



Centro Mixto Universidad de Salamanca y CSIC
Departamento de Microbiología y Genética
Instituto de Biología Funcional y Genómica



“Identificación de nuevos reguladores implicados en los procesos de apoptosis y autofagia mediante la expresión de la Caspasa-10 humana en *Saccharomyces cerevisiae*”

Tesis Doctoral
Patricia Lisa Santamaría
Salamanca, 2011



Centro Mixto Universidad de Salamanca y CSIC
Departamento de Microbiología y Genética
Instituto de Biología Funcional y Genómica



“Identificación de nuevos reguladores implicados en los procesos de apoptosis y autofagia mediante la expresión de la Caspasa-10 humana en *Saccharomyces cerevisiae*”

Memoria presentada por Patricia Lisa Santamaría para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas.

Salamanca, a de Mayo de 2011.

D. Ángel Domínguez Olivarri, Director del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “Identificación de nuevos reguladores implicados en los procesos de apoptosis y autofagia mediante la expresión de la Caspasa-10 humana en *Saccharomyces cerevisiae*” presentada por Dña. Patricia Lisa Santamaría para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. José Luis Revuelta Doval y Dr. Alberto Jiménez García en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firmo el presente certificado en Salamanca, a de Mayo de 2011.

Fdo. Dr. Ángel Domínguez Olivarri

D. José Luis Revuelta Doval, Catedrático de Genética de la Universidad de Salamanca

D. Alberto Jiménez García, Profesor titular del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “Identificación de nuevos reguladores implicados en los procesos de apoptosis y autofagia mediante la expresión de la Caspasa-10 humana en *Saccharomyces cerevisiae*“ que presenta el doctorando Patricia Lisa Santamaría, ha sido realizado bajo su dirección en el Centro Mixto Instituto de Biología Funcional y Genómica, Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firmo el presente certificado en Salamanca, a de Mayo de 2011.

Fdo. Dr. José Luis Revuelta Doval

Fdo. Dr. Alberto Jiménez García

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer al Dr. José Luis Revuelta haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación durante estos 5 años y al Dr. Alberto Jiménez por su tutela en este trabajo además de la confianza depositada en mí.

A mis compañeros de trabajo: Cris, Cristi (o Mili), José (o Josito) y Loli. Muchas gracias por todos los momentos vividos tanto dentro como fuera del laboratorio. Habéis sido mucho más que mis compañeros, habéis sido mi apoyo en los días difíciles y en los días buenos, y estoy segura de que de aquí me llevo a unos buenos amigos. Quisiera agradecer también a Angie su atención y preocupación personal por mí.

A todo el personal técnico, en particular a Carmen por su paciencia con el microscopio y a Paco por todas las cosas que ha tenido que reparar siempre sin olvidarse de una sonrisa. Gracias a todas las personas que han pasado por aquí y han hecho todo este tiempo mucho más agradable.

A mi grupo de amigos, especialmente a Sonia, Laura y Mireia, por vuestra comprensión, por todos los ratos inolvidables que me habéis hecho pasar y, sobre todo, por vuestro empeño en conseguir sacarme siempre una sonrisa. Me siento muy orgullosa de teneros como amigas.

A mis padres porque todo lo que soy os lo debo a vosotros. Gracias por vuestro apoyo incondicional porque sin él nunca habría llegado hasta aquí. A mis hermanos, especialmente a Adri, por su preocupación, cariño, atención...

A Claudio por el día a día que ha vivido a mi lado durante estos cinco años de tesis en los que ha habido alegrías, tristezas, euforia, desesperación... Gracias por entenderme y creer en mí siempre.

“Un científico debe tomarse la libertad de plantear cualquier cuestión, de dudar de cualquier afirmación, de corregir errores”.

Julius Robert Oppenheimer

A mis padres, Jesús y Eloisa

A Claudio

ABREVIATURAS

BiFC	Complementación bimolecular de fluorescencia
CARD	Dominio de reclutamiento y activación de las caspasas
<i>CASP8</i>	Caspasa-8
<i>CASP10</i>	Caspasa-10
CFP	Proteína azul fluorescente
Cub	Extremo C-terminal de la ubiquitina
DD	Dominio de muerte
DED	Dominio efector de muerte
DHE	Dihidroetidio
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> (Citometría de flujo)
FLIP	Proteína inhibidora de FLICE
GFP	Proteína verde fluorescente
H ₂ DCF-DA	Diclorofluoresceín-diacetato
HU	Hidroxiurea
MA	Metil-adenina
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MAPKK	Proteína quinasa quinasa activada por mitógenos
MAPKKK	Proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógenos
MOMP	Permeabilización de la membrana mitocondrial externa
Nub	Extremo N-terminal de la ubiquitina
PAS	Estructura preautofagosomal
PFGE	<i>Pulse Field Gel Electrophoresis</i> (electroforesis en campo pulsado)
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PI3P	Fosfatidilinositol 3-fosfato
PtdIns3K	Fosfatidilinosítido 3-quinasa
PS	Fosfatidilserina
Rap	Rapamicina
RFP	Proteína roja fluorescente
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SUS	Sistema de rotura de la ubiquitina
TCA	Ácido tricloroacético
USPs	Proteasas específicas de ubiquitina
YeVenus	Proteína amarilla fluorescente

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. Introducción

I.1. LA LEVADURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> COMO ORGANISMO MODELO.....	1
I.1.1. Colecciones de mutantes de delección de <i>S. cerevisiae</i>	2
I.1.2. Aproximaciones genéticas para la identificación de nuevas funciones génicas.....	5
I.1.2.1 Aproximaciones inversas.....	5
I.2. LOS PROCESOS DE MUERTE CELULAR.....	8
I.2.1. Apoptosis.....	9
I.2.1.1. Apoptosis en levaduras.....	13
I.2.2. Las caspasas como principales reguladores de los procesos de apoptosis.....	13
I.2.2.1. Clasificación y estructura.....	15
I.2.2.2. Metacaspasas y paracaspasas.....	17
I.2.3. Necrosis.....	19
I.2.4. Autofagia.....	20
I.2.4.1. Concepto de macroautofagia y fases en que se divide el proceso.....	21
I.2.4.2. Procesos de autofagia de tipo selectivo.....	26
I.2.5. Relación entre apoptosis y autofagia.....	28
I.3. CHECKPOINT DE FASE-S.....	31
I.4. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN Y CASCADAS DE FOSFORILACIÓN.....	33
I.4.1. Rutas de MAPKs en levaduras.....	34
I.4.2. Familia de proteínas Far.....	37

II. Objetivos	41
----------------------------	----

III. Resultados

III.1. Caracterización de los fenotipos derivados de la expresión de la Caspasa-8 y la Caspasa-10 humanas en <i>S. cerevisiae</i>	43
III.1.1. Las Caspasas-8 y -10 humanas son tóxicas en <i>S. cerevisiae</i>	43
III.1.2. La Caspasa-10 humana induce muerte celular en <i>S. cerevisiae</i>	45
III.1.3. La muerte celular inducida por la expresión de las Caspasas-8 y -10 humanas es independiente de la maquinaria de la levadura.....	46
III.1.4. La activación proteolítica de la Caspasa-10 es esencial para su efecto citotóxico en <i>S. cerevisiae</i>	47

III.1.5. La expresión de las Caspasas-8 y -10 humanas promueve un aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en <i>S. cerevisiae</i>	49
III.1.6. La expresión de las Caspasas-8 y -10 humanas induce externalización de la fosfatidilserina en <i>S. cerevisiae</i>	50
III.1.7. La expresión de la Caspasa-10 humana no provoca fragmentación del ADN genómico en <i>S. cerevisiae</i>	51
III.1.8. Inactivación del checkpoint de fase-S tras la expresión de las Caspasas-8 y -10 humanas en <i>S. cerevisiae</i>	52
III.1.9. La expresión de la Caspasa-10 promueve una desorganización del citoesqueleto de actina.....	54
III.1.10. Otros fenotipos subcelulares asociados a la expresión de la Caspasa-10.....	55
III.2. Búsqueda sistemática de cepas mutantes de <i>S. cerevisiae</i> que muestran una actividad supresora de la toxicidad inducida por la Caspasa-10 humana.....	58
III.2.1. Escrutinio de genes que participan en el proceso de muerte celular inducido por la expresión de la Caspasa-10 humana en <i>S. cerevisiae</i>	58
III.3. Caracterización de nuevos mecanismos de regulación de los procesos de muerte celular en <i>S. cerevisiae</i>	61
III.3.1. Los genes <i>FAR</i> son esenciales en la toxicidad inducida por la expresión de la Caspasa-10 humana en la levadura.....	61
III.3.2. Localización subcelular de la familia Far.....	62
III.3.3. <i>FAR11</i> participa en el proceso de muerte celular inducida tras la expresión de la Caspasa-10 humana en <i>S. cerevisiae</i>	65
III.3.4. La delección del gen <i>FAR11</i> suprime los fenotipos citotóxicos observados tras la expresión de la Caspasa-10 humana en <i>S. cerevisiae</i>	66
III.3.5. La fosforilación de Far11 en el residuo de serina-18 es esencial para su función.....	69
III.3.6. La expresión de la Caspasa-10 promueve la activación de rutas MAPKs.....	71
III.3.7. La proteína Far11 participa en el proceso de muerte celular por autofagia.....	72
III.3.8. Far11 interacciona con ortólogos de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) en <i>S. cerevisiae</i>	75
III.3.9. <i>FAM40A</i> y <i>FAM40B</i> (ortólogos de <i>FAR11</i>) rescatan parcialmente el fenotipo de muerte celular.....	80

IV. Discusión

IV.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS FENOTIPOS DERIVADOS DE LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA CASPASA-8 Y CASPASA-10 HUMANA EN <i>S. CEREVISIAE</i>	83
---	----

IV.2. PARTICIPACIÓN DE <i>FAR11</i> EN EL PROCESO DE MUERTE CELULAR INDUCIDO POR LA EXPRESIÓN DE LA CASPASA-10 HUMANA EN <i>S. CEREVISIAE</i>	85
---	----

V. Conclusiones	97
------------------------------	----

VI. Materiales y métodos

VI.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	99
VI.1.1. Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	99
VI.1.2. Cepas de <i>E. coli</i>	105
VI.2. MANTENIMIENTO Y PROPAGACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	105
VI.2.1. <i>Escherichia coli</i>	106
VI.2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	106
VI.3. VECTORES Y OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS.....	107
VI.3.1. Vectores.....	107
VI.3.2. Oligonucleótidos.....	107
VI.4. PREPARACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	109
VI.4.1. Obtención de ADN plasmídico de <i>E.coli</i>	109
VI.4.2. Obtención de ADN genómico de <i>S. cerevisiae</i>	110
VI.5. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	111
VI.5.1. Transformación de células de <i>E. coli</i>	111
VI.5.2. Transformación de células de <i>S. cerevisiae</i>	111
VI.6. MANIPULACIÓN DE ADN.....	111
VI.6.1. Digestión enzimática.....	111
VI.6.2. Clonación.....	111
VI.6.3. Electroforesis de ADN.....	112
VI.6.4. Electroforesis en campo pulsado (PFGE).....	112
VI.6.5. Análisis del contenido de ADN en el ciclo celular.....	113
VI.6.6. Purificación de un fragmento de ADN en un gel de agarosa.....	113
VI.6.7. Amplificación de fragmentos de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	113
VI.6.8. Mutagénesis dirigida.....	114
VI.6.9. Secuenciación del ADN.....	114
VI.7. MANIPULACIÓN DE ARN.....	114
VI.7.1. Extracción de ARN.....	114
VI.7.2. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR).....	115
VI.8. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS.....	115
VI.8.1. Obtención de extractos proteicos de <i>S. cerevisiae</i>	115

VI.8.2. Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA).....	115
VI.8.3. Separación electroforética de proteínas.....	116
VI.8.4. Detección de proteínas con epítomos inmunoreactivos.....	116
VI.8.5. Ensayo β - galactosidasa.....	117
VI.8.6. Método de sistema de rotura de la ubiquitina (SUS).....	117
VI.8.7. Ensayo de Complementación Bimolecular de Fluorescencia (BiFC).....	118
VI.9. TÉCNICAS DE FLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA.....	118
VI.9.1.Detección de proteínas por fluorescencia directa.....	118
VI.9.2. Tinción de viabilidad celular.....	119
VI.9.3. Tinción de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	119
VI.9.4. Tinción con Anexina V/Ioduro de Propidio.....	120
VI.9.5. Tinción de diferentes orgánulos celulares.....	120
VI.9.6. Microscopía electrónica.....	120
VI.10. SOPORTE INFORMÁTICO.....	121

VI. Bibliografía.....	123
------------------------------	------------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Descripción de la estrategia de reemplazamiento génico empleada en el proyecto de Delección del Genoma de <i>S. cerevisiae</i>	3
Figura 2. Esquema de la estrategia experimental empleada en un escrutinio de pérdida de función en el que se expresa un gen tóxico desde un promotor inducible por galactosa.....	7
Figura 3. Esquema de la estrategia experimental empleada en un escrutinio de ganancia de función en el que la expresión del gen tóxico se induce con galactosa.....	8
Figura 4. Clasificación de las proteínas de la familia Bcl-2 en función de sus dominios BH.....	11
Figura 5. Esquema de las vías de apoptosis en mamíferos.....	13
Figura 6. Representación esquemática de la apoptosis en <i>S. cerevisiae</i>	15
Figura 7. Clasificación y estructura de las caspasas.....	17
Figura 8. Esquema de la organización estructural de las caspasas, metacaspasas y paracaspasas.....	19
Figura 9. Representación esquemática de las diferentes etapas de los procesos de autofagia en la levadura.....	26
Figura 10. Procesos de autofagia de tipo selectivo en <i>S. cerevisiae</i>	28
Figura 11. Esquema de la relación entre los procesos de muerte celular por apoptosis y autofagia.....	30
Figura 12. Esquema del checkpoint de fase-S en <i>S. cerevisiae</i> y en mamíferos.....	33
Figura 13. Esquema de las diferentes rutas de señalización MAPK en <i>S. cerevisiae</i>	36
Figura 14. Interacciones proteicas de la Familia Far.....	39
Figura 15. La expresión heteróloga de la Caspasa-8 y la Caspasa-10 humanas inhibe el crecimiento en <i>S. cerevisiae</i>	44
Figura 16. La Caspasa-10 humana induce muerte celular en <i>S. cerevisiae</i>	46
Figura 17. Diluciones seriadas en medios con glucosa y con galactosa de las cepas $\Delta aif1$, $\Delta mca1$ y ρ^- transformadas con los plásmidos pESC-LEU_CASP8 o pESC-URA_CASP10.....	47
Figura 18. La activación de la Caspasa-10 es esencial para su efecto citotóxico en <i>S. cerevisiae</i>	48
Figura 19. La Caspasa-8 y la Caspasa-10 humanas inducen un aumento en los niveles de estrés oxidativo en <i>S. cerevisiae</i>	49
Figura 20. La Caspasa-8 y la Caspasa-10 humanas promueven externalización de la fosfatidilserina en <i>S. cerevisiae</i>	51
Figura 21. Electroforesis en campo pulsado de ADN cromosómico de las cepas BY4741/CASP8 y BY4741/CASP10.....	52
Figura 22. Análisis del contenido de ADN de las cepas que expresan CASP8 y CASP10.....	54

Figura 23. Cultivos de la cepa BY4741/ <i>CASP10</i> crecidos durante 4h en un medio con glucosa (A) o con galactosa (B-G) fueron teñidos con Faloidina y visualizados por microscopía de fluorescencia.....	55
Figura 24. Cultivos de la cepa que expresa <i>CASP10</i> mantenidos en un medio con glucosa o con galactosa fueron teñidos con A) MDY-64 (membrana vacuolar) o B) SYTO18 (mitocondria).....	56
Figura 25. Microscopía electrónica de la cepa que expresa <i>CASP10</i>	57
Figura 26. Estrategia experimental empleada en el escrutinio genético de búsqueda de cepas supresoras de la toxicidad inducida por la expresión de <i>CASP10</i> en <i>S. cerevisiae</i>	59
Figura 27. Toxicidad de la Caspasa-10 humana en las cepas mutantes de la familia <i>FAR</i>	62
Figura 28. Localización subcelular de las proteínas Far3-CFP, Far7-GFP, Far9-CFP y Far11-YeVenus.....	63
Figura 29. Ensayos de colocalización entre Far11-Far3 y Far11-Far9.....	64
Figura 30. Relocalización de la proteína Far9-CFP tras la expresión de la Caspasa-10.....	65
Figura 31. <i>FAR11</i> es esencial en el proceso de muerte celular inducido por la expresión de <i>CASP10</i>	66
Figura 32. La cepa <i>Δfar11</i> suprime los efectos citotóxicos asociados a la expresión de <i>CASP10</i>	68
Figura 33. Mutaciones de <i>FAR11</i> en los residuos de serina-18 y serina-81.....	70
Figura 34. La expresión de la Caspasa-10 provoca activación de las rutas MAPKs.....	72
Figura 35. La expresión de la Caspasa-10 está asociada a fenotipos de autofagia.....	74
Figura 36. Representación esquemática del sistema de rotura de la ubiquitina o “ <i>Split Ubiquitin System</i> ”.....	76
Figura 37. Interacciones proteicas de Far11 con Pph21, Pph22, Pph3, Tpd3 y Far3.....	78
Figura 38. Representación experimental del método de Complementación Bimolecular de Fluorescencia (BiFC).....	79
Figura 39. Interacciones de proteínas entre Far11 y Pph21, Pph22, Pph3, Tpd3 y Far3 analizadas por el método de Complementación Bimolecular de Fluorescencia (BiFC).....	80
Figura 40. Toxicidad de la Caspasa-10 en las cepas <i>Δfar11</i> transformadas con los plásmidos de expresión de <i>FAR11</i> , <i>FAM40A</i> y <i>FAM40B</i>	81
Figura 41. Hipótesis del mecanismo molecular desencadenado tras la expresión de la Caspasa-10 humana en la cepa silvestre de <i>S. cerevisiae</i>	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales diferencias existentes entre los procesos de muerte celular por apoptosis y necrosis.....	20
Tabla 2. Cuadro-resumen del proceso de autofagia en el que participan las 34 proteínas Atg identificadas.....	27
Tabla 3. Cepas mutantes supresoras de la toxicidad asociada a la Caspasa-10 humana en <i>S. cerevisiae</i>	60
Tabla 4. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99
Tabla 5. Plásmidos empleados en este estudio.....	107
Tabla 6. Oligonucleótidos empleados en este estudio.....	107

I. Introducción

I.1. LA LEVADURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* COMO ORGANISMO MODELO

Saccharomyces cerevisiae es un hongo hemiascomiceto unicelular utilizado en la fabricación de pan, cerveza y vino. *S. cerevisiae* fue descubierta por Franz Meyen (Meyen, 1860) y es conocida comúnmente como “levadura de gemación”. A partir del año 1872 esta levadura empezó a cobrar mayor importancia en el mundo científico gracias a los estudios realizados por Pasteur sobre el proceso de fermentación empleando *S. cerevisiae* (Pasteur, 1872).

S. cerevisiae es considerado como un organismo modelo eucariótico para una gran variedad de estudios genéticos, bioquímicos y biotecnológicos debido a una serie de ventajas sobre otros sistemas modelo:

- Se trata de un organismo unicelular no patógeno y de crecimiento rápido en condiciones reproducibles, económicas y controladas. Las células de *S. cerevisiae* pueden crecer tanto en suspensión en medio líquido como en medio sólido formando colonias aisladas. Además, *S. cerevisiae* puede crecer tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas.
- *S. cerevisiae*, a diferencia de otros organismos, presenta un ciclo biológico con dos fases biológicas estables: haploide y diploide. La fase haploide permite generar, aislar y caracterizar mutantes con mucha facilidad, mientras que en la fase diploide se pueden realizar una amplia variedad de análisis genéticos como, por ejemplo, estudios de haploinsuficiencia.
- *S. cerevisiae* ofrece una amplia gama de herramientas moleculares que hacen muy sencilla su manipulación genética, destacando la disponibilidad de un sistema de transformación eficiente y versátil, así como la existencia de plásmidos estables en alto o bajo número de copias, con promotores constitutivos o inducibles. La existencia de este tipo de herramientas hace posible la expresión heteróloga de proteínas bajo unas determinadas condiciones de cultivo convirtiendo a este organismo en un instrumento muy útil en el campo de la Biología Molecular y la Biotecnología.
- Otra ventaja que presenta *S. cerevisiae* es la alta tasa de recombinación homóloga que permite la integración de ADN transformante en una localización exacta del cromosoma, reemplazando por tanto el gen deseado por un marcador de selección, por un alelo mutante, o introduciendo promotores regulables o etiquetas moleculares (GFP, 3HA, Myc, etc). Gracias al marcaje con etiquetas moleculares se puede examinar fácilmente la localización intracelular de las proteínas y detectar sus niveles de expresión.
- La mayor parte de los procesos celulares básicos están altamente conservados desde la levadura hasta el ser humano, especialmente los relacionados con el metabolismo y la división celular. Por lo tanto, *S. cerevisiae* constituye un sistema adecuado para el estudio de procesos celulares básicos como las rutas de señalización intracelular o la muerte celular

programada (Madeo, F. *et al.* 2002). De hecho, la expresión heteróloga de proteínas humanas en *S. cerevisiae* ha abierto un amplio campo de investigación en procesos de neurodegeneración, cáncer, apoptosis y autofagia (Chua, C. E. y Tang, B. L. 2006; Braun, R. J. *et al.* 2010). Además, se han descrito hasta un 30% de genes implicados en enfermedades humanas que están conservados en la levadura (Foury *et al.* 1996). Esto ha convertido a la levadura en un modelo extraordinario para analizar el desarrollo de enfermedades como el Parkinson o el Alzheimer, así como para estudiar la respuesta celular frente a diferentes tipos de estrés o agentes citotóxicos (Stephan, C. *et al.* 2006; Winderickx, J. *et al.* 2008; Bharadwaj, P. *et al.* 2010; Franssens, V. *et al.* 2010).

- *S. cerevisiae* es probablemente el organismo eucariótico mejor conocido y del que existen un mayor número de bases de datos disponibles que albergan información acerca de su genoma, transcriptoma, proteoma o interactoma.

I.1.1. Colecciones de mutantes de delección de *S. cerevisiae*

La disrupción génica es una aproximación muy eficaz para determinar la función biológica de un ORF no caracterizado. En *S. cerevisiae*, gracias a su elevada capacidad recombinogénica, es posible construir una disrupción génica precisa (desde el codón de inicio al codón de parada) y tratar de inferir la función génica a través de la respuesta de la cepa mutada frente a una amplia variedad de condiciones selectivas (estrés, nutrientes, drogas, etc) (Jacoby, J. J. *et al.* 1998).

En 1996, después de la publicación de la secuencia genómica de *S. cerevisiae*, se creó un consorcio internacional de laboratorios europeos y norteamericanos (entre los que se encontraba nuestro grupo) para desarrollar el proyecto de Delección del Genoma de *S. cerevisiae* (SGDP: *Saccharomyces* Genome Deletion Project). En este proyecto se deleccionaron de forma sistemática los aproximadamente 6000 ORFs de la levadura. La estrategia empleada consistió en el reemplazamiento mediante recombinación homóloga de cada ORF por un módulo de delección generado por PCR. El módulo de delección está formado por el marcador *kanMX4*, que aporta resistencia a G418, flanqueado por secuencias cortas (45 pb) idénticas a la secuencia genómica del locus diana (Figura 1). Empleando esta estrategia se construyeron y verificaron más de 20.000 cepas “knock-out” isogénicas correspondientes a cuatro formatos: 6.000 cepas diploides heterocigotas, 4.800 cepas diploides homocigotas, 4.800 cepas haploides *MATa* y 4800 cepas haploides *MATα*. Además pudieron identificarse 1.150 genes esenciales, cuya delección resultaba letal.

Un componente innovador de las colecciones de mutantes generadas fue desarrollado por el grupo del Dr. Ron Davis del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Stanford (California) y supuso la incorporación sistemática de etiquetas moleculares únicas y específicas para cada mutante. Cada mutante contiene a cada lado del módulo *kanMX4* una secuencia de 20 nucleótidos única y exclusiva de cada locus génico. Estas dos secuencias específicas, denominadas individualmente UPTAG y DOWNTAG, son conocidas como etiquetas moleculares o TAGs que actúan a modo de código de barras identificador de la delección que porta cada cepa. Además, cada etiqueta molecular está flanqueada, a su vez, por dos secuencias de 18 pb comunes a todas las cepas (oligonucleótidos universales), de manera que es posible en una única reacción de PCR amplificar todas las etiquetas presentes en una determinada muestra (Figura 1). La principal ventaja que proporcionan estos códigos de barras es que permiten realizar análisis fenotípicos cuantitativos de todas las cepas de delección de manera simultánea y en paralelo (Shoemaker, D. D. *et al.* 1996; Giaever, G. *et al.* 1999; Winzeler, E. A. *et al.* 1999).

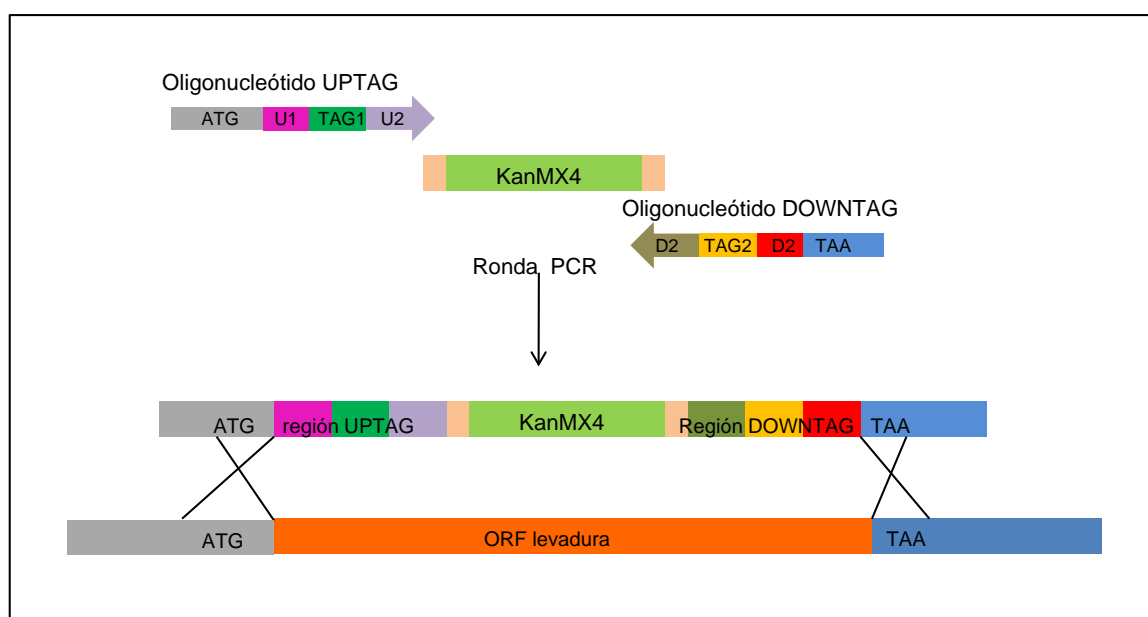


Figura 1. Descripción de la estrategia de reemplazamiento génico empleada en el proyecto de Delección del Genoma de *S. cerevisiae*. El oligonucleótido UPTAG está formado por: 18 pb de la región *upstream* de la ORF del gen que se pretende deleccionar (incluyendo el AUG), una región cebadora U1, 20 pb específicos del gen que se va a deleccionar (TAG1) y una región U2 que es una homóloga al extremo 5' del módulo *KanMX4*. El oligonucleótido DOWNTAG consta de: 18 pb de la región *downstream* de la ORF del gen que se pretende deleccionar (incluyendo el codón de parada), una secuencia cebadora D1, 20 pb específicos del gen que va a ser deleccionado (TAG2) y una región D2 que es homóloga al extremo 3' del módulo *KanMX4*. Figura adaptada de la web del SGDP (http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/PCR_strategy.html).

Como se ha mencionado anteriormente, existen tres tipos de colecciones de mutantes de delección de *S. cerevisiae*:

- Las **colecciones de mutantes heterocigotos**, en las que se ha delecionado una sola copia de cada gen, se han utilizado para identificar mutaciones que en heterocigosis causan sensibilidad a un compuesto determinado. Estos estudios se basan en el fenómeno de haplosuficiencia, por el cual una única copia de un gen en un organismo diploide es insuficiente para generar un fenotipo silvestre.
- Las **colecciones de mutantes homocigotos**, en las que ambas copias de cada gen no esencial han sido delecionadas en su correspondiente par de cromosomas, permiten identificar rutas o procesos que confieren sensibilidad o resistencia a un compuesto.
- Las **colecciones de mutantes haploides**, en los que cada gen ha sido delecionado, muestran las mismas características que las de mutantes homocigotos y presentan el inconveniente de que las cepas haploides tienen más probabilidad de estar afectadas por mutaciones secundarias que se manifiesten en el fenotipo. Los ensayos de resistencia o sensibilidad a determinadas drogas o proteínas citotóxicas llevadas a cabo en estas colecciones de mutantes permiten la identificación de reguladores de diferentes procesos celulares.

El empleo de las colecciones de mutantes de delección ofrece una serie de ventajas y permite abordar nuevas aproximaciones experimentales:

- Permiten analizar de forma sistemática el fenotipo de delección de todas las ORFs de forma rápida y exhaustiva.
- La delección de cada ORF es completa, de forma que se evitan las posibles funciones alteradas o residuales asociadas a productos truncados.
- La identificación de la mutación asociada al fenotipo de interés es directa, sin necesidad de posteriores clonaciones ni secuenciaciones. Su verificación es rápida gracias a las etiquetas moleculares únicas que la identifican.
- Permiten realizar análisis cuantitativos, ya que es posible detectar fenotipos intermedios que pasarían desapercibidos en otro tipo de estudios.

No obstante, estas estrategias presentan también algunas limitaciones a tener en cuenta:

- Los fenotipos de ORFs solapantes no se pueden diferenciar fácilmente.
- El proceso de recombinación es mutagénico, de forma que puede producir mutaciones secundarias, las cuales son difíciles de identificar.
- Algunas cepas deletantes pueden ser aneuploides.

- Los genes esenciales determinan que haya cepas inviables en las colecciones homocigotas y en las colecciones haploides.
- La delección de genes funcionalmente redundantes puede no mostrar un fenotipo detectable.
- El fenotipo de delección observado puede variar en función del fondo genético.

Las colecciones de mutantes de delección han sido utilizadas como un buen instrumento para conocer los mecanismos moleculares en los que participan genes cuya función es todavía desconocida tanto en levadura como en humanos. Por ejemplo, el gen *UTH1* de *S. cerevisiae*, implicado en procesos de autofagia, fue identificado en un *screening* genético considerándose esencial para la muerte celular inducida por la proteína proapoptótica humana Bax en la levadura y sugiriéndose la idea de que los miembros de la familia Bcl-2 de mamíferos podrían participar en las rutas de autofagia (Camougrand, N. *et al.* 2003). La principal ventaja del uso de colecciones de cepas mutantes de delección de *S. cerevisiae* consiste en que permiten identificar de forma rápida la cepa mutante en estudio mediante la amplificación y posterior secuenciación de la etiqueta molecular que es específica del gen que tiene delecionado cada cepa. Además, se pueden realizar estudios fenotípicos sistemáticos de respuesta a drogas o a la expresión de genes tóxicos analizando las cepas de manera conjunta agrupadas en *pools* de mutantes.

I.1.2. Aproximaciones genéticas para la identificación de nuevas funciones génicas

Se pueden distinguir dos tipos de estrategias experimentales generales para identificar nuevas funciones génicas: aproximaciones directas y aproximaciones inversas, dependiendo si el proceso de investigación va desde el fenotipo al gen de interés o viceversa. Estas aproximaciones difieren en el enfoque empleado durante el desarrollo del método experimental. A continuación se van a describir con mayor detalle algunas aproximaciones inversas que se han empleado en el desarrollo de este trabajo.

I.1.2.1. Aproximaciones Inversas

La Genética inversa es una disciplina de la Genética que trata de descubrir la función de un gen mediante el análisis de los efectos fenotípicos de las secuencias de genes específicos obtenidos por secuenciación del ADN. Este tipo de aproximaciones permite identificar nuevas funciones génicas mediante escrutinios de pérdida o ganancia de función.

Escrutinios de pérdida de función

Es un tipo de ensayo perteneciente al campo de la genómica inversa que permite realizar estudios *in vivo*. Su objetivo consiste en identificar mutaciones que rescaten la inhibición del crecimiento producida por la expresión o sobreexpresión de proteínas tóxicas para la levadura (Arnoldo, A. *et al.* 2008). La ventaja de este método es que permite identificar moduladores de proteínas heterólogas (Camougrand, N. *et al.* 2003); sin embargo, este tipo de escrutinios están limitados al empleo de proteínas que sean tóxicas en la levadura.

Las aproximaciones genéticas que consisten en la búsqueda de cepas que supriman la toxicidad de una determinada proteína o compuesto se han utilizado para identificar genes que participan en procesos citotóxicos y de muerte celular (Dilda, P. J. *et al.* 2005). En los ensayos donde se expresa una proteína citotóxica en la levadura es necesario tener en cuenta una serie de factores como son el tipo de promotor empleado para la expresión del gen de interés (inducible o constitutivo) o si el gen está clonado en un vector de expresión en levaduras episómico o centromérico.

Aunque el sistema es extremadamente versátil, la expresión del gen de interés resulta un instrumento realmente útil si se trata de una proteína tóxica en la levadura y el propósito del estudio es comparar en diferentes cepas mutantes la existencia o ausencia de crecimiento ya que estos fenotipos son fácilmente observables y analizables.

El procedimiento llevado a cabo en los escrutinios basados en la búsqueda de cepas mutantes capaces de suprimir o revertir el efecto citotóxico de una determinada proteína consiste en clonar el gen de interés (gen tóxico) en un plásmido de expresión inducible y, posteriormente, transformar una colección de cepas mutantes, ya sea de forma individual o empleando conjuntos de mutantes agrupados en *pools*. La expresión del gen de interés se efectúa en el medio apropiado en función del promotor utilizado. Por ejemplo, si la expresión del gen de interés es inducible en galactosa (promotor *GALI*) los transformantes serán seleccionados en un medio con glucosa, donde la expresión del gen está reprimida para, posteriormente, ser transferidos a un medio con galactosa donde se induce la expresión del gen tóxico (Giorgini, F. y Muchowski, P. J. 2006). Si la expresión del gen de interés resulta tóxica no habrá crecimiento de la cepa silvestre en un medio donde se induce su expresión. Sin embargo, las cepas mutantes que crezcan en el medio inducible se considerarán cepas supresoras y, por tanto, los genes que tengan delecionados las cepas supresoras (genes supresores) serán esenciales en los mecanismos que conducen a la

toxicidad del gen de interés en la levadura (Figura 2). En el caso de que estos genes supresores estuvieran conservados en humanos podrían constituir una excelente herramienta para identificar nuevas funciones y posibles dianas terapéuticas en el tratamiento de diferentes patologías (Bidlemaier, S. *et al.* 2009).

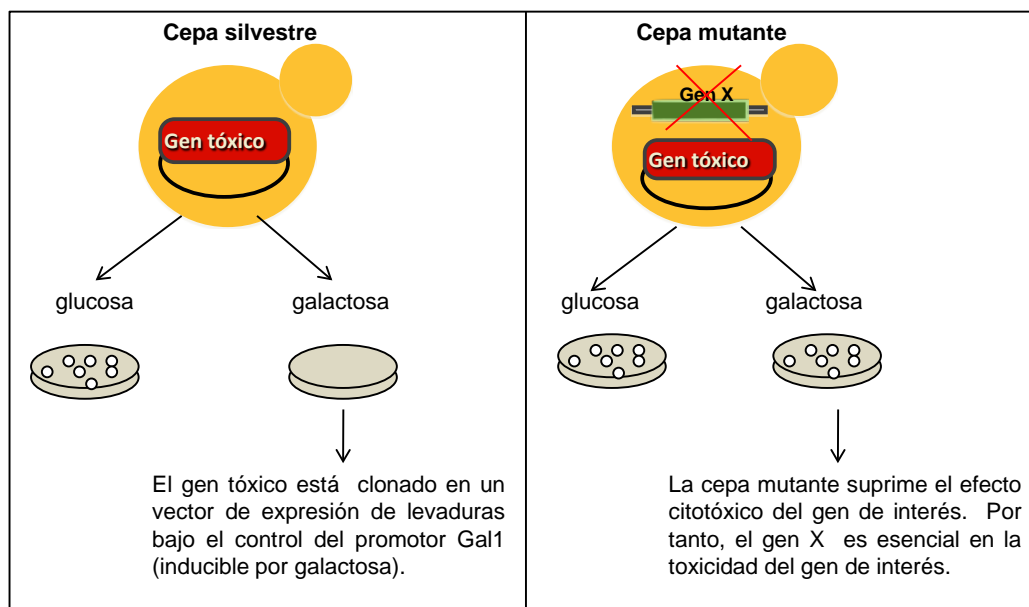


Figura 2. Esquema de la estrategia experimental empleada en un escrutinio de pérdida de función en el que se expresa un gen tóxico desde un promotor inducible por galactosa.

Escrutinios de ganancia de función

Estos análisis se basan en la alteración de un fenotipo seleccionado mediante el incremento de la dosis génica. Este tipo de escrutinios han permitido la identificación de genes implicados en diversas funciones celulares como por ejemplo en la parada del ciclo celular en fase G1 (Liu, H. *et al.* 1992; Espinet, C. *et al.* 1995). Su objetivo consiste en identificar genes cuya sobreexpresión rescate la inhibición del crecimiento producida por una droga o por la expresión o sobreexpresión de proteínas tóxicas para la levadura (Liu, H. *et al.* 1992). La sobreexpresión de los genes correspondientes se realiza mediante el empleo de una librería genómica de expresión en la que cada construcción presenta la ORF del gen clonada en un vector de expresión bajo el control de un promotor inducible. La librería genómica de expresión puede ser utilizada para la búsqueda de genes cuya sobreexpresión promueva el crecimiento o suprima el efecto citotóxico desencadenado por la expresión del gen de interés (gen tóxico). El método desarrollado en este caso consiste en una doble transformación del plásmido en el que está clonado el gen tóxico y de la librería genómica en la cepa silvestre de la levadura (Giorgini, F. y Muchowski, P. J. 2006). La expresión del gen de interés (gen tóxico) y de los genes de la librería genómica de expresión se efectúa en el

medio apropiado en función de los promotores utilizados. La cepa silvestre que únicamente expresa el gen tóxico no podrá crecer. Sin embargo, las cepas en la que se sobreexpresa un determinado gen (gen X) que suprima el fenotipo citotóxico ocasionado por el gen tóxico sí mostrarán crecimiento y se considerará que la sobreexpresión del gen X participa en la toxicidad del gen tóxico en la levadura (Figura 3).

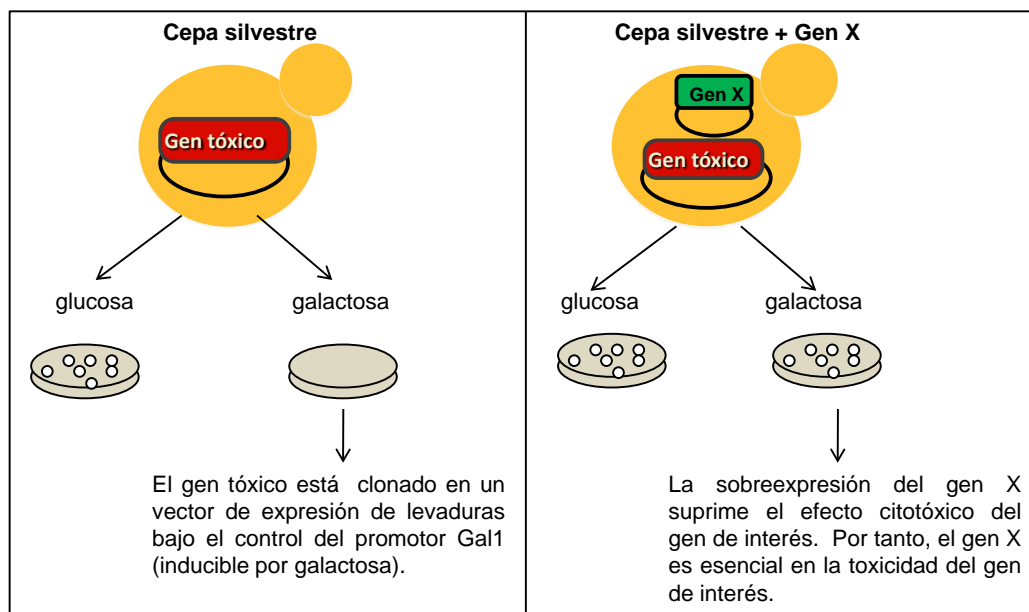


Figura 3. Esquema de la estrategia experimental empleada en un escrutinio de ganancia de función en el que la expresión del gen tóxico se induce con galactosa. La librería genómica de expresión puede ser utilizada para identificar genes cuya sobreexpresión suprime el fenotipo citotóxico.

En nuestro grupo estamos interesados en la identificación de nuevos circuitos de regulación de los procesos de muerte celular mediante el empleo de las aproximaciones descritas en *S. cerevisiae* y que han servido para identificar nuevas funciones génicas en diversos trabajos previos. A continuación se describen los aspectos principales de los procesos de muerte celular.

I.2. LOS PROCESOS DE MUERTE CELULAR

Los seres vivos están expuestos a una multitud de agentes nocivos extracelulares e intracelulares que afectan al correcto funcionamiento de sus células. De hecho, muchas patologías tienen su origen en limitaciones o anomalías en los procesos de mantenimiento y reparación del DNA, o en los mecanismos de detoxificación de radicales libres (Vicencio, J. M. *et al.* 2008).

Las células que presentan ciertos daños irreversibles o que se encuentran en ambientes extremadamente adversos disponen de dos mecanismos que permiten preservar la integridad del

organismo: entrar en un estado de quiescencia permanente e inactividad metabólica (un proceso denominado *senescencia celular*); o bien iniciar procesos de muerte celular programada (Galluzzi, L. *et al.* 2007; Vicencio, J. M. *et al.* 2008).

La amplia variedad de procesos de muerte celular ha propiciado que el Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular (NCCD) haya formulado una clasificación atendiendo a diferentes aspectos (Kroemer, G. *et al.* 2009):

- morfológicos: apoptosis, necrosis y autofagia
- enzimológicos: con o sin implicación de diferentes proteasas como caspasas, calpains o catepsinas
- funcionales: programada o accidental, fisiológica o patológica
- inmunológicos: inmunogénica o no-inmunogénica

A continuación, se van a tratar los *tipos de muerte celular en base a sus aspectos morfológicos: apoptosis, necrosis y autofagia*, ya que en este trabajo se han estudiado los fenotipos en base a este criterio.

I.2.1. Apoptosis

El término apoptosis fue acuñado por primera vez por Kerr *et al.*, en 1972. Se trata de un tipo de muerte celular programada genéticamente en la que los rasgos característicos son: la generación masiva de radicales libres de oxígeno (ROS), la externalización de la fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana plasmática, la aparición de cuerpos apoptóticos (células cuyo contenido ha sido degradado), la fragmentación nuclear, la condensación de la cromatina y la degradación del ADN (Kerr, J. F. *et al.* 1972).

Este proceso es de vital importancia para el desarrollo y la supervivencia de los organismos y se basa principalmente en la activación controlada de proteasas (caspasas) e hidrolasas que degradan ciertos componentes celulares (Vicencio, J. M. *et al.* 2008). La apoptosis es una respuesta extrema al estrés celular que acaba en la muerte de las células dañadas y representa un importante mecanismo de supresión tumoral. De hecho, fallos en los mecanismos celulares de apoptosis son responsables de la aparición y progresión de algunos tipos de cáncer (Roth, W. 2009; Zivny, J. *et al.* 2010).

Para llevar a cabo la ejecución del programa apoptótico en mamíferos existen dos vías: la vía intrínseca y la vía extrínseca, que confluyen en la activación de las caspasas iniciadoras y efectoras capaces de transmitir la señal apoptótica a través de una cascada de transducción de señales.

- ***Vía intrínseca o mitocondrial:***

El estímulo responsable de esta vía de muerte procede del propio interior celular (por ejemplo, debido a estrés genotóxico). El evento crucial para que se desencadenen los mecanismos moleculares de activación de esta ruta es la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP) (Chipuk, J. E. *et al.* 2006). Este suceso va a permitir la liberación al citosol de numerosas proteínas residentes en el espacio intermembranal de la mitocondria (citocromo c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, AIF1 y endonucleasa G).

