiquitin-protein ligase E3 (predicted)	T737, S738
	SPAC144.17c	6-phosphofructo-2-kinase (predicted)	S106
	SPAC16A10.03 c	ubiquitin-protein ligase E3 involved in vesicle docking Pep5/Vps11-like (predicted)	T829, T831
	SPAC222.13c	6-phosphofructo-2-kinase (predicted)	S70
	SPAC22A12.14 c	BSD domain protein, unknown biological role	S259
	SPAC22F8.05	alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase (predicted)	T88, S109
	SPAC25B8.08	Golgi Ras-interacting protein with DIL domain, human RADIL and RASIP1 ortholog (predicted), implicated in vesicle-mediated transport	S305
	SPAC25G10.0 1	RNA-binding protein involved in histone acetylation	S199
	SPAC29A4.09	rRNA exonuclease Rrp17 (predicted)	T153, S157
	SPAC3G6.07	Schizosaccharomyces specific protein	Y63, T85
wdr44	SPAC3H5.08c	WD repeat protein, human WDR44 family	S138, S262
	SPAC3H5.09c	mitochondrial protein, human KIAA0100 ortholog (predicted)	T2074, T2080
	SPAC458.02c	mRNP complex (predicted)	S105, S342
	SPAC4G8.04	GTPase activating protein (predicted)	T327, S349, S364
	SPAC57A7.05	ER transmembrane transporter (predicted)	S141
	SPAC607.07c	Schizosaccharomyces specific protein	S113, S118
	SPAC694.02	DEAD/DEAH box helicase, human DDL60 and DDL60L ortholog	S518
	SPAC7D4.12c	ThrE amino acid transmembrane transporter family protein	T44, S60
	SPAC806.06c	nicotinamide mononucleotide (NMN) adenylyltransferase (predicted)	S26, S32
	SPAC824.09c	GTPase activating protein (predicted)	S254
	SPAC8C9.04	Schizosaccharomyces specific protein	S167, S176, T500
	SPAPB1A10.0 5	Schizosaccharomyces specific protein	T23
	SPAPB1A10.1 3	Schizosaccharomyces specific protein	S135
	SPAPB1E7.01c	DUF3245 nucleolar protein, conserved in fungi and plant family	T127
	SPAPYUG7.05	delta-1-pyrroline-5-carboxylate reductase (predicted)	S96
	SPBC12C2.03c	methionine synthase reductase (predicted)	S21
	SPBC13E7.07	Schizosaccharomyces specific protein	S156
	SPBC1604.12	Schizosaccharomyces specific phosphoprotein	S70, S73, S603
	SPBC16E9.02c	CUE domain protein, human TOLLIP ortholog	S418
	SPBC16H5.08c	ribosome biogenesis ATPase, Arb family ABCF2-like (predicted)	S64
	SPBC1773.04	methylglyoxyl reductase (NADPH-dependent) (predicted)	T153, S160
	SPBC17A3.05c	DNAJ/DUF1977, human DNAJB12 homolog, Hsp70 co-chaperone (predicted)	T64
	SPBC17D1.05	Schizosaccharomyces specific protein	S157, S160
	SPBC1E8.02	ER ubiquitin family protein (predicted)	S227

ANNEX

	SPBC20F10.02c	DUF1741 family protein, human C10orf76 ortholog	T60, Y70, S74
	SPBC21B10.07	glycosyl hydrolase family (predicted)	S21, S23
	SPBC25B2.03	zf-C3HC4 type zinc finger	S125
	SPBC27B12.12c	CorA family magnesium ion transmembrane transporter (predicted)	S29
	SPBC30D10.15	snoRNP assembly factor Naf1 (predicted)	S361, S366
	SPBC3B8.04c	phosphate (Pi) transmembrane transporter (predicted)	S140
	SPBC3E7.09	Sad1-UNC-like protein involved protein folding in the ER (predicted)	S214
	SPBC3F6.01c	TPR repet serine/threonine protein phosphatase, unknown specificity (predicted)	S150
	SPBC3H7.02	sulfate transmembrane transporter (predicted)	S873
	SPBC428.10	Schizosaccharomyces pombe specific protein	S337, S340, S353, S748
	SPBC609.01	cytoplasmic P body 3'-5'-exoribonuclease, Dis3L2-related (predicted)	S20, S22
	SPBC646.08c	oxysterol binding protein (predicted)	S182, S183
	SPBC9B6.03	zf-FYVE type zinc finger protein, localizations and processes on human protein appear to be conflicting	S23
	SPBPB7E8.02	PSP1 family protein	S497
	SPCC1672.11c	P-type ATPase P5 type (predicted)	S108
	SPCC16C4.02c	Armadillo-type fold protein, DUF1941 family protein, human neurochondrin ortholog, implicated in signal transduction	S241
	SPCC1739.01	zf-CCCH type zinc finger protein	S322, T358, S399, S406, S409, S489, S495, S522
	SPCC1795.12c	Schizosaccharomyces specific protein	S53
	SPCC191.01	Schizosaccharomyces specific protein	S99, S102
	SPCC23B6.01c	oxysterol binding protein (predicted)	S440, S443
	SPCC24B10.02c	NAD/NADH kinase (predicted)	S422
	SPCC320.06	conserved fungal protein	T7
	SPCC320.08	transmembrane transporter (predicted)	S463, S466, S467
	SPCC4G3.12c	ubiquitin-protein ligase E3 (predicted)	S246
	SPCC553.12c	transmembrane transporter (predicted)	S21
	SPCC594.01	DUF1769 family protein	S638, S640
	SPCC594.02c	DUF2456 family conserved fungal protein	T300, T304, S419, S421, S477, S479
	SPCC622.14	GTPase activating protein (predicted)	S129, S130, S133
	SPCC622.15c	Schizosaccharomyces specific protein	T69, T77, S92, S506
	SPCC70.10	Schizosaccharomyces specific protein	S77, S81
	SPCC825.01	ATPase, involved in cytoplasmic translational initiation (predicted)	S47

Taula Annex 2. Proteïnes fosforilades en la soca wt que no estan fosforilades a la soca *Δckk2* en condicions de privació de nitrogen.

Gen	ID	Proteïna	Residus fosforilats
abc3	SPBC359.05	ABC transmembrane transporter Abc3, unknown specificity	T755, T761, T762
abo1	SPAC31G5.19	ATPase with bromodomain protein	S1047, S1054
ada1	SPBC106.04	adenosine deaminase Ada1	S825
adn2	SPBC1289.10c	transcription factor Adn2 (predicted)	S614, S617
adn3	SPCC1494.10	transcription factor Adn3	Y706, S707, S713
aha1	SPBC1711.08	chaperone activator Aha1	S194
aim21	SPBC18E5.07	DUF3210 family conserved fungal protein	S259, S519
alp14	SPCC895.07	TOG/XMAP215 microtubule plus end tracking polymerase Alp14	S650
amk2	SPCC1919.03c	AMP-activated protein kinase beta subunit Amk2	S75
ani1	SPBC1347.02	CENP-A amino terminus domain (NTD) isomerase Ani1	S248
any2	SPAC1F12.05	arrestin-related endocytic adaptor Any2 (predicted)	T13, S39, S44
arc1	SPBC14C8.06	ARP2/3 actin-organizing complex subunit Sop2	S338, S365
arc2	SPAC6F6.10c	ARP2/3 actin-organizing complex subunit Arc34	S313
arp3	SPAC630.03	Arp2/3 protein complex, actin-like protein subunit Arp3	S44
arp8	SPAC664.02c	Ino80 complex actin-like protein Arp8	S62
arx1	SPBC23E6.05	ribosomal export complex protein Arx1, peptidase family (predicted)	S353, S355
ase1	SPAPB1A10.09	antiparallel microtubule cross-linking factor Ase1	S640
asp1	SPCC1672.06c	inositol hexakisphosphate kinase/inositol pyrophosphate synthase (predicted)	S21
atb2	SPBC800.05c	tubulin alpha 2	T382
atf1	SPBC29B5.01	transcription factor, Atf-CREB family Atf1	S438, S441
atg13	SPAC4F10.07c	autophagy associated protein kinase regulatory subunit Atg13	S611
ath1	SPBC21B10.03c	ataxin-2 homolog	S71, S213
bbc1	SPAC23A1.17	WIP family cytoskeletal protein Bbc1 (predicted)	S501, S597, T685, T689, S1255
bdf1	SPCC1450.02	Swr1 complex bromodomain subunit Bdf1	S34
bdp1	SPCC1919.14c	transcription factor TFIIIB complex subunit Bdp1 (predicted)	S107
bfr1	SPCC18B5.01c	brefeldin A transmembrane transporter Bfr1	S486, S489
blt1	SPBC1A4.05	ubiquitin domain-like protein Blt1	S56, T650
bop1	SPAP32A8.03c	ubiquitin-protein ligase E3, human RNF126 ortholog (predicted)	S487
bqt3	SPCC594.07c	bouquet formation protein Bqt3	T130, S147, S153
brf1	SPBC13E7.10c	transcription factor TFIIIB complex subunit Brf1	S289
btb2	SPBC25B2.06c	BTB/POZ domain protein Btb2	T7, S37
bud6	SPAC15A10.16	nucleation-promoting factor Bud6	S1336
bur6	SPAC17G8.03c	DNA polymerase epsilon interactor Dpb3-like	T156
cao1	SPAC2E1P3.04	copper amine oxidase Cao1	S519
cap1	SPCC306.09c	adenylyl cyclase-associated protein Cap1	T53
cch1	SPAC6F6.01	plasma membrane calcium ion import channel Cch1	S325, S326, S334
ccs1	SPAC22E12.04	superoxide dismutase copper chaperone Ccs1	S231
cdb4	SPAC23H4.09	curved DNA-binding protein Cdb4	S233, S235, S237
cdc10	SPBC336.12c	MBF transcription factor complex subunit Cdc10	S222