Una vez en el citosol, el citocromo c se asocia con Apaf-1 (*Apoptosis Protease Activating Factor-1*) y con la procaspasa-9 para formar el apoptosoma (Shi, Y. 2008). Este complejo proteico va a permitir la oligomerización y posterior activación de la caspasa-9 que, como caspasa iniciadora, se encarga de activar mediante proteólisis a las caspasas efectoras (caspasa-3) (Bratton, S. B. *et al.* 2001; Chu, C. Y. *et al.* 2001). Las caspasas efectoras son realmente los ejecutores del programa apoptótico ya que son las encargadas de proteolizar los sustratos correspondientes como enzimas de reparación del ADN (PARP) y endonucleasas (Cohen, G. M. 1997; Widlak, P. y Garrard, W. T. 2005; Yoshida, A. *et al.* 2006).

La permeabilización de la membrana mitocondrial también permite la salida de SMAC/DIABLO que bloquea la actividad de los inhibidores de caspasas (IAPS) y, por tanto, facilita la actividad proteolítica de las caspasas efectoras (Chai, J. *et al.* 2000).

Papel de la familia Bcl-2 en la regulación de la apoptosis a través de la vía mitocondrial

Esta familia debe su nombre al primer miembro que se descubrió: el proto-oncogén Bcl-2. Se observó que su expresión no promovía la proliferación celular como otros oncogenes, sino que bloqueaba la muerte celular ante múltiples estímulos fisiológicos y patológicos (McDonnell, K. M. 1989). En mamíferos, la familia Bcl-2 consta de 25 miembros y todos y cada uno de ellos conservan al menos uno de los cuatro dominios homólogos de Bcl-2 denominados dominios BH (*Bcl-2 homology*). A través de estos dominios BH los diferentes miembros de la familia Bcl-2 pueden interactuar entre sí formando homodímeros (Bax/Bax, Bcl-2/Bcl-2) o heterodímeros

(Bcl-2/Bax), siendo estas interacciones determinantes para la supervivencia o muerte celular (Oltvai, Z. N. *et al.* 1993).

La familia Bcl-2 se compone de tres subfamilias (Fig. 4):

- 1) La subfamilia de **proteínas antiapoptóticas**, que incluye Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1, A-1 y Bcl-w. Todo este grupo de proteínas conserva los cuatro dominios homólogos de Bcl-2 (BH1-BH4) y poseen una cola hidrofóbica en el extremo C-terminal que es responsable de su localización en la membrana externa de la mitocondria. Son proteínas antiapoptóticas, es decir, previenen los procesos de muerte celular apoptótica.
- 2) La subfamilia de **proteínas proapoptóticas multidominio**, Bax, Bak y Bok, no presentan el dominio BH4. Estas proteínas se localizan en el citosol y frente al estímulo apoptótico migran a la membrana mitocondrial externa promoviendo la liberación de citocromo c de la mitocondria.
- 3) La subfamilia de **proteínas proapoptóticas “sólo BH3”**, que sólo presentan el dominio BH3. Esta subfamilia incluye a las proteínas Bid, Bim, Bad, Bik, Bmf, Hrk/DP5, Noxa y Puma (Wang, K. *et al.* 1996). Son las encargadas de desencadenar la apoptosis durante el desarrollo embrionario o frente a daños intracelulares (Huang, D. C. y Strasser, A. 2000). Sin embargo, aunque la activación de estas proteínas predispone a la célula a padecer apoptosis no pueden ejecutarla en ausencia de los efectores Bax y Bak (Zong, W. X. *et al.* 2001).

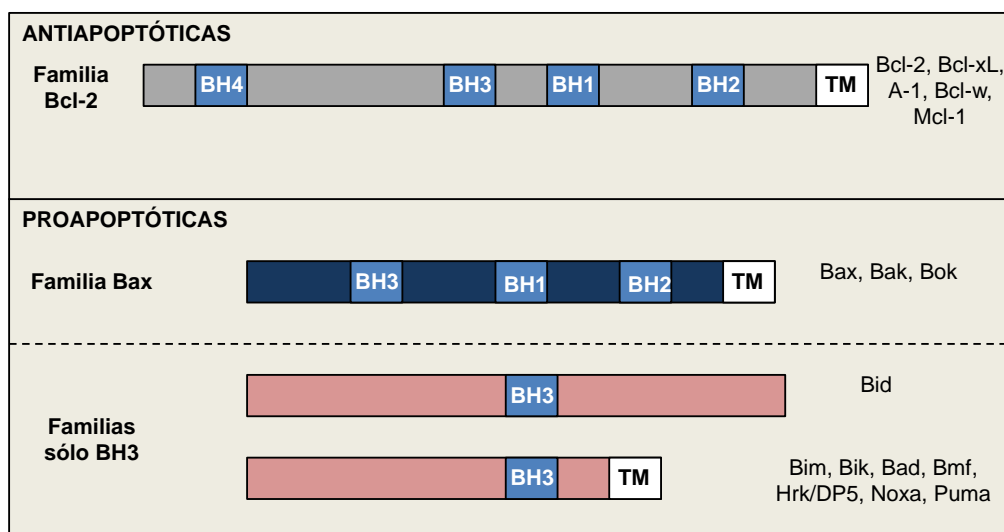


Figura 4. Clasificación de las proteínas de la familia Bcl-2 en base a la presencia de dominios BH: subfamilia Bcl-2 (antiapoptótica), subfamilia Bax (proapoptótica) y subfamilia sólo-BH3 (proapoptótica).

-Vía extrínseca:

También conocida como **vía de los receptores de muerte**, establece conexiones con el espacio extracelular, recibiendo señales proapoptóticas desde el exterior a través de los receptores de muerte. Se han descrito dos familias de receptores de muerte: la proteína Fas (CD95) y el factor de necrosis tumoral (TNF) (Medema, J. P. *et al.* 1997).

La transducción de la señal apoptótica en la vía extrínseca depende de la oligomerización (trimerización) y activación del receptor CD95 tras la unión con su ligando FasL que es homotrimérico (Scaffidi, C. *et al.* 1998). Posteriormente, un complejo de proteínas llamado complejo de señalización inductor de muerte (DISC) se asocia al CD95 activo. El complejo DISC está formado por la proteína adaptadora FADD que se une a cada monómero de CD95 a través de un dominio de muerte DD (*Death Domain*) y a las procaspasas iniciadoras (procaspasa-8 o -10) a través de los dominios efectores de muerte DED (*Death Effector Domain*) formando un complejo tripartito (Bao, Q. y Shi, Y. 2007). Las procaspasas-8 o -10 que se encuentran reclutadas en el complejo DISC se autoactivan proteolíticamente, promoviéndose su liberación al citosol formando un heterotetrámero catalíticamente activo constituido por dos subunidades grandes y dos pequeñas (Medema, J. P. *et al.* 1997; Martin, D. A. *et al.* 1998; Peter, M. E. y Krammer, P. H. 2003). La caspasa-8 (también conocida como FLICE) y la caspasa-10, una vez activas, son capaces de proteolizar y activar la procaspasa-3 (caspasa efectora) iniciándose la transducción de la señal apoptótica (Medema, J. P. *et al.* 1997).

La inhibición de esta ruta puede producirse a través de proteínas FLIP (FLICE-inhibitory proteins). Dentro de este grupo de proteínas existen dos variantes transcripcionales, una “corta” conocida como c-FLIP_S (*short*) que consta de dos repeticiones en tandem de dominios DED y cuyo papel es inhibir la activación de las procaspasas-8 y -10 en el complejo DISC (Krueger, A. *et al.* 2001) y otra variante “larga” llamada c-FLIP_L (*long*) que muestra una región de alta homología con las procaspasas-8 y -10 en el extremo C-terminal (Scaffidi, C. *et al.* 1999). La función de esta variante transcripcional larga (c-FLIP_L) no está del todo clara y se le atribuye un doble papel antiapoptótico y proapoptótico (Goltsev, Y. V. *et al.* 1997).

Las vías intrínseca y extrínseca convergen a nivel de la activación de la procaspasa-3. El solapamiento e integración de ambas vías se debe a Bid, una proteína proapoptótica de la familia Bcl-2 (Wang, K. *et al.* 1996). La caspasa-8 media la proteólisis de Bid incrementando

enormemente su actividad proapoptótica lo que conlleva su translocación a la mitocondria, donde promueve la liberación de citocromo c (Gross, A. *et al.* 1999) (Figura 5).

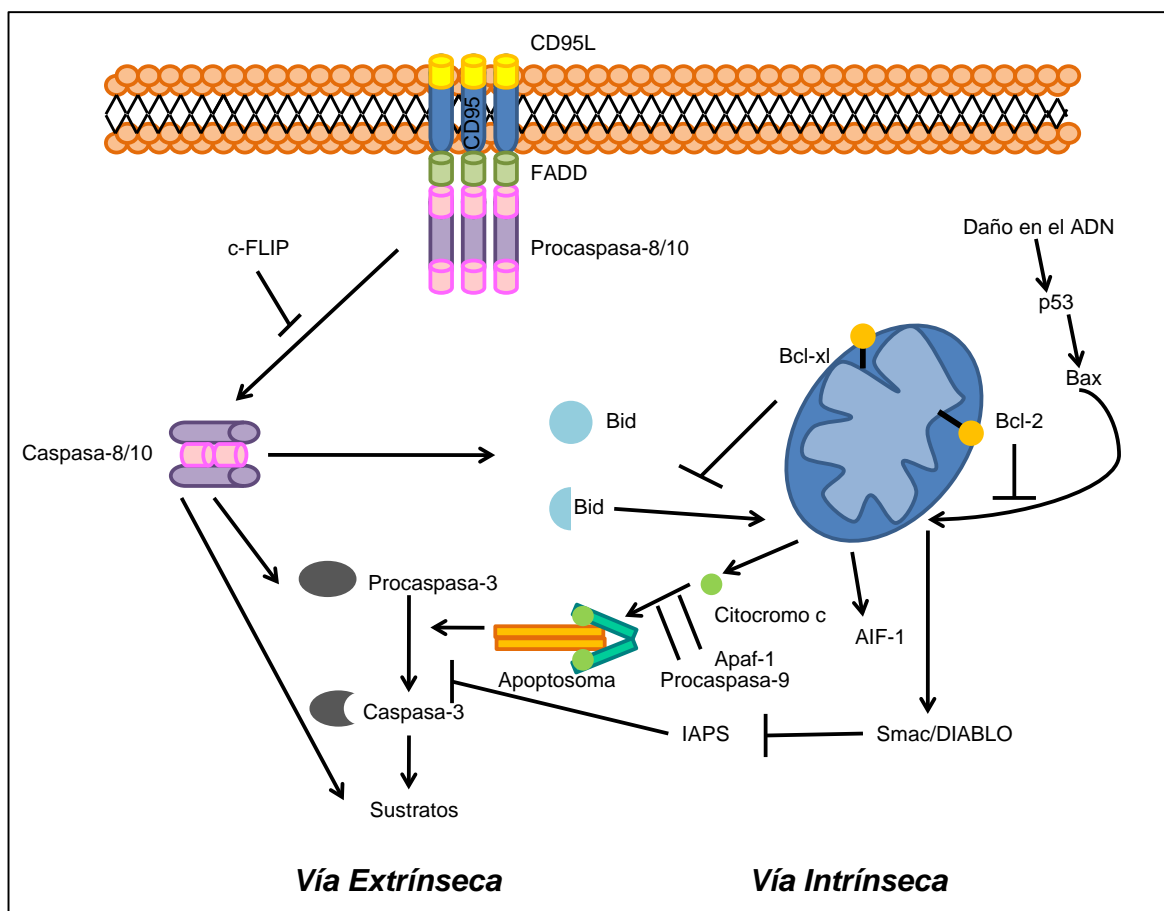


Figura 5. Esquema de las vías de apoptosis en mamíferos. La **vía extrínseca** se activa a través de los receptores de muerte de la membrana plasmática. En la **vía intrínseca** el estímulo apoptótico procede del interior celular y la mitocondria ocupa un papel central en su activación.

I.2.1.1. Apoptosis en levaduras

La existencia de muerte celular apoptótica no se reduce únicamente a organismos pluricelulares puesto que se trata de un proceso fisiológico conservado que se encuentra también presente en algunos organismos unicelulares (Madeo, F. *et al.* 1997; Buttner, S. *et al.* 2008). La apoptosis en levaduras ha sido considerada como un mecanismo de adaptación frente a las condiciones ambientales adversas (Skulachev, V. P. 2002) y fue descrita por primera vez en un mutante *cdc48* (Madeo, F. *et al.* 1997). Los fenotipos observados en la cepa *cdc48* eran características propias de la apoptosis en mamíferos como la fragmentación del ADN, la externalización de la fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana plasmática y la liberación de citocromo c por parte de la mitocondria. La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como papel central en el proceso de apoptosis en levaduras confirmó que la

similitud de este proceso con la apoptosis en mamíferos no se reducía únicamente a características morfológicas (Madeo, F. *et al.* 1999).

Los elevados niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) se producen en respuesta a diferentes tipos de estímulos externos perjudiciales para la célula como elevadas dosis de peróxido de hidrógeno, ácido acético, cloruro sódico u otros tipos de estrés como el envejecimiento cronológico y replicativo que desencadenan la migración de la metacaspasa (Mca1) desde el citosol hasta el núcleo donde interviene en la fragmentación del ADN (Madeo, F. *et al.* 2002). Además, el estrés térmico también promueve la translocación de la metacaspasa al núcleo a través de la proteína Nma111 (Fahrenkrog, B. *et al.* 2004) (Figura 6).

En la última década, se han identificado en *S. cerevisiae* varios genes ortólogos de mamíferos implicados en apoptosis como la metacaspasa (*MCA1*), el factor inductor de apoptosis (*AIF1*), Omi (*NMA111*) y EndoG (*NUC1*) (Fahrenkrog, B. *et al.* 2004; Wissing, S. *et al.* 2004; Guscetti, F. *et al.* 2005; Buttner, S. *et al.* 2007).

La mitocondria es también el orgánulo principal en el proceso de apoptosis de levaduras. Tras recibir el estímulo apoptótico se produce la liberación de citocromo c desde la mitocondria y se promueve la migración del factor inductor de apoptosis (Aif1) desde la mitocondria al núcleo donde participa en la degradación del ADN (Wissing, S. *et al.* 2004). El gen *NUC1*, ortólogo de la endonucleasa G de mamíferos, participa en el proceso de muerte celular mediante su migración al núcleo tras la permeabilización de la membrana mitocondrial externa contribuyendo a la degradación del ADN en células apoptóticas (Buttner, Eisenberg *et al.* 2007).

S. cerevisiae es probablemente el organismo eucariótico mejor conocido y, por lo tanto, un modelo experimental muy valioso para el estudio de procesos y rutas de señalización que están conservados en eucariotas superiores (Braun, R. J. *et al.* ; Lum, J. J. *et al.* 2004; Stephan, C. *et al.* 2006). Mediante la expresión heteróloga de proteínas antiapoptóticas humanas como Bcl-2 o Bcl-x_L en la levadura se ha comprobado que estas proteínas también ejercen un efecto antiapoptótico en este organismo unicelular. Por el contrario la expresión de la proteína proapoptótica Bax en *S. cerevisiae* causa un fenotipo citotóxico similar al que tiene lugar en células humanas (Tao, X. J. *et al.* 1997). El empleo de este organismo unicelular como modelo de estudio ha permitido identificar un inhibidor de la apoptosis en células de mamífero conocido como *Bax Inhibitor-1*

(BI-1) (Chae, H. J. *et al.* 2003). Por tanto, este trabajo respalda la validez y la utilidad del uso de la levadura como organismo modelo en el estudio de los procesos de muerte celular.

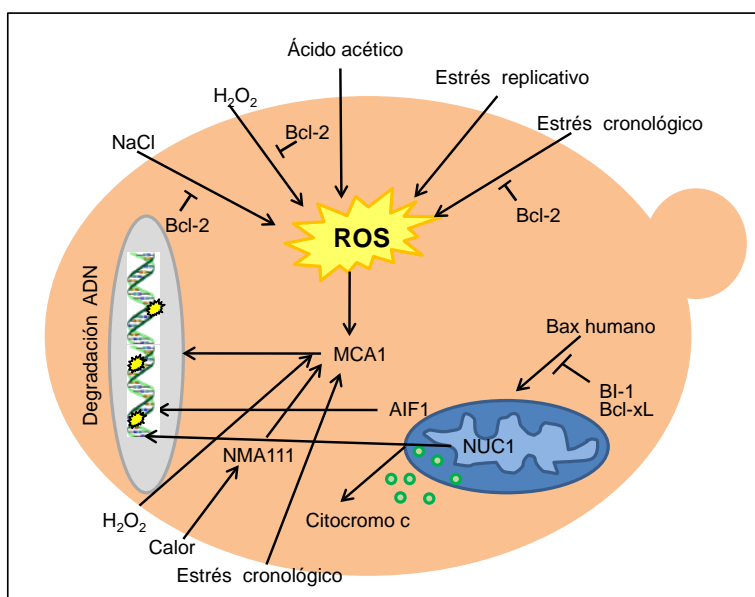


Figura 6. Representación esquemática de la apoptosis en *S. cerevisiae*. Adaptado de (Madeo, F. *et al.* 2002). La célula responde a los diferentes tipos de estrés (estrés replicativo, cronológico etc.) y estímulos tóxicos (ácido acético, NaCl, H₂O₂, calor) mediante una producción masiva de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos elevados niveles de estrés oxidativo promueven la activación de la metacaspasa (Mca1) y del factor inductor de la apoptosis (Aif-1) que participan en la degradación de ADN.

I.2.2. Las caspasas como principales reguladores del proceso de apoptosis

Las caspasas son un grupo de cisteínil-aspartato proteasas caracterizadas por poseer un residuo de cisteína reponsable de la proteólisis de otras proteínas en residuos de aspartato. Las caspasas son reguladores esenciales en los procesos de apoptosis y tienen especial relevancia en los procesos morfogénéticos durante el desarrollo embrionario. Algunas caspasas también están implicadas en procesos de maduración proteica como en el caso de mediadores del sistema inmune del tipo de la interleuquinas (Cerretti, D. P. *et al.* 1992). Por estos motivos, fallos en los procesos controlados por caspasas son responsables del desarrollo de algunos tumores y enfermedades autoinmunes (Kremer, Rust *et al.* 2009). Asimismo, una excesiva activación de las caspasas se ha relacionado con ciertas enfermedades como el Alzheimer o corea de Huntington (Pattison, L. R. *et al.* 2006; Kremer, A. E. *et al.* 2009; Rohn, T. T. *et al.* 2009).

I.2.2.1. Clasificación y estructura de las caspasas

Las caspasas pueden agruparse en varias categorías atendiendo a diferentes criterios como su *estructura* y su *función*. Estas proteasas que son esenciales en la apoptosis también participan en procesos inflamatorios relacionados con la maduración de las citoquinas (Ho, P. K. y Hawkins, C. J. 2005). Por lo tanto, en base a la función que realizan en las células se puede distinguir el **grupo**

inflamatorio que está formado por las caspasas-1, 4, 5 y 11 y el **grupo apoptótico** que incluye las caspasas-2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 12 y 14.

Como se ha mencionado anteriormente, las caspasas que actúan en los procesos de apoptosis pueden ser **caspasas iniciadoras** (caspasa-2, 8, 9, 10 y 12) o **caspasas efectoras** (caspasa-3, 6, 7 y 14) (Figura 7A). Las caspasas iniciadoras son aquellas que se activan inicialmente en respuesta al estímulo apoptótico procesando las formas inactivas de las caspasas efectoras; las caspasas efectoras, una vez activadas, se encargan de proteolizar los sustratos específicos en las distintas vías de apoptosis (Ho, P. K. y Hawkins, C. J. 2005; Festjens, N. *et al.* 2006). Las caspasas constan de tres dominios: un **prodominio** de longitud variable situado en el extremo N-terminal, un **dominio grande (p20)** que contiene el centro activo con la cisteína catalítica dentro de un motivo conservado Q-A-C-Q-G, y un **dominio pequeño (p10)** en el extremo C-terminal. Los tres dominios están separados por sitios de corte de ácido aspártico que permiten su procesamiento proteolítico (Riedl, S. J. y Shi, Y. 2004). Las caspasas iniciadoras poseen un prodominio más largo que el de las caspasas efectoras. De hecho la longitud del prodominio N-terminal constituye otro criterio de clasificación de las caspasas. Además, entre las caspasas iniciadoras encontramos aquellas que contienen prodominios CARD (“*Caspase Activation and Recruitment Domain*”) y aquellas que poseen prodominios DED (“*Death Effector Domain*”) que son esenciales para la interacción con las proteínas adaptadoras asociadas a los receptores de muerte (Figura 7B).

Las caspasas son inicialmente sintetizadas como zimógenos inactivos (procaspasas) que deben activarse mediante proteólisis. La activación de las caspasas elimina el prodominio N-terminal y los dominios grande (p20) y pequeño (p10) pueden interaccionar entre sí formando una **caspasa madura y activa** (Stennicke, H. R. y Salvesen, G. S. 1998). La presencia de ácido aspártico en los motivos de corte es consistente con la habilidad de las caspasas de autoactivarse, como es el caso de las caspasas iniciadoras, o de ser activadas por otras caspasas como parte de una cascada de amplificación de la señal de muerte (Cohen, G. M. 1997).

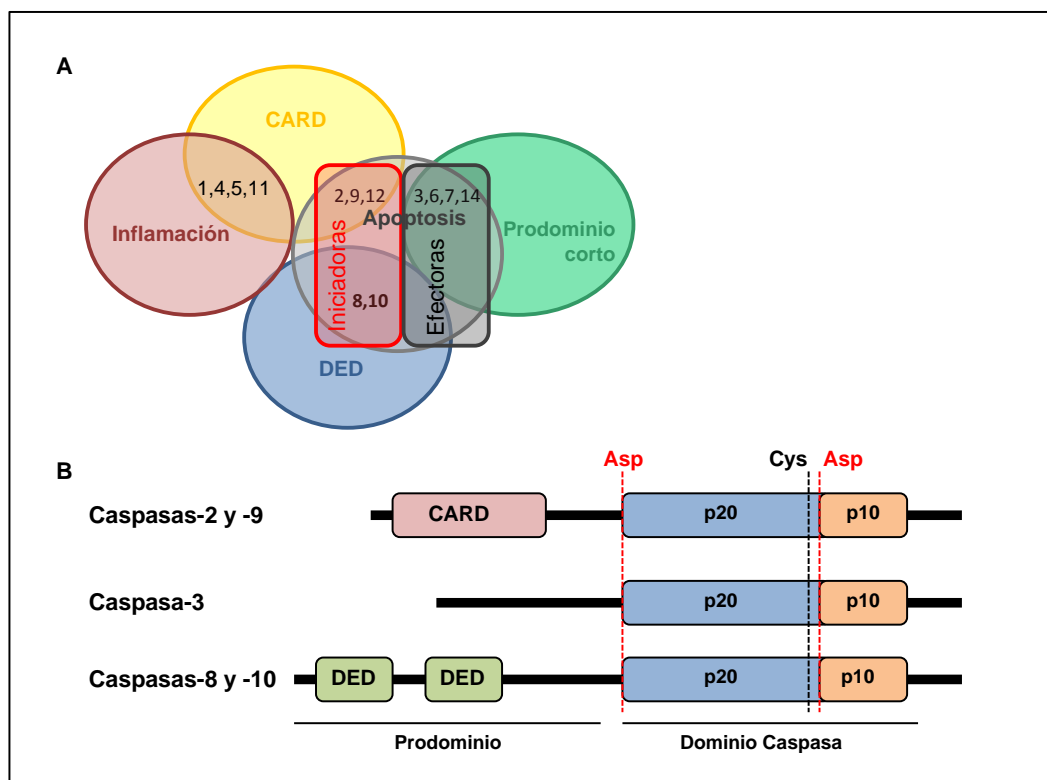


Figura 7. Clasificación y estructura de las caspasas. A) Clasificación de las caspasas atendiendo a su *función* (inflamación y apoptosis; iniciadoras y efectoras) y a la *estructura* del prodominio N-terminal (dominio DED, CARD o prodominio corto). B) Representación de los dominios estructurales de las caspasas iniciadoras con dominios DED (caspasas-8 y -10), con dominios CARD (caspasas-2 y -9) y con prodominio corto (caspasa-3). Las caspasas presentan dos motivos de corte de ácido aspártico (Asp) y un dominio catalítico de cisteína (Cys).

Las caspasas maduras son un heterotetrámero constituido por dos dominios grandes y otras dos dominios pequeños ($p20_2$ y $p10_2$) (heterodímeros de homodímeros). Las caspasas iniciadoras, una vez procesadas en sus formas maduras, activarán a las caspasas efectoras mediante proteólisis promoviendo, de este modo, la señal apoptótica (Donepudi, M. y Grutter, M. G. 2002).

I.2.2.2. Metacaspasas y paracaspasas

La identificación de las caspasas como reguladores de procesos de muerte celular en metazoos ha promovido el interés por la búsqueda de homólogos de estas proteasas en otros reinos. De este modo, se han identificado dos familias de proteínas similares a las caspasas desde el punto de vista estructural: las *metacaspasas* (presentes en plantas, hongos y protozoos) y las *paracaspasas* (que se encuentran en metazoos y algunos hongos como *Dictyostelium discoideum*).

Las metacaspasas son similares a las caspasas en la presencia del dominio p20 y del centro catalítico de cisteína (Uren, A. G. *et al.* 2000). La secuencia de aminoácidos de las metacaspasas ha permitido clasificarlas en dos grupos principales: las *metacaspasas tipo I*, que tienen prodominios con repeticiones de prolina y dedos de zinc y las *metacaspasas tipo II*, que carecen de prodominios y presentan una inserción de 200 aminoácidos en el extremo C-terminal de la subunidad p20 (Vercammen, D. *et al.* 2007). De forma similar a las caspasas, algunas metacaspasas de plantas, levaduras y parásitos del género *Leishmania*, requieren de su autoprosesamiento para ser activas enzimáticamente (Madeo, F. *et al.* 2002; Gonzalez, I. J. *et al.* 2007). Sin embargo, a diferencia de las caspasas, las metacaspasas presentan en los sitios de corte residuos de arginina o lisina (Lee, N. *et al.* 2007) (Figura 8).

Las paracaspasas contienen un prodominio formado por un dominio de muerte DD y uno o dos dominios de inmunoglobulinas (Ig), además de presentar un centro catalítico conservado en un residuo de cisteína al igual que en el caso de las caspasas y metacaspasas (Aravind, L. y Koonin, E. V. 2002).

El descubrimiento de metacaspasas y paracaspasas en organismos en los cuales no hay genes que codifiquen caspasas ha motivado su estudio con el fin de dilucidar su posible vinculación con procesos apoptóticos en organismos menos evolucionados. En el caso de *S. cerevisiae*, la proteína codificada por el único gen de metacaspasa presente en su genoma, *YCA1* o *MCA1*, ha sido implicada en la muerte programada de células envejecidas (Herker, E. *et al.* 2004) y de células defectuosas en algunas funciones biológicas como la deubiquitinación (Bettiga, M. *et al.* 2004), el recambio de ARN_m (Mazzoni, C. *et al.* 2005), la replicación de ADN (Weinberger, M. *et al.* 2005) y la regulación de la expresión génica (Mitsui, K. *et al.* 2005). La metacaspasa de *S. cerevisiae* también se ha asociado con la muerte celular programada de células expuestas a diferentes tipos de estrés ambiental como elevadas concentraciones de H₂O₂, ácido acético y cloruro sódico (Wadskog, I. *et al.* 2004; Khan, M. A. *et al.* 2005), choque térmico (Flower, T. R. *et al.* 2005), estrés osmótico (Silva, R. D. *et al.* 2005) y toxinas virales (Ivanovska, I. y Hardwick, J. M. 2005).

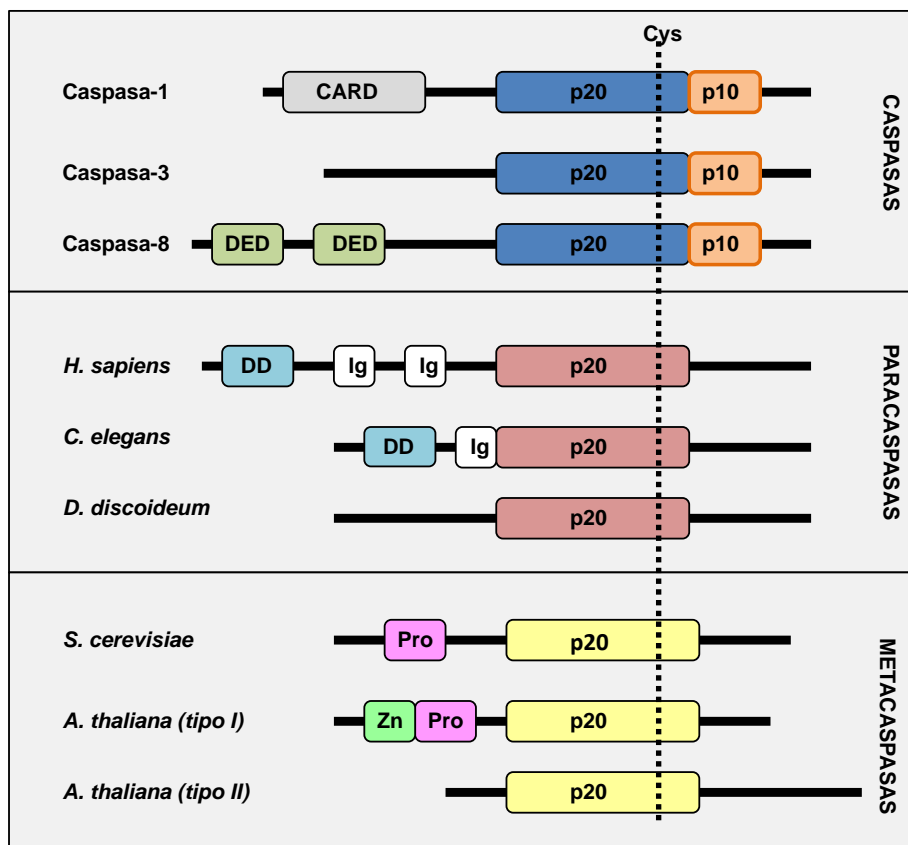


Figura 8. Esquema de la organización estructural de las caspasas, paracaspasas y metacaspasas. Todas ellas presentan un residuo de cisteína (Cys) en el centro catalítico.

I.2.3. Necrosis

La necrosis es un tipo de muerte celular caracterizado morfológicamente por la vacuolización del citoplasma, la ruptura de la membrana plasmática y la inducción de una respuesta inflamatoria alrededor de la célula que está muriendo (Proskuryakov, S. Y. *et al.* 2002). Se han identificado células necróticas en un amplio rango de estados patológicos tales como la isquemia o la hipoxia (Cuenca-Lopez, M. D. *et al.* 2010), durante el desarrollo de algunas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson, la corea de Huntington o la esclerosis lateral amiotrófica (Martin, E. R. *et al.* 2001).

Tradicionalmente se ha considerado la necrosis como un proceso pasivo e independiente del consumo de energía. Sin embargo, en la última década se han realizado estudios que demuestran que la muerte necrótica también está regulada (Leist, M. y Jaattela, M. 2001). La señal intracelular desencadenada por la unión de la proteína adaptadora FADD al receptor de muerte Fas es capaz de inducir el proceso necrótico (Okada, Y. *et al.* 2004). El receptor de muerte Fas presenta en su extremo C-terminal un dominio DD (“Death Domain”) que le permite unirse a la

proteína adaptadora FADD facilitando el reclutamiento de la proteína RIP (“*Receptor-Interacting Protein*”), específica de la vía de señalización de necrosis (Holler, N. *et al.* 2000). Este complejo de señalización de muerte se asemeja al complejo DISC formado durante el proceso apoptótico pero a diferencia de éste, no participan las caspasas (Leist, M. y Jaattela, M. 2001).

Además, el calcio y la ceramida, así como la activación de diferentes rutas de estrés como la de JNK o p38 también juegan un papel importante como mediadores de la respuesta necrótica (Proskuryakov, S. Y. *et al.* 2002).

En las últimas fases del proceso necrótico tiene lugar una activación de diferentes tipos de proteasas. En algunos modelos, esta fase es ejecutada por caspasas, mientras que en otros la inhibición de caspasas no sólo no detiene la necrosis sino que favorece su ejecución (Hirsch, T. *et al.* 1997). Otras proteasas también implicadas en este proceso son las calpainas (Lankiewicz, S. *et al.* 2000) y las catepsinas (Foghsgaard, L. *et al.* 2001).

Existen varias diferencias significativas entre los procesos de apoptosis y necrosis si se consideran diversos rasgos fisiológicos y morfológicos (Tabla 1).

Tabla 1. Principales diferencias existentes entre los procesos de muerte celular por apoptosis y necrosis.

APOPTOSIS	NECROSIS
<ul style="list-style-type: none">• Deformación de la membrana plasmática• Condensación de la cromatina• Formación de vesículas limitadas por membrana• Orgánulos permanecen intactos• Proceso activo dependiente de energía (ATP)	<ul style="list-style-type: none">• Pérdida de la integridad de la membrana plasmática• NO condensación de la cromatina• NO formación de vesículas• Desintegración de orgánulos• Proceso pasivo y/o activo dependiente de energía (ATP)

I.2.4. Autofagia

La autofagia es un proceso catabólico en el cual porciones del citoplasma u orgánulos deteriorados son secuestrados en vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas (macroautofagia) o directamente invaginados por la membrana de la vacuola (microautofagia) para su degradación y eventual reciclado de las macromoléculas resultantes.

La autofagia es un proceso muy conservado evolutivamente que ocurre en todas las células eucariotas (Levine, B. y Klionsky, D. J. 2004). Las características morfológicas vinculadas a este proceso fueron identificadas por primera vez en células de mamíferos gracias a un extensivo

estudio tanto morfológico como farmacológico (Marzella, L. *et al.* 1982). La autofagia en levaduras se describió por primera vez en 1992 (Takeshige, K. *et al.* 1992) y desde entonces se han identificado 34 componentes moleculares que participan en este proceso: los llamados genes *ATG* (“**AuT**o**p**h**aG**y-related genes”) (Klionsky, D. J. *et al.* 2003; Huang, J. y Klionsky, D. J. 2007; Yuga, M. *et al.* 2011). Las proteínas Atg pueden clasificarse en función del proceso de autofagia en el que participan (Tabla 2). Muchos ortólogos de los genes *ATG* de *S. cerevisiae* han sido identificados y estudiados en algunos eucariotas superiores como en nematodos, insectos, plantas y mamíferos, y parecen tener funciones similares a las que desempeñan en la levadura (Xie, Z. y Klionsky, D. J. 2007).

Los estudios en levaduras reflejan la importancia del proceso de autofagia como un mecanismo empleado por la célula para sobrevivir frente a condiciones de baja disponibilidad de nutrientes en el medio (Levine, B. y Klionsky, D. J. 2004). En mamíferos la autofagia también parece funcionar como un mecanismo protector y cobra un papel especialmente importante en el sistema nervioso adulto, protegiendo a las neuronas del daño oxidativo, de la síntesis de proteínas defectuosas y de otros estímulos tóxicos (Brunk, U. T. y Terman, A. 2002).

El concepto de autofagia como mecanismo de defensa contrasta con las evidencias de que la autofagia puede actuar como un mecanismo de muerte en determinadas circunstancias. En este sentido, diferentes estudios morfológicos han descrito un tipo de muerte programada de neuronas durante el desarrollo que cursa con una gran proliferación de vacuolas autofágicas y la progresiva desaparición de orgánulos (Schweichel, J. U. y Merker, H. J. 1973). El proceso de autofagia consistente en la eliminación de proteínas dañadas es especialmente importante en las células nerviosas, que son capaces de generar moléculas dañadas mucho más rápidamente que la mayor parte de otros tipos celulares. Actualmente la muerte celular producida por una actividad autofágica ineficiente está tomando relevancia en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Nixon, R. A. *et al.* 2005), el Parkinson (Anglade, P. *et al.* 1997) o la corea de Huntington (Ravikumar, B. *et al.* 2005).

1.2.4.1. Concepto de macroautofagia y fases en las que se divide el proceso

El término macroautofagia hace referencia a un proceso de autofagia de tipo no selectivo en el que los componentes citoplásmicos son englobados en unas **vesículas de doble membrana** llamadas **autofagosomas** que se fusionan con la membrana de la vacuola para su posterior degradación y reciclaje de las macromoléculas resultantes de este proceso. La activación de la

maquinaria molecular asociada a la macroautofagia (en adelante autofagia) se produce en situaciones de estrés nutricional y puede desencadenar un proceso de muerte celular si la situación de estrés persiste (Inoue, Y. y Klionsky, D. J. 2010). La autofagia es un proceso secuencial que se desarrolla a través de una serie de fases: inducción, reconocimiento y selección de sustratos, formación del autofagosoma y liberación del autofagosoma en la vacuola/lisosoma (Figura 9). A continuación se describen las fases de la autofagia en *S. cerevisiae*, así como los mecanismos de regulación que gobiernan su desarrollo, haciendo también referencia a algunos efectores homólogos de mamíferos.

1.- Inducción:

La inducción del proceso de autofagia depende del estado de fosforilación de las proteínas Atg1 y Atg13 que determina la formación del complejo Atg1-Atg13-Atg17 y, posteriormente, el reclutamiento de otras proteínas Atg al sitio de ensamblaje del fagóforo o estructura preautofagosomal (PAS) para iniciar la expansión del autofagosoma. En la levadura, Tor inhibe la formación de este complejo mediante la fosforilación directa de Atg13. Cuando la disponibilidad de nutrientes en el medio es alta, Atg13 es hiperfosforilada por Tor, lo que disminuye significativamente su afinidad por Atg1 y Atg17 (Kamada, Y. *et al.* 2010). Por el contrario, cuando la actividad de Tor se inhibe con rapamicina o debido a la ausencia de nutrientes en el medio, Atg13 no se hiperfosforila y, por tanto, aumenta su afinidad por Atg1 y Atg17. La interacción de Atg1 con Atg13 hipofosforilada y Atg17 permite la activación de la actividad quinasa de Atg1 (Kamada, Y. *et al.* 2000; Cheong, H. *et al.* 2008). La hipofosforilación de Atg13 puede ser debida a la ausencia de fosforilación o a la desfosforilación de esta proteína; es decir, causada por la inhibición de quinasas o por la activación de fosfatasas mediante mecanismos que podrían estar interregulados. No obstante, por el momento no se ha descrito ninguna proteína capaz de desfosforilar a Atg13.

En mamíferos la inducción de la autofagia se desarrolla de forma análoga a la levadura, mediante la activación de las proteínas Ulk1, mAtg13 y Fip200 que son ortólogos de Atg1, Atg13 y Atg17 respectivamente (Hara, T. y Mizushima, N. 2009).

En *S. cerevisiae* Tor1 también participa en la inducción de la autofagia a través de una cascada de señalización regulada por la proteína fosfatasa 2A (PP2A) y la fosfatasa Sit4 (De Virgilio *et al.*, 2006). En condiciones ricas en nutrientes, Tap42 (proteína asociada a la fosfatasa 2A) es fosforilada y se une a PP2A y Sit4. El tratamiento con rapamicina o la ausencia de

nutrientes causan la desfosforilación y disociación de Tap42, produciéndose la activación de Sit4. Tor1 podría directamente fosforilar Tap42 o indirectamente regular el estado de fosforilación de Tap42 vía Tap41. Ante la inactivación de Tor1, Tap42 es inhibido, lo cual podría indicar un papel de Tap42 como regulador negativo de este proceso (Yorimitsu, T. *et al.* 2009). La disociación del complejo Tap42-Sit4 provoca la activación de Sit4 que promueve la activación transcripcional de Gln3 (Beck, T. y Hall, M. N. 1999). Por otro lado, en respuesta a la baja disponibilidad de nutrientes en el medio o al tratamiento con rapamicina Tap42 se disocia de la proteína PP2A. Las subunidades catalíticas de la PP2A, Pph21 y Pph22, tras su liberación del complejo, se encargan de activar los factores de transcripción Msn2/4 (Vinod, P. K. *et al.* 2008).

Otro mecanismo de regulación de la inducción del proceso de autofagia tanto en levaduras como en mamíferos recae en la ruta de señalización Ras/PKA (Yorimitsu, T. *et al.* 2007). Cuando hay suficiente disponibilidad de nutrientes en el medio las proteínas GTPasas Ras1 y Ras2 se activan y estimulan la producción de AMPc. El AMPc se une a la subunidad reguladora de la PKA (Bcy1) permitiendo la disociación de las subunidades catalíticas de la PKA (Tpk1, 2 y 3) lo que conduce a la activación de la PKA (Thevelein, J. M. y de Winde, J. H. 1999). La activación de la ruta PKA mediante un alelo hiperactivo de *RAS2*, *RAS2^{G19V}*, o la delección de *BCY1* evita la inducción de la autofagia a pesar del tratamiento de las células con rapamicina mientras que la inactivación de la ruta PKA por un alelo dominante negativo de *RAS2*, *RAS2^{G22A}*, promueve la autofagia en condiciones de disponibilidad suficiente de nutrientes en el medio (Budovskaya, Y. V. *et al.* 2004). La PKA se encarga directamente de fosforilar la proteína Atg13 actuando, por tanto, como un regulador negativo de la autofagia (Stephan, J. S. *et al.* 2009).

Tor1 y PKA se encuentran interrelacionados a través de la proteína Sch9 (Yorimitsu, T. *et al.* 2007). Existen dos modelos de interrelación entre las rutas de Tor1 y PKA: en el primer modelo las proteínas Tor1, Sch9 y PKA actúan de forma paralela inhibiendo el proceso de autofagia (Zurita-Martinez, S. A. y Cardenas, M. E. 2005) y en el segundo modelo la PKA sería una posible diana de Tor1 y, por tanto, participarían en una misma ruta (Schmelzle, T. *et al.* 2004). Sin embargo, se desconoce todavía cuál de estas dos modelos es el auténtico mecanismo de conexión entre Tor1 y PKA en la inducción de la autofagia.

2. - Reconocimiento y selección de sustratos:

La selección de los sustratos que serán incluidos en el autofagosoma es un proceso muy importante que depende del reconocimiento y la interacción de los sustratos con proteínas

receptoras de la maquinaria autofágica. Una característica significativa de esta fase de la autofagia es la alta especificidad de receptores en función de la ruta de autofagia (Stromhaug, P. E. *et al.* 2004) (Ver punto 2.4.2). Por ejemplo, la proteína Atg32 es un receptor específico del proceso de mitofagia y por tanto, sólo reconoce y selecciona las mitocondrias como sustrato para ser degradado (Kanki, T. y Klionsky, D. J. 2009; Kanki, T. *et al.* 2009).

3.- Formación del autofagosoma:

Durante la formación del autofagosoma la mayoría de las proteínas Atg se localizan en la estructura preautofagosomal (PAS). Por lo tanto, se considera que el PAS puede actuar como un centro de nucleación de material membranoso para la formación y expansión del autofagosoma (Xie, Z. y Klionsky, D. J. 2007).

La formación y ensamblaje del PAS requiere de la participación de un complejo fosfatidilinositol 3-quinasa (PtdIns3K) formado por las proteínas Vps34 (PtdIns3K), la quinasa Vps15, Vps30/Atg6 y Atg14 (Kihara, A. *et al.* 2001). Este complejo es responsable de la formación en la membrana del PAS de fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) que es esencial para el reclutamiento de las demás proteínas Atg (Kawamata, T. *et al.* 2008).

Atg9 es una proteína integral de membrana que interviene durante el proceso de ensamblaje del material membranoso (He, C. *et al.* 2006). Esta proteína sufre un transporte cíclico entre la estructura preautofagosomal (PAS) y los sitios periféricos de donde proviene el material membranoso (principalmente del retículo endoplásmico, aparato de Golgi o mitocondria) (Reggiori, F. *et al.* 2005; Mari, M. y Reggiori, F. 2010; van der Vaart, A. y Reggiori, F. 2010). El movimiento anterógrado de Atg9 hacia el PAS requiere de la actuación de otras proteínas como Atg23 y Atg27 que forman parte de un complejo heterotrimérico junto con Atg9 (Legakis, J. E. *et al.* 2007). La recuperación de Atg9 desde el PAS hacia los sitios periféricos depende del complejo quinasa Atg1-Atg13, Atg2-Atg18, resultando la ausencia de alguna de estas proteínas en una acumulación de Atg9 en el PAS (Reggiori, F. *et al.* 2004).

La mayor parte de las proteínas identificadas en los procesos de autofagia participan en la formación de vesículas. En este grupo se encuentran dos proteínas de tipo Ubl ("*Ubiquitin-like protein*") que participan en reacciones de conjugación: Atg8 y Atg12 (Ohsumi, Y. 2001). Atg8 sufre un procesamiento proteolítico anterior a su conjugación con el lípido fosfatidiletanolamina y una vez unido a éste se ancla en la membrana del autofagosoma participando en la expansión del

fagóforo (Nakatogawa, H. *et al.* 2007). Atg8 es utilizada como marcador de autofagia mediante su unión a GFP, de tal forma que en los casos donde tenga lugar el proceso de autofagia la proteína verde fluorescente o GFP es proteolizada y liberada siendo la cantidad de GFP libre proporcional a los niveles celulares de autofagia. La otra proteína de tipo Ubl, Atg12, participa en diferentes reacciones de conjugación (Mizushima, N. *et al.* 1998) que conducen a la formación de la estructura multimérica Atg12-Atg5-Atg6-Atg16. Este complejo funcional es esencial para el proceso de autofagia y se ha sugerido que podría participar en la curvatura de la membrana del autofagosoma (Kuma, A. *et al.* 2002). No obstante, la función específica de estas reacciones de conjugación constituye otro de los puntos todavía desconocidos del proceso de autofagia.

4.- Fusión del autofagosoma con la vacuola:

Los componentes necesarios para la fusión del autofagosoma con la vacuola son comunes para todas las rutas de autofagia. Entre la maquinaria implicada en esta etapa se encuentran diferentes proteínas SNARE “*Soluble NSF Attachment protein REceptor*” como Vam3, Vam7, Vti1 y Ykt6; homólogos GDI “*Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor*” como Sec17, Sec18 y Sec19; la proteína Ypt7 y algunos miembros de la clase C de las proteínas Vps (“*Vacuolar protein sorting*”) (Wang, C. W. *et al.* 2003).

Para llevar a cabo con éxito el reciclaje de los componentes citoplásmicos es necesaria la ruptura de la membrana del cuerpo autofágico resultante de la fusión del autofagosoma con la vacuola. La lisis de la vesícula depende del pH ácido del lumen de la vacuola y de la proteinasa B, además de las hidrolasas vacuolares y de la lipasa Atg15 (Teter, S. A. *et al.* 2001). Las macromoléculas resultantes de este proceso han de ser liberadas al citosol para su reutilización. Atg22 es una proteína integral de la membrana vacuolar encargada de mediar el flujo de aminoácidos resultantes del proceso de degradación autofágica desde el interior vacuolar hacia el citosol (Yang, Z. *et al.* 2006).

En otros organismos como *D. discoideum* (Otto *et al.*, 2004), *Drosophila melanogaster* (Scott, R. C. *et al.* 2004), *Caenorhabditis elegans* (Melendez, A. *et al.* 2003), *Arabidopsis thaliana* (Hanaoka, H. *et al.* 2002) o mamíferos (Yan, W. *et al.* 1998) el mecanismo de activación y desarrollo del proceso de autofagia es análogo al que tiene lugar en *S. cerevisiae*.

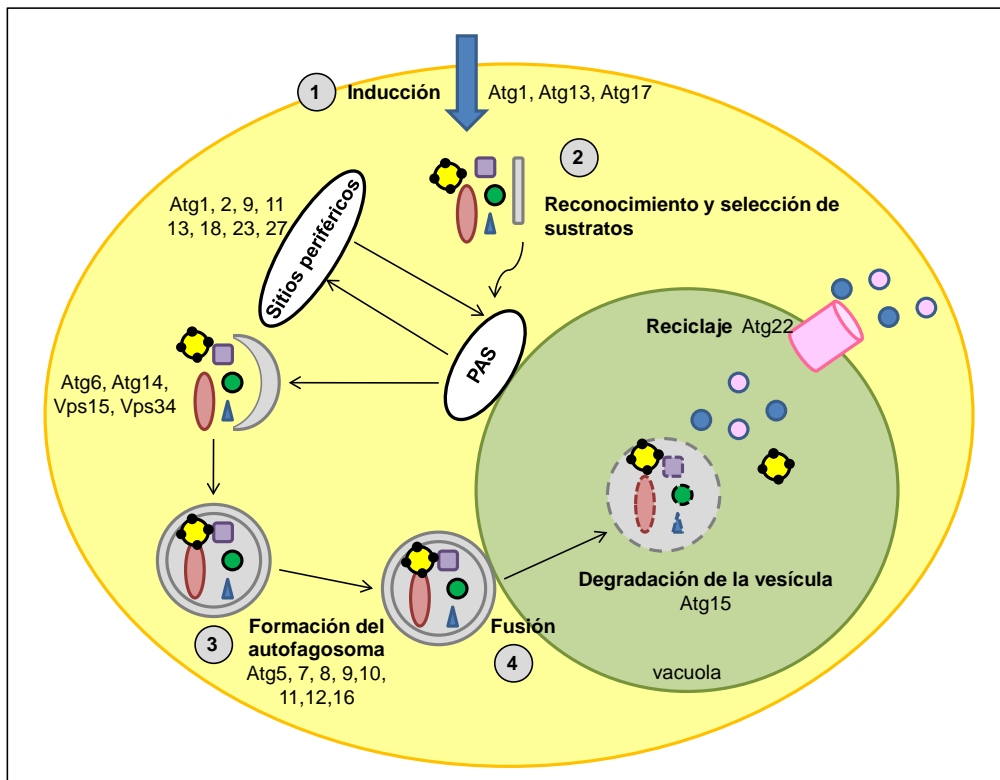


Figura 9. Representación esquemática de las diferentes etapas de los procesos de autofagia en la levadura: inducción del proceso autofágico, reconocimiento y selección del sustrato, formación del autofagosoma y fusión del autofagosoma con la vacuola. Figura adaptada de (Yang, Z. y Klionsky, D. J. 2009).

I.2.4.2. Procesos de autofagia de tipo selectivo

La autofagia consiste en la eliminación de los diferentes orgánulos celulares dañados mediante un proceso de muerte celular de tipo selectivo.

Los procesos de **autofagia de tipo selectivo** se pueden clasificar en función de los **componentes celulares** que van a ser degradados: ruta Cvt, mitofagia, pexofagia, reticulofagia y ribofagia (Figura 10). Todos estos procesos comparten unas proteínas (Atg) comunes y otras específicas encargadas del reconocimiento y selección del sustrato que va a ser degradado (Tabla 2).

Tabla 2. Cuadro resumen del proceso de autofagia en el que participan las 34 proteínas Atg identificadas. En el grupo de la izquierda (comunes) están representadas las proteínas Atg que intervienen en todos los procesos de autofagia, a continuación las específicas de macroautofagia, ruta Cvt, pexofagia, mitofagia, ribofagia y reticulofagia. Figura adaptada de (Inoue, Y. y Klionsky, D. J. 2010).

Comunes	Macroautofagia	Ruta Cvt	Pexofagia	Mitofagia	Ribofagia	Reticulofagia
Atg1,Atg2,Atg3	Atg17	Atg19	Atg25	Atg32	Atg11	Atg20
Atg4,Atg5,Atg6	Atg29	Atg21	Atg26	Atg33	Atg20	
Atg7,Atg8,Atg9	Atg21	Atg23	Atg28		Atg24	
Atg10, Atg12		Atg34				
Atg13, Atg14						
Atg15, Atg16						
Atg18, Atg22		Atg11, Atg20, Atg24				

- **Ruta Cvt** (Cytoplasm to Vacuole Targeting): se trata de un proceso biosintético, a diferencia de la macroautofagia que es un proceso degradativo. Comparte con el resto de procesos de autofagia parte de la maquinaria autofágica (genes Atg) además de presentar factores adicionales que son específicos del material celular que va a ser reclutado durante este proceso (Figura 10). La ruta Cvt es la responsable del transporte de las hidrolasas aminopeptidasa 1 (Ape1) y α - manosidasa 1 (Ams1) directamente desde el citoplasma a la vacuola donde son procesadas enzimáticamente convirtiéndose en las formas maduras (Hutchins, M. U. y Klionsky, D. J. 2001). La ruta Cvt está activa cuando hay suficiente disponibilidad de nutrientes en el medio, por tanto, las proteínas Atg1 y Atg13 se encuentran hiperfosforiladas y no se induce la macroautofagia (Yang, Z. y Klionsky, D. J. 2009). Durante este proceso las proteínas Atg11 y Atg19 participan en el reconocimiento específico de los precursores de las hidrolasas (PrApe1 o PrAms1) que son empaquetados en una **vesícula de doble membrana** denominada “**vesícula cvt**” (Lynch-Day, M. A. y Klionsky, D. J. 2010).

- **Mitofagia:** Es un tipo selectivo de autofagia en el que el orgánulo que se va a degradar es la mitocondria (Priault, M. *et al.* 2005). Se trata de un proceso catabólico que implica la formación de vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas. Las dos proteínas esenciales para el proceso de mitofagia son Atg32 y Atg33. En *S. cerevisiae* la mitofagia está asociada a procesos de muerte celular (Priault, M. *et al.* 2005).

- **Pexofagia:** es un proceso catabólico que implica la degradación de los peroxisomas. Se trata de un tipo selectivo de autofagia en el que el peroxisoma es englobado en un vesícula llamada **pexofagosoma** (autofagosoma específico de peroxisomas) antes de su fusión con la vacuola

donde rápidamente es degradado. Las proteínas específicas del reconocimiento de los peroxisomas son Atg25, Atg26, Atg28 y Atg 30 (Schell-Steven, A. *et al.* 2005).

- **Reticulofagia:** es el mecanismo de regulación por el cual fragmentos del retículo endoplásmico son englobados en autofagosomas para posteriormente ser degradados en la vacuola. La maquinaria autofágica necesaria para que se lleve a cabo este proceso son los genes *ATG8*, *ATG5*, *ATG1*, *ATG12* y *ATG20* (Bernales, S. *et al.* 2006).

- **Ribofagia:** consiste en la degradación de los ribosomas mediante la activación de la maquinaria autofágica. Comparte con el resto de procesos de autofagia algunas proteínas Atg (Tabla 2), además de presentar una proteína específica del reconocimiento de los ribosomas, Atg20 (Kucharczyk, R. *et al.* 2000).

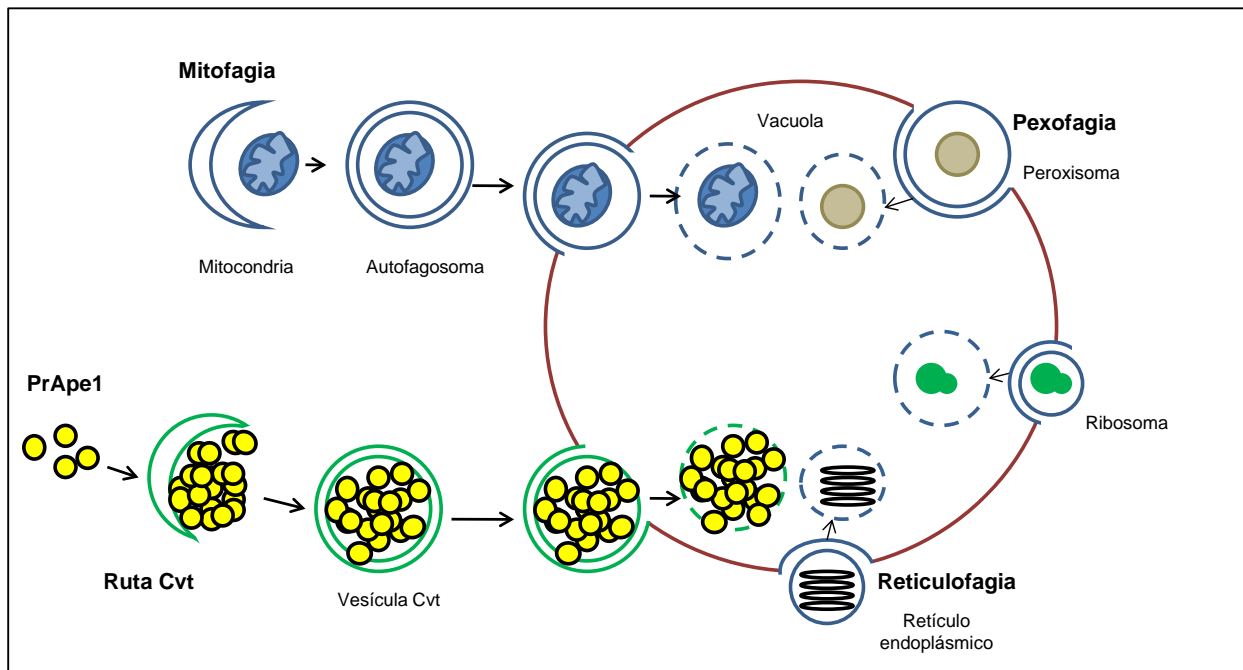


Figura 10. **Procesos de autofagia** de tipo selectivo en *S. cerevisiae*. La ruta biosintética Cvt empaqueta y transporta selectivamente el precursor de la hidrolasa Ape1 (prApe1). Las rutas catabólicas se encargan de la degradación de los diferentes orgánulos celulares: mitofagia (mitocondria), reticulofagia (retículo endoplásmico), ribofagia (ribosomas) y pexofagia (peroxisomas).

I.2.5. Relación entre apoptosis y autofagia

Los procesos de apoptosis y autofagia presentan diferentes mecanismos de interconexión que se describen a continuación:

- a) La autofagia puede actuar como mecanismo básico e indispensable para la ejecución de la apoptosis (Figura 11A). El proceso de autofagia puede ser considerado como un mecanismo citoprotector, con la finalidad de eliminar orgánulos dañados para asegurar la

supervivencia celular. Sin embargo, en determinadas ocasiones en las que se acumula gran cantidad de estrés oxidativo la maquinaria autofágica no es capaz de hacer frente al daño ocasionado y la célula acaba iniciando procesos de apoptosis (Saiki, S. *et al.* 2011).

- b) A diferencia del caso anterior, la autofagia también puede actuar como inhibidor de la apoptosis, eliminando los orgánulos dañados, como por ejemplo las mitocondrias, evitando así la emisión al citosol de factores apoptogénicos procedentes de este orgánulo. Esta vía supone, por tanto, un mecanismo de supervivencia celular (Bova, M. P. *et al.* 2005) (Figura 11B).
- c) La apoptosis y la autofagia constituyen mecanismos de muerte celular independientes y bien definidos en función de agente citotóxico y del tipo celular de que se trate. Por ejemplo, sobre distintas líneas celulares el mismo agente citotóxico puede inducir diferentes tipos de muerte, (Kanzawa, T. *et al.* 2005). También frente a un mismo tipo celular la respuesta varía en función del agente citotóxico empleado (Kanzawa, T. *et al.* 2004). En muchos casos, la inhibición de la muerte celular por autofagia induce apoptosis y la inhibición de la apoptosis induce muerte por autofagia (Figura 11C). Es decir, ambos procesos pueden actuar como mecanismos independientes, pero alternativos que intentan suplir las deficiencias en alguno de ellos. Por ejemplo, la inhibición de los genes proapoptóticos Bax y Bak o el uso de inhibidores de caspasas, desencadena un proceso de muerte celular autofágica dependientes de los genes *ATG7* y *BECLINA-1* en células de médula ósea (Lum, J. J. *et al.* 2005). Por el contrario, el uso de inhibidores de autofagia como la 3-metil adenina (3-MA, inhibidor de las PI3K) y bafilomicina (inhibidor de la H⁺-ATPasa vacuolar que inhibe la autofagia mediante la acidificación de vesículas autofágicas) induce apoptosis en células neuronales (Xue, L. *et al.* 2001). Además, determinadas señales proapoptóticas como la activación de TNF, TRAIL y FADD inducen autofagia (Jia, L. *et al.* 1997; Mills, K. R. *et al.* 2004; Pyo, J. O. *et al.* 2005).

La mitocondria genera señales proapoptóticas que intentan ser eliminadas por autofagia mediante la destrucción de las mitocondrias dañadas, por tanto la mitocondria podría representar un nexo de unión entre ambas vías. Además miembros de la familia Bcl-2 pueden regular la autofagia. Se ha propuesto que Bcl-2 actúa como inhibidor de la autofagia mediante su capacidad de interacción con la proteína Beclina-1 (Patingre, S. *et al.* 2005). Recientemente se ha identificado una proteína llamada Naf-1 que interacciona con Bcl-2 en el retículo endoplásmico inhibiendo el proceso de autofagia (Chang, N. C. *et*

al. 2010). La proteína de la familia Bcl-2, Bik, compete junto con Naf-1 por su unión con Bcl-2, y cuando se produce la interacción Bik-Bcl-2 se desencadena un proceso de muerte celular por apoptosis (Leber, B. y Andrews, D. W. 2010). Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual se favorece un tipo de interacción u otro todavía se desconoce. Otro nexo de unión entre las rutas de apoptosis y autofagia es la proteína Atg5 (Yousefi, S. *et al.* 2006). Atg5 interviene en la formación del autofagosoma durante el proceso de autofagia (Suzuki, K. y Ohsumi, Y. 2007). Además, cuando se desencadena el programa apoptótico en la célula Atg5 es proteolizada dando lugar a una forma truncada de esta proteína que es capaz de unirse a Bcl-2 o Bcl-xl promoviendo la liberación de citocromo c de la mitocondria (Yousefi, S. *et al.* 2006). Por tanto, en el proceso de interconexión entre ambas vías de muerte celular (apoptosis y autofagia) cobran especial importancia los miembros de la Familia Bcl-2 (Zhou, F. *et al.* 2011). Sin embargo, todavía existen muchas incógnitas sobre los nexos de unión entre ambos procesos de muerte celular, lo que abre un nuevo campo de investigación para descubrir los mecanismos moleculares responsables de la elección de un tipo de muerte celular u otro.

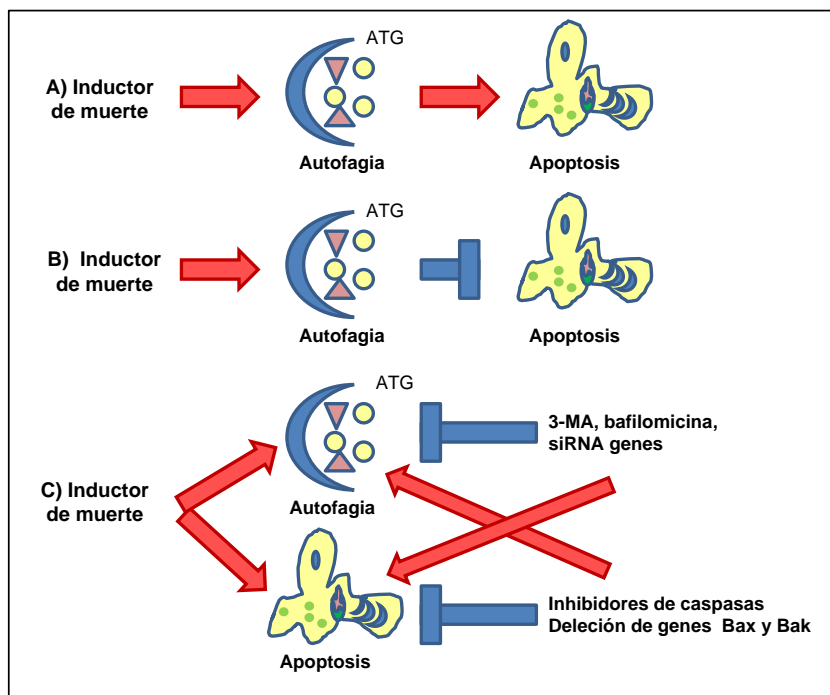


Figura 11. Esquema de la relación entre los procesos de muerte celular por apoptosis y autofagia. A) Proceso en el que la autofagia conduce a un mecanismo de muerte celular apoptótica. B) El proceso de autofagia actúa como mecanismo citoprotector bloqueando la apoptosis. C) Ambos procesos de muerte celular (autofagia y apoptosis) se encuentran interconectados.

I.3. CHECKPOINT DE FASE-S

Algunos procesos de muerte celular pueden desencadenarse como consecuencia de daños irreversibles en el ADN. Por consiguiente, los procesos de muerte y la activación de checkpoints que regulan la progresión del ciclo celular están relacionados y comparten puntos de interregulación (Burhans, W. C. *et al.* 2003; Weinberger, M. *et al.* 2005).

La correcta coordinación de todos los procesos celulares es necesaria para que tenga un lugar un progreso adecuado del ciclo celular. Ante determinados tipos de estrés, como el estrés genotóxico, la célula activa los checkpoints específicos de cada fase del ciclo celular y detiene la progresión del ciclo para poder reparar los daños ocasionados (Hartwell, L. H. y Weinert, T. A. 1989).

En respuesta a diferentes tipos de estrés fisiológico ocasionados durante la fase-S del ciclo celular como daño en el genoma mediante la alquilación del ADN por metil metanosulfonato (MMS), radiación ionizante o ultravioleta, la célula intenta reparar el daño mediante la activación del checkpoint de fase-S que induce la parada de la replicación del ADN y detiene el ciclo celular en la fase-S (Paulovitch *et al.*, 1997). El checkpoint de fase-S consiste en una cascada de transducción de señales donde las proteínas sensoras (Rad24, Ddc1, Mec3, Rad17, Mec1 y Ddc2) son capaces de detectar lesiones específicas en el ADN y transmitir esa señal hasta las proteínas efectoras (Rad53 y Chk1). Mec1, proteína perteneciente a la familia fosfatidilinositol-3 quinasa, es reclutada a los sitios de daño donde se une específicamente al ADN (Melo, J. A. *et al.* 2001). Mec1 junto con otra proteína quinasa denominada Tell1 se encargan de fosforilar Rad9 (Vialard, J. E. *et al.* 1998). Rad9 actúa como proteína adaptadora amplificando la señal de daño aunque también se cree que podría intervenir en el proceso como proteína sensora uniéndose directamente a los sitios de rotura de ADN (Naiki, T. *et al.* 2004). Rad9, una vez activada, es capaz de fosforilar a las proteínas efectoras Rad53 y Chk1 (Sweeney, F. D. *et al.* 2005). La fosforilación de Rad53 y Chk1 conduce a la parada del ciclo celular en fase S. En este momento se activan los procesos asociados a la activación del checkpoint como la regulación transcripcional de los genes encargados de reparar el daño del ADN, la activación transcripcional de ciclinas y la estabilización de las horquillas de replicación (Chen, Y. y Sanchez, Y. 2004). Cuando la señal de daño en el ADN es debida a un estrés replicativo la proteína adaptadora que participa en este proceso es Mrc1 (Alcasabas, A. A. *et al.* 2001). Mrc1 fosforila a Rad53 promoviendo la parada del ciclo celular en fase-S (Figura 12). La proteína Rad53 permanece desfosforilada cuando el checkpoint de fase-S no se activa y la desfosforilación de Rad53 depende de las proteínas

fosfatasas de tipo 2C Ptc2 y Ptc3 además de la proteína fosfatasa de tipo 2A Pph3 (O'Neill, B. M. *et al.* 2007; Travesa, A. *et al.* 2008).

El checkpoint de fase-S del ciclo celular está bastante conservado en organismos eucariotas superiores. Por lo tanto, las proteínas sensoras, adaptadoras y efectoras de *S. cerevisiae* presentan homólogos en mamíferos con funciones análogas (Bartek, J. y Lukas, J. 2001) (Figura 12). En el caso del ser humano, la existencia de algún fallo en la reparación del ADN o defectos en el mecanismo de regulación del ciclo celular puede ocasionar diferentes enfermedades como *Xeroderma pigmentosum* o *Ataxia telangiectasia* (Kerzendorfer, C. y O'Driscoll, M. 2009).

Cuando el daño en el ADN es irreparable, las células pueden iniciar procesos de senescencia o muerte por apoptosis (Branzei, D. y Foiani, M. 2008). Frente al daño extremo en el ADN se activa la ruta intrínseca de la apoptosis conduciendo a la liberación de citocromo c por parte de la mitocondria. El citocromo c liberado se une a la molécula adaptadora Apaf-1 dando lugar a la formación del apoptosoma (Wang, X. 2001). Este complejo promueve la activación de la Caspasa-9 desencadenando el programa apoptótico. La proteína supresora tumoral p53 tiene un papel importante en la regulación de la apoptosis en respuesta al daño en el ADN en células diferenciadas (Schuler, M. y Green, D. R. 2005). P53 regula directamente la liberación de citocromo c y la activación transcripcional de proteínas de la familia Bcl-2 como Bax, Puma y Noxa (Vaughn, A. E. y Deshmukh, M. 2007). P53 también puede participar en procesos de autofagia desarrollando una doble función: por una parte, como regulador negativo del proceso de autofagia, ya que en ausencia de estrés fisiológico los niveles basales de p53 inhiben la autofagia; y como regulador positivo de autofagia, ya que mediante el estrés genotóxico en la célula p53 promueve la inactivación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y la inhibición de TOR1 (Meijer, A. J. y Codogno, P. 2009).

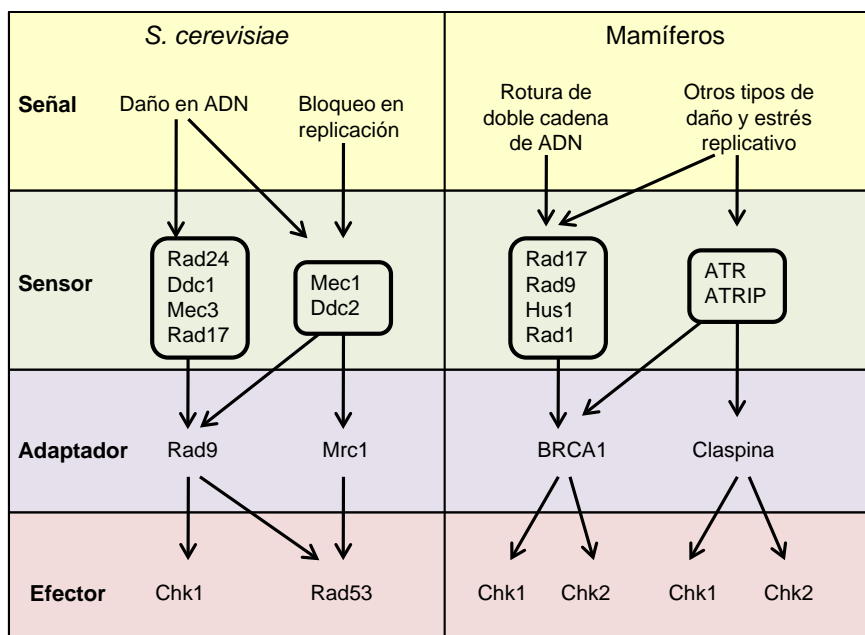


Figura 12. Esquema del checkpoint de fase-S en *S. cerevisiae* y en mamíferos. Existen cuatro componentes fundamentales en estas rutas: la señal del daño, las proteínas sensoras, adaptadoras y efectoras. Figura adaptada de (Melo, J. y Toczyski, D. 2002).

I.4. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN Y CASCADAS DE FOSFORILACIÓN

La transducción de señales es el mecanismo por el cual los estímulos intracelulares y los extracelulares que llegan a la membrana plasmática de la célula se convierten en respuestas celulares específicas que permiten la adaptación a cambios en el medio externo, así como el mantenimiento de la homeostasis. La supervivencia y la muerte celular están controladas por diversas rutas de señalización celular. La transducción de una señal desde la membrana plasmática y su propagación en el interior celular se realiza mediante la activación secuencial de distintas proteínas, entre las que se encuentran proteínas quinasas y fosfatasas, organizadas en lo que se conoce como “cascadas de señalización”. Estas cascadas pueden ser activadas por una gran variedad de estímulos entre los que se incluyen hormonas, factores de crecimiento, citoquinas y agentes citotóxicos (Zheng, W. H. y Quirion, R. 2006; Weber, A. *et al.* 2010; Deb, I. y Das, S. 2011).

La fosforilación reversible de las proteínas se produce en casi todos los aspectos de la vida celular y juega un papel importante en la regulación de muchos procesos como el metabolismo, la proliferación, la diferenciación y la respuesta inmune. La importancia de la fosforilación y de su correcta regulación se ha puesto de manifiesto tras el conocimiento de que fallos en la fosforilación de las proteínas puede ser la causa de diferentes enfermedades como la diabetes, el

cáncer, las enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas o cardiovasculares (Cohen, C. *et al.* 2002).

Las rutas MAP quinasa (MAPK) son unas vías de transducción de señales de células eucariotas que están muy conservadas desde levaduras hasta mamíferos, presentando todas ellas el llamado **módulo MAPK** que está formado por diferentes proteínas quinasas encargadas desencadenar una cascada de fosforilación secuencial promoviendo la transducción de señales. El módulo MAPK consta de una MAPK quinasa quinasa (MAPKKK), una MAPK quinasa (MAPKK) y por último una MAPK. La última MAPK es activada mediante fosforilación en residuos conservados de tirosina y treonina pertenecientes a un motivo Thr-X-Tyr por la MAPKK. Esta MAPKK, a su vez, es fosforilada en residuos de serina y treonina por la MAPKKK. La cascada MAPK es activada, principalmente, por quinasas del tipo STE20/PAK y por proteínas de unión a GTP (Gutkind, J. S. 2000), llevando a cabo su función mediante la fosforilación y activación de diferentes sustratos como factores de transcripción, proteínas quinasas y otras proteínas relacionadas con el citoesqueleto (Roux, P. P. y Blenis, J. 2004).

I.4.1. Rutas de MAPKs en levaduras

En levaduras, existen cinco rutas MAPK que integran información biológica del medio extracelular (Figura 13):

- Ruta de respuesta a la feromona o factor- α
- Ruta de integridad o de estrés de pared celular
- Ruta de estrés osmótico
- Ruta de crecimiento filamentoso
- Ruta de esporulación

Una de las funciones principales de estas rutas MAPK es detectar determinados tipos de estrés que pueden poner en peligro la viabilidad celular permitiendo la activación de la maquinaria celular adecuada para hacer frente al estrés específico. Los diferentes estímulos que desencadenan la activación de estas rutas MAPK son: la feromona, la baja disponibilidad de nutrientes en el medio, los elevados niveles de osmolaridad o el estrés de la pared celular (Figura 13), aunque también las señales transmitidas a través de una misma ruta pueden activar otra mediante la activación de componentes comunes, por tanto, estableciendo una interconexión entre ellas (McClean, M. N. *et al.* 2007).

En la membrana plasmática se localizan los receptores transmembrana encargados de detectar específicamente cada uno de los estímulos externos. En la ruta de respuesta a la feromona, los receptores de membrana plasmática a los que se van a unir el factor- α o el factor- α son respectivamente Ste2 y Ste3; ante elevados niveles de osmolaridad se activan las proteínas Sho1 y Msb2 y las proteínas Mid2, Mtl1, Wsc1, Wsc2 y Wsc3 son los sensores de estrés de pared celular. Los receptores de membrana están asociados a proteínas G heterotriméricas (formadas por subunidades α , β y γ) que se encargan de trasladar la señal desde el receptor hasta el módulo MAPK. Por ejemplo, en la ruta de respuesta a la feromona, la activación del receptor induce la disociación de la subunidad α (Gpa1) de las subunidades β (Ste4) y γ (Ste18) promoviendo la activación de Cdc42 que es una GTPasa de la familia rho (Klein, S. *et al.* 2000). Cdc42-GTP es capaz de activar a Ste20 que actúa como una MAPKKK activando el módulo MAPK mediante fosforilación. En las rutas MAPK de respuesta a estrés nutricional u osmótico la activación del módulo MAPK se produce mediante la asociación de Cdc42 a Ste20 y Ste50 (Tatebayashi, K. *et al.* 2006). En el caso de la ruta de estrés de pared celular la GTPasa Rho1, a través de su regulador Rom2, promueve la activación del módulo MAPK correspondiente (Ozaki, K. *et al.* 1996).

En las rutas MAPKs de respuesta a la feromona y de estrés de pared celular existen proteínas adaptadoras (Ste5 y Spa2, respectivamente) encargadas de reclutar espacialmente las diferentes proteínas quinasas del módulo MAPK (Choi, Y. J. *et al.* 2000).

Las proteínas MAPK se encargan de fosforilar una gran variedad de sustratos incluyendo factores de transcripción y otras proteínas (Elion, E. A. *et al.* 1993; Jung, U. S. *et al.* 2002; de Nadal, E. *et al.* 2003), regulando la progresión del ciclo celular (Gartner, A. *et al.* 1998; Escote, X. *et al.* 2004), la morfología celular (Nolan, S. *et al.* 2006) y la expresión de genes en respuesta a diferentes tipos de estrés extracelular (Elion, E. A. *et al.* 1993; Madhani, H. D. *et al.* 1999).

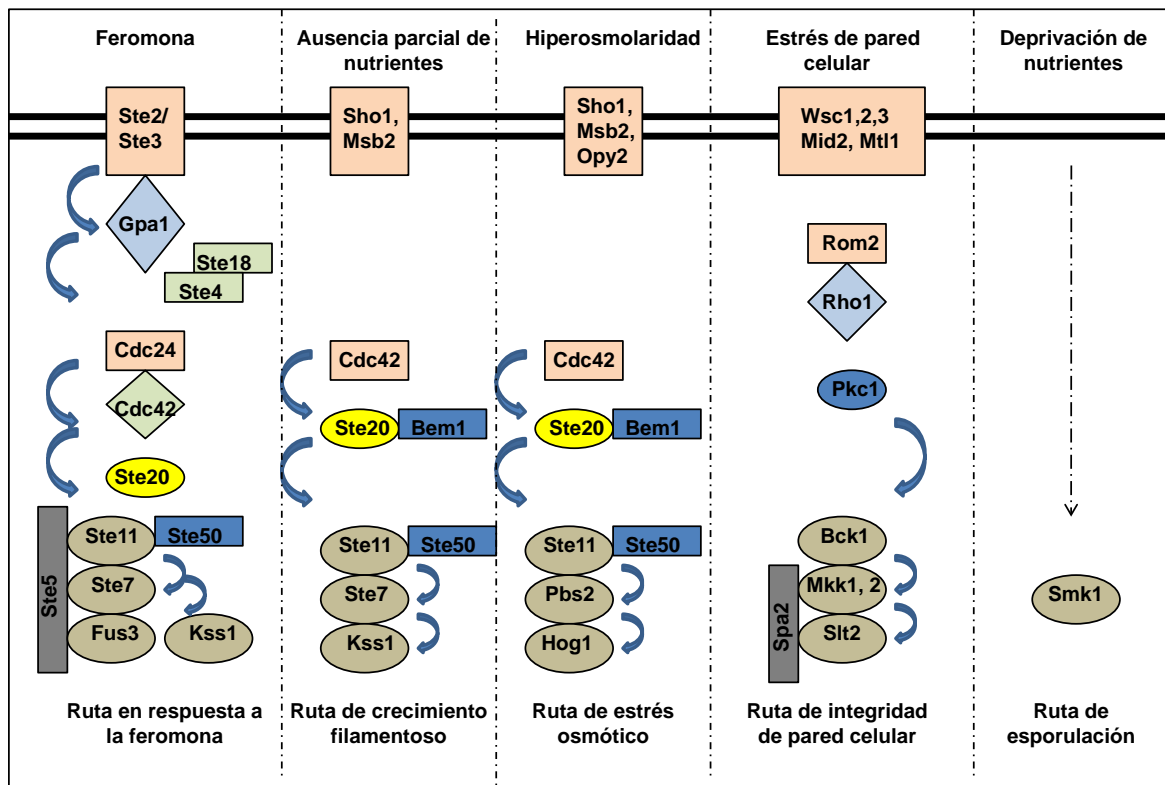


Figura 13. Esquema de las diferentes rutas de señalización MAPK en *S. cerevisiae*: ruta en respuesta a la feromona, de crecimiento filamentosos, de estrés osmótico, de integridad celular y de esporulación. Figura adaptada de (Chen, R. E. y Thorner, J. 2007).

La duración y magnitud de la activación de las rutas MAPK constituye un punto crítico para la célula puesto que la hiperactivación de estas rutas puede producir efectos letales (Maddodi, N. *et al.* 2010). En la regulación de estas rutas de señalización participan diferentes proteínas fosfatasa: proteínas tirosina fosfatasa (PTPs), proteínas serina/treonina fosfatasa y proteínas fosfatasa de doble función (DSPs) encargadas de modular el estado de fosforilación de los componentes de estas rutas MAPK (Saxena, M. y Mustelin, T. 2000).

Diferentes proteínas serina/treonina fosfatasa de tipo 2C (PP2C) han sido identificadas como reguladores negativos de la ruta de estrés osmótico, entre ellas Ptc1, 2, y 3 (Maeda, T. *et al.* 1994). La conexión de estas fosfatasa con la ruta de hiperosmolaridad se produce a través de la MAPK Hog1. Ptc1 regula los niveles basales de Hog1, mientras que Ptc2 y Ptc3, que también participan en la regulación del estado de fosforilación de Rad53, se encargan de limitar la activación máxima de Hog1 mediante su desfosforilación (Young, C. *et al.* 2002).

Las proteínas tirosina fosfatasa (PTPs) Ptp2 y Ptp3 regulan las rutas de señalización en levaduras a través Hog1, Fus3 y Slt2. En este caso la participación de una fosfatasa u otra

depende de la capacidad de unión al sustrato y de su localización celular (Mattison, C. P. *et al.* 1999).

En el grupo de las fosfatasa DSPs se sitúan Msg5 y Sdp1. Msg5 desfosforila Fus3, promoviendo la inactivación de la ruta de respuesta a la feromona además de modular la ruta de integridad mediante la desfosforilación de Slt2 (Martin, H. *et al.* 2000). Sdp1 controla los niveles de fosforilación de Slt2 después de inducirse el daño en la pared celular pero no en condiciones basales (Hahn, J. S. y Thiele, D. J. 2002).

Las proteínas fosfatasa además de regular los niveles de fosforilación de sus sustratos, participan en la interrelación de las diferentes rutas de señalización integrando las señales pertenecientes a cada una de ellas (Junttila, M. R. *et al.* 2008).

I.4.2. Familia de proteínas Far

En *S. cerevisiae* la ruta de respuesta a la feromona produce una parada del ciclo celular en fase G1 para permitir la conjugación de las células de tipo sexual opuesto. El establecimiento y mantenimiento de la parada del ciclo celular en respuesta a la feromona depende de la actividad de los miembros de la familia de proteínas Far. Esta familia de proteínas se puede dividir en dos grupos en relación con la función celular que desempeña cada uno de sus miembros: por una parte Far1 encargada de inducir la parada del ciclo celular en fase G1 (Mendenhall, M. D. 1998) y por otra parte las proteínas Far3, 7, 8, 9, 10 y 11 que participan en el mantenimiento de la parada del ciclo celular en fase G1 tras la activación de la cascada de señalización específica de la conjugación (Kemp, H. A. y Sprague, G. F., Jr. 2003).

Far1 es un inhibidor de las proteínas quinasas dependientes de ciclina. Está encargado de inactivar el complejo Cdc28/Cln2, y por tanto, participa en la parada del ciclo celular en fase G1 (Peter, M. y Herskowitz, I. 1994; Mendenhall, M. D. 1998). Far1 es fosforilado por Fus3 a través de la cascada de señalización de respuesta a la feromona. El sentido biológico de esta parada del ciclo celular es permitir que tenga lugar la conjugación cuando las células hayan alcanzado el tamaño correspondiente (Chang, F. y Herskowitz, I. 1990). Far1 también puede formar parte de un complejo proteico junto con Cdc24 y las subunidades β y γ de la proteína G (Cdc24-Far1- $G_{\beta\gamma}$) implicado en el establecimiento del crecimiento polarizado durante la conjugación (Nern, A. y Arkowitz, R. A. 1999).

El grupo de proteínas Far3, Far7, Far8, Far9, Far10 y Far11 participan en la ruta de señalización de respuesta a la feromona a través de una vía independiente de Far1 que asegura el mantenimiento de la parada del ciclo celular en fase G1, necesaria para que tenga lugar la conjugación (Kemp, H. A. y Sprague, G. F., Jr. 2003). Far3 es el miembro de este grupo que ha sido mejor caracterizado. Fue descubierto en un escrutinio en busca de cepas deletantes que presentaban defectos en la parada del ciclo celular en fase G1 (Horecka, J. y Sprague, G. F., Jr. 1996). Aunque la participación de Far3 en el mantenimiento de la parada del ciclo celular en respuesta a la feromona se produce a través de un mecanismo todavía desconocido, se ha descrito que Far3 no regula los niveles de ciclinas de la fase G1, ni está implicado en la ruta de señalización de Far1 (Horecka, J. y Sprague, G. F., Jr. 1996). Además, se ha determinado que las proteínas Far7, 8, 9, 10 y 11 pueden interactuar con Far3 formando un complejo multiproteico que es esencial para mantener a las células en G1 durante el proceso de conjugación (Kemp, H. A. y Sprague, G. F., Jr. 2003) (Figura 14). Se ha comprobado que tras el tratamiento prolongado con factor- α , las células de la cepa mutante $\Delta far3$ y del séxtuple mutante $\Delta far3\Delta far7\Delta far8\Delta far9\Delta far10\Delta far11$ experimentan una parada inicial del ciclo celular, pero reanudan la progresión del ciclo después de 10 horas; sin embargo, la cepa $\Delta far1$ continua dividiéndose pese a la exposición continuada con factor- α (Kemp, H. A. y Sprague, G. F., Jr. 2003). Estos datos indican que Far1 está implicado en la inducción de la parada del ciclo celular de fase G1, mientras que el resto de miembros de la familia Far aseguran el mantenimiento de esa parada evitando la reanudación prematura del ciclo celular durante el proceso de conjugación.

Entre los miembros de la familia FAR destaca el gen *FAR11*, ya que se han identificado dos ortólogos en humanos, *FAM40A* y *FAM40B*, de función desconocida (Kemp, H. A. y Sprague, G. F., Jr. 2003), aunque se ha sugerido que las proteínas Fam40A y Fam40B (también llamadas Strip-1 y Strip-2) forman parte de un complejo multiproteico con actividad fosfatasa-quinasa denominado STRIPAK (Goudreault, M. *et al.* 2009). Este complejo proteico está formado por la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 2A (PP2A-C), una proteína adaptadora (PP2A-A), las estriatinas (subunidades reguladoras de la proteína fosfatasa 2A), una proteína asociada a estriatinas (Mob3), Fam40A y Fam40B (ortólogos de Far11 en humanos), la proteína CCM3 y proteínas quinasas de la familia Ste20 (Goudreault, M. *et al.* 2009).

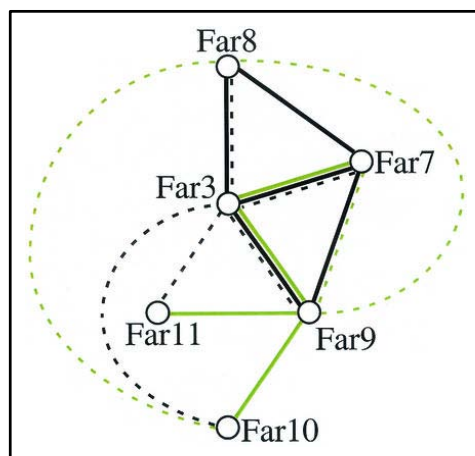


Figura 14. Interacciones proteicas de la familia FAR. Tomado de (Kemp, H. A. y Sprague, G. F., Jr. 2003). Las líneas discontinuas muestran interacciones proteicas comprobadas por análisis de dos híbridos. En líneas discontinuas aparecen las interacciones proteicas verificadas por ensayos de coimmunoprecipitación.

Far11 parece que puede estar regulado mediante la fosforilación de alguno de sus restos de serina, como pone de manifiesto la identificación de un fosfopéptido de Far11 en un ensayo de fosfoproteómica en células de *S. cerevisiae* tratadas con factor- α (Gruhler, A. *et al.* 2005). Se abre, por tanto, un nuevo campo de investigación para determinar las posibles conexiones entre la regulación de la actividad del complejo Far y la cascada de señalización en respuesta a la feromona, así como para descifrar la función molecular de los ortólogos de los genes *FAR* en mamíferos.