ANNEX

cdc15	SPAC20G8.05c	extended Fer/CIP4 (EFC) domain protein Cdc15	T440, S490, S493, S535, S617, S632, S689, S693, S755, S763
cdt1	SPBC428.18	replication licensing factor Cdt1	S24, S27, T29
cek1	SPCC1450.11c	serine/threonine protein kinase Cek1	S477, S480, S482
cfh2	SPCC417.05c	SEL1 repeat protein, chitin synthase regulatory factor-like Cfh2	S117
cfr1	SPAC6G9.12	exomer complex BRCT domain subunit Cfr1	S470
cft2	SPBC1709.15c	cleavage factor two Cft2/polyadenylation factor CPSF-73 (predicted)	S522
cha4	SPBC1683.13c	transcription factor Cha4 (predicted) / Regulation of nitrogen utilisation	S582
chr4	SPBC1289.01c	1,3-beta-glucan synthase regulatory factor Chf3/Chr4	S11
chs1	SPAC13G6.12c	chitin synthase I	S430, S438, S450
cip1	SPBC16A3.18	RNA-binding protein Cip1	S78
cip2	SPAC12G12.03	RNA-binding protein Cip2	T542
cnp20	SPBC800.13	histone H4 variant, CENP-T ortholog	S13
cnt5	SPBC17G9.08c	Centaurin Cnt5	S650
cog3	SPBC1539.05	Golgi transport complex subunit Cog3 (predicted)	T48, T71
coy1	SPCC364.04c	CASP family protein involved in Golgi vesicle transport Coy1 (predicted)	S272
cph2	SPAC2F7.07c	Clr6 histone deacetylase associated PHD protein Cph2	S82
cps3	SPAC3A11.02	zf-CCCH type zinc finger protein, unknown biological role Cps3, potential makorin ortholog	S240
crn1	SPAC23C4.02	actin binding protein, coronin Crn1	S459, S501, S553
csh3	SPBC119.05c	Wiskott-Aldrich syndrome homolog binding protein Lsb1 (predicted)	S47
csx1	SPAC17A2.09c	RNA-binding protein Csx1	S50
cti6	SPBC1685.08	histone deacetylase complex ubiquitin-like protein ligase subunit Cti6	S136, S140
cut11	SPAC1786.03	spindle pole body docking protein Cut11	T215, y219
cyr1	SPBC19C7.03	adenylate cyclase	T1568, S1589
dbp3	SPBC17D1.06	ATP-dependent RNA helicase Dbp3 (predicted)	T245, T252, S258
dbp2	SPAC167.05	Usp (universal stress protein) family protein	S15, S1521, T362, S554
dca7	SPBC17D11.08	WD repeat protein, DDB1 and CUL4-associated factor Dca7 (predicted)	S10, S388
dcp2	SPAC19A8.12	mRNA decapping complex catalytic subunit Dcp2	S290
deb1	SPAC1B1.01	transcription factor Deb1/Rdp1	S116
def1	SPBC354.10	RNAPII degradation factor Def1 (predicted)	S181
dfr1	SPCC1223.08c	dihydrofolate reductase/serine hydrolase family fusion protein Dfr1	S367, S372, T379
dma1	SPAC17G8.10c	mitotic spindle checkpoint ubiquitin ligase Dma1	S266
dnf2	SPAC24B11.12c	P-type ATPase (predicted)	S1332
eaf7	SPBC16A3.19	histone acetyltransferase complex subunit Eaf7	S228, S230
ede1	SPBC800.10c	EPS15 repeat family actin cortical patch component (predicted)	S239, T375, T381, S432, S452, T867, T873
efr3	SPCC794.08	phosphatidylinositol-4 kinase plasma membrane scaffold Efr3	S228, S229, S233
eis1	SPCC63.14	eisosome assembly protein eis1	S118, S121, S905, S910, S926, S1131, S1141
ell1	SPBP23A10.14c	RNA polymerase II transcription elongation factor SpELL	S192
ent1	SPCC162.07	epsin	S176
ent3	SPCC794.11c	ENTH/VHS domain protein Ent3 (predicted)	S189

erh1	SPAC19G12.17	enhancer of rudimentary homolog Erh1	S8, S18
erv29	SPCC970.06	COP II adaptor Erv29 (predicted)	S161, T163
far10	SPBC3H7.13	SIP/FAR complex FHA domain subunit Far10/Csc1	S203
fep1	SPAC23E2.01	iron-sensing transcription factor Fep1	S120, T121, S126
fft2	SPCC1235.05c	SMARCAD1 family ATP-dependent DNA helicase Fft2 (predicted)	T1104
fnx2	SPBC3E7.06c	vacuolar amino acid transmembrane transporter Fnx2	S410, T412, Y415
gaf1	SPCC1902.01	transcription factor Gaf1	S741
gar1	SPBC20F10.01	snoRNP pseudouridylase box H/ACA snoRNP complex protein Gar1	S94
gea1	SPBC211.03c	guanyl-nucleotide exchange factor (predicted)	S412, S416
gef2	SPAC31A2.16	RhoGEF Gef2	T542
gga22	SPBC25H2.16c	Golgi localized Arf binding gamma-adaptin ortholog Gga22	S328
ggc1	SPCC1682.09c	mitochondrial guanine nucleotide transmembrane transporter Ggc1 (predicted)	T35, S37
ght1	SPCC548.07c	hexose transmembrane transporter Ght1	S512, S514, S518, S548, S551
ght5	SPCC1235.14	plasma membrane hexose transmembrane transporter Ght5	S527, S528
git11	SPBC215.04	heterotrimeric G protein gamma subunit Git11	S43, S45
glo3	SPAC22E12.17c	ARF GTPase activating protein (predicted)	S211, T218
gos1	SPAC4G8.10	SNARE Gos1 (predicted)	S43
gpc1	SPBC776.05	glycerophosphocholine acyltransferase (GPCAT) Gpc1 (predicted)	S397
gpd3	SPBC354.12	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase Gpd3	S203
gpx1	SPBC32F12.03c	glutathione peroxidase Gpx1	S156
grn1	SPBC26H8.08c	GTPase Grn1	S180
gst4	SPCC1281.07c	glutathione S-transferase (predicted)	T152
gup1	SPAC24H6.01c	membrane bound O-acyltransferase, MBOAT Gup1 (predicted)	S37
gyp7	SPAC630.05	GTPase activating protein Gyp7 (predicted)	S243, T244, T247
hfl1	SPAC30D11.06c	Lazarus1 family transmembrane transporter	S364
his1	SPAC25G10.05c	ATP phosphoribosyltransferase	S167
hop1	SPBC1718.02	linear element associated protein Hop1	T270
hpz1	SPBC2A9.07c	zf-PARP type zinc finger protein, G1-S transition regulator Hpz1	T130, S131
hrp1	SPAC1783.05	ATP-dependent DNA helicase Hrp1	S93
hsf1	SPAC2E12.02	transcription factor Hsf1	S316
hta1	SPCC622.08c	histone H2A alpha	S122
hta2	SPAC19G12.06c	histone H2A beta	S122
hus1	SPAC20G4.04c	checkpoint clamp complex protein Hus1	S187, S192
iec5	SPAPB1E7.14	Ino80 complex subunit Iec5	S43
imp2	SPBC11C11.02	contractile ring protein Imp2	S456, S461, S564
ino80	SPAC29B12.01	SNF2 family ATP-dependent 3' to 5' DNA helicase Ino80	T529, S771, S806
inp53	SPAC9G1.10c	inositol polyphosphate phosphatase Inp53 (predicted)	S195
irs1	SPBC8D2.06	cytoplasmic isoleucine-tRNA ligase Irs1 (predicted)	T1037, S1060
isp4	SPBC29B5.02c	plasma membrane OPT oligopeptide transmembrane transporter family Isp4	S37, S40
isp7	SPAC25B8.13c	2-OG-Fe(II) oxygenase superfamily protein	S193