II. Objetivos

Los objetivos que se plantean en este trabajo son los siguientes:

1. Caracterización de los fenotipos derivados de la expresión heteróloga de la Caspasa-8 y la Caspasa-10 humanas en *S. cerevisiae*.
2. Búsqueda sistemática de cepas mutantes de *S. cerevisiae* que muestran una actividad supresora de la toxicidad inducida por la Caspasa-10 humana.
3. Caracterización de nuevos mecanismos de regulación de los procesos de muerte celular en *S. cerevisiae*.

III. Resultados

III.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS FENOTIPOS DERIVADOS DE LA EXPRESIÓN DE LA CASPASA-8 Y LA CASPASA-10 HUMANAS EN *S. CEREVISIAE*

III.1.1. La Caspasa-8 y la Caspasa-10 humanas son tóxicas en *S. cerevisiae*

Los genes *CASP8* y *CASP10* humanos están localizados en la misma región del cromosoma 2 y podrían haberse originado como consecuencia de una duplicación génica en el transcurso de la evolución (Ho, P. K. y Hawkins, C. J. 2005). La organización genómica de estos genes indica que pueden sufrir diferentes modificaciones post-transcripcionales mediante procesos de *splicing* alternativo dando lugar a varias isoformas de las proteínas Caspasa-8 y Caspasa-10. La isoforma C de la Caspasa-8 (también llamada *MACH-alpha2* o *MCH5*) y la isoforma D de la Caspasa-10 son las formas mayoritarias en los tejidos humanos (Scaffidi, C. *et al.* 1997; Ng, P. W. *et al.* 1999).

Con el propósito de determinar si estas isoformas de la Caspasa-8 y -10 humanas son tóxicas en la levadura de gemación, se amplificaron las ORFs codificantes de las isoformas C y D de la Caspasa-8 y Caspasa-10 humanas, respectivamente. Se empleó una librería de cDNA obtenida a partir de RNA total de células humanas Jurkat utilizando los oligonucleótidos correspondientes descritos en la Tabla 6. Las variantes transcripcionales de la Caspasa-8 (*CASP8_C*) y Caspasa-10 (*CASP10_D*) fueron verificadas mediante la secuenciación completa de los productos de PCR. Durante el proceso de amplificación se aisló una nueva variante transcripcional del gen *CASP8* que fue denominada como *CASP8_S* y depositada en la base de datos GenBank (EU168332). Esta variante transcripcional *CASP8_S* codifica una nueva isoforma de la Caspasa-8 que es más corta que la isoforma C, pero que mantiene los dos dominios DED y el dominio catalítico (Figura 15A).

Las tres ORFs obtenidas *CASP8_C*, *CASP8_S* y *CASP10_D* fueron clonadas en los vectores de expresión en levadura pESC-URA (en el caso de *CASP10_D*) y pESC-LEU (en el caso de *CASP8_C* y *CASP8_S*). Los plásmidos pESC-URA_*CASP10_D*, pESC-LEU_*CASP8_C* y pESC-LEU_*CASP8_S* fueron empleados para transformar la cepa haploide BY4741 de *S. cerevisiae*. La inducción de la expresión de las variantes transcripcionales de *CASP8* y *CASP10* se llevó a cabo en un medio selectivo con galactosa como fuente de carbono comprobándose que la expresión de ambas caspasas inhibía el crecimiento en *S. cerevisiae* (Figura 15B-C). Como control negativo se empleó la cepa BY4741 transformada con el vector pESC-URA vacío. Además, se utilizó como control positivo de toxicidad en *S. cerevisiae* la cepa BY4741

transformada con un plásmido de expresión del gen *BAX* de ratón cuya expresión es tóxica en *S. cerevisiae*. Se comprobó que la expresión de las isoformas C y D de la Caspasa-8 y Caspasa-10, respectivamente, causan un efecto tóxico comparable al de la expresión de Bax en *S. cerevisiae*. Sin embargo, la expresión de la isoforma S de la Caspasa-8 resultó significativamente menos tóxica que las otras isoformas analizadas. Por consiguiente, se decidió continuar trabajando con las variantes transcripcionales *CASP8_vC* y *CASP10_vD* porque causan un fenotipo citotóxico más evidente que la variante *CASP8_vS*. En adelante nos referiremos a las *CASP8_vC* y *CASP10_vD* como Caspasa-8 y Caspasa-10, respectivamente.

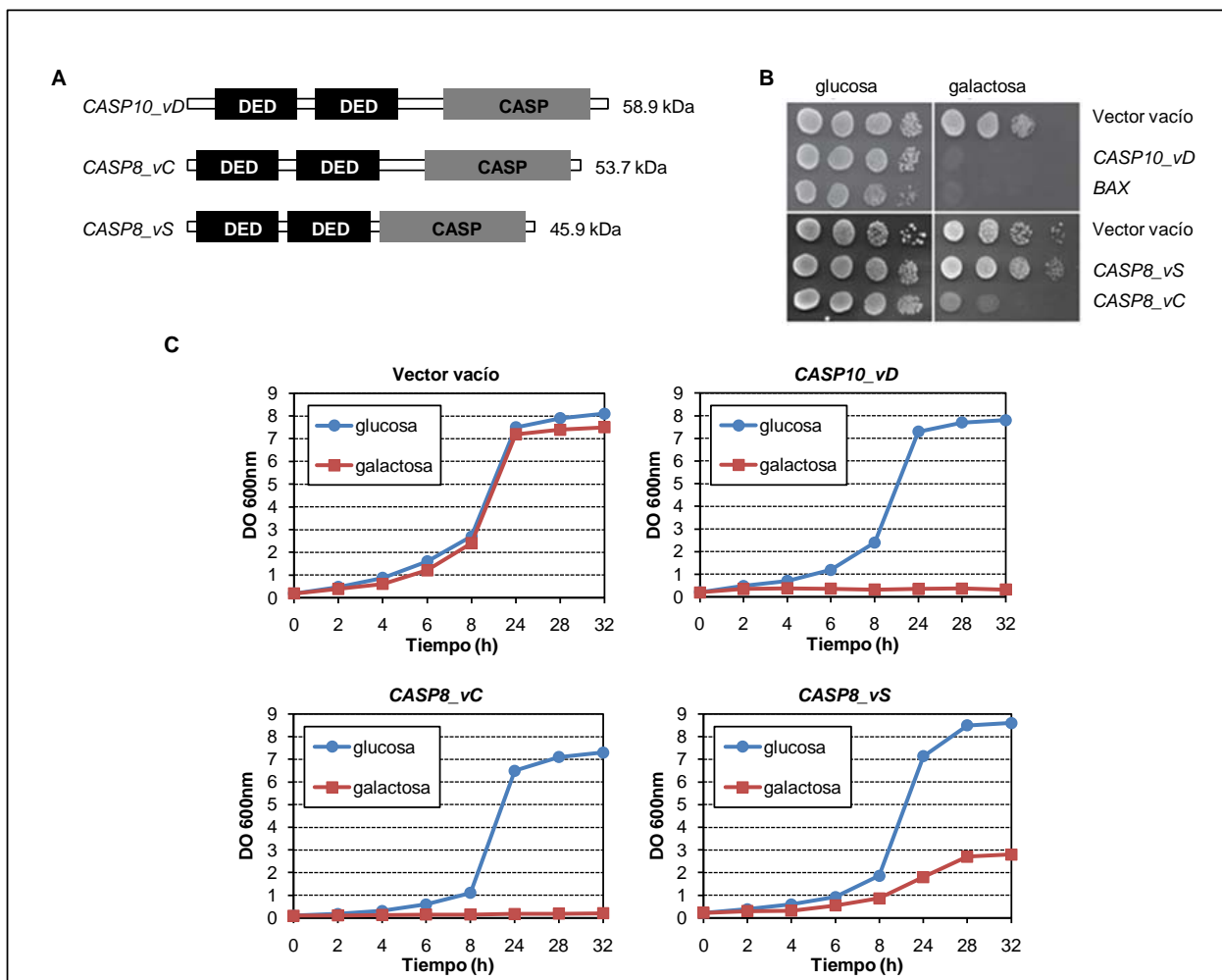


Figura 15. La expresión heteróloga de la Caspasa-8 y la Caspasa-10 humanas inhibe el crecimiento en *S. cerevisiae*. A) Dominios estructurales de las isoformas codificadas por los genes *CASP8_C*, *CASP8_S* y *CASP10_D*. B) Diluciones seriadas de cepas BY4741 transformada con los plásmidos de expresión de los genes *CASP8* y *CASP10*. La inducción de la expresión se realiza en medios con galactosa como fuente de carbono. Se emplean como controles negativos la cepa BY4741 transformada con los plásmidos vacíos y como control positivo del efecto citotóxico la cepa BY4741/BAX. C) Curvas de crecimiento de cepas BY4741 que expresan *CASP8_vC*, *CASP8_vS* o *CASP10_vD*. Como control negativo se utilizó la cepa BY4741 transformada con el plásmido pESC-URA vacío.

III.1.2. La Caspasa-10 humana induce la muerte celular en *S. cerevisiae*

En estudios previos se ha demostrado que la toxicidad asociada a la expresión de la Caspasa-8 humana en *S. cerevisiae* se debe a la inducción de muerte celular (Kang, J. J. *et al.* 1999; Puryer, M. A. y Hawkins, C. J. 2006). En este trabajo se llevó a cabo un análisis de clonogenicidad para determinar si la expresión de la Caspasa-10 en *S. cerevisiae* inhibe el crecimiento o causa la muerte celular.

Las células de la cepa BY4741 de *S. cerevisiae* transformada con los plásmidos pESC-URA_CASP10 (en adelante solo CASP10) o pESC-URA vacío se cultivaron en un medio selectivo con glucosa como fuente de carbono hasta alcanzar la fase logarítmica. Entonces las células fueron transferidas a un medio selectivo con galactosa como fuente de carbono para inducir la expresión de la Caspasa-10 durante 2h, 4h y 8h. Se tomaron alícuotas de cada cultivo a los tiempos indicados y se analizó la capacidad de estas células para formar colonias (clonogenicidad) en medio selectivo con glucosa como fuente de carbono. Como se muestra en la Figura 16, la expresión de la Caspasa-10 es responsable de un descenso paulatino de la clonogenicidad. A partir de las 4h de inducción de la expresión de la Caspasa-10 la capacidad de formación de colonias se reduce significativamente, siendo prácticamente nula tras 8h de inducción. Sin embargo, en la cepa BY4741/pESC-URA utilizada como control negativo, se produce un aumento en el número de colonias formadas a lo largo del tiempo. Por tanto, este resultado indica que la expresión de la Caspasa-10 en *S. cerevisiae* provoca la muerte celular.

El resultado obtenido en el ensayo de clonogenicidad fue corroborado mediante el uso de los tintes vitales FUN-1 y Resazurina que permiten distinguir entre células vivas (metabólicamente activas) y células muertas. En este caso las células de las cepas BY4741/pESC-URA y BY4741/pESC-URA_CASP10 se mantuvieron durante 6h en medio de inducción (con galactosa como fuente de carbono). Transcurrido ese tiempo se recogieron alícuotas de cada cultivo y se trataron con los compuestos fluorescentes FUN-1 y Resazurina. La tinción FUN-1 reveló que únicamente las células transformadas con el vector vacío presentaban estructuras rojas intravacuolares indicativas de que se trataba de células metabólicamente activas (células vivas). Asimismo, la tinción con Resazurina mostró que sólo en las células de la cepa BY4741/pESC-URA se observaba la fluorescencia correspondiente a células vivas (Figura 16B-C). Por consiguiente, se confirmó la muerte celular masiva a partir de las 6h desde la inducción de la expresión del gen CASP10 (Figura 16B-C). Estos resultados ponen de manifiesto que la Caspasa-10 humana induce la muerte celular en *S. cerevisiae*.

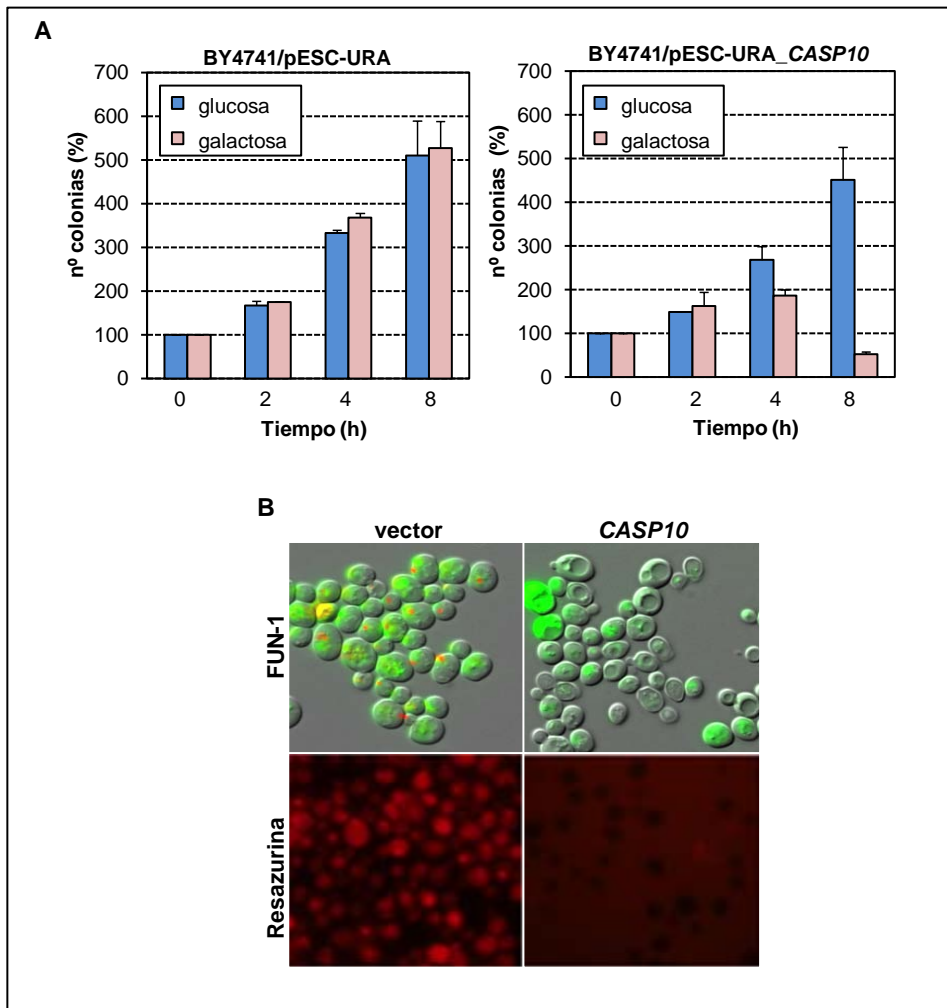


Figura 16. La Caspasa-10 humana induce muerte celular en *S. cerevisiae*. A) Análisis de clonogenicidad de las cepas BY4741/pESC-URA y BY4741/pESC-URA_CASP10. Las gráficas representan el porcentaje de colonias que se forman tras la incubación en un medio con galactosa a lo largo del tiempo. Los valores representan la media de tres experimentos independientes. B) Tinción FUN-1 de células BY4741/pESC-URA y BY4741/pESC-URA_CASP10 mantenidas durante 6h en un medio con galactosa. Las células vivas presentan estructuras rojas intravacuolares. C) Tinción con Resazurina de células BY4741/pESC-URA y BY4741/pESC-URA_CASP10 mantenidas durante 6h en un medio con galactosa. La fluorescencia roja es indicativa de células vivas.

III.1.3. La muerte celular inducida por la expresión de la Caspasa-8 y la Caspasa-10 humanas es independiente de la maquinaria apoptótica de la levadura

Las proteínas Aif1 o factor inductor de apoptosis y Mca1 o metacaspasa, así como la mitocondria, son importantes efectores en los procesos de muerte celular en *S. cerevisiae* (Eisenberg, T. *et al.* 2007). Por lo tanto, se quiso investigar si estas proteínas son también indispensables en la muerte celular dependiente de la expresión de la Caspasa-8 y -10 en *S. cerevisiae*. Con este objetivo la Caspasa-8 y la Caspasa-10 humanas fueron expresadas, desde los

vectores descritos con anterioridad, en las cepas mutantes $\Delta aif1$, $\Delta mca1$ y en una cepa rho^- que carece de mitocondrias funcionales. Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de las caspasas también promueve una clara inhibición del crecimiento en las cepas mutantes $\Delta aif1$ y $\Delta mca1$, así como en la cepa rho^- , indicando que ninguna de estas proteínas (Aif1 y Mca1) ni tampoco la mitocondria, son esenciales para que se produzca la muerte celular inducida por la expresión de *CASP8* y *CASP10* (Figura 17).

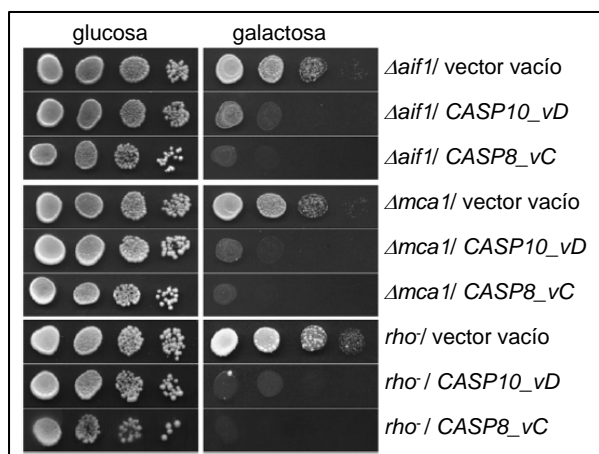


Figura 17. Diluciones seriadas en medios con glucosa o galactosa de las cepas $\Delta aif1$, $\Delta mca1$ y rho^- transformadas con los plásmidos pESC-LEU_ *CASP8* o pESC-URA_ *CASP10*. Las mismas cepas $\Delta aif1$, $\Delta mca1$ y rho^- transformadas con el vector vacío pESC-URA fueron utilizadas como controles negativos.

III.1.4. La activación proteolítica de la Caspasa-10 es esencial para su efecto citotóxico en *S. cerevisiae*

Las caspasas son sintetizadas como proenzimas (zimógenos) inactivas y para poder desencadenar el programa apoptótico han de ser activadas mediante proteólisis (Donepudi, M. y Grutter, M. G. 2002). La Caspasa-10 es proteolizada en dos residuos de ácido aspártico, liberándose el dominio grande (p20) y el dominio pequeño (p10) para formar una enzima activa (Figura 18A). Con el fin de comprobar si la Caspasa-10 es eficientemente activada en *S. cerevisiae*, se llevó a cabo un análisis western-blot de la cepa BY4741 que expresa el gen *CASP10* para detectar el dominio p10 que se genera tras la activación proteolítica de la procaspasa-10. Se utilizó un anticuerpo anti-caspasa10 que reconoce un epítipo en el extremo C-terminal de esta caspasa. En este experimento el anticuerpo fue capaz de detectar un péptido de aproximadamente 12 KDa correspondiente al dominio p10 de la Caspasa-10 que es resultado de la proteólisis de la proenzima (Figura 18A), indicando que la Caspasa-10 es eficazmente activada en *S. cerevisiae*.

A continuación se quiso comprobar si la activación proteolítica de la Caspasa-10 es necesaria para inducir la muerte celular en *S. cerevisiae*. Se diseñaron alelos mutantes del gen *CASP10* portadores de mutaciones que afectaban al centro catalítico (Cys⁴⁰¹) y a los dos residuos

implicados en la activación proteolítica (Asp²¹⁹ y Asp⁴¹⁶). Las sustituciones introducidas fueron las siguientes: cambio de Cys⁴⁰¹ a Gly, de Asp²¹⁹ a Ala y de Asp⁴¹⁶ a Ala. La presencia de estas mutaciones fue verificada mediante la secuenciación de los alelos mutantes que fueron clonados en el vector de expresión pESC-URA y los plásmidos resultantes se emplearon para transformar la cepa BY4741 de *S. cerevisiae*. La expresión de los alelos mutantes se realizó en medios selectivos con galactosa como fuente de carbono y se observó que ninguna de las isoformas mutantes de la Caspasa-10 (Casp10-D219A, Casp10-D416A o Casp10-C401G) resulta letal en *S. cerevisiae* (Figura 18C-D), indicando que los residuos reemplazados son esenciales para la muerte celular inducida por la Caspasa-10 humana en *S. cerevisiae*.

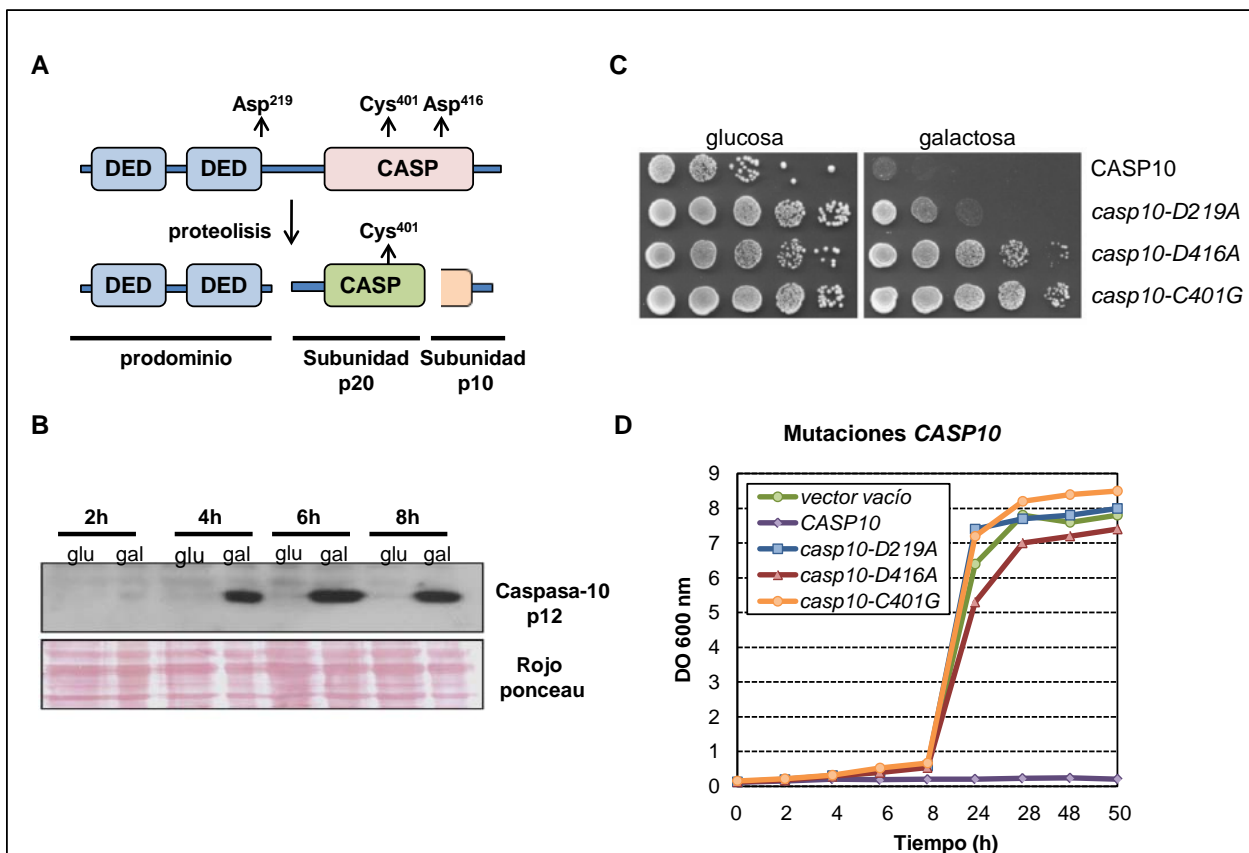


Figura 18. La activación de la Caspasa-10 es esencial para su efecto citotóxico en *S. cerevisiae*. A) Esquema de la activación proteolítica de la Caspasa-10. B) Western-blot de extractos proteicos de la cepa BY4741/pESC-URA_CASP10 mantenida en medios con glucosa o galactosa durante los tiempos indicados. C) Análisis de toxicidad de los alelos mutantes de la CASP10. D) Curvas de crecimiento de las cepas que expresan los alelos mutantes del gen CASP10 en un medio con galactosa como fuente de carbono.

III.1.5. La expresión de la Caspasa-8 y la Caspasa-10 humanas promueve un aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en *S. cerevisiae*

La expresión de algunas proteínas proapoptóticas humanas como Bax en *S. cerevisiae* induce la producción masiva de ROS (Madeo, F. *et al.* 1999). Con el objetivo de determinar si la expresión de la Caspasa-8 o la Caspasa-10 humanas en *S. cerevisiae* está igualmente asociada a elevados niveles de estrés oxidativo se analizó la producción de ROS en las cepas que expresan los genes *CASP8* y *CASP10* mediante el empleo de los compuestos fluorescentes H₂DCF-DA y DHE, que son capaces de detectar radicales peróxido y superóxido, respectivamente.

Para llevar a cabo este experimento cultivos de células de las cepas BY4741/pESC-URA_*CASP10* y BY4741/pESC-LEU_*CASP8* en fase logarítmica fueron transferidos a un medio con galactosa para inducir la expresión de estas caspasas. Posteriormente se recogieron muestras de los cultivos a las 2h y 4h después del cambio de la fuente de carbono y se analizó la producción de ROS mediante microscopía de fluorescencia usando los compuestos H₂DCF-DA y DHE. Como se puede apreciar en la Figura 19, a partir de las 2h de inducción de la expresión de la Caspasa-8 aparecen niveles altos de ROS, tanto de tipo superóxido como peróxido. En el caso de la Caspasa-10 este efecto es un poco más tardío, puesto que no se observa la producción de ROS hasta después de 4h de inducción de la expresión del gen *CASP10*. Por tanto, estos resultados indican que la expresión de la Caspasa-8 y la Caspasa-10 humanas en *S. cerevisiae* promueve una elevada producción de ROS de tipo peróxido y superóxido.

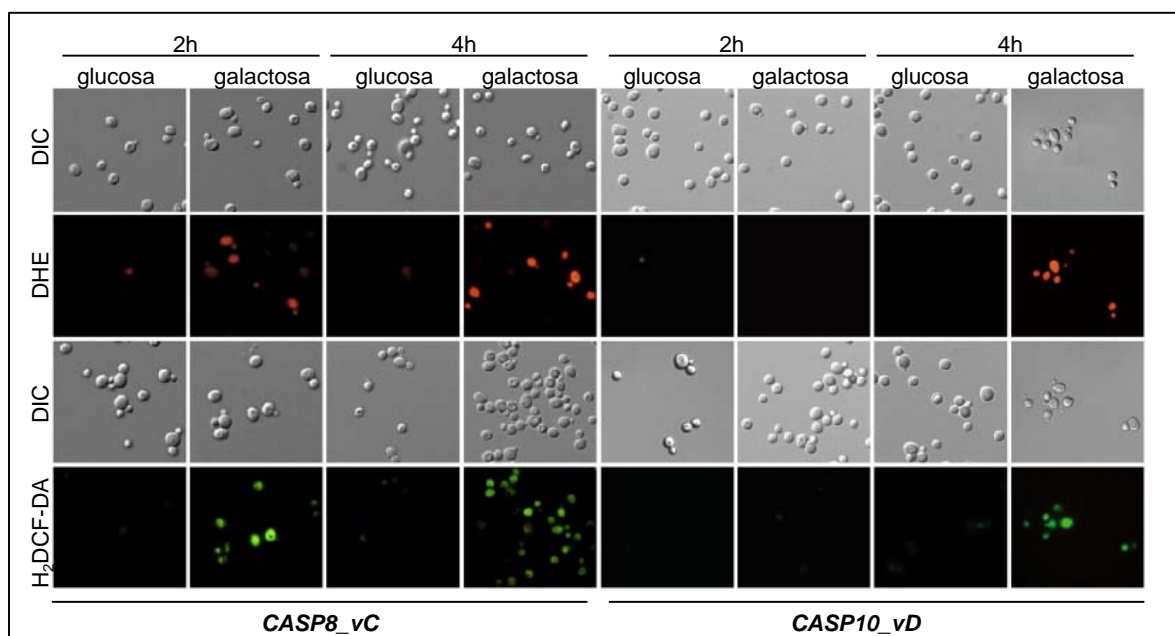


Figura 19. La Caspasa-8 y la Caspasa-10 humanas inducen un aumento en los niveles de estrés oxidativo en *S. cerevisiae*.

Figura 19 (Continuación). Células de las cepas BY4741/pESC-LEU_CASP8 y BY4741/pESC-URA_CASP10 crecidas en medios con glucosa o galactosa fueron teñidas con DHE (color naranja) y H₂DCF-DA (color verde) y visualizadas al microscopio de fluorescencia a los tiempos indicados.

III.1.6. La expresión de la Caspasa-8 y la Caspasa-10 humanas induce la externalización de la fosfatidilserina en *S. cerevisiae*

La organización de los fosfolípidos de las membranas se modifica tras la inducción de la apoptosis en la mayoría de los tipos celulares (Bever, E. M. *et al.* 1998). La fosfatidilserina (PS), localizada en la cara citoplásmica de las células, se relocaliza hacia el exterior celular cuando se induce la apoptosis quedando expuesta sobre la superficie celular. Por lo tanto, la externalización de la fosfatidilserina es considerada uno de los marcadores típicos de la apoptosis (Allen, R. T. *et al.* 1997).

Para determinar si la expresión de las caspasas iniciadoras (Caspasas-8 y Caspasa-10) promueve este fenotipo en *S. cerevisiae* se examinó la distribución de la fosfatidilserina en la membrana plasmática mediante tinción con AnexinaV/Ioduro de Propidio. El uso de AnexinaV/Ioduro de Propidio permite distinguir entre necrosis, apoptosis temprana y apoptosis tardía. La tinción con AnexinaV es un marcador típico de apoptosis temprana, mientras que la tinción AnexinaV positiva acompañada de un alto número de células teñidas con Ioduro de Propidio es un marcador típico de apoptosis tardía. Por otra parte, la sola existencia de células teñidas con Ioduro de Propidio es indicativa de muerte por necrosis.

El experimento se llevó a cabo empleando células de las cepas BY4741/pESC-URA_CASP10 y BY4741/pESC-LEU_CASP8 crecidas en medios con glucosa o galactosa como se ha descrito anteriormente. Se tomaron alícuotas de los cultivos a diferentes tiempos (2h, 4h, 6h) y las células fueron teñidas con AnexinaV/Ioduro de Propidio. Mientras que las células de los cultivos de 2h no se teñieron en ninguno de los casos, tras 4 y 6 horas de inducción de la expresión de la Caspasa-8 o de la Caspasa-10 se observó que la mayoría de las células estaban teñidas con AnexinaV, pero no con Ioduro de Propidio (Figura 20). Este resultado indica que la expresión de la Caspasa-8 o de la Caspasa-10 induce un fenotipo propio de apoptosis temprana en *S. cerevisiae*.

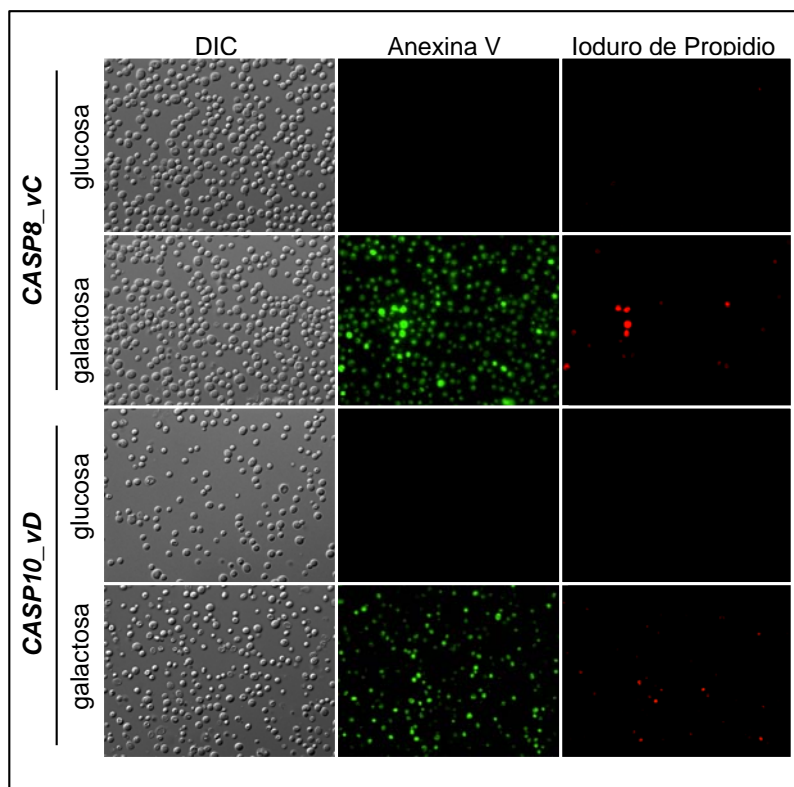


Figura 20. Cultivos de las cepas BY4741/pESC-LEU_CASP8 y BY4741/pESC-URA_CASP10 mantenidos durante 4h en medios con glucosa o galactosa fueron tratados con AnexinaV/Ioduro de Propidio y examinados mediante microscopía de fluorescencia con los filtros de GFP (AnexinaV) y RFP (ioduro de propidio).

III.1.7. La expresión de la Caspasa-10 humana no provoca la fragmentación del ADN genómico en *S. cerevisiae*

Otro de los fenotipos asociado a los procesos de apoptosis es la fragmentación del ADN debido a la activación de ciertas endonucleasas endógenas como la endonucleasa G (Walker, P. R. *et al.* 1999). Previamente se ha descrito que la expresión de la Caspasa-8 causa un efecto citotóxico asociado a altos niveles de estrés oxidativo, pero no induce la fragmentación del ADN (Puryer, M. A. y Hawkins, C. J. 2006). Con el objetivo de determinar si la expresión de la Caspasa-10 humana provoca la fragmentación del ADN en *S. cerevisiae* se analizó la integridad del ADN cromosómico mediante electroforesis en campo pulsado (CHEF) de las cepas que expresan los genes *CASP8* (que sirvió como control negativo) y *CASP10* tras 8 horas de cultivo en medio con glucosa o con galactosa. Como control positivo de la fragmentación de ADN se incluyó una muestra de ADN cromosómico de células transformadas con el vector pESC-URA vacío crecidas en presencia de 10 mM de peróxido de hidrógeno. El ADN cromosómico de las cepas que expresan la Caspasa-8 o la Caspasa-10 fue separado en 10 bandas discretas correspondientes a los 16 cromosomas de *S. cerevisiae*, indicando que los cromosomas permanecían intactos y de que el ADN no estaba degradado. Por el contrario, en las células tratadas con peróxido de hidrógeno apareció un claro patrón de degradación del ADN (Figura

21). Por tanto, estos resultados demuestran que la expresión de la Caspasa-10 humana en *S. cerevisiae* no causa la fragmentación del ADN.

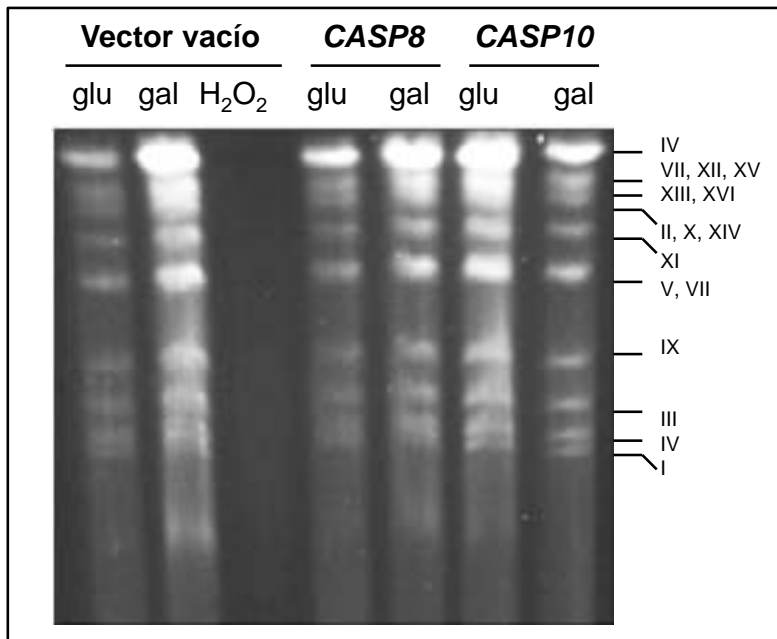


Figura 21. Electroforesis en campo pulsado de ADN cromosómico de las cepas BY4741/pESC-LEU_CASP8, BY4741/pESC-URA_CASP10 y BY4741/pESC-URA crecidas en medios con glucosa o galactosa. ADN de la cepa BY4741/pESC-URA crecida en presencia de 10mM H₂O₂ se incluyó como control positivo de degradación del ADN. El ADN cromosómico fue resuelto en un gel de agarosa del 1% durante 25 horas. Se indican los cromosomas correspondientes en cada banda obtenida en la electroforesis.

III.1.8. Inactivación del checkpoint de fase-S tras la expresión de la Caspasa-8 o la Caspasa-10 en *S. cerevisiae*

Los procesos de muerte celular apoptótica están relacionados con la progresión del ciclo celular a través de la regulación de los checkpoints que controlan el ciclo, de modo que frente a un estrés genotóxico en la célula se activan los checkpoints para reparar el daño ocasionado y la inactivación o los errores en la activación de estos checkpoints pueden desencadenar procesos de muerte celular (Weinberger, M. *et al.* 2005; Matsuura, K. *et al.* 2008).

Con el propósito de analizar si la expresión de la Caspasa-8 o la Caspasa-10 humanas produce alteraciones en el ciclo celular, se realizó un seguimiento en la progresión del ciclo celular en respuesta a la expresión de estas caspasas mediante el análisis del contenido en ADN. El experimento se llevó a cabo empleando cultivos asincrónicos de las cepas que portan los plásmidos de expresión de *CASP8*, *CASP10* o los correspondientes vectores vacíos (pESC-URA o pESC-LEU). Los cultivos de estas cepas se mantuvieron en medios con glucosa o galactosa y se recogieron alícuotas a las 2h, 4h, 6h y 8h después de la inducción de la expresión de las caspasas. El contenido en ADN de cada una de las muestras se analizó mediante citometría de flujo (FACS). Como resultado del análisis, se obtienen unas gráficas en las que cada pico

representa el contenido de ADN y que es indicativo de cada fase del ciclo celular. En este experimento correspondiente a cultivos asincrónicos no se observó ninguna alteración, ni retardo en la progresión del ciclo celular después de inducir la expresión de la Caspasa-8 o la Caspasa-10 en *S. cerevisiae* (no se muestra el resultado de los perfiles de FACS).

En respuesta al estrés replicativo las células activan el checkpoint de fase-S y el proceso de replicación cesa para poder reparar el daño ocasionado en la medida de lo posible (Grallert, B. y Boye, E. 2008). Se quiso comprobar si la expresión de la Caspasa-8 o la Caspasa-10 causa alguna alteración del checkpoint de fase-S frente a un daño genotóxico. Por lo tanto, se trataron las células de las cepas que expresan la Caspasa-8 o la Caspasa-10 con el agente genotóxico hidroxurea (HU) y se analizó el contenido de ADN de los cultivos. La expresión de los genes *CASP8* o *CASP10* se indujo en un medio con galactosa durante 4 horas y posteriormente se realizó el tratamiento con 0,2M de hidroxurea durante 2 horas. Alícuotas de cada cultivo fueron recogidas y analizadas mediante citometría de flujo (FACS) para determinar el contenido de ADN. Las cepas que portan vectores vacíos sufren una parada del ciclo celular en fase-S, en respuesta al tratamiento con hidroxurea, que dura aproximadamente 1h y transcurrido ese periodo de tiempo las células reanudan el ciclo celular y duplican su material genético, como queda representado en la Figura 22 por el pico 2N que aparece 1h después del tratamiento con hidroxurea. Sin embargo, las cepas que expresan la Caspasa-8 o la Caspasa-10 no experimentan la parada del ciclo celular en fase-S después del tratamiento con hidroxurea ya que, en los perfiles de contenido en ADN, se observa una población de células con un contenido haploide (N) y otra población de células que posee un contenido de ADN diploide (2N), lo que es propio de células en crecimiento activo (Figura 22). Estos resultados indican que tras la expresión de las Caspasas -8 y -10 humanas en la levadura se produce la inactivación del checkpoint de fase-S y que, por tanto, las células no responden correctamente al daño en el ADN producido por el tratamiento con hidroxurea.

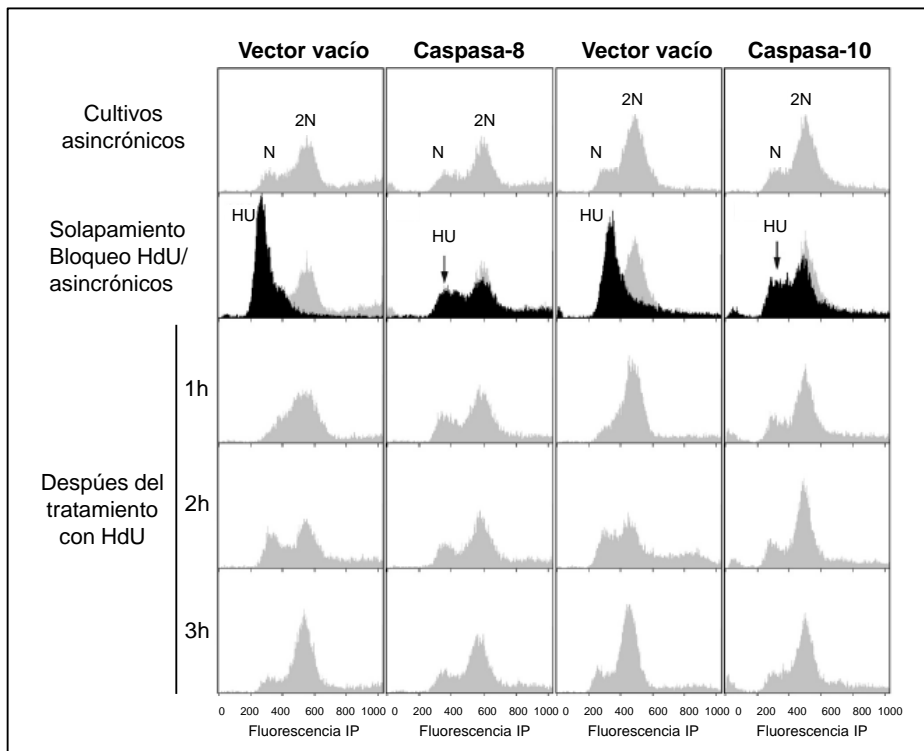


Figura 22. Análisis del contenido de ADN de las cepas que expresan *CASP8* y *CASP10*. Los cultivos fueron tratados con hidroxurea (HU) 0,2 M durante 2h y posteriormente fueron teñidos con yoduro de propidio y analizados mediante citometría de flujo (FACS). En el gráfico se muestran poblaciones de células con contenido de ADN haploide (N) y diploide (2N). Las cepas transformadas con los vectores vacíos fueron utilizadas como controles positivos del experimento.

III.1.9. La expresión de la Caspasa-10 humana promueve una desorganización del citoesqueleto de actina

El citoesqueleto de actina juega un papel fundamental en múltiples rutas de señalización celular y también está relacionado con la regulación de los procesos de muerte celular (Leadsham, J. E. y Gourlay, C. W. 2008). El citoesqueleto de actina se encuentra organizado en cables y parches de actina en condiciones fisiológicas en ausencia de estrés. Unos niveles altos de estrés oxidativo se correlacionan con una desorganización de los filamentos de actina fundamentalmente en forma de parches o acúmulos de gran grosor (Leadsham, J. E. y Gourlay, C. W. 2008). Puesto que anteriormente se había comprobado que la expresión de la Caspasa-10 promueve altos niveles de estrés oxidativo se analizó si la organización del citoesqueleto de actina resultaba afectada tras la expresión de esta caspasa. Los cultivos de células BY4741/pESC-URA_ *CASP10* fueron crecidos en un medio selectivo con glucosa hasta alcanzar la fase exponencial y en ese momento fueron transferidos, por una parte, a un medio selectivo con

galactosa como fuente de carbono donde se mantuvieron durante 4h desde la inducción de la expresión de *CASP10* y por otra parte, a un nuevo medio con glucosa donde no existe expresión de *CASP10* y que, por tanto, se utiliza como control negativo. Se recogieron alícuotas de cada uno de los cultivos celulares que fueron teñidas con el compuesto fluorescente Faloidina para ser visualizadas al microscopio de fluorescencia. Tras 4h de inducción de la expresión de *CASP10* se observaron grandes acúmulos de los parches de actina, a diferencia de lo observado en el control negativo en el que aparecía el citoesqueleto de actina perfectamente organizado en cables y parches (Figura 23). Los agregados de actina que aparecen tras la expresión de la Caspasa-10 se acumulan preferentemente en el cuello de las células que se están dividiendo (Figura 23F-G). Estos resultados indican que la expresión de la Caspasa-10 promueve una desorganización del citoesqueleto de actina en *S. cerevisiae*.

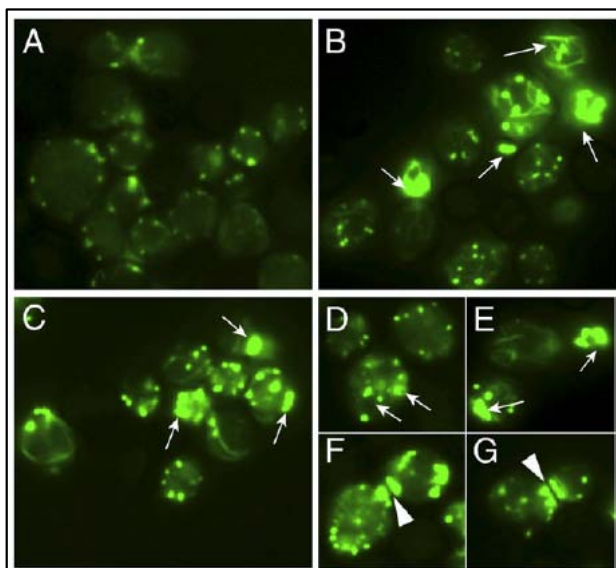


Figura 23. Cultivos de la cepa BY4741/pESC-URA_ *CASP10* crecidos durante 4h en un medio con glucosa (A) o con galactosa (B-G) fueron teñidos con Faloidina y visualizados por microscopía de fluorescencia. Las flechas indican los agregados de actina. Los triángulos blancos señalan acúmulos de actina en el cuello de las células que se están dividiendo.

III.1.10. Otros fenotipos subcelulares asociados a la expresión de la Caspasa-10

Se ha descrito que las células apoptóticas de *S. cerevisiae* muestran ciertos fenotipos subcelulares como altos niveles de vacuolización, condensación de la cromatina y alteraciones en el lumen del retículo endoplásmico (Madeo, F. *et al.* 1997). Además, la expresión de la Caspasa-3 o la Caspasa-8 en *S. cerevisiae* causa también ciertas alteraciones en la mitocondria (Puryer, M. A. y Hawkins, C. J. 2006).

Para comprobar si la expresión de la Caspasa-10 humana provoca alteraciones en orgánulos como la mitocondria o la vacuola se realizó un estudio mediante microscopía de fluorescencia con marcadores específicos de cada orgánulo. Con este objetivo, células de la cepa BY4741/pESC-URA_ *CASP10* mantenidas en un medio con galactosa durante 4 horas fueron teñidas con MDY-64 (marcador vacuolar) y con SYTO18 (marcador mitocondrial) y

posteriormente visualizadas al microscopio de fluorescencia. Tras la expresión de la Caspasa-10 se produce un aumento en el número de vacuolas por célula (Figura 24A), sin embargo no se manifiestan alteraciones en la mitocondria (Figura 24B).

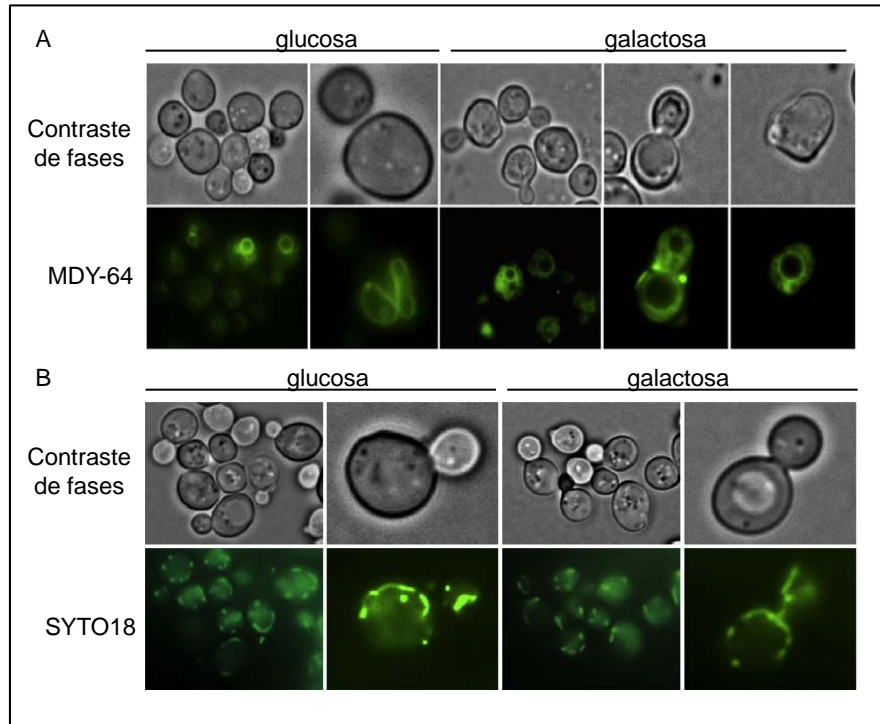


Figura 24. Cultivos de la cepa BY4741/pESC-URA_CASP10 mantenidos en un medio con glucosa o con galactosa fueron teñidos con A) MDY-64 (membrana vacuolar) o B) SYTO18 (mitocondria) y examinadas por microscopía de fluorescencia.

Con la finalidad de estudiar los fenotipos subcelulares asociados a la expresión heteróloga de la Caspasa-10 humana en *S. cerevisiae* de manera más exhaustiva se examinaron células de las cepas BY4741/pESC-URA y BY4741/pESC-URA_CASP10 mantenidas en un medio con galactosa durante 6 horas mediante microscopía electrónica de transmisión. Las imágenes revelaron que las células que expresan la Caspasa-10 presentan, en efecto, una alta vacuolización confirmando los resultados previos de microscopía de fluorescencia y también muestran una expansión en el lumen del retículo endoplásmico, un engrosamiento de la pared celular y una condensación de la cromatina (Figura 25).

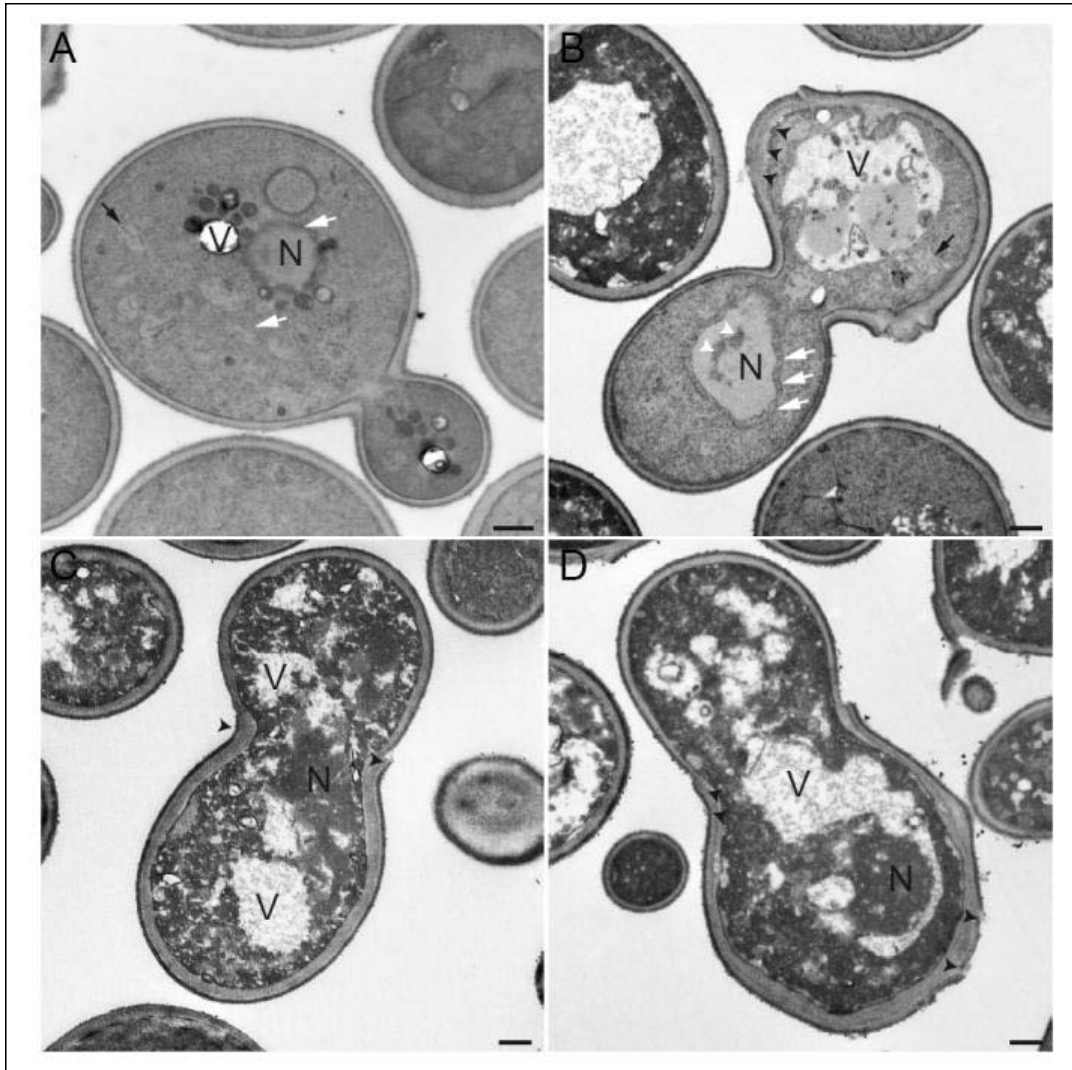


Figura 25. Microscopía electrónica de células de las cepas A) BY4741/pESC-URA y (B-D) BY4741/pESC-URA_CASP10. Los cultivos celulares fueron mantenidos durante 6h en un medio con galactosa y visualizados mediante microscopía electrónica. N, núcleo; V, vacuola. Las flechas blancas señalan el retículo endoplásmico; las flechas negras indican mitocondrias. Los triángulos blancos resaltan la condensación de la cromatina y los triángulos negros señalan perturbaciones en la pared celular. Barras: 500nm.

III.2. BÚSQUEDA SISTEMÁTICA DE CEPAS MUTANTES DE *S. CEREVISIAE* QUE MUESTRAN UNA ACTIVIDAD SUPRESORA DE LA TOXICIDAD INDUCIDA POR LA CASPASA-10 HUMANA

III.2.1. Escrutinio de genes que participan en el proceso de muerte celular inducido por la expresión de la Caspasa-10 humana en *S. cerevisiae*

Después de caracterizar el efecto citotóxico observado tras la expresión de la Caspasa-10 humana en *S. cerevisiae*, los siguientes objetivos que nos propusimos en este trabajo fueron la identificación de mutaciones supresoras de la toxicidad asociada a la Caspasa-10 y de nuevos mecanismos de regulación génica que controlan los procesos de muerte celular en *S. cerevisiae*. Para abordar estos objetivos se desarrolló un escrutinio genético de supresión de la toxicidad inducida por la expresión de la Caspasa-10 humana en *S. cerevisiae*.

Para llevar a cabo este escrutinio genético se empleó una colección de mutantes de delección de *S. cerevisiae* construida en el fondo genético BY4741 (EUROSCARF, <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/yeast.html>). Se utilizaron 10 *pools* o conjuntos de unas 450 cepas mutantes en los que cada cepa está representada en la misma proporción. El empleo de *pools* de mutantes para la realización de escrutinios genéticos de supresión tiene la ventaja de que se puede rastrear una colección completa de mutantes de delección de *S. cerevisiae* de forma rápida; sin embargo, presenta la desventaja de que el proceso no se satura y se pierde información relativa a cepas de crecimiento lento o de fenotipos intermedios.

El procedimiento experimental llevado a cabo consistió en transformar cada uno de los 10 *pools* de cepas con el plásmido pESC-URA_CASP10. Los transformantes obtenidos fueron seleccionados en un medio con glucosa, donde la expresión de la Caspasa-10 es reprimida, que se usó como control de la eficiencia de transformación, y en un medio con galactosa donde se induce la expresión de la Caspasa-10 (Figura 26). La mayor parte de los transformantes fueron incapaces de crecer en un medio con galactosa debido al efecto citotóxico de la Caspasa-10. Aquellos transformantes capaces de crecer en el medio con galactosa fueron aislados e identificados mediante la secuenciación de las etiquetas moleculares UPTAG y DOWNTAG. Para verificar los resultados obtenidos cada una de las cepas supresoras obtenidas en el escrutinio fue transformada de manera independiente con el plásmido pESC-URA_CASP10 para confirmar la capacidad de supresión de la toxicidad asociada a la expresión de la Caspasa-10.

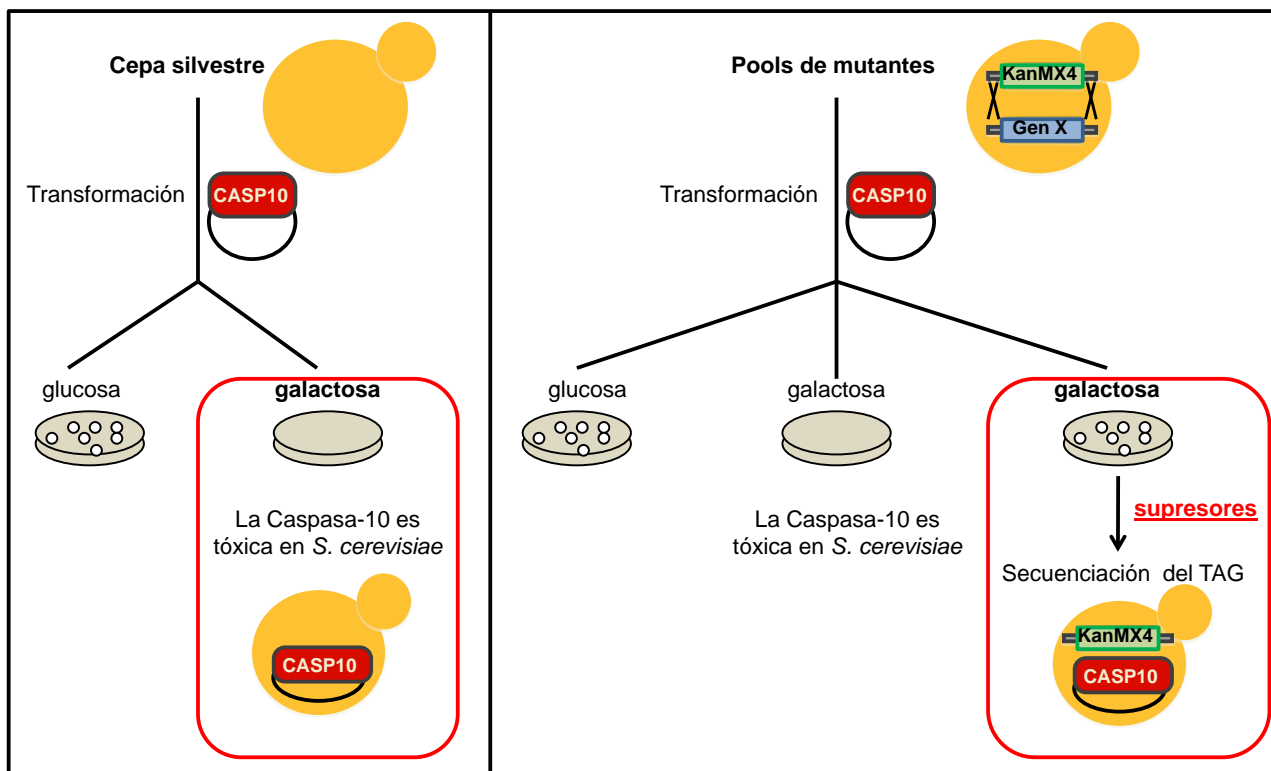


Figura 26. Estrategia experimental empleada en el escrutinio genético de búsqueda de cepas supresoras de la toxicidad inducida por la expresión de *CASP10* en *S. cerevisiae*. La ORF de la *CASP10* está clonada en un vector de expresión en levaduras bajo el control del promotor *GALI* (inducible en galactosa). Los mutantes supresores que son resistentes a la expresión de la Caspasa-10 se aíslan y se identifican mediante secuenciación de las etiquetas moleculares.

En este análisis se identificaron genes supresores pertenecientes a diferentes categorías funcionales: la familia de genes *FAR*, rutas de señalización de MAPK, genes codificantes de proteínas quinasa y fosfatasa y finalmente otros genes relacionados con procesos de autofagia y respuesta a estrés (Tabla 3). Debido a que este tipo de escrutinios no es saturante, puede haber cepas supresoras que no sean identificadas. Sin embargo, los resultados obtenidos en el escrutinio proporcionan una información muy valiosa acerca de los procesos celulares que están implicados en la letalidad asociada a la expresión del gen tóxico. Por lo tanto, con el objetivo de identificar otros genes esenciales en la toxicidad inducida por la expresión de la Caspasa-10 humana, también se analizaron de forma individual cepas mutantes que tenían deletionados genes pertenecientes a las categorías funcionales más representadas en los resultados del escrutinio de supresores. Todas las cepas supresoras identificadas finalmente y verificadas se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Cepas mutantes supresoras de la toxicidad asociada a la Caspasa-10 humana en *S. cerevisiae*.

<i>Categoría funcional</i>	<i>Gen supresor</i>	<i>Función</i>
Familia FAR	<i>FAR3</i>	Mantenimiento de la parada del ciclo celular en respuesta a la feromona.
	<i>FAR7</i>	Mantenimiento de la parada del ciclo celular en respuesta a la feromona.
	<i>FAR8</i>	Mantenimiento de la parada del ciclo celular en respuesta a la feromona.
	<i>FAR9</i>	Mantenimiento de la parada del ciclo celular en respuesta a la feromona.
	<i>FAR10</i>	Mantenimiento de la parada del ciclo celular en respuesta a la feromona.
	<i>FAR11</i>	Mantenimiento de la parada del ciclo celular en respuesta a la feromona.
Rutas MAPKs	<i>GPA1</i>	Subunidad alpha de la proteína G heterotrimérica. Se une a receptores de feromona.
	<i>STE20</i>	Proteína quinasa de la familia PAK, interviene en distintas rutas MAPKs.
	<i>STE11</i>	MAPKKK implicada en la ruta de respuesta a la feromona y crecimiento invasivo.
	<i>STE7</i>	MAPKK implicada en la ruta de respuesta a la feromona y crecimiento invasivo.
	<i>FUS3</i>	MAPK implicada en la conjugación.
	<i>KSS1</i>	MAPK implicada en la ruta de respuesta a la feromona y crecimiento invasivo.
	<i>SLT2</i>	MAPK implicada en el control del mantenimiento de la pared celular.
Fosfatasas y Quinasas	<i>PPH21</i>	Subunidad catalítica de la PP2A, implicado en la regulación de mitosis.
	<i>PPH22</i>	Subunidad catalítica de la PP2A, implicado en la regulación de mitosis.
	<i>PPH3</i>	Subunidad catalítica de un complejo fosfatasa conservado Psy2-Psy4.
	<i>PTC2</i>	Proteína fosfatasa de tipo 2 C, participa en la inactivación del checkpoint de fase-S.
	<i>PTC3</i>	Proteína fosfatasa de tipo 2 C, participa en la inactivación del checkpoint de fase-S.
	<i>TPK1</i>	Subunidad catalítica de PKA, participa en la ruta de señalización Ras/PKA/AMPC.
	<i>TPK2</i>	Subunidad catalítica de PKA, participa en la ruta de señalización Ras/PKA/AMPC.
<i>TPK3</i>	Subunidad catalítica de PKA, participa en la ruta de señalización Ras/PKA/AMPC.	
Autofagia, estrés y otros	<i>ATG1</i>	Ser/Thr protein necesaria para la formación de vesículas durante autofagia y ruta cvt.
	<i>ATG4</i>	Cisteín proteasa implicada en el proceso de autofagia.
	<i>ATG6</i>	Ortóloga de la Beclina-1 en humanos. Forma parte del complejo PtdIns-3-quinasa.
	<i>ATG8</i>	Componente del autofagosoma y vesículas cvt. Participa en la expansión del fagóforo.
	<i>ATG13</i>	Subunidad reguladora del complejo formado junto con Atg1. Necesaria en autofagia.
	<i>PMH1</i>	Implicada en la biosíntesis de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI).
	<i>SSM4</i>	Implicada en la degradación de proteínas asociadas al retículo endoplásmico.
	<i>ITT1</i>	Proteína que modula la eficiencia del proceso de terminación transduccional.
	<i>NTH1</i>	Trehalasa, degrada trehalosa y es necesaria para la termotolerancia.
	<i>LDB18</i>	Componente del complejo de dinactina, necesario para la actividad dineína.
	<i>WHI3</i>	Proteína de unión a ARN que secuestra ARNm de CLN3.
	<i>RPL21B</i>	Componente proteico de la subunidad grande (60S) del ribosoma.
	<i>MDM30</i>	Proteína F-box, asociada a la mitocondria y tiene un papel en la fusión mitocondrial.
	<i>BFR1</i>	Componente de complejos RNPm , implicados en la segregación nuclear.
	<i>ORT1</i>	Transportador de ornitina de la membrana mitocondrial interna.
<i>CWP1</i>	Proteína de la pared celular.	

Tabla 3. Continuación

<i>MBR1</i>	Proteína implicada en funciones mitocondriales y respuesta a estrés.
<i>AIM9</i>	Proteína implicada en la función y organización de la mitocondria.
<i>CUP9</i>	Represor transcripcional de <i>PTR2</i> , codifica para un transportador de péptidos.
<i>GLN3</i>	Factor de transcripción activador de genes en respuesta a estrés nutricional.
<i>MSN2</i>	Factor de transcripción activado en condiciones de estrés.
<i>ASG1</i>	Regulador transcripcional implicado en respuesta a estrés.
<i>PMT5</i>	Proteína O-Manosiltransferasa, transfiere residuos de manosa.

III.3. CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LOS PROCESOS DE MUERTE CELULAR EN *S. CEREVISIAE*

III.3.1. Los genes *FAR* son esenciales en la toxicidad inducida por la expresión de la Caspasa-10 humana en levadura

La familia de genes *FAR* participa en el mantenimiento de la parada del ciclo celular en fase G1 desencadenada tras la activación de la ruta MAPK de respuesta a la feromona (Kemp, H. A. y Sprague, G. F., Jr. 2003). En este proceso los genes *FAR* actúan a través de dos vías: una vía dependiente de *FAR1* y la otra vía independiente de *FAR1* en la que participan el resto de miembros de la familia *FAR* (*FAR3*, *FAR7*, *FAR8*, *FAR9*, *FAR10* y *FAR11*) (Horecka, J. y Sprague, G. F., Jr. 1996). Far1 es un inhibidor del complejo Cdc28/Cln encargado directamente de la parada del ciclo celular en fase G1, mientras que Far3, Far7, Far8, Far9, Far10 y Far11 forman parte de un complejo multiproteico implicado en el mantenimiento de la parada del ciclo celular (Kemp, H. A. y Sprague, G. F., Jr. 2003).

Los resultados obtenidos en el escrutinio de supresión y el posterior análisis de cepas individuales mostraron que todos los genes pertenecientes a la familia *FAR*, excepto *FAR1*, son indispensables en el proceso de muerte celular inducido tras la expresión de la Caspasa-10 en *S. cerevisiae* (Figura 29), lo que sugiere que esta familia de genes podría presentar funciones no descritas hasta el momento. Además, el gen *FAR11* tiene dos homólogos en humanos, *FAM40A* y *FAM40B* (también llamados *STRIP-1* y *STRIP-2*) que forman parte de un complejo multiproteico denominado STRIPAK con actividad quinasa-fosfatasa cuyas funciones específicas no han sido determinadas con exactitud (Goudreault, M. *et al.* 2009). Por lo tanto, nos decidimos a caracterizar con mayor detalle la implicación de Far11 en los procesos de muerte celular inducida por la expresión de la Caspasa-10 humana en *S. cerevisiae*.

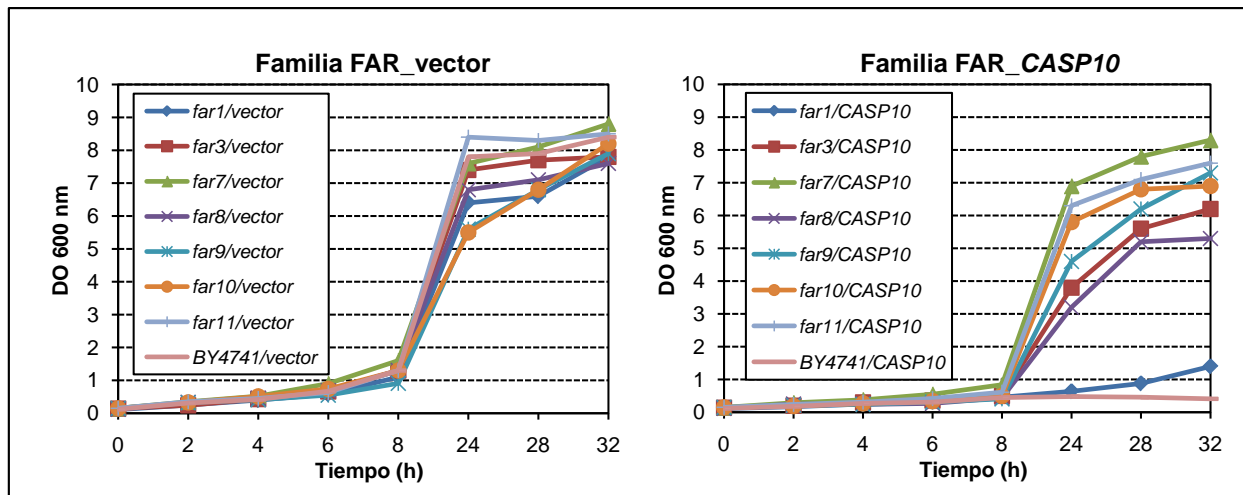


Figura 27. Toxicidad de la Caspasa-10 humana en las cepas mutantes de la familia FAR. Cultivos celulares de cada una de las cepas fueron crecidos en un medio con galactosa para inducir la expresión de CASP10. Como controles de crecimiento se emplearon las cepas mutantes transformadas con el vector pESC-URA vacío.

III.3.2. Localización subcelular de las proteínas de la familia Far

La proteína Far1 es fosforilada por la MAPK Fus3 y se localiza en el núcleo tras la activación de la ruta de respuesta a la feromona (Chang, F. y Herskowitz, I. 1990). Sin embargo, no se ha descrito de forma precisa la localización subcelular del resto de las proteínas de la familia Far, aunque se sugiere que su localización podría estar asociada a endomembranas puesto que Far9, Far10 y Far11 presentan secuencias típicas de dominios transmembrana (Kemp, H. A. y Sprague, G. F., Jr. 2003). Debido a que nuestro interés se centra en Far11, nos propusimos determinar la localización subcelular precisa de la proteína Far11 y además, de las proteínas Far3, Far7 y Far9, ya que se han descrito interacciones físicas mutuas entre estas proteínas y Far11. Para llevar a cabo este análisis se construyeron varias cepas diploides (en el fondo genético BY4743) de *S. cerevisiae* que expresan proteínas de fusión a RFP (proteína roja fluorescente), cuya localización es conocida, y las diferentes proteínas Far fusionadas con las proteínas fluorescentes YeVenus, CFP o GFP (Tabla 4). Los cultivos celulares de cada una de las cepas fueron crecidos en un medio rico hasta alcanzar la fase logarítmica, momento en el que se recogieron alícuotas para visualizar las células mediante microscopía de fluorescencia. Los ensayos de colocalización de las proteínas de fusión establecieron la localización de Far3-CFP en la región interna del aparato de Golgi por su colocalización con Cop1-RFP, Far7-GFP y Far11-YeVenus se localizaron en la región externa del aparato de Golgi, ya que colocalizaron con Chc1-RFP; y Far9-CFP presentó la misma localización que Sec13-RFP que es una proteína propia de la membrana del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi (Figura 28). Por lo tanto, todas las proteínas Far analizadas se localizan en los orgánulos membranosos retículo

endoplásmico o aparato de Golgi, indicando que estas proteínas podrían estar participando en la ruta de secreción o en procesos relacionados con el transporte de vesículas.

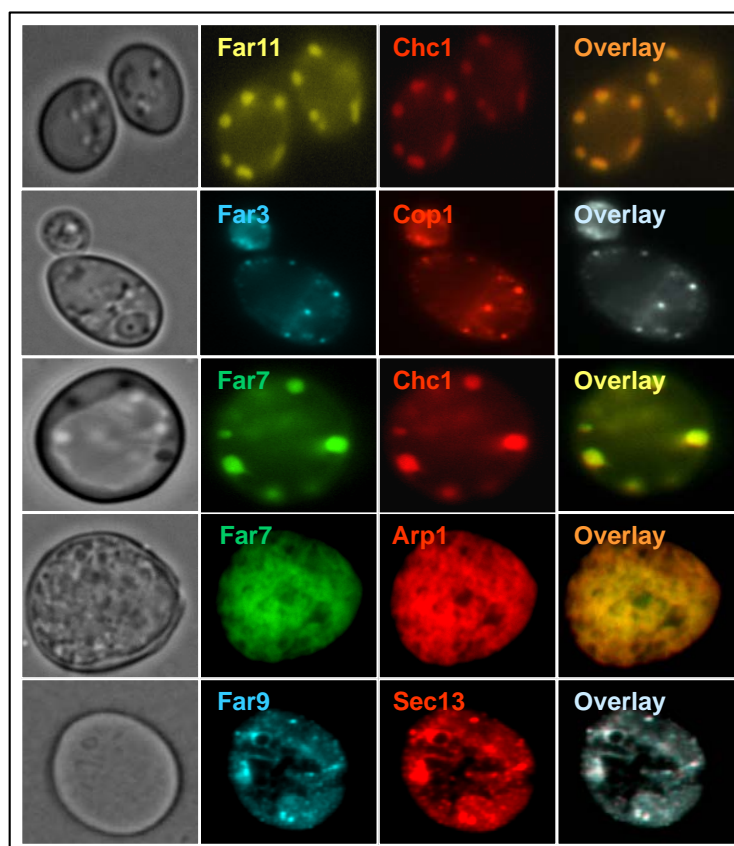


Figura 28. Localización subcelular de las proteínas Far3-CFP, Far7-GFP, Far9-CFP y Far11-YeVenus. Se emplearon los marcadores de localización Chc1-RFP (región externa del aparato de Golgi), Cop1-RFP (región interna del aparato de Golgi), Arp1-RFP (aparato de Golgi) y Sec13-RFP (membranas del retículo endoplásmico y aparato de Golgi).

Puesto que el interés principal de este estudio se centra en la proteína Far11, nos propusimos comprobar si existe la misma localización subcelular entre los miembros de las parejas de proteínas Far11-Far3 y Far11-Far9 mediante ensayos de colocalización, ya que se habían descrito interacciones físicas de Far11 con Far3 y con Far9 (Kemp, H. A. y Sprague, G. F., Jr. 2003). Para llevar a cabo este estudio se crearon cepas diploides con las parejas de proteínas Far11-Far3 y Far11-Far9 fusionadas a diferentes proteínas fluorescentes. Las células de estas cepas fueron crecidas en medio rico hasta alcanzar la fase logarítmica y fueron visualizadas mediante microscopía de fluorescencia. Este ensayo determinó la existencia de una colocalización parcial entre las proteínas Far11- Far3 y Far11- Far9 (Figura 29).

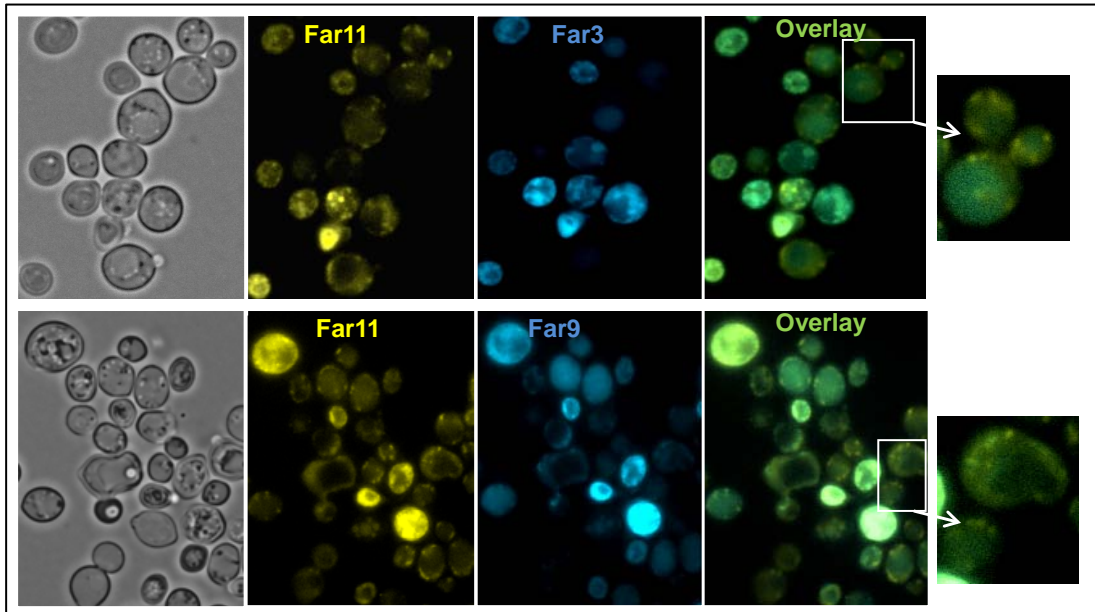


Figura 29. Ensayos de colocalización entre Far11-Far3 y Far11-Far9. Se emplearon cepas diploides que presentan la proteína Far11 fusionada a la proteína amarilla fluorescente (YeVenus) y Far3 o Far9 marcadas con la proteína azul fluorescente (CFP).

Muchas proteínas sufren cambios en su localización tras recibir diferentes tipos de estímulos. Por ejemplo Aif1, proteína localizada en la membrana mitocondrial, migra al núcleo después de recibir el estímulo apoptótico (Wissing, S. *et al.* 2004). Con el objetivo de determinar si la expresión de la Caspasa-10 promueve la relocalización de las proteínas de la familia Far se realizaron ensayos de colocalización antes y después de inducir la expresión de la Caspasa-10. Para llevar a cabo este análisis las cepas empleadas anteriormente fueron transformadas con el plásmido pESC-URA_CASP10. Estas células fueron crecidas en un medio con glucosa hasta alcanzar la fase logarítmica y después fueron transferidas a un medio con galactosa para inducir la expresión de la Caspasa-10. Se recogieron muestras a las 6h tras el cambio de fuente de carbono y se visualizaron al microscopio de fluorescencia. Se utilizaron como controles negativos las correspondientes cepas diploides que portan el plásmido pESC-URA vacío. De todas las cepas analizadas sólo se observaron diferencias en la cepa que porta la fusión Far9-CFP que, tras la expresión de la Caspasa-10, mostró un cambio de localización desde el RE-Golgi a la vacuola, como demuestra la falta de colocalización con el marcador Sec13-RFP con el que colocalizaba perfectamente en ausencia de expresión de CASP10 (Figura 30).

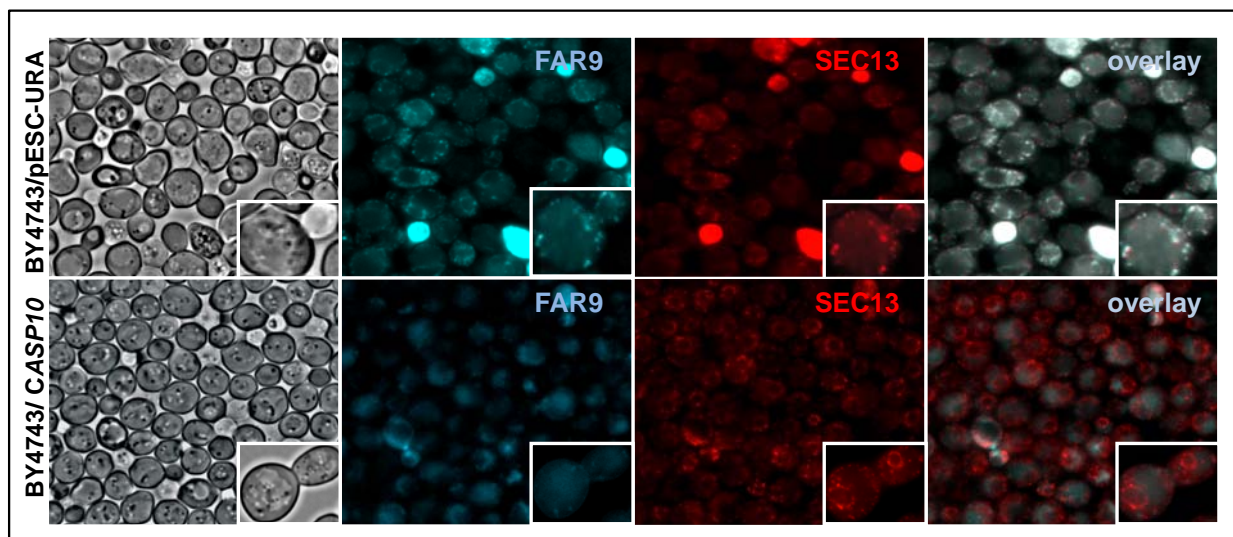


Figura 30. Relocalización de la proteína Far9-CFP tras la expresión de la Caspasa-10. Se emplearon cepas diploides BY4743 que expresan la proteína Far9-CFP y el marcador de localización Sec13-RFP transformadas con el plásmido pESC-URA_CASP10 o con el plásmido pESC-URA vacío que sirvió como control negativo.

III.3.3. *FAR11* participa en el proceso de muerte celular inducido tras la expresión de la Caspasa-10 en *S. cerevisiae*

En el escrutinio descrito previamente se determinó que la cepa $\Delta far11$ suprime el efecto citotóxico causado por la expresión de la Caspasa-10 en *S. cerevisiae*. Como se ha mencionado anteriormente, el hecho de que el gen *FAR11* presente dos ortólogos en humanos de función desconocida nos condujo a centrar nuestro trabajo en la caracterización de los fenotipos asociados a este gen con el objetivo de identificar nuevas funciones de Far11.

Con el propósito de verificar si el gen *FAR11* es esencial en el proceso de muerte celular inducido tras la expresión de la Caspasa-10 se realizaron ensayos de complementación génica. Para llevar a cabo este estudio se transformó la cepa $\Delta far11$ con un plásmido centromérico YcpLac111 que tiene clonado el gen *FAR11* con su promotor nativo en los sitios de restricción *BamHI-KpnI*. El crecimiento celular de las cepas BY4741/CASP10, $\Delta far11$ /CASP10 y $\Delta far11$ /CASP10/*FAR11* fue analizado en medio sólido y líquido (Figura 31A-B). El experimento se realizó en un medio con glucosa y en un medio con galactosa donde se induce la expresión de *CASP10*. El resultado mostró que la expresión del gen *FAR11* en la cepa $\Delta far11$ rescata el efecto citotóxico observado tras la expresión de la Caspasa-10 en la cepa silvestre; es decir, la cepa $\Delta far11$ /CASP10/*FAR11* muestra el mismo fenotipo que la cepa BY4741/CASP10. Por lo tanto,

estos ensayos confirman que el gen *FAR11* es esencial en el proceso de muerte celular inducido por la expresión de la Caspasa-10 humana en *S. cerevisiae*.

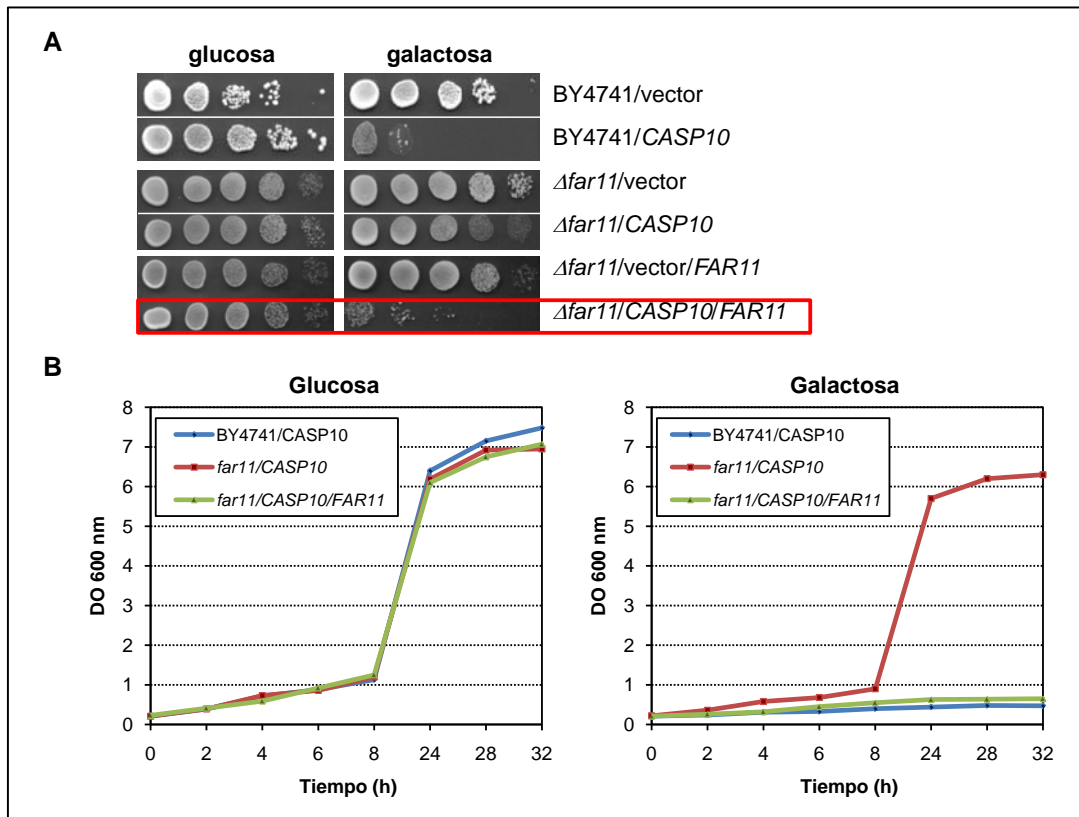


Figura 31. *FAR11* es esencial en el proceso de muerte celular inducido por la expresión de *CASP10*. A) Diluciones seriadas y B) Curvas de crecimiento de las cepas BY4741/*CASP10*, $\Delta far11$ /*CASP10* y $\Delta far11$ /*CASP10*/*FAR11* en un medio con glucosa y con galactosa. Se utilizó como control negativo la cepa BY4741/*CASP10* y como control positivo la cepa $\Delta far11$ /*CASP10*.

III.3.4. La delección del gen *FAR11* suprime todos los fenotipos citotóxicos observados tras la expresión de la Caspasa-10 en *S. cerevisiae*

La expresión de la Caspasa-10 en *S. cerevisiae* induce un proceso de muerte celular asociada a fenotipos característicos de apoptosis y autofagia (Lisa-Santamaria, P. *et al.* 2009). Con el objetivo de investigar si tales fenotipos aparecen en los mutantes $\Delta far11$ se estudió la viabilidad celular, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación del checkpoint de fase-S tras la expresión de la Caspasa-10 en las cepas $\Delta far11$ /*CASP10* y $\Delta far11$ /*CASP10*/*FAR11*.

El análisis de la viabilidad celular y los niveles de estrés oxidativo se realizaron en cultivos mantenidos durante 6 horas en un medio con galactosa. Se recogieron alícuotas de cada cultivo y las células fueron teñidas con el tinte vital FUN-1 o con el compuesto fluorescente H₂DCF-DA y examinadas al microscopio de fluorescencia. En la cepa $\Delta far11$ /*CASP10* se observó que las

células son metabólicamente activas debido a la aparición de las estructuras rojas intravacuolares tras la tinción con FUN-1 (Figura 34A). Además, tras la tinción con H₂DCF-DA no se observó la fluorescencia producida por la presencia de radicales peróxido (Figura 32B). Sin embargo, la expresión del gen *FAR11* en la cepa *Δfar11/CASP10* rescata los fenotipos citotóxicos observados tras la expresión de la Caspasa-10 en la cepa silvestre; es decir, las células muestran altos niveles de estrés oxidativo y no son metabólicamente activas (células muertas) (Figura 32A-B).