ANNEX

iss10	SPAC7D4.14c	NURS complex subunit Iss10	S265, S434
its8	SPBC839.08c	pig-N (predicted)	S334, S345, S357
kcs1	SPCC970.08	inositol polyphosphate kinase Kcs1 (predicted)	T84, S88
kri1	SPAC22G7.05	ribosome biogenesis protein Kri1 (predicted)	T115
lsb4	SPAPJ696.02	actin cortical patch component Lsb4 (predicted)	S322
lsb5	SPBC31F10.07	actin cortical patch component Lsb5 (predicted)	S288
lsd90	SPBC16E9.16c	Lsd90 protein	T51
lst4	SPAC30C2.07	Schizosaccharomyces specific protein	S245
lub1	SPBC887.04c	WD repeat protein Lub1	S491
map1	SPAC11E3.06	MADS-box transcription factor Map1	S253, S255
mcs4	SPBC887.10	response regulator Mcs4	T163
mei2	SPAC27D7.03c	RNA-binding protein involved in meiosis Mei2	T571
meu34	SPAC3A12.03c	ubiquitin-protein ligase E3 Meu34, human RNF13 family homolog, unknown biological role (predicted)	S78
mfc1	SPAPB1A11.01	copper transmembrane transporter, meiotic Mfc1	S252, S253, S261
mga2	SPAC26H5.05	IPT/TIG ankyrin repeat containing transcription regulator of fatty acid biosynthesis (predicted)	S524
mg11	SPCC5E4.05c	mitochondrial acylglycerol lipase Mgl1 (predicted)	T345, T346
mip1	SPAC57A7.11	WD repeat protein, Raptor homolog Mip1	T830
mlo2	SPBC4.05	ubiquitin protein ligase E3 component human N-recognin 7 homolog Mlo2	S110
mmm1	SPBC27B12.01c	ERMES complex subunit Mmm1 (predicted)	S309
mot1	SPBC1826.01c	TATA-binding protein associated factor Mot1 (predicted)	S244
mpd2	SPAC4F10.13c	GYF domain protein	T42, S113, S505, S509, S604, S951
mpi1	SPBC2G2.16	mannose-6-phosphate isomerase Mpi1 (predicted)	S152
mra1	SPAC18G6.07c	rRNA (pseudouridine) methyltransferase Mra1	S72
msa1	SPAC13G7.13c	RNA-binding protein Msa1	S257
msy1	SPCC1183.11	MS calcium ion channel protein Msy1	S90
mto2	SPBC902.06	gamma tubulin complex linker Mto2	S275, S390
mtr1	SPCC132.01c	microtubule regulator Mtr1	T685, S702
mug135	SPCC330.04c	mug2/mug135/meu2 family, with repeat expansion	S100
mug147	SPBC56F2.06	Schizosaccharomyces specific protein Mug147	T370, T403
mug191	SPAC3C7.05c	alpha-1,6- mannanase (predicted)	T426
mug20	SPBC36B7.06c	Schizosaccharomyces specific protein Mug20	S111
mug35	SPAC22H12.01c	Schizosaccharomyces specific protein Mug35	S128, S141, S144
mug72	SPCC1902.02	oxidoreductase (predicted)	S357, S363, S504
mvp1	SPAC3A11.06	sorting nexin Mvp1 (predicted)	S259
nda2	SPBC16A3.15c	tubulin alpha 1	T386
nem1	SPBC3B8.10c	Nem1-Spo7 phosphatase complex catalytic subunit Nem1 (predicted)	S51
nhe1	SPAC977.10	plasma membrane sodium ion/proton antiporter Nhe1/Sod2	S45, T47
nif1	SPBC23G7.04c	protein kinase inhibitor, SEL1 repeat protein Nif1	S196
nmd3	SPAC16C9.03	export adaptor Nmd3 (predicted)	T130, T145
nnk1	SPCC70.05c	serine/threonine protein kinase Nnk1 (predicted)	S58, S86, T90, S94, S207
nop12	SPAC16E8.06c	RNA-binding protein Nop12 (predicted)	S94
nop58	SPAC23G3.06	U3 snoRNP protein Nop58 (predicted)	S417
nop9	SPAC6G9.02c	pumilio family RNA-binding protein Nop9 (predicted)	S26
not2	SPCC4G3.15c	CCR4-Not complex NOT box subunit Not2	S105

not3	SPAC1B3.05	CCR4-Not complex NOT box subunit Not3/5	S447, S449
npa3	SPBC119.15	RNA polymerase II binding AAA family ATPase Npa3 (predicted)	S311
nst1	SPAC29E6.10c	conserved fungal NST1 family protein	S973, S979
ntr2	SPAC17A2.08c	spliceosome complex disassembly protein Ntr2 (predicted)	S16, S80
nup146	SPAC23D3.06c	nucleoporin, WD repeat Nup146	T463
nxt3	SPBP8B7.11	ubiquitin protease cofactor Nxt3 (predicted)	S167
oca2	SPCC1020.10	serine/threonine protein kinase Oca2	S39, S175, S286
oga1	SPBC16A3.08c	Stm1 homolog Oga1	T268
ogm1	SPAC22A12.07c	protein O-mannosyltransferase Ogm1	T126, S131, S147
ogm4	SPBC16C6.09	protein O-mannosyltransferase Ogm4	S20
orm1	SPBC119.09c	ORMDL family protein Orm1 (predicted)	S183
osh2	SPBC2F12.05c	sterol binding ankyrin repeat protein (predicted)	T872
pabp	SPAC57A7.04c	mRNA export shuttling protein	T20
pal1	SPCP1E11.04c	membrane associated protein Pal1	S121, S125, S370
pan1	SPAC25G10.09c	actin cortical patch component, with EF hand and WH2 motif Pan1 (predicted)	S1039
pcd1	SPAC6G9.05	coenzyme A diphosphatase (predicted)	T263
pcf2	SPAC26H5.03	CAF assembly factor (CAF-1) complex subunit B, Pcf2	S468
pck2	SPBC12D12.04c	protein kinase C (PKC)-like Pck2	T984
pdc1	SPAC20G4.08	P-body assembly protein	S84, S155
pdr16	SPCC23B6.04c	meiotic sec14 cytosolic factor family, phospholipid-intermembrane transfer protein Pdr16 (predicted)	S139, S146, S150, S185, S383, S894
pdx1	SPCC1259.09c	pyruvate dehydrogenase protein x component, Pdx1 (predicted)	T254, T257
peg1	SPAC3G9.12	CLASP family microtubule-associated protein	S1363, S1372
pet1	SPAC22F8.04	Golgi phosphoenolpyruvate transmembrane transporter Pet1	S47
pex32	SPCC550.09	peroxin Pex32 (predicted)	S216
pho7	SPBC27B12.11c	transcription factor Pho7	S200
pik1	SPAC22E12.16c	1-phosphatidylinositol 4-kinase Pik1	S219
pil1	SPCC736.15	eisosome BAR domain protein Pil1	T233
pka1	SPBC106.10	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit Pka1	S17
pk1	SPAC3A11.14c	kinesin-14 family minus-end directed microtubule motor Pk1 (klp1)	S547
pmc1	SPAPB2B4.04c	vacuolar calcium transporting P-type ATPase P2 type, Pmc1	S1246, S1248
pnk1	SPAC23C11.04c	DNA kinase/phosphatase Pnk1	T53
pob1	SPBC1289.04c	Boi family protein	S463, S594, T606, S633, S652, S655
por1	SPAC1635.01	mitochondrial outer membrane voltage-dependent anion-selective channel (predicted)	T264
ppk19	SPBC119.07	serine/threonine protein kinase Ppk19	S1102
ppk29	SPBC557.04	Ark1/Prk1 family protein kinase Ppk29	S795
ppk30	SPBC6B1.02	Ark1/Prk1 family protein kinase Ppk30	S544
ppk32	SPBP23A10.10	serine/threonine protein kinase Ppk32	T726, S736
ppk38	SPCP1E11.02	Ark1/Prk1 family protein kinase Ppk38	S542
pre9	SPAC13C5.01c	20S proteasome complex subunit alpha 3 Pre9	T244
prp31	SPBC119.13c	U4/U6 x U5 tri-snRNP complex subunit Prp31	T18, T21, T23
prz1	SPAC4G8.13c	calcineurin responsive transcription factor Prz1	S528
psc3	SPAC17H9.20	mitotic cohesin complex, non-SMC subunit Psc3	T773