Para analizar la actividad del checkpoint de fase-S en los mutantes *far11* se determinó el contenido de ADN mediante de citometría de flujo en células de las cepas BY4741/*CASP10*, *Δfar11/CASP10* y *Δfar11/CASP10/FAR11* tras el tratamiento con hidroxurea. En este caso los cultivos celulares se mantuvieron durante 4 horas en medio con galactosa para inducir la expresión de *CASP10*. Tras ese periodo de tiempo las células fueron tratadas con el agente genotóxico hidroxurea 0,2M durante 2 horas. Se recogieron alícuotas de los cultivos, se tiñeron con ioduro de propidio y se analizaron mediante citometría de flujo. Las células de la cepa *Δfar11/CASP10* mostraron un contenido haploide (N) de ADN, indicativo de una parada del ciclo celular en fase-S (Figura 32C). Por el contrario, cuando se expresa el gen *FAR11* en la cepa *Δfar11/CASP10* se recupera de nuevo el fenotipo observado tras la expresión de *CASP10* en la cepa silvestre, ya que estas células son capaces de duplicar su material genético (2N) incluso en presencia de hidroxurea y, por tanto, no sufren parada del ciclo celular en fase-S en respuesta al daño genotóxico. Estos resultados confirman que el gen *FAR11* está implicado en el proceso de muerte celular inducido por la expresión de la Caspasa-10 humana en *S. cerevisiae* y que *FAR11* puede participar en la regulación del checkpoint de fase-S en respuesta al daño en el ADN.

La proteína Rad53 es una quinasa esencial para la activación de los checkpoints del ciclo celular y cuyo estado de fosforilación determina su actividad (Alvino, G. M. *et al.* 2007). En los cultivos celulares tratados con el agente genotóxico hidroxurea la proteína Rad53 se activa mediante fosforilación y se produce la parada del ciclo celular en fase-S (Ma, J. L. *et al.* 2006; Heideker, J. *et al.* 2007). Con el propósito de determinar si la pérdida de respuesta al tratamiento con hidroxurea en la cepa BY4741/*CASP10* es debido a alteraciones del estado de fosforilación de la proteína Rad53 se analizó su nivel de fosforilación mediante western-blot usando un anticuerpo específico de Rad53. En la cepa BY4741/*CASP10* mantenida en medio con galactosa la proteína Rad53 permanece anormalmente desfosforilada y, por tanto, el checkpoint de fase-S se mantiene inactivo y las células pueden completar la replicación del ADN sin responder al tratamiento con hidroxurea, confirmando el resultado obtenido en los análisis previos. Sin

embargo, en la cepa *Δfar11/CASP10* mantenida en un medio con galactosa la proteína Rad53 es eficientemente fosforilada tras el tratamiento con hidroxiiurea provocando la parada del ciclo celular (Figura 32D). Por lo tanto, el gen *FAR11* está implicado en la función del checkpoint de fase-S del ciclo celular participando en la regulación del estado de fosforilación de la proteína Rad53.

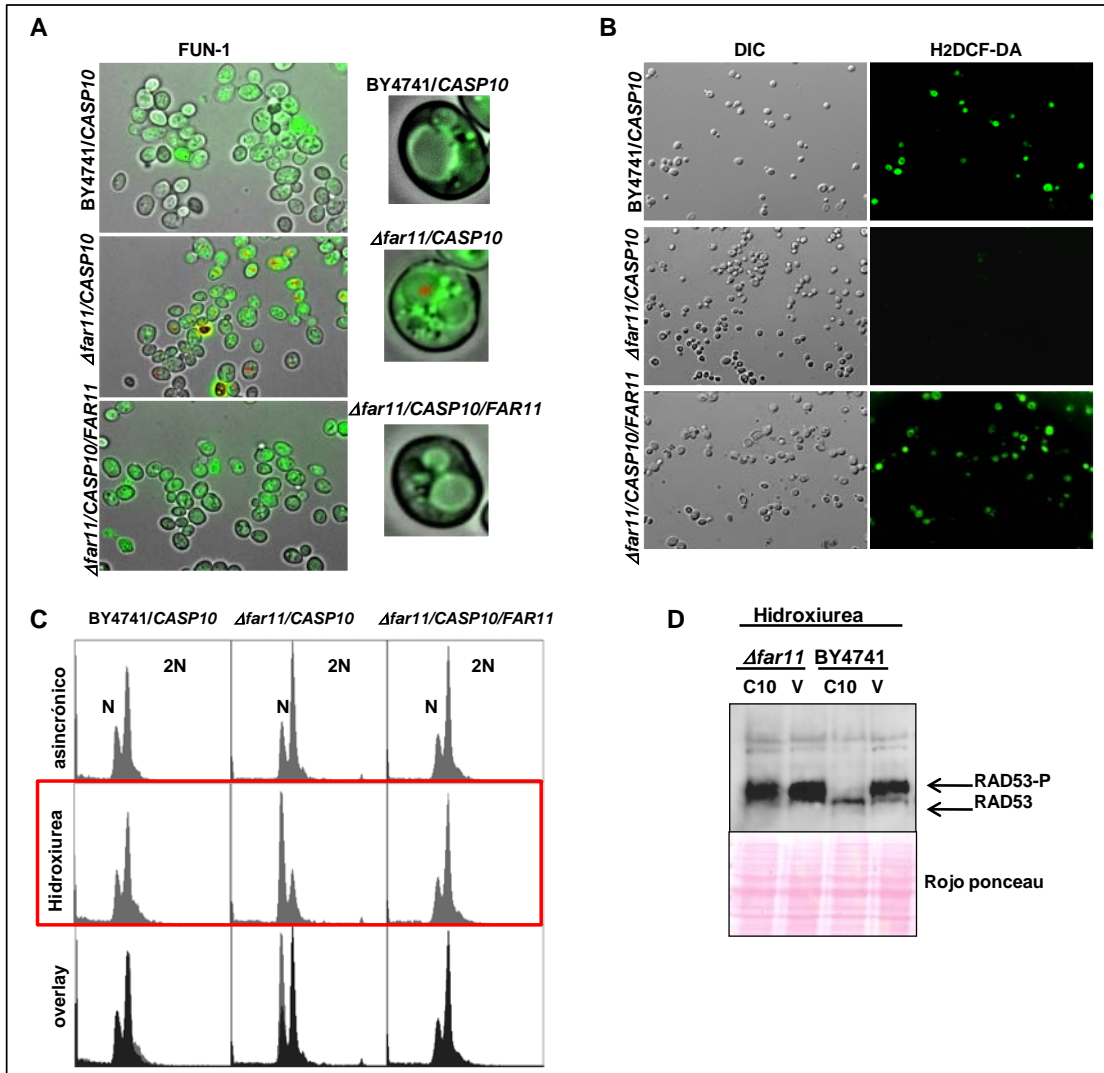


Figura 32. La cepa *Δfar11* suprime los efectos citotóxicos asociados a la expresión de la Caspasa-10. A) Tinción con FUN-1 de las cepas BY4741/*CASP10*, *Δfar11*/*CASP10* y *Δfar11*/*CASP10*/*FAR11*. Las células metabólicamente activas presentan unas estructuras rojas intravacuolares. B) Tinción con H₂DCF-DA de las cepas anteriores. La intensidad de fluorescencia que presentan las células es proporcional a los niveles de estrés oxidativo. C) Perfiles del contenido de ADN tras el tratamiento con hidroxiiurea. Los picos del gráfico representan el contenido de ADN haploide (N) o diploide (2N). D) Western Blot de extractos totales de las cepas BY4741 y *Δfar11* portadoras del vector pESC-URA (V) o el plásmido pESC-URA_*CASP10* (C10) crecidas en galactosa y tratadas con hidroxiiurea. Se empleó un anticuerpo anti-Rad53 (Santa Cruz Biotech.). La tinción de la membrana con rojo ponceau se emplea como control de carga.

III.3.5. La fosforilación de Far11 en el residuo de serina-18 es esencial para su función

La inducción de la ruta MAPK en respuesta a la feromona activa una cascada de transducción de señales que conduce a la fosforilación de diferentes sustratos y entre ellos se encuentra el residuo serina-18 de Far11 (Li, X. *et al.* 2007). En otro trabajo reciente, la serina-81 de Far11 fue también identificada como un sitio de fosforilación de las proteínas Mec1/Tell1 implicadas en el checkpoint de fase-S (Smolka, M. B. *et al.* 2007).

Para determinar si los residuos de serina-18 y serina-81 de la proteína Far11, que han sido descritos como sitios de fosforilación, son esenciales en el efecto citotóxico desencadenado tras la expresión de la Caspasa-10 se diseñaron dos alelos mutantes de *far11* portadores de sustituciones en los codones que codifican los residuos 18 y 81 de la proteína Far11. El residuo Ser18 fue sustituido por un residuo de alanina mediante mutagénesis dirigida empleando oligonucleótidos mutagénicos (Tabla 6). En cambio, la sustitución del residuo Ser81 por un residuo de alanina no pudo realizarse empleando el método anterior y se encargó su síntesis a la empresa GenScript (USA). La presencia de las sustituciones en los alelos mutantes fue verificada mediante su secuenciación completa. Los alelos mutantes *far11-S18A* y *far11-S81A* fueron clonados en el vector de expresión en levaduras YcpLac111 bajo el control del promotor endógeno de *FAR11*. Los plásmidos se emplearon para transformar las cepas $\Delta far11/pESC-URA$ y $\Delta far11/pESC-URA_CASP10$ y se analizó el crecimiento de las cepas transformantes en medio sólido y medio líquido. El resultado que se observó fue que la expresión de la Caspasa-10 en la cepa mutante que expresa el alelo *far11-S81A* resulta letal para la célula, al igual que ocurre en la cepa silvestre. Por lo tanto, el residuo Ser81 parece que no es esencial para desencadenar el proceso de muerte celular inducido por la expresión de la Caspasa-10 (Figura 33A-B). Sin embargo, la expresión de la isoforma Far11-S18A suprime claramente el efecto citotóxico de la Caspasa-10 indicando que el residuo de Ser18 de Far11 es esencial en el proceso de muerte celular inducido por la expresión de la Caspasa-10 (Figura 33A-B).

A continuación nos propusimos comprobar si alguno de estos residuos de Far11 (Ser18 o Ser81) participa en la función asociada a Far11 de regulación del checkpoint de fase-S. Con este objetivo se examinó mediante western-blot el estado de fosforilación de Rad53 en respuesta a la expresión de la Caspasa-10 y al tratamiento con hidroxurea en las cepas que expresan las isoformas mutantes Far11-S18A y Far11-S81A. Los cultivos celulares de estas cepas fueron mantenidos en un medio selectivo con galactosa como fuente de carbono para inducir la expresión de *CASP10* durante 4 horas. Después, las células fueron tratadas con hidroxurea

durante 2 horas y se recogieron alícuotas de los cultivos para su análisis mediante western-blot empleando un anticuerpo específico de Rad53. Los resultados obtenidos mostraron que la proteína Rad53 permanece defosforilada en la cepa que expresa la isoforma mutante Far11-S81A, como ocurre en la cepa silvestre. Sin embargo, la cepa que expresa la isoforma mutante Far11-S18A presenta la proteína Rad53 fosforilada, al igual que sucede en la cepa $\Delta far11$ /pESC-URA_CASP10 (Figura 33C). Por tanto, este ensayo indica que el residuo Ser18 de Far11 es necesario para la defosforilación de la proteína Rad53, mientras que el residuo Ser81 no influye, aparentemente, en los niveles de fosforilación de esta proteína en las condiciones ensayadas.

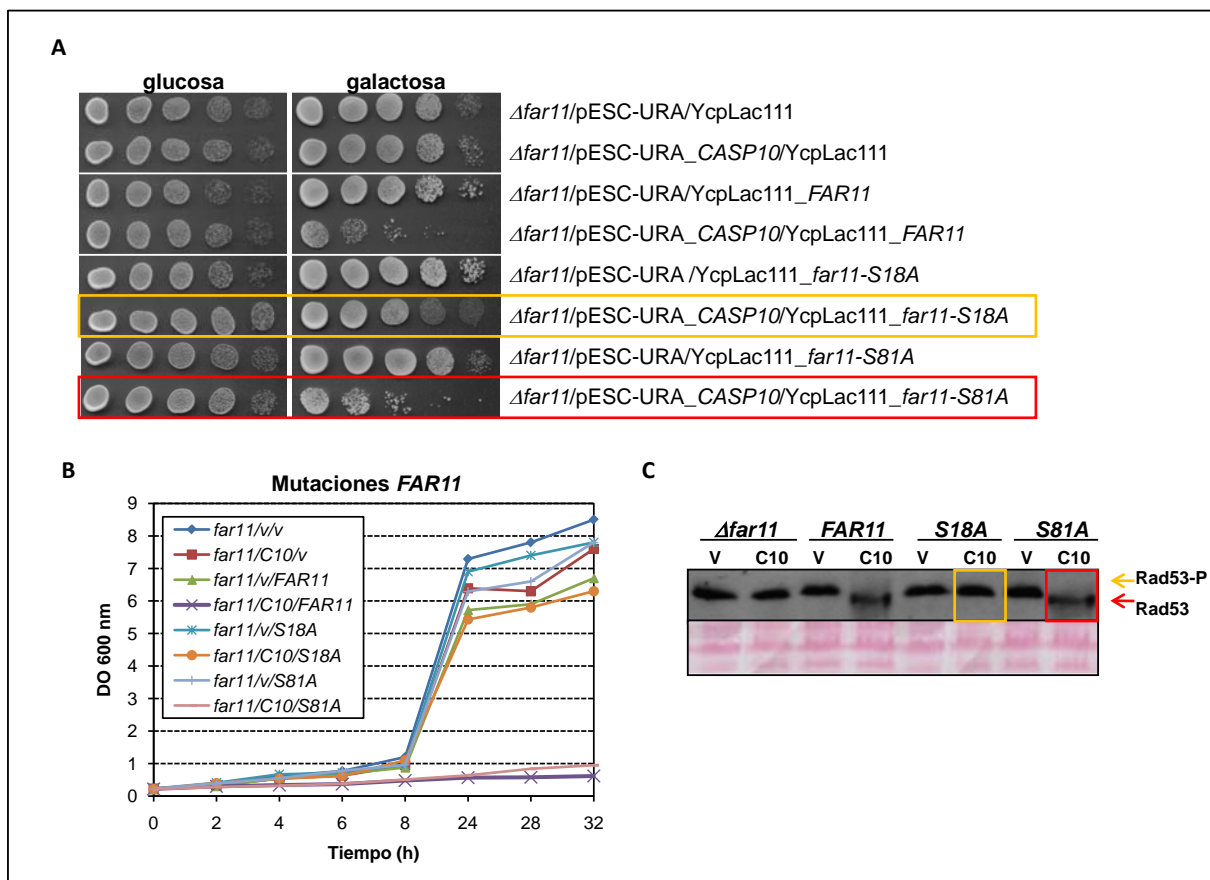


Figura 33. Mutaciones de FAR11 en los residuos de serina-18 y serina-81. A) Diluciones seriadas de las cepas $\Delta far11$ /pESC-URA y $\Delta far11$ /pESC-URA_CASP10 transformadas con los plásmidos de expresión de FAR11 y de los alelos mutantes FAR11-S18A y FAR11-S81A. El ensayo de crecimiento se llevó a cabo en un medio selectivo con glucosa o con galactosa. B) Curvas de crecimiento de las cepas anteriores. Los cultivos fueron crecidos en un medio con galactosa para inducir la expresión de CASP10. C) Análisis western-blot de la proteína Rad53 en las cepas $\Delta far11$, $\Delta far11$ /FAR11, $\Delta far11$ /far11-S18A y $\Delta far11$ /far11-S81A portadoras del vector pESC-URA (V) o el plásmido pESC-URA_CASP10 (C10) crecidas en galactosa y tratadas con hidroxurea. La tinción de la membrana con rojo ponceau se emplea como control de carga.

III.3.6. La expresión de la Caspasa-10 promueve la activación de rutas MAPK

En *S. cerevisiae* existe una amplia variedad de rutas de señalización en respuesta a diferentes tipos de estímulos (Chen, R. E. y Thorner, J. 2007). Muchas de estas rutas de señalización convergen en la activación de las proteínas MAPK, encargadas de fosforilar otros sustratos pertenecientes a diferentes vías de transducción de señales (Elion, E. A. *et al.* 1993; Cook, J. G. *et al.* 1996; Tedford, K. *et al.* 1997). La activación de la ruta MAPK en respuesta a la feromona conduce a la fosforilación, y por tanto, activación de Kss1 y Fus3, promoviendo la translocación de Fus3 al núcleo donde activa el factor de transcripción Ste12 que promueve la expresión de genes específicos de la conjugación como *FUS1* (Hagen, D. C. *et al.* 1991).

En nuestro escrutinio fenotípico se identificaron cepas supresoras de la toxicidad inducida por la Caspasa-10 que tenían deletionados genes implicados en rutas MAPK. Por lo tanto, se investigó la activación del módulo MAPK en respuesta a la expresión de la Caspasa-10 mediante el análisis del estado de fosforilación de las proteínas Fus3, Kss1 y Slt2 por western-blot empleando el anticuerpo p44/42 (Cell Signalling) que detecta únicamente la forma fosforilada de estas proteínas. El ensayo se realizó en las cepas BY4741/pESC-URA y BY4741/pESC-URA_*CASP10* y se emplearon como controles negativos específicos de cada proteína las cepas $\Delta fus3$, $\Delta kss1$ y $\Delta slt2$ transformadas con el plásmido pESC-URA_*CASP10* o con el vector pESC-URA vacío. La expresión de la Caspasa-10 en la cepa silvestre causa una clara fosforilación de las proteínas Fus3, Kss1 y Slt2 (Figura 36A), y por tanto, conduce a la activación de las rutas de señalización en respuesta a la feromona y de estrés de pared celular.

El análisis de la activación de rutas MAPK en respuesta a la expresión de la Caspasa-10 en *S. cerevisiae* se complementó con un ensayo de localización de la proteína de fusión Fus3-GFP. La localización de esta proteína se examinó mediante microscopía de fluorescencia y se comprobó que a partir de las 6h de la expresión de la Caspasa-10 se produce una relocalización de la proteína Fus3-GFP en el núcleo, mientras que en la cepa en la que no se expresa la Caspasa-10 Fus3-GFP permanece dispersa en el citosol (Figura 34B). Además, para confirmar la activación de los sustratos de Fus3 en respuesta a la expresión de la Caspasa-10, también se analizaron los niveles de expresión del gen *FUS1* en las cepas BY4741/pESC-URA y BY4741/pESC-URA_*CASP10* mediante qRT-PCR. Como se muestra en la Figura 34C existe una clara correlación entre la expresión de *CASP10* y de *FUS1* siendo ésta máxima a las 6h de inducción de la expresión de la Caspasa-10, momento en el que se produce un aumento de unas 3 veces en los niveles de expresión del gen *FUS1*. Todos estos resultados demuestran que la

expresión de la Caspasa-10 en *S. cerevisiae* promueve la activación de rutas de señalización MAPK y, en concreto, de las rutas de respuesta a la feromona y de estrés de pared celular.

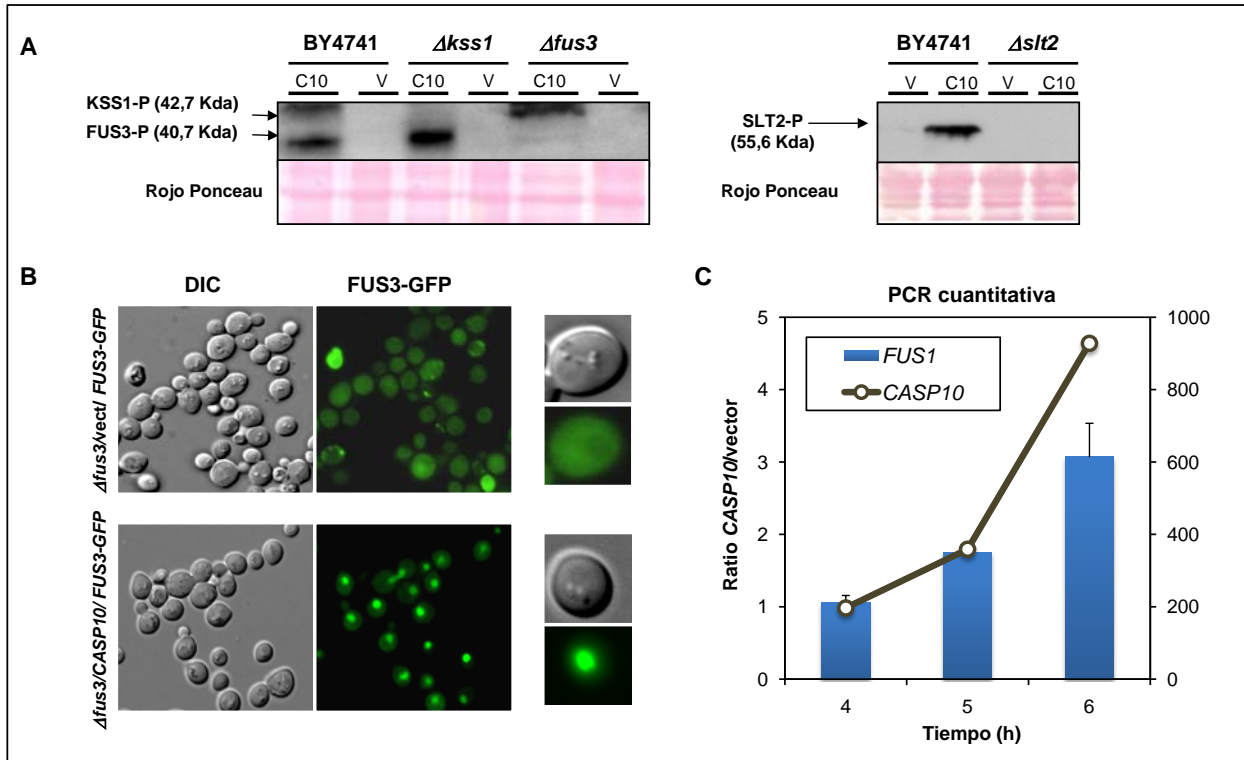


Figura 34. La expresión de la Caspasa-10 provoca activación de las rutas MAPK. A) Western-blot de extractos totales de las cepas BY4741, $\Delta fus3$, $\Delta kss1$ y $\Delta slt2$ transformadas con el plásmido de expresión de *CASP10* (C10) o con el plásmido vacío (V) mantenidas durante 6h en un medio con galactosa. Se empleó el anticuerpo p44/42 (Cell Signalling). La tinción de la membrana con rojo ponceau fue utilizada como control de carga. B) Localización subcelular de FUS3-GFP en cepas transformadas con el plásmido pESC-URA_ *CASP10* o con el vector pESC-URA vacío. C) PCR cuantitativa de la expresión de *FUS1* y *CASP10* a lo largo del tiempo en un medio con galactosa. Los valores representan la expresión relativa de *FUS1* (escala derecha) y *CASP10* (escala izquierda) en la cepa BY4741/pESC-URA_ *CASP10* con respecto a la cepa BY4741/pESC-URA. Las barras de error indican la desviación típica.

III.3.7. La proteína Far11 participa en el proceso de muerte celular por autofagia

La autofagia es un proceso catabólico que conduce finalmente a la degradación de los componentes celulares mediante un complejo mecanismo molecular desencadenado por la asociación de las proteínas Atg1-Atg13 (Kamada, Y. *et al.* 2000). La interacción entre Atg1 y Atg13 depende de la hipofosforilación de estas proteínas, proceso que tiene lugar en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes en el medio o tras el tratamiento de las células con rapamicina y que conduce finalmente a la muerte celular por autofagia si el estímulo persiste en el tiempo. Nuestros resultados previos mostraron que la expresión de la Caspasa-10 en *S. cerevisiae* induce una alta vacuolización que es consistente con la activación de un proceso de

autofagia (Lisa-Santamaria, P. *et al.* 2009). Además, los resultados del escrutinio fenotípico revelaron que la delección de varios genes de la maquinaria autofágica (*ATG1*, *ATG4*, *ATG6*, *ATG8* y *ATG13*) suprime la letalidad asociada a la expresión de la Caspasa-10 en *S. cerevisiae*. Por lo tanto, decidimos investigar si la expresión de la Caspasa-10 induce efectivamente la activación del proceso de autofagia. Con este objetivo se analizó el grado de fosforilación de la proteína Atg13 que constituye un marcador principal de la inducción de la autofagia. Para llevar a cabo este análisis se construyeron las cepas $\Delta atg13/pESC-URA$ y $\Delta atg13/pESC-URA_CASP10$ que fueron transformadas con un plásmido centromérico (pRS315/HA-*ATG13*) que dirige la expresión constitutiva del gen *ATG13* marcado con el epítipo HA. El estado de fosforilación de Atg13 en las cepas descritas se analizó mediante western-blot de cultivos que fueron mantenidos en medio con galactosa entre 6-8 horas. Además, en el ensayo también se incluyó el tratamiento con rapamicina como control de inducción de autofagia. Los resultados mostraron que la proteína HA-Atg13 se mantiene hiperfosforilada en ausencia de expresión de la Caspasa-10; sin embargo, se promueve una clara hipofosforilación de HA-Atg13 después de 8 horas de inducción de la expresión de la Caspasa-10, indicando que el proceso de autofagia se desencadena en respuesta a la expresión de la Caspasa-10 humana en *S. cerevisiae* (Figura 35A). Otro método utilizado para corroborar la inducción del proceso de autofagia tras la expresión de la Caspasa-10 en *S. cerevisiae* fue el ensayo mediante western-blot de la proteína Atg8-GFP donde la detección de GFP libre constituye un indicador del grado de autofagia. Cultivos celulares de las cepas $\Delta atg8/vector/ATG8-GFP$ y $\Delta atg8/CASP10/ATG8-GFP$ fueron mantenidos en un medio con galactosa durante 8h para inducir la expresión de la Caspasa-10, incluyéndose como control positivo del experimento las células tratadas con rapamicina. El resultado fue que tras 8h de inducción de la expresión de *CASP10* se produce liberación de GFP (Figura 35B) y, por tanto, se puede deducir que se ha activado el proceso de autofagia.

Durante la etapa de inducción de la autofagia se produce un aumento en la expresión de *ATG13* (Kamada, Y. *et al.* 2010) y los niveles de expresión de *ATG8* se incrementan durante la formación del autofagosoma (Kirisako, T. *et al.* 1999). Por tanto, para confirmar la activación del proceso de autofagia tras la expresión de la Caspasa-10 se analizó la expresión de los genes *ATG13* y *ATG8* mediante PCR cuantitativa en las cepas BY4741/pESC-URA y BY4741/pESC-URA_ *CASP10*. Se comprobó que tras la expresión de la Caspasa-10 se produce un aumento en la expresión de los genes *ATG13* y *ATG8*, situándose los niveles máximos de expresión a las 8h y 6h, respectivamente (Figura 35C).

Para determinar si el gen *FAR11* participa en la inducción del proceso de autofagia se llevó a cabo el análisis del estado de fosforilación de Atg13, como se ha descrito anteriormente, en un mutante $\Delta far11$, que suprime el efecto citotóxico de la Caspasa-10. El resultado obtenido en este caso indica que la presencia de Far11 es esencial para la inducción del proceso de autofagia, mediante la regulación del estado de fosforilación de Atg13, ya que ninguno de los estímulos que provocan la autofagia en nuestro sistema (el tratamiento con rapamicina o la expresión de la Caspasa-10 humana) causó la hipofosforilación de HA-Atg13 (Figura 35D).

Estos resultados demuestran que la expresión de la Caspasa-10 humana en *S. cerevisiae* activa los mecanismos moleculares propios del proceso de autofagia y que la proteína Far11 participa en la inducción de este proceso, directa o indirectamente, mediante la regulación del estado de fosforilación de la proteína Atg13.

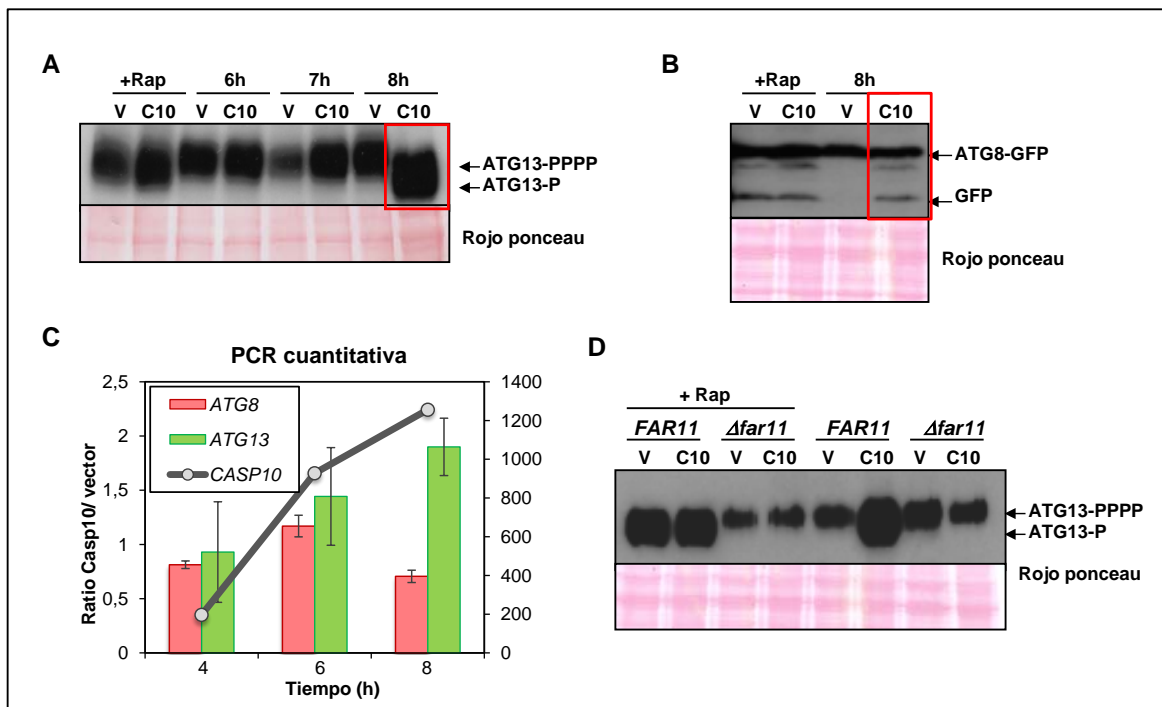


Figura 35. La expresión de la Caspasa-10 está asociada a fenotipos de autofagia. A) Western-blot de la proteína Atg13 en las cepas $\Delta atg13/pRS315_HA-ATG13/pESC-URA$ (V) y $\Delta atg13/pRS315_HA-ATG13/pESC-URA_CASP10$ (C10). Se utilizó el anticuerpo Anti-HA (Babco). B) Western-blot de la proteína Atg8 en la cepa $\Delta atg8/pUG36_ATG8-GFP$ transformada con el plásmido vacío (V) o con el plásmido de expresión de la Caspasa-10 (C10). Se utilizó el anticuerpo anti-GFP (Amersham). C) Ensayo de PCR cuantitativa de los genes *ATG8* y *ATG13* en las cepas BY4741/pESC-URA y BY4741/pESC-URA_ *CASP10*. Los resultados fueron relativizados con respecto al plásmido vacío. En el gráfico se representa la expresión relativa de *ATG8* y *ATG13* (escala derecha) y la expresión relativa de *CASP10* (escala izquierda). Las barras de error indican la desviación típica.

Figura 35 (Continuación). D) Western-blot de Atg13 en las cepas *Δfar11* y *FAR11* transformadas con el plásmido vacío (V) o con el plásmido de expresión de *CASP10* (C10). Se utilizó como control positivo de la autofagia las células tratadas con rapamicina (+ Rap). La tinción de la membrana con rojo ponceau fue utilizada como control de carga.

III.3.8. Far11 interacciona con ortólogos de la Proteína Fosfatasa 2A (PP2A) en *S. cerevisiae*

La mayor parte de los procesos celulares están regulados por diferentes redes de proteínas que interaccionan entre sí y la identificación de estas interacciones es crucial para entender algunas de las funciones celulares de las proteínas. Se han desarrollado diversos métodos *in vivo* para estudiar las interacciones de proteínas asociadas a membrana, como el método de rotura de la ubiquitina conocido como “*Split Ubiquitin System o SUS*” (Johnsson, N. y Varshavsky, A. 1994) o la Complementación Bimolecular de Fluorescencia o BiFC (Hu, C. D. *et al.* 2002).

Las proteínas Fam40A y Fam40B que están codificadas por los ortólogos de *FAR11* en humanos forman parte de un complejo multiproteico con actividad quinasa y fosfatasa (Goudreault, M. *et al.* 2009). Según este modelo, las proteínas Fam40A y Fam40B interaccionan con la proteína fosfatasa 2A (PP2A) a través de otro grupo de proteínas conocidas como estriatinas. Además, Far11 también interacciona físicamente con Tpd3 que es la subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 2A en *S. cerevisiae* (Uetz, P. *et al.* 2000). Nuestros resultados previos indican que Far11 participa en procesos regulados a través del estado de fosforilación de distintos efectores. Por lo tanto, nos propusimos investigar si Far11 puede interaccionar con proteínas fosfatasas en *S. cerevisiae* empleando las dos metodologías citadas: el sistema de rotura de la ubiquitina o “*split ubiquitin system*” y el ensayo de complementación bimolecular de fluorescencia o BiFC. Se analizaron varias fosfatasas: Pph21 y Pph22, subunidades catalíticas de la proteína fosfatasa 2A y Pph3, subunidad catalítica del complejo Psy2-Psy4. Como controles positivos se emplearon las proteínas Tpd3 y Far3 cuyas interacciones con Far11 han sido previamente descritas (Uetz, P. *et al.* 2000; Kemp, H. A. y Sprague, G. F., Jr. 2003).

El sistema de rotura de la ubiquitina o SUS está basado en la capacidad que tienen los dominios N-terminal o “Nub” y C-terminal o “Cub” de la ubiquitina de reconstituir la proteína funcional. NubG es un mutante que tiene disminuida su afinidad con el dominio Cub, de tal forma que estos dominios sólo pueden reconstituir la ubiquitina funcional cuando se encuentran próximos e interaccionan físicamente. Esta propiedad se emplea para determinar *in vivo* la interacción física de proteínas asociadas a membrana mediante su fusión a los dominios Nub o

Cub. La ubiquitina funcional es reconocida por proteasas específicas de ubiquitina (USPs). En el sistema usado en este estudio las proteasas específicas de ubiquitina liberan un factor de transcripción artificial llamado Proteína A-lexA-VP16 (PLV) que está fusionado en el extremo C-terminal de la ubiquitina y que induce la activación transcripcional de los genes reporteros *HIS3*, *ADE2* y *LacZ* en el núcleo (Figura 36).

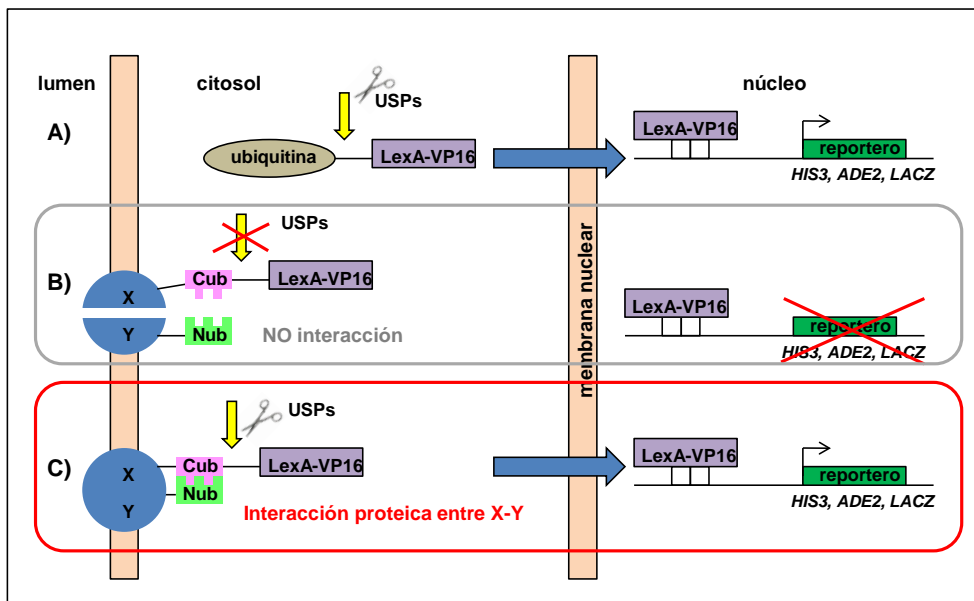


Figura 36. Representación esquemática del sistema de rotura de la ubiquitina o “*Split Ubiquitin System*”. A) La ubiquitina está fusionada al factor de transcripción artificial LexA-VP16 y es reconocida por unas proteasas específicas (USPs) que liberan el factor de transcripción que se dirige al núcleo, donde activa la transcripción de los genes reporteros. B) La proteína de interés X está fusionada al Cub. No se produce interacción entre las proteínas de interés X e Y, por tanto, no se reconstituye la ubiquitina funcional. C) La ubiquitina funcional se reconstituye debido a la interacción física entre las proteínas de interés X e Y, por tanto, es reconocida por las USPs activando transcripcionalmente los genes reporteros.

En nuestro experimento el extremo C-terminal de la ubiquitina (Cub) se fusionó a la proteína Far11 y las diferentes proteínas que nos propusimos analizar, Pph21, Pph22, Tpd3 y Far3 se fusionaron al extremo N-terminal de la ubiquitina o NubG. Estas fusiones fueron integradas en unos plásmidos centroméricos y transformadas en cepas de levadura de tipo sexual opuesto (*Mat a*: THY.AP4 y *Mat α*: THY.AP5) para construir cepas diploides que porten la proteína Far11-Cub y las proteínas fosfatasa de interés fusionadas al NubG (*Ver Materiales y Métodos*). La cepa THY.AP4 tiene los genes reporteros *HIS3*, *ADE2* y *LacZ* bajo el control del promotor dirigido por LexA, formando un factor de transcripción artificial (proteína A-LexA-VP16). El cassette LexA-VP16 está formado por la proteína de unión al ADN LexA y el dominio de

activación transcripcional VP16 (Pellett, P. E. *et al.* 1985). LexA-VP16 puede activar a los genes reporteros mediante su unión a los sitios LexA en la región del promotor. Gracias al uso de esta cepa (THY.AP4) es posible detectar interacciones de proteínas mediante i) el análisis de la capacidad de crecimiento en un medio sin adenina ni histidina ó ii) midiendo la actividad β -galactosidasa del gen *LacZ*. Por tanto, únicamente aquellas cepas que presenten interacciones entre Far11 y la proteína correspondiente serán capaces de crecer en un medio mínimo y mostrarán una coloración azul en el ensayo β -galactosidasa como consecuencia de la activación transcripcional del gen *LacZ*.

Con el propósito de analizar el efecto que tiene la expresión de la Caspasa-10 sobre estas interacciones proteicas, las cepas diploides fueron transformadas con un plásmido de expresión derivado del pESC-URA en el que el marcador de selección de uracilo (*URA3*) fue sustituido por geneticina (G418) y que tiene clonada la ORF de *CASP10* en los sitios de restricción *NotI-SacI*. Se transformaron las correspondientes cepas diploides con el plásmido vacío anterior (derivado del pESC-URA), para poder realizar el experimento utilizando el mismo medio de selección. Por tanto, las cepas que presenten interacciones entre Far11 y la proteína de interés tras la expresión de *CASP10* serán capaces de crecer en un medio mínimo que contenga galactosa como fuente de carbono y suplementado con geneticina.

La interacción de proteínas con el sistema de rotura de ubiquitina fue analizado tanto mediante curvas de crecimiento en medio mínimo como con el ensayo de la actividad β -galactosidasa; utilizándose en ambos casos como control positivo la cepa diploide que expresa un Nub de tipo silvestre y que por tanto, interacciona con el Cub espontáneamente reconstituyendo la ubiquitina funcional. Como control negativo se utilizó una cepa que expresa el plásmido del NubG vacío (pXN-gate o pXN-gate-3HA) y que, por tanto, no puede interaccionar con la proteína del Cub. El ensayo de curvas de crecimiento se realizó en un medio mínimo para determinar la pareja de proteínas capaz reconstituir la ubiquitina funcional y que, por tanto, presenta una interacción física. Los resultados de este análisis revelaron que Far11 interacciona con las proteínas Pph21, Pph22, Pph3, Tpd3 y Far3 debido a la capacidad de crecimiento de estas cepas en medio mínimo y que, por tanto, son capaces de reconstituir la ubiquitina funcional (Figura 37A). El ensayo de la actividad β -galactosidasa constató las interacciones proteicas de Far11 con Pph21, Pph22, Pph3, Tpd3 o Far3 ya que las cepas en las que se mostraba interacción física entre estas proteínas presentaban una coloración azul resultado de la activación transcripcional del gen *LacZ* (Figura 37B). Estas interacciones proteicas se mantienen tras la

expresión de la Caspasa-10 aunque, en este caso, se pueden distinguir dos tipos de interacciones, unas más fuertes constituidas por las proteínas Pph22 y Tpd3 y otras más débiles como las formadas por las proteínas Pph21, Pph3 y Far3 representadas por una menor capacidad de crecimiento en medio mínimo (Figura 37A) y una menor intensidad en el color azul resultante del ensayo de la actividad β -galactosidasa (Figura 37B).

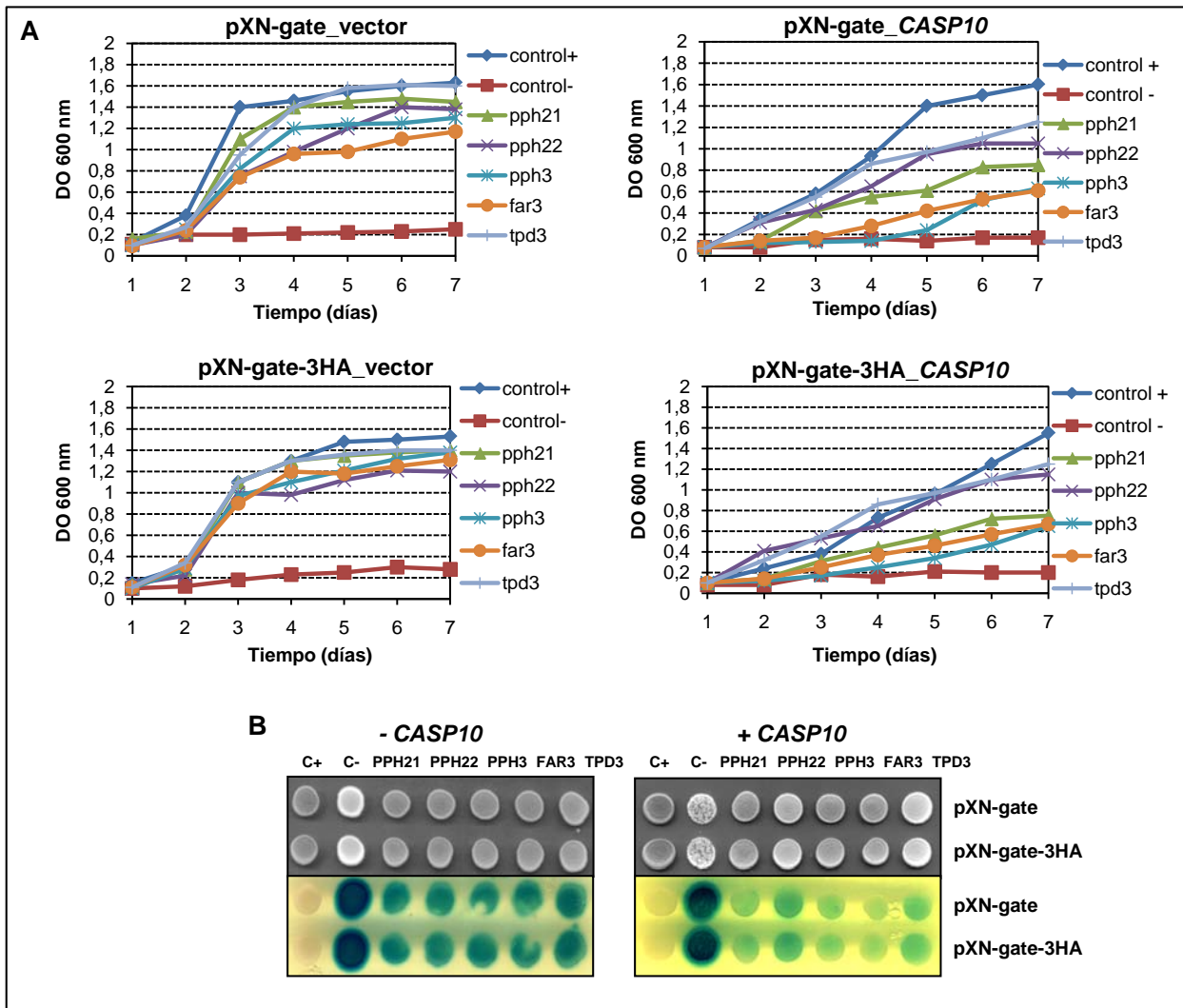


Figura 37. Interacciones proteicas de Far11 con Pph21, Pph22, Pph3, Far3 y Tpd3. A) Curvas de crecimiento de las cepas de *S. cerevisiae* que tienen clonadas las distintas proteínas fosfatasa en los vectores pXN-gate o pXN-gate-3HA y presentan el plásmido de la Caspasa-10 o el plásmido vacío. El crecimiento celular se llevó a cabo en medio mínimo. B) Ensayo β -galactosidasa de las cepas anteriores que fueron plaqueadas en un medio rico (SD-TRP-LEU). Se utilizó como control positivo de interacción la cepa diploide que tiene un Nub silvestre y como control negativo las cepas diploides que portan el plásmido vacío correspondiente (pXN-gate o pXN-gate-3HA).