ANNEX

pst2	SPAC23C11.15	Clr6 histone deacetylase complex subunit Pst2	S687
ptr2	SPBC13A2.04c	PTR family peptide transmembrane transporter Ptr2	S13
pub3	SPBC16E9.11c	HECT-type ubiquitin-protein ligase E3 Pub3 (predicted)	S177
puc1	SPBC19F5.01c	cyclin Puc1	S81, S82, S88
qcr7	SPCC737.02c	ubiquinol-cytochrome-c reductase complex subunit 6 (predicted)	T130
rad26	SPAC9E9.08	ATRIP, ATR checkpoint kinase regulatory subunit Rad26	S306, S307
rad52	SPAC30D11.1.0	DNA recombination protein, Rad51 mediator Rad52 (previously Rad22)	S319
rad60	SPBC1921.02	DNA repair protein, SUMO-related Rad60	S111
reg1	SPAC227.15	protein phosphatase regulatory subunit Reg1 (predicted)	S732, S774
rga2	SPAC26A3.09c	RhoGAP, GTPase activating protein Rga2	S181, S228, S232
rga3	SPAC29A4.11	RhoGAP, GTPase activating protein Rga3	S269
rga4	SPBC28E12.03	RhoGAP, GTPase activating protein Rga4	S193, S194, S198
rga6	SPBC354.13	RhoGAP, GTPase activating protein Rga6 (predicted)	S60
rgf2	SPAC1006.06	RhoGEF Rgf2	S86
rio2	SPBC1703.05	protein kinase, RIO family Rio2 (predicted)	S333
rlc1	SPAC926.03	myosin II regulatory light chain Rlc1	S82, S85, S92
rmn1	SPBC902.04	RNA-binding protein	S79
rna15	SPAC644.16	RNA-binding protein Rna15	S293
rng10	SPAC688.07c	coiled-coil protein involved in septum formation Rng10	S112, S205, S538, S630, S632
rog1	SPAC4A8.10	acylglycerol lipase (predicted)	S133
rpl401	SPBC1711.06	60S ribosomal protein L4 (predicted)	T253
rpl402	SPBP8B7.03c	60S ribosomal protein L4 (predicted)	T253
rpn11	SPAC31G5.13	19S proteasome regulatory subunit Rpn11	S113, S122, S123
rpt2	SPBC4.07c	19S proteasome regulatory subunit Rpt2	T58
rrp5	SPCC1183.07	U3 snoRNP-associated protein Rrp5 (predicted)	S1688
rsc58	SPAC1F3.07c	RSC complex subunit Rsc58	S378
rsn1	SPBC354.08c	Golgi to plasma membrane transport protein Rsn1 (predicted)	S416, S420, S427
sak1	SPAC3G9.14	transcriptional activator Sak1	S192
san1	SPBC2A9.04c	sir antagonist, ubiquitin-protein ligase E3	T240
sbp1	SPBC1773.07c	Ran GTPase binding protein Sbp1	S52
sck2	SPAC22E12.14c	serine/threonine protein kinase Sck2	T176
scr1	SPBC1D7.02c	transcription factor Scr1	S332, S333
scs2	SPBC16G5.05c	VAP family protein Scs2	S265, T269
scs22	SPAC17C9.12	VAP family protein Scs22	S231, S237, S258, S262, S264
sds23	SPBC646.13	PP2A-type phosphatase inhibitor Sds23/Moc1	S399, S402
sea3	SPAC11E3.05	ubiquitin-protein ligase E3, coatamer related complex subunit Sea3 (predicted)	S9, S10
sec16	SPAC29B12.07	multidomain vesicle coat component Sec16 (predicted)	S886, S890, S899, S1612
sec17	SPAC959.02	alpha SNAP (predicted)	S76
sec24	SPAC22F8.08	COPII cargo receptor Sec24/Sfb2 subunit	S127
sec28	SPBC24C6.05	coatamer epsilon subunit (predicted)	S60, S63
sec3	SPAC17G8.12	exocyst complex subunit Sec3	S241
sec71	SPAC4D7.01c	Sec7 domain protein, ARF GEF (predicted)	S22, T673
sec73	SPAC19A8.01c	guanyl-nucleotide exchange factor Sec73 (predicted)	S276
sec9	SPBC26H8.02c	SNAP-25 homologue, t-SNARE component Sec9	T165
ser3	SPCC364.07	D-3 phosphoglycerate dehydrogenase Ser3 (predicted)	S21
set3	SPAC22E12.11c	histone lysine methyltransferase Set3	S530, S573

sfr1	SPBC28F2.07	Swi five-dependent recombination mediator Sfr1	S168, S175
sgo2	SPAC15A10.15	inner centromere protein, shugoshin Sgo2	T402
shd1	SPAC16E8.01	cytoskeletal protein binding protein Sla1 family, Shd1 (predicted)	S298, S461, T923, T928
shk1	SPBC1604.14c	PAK-related kinase Shk1	S283, S287
sib1	SPAC23G3.02c	ferrichrome synthetase Sib1	S3547, S3549, S3550
sin1	SPAPYUG7.02c	stress activated MAP kinase interacting protein Sin1	T528
sip3	SPAC19A8.02	ER-plasma membrane tethering protein (predicted)	S197, S198, S206
sle1	SPAC1A6.07	eisosome assembly protein Seg1	T107
sol1	SPBC30B4.04c	SWI/SNF complex subunit Sol1	S333, S342
spo15	SPAC1F3.06c	mitotic and meiotic spindle pole body protein Spo15	T11, S33, S43
spt5	SPAC23C4.19	DSIF transcription elongation factor complex subunit Spt5	T863
spt8	SPBC14C8.17c	SAGA complex subunit Spt8	S364
srk1	SPCC1322.08	MAPK-activated protein kinase Srk1	S532, S567
srp1	SPBC11C11.08	SR family protein, human SRF52 ortholog Srp1	S213, S217
srp102	SPAC23H4.07c	signal recognition particle receptor beta subunit Srp102 (predicted)	T4, T14
ssa2	SPCC1739.13	heat shock protein Ssa2	T417
ssm4	SPAC27D7.13c	dynactin microtubule-binding subunit, p150-Glued Ssm4	T606
ssn6	SPBC23E6.09	transcriptional corepressor Ssn6	T1041
sst1	SPAC521.04c	calcium permease (predicted)	S89
sst2	SPAC19B12.10	human AMSH/STAMBIP protein homolog, ubiquitin specific-protease	S177
ste7	SPAC23E2.03c	arrestin family meiotic suppressor protein Ste7	S481
sts5	SPCC16C4.09	cytoplasmic P body 3'-5'-exoribonuclease, Dis3L2-related (predicted)	S376
sum3	SPCC1795.11	translation initiation RNA helicase Sum3	S54, S606
sup35	SPCC584.04	cytoplasmic translation release factor class II eRF3	S71
syp1	SPBC4C3.06	F-BAR domain protein Syp1 (predicted)	S322
taf12	SPAC15A10.02	transcription factor TFIID complex subunit A/ SAGA complex subunit Taf12	T242
tam10	SPBC14C8.19	nucleolar RNA binding protein, human KNOP1 ortholog	S132
tcb1	SPCC962.01	tricalbin, C2 domain protein (phospholipid binding) ER-plasma membrane tethering protein Tcb1 (predicted)	S120
tcb2	SPCP31B10.06	tricalbin, C2 domain protein (phospholipid binding) ER-plasma membrane tethering protein Tcb2 (predicted)	S1067
tcg1	SPBC660.11	single-stranded telomeric binding protein Tgc1	S324
tco89	SPCC162.12	TORC1 subunit Tco89	S70
tdh1	SPBC32F12.11	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Tdh1	S203
tea4	SPBC1706.01	tip elongation aberrant protein Tea4	S404
tef3	SPCC417.08	translation elongation factor eEF3	T957, T963, T967
tfs1	SPAC20H4.03c	transcription elongation factor TFIIS	S95
thf1	SPBC839.16	C1-5,6,7,8-tetrahydrofolate (THF) synthase, trifunctional enzyme Thf1	S262, S270
tho1	SPCP25A2.03	THO complex subunit Tho1 (predicted)	S582
tif33	SPAC4A8.16c	translation initiation factor eIF3c	S19
tif471	SPAC17C9.03	translation initiation factor eIF4G	T503, T509, S767
tip1	SPAC3C7.12	CLIP170 family protein Tip1	S360, S371
tor2	SPBC216.07c	serine/threonine protein kinase Tor2	S1525
trm1	SPBC25D12.05	tRNA (guanine-N2-)-methyltransferase Trm1	S93

ANNEX

trm5	SPAPB18E9.01	tRNA (guanine(37)-N(1))-methyltransferase activity Trm5 (predicted)	S140
trp4	SPBC16G5.08	phosphoribosylanthranilate transferase Trp4	S133, S139
tup11	SPAC18B11.10	transcriptional corepressor Tup11	T279
uap1	SPBC1289.08	UDP-N-acetylglucosamine diphosphorylase Uap1/Qri1(predicted)	S155
uap56	SPAC17G6.14c	TREX complex subunit, ATP-dependent RNA helicase Uap56	T391, T397
uba2	SPBC16H5.03c	SUMO activating enzyme E1-type Uba2	S609
ubp10	SPBC577.07	ubiquitin C-terminal hydrolase Ubp10 (predicted)	S251
ubp16	SPCC1682.12c	ubiquitin C-terminal hydrolase Ubp16	S35
ubp9	SPBC1703.12	ubiquitin C-terminal hydrolase Ubp9	S549
uep1/u bi3	SPAC1805.12c	ribosomal-ubiquitin fusion protein Ubi2/ribosomal- ubiquitin fusion protein Ubi3 (predicted)	S57
vip1	SPAC10F6.06	RNA-binding protein Vip1	T230
vma8	SPCC965.03	V-type ATPase V1 subunit D (predicted)	T221
vms1	SPCC1827.04	Cdc48p-Npl4p-Vms1p AAA ATPase complex subunit involved in ER associated ubiquitin-dependent protein catabolic process Vms1 (predicted)	S38, S140
vps10	SPBC16C6.06	sorting receptor for vacuolar proteins, Vps10	T5
vps54	SPAC2F3.10	GARP complex subunit Vps54 (predicted)	T742
vsl1	SPCC594.06c	vacuolar SNARE Vsl1/Vam7	S224
vtc2	SPAC14C4.11	vacuolar transporter chaperone (VTC) complex polyphosphate synthetase subunit, , Vtc2/3 (predicted)	S334
vtc4	SPCC1322.14c	vacuolar transporter chaperone (VTC) complex subunit (predicted)	T508
yap18	SPBC19F8.03c	ENTH/VHS domain protein (predicted)	S377, T414, S419, S638
yar1	SPBP16F5.05c	ribosome biogenesis protein Yar1 (predicted)	T136
ybt1	SPAC9E9.12c	ABC transmembrane transporter Ybt1	S615, S618
yih1	SPAC27E2.02	IMPACT homolog, cytoplasmic translational regulator Yih1 (predicted)	S113
zfs1	SPBC1718.07c	CCCH tandem zinc finger protein, human Tristetraprolin homolog Zfs1, involved in mRNA catabolism	S48, S229
	SPAC12G12.0 7c	conserved fungal protein	S400
	SPAC1327.01c	transcription factor, zf-fungal binuclear cluster type (predicted)	S22, T32, S47, S139
	SPAC144.17c	6-phosphofructo-2-kinase (predicted)	S106
	SPAC18B11.11	GTPase activating protein (predicted)	T64, S66
	SPAC1F7.11c	transcription factor, zf-fungal binuclear cluster type (predicted)	S675
	SPAC20G4.05c	mitochondrial protein, UPF0061 family, human SELENOO ortholog	S73
	SPAC20H4.09	ATP-dependent RNA helicase, spliceosomal (predicted)	S264, T269
	SPAC222.13c	6-phosphofructo-2-kinase (predicted)	T65, S70
	SPAC23D3.13c	guanyl-nucleotide exchange factor (predicted)	S670
	SPAC2F3.16	ubiquitin-protein ligase E3, implicated in DNA repair (predicted)	T22, S23
	SPAC323.07c	MatE family transmembrane transporter (predicted)	S26
	SPAC3C7.13c	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (predicted)	Y113, T123
wdr44	SPAC3H5.08c	WD repeat protein, human WDR44 family	S262
	SPAC3H5.09c	mitochondrial protein, human KIAA0100 ortholog (predicted)	T1506, S1529
	SPAC607.07c	Schizosaccharomyces specific protein	S113

	SPAC630.07c	Schizosaccharomyces specific protein	S20
	SPAC644.09	pyridoxal phosphate homeostasis protein (predicted)	S183
	SPAC806.06c	nicotinamide mononucleotide (NMN) adenylyltransferase (predicted)	S58
	SPAC977.17	MIP water channel (predicted)	S203, S593
	SPAC9G1.07	Schizosaccharomyces specific protein	S258
	SPAPB1A10.13	Schizosaccharomyces specific protein	S322, S325
	SPBC13A2.03	ER phosphatidate cytidyltransferase	S30, T32
	SPBC13E7.07	Schizosaccharomyces specific protein	T132
	SPBC1604.12	Schizosaccharomyces specific phosphoprotein	T557, S612
	SPBC16E9.02c	CUE domain protein, human TOLLIP ortholog	T463
	SPBC16E9.15	heat shock factor binding protein, implicated in transcriptional response to stress (predicted)	S69
	SPBC16H5.12c	DUF2433 metallo phosphatase superfamily conserved fungal protein	S514
	SPBC17A3.03c	phosphoprotein phosphatase (predicted)	S158
	SPBC19F5.04	aspartate kinase (predicted)	S508
	SPBC1E8.02	ER ubiquitin family protein (predicted)	T566
	SPBC1E8.05	conserved fungal protein, Kre9/Knh1 family	S162, S163, S164
	SPBC2G5.01	ER protein involved in ER-nucleus signaling (predicted)	S343, S344
	SPBC36.02c	spermidine family transmembrane transporter (predicted)	T6, T15, T29
	SPBC36.11	Schizosaccharomyces specific protein	S194
	SPBC365.16	mitochondrial membrane protein, conserved in yeast and apicomplexa	T100
	SPBC418.02	NatA N-acetyltransferase complex subunit (predicted)	S563, S576, S579
	SPBC428.10	Schizosaccharomyces pombe specific protein	T667
	SPBC530.11c	transcription factor, zf-fungal binuclear cluster type (predicted)	S28
	SPBC577.03c	acetyl-CoA:L-glutamate N-acetyltransferase (predicted)	T215
	SPBC646.08c	oxysterol binding protein (predicted)	S229, S235
	SPBC713.09	Schizosaccharomyces specific protein	S191
	SPBC887.12	P-type ATPase (predicted)	S78
	SPBC9B6.03	zf-FYVE type zinc finger protein, localizations and processes on human protein appear to be conflicting	S53
	SPBC9B6.11c	CCR4/nocturin family endoribonuclease (predicted)	S353
	SPBPB21E7.09	L-asparaginase (predicted)	S304
	SPBPB7E8.02	PSP1 family protein	S377
	SPBPJ4664.05	endomembrane system protein, FAR-17a/AIG1-like family protein, human AIG1 and ADTRP ortholog	T57, T74
	SPCC1450.12	PXA domain protein	S258
	SPCC14G10.04	Schizosaccharomyces specific protein	S328
	SPCC1739.01	zf-CCCH type zinc finger protein	S441, S443, S495, T525
	SPCC2H8.02	plasma membrane inorganic phosphate transmembrane transporter (predicted)	S269
	SPCC594.01	DUF1769 family protein	S298
	SPCC594.02c	DUF2456 family conserved fungal protein	T307
	SPCC622.14	GTPase activating protein (predicted)	S268, S301
	SPCC622.15c	Schizosaccharomyces specific protein	T56, S368, S370, S372
	SPCC663.15c	DUF3818 and PXA domain conserved fungal protein	S146
	SPCC757.13	dipeptide transmembrane transporter (predicted)	T105, S116
	SPCC825.01	ATPase, involved in cytoplasmic translational initiation (predicted)	S55

ANNEX

psg2	SPCP31B10.04	DUF4448 family conserved fungal membrane protein, similar to cell surface proteins	T262
------	--------------	---	------

Taula Annex 3. Proteïnes fosforilades en la soca wt que no estan fosforilades a la soca $\Delta ckk2$ en condicions sense estrès.

Gen	ID	Proteïna	Residus fosforilats
abp2	SPBC1861.02	unknown protein, may bind replication origins Abp2	S177
ada1	SPBC106.04	adenosine deaminase Ada1	S86
adn2	SPBC1289.10c	transcription factor Adn2 (predicted)	S509
aha1	SPBC1711.08	chaperone activator Aha1	S170
aim21	SPBC18E5.07	barbed end F-actin assembly inhibitor	S217, S259
alp14	SPCC895.07	TOG/XMAP215 microtubule plus end tracking polymerase Alp14	S543, S548
alp5	SPBP23A10.08	actin-like protein Arp4	S290
amk2	SPCC1919.03c	AMP-activated protein kinase beta subunit Amk2	S18
arc1	SPBC14C8.06	ARP2/3 actin-organizing complex subunit Sop2	T300
asc1	SPAC30C2.04	cofactor for cytoplasmic methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases Asc1 (predicted)	S359
ase1	SPAPB1A10.09	antiparallel microtubule cross-linking factor Ase1	S701
ask1	SPBC27.02c	DASH complex subunit Ask1	T136
asn1	SPBC119.10	asparagine synthetase	T96, Y97, Y105
atd2	SPAC922.07c	aldehyde dehydrogenase (predicted)	T453, T483
atf1	SPBC29B5.01	transcription factor, Atf-CREB family Atf1	T204, T216, T240
avt3	SPAC3H1.09c	vacuolar amino acid transmembrane transporter Avt3	S22, S24
bbc1	SPAC23A1.17	WIP family cytoskeletal protein Bbc1 (predicted)	S501
bdc1	SPBC21D10.10	bromodomain protein Bdc1	T153
bdf1	SPCC1450.02	Swr1 complex bromodomain subunit Bdf1	S239
bdf2	SPAC631.02	BET family double bromodomain protein Bdf2	S191
bdp1	SPCC1919.14c	transcription factor TFIIIB complex subunit Bdp1 (predicted)	S107
bgs4	SPCC1840.02c	cell wall and secondary septum 1,6 branched 1,3-beta-glucan synthase catalytic subunit Bgs4	S969
blt1	SPBC1A4.05	ubiquitin domain-like protein Blt1	S582
bqt4	SPBC19C7.10	bouquet formation protein Bqt4	T143, T146
btf3	SPAC4F10.14c	nascent polypeptide-associated complex beta subunit	T95
bub1	SPCC1322.12c	mitotic spindle checkpoint kinase Bub1	T423
bud6	SPAC15A10.16	nucleation-promoting factor Bud6	T347, S355, S359, S1290, T1294,
bun107	SPAC31A2.14	WD repeat protein, human WDR48 family Bun107	S751
byr4	SPAC222.10c	two-component GAP Byr4	S248, S499, S535
can1	SPBC18H10.16	plasma membrane arginine/lysine transmembrane transporter Can1	S955
ccq1	SPCC188.07	shelterin complex HEAT repeat subunit Ccq1	S728
cdc11	SPCC1739.11c	SIN component scaffold protein, centriolin ortholog Cdc11	S138
cdc8	SPAC27F1.02c	tropomyosin	S55
cek1	SPCC1450.11c	serine/threonine protein kinase Cek1	S477, S480, S482, S509, S1105
chr4	SPBC1289.01c	1,3-beta-glucan synthase regulatory factor Chf3/Chr4	S63, S90
ckn1	SPBC577.09	ERCC-8 DNA repair homolog	S180, S184, T189
clc1	SPBC9B6.08	clathrin light chain Clc1	T64
cor1	SPAC2C4.05	cornichon family protein (predicted)	T9, T14, S42
crf1	SPAC22H10.11c	transcriptional corepressor for ribosomal proteins via TOR signaling pathway Crf1 (predicted)	T378
crn1	SPAC23C4.02	actin binding protein, coronin Crn1	S500
csi1	SPBC2G2.14	mitotic centromere-SPB clustering protein Csi1	S336, S418
csr102	SPAC3H8.02	sec14 cytosolic factor family, phospholipid-intermembrane transfer protein Csr102 (predicted)	S77
csx1	SPAC17A2.09c	RNA-binding protein Csx1	S384