El otro método usado fue la Complementación Bimolecular Fluorescente o BiFC. Está basado en la formación de un complejo fluorescente mediante la interacción de los dominios N-terminal y C-terminal de la proteína amarilla fluorescente (YeVenus) que tiene lugar únicamente

cuando estos dominios están fusionados a proteínas que interactúan físicamente (Cole, K. C. *et al.* 2007). Para llevar a cabo este análisis se fusionó el gen *FAR11* con el extremo C-terminal de la proteína amarilla fluorescente (YeVenus) y los genes *PPH21*, *PPH22*, *PPH3*, *TPD3* y *FAR3* con el extremo N-terminal de la YeVenus mediante la técnica de PCR (Figura 38). Estos fragmentos de PCR fueron transformados en cepas de levadura e integrados en su genoma mediante recombinación homóloga (*Ver Materiales y Métodos*).

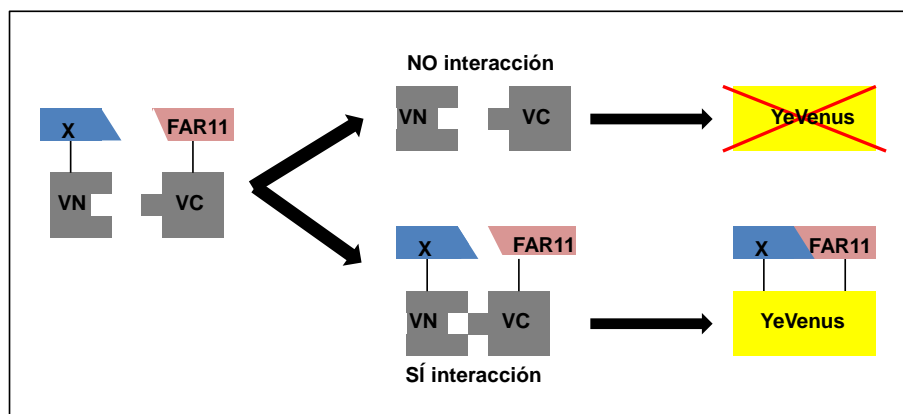


Figura 38. Representación experimental del método de Complementación Bimolecular de Fluorescencia (BiFC). La proteína Far11 fue fusionada al extremo C-terminal de la YeVenus (VC) y la proteína de interés X en el extremo N terminal de la YeVenus (VN). Únicamente en el caso de que haya interacción entre Far11-X se reconstituirá la YeVenus y, por tanto, las células mostrarán fluorescencia amarilla.

Con el objetivo de analizar las posibles interacciones proteicas entre Far11 y las proteínas Pph21, Pph22, Pph3, Far3 y Tpd3, así como el efecto que la Caspasa-10 pudiera ejercer sobre estas interacciones, estas cepas diploides fueron transformadas con el plásmido pGILDA vacío y con el plásmido pGILDA_ *CASP10*, en el que la expresión de *CASP10* es inducible en un medio con galactosa como fuente de carbono. Las células de *S. cerevisiae* fueron examinadas mediante microscopía de fluorescencia utilizándose como controles negativos las correspondientes cepas haploides. Los resultados muestran que Far11 interactúa con Pph21, Pph22, Pph3, Tpd3 y Far3 ya que en estos casos se observa fluorescencia debida a la reconstitución de la proteína amarilla fluorescente (Figura 39) y estas interacciones se mantienen tras la expresión de la Caspasa-10. Sin embargo, en el caso de las parejas de proteínas Far11-Pph21, Far11-Pph3 y Far11-Far3 estas interacciones parecen ser más débiles ya que muestran una menor intensidad de fluorescencia. Estos resultados corroboran los datos obtenidos mediante el ensayo del sistema de rotura de la ubiquitina o SUS.

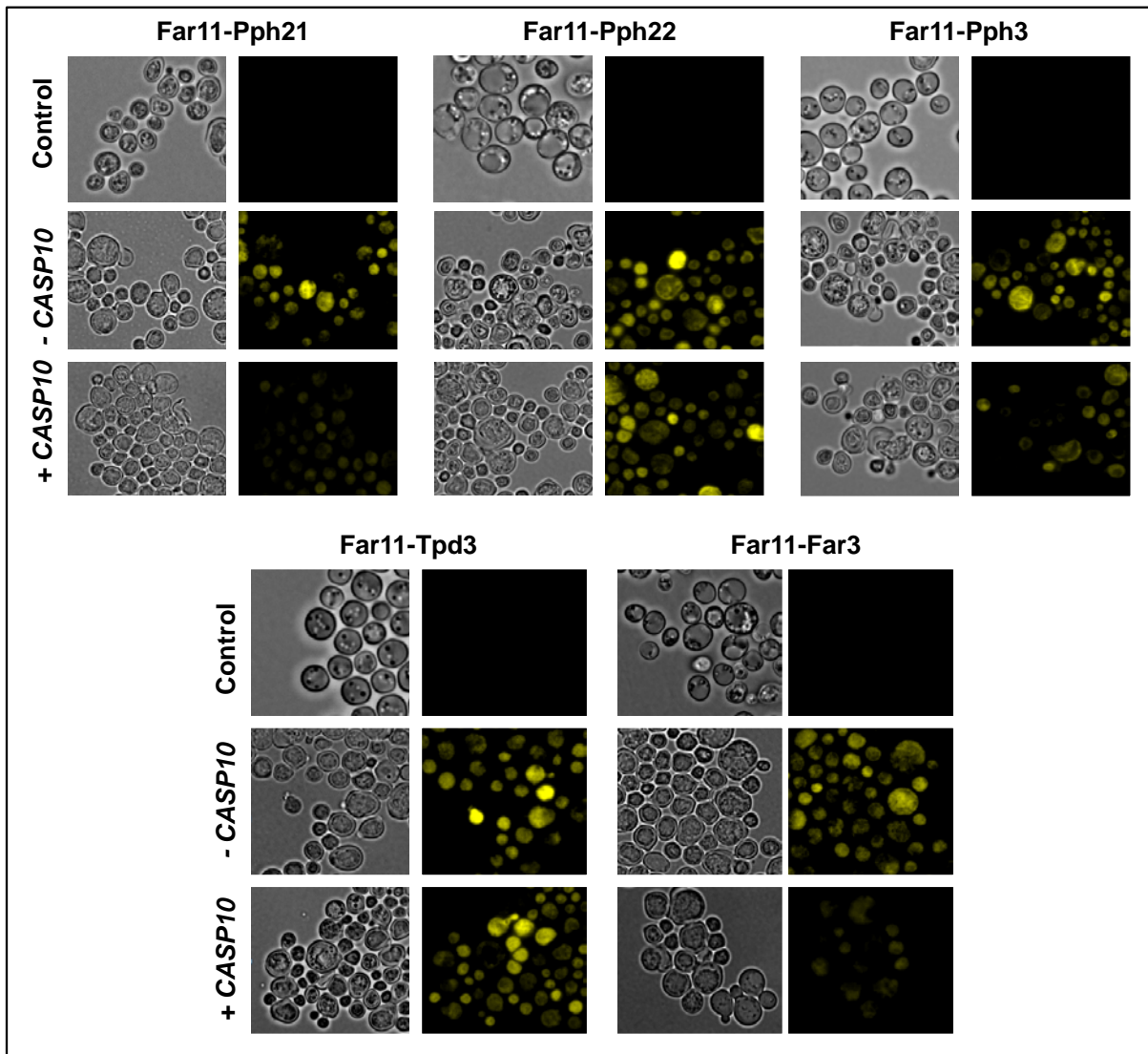


Figura 39. Interacciones de proteínas entre Far11 y Pph21, Pph22, Pph3, Tpd3 y Far3 analizadas por el método de Complementación Bimolecular de Fluorescencia (BiFC). Las cepas diploides de *S. cerevisiae* fueron mantenidas en un medio con galactosa para inducir la expresión de *CASP10*. Se utilizaron como controles negativos las correspondientes cepas haploides.

III.3.9. *FAM40A* y *FAM40B* (ortólogos de *FAR11* en humanos) rescatan parcialmente el fenotipo de muerte celular

Existen dos ortólogos del gen *FAR11* en humanos que codifican las proteínas Fam40A y Fam40B (Kemp, H. A. y Sprague, G. F., Jr. 2003). Además, se ha descrito que las proteínas Fam40A y Fam40B, también llamadas Strip-1 y Strip-2, forman parte de un complejo multiproteico denominado STRIPAK que posee actividad fosfatasa y quinasa (Goudreault, M. *et al.* 2009).

Con la finalidad de comprobar si los genes *FAM40A* y *FAM40B* pueden complementar la delección del gen *FAR11* en *S. cerevisiae* y, por tanto, pueden considerarse homólogos funcionales de *FAR11*, se clonaron las ORFs de *FAM40A* y *FAM40B* (GenBank BC121793.1 y BC019064.2, respectivamente) en el vector centromérico YcpLac111 bajo el control del promotor *FAR11*. Estos plásmidos fueron usados para transformar las cepas $\Delta far11$ /pESC-URA y $\Delta far11$ /pESC-URA_CASP10 y así poder determinar si los genes *FAM40A* y *FAM40B* también rescatan el fenotipo silvestre tras la expresión de la Caspasa-10 humana. En este ensayo el experimento consistió en evaluar el crecimiento de estas cepas en medio líquido mediante curvas de crecimiento a lo largo del tiempo, usando como control positivo la cepa $\Delta far11$ /pESC-URA_CASP10 y como control negativo la cepa $\Delta far11$ /CASP10/*FAR11* debido a su efecto citotóxico. Los cultivos celulares fueron mantenidos a lo largo del tiempo en un medio con galactosa como fuente de carbono para elaborar las curvas de crecimiento de cada cepa. Como se muestra en la Figura 40, la expresión de los genes *FAM40A* y *FAM40B* es capaz de rescatar parcialmente el fenotipo citotóxico de la Caspasa-10 en un fondo genético $\Delta far11$, indicando que los genes *FAM40A* y *FAM40B* podrían considerarse homólogos funcionales del gen *FAR11* de *S. cerevisiae*.

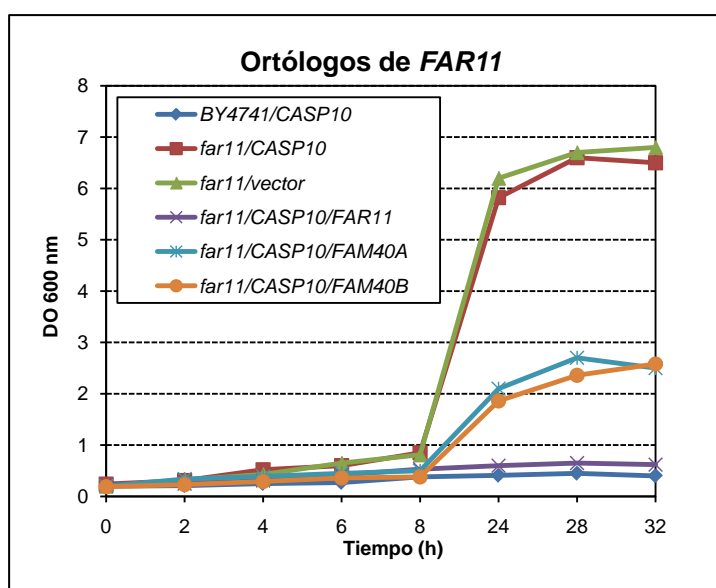


Figura 40. Toxicidad de la Caspasa-10 en las cepas $\Delta far11$ transformadas con los plásmidos de expresión de *FAR11*, *FAM40A* y *FAM40B*. Las células de estas cepas fueron crecidas en un medio selectivo con galactosa para inducir la expresión de *CASP10*. Se utilizó como control positivo la cepa $\Delta far11$ /CASP10 y como control negativo la cepa $\Delta far11$ /CASP10/*FAR11*.

IV. Discusión

IV.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS FENOTIPOS DERIVADOS DE LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA CASPASA-8 Y CASPASA-10 HUMANA EN *S. CEREVISIAE*

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que implica una serie de cambios bioquímicos y morfológicos en las células como la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear (picnosis y cariorrésis), la degradación del ADN y de otros contenidos intracelulares, la externalización de la fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana plasmática y la generación masiva de ROS (Kerr, J. F. *et al.* 1972). Entre las principales proteínas encargadas de ejecutar el programa apoptótico se encuentran las caspasas, las cuales actúan a través de dos vías de apoptosis: la vía intrínseca y la vía extrínseca (Ho, P. K. y Hawkins, C. J. 2005). Sin embargo, estas proteasas también participan en otros procesos como inflamación, la diferenciación celular o el desarrollo (Garrido, C. y Kroemer, G. 2004).

Se han expresado en *S. cerevisiae* las isoformas más abundantes en los tejidos humanos de la Caspasa-8 (isoforma C) y la Caspasa-10 (isoforma D). Además, también se ha analizado la expresión en *S. cerevisiae* de una nueva isoforma no descrita anteriormente de la Caspasa-8 (isoforma S). Tras la expresión de las Caspasas-8 y -10 humanas en la levadura de gemación se observaron fenotipos asociados a procesos de muerte celular, como indican los ensayos de clonogenicidad y el análisis de las tinciones vitales FUN-1 y resazurina. El fenotipo letal variaba considerablemente en el caso de la nueva isoforma de la Caspasa-8 (isoforma S), lo que sugiere funciones diferentes para cada isoforma. De hecho, en trabajos previos han descrito que la isoforma A de la Caspasa-10 no induce muerte celular en *S. cerevisiae* (Kang, J. J. *et al.* 1999) confirmando que las diferentes isoformas de la Caspasa-10 podrían tener efectos distintos en la levadura.

La muerte celular inducida por la expresión de estas caspasas iniciadoras humanas (Caspasa-8 y Caspasa-10) depende de su activación proteolítica y está acompañada de fenotipos típicos apoptóticos como son la condensación de la cromatina, la producción masiva de ROS y la externalización de la fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana plasmática. Sin embargo, no se ha detectado degradación del ADN, hecho que ya había sido previamente descrito en el caso de la Caspasa-3 y la Caspasa-8 (Puryer, M. A. y Hawkins, C. J. 2006). Además, la mitocondria, que es un orgánulo esencial en el proceso de apoptosis u otros efectores de la apoptosis en levaduras como Aif1, EndoG o Mca1 (Eisenberg, T. *et al.* 2007) no son necesarios para la toxicidad de estas caspasas. Estos resultados sugieren que la expresión de la

Caspasa-8 y la Caspasa-10 en *S. cerevisiae* desencadena otros mecanismos moleculares que causan la muerte celular, pero que son independientes de la maquinaria apoptótica de la levadura.

Los procesos de apoptosis y de regulación del ciclo celular están íntimamente ligados, ya que la Caspasa-8 y la Caspasa-10, además de la metacaspasa o *MCA1* participan en la proliferación y adecuado funcionamiento del ciclo celular (Tibbetts, M. D. *et al.* 2003; Gilot, D. *et al.* 2005; Lee, R. E. *et al.* 2008). El daño en el ADN producido por un estrés replicativo activa los checkpoints o “puntos de vigilancia” del ciclo celular para evitar la replicación del ADN dañado y de este modo poder reparar los daños ocasionados (Bartek, J. *et al.* 2004). Además, ha sido descrito que los defectos en la replicación del ADN pueden conducir a un proceso de muerte celular apoptótica en la levadura (Weinberger, M. *et al.* 2005). La expresión de la Caspasa-8 y la Caspasa-10 humanas en *S. cerevisiae* promueve un incremento de estrés oxidativo y estos altos niveles de especies reactivas de oxígeno podrían provocar la activación del checkpoint de fase-S del ciclo celular para evitar o reparar el daño en el ADN. Sin embargo, los resultados que se han presentado muestran que las células que expresan la Caspasa-8 y la Caspasa-10 humanas no experimentan parada del ciclo celular y tampoco responden al tratamiento con agentes genotóxicos, indicando que la expresión de estas caspasas podría alterar la funcionalidad del checkpoint de fase-S de daño en el ADN impidiendo su activación y, por tanto, permitiendo la progresión del ciclo celular incluso en condiciones de estrés genotóxico. Además, se ha descrito que la inactivación del checkpoint de fase-S puede ser debido a un mecanismo de adaptación por el cual las células sometidas a un estrés genotóxico persistente durante un periodo de tiempo prolongado bloquean su respuesta frente a este estímulo permitiendo la progresión del ciclo celular (Clemenson, C. y Marsolier-Kergoat, M. C. 2009).

La pared celular y diferentes orgánulos celulares como las vacuolas y el retículo endoplásmico sufren alteraciones tras la expresión de la Caspasa-10 en *S. cerevisiae*. Se ha descrito que en respuesta a altos niveles de estrés oxidativo se produce la activación de la ruta de integridad celular (Staleva, L. *et al.* 2004; Vilella, F. *et al.* 2005), lo cual explicaría algunos de los fenotipos asociados a la expresión de la Caspasa-10 como la alteración de la pared celular.

Las vacuolas son unos orgánulos que están encargados del almacenamiento de sustancias y que participan en procesos degradativos cuando se genera algún tipo de estrés celular (Li, S. C. y Kane, P. M. 2009) mediante la eliminación de los orgánulos dañados a través del proceso de autofagia (Roberts, P. *et al.* 2003; Mizushima, N. *et al.* 2008). La expresión de la Caspasa-10

produce un incremento en el número y tamaño de las vacuolas que es un fenotipo observado en procesos de autofagia (Kiel, J. A. 2010) y que, por tanto, sugiere que la muerte celular asociada a la Caspasa-10 humana en *S. cerevisiae* podría estar relacionada con la inducción de autofagia. Previamente se ha descrito que la proteína proapoptótica Bax humana induce fenotipos de autofagia y mitofagia en la levadura (Kissova, I. *et al.* 2006; Khoury, C. M. y Greenwood, M. T. 2008). Además, se conoce que ambos tipos de muerte celular programada (autofagia y apoptosis) están interrelacionados ya que las células que sufren autofagia también muestran fenotipos típicos de apoptosis y que las caspasas también pueden actuar en procesos de autofagia (Gozuacik, D. y Kimchi, A. 2007; Scott, R. C. *et al.* 2007).

Otro de los fenotipos observados tras la expresión de la Caspasa-10 es la expansión del lumen del retículo endoplásmico en algunas células. Este fenotipo fue también descrito en la cepa *cdc48* de *S. cerevisiae* que se considera el paradigma de la apoptosis en un organismo unicelular como la levadura (Madeo, F. *et al.* 1997) y se atribuye este fenotipo a una desregulación en la ruta de degradación de proteínas asociadas al retículo endoplásmico (Braun, R. J. y Zischka, H. 2008). Esta desregulación causada por mutaciones en el gen *CDC48* estaba, en parte, asociada a una acumulación de especies reactivas de oxígeno y a un proceso de muerte celular apoptótica dependiente de la metacaspasa Mca1 (Braun, R. J. y Zischka, H. 2008).

De acuerdo con los resultados obtenidos, todos los fenotipos asociados a la expresión de la Caspasa-10 humana en *S. cerevisiae* aparecen inmediatamente después de la expresión y activación de la caspasa, que se produce unas 4 horas después de la inducción de la expresión en un medio con galactosa como fuente de carbono, indicando que la expresión de las caspasas iniciadoras promueve una respuesta rápida y letal para la célula.

IV.2. PARTICIPACIÓN DE *FAR1* EN EL PROCESO DE MUERTE CELULAR INDUCIDO POR LA EXPRESIÓN DE LA CASPASA-10 HUMANA EN *S. CEREVISIAE*

Los estudios realizados con organismos modelo como la levadura de gemación han permitido identificar funciones de genes hasta ahora desconocidas en organismos superiores como en humanos (Xu, Q. y Reed, J. C. 1998). El hecho de que el genoma de *S. cerevisiae* esté totalmente secuenciado y de que haya colecciones de mutantes de delección de este organismo posibilita su uso para realizar aproximaciones genéticas indirectas con el objetivo de detectar

cepas supresoras capaces de sobrevivir a cualquier efecto citotóxico, como en este caso, a la expresión de la Caspasa-10.

Con el objetivo de dilucidar los mecanismos moleculares que dirigen el proceso de muerte celular desencadenado tras la expresión de la Caspasa-10 en *S. cerevisiae*, se desarrolló un escrutinio de supresión de toxicidad en el que fueron identificados genes esenciales para la letalidad asociada a la Caspasa-10 que pertenecen a diferentes grupos funcionales o familias génicas como la familia *FAR* (*FAR3*, *FAR7*, *FAR8*, *FAR9*, *FAR10* y *FAR11*), genes pertenecientes a rutas de señalización MAPKs (*GPA1*, *STE20*, *STE11*, *STE7*, *FUS3*, *KSS1* y *SLT2*), otros genes con actividad quinasa y fosfatasa (*TPK1*, *TPK2*, *TPK3*, *PPH21*, *PPH22*, *PPH3*, *PTC2* y *PTC3*) y genes relacionados con autofagia (*ATG1*, *ATG4*, *ATG8*, *ATG6* y *ATG13*), entre otros. La ventaja del empleo de este tipo de aproximación genética es que permite identificar moduladores de proteínas heterólogas (Camougrand, N. *et al.* 2003); sin embargo, también presenta algunos inconvenientes ya que este tipo de escrutinios están limitados al empleo de proteínas que sean tóxicas en la levadura, como en este caso, la Caspasa-10.

La familia de proteínas Far participa en el establecimiento y mantenimiento de la parada del ciclo celular en fase G1 en respuesta a la feromona (Kemp, H. A. y Sprague, G. F., Jr. 2003). Sorprendentemente todos los miembros de esta familia, a excepción de Far1, están implicados en el proceso de muerte celular desencadenada tras la expresión de la Caspasa-10. Se ha descrito que las proteínas Far actúan a través de dos mecanismos diferentes: mediante una vía dependiente de Far1, en la que tras la activación de la ruta MAPK, Fus3 fosforila a Far1 provocando su unión al complejo Cdc28-Cln actuando como un inhibidor de CDKs (Chang, F. y Herskowitz, I. 1992); y una vía independiente de Far1 en la que participan el resto de miembros de esta familia (Far3, Far7, Far8, Far9, Far10 y Far11). La vía independiente de Far1 resulta esencial para asegurar el mantenimiento de la parada del ciclo celular a través de un mecanismo todavía desconocido, aunque se ha descrito que Far11 se fosforila tras la activación de la ruta, pero las proteínas Far no parecen regular los niveles de ciclinas de la fase G1 (Kemp, H. A. y Sprague, G. F., Jr. 2003; Gruhler, A. *et al.* 2005).

En este trabajo se ha determinado que las proteínas Far3, Far7, Far9 y Far11 se localizan en sistemas de endomembranas de la vía de secreción, entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, a diferencia de Far1 que tiene una localización nuclear (Blondel, M. *et al.* 1999). La localización subcelular de las proteínas Far podría ser determinante para su función como

posibles señalizadores celulares ya que el sistema de endomembranas se encuentra directamente implicado en procesos de transporte de vesículas y procesos de degradación o autofagia (Longatti, A. y Tooze, S. A. 2009). Se han identificado proteínas implicadas en autofagia como Atg20 que sufren un cambio de localización a lo largo del proceso de muerte celular pasando de una localización asociada a la membrana del aparato de Golgi y llegando, incluso, a localizarse en endosomas que finalmente se fusionarán con la vacuola (Yorimitsu, T. y Klionsky, D. J. 2005). El hecho de que la expresión de la Caspasa-10 promueva la relocalización de la proteína Far9-CFP desde el RE-Golgi a la vacuola podría sugerir la participación de esta proteína en procesos de muerte celular por autofagia. Además, la proteína Far9, también conocida como Vps64 “*vacuolar protein sorting*”, está asociada al transporte de proteínas hasta la vacuola (Bonangelino, C. J. *et al.* 2002) y se ha identificado que algunos miembros de la familia de proteínas Vps están implicadas en la eficiente señalización de Tor1 (Zurita-Martinez, S. A. *et al.* 2007).

Uno de los fenotipos asociados a la expresión de la Caspasa-10 es la desorganización del citoesqueleto de actina. La presencia de agregados de actina en las células se debe a la desestabilización del citoesqueleto por una hiperactivación de la ruta Ras/PKA/AMPC que conduce finalmente a un proceso de muerte celular por apoptosis (Gourlay, C. W. y Ayscough, K. R. 2006). En el escrutinio realizado se identificaron los genes *TPK1*, *TPK2* y *TPK3*, que codifican las subunidades catalíticas de la PKA, como efectores esenciales en el proceso de muerte celular inducido por la expresión de la Caspasa-10. Por tanto, se podría pensar que la expresión de la Caspasa-10 produce una hiperactivación de la ruta PKA que sería causante de la aparición de los agregados de actina y de la desestabilización del citoesqueleto que acompaña a la muerte celular inducida por la Caspasa-10 en *S. cerevisiae*. Además, esta hipótesis constata el hecho de que la sobreexpresión de *TPK1*, *TPK2* y *TPK3* cause un fenotipo letal para la célula (Liu, H. *et al.* 1992; Mazon, M. J. *et al.* 1993) y explicaría la supervivencia celular experimentada en las cepas que tienen delecionados los genes *TPK1*, *TPK2* y *TPK3* en los que la ruta PKA estaría bloqueada. También se ha descrito que el citoesqueleto de actina es sensible al estrés oxidativo y que los puentes disulfuro entre los residuos de cisteína de la actina podrían funcionar como sensores del estrés oxidativo (Dalle-Donne, I. *et al.* 2001; Farah, M. E. y Amberg, D. C. 2007; Leadsham, J. E. y Gourlay, C. W. 2008). La aparición de agregados o acúmulos de actina como consecuencia de una disminución del reciclaje de actina también ha sido relacionado con la liberación de especies reactivas de oxígeno o ROS por parte de la mitocondria (Gourlay, C. W. y Ayscough, K. R. 2005). Por tanto, se podría pensar que la

producción masiva de ROS tras la expresión de la Caspasa-10 en las células de *S. cerevisiae* contribuye a la desestabilización del citoesqueleto de actina y, en consecuencia, a la aparición de engrosamientos en los cuellos de gemación. Sin embargo, como ya se indicó anteriormente, la mitocondria no es esencial para la muerte celular inducida por la Caspasa-8 y la Caspasa-10 humanas en *S. cerevisiae*. Por tanto, el retículo endoplásmico podría ser considerado como una fuente alternativa de estrés oxidativo asociado a la expresión de estas caspasas humanas. Se ha descrito que en respuesta al estrés oxidativo proveniente del retículo endoplásmico se produce la activación de la MAPK Hog1 (Bicknell, A. A. *et al.* 2010). El gen *HOG1* no fue identificado como esencial en el proceso de muerte celular desencadenado tras la expresión de la Caspasa-10 aunque sí se comprobó la activación de las MAPKs Fus3, Kss1 y Slt2. Además, otros grupos de investigación han corroborado la activación de la ruta de integridad en respuesta a elevados niveles de estrés oxidativo procedentes del retículo endoplásmico (Chen, Y. *et al.* 2005). Por tanto, se podría deducir que la expresión de la Caspasa-10 conduce a una producción masiva de estrés oxidativo proveniente, probablemente, del retículo endoplásmico dando lugar, finalmente, a la activación de distintas rutas MAPK como la ruta de respuesta a la feromona o ruta de integridad mediante la fosforilación de Fus3, Kss1 y Slt2. Las rutas de señalización MAPKs están muy conservadas desde levaduras a mamíferos (Widmann, C. *et al.* 1999) y recientemente se ha identificado en células humanas una isoforma de la PKC (proteína quinasa C), PKC- θ , que está implicada en el proceso de autofagia producido en respuesta a los elevados niveles de estrés oxidativo procedentes del retículo endoplásmico (Sakaki, K. *et al.* 2008) estableciendo, por tanto, un vínculo entre el estrés procedente del retículo endoplásmico, la activación de rutas de señalización y los diferentes tipos de muerte celular por autofagia. En contraposición, algunos autores han determinado que únicamente se produce la activación de la ruta de señalización de MAPK durante el proceso de pexofagia (autofagia del peroxisoma) y no en otros tipos de autofagia (Manjithaya, R. *et al.* 2010).

Algunos genes que participan en las rutas de señalización MAPK también están implicados en la muerte celular inducida por la expresión de la Caspasa-10. En respuesta a la feromona, la célula activa una ruta MAPK que finalmente conduce a la activación de genes específicos de la conjugación y a la parada del ciclo celular en fase G1 para permitir la conjugación (Yu, L. *et al.* 2008). La expresión de la Caspasa-10 en *S. cerevisiae* promueve la activación de los módulos MAPK de respuesta a la feromona y de integridad celular mediante la fosforilación de Fus3, Kss1 y Slt2, desencadenando finalmente un proceso de muerte celular acompañado de altos niveles de estrés oxidativo. Se han identificado tres rutas de señalización que regulan el proceso

de muerte celular en función de la dosis de factor- α suministrada en las células (Zhang, N. N. *et al.* 2006). Ante una baja concentración de factor- α la célula puede responder mediante dos mecanismos distintos: i) con una activación de los genes *FUS1* y *FUS2* produciéndose la degradación de la pared celular que conduce, finalmente, a la activación de la ruta de estrés de pared celular o ruta de integridad desencadenando un proceso de muerte celular rápida y ii) promoviendo la activación de los genes *CCH1* y *MIDI1*, implicados en la liberación del calcio procedente del retículo endoplásmico al citosol, y por tanto, activando a la calcineurina y dando lugar a un proceso de muerte celular lenta. Cuando la dosis de factor- α es elevada tiene lugar un proceso de muerte celular muy rápida dependiente de *FIG1* (Zhang, N. N. *et al.* 2006). Estos tres mecanismos moleculares conducen a un proceso de muerte celular precedido de una producción elevada de especies reactivas de oxígeno (ROS) procedente de una fuente de estrés oxidativo diferente de la mitocondria (Zhang, N. N. *et al.* 2006). En nuestros resultados se había comprobado que tras la expresión de la Caspasa-10 se produce la activación transcripcional de *FUS1* así como la fosforilación de Slt2 y por tanto, activación de la ruta de estrés de pared celular. Además, entre los supresores del efecto citotóxico de la Caspasa-10 se encontró la cepa que tiene delecionado el gen *CWPI*, implicado en la organización de la pared celular. Por tanto, uno de los mecanismos moleculares que se desencadenaría en las células tras la expresión de la Caspasa-10 podría considerarse dependiente de *FUS1* y *FUS2* según el modelo descrito por (Zhang, N. N. *et al.* 2006), estableciéndose una conexión entre la activación de rutas de señalización y los procesos de muerte celular.

Por otra parte, en un trabajo en el que se analiza el fosfoproteoma de células de *S. cerevisiae* tratadas con factor- α se ha determinado que la activación de esta ruta MAPK conduce a la fosforilación de la proteína Far11 en el residuo de Serina-18 (Gruhler, A. *et al.* 2005). En nuestro trabajo se ha demostrado que el gen *FAR11* es esencial en la muerte celular inducida por la Caspasa-10 y, en concreto, que el residuo Ser18 de Far11 es indispensable para que la Caspasa-10 pueda causar el fenotipo citotóxico en *S. cerevisiae*. Por consiguiente, la función de Far11 podría estar regulada mediante la fosforilación del residuo Ser18 y probablemente alguna de las MAPKs Fus3, Kss1 o Slt2 estarían implicadas en la fosforilación de Far11.

La regulación de los procesos de muerte celular y la progresión del ciclo celular son dos mecanismos que se encuentran interconectados a través de los puntos de vigilancia o checkpoints (Burhans, W. C. *et al.* 2003). Cuando las células sufren un daño genotóxico estos checkpoints se activan para intentar reparar el daño ocasionado en la medida de lo posible (Putnam, C. D. *et al.*

2009). El tratamiento de las células de *S. cerevisiae* con el agente genotóxico hidroxurea induce la fosforilación de la proteína Rad53 causando una parada del ciclo celular en fase-S con el objetivo de reparar el daño en el ADN (Alvino, G. M. *et al.* 2007). La expresión de la Caspasa-10 en una cepa silvestre de *S. cerevisiae* tratada con hidroxurea provoca la inactivación del checkpoint de fase-S posiblemente debido a la desfosforilación de la proteína Rad53. Sin embargo, las células de la cepa $\Delta far11$ son capaces de responder adecuadamente al tratamiento con hidroxurea desencadenando una parada del ciclo celular en fase-S, ya que se produce la fosforilación de Rad53. Por tanto, nuestros resultados indican que Far11 participa en la desfosforilación de Rad53. Además se ha determinado que el residuo Ser18, pero no el residuo Ser81, de Far11 es necesario para el mantenimiento del estado de fosforilación de Rad53 y, por tanto, para la activación del checkpoint de fase-S. El residuo Ser81 de Far11 ha sido identificado previamente como un sitio de fosforilación de las proteínas Mec1/Tel1 implicadas en el checkpoint de fase-S (Smolka, M. B. *et al.* 2007). Este hecho contrasta con el resultado obtenido en este estudio de que el residuo de Ser81 no participe en la regulación del estado de fosforilación de Rad53 ni, por tanto, en la activación del checkpoint de fase-S ya que Rad53 es una proteína efectora de Mec1/Tel1. Sin embargo, se han identificado otras proteínas dianas de Mec1/Tel1 activadas mediante fosforilación que no participan en la activación del checkpoint de fase-S (Tseng, S. F. *et al.* 2006).

El efecto de Far11 sobre la función de Rad53 parece estar limitada, directa o indirectamente, a la regulación de su estado de fosforilación. Por lo tanto, cabe pensar que Far11 puede bien inducir la desfosforilación de Rad53, o bien inhibir su fosforilación. Se ha descrito que las fosfatasas Ptc2 y Ptc3, junto con Pph3, participan en la desactivación mediante desfosforilación del checkpoint de Rad53 (Travesa, A. *et al.* 2008). Además, en nuestro escrutinio genético se identificaron las cepas supresoras $\Delta pph3$, $\Delta ptc2$ y $\Delta ptc3$ lo que indica que la actividad de las fosfatasas Pph3, Ptc2 y/o Ptc3 es esencial para la letalidad asociada a la Caspasa-10 humana en *S. cerevisiae*. Far11 podría regular el estado de fosforilación de Rad53, de forma indirecta, a través de las fosfatasas Pph3, Ptc2 y/o Ptc3. De hecho, se ha descrito que las proteínas Fam40A y Fam40B humanas, codificadas por los ortólogos humanos de *FAR11*, forman parte del complejo STRIPAK junto con la proteína fosfatasa 2A (Goudreault, M. *et al.* 2009) y que Far11 interacciona físicamente con la proteína Tpd3 que es la subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) en *S. cerevisiae* (Uetz, P. *et al.* 2000). Además, en este trabajo se ha demostrado que Far11 también presenta interacción física con la subunidad catalítica Pph3. Por lo tanto, la posible interacción de Far11 con Pph3 tras la expresión de la Caspasa-10 podría ser

responsable de la desfosforilación de Rad53, considerando que Far11 se comportase como un coactivador de esta fosfatasa. No obstante, la existencia de interacción física entre Far11 y Pph3 en células en las que no existe expresión de la Caspasa-10 podría descartar que esta fuera la única causa de la desfosforilación de Rad53, puesto que en estas células la proteína Rad53 permanece fosforilada. En relación a este resultado otra posibilidad sería que independientemente de la interacción física existente entre Far11 y Pph3, la regulación de la actividad fosfatasa dependiera del estado de fosforilación de Far11, de tal forma que únicamente cuando la proteína Far11 fuera fosforilada, probablemente en la Ser18, ya que este residuo es el que participa en los fenotipos dependientes de la expresión de la Caspasa-10, se produciría la activación del complejo fosfatasa (Pph3, Ptc2 y Ptc3), y por tanto la desfosforilación de Rad53. La participación de Far11 en el estado de fosforilación de Rad53 también podría estar regulado a través de Ptc2 y/o Ptc3, mediante una posible interacción entre Far11 y alguna de estas fosfatasas producida tras la expresión de la Caspasa-10, lo que supondría una activación de la actividad fosfatasa de este complejo (Pph3, Ptc2 y Ptc3) y que explicaría la inactivación del checkpoint de fase-S. Un dato a considerar entre las posibles interacciones de Far11 con Ptc2 y Ptc3 y la interacción física descrita en este trabajo de Far11 con Pph3 es la localización subcelular de cada una de estas proteínas. Las proteínas fosfatasas Pph3, Ptc2 y Ptc3 encargadas de desfosforilar Rad53 se pueden localizar en el citosol o en el núcleo (Saito, H. y Tatebayashi, K. 2004; Tate, J. J. *et al.* 2006) mientras que Far11 es una proteína que presenta tres dominios transmembrana (Kemp, H. A. y Sprague, G. F., Jr. 2003) y se localiza en el aparato de Golgi. Por tanto, la interacción de Far11 con estas fosfatasas tendría lugar en el dominio de Far11 situado hacia la cara citosólica del aparato de Golgi. Tras la fosforilación de Far11 y/o interacción con estas proteínas se produciría la activación del complejo fosfatasa (Pph3, Ptc2 y Ptc3) que se dirigiría desde el citosol al núcleo para participar en la desfosforilación de Rad53 (Zheng, P. *et al.* 1993).

Nuestros resultados demuestran que Far11 también está implicada en la regulación del estado de fosforilación de la proteína Atg13, que es indispensable en la etapa inicial del proceso de autofagia. El mecanismo desencadenante del proceso de autofagia es la hipofosforilación de las proteínas Atg1 y Atg13, suceso que permite la interacción entre ambas proteínas (Reggiori, F. *et al.* 2004). La hipofosforilación de Atg13 en nuestro modelo es patente a partir de las 8 horas de inducción de la expresión de la Caspasa-10 en *S. cerevisiae*. Este hecho parece indicar que entre las 2h-8h tras la inducción de la expresión de la Caspasa-10 se producen ciertos fenotipos apoptóticos como externalización de la fosfatidilserina, la condensación de la cromatina o la producción de altos niveles de estrés oxidativo y finalmente, a partir de las 6-8 horas, se

desencadena un proceso de muerte celular por autofagia. No obstante, las células de la cepa *Δfar11* son capaces de sobrevivir al efecto citotóxico de la Caspasa-10 ya que mantienen la proteína Atg13 hiperfosforilada, resultando *FAR11* esencial en el proceso de muerte celular llevado a cabo por la expresión de la Caspasa-10. La cepa *Δfar11* mantiene unos niveles elevados de fosforilación de la proteína Atg13, incluso tras el tratamiento de las células con rapamicina que inhibe Tor1 y, por tanto, no induce la autofagia, indicando que Far11 debe estar implicado en el proceso de autofagia participando, directa o indirectamente, en la regulación del estado de fosforilación de la proteína Atg13. En el proceso de inducción de la autofagia participa el complejo Tor1, que permanece bloqueado ante la ausencia de nutrientes en el medio, y también interviene la PKA, encargada de fosforilar directamente a Atg1 y Atg13 (Stephan, J. S. *et al.* 2009). La hiperfosforilación de Atg13 experimentada en la cepa *Δfar11* puede deberse a la fosforilación de esta proteína a través de una proteína quinasa o a la ausencia de defosforilación mediante el bloqueo de una proteína fosfatasa. Las células de la cepa que presenta *FAR11* silvestre responden adecuadamente al tratamiento con rapamicina mostrando una hipofosforilación de Atg13 dependiente del bloqueo de Tor1, diana específica de la rapamicina (Crespo, J. L. y Hall, M. N. 2002). El mismo resultado de hipofosforilación de Atg13 se obtuvo tras la expresión de la Caspasa-10 en la cepa silvestre, por lo que se podría pensar que la causa de la hipofosforilación de Atg13 y, por tanto, de la inducción del proceso de autofagia fuera la existencia de una fosfatasa capaz de retirar grupos fosfato de Atg13 y no la ausencia de fosforilación de Atg13 dependiente del complejo TOR o de la PKA. El mecanismo desencadenante del proceso de autofagia es la hipofosforilación de Atg13 ya que se ha demostrado que una forma no fosforilable de Atg13 es capaz de inducir autofagia (Kamada, Y. *et al.* 2010). Por tanto, el hecho de que pueda desencadenarse el proceso de autofagia en células en las que la PKA pudiera estar sobreactivada sugiere la idea de que pudiera existir una proteína fosfatasa que en ese contexto fuera capaz de retirar grupos fosfato de Atg13, dando lugar a una forma hipofosforilada de Atg13. De hecho, se ha sugerido la posibilidad de que Atg13 pueda ser defosforilado de forma selectiva en el PAS a través de mecanismos que se desconocen (Stephan, J. S. *et al.* 2010). Otros grupos de investigación han trabajado intentando identificar proteínas fosfatasas capaces de defosforilar a Atg13 en condiciones de falta de nutrientes sin obtener ningún resultado significativo (Kamada, Y. *et al.* 2010). Si la actividad de esta fosfatasa dependiera de Far11 se podría explicar fácilmente el hecho de que en la cepa *Δfar11* se observen unos niveles elevados de fosforilación de Atg13. Además esta hipótesis podría apoyar la función de los ortólogos de Far11 en humanos, Fam40A y Fam40B, que forman parte del complejo

STRIPAK junto con la proteína fosfatasa 2A (Goudreault, M. *et al.* 2009) y la proteína fosfatasa 2A (PP2A) regula negativamente la autofagia (Yorimitsu, T. *et al.* 2009).

En este trabajo se ha demostrado que Far11 participa en el proceso de muerte celular inducido por la expresión de la Caspasa-10 asociado, en la última etapa, a fenotipos de autofagia y se ha comprobado que Far11 interacciona con la proteína fosfatasa 2A, en concreto, con las subunidades catalíticas Pph21 y Pph22, y con la subunidad reguladora Tpd3. Los ortólogos de Far11 en humanos, Fam40A y Fam40B, forman parte de un complejo multiproteico donde también interaccionan con la PP2A a través de las estriatinas (Goudreault, M. *et al.* 2009). Además se determinó que los genes humanos *FAM40A* y *FAM40B* rescatan parcialmente la expresión de *FAR11*. Por tanto, estos resultados demuestran que la levadura *S. cerevisiae* constituye un buen instrumento de estudio para identificar los mecanismos moleculares en los que participan genes cuya función es todavía desconocida tanto en la levadura como en organismos superiores.

La inhibición del complejo Tor1 con rapamicina promueve la activación de la ruta de integridad mediante la fosforilación de Slt2 (Torres, J. *et al.* 2002), estableciendo una conexión entre el proceso de autofagia y la ruta de integridad. Algunos autores sugieren que la relación entre la activación del proceso de autofagia y la ruta de integridad podría deberse a la activación de Sit4, lo que provocaría la activación de la GTPasa de la ruta de integridad Rom2 encargada de desencadenar la cascada de transducción de señales conduciendo finalmente a la fosforilación de Slt2 (Torres, J. *et al.* 2002). En nuestro trabajo se ha determinado que la expresión de la Caspasa-10 promueve la fosforilación de Slt2; sin embargo, no se han identificado otros genes implicados en la ruta de integridad que sean esenciales en la toxicidad dependiente de la Caspasa-10. Otros autores proponen que la conexión entre ambos procesos reside en la proteína Sch9, que en condiciones fisiológicas es fosforilada por Tor1, bloqueando la fosforilación y, por tanto, la activación de Slt2 (Soulard, A. *et al.* 2010). En este sentido se podría pensar que la fosforilación de Slt2 y activación dependiente de la expresión de la Caspasa-10 se debe a la desfosforilación de Sch9.