ANNEX

cta4	SPACUNK4.07c	P-type ATPase, calcium transporting Cta4	S378, S386, S387
ctf1	SPBC3B9.11c	mRNA cleavage and polyadenylation specificity factor complex subunit Ctf1	S298
cwf19	SPAC30D11.09	complexed with Cdc5 protein Cwf19	S398
cwf2	SPAC3A12.11c	zf-CCCh type zinc finger protein, Prp19 complex subunit, RNA-binding Cwf2	T349
cwf22	SPBC13E7.01	splicing factor Cwf22	S851
cyk3	SPAC9G1.06c	Nebulin-family actin filament anchoring protein Cyk3	S82
cyr1	SPBC19C7.03	adenylate cyclase	S1572
dbl1	SPCC2H8.05c	double strand break localizing Dbl1	S68
dbp10	SPAC31A2.07c	ATP-dependent RNA helicase Dbp10 (predicted)	S635, S638
dcp2	SPAC19A8.12	mRNA decapping complex catalytic subunit Dcp2	S310
def1	SPBC354.10	RNAPII degradation factor Def1 (predicted)	T359, T361, S601, S612
dep1	SPBC21C3.02c	Sds3-like family protein Dep1	S205, S223
dhp1	SPAC26A3.12c	5'-3' exoribonuclease Dhp1	S547
din1	SPAC19D5.06c	RNA pyrophosphohydrolase Din1	S214
dma1	SPAC17G8.10c	mitotic spindle checkpoint ubiquitin ligase Dma1	S266
doa10	SPBC14F5.07	ER ubiquitin-protein ligase E3 Doa10 (predicted)	S387
dsc2	SPAC1486.02c	Golgi Dsc E3 ligase complex subunit Dsc2	T266
eaf7	SPBC16A3.19	histone acetyltransferase complex subunit Eaf7	S233, S239
efr3	SPCC794.08	phosphatidylinositol-4 kinase plasma membrane scaffold Efr3	S700
egd2	SPBC25H2.05	nascent polypeptide-associated complex alpha subunit Egd2	T116
eis1	SPCC63.14	eisosome assembly protein eis1	S790, T1058
ell1	SPBP23A10.14c	RNA polymerase II transcription elongation factor Ell1	S183, S192
emc4	SPCC1281.03c	ER membrane protein complex subunit Emc4 (predicted)	S55, S57
eno102	SPBPB21E7.01c	enolase (predicted)	T26
esf2	SPBC28E12.05	U3 snoRNP-associated protein Esf2 (predicted)	S22
exo84	SPAC6F12.08c	exocyst complex subunit Exo84 (predicted)	S33
far11	SPBC27B12.04c	SIP/FAR complex subunit, Far11/Csc2	S500
fbh1	SPBC336.01	DNA helicase I, ubiquitin ligase F-box adaptor Fbh1	T252, T270
fft2	SPCC1235.05c	SMARCAD1 family ATP-dependent DNA helicase Fft2 (predicted)	S1205, S1219
fhn1	SPBC1685.13	eisosome assembly protein Fhn1	S181
fkh1	SPBC839.17c	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Fkh1	S45
fkh2	SPBC16G5.15c	forkhead transcription factor Fkh2	T366, T369, T378, S430, S435
gaf1	SPCC1902.01	transcription factor Gaf1	S758
gal10	SPBPB2B2.12c	UDP-glucose 4-epimerase/aldose 1-epimerase Gal10	Y472, T477, T497
gdh2	SPCC132.04c	NAD-dependent glutamate dehydrogenase Gdh2	T194, S209
gef2	SPAC31A2.16	RhoGEF Gef2	S736
ght5	SPCC1235.14	plasma membrane high-affinity glucose/fructose:proton symporter Ght5	S536
ght8	SPCC548.06c	plasma membrane hexose:proton symporter, unknown specificity Ght8 (predicted)	S502
glo3	SPAC22E12.17c	ARF GTPase activating protein (predicted)	S166
gpd1	SPBC215.05	glycerol-3-phosphate dehydrogenase Gpd1	S310, S376
gpd3	SPBC354.12	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase Gpd3	T184
gpx1	SPBC32F12.03c	glutathione peroxidase Gpx1	S74
gup1	SPAC24H6.01c	membrane bound O-acyltransferase, MBOAT Gup1 (predicted)	S37
has1	SPAC1F7.02c	ATP-dependent RNA helicase Has1 (predicted)	S60
hba1	SPBC365.13c	Ran GTPase binding protein Hba1	S136
hip1	SPBC31F10.13c	histone H3.3 H4 chaperone, hira family Hip1	S46

hmo1	SPBC28F2.11	HMG box protein Hmo1	S194, S215
hrp1	SPAC1783.05	ATP-dependent DNA helicase Hrp1	T1259
hsf1	SPAC2E12.02	transcription factor Hsf1	S318, S350, S354
hsp9	SPAP8A3.04c	heat shock protein Hsp9	S22, S24
hsr1	SPAC3H1.11	transcription factor Hsr1	S33
hta2	SPAC19G12.06c	histone H2A beta	S122
ies2	SPAC6B12.05c	Ino80 complex subunit Ies2	S128
ies4	SPAC23G3.04	Ino80 complex subunit Ies4	S82, S85
imp2	SPBC11C11.02	F-BAR domain protein Imp2	S502
ino80	SPAC29B12.01	SNF2 family ATP-dependent 3' to 5' DNA helicase Ino80	S272
ins1	SPCC306.05c	INSIG domain protein	S60
irs4	SPAC1687.09	autophagy/CVT pathway ENTH/VHS domain protein Irs4 (predicted)	S283, S1058
ish2	SPAC23C4.05c	LEA domain protein Ish2	S266
isp4	SPBC29B5.02c	plasma membrane OPT oligopeptide transmembrane transporter family Isp4	T96, S113
iss10	SPAC7D4.14c	NURS complex subunit Iss10	S328, S334
ksg1	SPCC576.15c	serine/threonine protein kinase Ksg1	S74, S271
lac1	SPBC3E7.15c	sphingosine N-acyltransferase Lac1	S366
lar1	SPAC1527.03	RNA-binding protein, LARP1 family Lar1 (predicted)	S432
lea1	SPBC1861.08c	U2 snRNP-associated protein Lea1 (predicted)	S194
lem2	SPAC18G6.10	LEM domain nuclear inner membrane protein Heh1/Lem2	S184
leo1	SPBC13E7.08c	RNA polymerase II associated Paf1 complex subunit Leo1	S426, S428
leu2	SPAC9E9.03	3-isopropylmalate dehydratase Leu2	S358
lsb1	SPBC119.05c	Wiskott-Aldrich syndrome homolog binding protein Lsb1 (predicted)	S47
ltc1	SPBC20F10.07	GRAM domain membrane contact site protein Ltc1	S55
mak1	SPAC1834.08	histidine kinase Mak1	S52
mbf1	SPBC83.17	multi-protein bridging factor Mbf1 (predicted)	T74
mcm4	SPCC16A11.17	MCM complex subunit Mcm4/Cdc21	S391, S393
mcm7	SPBC25D12.03c	MCM complex subunit Mcm7	S44
meu10	SPCC1223.12c	GPI anchored cell surface protein involved in ascospore wall assembly Meu10	T153, T161
meu13	SPAC222.15	Tat binding protein 1 (TBP-1)-interacting protein (TBPIP) homolog (predicted)	T192, S194
mga2	SPAC26H5.05	IPT/TIG ankyrin repeat gene-specific transcription coactivator Mga2	S524
mip1	SPAC57A7.11	WD repeat protein, Raptor homolog Mip1	S863, S870
mis3	SPBC25B2.05	rRNA processing protein Mis3	T83, T94, T97
mkh1	SPAC1F3.02c	MEK kinase (MEKK) Mkh1	S570
mnr2	SPAC17A2.14	vacuolar CorA family magnesium ion transmembrane transporter Mnr2	S105, S113
mpd2	SPAC4F10.13c	GYF domain protein	S505, S509, S651, T723, S734, S736, S750
mpe1	SPBP8B7.15c	mRNA cleavage ubiquitin-protein ligase E3 Mpe1 (predicted)	S133
mra1	SPAC18G6.07c	rRNA (pseudouridine) methyltransferase Mra1	S72
mrđ1	SPBP22H7.02c	ribosome biogenesis RNA-binding protein Mrđ1 (predicted)	S270
msh6	SPCC285.16c	MutS protein homolog	S149, S299
msn5	SPAC328.01c	karyopherin/importin beta family nuclear import/export signal receptor (predicted)	T329, T330
mug123	SPCC16C4.17	Schizosaccharomyces specific protein Mug123	S234

ANNEX

mug35	SPAC22H12.01c	Schizosaccharomyces specific protein Mug35	S128
nak1	SPBC17F3.02	PAK-related GC kinase Nak1	S543, S549, S552
nnk1	SPCC70.05c	serine/threonine protein kinase Nnk1 (predicted)	S294
nop14	SPBC3F6.04c	U3 snoRNP protein Nop14 (predicted)	S160
nop9	SPAC6G9.02c	pumilio family RNA-binding protein Nop9 (predicted)	S26
not2	SPCC4G3.15c	CCR4-Not complex NOT box subunit Not2	T115
not3	SPAC1B3.05	CCR4-Not complex NOT box subunit Not3/5	S261, S445
npl4	SPBC1711.10c	Hrd1p ubiquitin ligase complex Npl4 (predicted)	T106
nrp1	SPAC17H9.04c	nucleolar RNA-binding protein, human TEX13A and TEX13B ortholog, implicated in mRNA processing	S437
nst1	SPAC29E6.10c	conserved fungal NST1 family protein	S358, S979
nup124	SPAC30D11.04c	nucleoporin Nup124	S241, S244, T531
nup146	SPAC23D3.06c	nucleoporin, WD repeat Nup146	T463, S479
nup40	SPAC19E9.01c	nucleoporin Nup40	S148
nup60	SPCC285.13c	nucleoporin Nup60	T265, S692
nup85	SPBC17G9.04c	nucleoporin Nup85	T443
obr1	SPAC3C7.14c	NAD(P)H dehydrogenase (quinone) (predicted)	S181
oga1	SPBC16A3.08c	Stm1 homolog Oga1	T16
ogm4	SPBC16C6.09	protein O-mannosyltransferase Ogm4	S20
orc1	SPBC29A10.15	origin recognition complex subunit Orc1	S320
orc2	SPBC685.09	origin recognition complex subunit Orc2	T57, T62, T65
osh2	SPBC2F12.05c	sterol intermembrane transfer protein Osh2 (predicted)	S840, S843, S846
pabp	SPAC57A7.04c	major poly(A) binding protein Pabp/Pab1	S618
pal1	SPCP1E11.04c	membrane associated protein Pal1	S70, S361
pan1	SPAC25G10.09c	actin cortical patch component, with EF hand and WH2 motif Pan1 (predicted)	S1053
pan2	SPAC22G7.04	PAN complex (poly(A)-specific ribonuclease) ubiquitin C-terminal hydrolase subunit Pan2 (predicted)	S627, S628
pan3	SPAC1B1.04c	PAN complex protein phosphotransferase subunit Pan3 (predicted)	S186
pat1	SPBC19C2.05	serine/threonine protein kinase Ran1/Pat1	S469
pdr16	SPCC23B6.04c	meiotic sec14 cytosolic factor family, phospholipid-intermembrane transfer protein Pdr16 (predicted)	S307, T503, S556, S559
pho7	SPBC27B12.11c	transcription factor Pho7	S230
pho84	SPBC8E4.01c	inorganic phosphate transmembrane transporter (predicted)	T281
phx1	SPAC32A11.03c	stationary phase-specific homeobox transcription factor Phx1	T156
pka1	SPBC106.10	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit Pka1	S350
pkd2	SPAC1F7.03	plasma membrane TRP-like calcium ion channel Pkd2	T653
pma1	SPAC1071.10c	plasma membrane P-type proton exporting ATPase, P3-type Pma1	S51, S494
pmc4	SPBC1105.06	mediator complex subunit Med4	S218
pmr1	SPBC31E1.02c	plasma membrane P-type ATPase, calcium transporting Pmr1	T160, T170
pob1	SPBC1289.04c	Boi family protein	Y110, S146
pol1	SPAC3H5.06c	DNA polymerase alpha catalytic subunit	S44
por1	SPAC1635.01	mitochondrial outer membrane voltage-dependent anion-selective channel Por1 (predicted)	Y246, T264
ppc89	SPAC4H3.11c	spindle pole body protein Ppc89	S157
ppk14	SPAC4G8.05	serine/threonine protein kinase Ppk14 (predicted)	S72
ppk29	SPBC557.04	Ark1/Prk1 family protein kinase Ppk29	S472, T549
ppk3	SPAC15A10.13	protein kinase domain and HEAT repeat protein Ppk3	S562, S564
ppk30	SPBC6B1.02	Ark1/Prk1 family protein kinase Ppk30	S452, S888

ppp1	SPBC19F5.05c	pescafillo-family BRCT domain protein Ppp1 (predicted)	T320
prf1	SPBC651.09c	RNA polymerase II associated Paf1 complex (predicted)	S470
prr1	SPAC8C9.14	transcription factor Prr1	S328
pst3	SPBC1734.16c	SIN3 family co-repressor Pst3	T200
ptr2	SPBC13A2.04c	plasma membrane PTR family peptide transmembrane transporter Ptr2	S617
puf1	SPBC56F2.08c	pumilio family RNA-binding protein Puf1 (predicted)	S102
puf2	SPBP35G2.14	pumilio family RNA-binding protein Puf2	S153
pus4	SPBC11C11.10	tRNA pseudouridine synthase Pus4 (predicted)	S291
pwi1	SPCC825.05c	splicing coactivator Srm160 (predicted)	S209, S211
pzh1	SPAC57A7.08	serine/threonine protein phosphatase Pzh1	S514
rad21	SPCC338.17c	mitotic cohesin complex, non-SMC subunit Rad21 (kleisin)	S163
rad24	SPAC8E11.02c	14-3-3 protein Rad24	S257
rad8	SPAC13G6.01c	ubiquitin-protein ligase E3/ ATP-dependent DNA helicase Rad8	S25, S31
rap1	SPBC1778.02	shelterin complex telomere binding subunit Rap1	S212
rdi1	SPAC6F12.06	Rho GDP dissociation inhibitor Rdi1 (predicted)	S34
rga2	SPAC26A3.09c	RhoGAP, GTPase activating protein Rga2	S445
rga4	SPBC28E12.03	RhoGAP, GTPase activating protein Rga4	S178
rga6	SPBC354.13	RhoGAP, GTPase activating protein Rga6 (predicted)	T485
rgf2	SPAC1006.06	RhoGEF Rgf2	S178
rgf3	SPCC645.06c	RhoGEF Rgf3	S34
rib1	SPAP27G11.09c	GTP cyclohydrolase Rib1 (predicted)	S45
rix1	SPCC4G3.18	Rix1 complex Armadillo-type fold Rix1	S611
rlp24	SPAC22E12.13c	ribosomal L24-like protein involved in ribosome biogenesis Rlp24 (predicted)	T136
rng10	SPAC688.07c	coiled-coil protein involved in septum formation Rng10	S112, S538, S828
rng8	SPAC4H3.14c	contractile ring myosin V regulator Rng8	S67
rod1	SPAC31A2.12	arrestin/PY protein involved in ubiquitin-mediated endocytosis Rod1 (predicted)	S449
rpa34	SPBC11G11.05	DNA-directed RNA polymerase I complex subunit Rpa34 (predicted)	S186
rpl8	SPBC29A3.04	60S ribosomal protein L7a/L8 (predicted)	S11
rps101	SPAC13G6.02c	40S ribosomal protein S3a	S240
rps2302	SPBP4H10.13	40S ribosomal protein S23 (predicted)	S39
rqc1	SPAC1142.01	ribosome quality control complex (RQC) complex subunit Rqc1	S648
rrp2	SPBC23E6.02	ATP-dependent DNA helicase/ ubiquitin-protein ligase E3 (predicted)	S289
rrp4	SPAC2F7.14c	exosome subunit Rrp4	S181, S184, S186
rrp5	SPCC1183.07	U3 snoRNP-associated protein Rrp5 (predicted)	T1391
rsc1	SPBC4B4.03	RSC complex subunit Rsc1	S515
rsc4	SPBC1734.15	RSC complex subunit Rsc4	T323
rsd1	SPAC19G12.07c	RNA-binding protein Rsd1 (predicted)	S109
sak1	SPAC3G9.14	transcriptional activator Sak1	S224
sce3	SPBC18H10.04c	translation initiation factor (predicted)	T362
sck1	SPAC1B9.02c	serine/threonine protein kinase Sck1	T115
scr1	SPBC1D7.02c	transcription factor Scr1	S265, S333
scw1	SPCC16C4.07	RNA-binding protein Scw1	S68, T286, T347, T369, T375
sdc1	SPCC18.11c	Lid2 complex Dpy-30 domain subunit Sdc1	S101
sds23	SPBC646.13	PP2A-type phosphatase inhibitor Sds23/Moc1	S329

ANNEX

sec16	SPAC29B12.07	multidomain vesicle coat component Sec16 (predicted)	S91
sec27	SPBC16C6.13c	coatomer beta' subunit (predicted)	S146
sec28	SPBC24C6.05	coatomer epsilon subunit (predicted)	T25
sec62	SPAC17G6.09	ER protein translocation subcomplex subunit Sec62 (predicted)	T247
sec71	SPAC4D7.01c	Sec7 domain protein, ARF GEF (predicted)	S332
sec73	SPAC19A8.01c	guanyl-nucleotide exchange factor Sec73 (predicted)	S1000
sec74	SPAC26F1.01	guanyl-nucleotide exchange factor Sec74 (predicted)	S70
ser3	SPCC364.07	D-3 phosphoglycerate dehydrogenase Ser3 (predicted)	S19
set2	SPAC29B12.02c	histone lysine H3-K36 methyltransferase Set2	S65, S67, S596
set3	SPAC22E12.11c	histone lysine methyltransferase Set3	S530, S533, T582, S591, S714
sfp47	SPAC7D4.02c	Ubp4 interactor Sfp47	S235
sgf73	SPCC126.04c	SAGA complex deubiquitinating submodule subunit Sgf73	S274
sid2	SPAC24B11.11c	NDR kinase Sid2	S402
sif2	SPCC16C4.01	mitochondrial protein, involved in mitochondrial gene expression (predicted)	T207
sks2	SPBC1709.05	heat shock protein, ribosome associated molecular chaperone Sks2	T421, S557
sle1	SPAC1A6.07	eisosome assembly protein Seg1	T19
sif1	SPAC821.03c	cell cortex node protein Sif1	S244
slt1	SPAC17G6.13	Schizosaccharomyces specific protein Slt1	T222, S269, S322
sly1	SPCC74.01	SNARE binding protein Sly1 (predicted)	S36
sol1	SPBC30B4.04c	SWI/SNF complex subunit Sol1	S342
spg4	SPAC328.04	microtubule severing ATPase Spg4 (predicted)	S167
spo15	SPAC1F3.06c	mitotic and meiotic spindle pole body protein Spo15	S342
spt5	SPAC23C4.19	DSIF transcription elongation factor complex subunit Spt5	S27
spt7	SPBC25H2.11c	SAGA complex bromodomain subunit Spt7	S156
sre2	SPBC354.05c	membrane-tethered transcription factor Sre2	T259
sro7	SPAC1F3.03	Lgl family protein Sro7 (predicted)	S492
srp1	SPBC11C11.08	SR family protein, human SRF52 ortholog Srp1	S267
srp2	SPAC16.02c	splicing factor Srp2	S294
srp40	SPBC1711.05	nucleocytoplasmic transport chaperone Srp40 (predicted)	S395, S402
ssm4	SPAC27D7.13c	dynactin microtubule-binding subunit, p150-Glued Ssm4	T606
ssn6	SPBC23E6.09	transcriptional corepressor Ssn6	T1041
ssp2	SPCC74.03c	AMP-activated protein serine/threonine kinase alpha subunit Ssp2	S367
str3	SPAC1F8.03c	plasma membrane heme transmembrane transporter Str3	S44
sts5	SPCC16C4.09	cytoplasmic P body 3'-5'-exoribonuclease, Dis3L2-related (predicted)	S380
swi6	SPAC664.01c	heterochromatin (HP1) family chromodomain protein Swi6	T235
syp1	SPBC4C3.06	F-BAR domain protein Syp1 (predicted)	S240
taf12	SPAC15A10.02	SAGA complex/transcription factor TFIID complex subunit A Taf12	T221
tcb1	SPCC962.01	tricalbin, C2 domain protein (phospholipid binding) ER-plasma membrane tethering protein Tcb1 (predicted)	T94
tcb3	SPAPYUK71.03c	tricalbin, C2 domain protein (phospholipid binding) ER-plasma membrane tethering protein Tcb3	S885

tdh1	SPBC32F12.11	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Tdh1	T184
tea1	SPCC1223.06	cell end marker Tea1	S556
tea2	SPBC1604.20c	kinesin family plus-end directed microtubule motor Tea2	T77, T85
tea4	SPBC1706.01	tip elongation aberrant protein Tea4	S540
tgp1	SPBC1271.09	plasma membrane glycerophosphodiester transmembrane transporter (predicted)	T152
tho2	SPAC1D4.14	THO complex subunit Tho2 (predicted)	T1351
tif35	SPBC18H10.03	translation initiation factor eIF3g	S6
tif452	SPBC1709.18	translation initiation factor eIF4E, 4F complex E subunit isoform 2, stress response factor	S33
tif471	SPAC17C9.03	translation initiation factor eIF4G	S1349, S1353
tif5	SPAC2F7.05c	translation initiation factor eIF5, Tif5(predicted)	S159
tif52	SPAC56F8.03	translation initiation factor eIF5B Tif52 (predicted)	S213, T364
tih1	SPAC212.11	RecQ type DNA helicase	T956
tma23	SPAC1952.02	ribosome biogenesis protein Tma23 (predicted)	S121
top2	SPBC1A4.03c	DNA topoisomerase II	S1401
tpr1	SPAC27D7.14c	RNA polymerase II associated Paf1 complex subunit Tpr1	S930
tps3	SPACUNK4.16c	alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase (predicted)	S105
trm1	SPBC25D12.05	tRNA (guanine-N2-)-methyltransferase Trm1	T226
trm732	SPCC1494.07	tRNA (cytosine 32-2'-O)-methyltransferase regulator Trm732	S770
trr1	SPBC3F6.03	thioredoxin reductase Trr1	T48, T49, T50
trs33	SPAC13G6.05c	TRAPP complex subunit Trs33 (predicted)	T177, S201
tup12	SPAC630.14c	transcriptional corepressor Tup12	S194
ubp8	SPAC13A11.04c	SAGA complex ubiquitin C-terminal hydrolase Ubp8	T190
ubx4	SPBC21C3.11	UBX domain protein Ubx4 (predicted)	S272
ucp8	SPBC83.01	UBA/EH/EF hand domain protein Ucp8	S259
utp18	SPBC29A3.06	CGI-48 family Utp18 (predicted)	S140
vac8	SPBC354.14c	vacuolar protein Vac8 (predicted)	T173
vcx1	SPCC1795.02c	vacuolar proton/calcium exchanger (predicted)	S154, T166
vgl1	SPCC550.14	KH domain RNA binding protein, vigilin (predicted)	S122, S125
vph1	SPAC16E8.07c	V-type ATPase V0 subunit a (predicted)	S686, S702
vps60	SPCC162.06c	vacuolar sorting protein Vps60 (predicted)	S124
vps74	SPAC5D6.13	Golgi phosphoprotein 3 family Vps74 (predicted)	S14
vps901	SPBC4F6.10	guanyl-nucleotide exchange factor Vps902	S405
vsl1	SPCC594.06c	vacuolar SNARE Vsl1/Vam7	S241, S246
win1	SPAC1006.09	MAP kinase kinase kinase Win1	S125
wis1	SPBC409.07c	MAP kinase kinase Wis1	S71, S201, S246, S250
wis4	SPAC9G1.02	MAP kinase kinase kinase Wis4	T640
ypp1	SPAC637.04	phosphatidylinositol-4 kinase plasma membrane scaffold Erf3 partner Ypp1	S647, S650
zfs1	SPBC1718.07c	zf-CCCH tandem zinc finger protein, human Tristetraprolin homolog Zfs1, involved in mRNA catabolism	S48
zpr1	SPAC15A10.04c	EF-1 alpha binding zinc finger protein Zpr1 (predicted)	T221
	SPAC1327.01c	transcription factor, zf-fungal binuclear cluster type (predicted)	S47
	SPAC16E8.17c	succinate-CoA ligase alpha subunit (predicted)	T146
	SPAC17G8.06c	dihydroxy-acid dehydratase (predicted)	T291, T302, S335
	SPAC24H6.11c	sulfate transmembrane transporter (predicted)	S789
	SPAC27D7.09c	But2 family protein, similar to cell surface molecules	T73
	SPAC323.04	mitochondrial ATPase (predicted)	T228, S241, S243
wdr44	SPAC3H5.08c	WD repeat protein, human WDR44 family	S722

ANNEX

	SPAC926.06c	leucine-rich repeat protein, unknown role	S290
	SPAC959.11	Schizosaccharomyces specific protein	S109, S114, T116
	SPAPB1A10.13	Schizosaccharomyces specific protein	T341, S418, T431
	SPAPB1E7.01c	DUF3245 nucleolar protein, conserved in fungi and plant family	T127
	SPBC13E7.07	Schizosaccharomyces specific protein	S156
	SPBC1604.12	Schizosaccharomyces specific phosphoprotein	S603
	SPBC1683.03c	transmembrane transporter (predicted)	T480, S497
	SPBC16E9.02c	CUE domain protein, human TOLLIP ortholog	T463
pac3	SPBC16E9.19	proteasome assembly chaperone 3 (predicted)	T62
	SPBC17D1.05	Schizosaccharomyces specific protein	S96
	SPBC19C7.11	plasma membrane ClC chloride channel (predicted)	S20
	SPBC1E8.02	ER ubiquitin family protein (predicted)	T105, T110
	SPBC23G7.13c	plasma membrane urea transmembrane transporter (predicted)	S459, S466, S467
	SPBC36.01c	spermidine family transmembrane transporter (predicted)	S82
	SPBC3E7.09	Sad1-UNC-like protein involved protein folding in the ER (predicted)	S214
	SPBC3F6.01c	TPR repeat serine/threonine protein phosphatase (predicted)	S105
	SPBC646.08c	sterol intermembrane transfer protein (predicted)	S215, S221, S225
	SPBC713.09	Schizosaccharomyces specific protein	S191
	SPBP4H10.07	ubiquitin-protein ligase E3, unknown specificity (predicted)	S580
	SPBP4H10.14c	Schizosaccharomyces specific protein	S27
	SPBP8B7.26	Schizosaccharomyces specific protein	S214, S238
	SPBPB2B2.01	amino acid transmembrane transporter (predicted)	T184
	SPBPB7E8.02	PSP1 family protein	S98, S539
	SPCC1223.01	ubiquitin-protein ligase E3 involved in rescue of stalled ribosomes (predicted)	S482
	SPCC1442.11c	Schizosaccharomyces pombe specific protein	T172
	SPCC1739.01	zf-CCCH type zinc finger protein	S399, S409
	SPCC297.05	DENN domain Rab GDP-GTP exchange factor, implicated in endosomal transport (predicted)	S118
	SPCC584.03c	GTPase regulator (predicted)	S441
	SPCC584.15c	arrestin involved in ubiquitin-dependent endocytosis	S460
	SPCC594.02c	DUF2456 family conserved fungal protein	S263
	SPCC622.14	GTPase activating protein (predicted)	S268