La Caspasa-10 es una proteasa encargada de activar mediante proteólisis a las caspasas efectoras que son las que ejecutan el programa apoptótico en células de mamíferos (Wang, J. *et al.* 2001). Nuestros resultados demuestran que la toxicidad asociada a la expresión de la Caspasa-10 depende de la presencia de los residuos implicados en la actividad catalítica de la enzima.

Esto sugiere que los fenotipos derivados de la expresión de la Caspasa-10 se originan como consecuencia de la proteólisis de una o varias proteínas diana. Por lo tanto, parece lógico pensar que la diana de la Caspasa-10 en *S. cerevisiae* debería ser una proteína cuya ausencia causara la supresión del efecto citotóxico. Los resultados obtenidos muestran que la expresión de la Caspasa-10 promueve la activación de rutas MAPK y que un número importante de las proteínas que forman parte de estas rutas (Gpa1, Ste20, Ste11, Ste7, Fus3, Kss1 y Slt2), así como la mayoría de los miembros de la familia Far, resultan esenciales para la toxicidad de la Caspasa-10, poniendo de manifiesto que la activación simultánea o la sobreactivación de estas rutas de señalización podría ser el mecanismo molecular desencadenante de los demás fenotipos observados. La diana o dianas de la Caspasa-10 en *S. cerevisiae* podría ser alguna de las proteínas responsable de la activación de estas rutas MAPK. Además, se ha descrito que la Caspasa-3 de mamíferos, una vez activada por la Caspasa-8 o -10 es capaz de proteolizar a Mst1 que está codificada por el ortólogo de *STE20* en mamíferos (Graves, J. D. *et al.* 1998). Sin embargo, en este trabajo se ha comprobado que la Caspasa-10 no es capaz de proteolizar ni a Ste20, ni tampoco a Gpa1 (no se muestran los resultados), sugiriendo que el efecto de la Caspasa-10 sobre estas rutas de señalización podría tener lugar de forma indirecta a través de otra u otras proteínas que podrían formar parte o no de las rutas MAPK.

Los procesos de muerte celular por apoptosis y autofagia se encuentran interrelacionados a través de diferentes proteínas, entre ellas la Beclina-1, homóloga de Atg6 en mamíferos (Maiuri, M. C. *et al.*). Según el escrutinio llevado a cabo en este estudio el gen *ATG6* es también esencial en el proceso de muerte celular llevado a cabo por la expresión de la Caspasa-10, lo que sugiere que Atg6 también podría ser considerado como un de nexos de unión entre los fenotipos apoptóticos y autofágicos en *S. cerevisiae*. Se ha descrito que Atg6 puede considerarse como una diana específica de las caspasas humanas, ya que tras la expresión de las caspasas Atg6 es proteolizada y este efecto es rescatado mediante el uso de inhibidores específicos de estas cisteína proteasas (Cho, D. H. *et al.* 2009). Por otra parte, la activación de Atg6 en el proceso de autofagia puede ser debido a: i) la disociación del complejo formado por Atg6 junto con Vps38 (proteína del complejo fosfatilinositol II), como ocurre con Beclina-1/Bcl-2 (Sinha, S. y Levine, B. 2008) ii) la formación de una proteína Atg6 truncada como consecuencia de la proteólisis (Leber, B. y Andrews, D. W. 2010) o iii) modificaciones en el estado de fosforilación o ubiquitinación de esta proteína (Kang, R. *et al.* 2011). Sin embargo, el auténtico mecanismo molecular que permite la conexión entre los procesos de muerte celular por apoptosis y autofagia se desconoce hasta el momento. Según nuestro modelo de estudio se podría pensar que la

expresión de la Caspasa-10 podría promover la proteólisis de Atg6 al igual que ocurre con el homólogo de Atg6 (Beclina-1) en mamíferos (Djavaheri-Mergny, M. *et al.* 2010). A partir de ese momento se desencadenarían todos los fenotipos asociados a la expresión de esta caspasa conduciendo, finalmente, a la hipofosforilación de Atg13 y, por tanto, a un proceso de muerte celular por autofagia. Además, el hecho de que se hayan encontrado varios genes relacionados con la autofagia (*ATG1*, *ATG4*, *ATG8*, *ATG6* y *ATG13*) que son esenciales en el proceso de muerte celular desencadenado tras la expresión de la Caspasa-10 confirma la hipótesis de que estas células finalmente sufren un proceso de muerte celular por autofagia. La proteína Atg6 forma parte de los complejos Vps34-fosfatidilinositol-3-quinasa I y II durante los procesos de autofagia o ruta cvt, respectivamente (Kihara, A. *et al.* 2001). Otra posibilidad sería que la expresión de la Caspasa-10 en la célula actuara como un estímulo inductor de autofagia provocando la disociación de la proteína Atg6 del complejo Vps34-fosfatidilinositol-3-quinasa II pudiendo, por tanto, interactuar con Atg14, miembro del complejo Vps34-fosfatidilinositol-3-quinasa I, esencial para la formación del autofagosoma durante el proceso de autofagia (Kametaka, S. *et al.* 1998). De hecho se ha comprobado que en células humanas la disociación del complejo Beclina1-Bcl2 desencadena el proceso de muerte celular por autofagia (Sinha, S. y Levine, B. 2008).

El mecanismo molecular propuesto en relación con los resultados obtenidos en este trabajo consistiría en la activación de las rutas de señalización de respuesta a la feromona y de estrés de pared celular o ruta de integridad tras la expresión de la Caspasa-10 humana en *S. cerevisiae* conduciendo, por tanto, a la fosforilación de las MAPKs Fus3, Kss1 y Slt2, respectivamente. Probablemente alguna de estas MAPKs podría fosforilar a Far11, al menos en la Ser18, dando lugar a los distintos fenotipos asociados a la expresión de la Caspasa-10 como inactivación del checkpoint de fase-S, desestabilización del citoesqueleto de actina e inducción de procesos de autofagia. Far11, una vez fosforilado, participaría en la desfosforilación de Rad53 mediante una posible interacción con Pph3, Ptc2 y/o Ptc3, comportándose como un coactivador del complejo fosfatasa Pph3, Ptc2 y Ptc3 e inactivando el checkpoint de fase-S. Por otra parte Far11 estaría participando en la regulación del estado de fosforilación de Atg13 actuando, según nuestra hipótesis, bien como una posible proteína fosfatasa o bien activando a alguna fosfatasa capaz de desfosforilar a Atg13 y, por tanto, contribuyendo a la activación del proceso de muerte celular por autofagia. De forma paralela, se produciría una hiperactivación de la ruta PKA en respuesta a la expresión de la Caspasa-10, lo que conllevaría a la desestabilización del citoesqueleto de

actina originándose, a lo largo de todo este proceso de muerte celular, una producción masiva de estrés oxidativo (ROS) procedente probablemente del retículo endoplásmico (Figura 41).

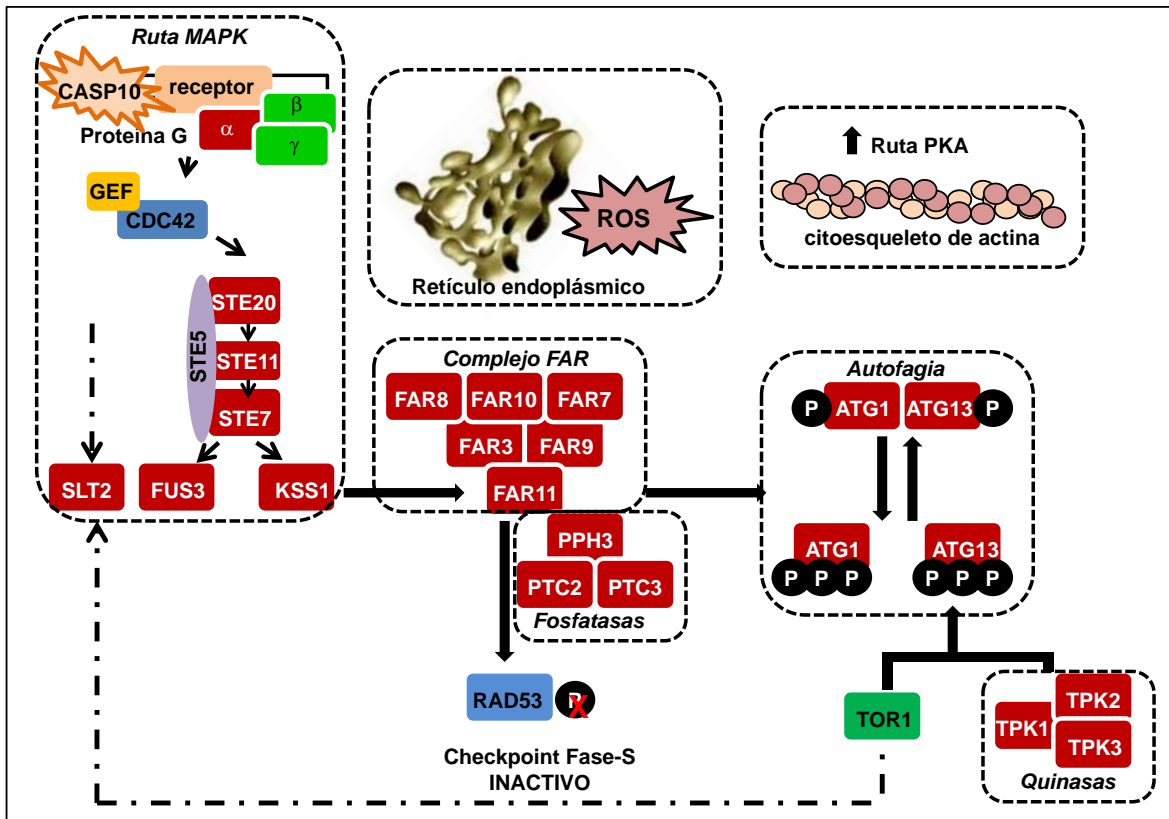


Figura 41. Hipótesis del mecanismo molecular desencadenado tras la expresión de la Caspasa-10 humana en la cepa silvestre de *S. cerevisiae*. Los recuadros de color rojo indican los genes esenciales en el proceso de muerte celular inducido por la expresión de la Caspasa-10 obtenidos tras el escrutinio.

V. Conclusiones

Los resultados descritos en este trabajo han permitido extraer las siguientes conclusiones:

1. La expresión de la Caspasa-8 o la Caspasa-10 humanas en *S. cerevisiae* induce muerte celular. Este tipo de muerte celular es dependiente de la actividad caspasa e independiente de la maquinaria apoptótica de la levadura y está asociada a fenotipos de apoptosis como externalización de la fosfatidilserina, producción masiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), condensación de la cromatina y de autofagia como incremento en el número y tamaño de las vacuolas.
2. En un escrutinio genético realizado en *S. cerevisiae* se han identificado genes supresores de la letalidad inducida por la Caspasa-10 humana pertenecientes a diferentes categorías funcionales: familia de genes *FAR* (*FAR3*, *FAR7*, *FAR8*, *FAR9*, *FAR10* y *FAR11*), componentes de rutas de señalización de MAPKs (*GPA1*, *STE20*, *STE11*, *STE7*, *FUS3*, *KSS1* y *SLT2*), otros genes con actividades fosfatasa-quinasa (*PPH21*, *PPH22*, *PPH3*, *PTC2*, *PTC3*, *TPK1*, *TPK2* y *TPK3*) y genes implicados en procesos de autofagia (*ATG1*, *ATG4*, *ATG8*, *ATG6* y *ATG13*), entre otros.
3. Las proteínas de la familia Far (Far3, Far7, Far9 y Far11) se localizan en el sistema de endomembranas, entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi.
4. El gen *FAR11* es esencial en el proceso de muerte celular inducido por la expresión de la Caspasa-10 y su delección suprime los fenotipos causados por la expresión de la Caspasa-10 humana en *S. cerevisiae*.
5. La expresión de la Caspasa-10 promueve la activación de diferentes rutas MAPK: la ruta de respuesta a la feromona y ruta de integridad o de estrés de pared celular.
6. La proteína Far11 participa en el proceso de muerte celular por autofagia y en la inactivación del checkpoint de fase-S mediante la regulación del estado de fosforilación de las proteínas Atg13 y Rad53, respectivamente.
7. Far11 interacciona físicamente con los homólogos de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) en levaduras: Pph21, Pph22, Pph3 y Tpd3.

VI. Materiales y Métodos

VI.1. MATERIAL BIOLÓGICO

VI.1.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Tabla 4. Cepas de <i>S. cerevisiae</i>		
Nombre de la cepa	Genotipo	Procedencia
BY4741	<i>MAT a, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i>	Euroscarf
BY4741/ pESC-URA	<i>MAT a, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i> + pESC-URA	Este estudio
BY4741/pESC-URA_CASP10_vD	<i>MAT a, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i> + pESC- URA_ CASP10_vD	Este estudio
BY4741/ pESC-LEU	<i>MAT a, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i> + pESC-LEU	Este estudio
BY4741/ pESC-LEU_CASP8_vC	<i>MAT a, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i> + pESC-LEU_ CASP8_vC	Este estudio
BY4741/ pESC-LEU_CASP8_vS	<i>MAT a, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i> + pESC-LEU_ CASP8_vS	Este estudio
<i>Δfar11</i>	<i>MAT a, his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0;</i> <i>YNL127w::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δfar11</i> / pESC-URA	<i>MTAT a, his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0;</i> <i>YNL127w::kanMX4</i> + pESC-URA	Este estudio
<i>Δfar11</i> / pESC-URA_CASP10_vD	<i>MAT a, his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0;</i> <i>YNL127w::kanMX4</i> + pESC-URA_CASP10_vD	Este estudio
<i>Δfar11</i> / pESC-URA/ YcpLac111	<i>MAT a, his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0;</i> <i>YNL127w::kanMX4</i> + pESC-URA + YcpLac111	Este estudio
<i>Δfar11</i> / pESC-URA_CASP10_vD/ YcpLac111_FAR11	<i>MAT a, his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0;</i> <i>YNL127w::kanMX4</i> + pESC-URA_CASP10_vD + YcpLac111_FAR11	Este estudio
<i>Δfar11</i> / pESC-URA_CASP10_vD/ YcpLac111_FAM40A	<i>MAT a, his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0;</i> <i>YNL127w::kanMX4</i> + pESC-URA_CASP10_vD + YcpLac111_FAM40A	Este estudio
<i>Δfar11</i> / pESC-URA_CASP10_vD/ YcpLac111_FAM40B	<i>MAT a, his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0;</i> <i>YNL127w::kanMX4</i> + pESC-URA_CASP10_vD + YcpLac111_FAM40B	Este estudio
<i>Δste20</i>	<i>MAT a, his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0;</i> <i>YHL007c::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δste20</i> / pESC-URA_CASP10_vD	<i>MAT a, his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0;</i> <i>YHL007c::kanMX4</i> + pESC-URA_CASP10_vD	Este estudio
<i>Δgpa1</i>	<i>MAT a, his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0;</i> <i>YHR005c::kanMX4</i>	Este estudio
<i>Δgpa1</i> / pESC-URA_CASP10_vD	<i>MAT a, his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0;</i> <i>YHR005c::kanMX4</i> + pESC-URA_CASP10_vD	Este estudio
<i>Δste11</i>	<i>MAT a, his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0;</i> <i>YLR362w::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δste11</i> / pESC-URA_CASP10_vD	<i>MAT a, his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0;</i> <i>YLR362w::kanMX4</i> + pESC-URA_CASP10_vD	Este estudio
<i>Δste7</i>	<i>MAT a, his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0;</i> <i>YDL159w::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δste7</i> / pESC-URA_CASP10_vD	<i>MAT a, his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0;</i> <i>YDL159w::kanMX4</i> + pESC-URA_CASP10_vD	Este estudio
<i>Δfus3</i>	<i>MAT a, his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0;</i> <i>YBL016w::kanMX4</i>	Euroscarf

Tabla 4. Continuación

<i>Δfus3/</i> pESC-URA	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Este estudio
<i>Δfus3/</i> pESC-URA_CASP10_vD	<i>YBL016w::kanMX4+</i> pESC-URA	
	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Este estudio
	<i>YBL016w::kanMX4+</i> pESC-URA_CASP10_vD	
<i>Δkss1</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Euroscarf
	<i>YGR040w::kanMX4</i>	
<i>Δkss1/</i> pESC-URA	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Este estudio
	<i>YGR040w::kanMX4+</i> pESC-URA	
<i>Δkss1/</i> pESC-URA_CASP10_vD	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Este estudio
	<i>YGR040w::kanMX4+</i> pESC-URA_CASP10_vD	
<i>Δfar1</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Euroscarf
	<i>YJL157c::kanMX4</i>	
<i>Δfar1/</i> pESC-URA_CASP10_vD	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Este estudio
	<i>YJL157c::kanMX4+</i> pESC-URA_CASP10_vD	
<i>Δfar3</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Euroscarf
	<i>YMR052w::kanMX4</i>	
<i>Δfar3/</i> pESC-URA_CASP10_vD	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Este estudio
	<i>YMR052w::kanMX4+</i> pESC-URA_CASP10_vD	
<i>Δfar7</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Euroscarf
	<i>YFR008w::kanMX4</i>	
<i>Δfar7/</i> pESC-URA_CASP10_vD	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Este estudio
	<i>YFR008w::kanMX4+</i> pESC-URA_CASP10_vD	
<i>Δfar8</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Euroscarf
	<i>YMR029c::kanMX4</i>	
<i>Δfar8/</i> pESC-URA_CASP10_vD	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Este estudio
	<i>YMR029c::kanMX4+</i> pESC-URA_CASP10_vD	
<i>Δfar9</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Euroscarf
	<i>YDR200c::kanMX4</i>	
<i>Δfar9/</i> pESC-URA_CASP10_vD	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Este estudio
	<i>YDR200c::kanMX4+</i> pESC-URA_CASP10_vD	
<i>Δfar10</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Euroscarf
	<i>YLR238w::kanMX4</i>	
<i>Δfar10/</i> pESC-URA_CASP10_vD	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Este estudio
	<i>YLR238w::kanMX4+</i> pESC-URA_CASP10_vD	
<i>Δslt2</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Euroscarf
	<i>YHR030c::kanMX4</i>	
<i>Δslt2/</i> pESC-URA	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Este estudio
	<i>YHR030c::kanMX4+</i> pESC-URA	
<i>Δslt2/</i> pESC-URA_CASP10_vD	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Este estudio
	<i>YHR030c::kanMX4+</i> pESC-URA_CASP10_vD	
<i>Δmsn2</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Euroscarf
	<i>YMR037c::kanMX4</i>	
<i>Δmsn2/</i> pESC-URA_CASP10_vD	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Este estudio
	<i>YMR037c::kanMX4+</i> pESC-URA_CASP10_vD	
<i>Δatg1</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Euroscarf
	<i>YGL180w::kanMX4</i>	
<i>Δatg1/</i> pESC-URA_CASP10_vD	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Este estudio
	<i>YGL180w::kanMX4+</i> pESC-URA_CASP10_vD	
<i>Δatg4</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Euroscarf
	<i>YNL223w::kanMX4</i>	
<i>Δatg4/</i> pESC-URA_CASP10_vD	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ;	Este estudio
	<i>YNL223w::kanMX4+</i> pESC-URA_CASP10_vD	

Tabla 4. Continuación

<i>Δatg6</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YPL120w::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δatg6/ pESC-URA_CASP10_vD</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YPL120w::kanMX4</i> + pESC-URA_CASP10_vD	Este estudio
<i>Δatg8/ pESC-URA_CASP10_vD</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YBL078c::kanMX4</i> + pESC-URA_CASP10_vD	Este estudio
<i>Δtpk1</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YGL164c::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δtpk1/ pESC-URA_CASP10_vD</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YGL164c::kanMX4</i> + pESC-URA_CASP10_vD	Este estudio
<i>Δtpk2</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YPL203w::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δtpk2/ pESC-URA_CASP10_vD</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YPL203w::kanMX4</i> + pESC-URA_CASP10_vD	Este estudio
<i>Δtpk3</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YKL166c::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δtpk3/ pESC-URA_CASP10_vD</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YKL166c::kanMX4</i> + pESC-URA_CASP10_vD	Este estudio
<i>Δpph21</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YDL134c::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δpph21/ pESC-URA_CASP10_vD</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YDL134c::kanMX4</i> + pESC-URA_CASP10_vD	Este estudio
<i>Δpph22</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YDL188c::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δpph22/ pESC-URA_CASP10_vD</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YDL188c::kanMX4</i> + pESC-URA_CASP10_vD	Este estudio
<i>Δpph3</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YDR075w::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δpph3/ pESC-URA_CASP10_vD</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YDR075w::kanMX4</i> + pESC-URA_CASP10_vD	Este estudio
<i>Δgln3</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YER040w::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δgln3/ pESC-URA_CASP10_vD</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YER040w::kanMX4</i> + pESC-URA_CASP10_vD	Este estudio
<i>Δptc2</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YER089c::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δptc2/ pESC-URA_CASP10_vD</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YER089c::kanMX4</i> + pESC-URA_CASP10_vD	Este estudio
<i>Δptc3</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YBL056w::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δptc3/ pESC-URA_CASP10_vD</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YBL056w::kanMX4</i> + pESC-URA_CASP10_vD	Este estudio
<i>Δatg13</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YPR185w::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δatg13/ pESC-URA/ pRS315_HA-ATG13</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YPR185w::kanMX4</i> + pESC-URA + pRS315_HA-ATG13	Este estudio
<i>Δatg13/ pESC-URA_CASP10_vD/ pRS315_HA-ATG13</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YPR185w::kanMX4</i> + pESC-URA_CASP10_vD + pRS315_HA-ATG13	Este estudio
<i>Δfar11/ pESC-URA/ pRS315_HA-ATG13</i>	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YNL127w::kanMX4</i> + pESC-URA + pRS315_HA-ATG13	Este estudio

Tabla 4. Continuación

<i>Δfar11/ pESC-URA_CASP10_vD/ pRS315_HA-ATG13</i>	MAT a , <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YNL127w::kanMX4+ pESC-URA_CASP10_vD + pRS315_HA-ATG13</i>	Este estudio
<i>Δcup9/ pESC-URA_CASP10_vD</i>	MAT a , <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YPL177c::kanMX4+ pESC-URA_CASP10_vD</i>	Este estudio
<i>Δaim9/ pESC-URA_CASP10_vD</i>	MAT a , <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YER080w::kanMX4+ pESC-URA_CASP10_vD</i>	Este estudio
<i>Δcwp1</i>	MAT a , <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YKL096w::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δcwp1/ pESC-URA_CASP10_vD</i>	MAT a , <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YKL096w::kanMX4+ pESC-URA_CASP10_vD</i>	Este estudio
<i>Δmbr1</i>	MAT a , <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YKL093w::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δmbr1/ pESC-URA_CASP10_vD</i>	MAT a , <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YKL093w::kanMX4+ pESC-URA_CASP10_vD</i>	Este estudio
<i>Δort1</i>	MAT a , <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YOR130c::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δort1/ pESC-URA_CASP10_vD</i>	MAT a , <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YOR130c::kanMX4+ pESC-URA_CASP10_vD</i>	Este estudio
<i>Δbfr1</i>	MAT a , <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YOR198c::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δbfr1/ pESC-URA_CASP10_vD</i>	MAT a , <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YOR198c::kanMX4+ pESC-URA_CASP10_vD</i>	Este estudio
<i>Δmdm30</i>	MAT a , <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YLR368w::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δmdm30/ pESC-URA_CASP10_vD</i>	MAT a , <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YLR368w::kanMX4+ pESC-URA_CASP10_vD</i>	Este estudio
<i>Δwhi3</i>	MAT a , <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YNL197c::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δwhi3/ pESC-URA_CASP10_vD</i>	MAT a , <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YNL197c::kanMX4+ pESC-URA_CASP10_vD</i>	Este estudio
<i>Δasg1</i>	MAT a , <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YIL130w::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δasg1/ pESC-URA_CASP10_vD</i>	MAT a , <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YIL130w::kanMX4+ pESC-URA_CASP10_vD</i>	Este estudio
<i>Δpmt5</i>	MAT a , <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YDL093w::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δpmt5/ pESC-URA_CASP10_vD</i>	MAT a , <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YDL093w::kanMX4+ pESC-URA_CASP10_vD</i>	Este estudio
<i>Δrpl21b</i>	MAT a , <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YPL079w::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δrpl21b/ pESC-URA_CASP10_vD</i>	MAT a , <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YPL079w::kanMX4+ pESC-URA_CASP10_vD</i>	Este estudio
<i>Δldb18</i>	MAT a , <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YLL049w::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>Δldb18/ pESC-URA_CASP10_vD</i>	MAT a , <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YLL049w::kanMX4+ pESC-URA_CASP10_vD</i>	Este estudio
BY4741/ <i>FAR11_ YeVenus</i>	MAT a , <i>his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0; kanMX4</i>	Este estudio
BY4741/ <i>FAR3 _ CFP</i>	MAT a , <i>his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0; kanMX4</i>	Este estudio
BY4741/ <i>FAR7_ GFP</i>	MAT a , <i>his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0; kanMX4</i>	Este estudio
BY4741/ <i>FAR9_ CFP</i>	MAT a , <i>his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0; kanMX4</i>	Este estudio
BY4742	MAT α , <i>his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0</i>	Euroscarf

Tabla 4. Continuación

BY4743/ <i>FAR11_</i> YeVenus/ <i>CHC1_RFP</i>	MAT a/α , <i>his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0;</i> <i>met1.5Δ0/MET15; LYS2/lys2Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0</i>	Este estudio
BY4743/ <i>FAR3_CFP/COPI_RFP</i>	MAT a/α , <i>his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0;</i> <i>met1.5Δ0/MET15; LYS2/lys2Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0</i>	Este estudio
BY4743/ <i>FAR9_CFP/SEC13_RFP</i>	MAT a/α , <i>his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0;</i> <i>met1.5Δ0/MET15; LYS2/lys2Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0</i>	Este estudio
BY4743/ <i>FAR7_GFP/ARPI_RFP</i>	MAT a/α , <i>his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0;</i> <i>met1.5Δ0/MET15; LYS2/lys2Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0</i>	Este estudio
BY4743/ <i>FAR7_GFP/CHC1_RFP</i>	MAT a/α , <i>his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0;</i> <i>met1.5Δ0/MET15; LYS2/lys2Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0</i>	Este estudio
BY4743/ <i>FAR11_</i> YeVenus/ <i>FAR3_CFP</i>	MAT a/α , <i>his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, met15Δ0/</i> <i>lys2Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0</i>	Este estudio
BY4743/ <i>FAR11_</i> YeVenus/ <i>FAR9_CFP</i>	MAT a/α , <i>his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, met15Δ0/</i> <i>lys2Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0</i>	Este estudio
BY4742/ <i>ARPI_RFP</i>	MAT α , <i>his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0; kanMX6</i>	Invitrogen
BY4742/ <i>COPI_RFP</i>	MAT α , <i>his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0; kanMX6</i>	Invitrogen
BY4742/ <i>CHC1_RFP</i>	MAT α , <i>his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0; kanMX6</i>	Invitrogen
BY4742/ <i>SEC13_RFP</i>	MAT α , <i>his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0; kanMX6</i>	Invitrogen
BY4743/ <i>FAR9_CFP/SEC13_RFP/</i> <i>pESC-URA</i>	MAT a/α , <i>his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0;</i> <i>met1.5Δ0/MET15; LYS2/lys2Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0 +</i> <i>pESC-URA</i>	Este estudio
BY4743/ <i>FAR9_CFP/SEC13_RFP/</i> <i>pESC-URA/ CASP10_vD</i>	MAT a/α , <i>his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0;</i> <i>met1.5Δ0/MET15; LYS2/lys2Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0 +</i> <i>pESC-URA/ CASP10_vD</i>	Este estudio
BY4741/ <i>FAR11_VC/</i> pGILDA	MAT a , <i>his3Δ1, leu2Δ0, met1.5Δ0, ura3Δ0 +</i> pGILDA	Este estudio
BY4741/ <i>FAR11_VC/</i> <i>pGILDA_CASP10_vD</i>	MAT a , <i>his3Δ1, leu2Δ0, met1.5Δ0, ura3Δ0 +</i> pGILDA_ <i>CASP10_vD</i>	Este estudio
THY.AP5/ <i>PPH21_VN</i>	MAT α , <i>his3Δ1, leu2Δ0, trp1Δ0, loxP::ade2</i>	Este estudio
THY.AP5/ <i>PPH22_VN</i>	MAT α , <i>his3Δ1, leu2Δ0, trp1Δ0, loxP::ade2</i>	Este estudio
THY.AP5/ <i>PPH3_VN</i>	MAT α , <i>his3Δ1, leu2Δ0, trp1Δ0, loxP::ade2</i>	Este estudio
THY.AP5/ <i>FAR3_VN</i>	MAT α , <i>his3Δ1, leu2Δ0, trp1Δ0, loxP::ade2</i>	Este estudio
THY.AP5/ <i>TPD3_VN</i>	MAT α , <i>his3Δ1, leu2Δ0, trp1Δ0, loxP::ade2</i>	Este estudio
BY4741/ <i>FAR11_VC/</i> pGILDA// <i>THY.AP5/ PPH21_VN</i>	MAT a/α , <i>his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/</i> <i>leu2Δ0, met1.5Δ0/MET15, ura3Δ0/URA3, trp1Δ0/ TRP1,</i> <i>loxP::ade2 +</i> pGILDA	Este estudio
BY4741/ <i>FAR11_VC/</i> pGILDA// <i>THY.AP5/ PPH22_VN</i>	MAT a/α , <i>his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0,</i> <i>met1.5Δ0/MET15, ura3Δ0/URA3, trp1Δ0/ TRP1,</i> <i>loxP::ade2 +</i> pGILDA	Este estudio
BY4741/ <i>FAR11_VC/</i> pGILDA// <i>THY.AP5/ FAR3_VN</i>	MAT a/α , <i>his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, met15Δ0/MET15,</i> <i>ura3Δ0/URA3, trp1Δ0/ TRP1, loxP::ade2 +</i> pGILDA	Este estudio
BY4741/ <i>FAR11_VC/</i> pGILDA// <i>THY.AP5/ TPD3_VN</i>	MAT a/α , <i>his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/</i> <i>leu2Δ0, met1.5Δ0/MET15, ura3Δ0/URA3, trp1Δ0/ TRP1,</i> <i>loxP::ade2 +</i> pGILDA	Este estudio
BY4741/ <i>FAR11_VC/</i> <i>pGILDA_CASP10_vD //</i> <i>THY.AP5/ PPH21_VN</i>	MAT a/α , <i>his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0,</i> <i>met1.5Δ0/MET15, ura3Δ0/URA3, trp1Δ0/ TRP1,</i> <i>loxP::ade2 +</i> pGILDA_ <i>CASP10_vD</i>	Este estudio
BY4741/ <i>FAR11_VC/</i> <i>pGILDA_CASP10_vD //</i> <i>THY.AP5/ PPH22_VN</i>	MAT a/α , <i>his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0,</i> <i>met1.5Δ0/MET15, ura3Δ0/URA3, trp1Δ0/ TRP1,</i> <i>loxP::ade2 +</i> pGILDA_ <i>CASP10_vD</i>	Este estudio
BY4741/ <i>FAR11_VC/</i> <i>pGILDA_CASP10_vD //</i> <i>THY.AP5/ PPH3_VN</i>	MAT a/α , <i>his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0,</i> <i>met1.5Δ0/MET15, ura3Δ0/URA3, trp1Δ0/ TRP1,</i> <i>loxP::ade2 +</i> pGILDA_ <i>CASP10_vD</i>	Este estudio

Tabla 4. Continuación

BY4741/ <i>FAR11_VC</i> / pGILDA_ <i>CASP10_vD</i> // THY.AP5/ <i>TPD3_VN</i>	MAT a/α , <i>his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, met15Δ0/MET15, ura3Δ0/URA3, trp1Δ0/TRP1, loxP::ade2</i> + pGILDA_ <i>CASP10_vD</i>	Este estudio
THY.AP4	MAT a , <i>leu2Δ0, ura3Δ0, lexA::lacZ::trp1 lexA::HIS3 lexA::ADE2</i>	Este estudio
THY.AP5	MAT α , <i>his3Δ1, leu2Δ0, trp1Δ0, loxP::ade2</i>	Este estudio
THY.AP4 + pMetYCgate_ <i>FAR11</i>	MAT a , <i>leu2Δ0, ura3Δ0, lexA::lacZ::trp1 lexA::HIS3 lexA::ADE2</i> + pMetYCgate_ <i>FAR11</i>	Este estudio
THY.AP5 + pXN-gate_ <i>PPH21</i>	MAT α , <i>his3Δ1, leu2Δ0, trp1Δ0, loxP::ade2</i> + pXN-gate_ <i>PPH21</i>	Este estudio
THY.AP5 + pXN-gate_ <i>PPH22</i>	MAT α , <i>his3Δ1, leu2Δ0, trp1Δ0, loxP::ade2</i> + pXN-gate_ <i>PPH22</i>	Este estudio
THY.AP5 + pXN-gate_ <i>PPH3</i>	MAT α , <i>his3Δ1, leu2Δ0, trp1Δ0, loxP::ade2</i> + pXN-gate_ <i>PPH3</i>	Este estudio
THY.AP5 + pXN-gate_ <i>FAR3</i>	MAT α , <i>his3Δ1, leu2Δ0, trp1Δ0, loxP::ade2</i> + pXN-gate_ <i>FAR3</i>	Este estudio
THY.AP5 + pXN-gate_ <i>TPD3</i>	MAT α , <i>his3Δ1, leu2Δ0, trp1Δ0, loxP::ade2</i> + pXN-gate_ <i>TPD3</i>	Este estudio
THY.AP5 + pXN-gate 3HA_ <i>PPH21</i>	MAT α , <i>his3Δ1, leu2Δ0, trp1Δ0, loxP::ade2</i> + pXN-gate 3HA_ <i>PPH21</i>	Este estudio
THY.AP5 + pXN-gate 3HA_ <i>PPH22</i>	MAT α , <i>his3Δ1, leu2Δ0, trp1Δ0, loxP::ade2</i> + pXN-gate 3HA_ <i>PPH22</i>	Este estudio
THY.AP5 + pXN-gate 3HA_ <i>PPH3</i>	MAT α , <i>his3Δ1, leu2Δ0, trp1Δ0, loxP::ade2</i> + pXN-gate 3HA_ <i>PPH3</i>	Este estudio
THY.AP5 + pXN-gate 3HA_ <i>FAR3</i>	MAT α , <i>his3Δ1, leu2Δ0, trp1Δ0, loxP::ade2</i> + pXN-gate 3HA_ <i>FAR3</i>	Este estudio
THY.AP5 + pXN-gate 3HA_ <i>TPD3</i>	MAT α , <i>his3Δ1, leu2Δ0, trp1Δ0, loxP::ade2</i> + pXN-gate 3HA_ <i>TPD3</i>	Este estudio
THY.AP4 + pMetYCgate_ <i>FAR11</i> // THY.AP5 + pXN-gate_ <i>PPH21</i>	MAT a/α , <i>his3Δ1/HIS3, leu2Δ0/leu2Δ0, trp1Δ0/TRP1 ura3Δ0/URA3, loxP::ade2, lexA::lacZ::trp1 lexA::HIS3 lexA::ADE2</i> + pMetYCgate_ <i>FAR11</i> + pXN-gate_ <i>PPH21</i>	Este estudio
THY.AP4 + pMetYCgate_ <i>FAR11</i> // THY.AP5 + pXN-gate_ <i>PPH22</i>	MAT a/α , <i>his3Δ1/HIS3, leu2Δ0/leu2Δ0, trp1Δ0/TRP1 ura3Δ0/URA3, loxP::ade2, lexA::lacZ::trp1 lexA::HIS3 lexA::ADE2</i> + pMetYCgate_ <i>FAR11</i> + pXN-gate_ <i>PPH22</i>	Este estudio
THY.AP4 + pMetYCgate_ <i>FAR11</i> // THY.AP5 + pXN-gate_ <i>PPH3</i>	MAT a/α , <i>his3Δ1/HIS3, leu2Δ0/leu2Δ0, trp1Δ0/TRP1 ura3Δ0/URA3, loxP::ade2, lexA::lacZ::trp1 lexA::HIS3 lexA::ADE2</i> + pMetYCgate_ <i>FAR11</i> + pXN-gate_ <i>PPH3</i>	Este estudio
THY.AP4 + pMetYCgate_ <i>FAR11</i> // THY.AP5 + pXN-gate_ <i>FAR3</i>	MAT a/α , <i>his3Δ1/HIS3, leu2Δ0/leu2Δ0, trp1Δ0/TRP1 ura3Δ0/URA3, loxP::ade2, lexA::lacZ::trp1 lexA::HIS3 lexA::ADE2</i> + pMetYCgate_ <i>FAR11</i> + pXN-gate_ <i>FAR3</i>	Este estudio
THY.AP4 + pMetYCgate_ <i>FAR11</i> // THY.AP5 + pXN-gate_ <i>TPD3</i>	MAT a/α , <i>his3Δ1/HIS3, leu2Δ0/leu2Δ0, trp1Δ0/TRP1 ura3Δ0/URA3, loxP::ade2, lexA::lacZ::trp1 lexA::HIS3 lexA::ADE2</i> + pMetYCgate_ <i>FAR11</i> + pXN-gate_ <i>TPD3</i>	Este estudio
THY.AP4 + pMetYCgate_ <i>FAR11</i> + <i>CASP10_vD</i>	MAT a , <i>leu2Δ0, ura3Δ0, lexA::lacZ::trp1 lexA::HIS3 lexA::ADE2</i> + pMetYCgate_ <i>FAR11</i> + <i>CASP10_vD</i>	Este estudio
THY.AP4 + pMetYCgate_ <i>FAR11</i> + <i>CASP10_vD</i> // THY.AP5 + pXN- gate_ <i>PPH21</i>	MAT a/α , <i>his3Δ1/HIS3, leu2Δ0/leu2Δ0, trp1Δ0/TRP1 ura3Δ0/URA3, loxP::ade2, lexA::lacZ::trp1 lexA::HIS3 lexA::ADE2</i> + pMetYCgate_ <i>FAR11</i> + <i>CASP10_vD</i> + pXN-gate_ <i>PPH21</i>	Este estudio
THY.AP4 + pMetYCgate_ <i>FAR11</i> + <i>CASP10_vD</i> // THY.AP5 + pXN- gate_ <i>PPH22</i>	MAT a/α , <i>his3Δ1/HIS3, leu2Δ0/leu2Δ0, trp1Δ0/TRP1 ura3Δ0/URA3, loxP::ade2, lexA::lacZ::trp1 lexA::HIS3 lexA::ADE2</i> + pMetYCgate_ <i>FAR11</i> + <i>CASP10_vD</i> + pXN-gate_ <i>PPH22</i>	Este estudio

Tabla 4. Continuación

THY.AP4 + pMetYCgate_FAR11 + CASP10_vD // THY.AP5 + pXN-gate_PPH3	MAT a/α , <i>his3Δ1/HIS3</i> , <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> , <i>trp1Δ0/TRP1</i> , <i>ura3Δ0/URA3</i> , <i>loxP::ade2</i> , <i>lexA::lacZ::trp1</i> <i>lexA::HIS3</i> <i>lexA::ADE2</i> + pMetYCgate_FAR11+ CASP10_vD + pXN-gate_PPH3	Este estudio
THY.AP4 + pMetYCgate_FAR11 + CASP10_vD // THY.AP5 + pXN-gate_FAR3	MAT a/α , <i>his3Δ1/HIS3</i> , <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> , <i>trp1Δ0/TRP1</i> , <i>ura3Δ0/URA3</i> , <i>loxP::ade2</i> , <i>lexA::lacZ::trp1</i> <i>lexA::HIS3</i> <i>lexA::ADE2</i> + pMetYCgate_FAR11+ CASP10_vD + pXN-gate_FAR3	Este estudio
THY.AP4 + pMetYCgate_FAR11 + CASP10_vD // THY.AP5 + pXN-gate_TPD3	MAT a/α , <i>his3Δ1/HIS3</i> , <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> , <i>trp1Δ0/TRP1</i> , <i>ura3Δ0/URA3</i> , <i>loxP::ade2</i> , <i>lexA::lacZ::trp1</i> <i>lexA::HIS3</i> <i>lexA::ADE2</i> + pMetYCgate_FAR11+ CASP10_vD + pXN-gate_TPD3	Este estudio
<i>Δfar11</i> / pESC-URA/ YcpLac111_FAR11.S18A	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>NLI27w::kanMX4</i> + pESC-URA +YcpLac111_FAR11.S18A	Este estudio
<i>Δfar11</i> / pESC-URA_CASP10_vD/ YcpLac111_FAR11.S18A	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YNLI27w::kanMX4</i> + pESC-URA_CASP10_vD + YcpLac111_FAR11.S18A	Este estudio
<i>Δfar11</i> / pESC-URA/ YcpLac111_FAR11.S81A	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YNLI27w::kanMX4</i> + pESC-URA + YcpLac111_FAR11. S81A	Este estudio
<i>Δfar11</i> / pESC-URA_CASP10_vD/ YcpLac111_FAR11.S81A	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YNLI27w::kanMX4</i> + pESC-URA_CASP10_vD + YcpLac111_FAR11.S81A	Este estudio
<i>Δfus3</i> / pESC-URA/ YcpLac111_FUS3-GFP	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YBL016w::kanMX4</i> + pESC-URA+ YcpLac111_FUS3-GFP	Este estudio
<i>Δfus3</i> / pESC-URA_CASP10_vD/ YcpLac111_FUS3-GFP	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YBL016w::kanMX4</i> + pESC-URA_CASP10_vD + YcpLac111_FUS3-GFP	Este estudio
<i>Δatg8</i> /pUG36_ATG8- GFP/pGILDA	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YBL078c::kanMX4</i> + pUG36_ATG8-GFP + pGILDA	Este estudio
<i>Δatg8</i> /pUG36_ATG8-GFP/ pGILDA_CASP10_vD	MAT a , <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>YBL078c::kanMX4</i> + pUG36_ATG8-GFP + pGILDA_CASP10_vD	Este estudio

VI.1.2. Cepas de *E.coli*

La cepa empleada para la transformación bacteriana fue DH5α. Su genotipo es *fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17* (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD, USA).

VI.2. MANTENIMIENTO Y PROPAGACIÓN DE MICROORGANISMOS

Todos los organismos empleados y obtenidos a lo largo de este trabajo se mantienen en 25% glicerol a -80°C.

VI.2.1. *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* se cultivaron habitualmente a 37°C. En los casos en que los cultivos se realizaron en medios líquidos se sometieron a una agitación de 200 r.p.m. Los diferentes medios de crecimiento que se emplearon así como su composición se detallan a continuación:

LB: 0.5% extracto de levadura, 1% bactotripton y 1% NaCl. Este medio fue el más comúnmente utilizado para el crecimiento de *E. coli*.

Los medios sólidos contenían agar 1,5%. El medio de LB fue suplementado, cuando fue necesario, con el antibiótico de ampicilina a una concentración de 100 µg/ml.

VI.2.2. *Saccharomyces cerevisiae*

El cultivo de *S. cerevisiae* se llevó a cabo a 28°C en los medios que se detallan a continuación:

YPD: 1% extracto de levadura, 2% bactopectona y 2% glucosa.

YPG: 1% extracto de levadura, 2% bactopectona, 2% rafinosa (BD Difco™) y 2% galactosa (Formedium).

SD: 0,67% base nitrogenada de levadura (BD Difco™), 2% glucosa (BD Difco™) y suplementado con los requerimientos correspondientes en función de la cepa utilizada en cada caso.

SG: 0,67% base nitrogenada de levadura (BD Difco™), 2% rafinosa (BD Difco™), 2% galactosa (Formedium) y suplementado con los requerimientos correspondientes en función de la cepa utilizada en cada caso.

Según las auxotrofías presentes en cada cepa de levadura, los medios SD y/o SG fueron suplementados con los siguientes requerimientos:

CSM-URA 0,770 g/l (Formedium)

CSM-LEU 0,69 g/l (Formedium)

CSM-URA-LEU 0,67 g/l (Formedium)

CSM-HIS-URA 0,75 g/l (Formedium)

CSM-TRP-LEU 0,865 g/l (Formedium)

CSM-MET-LYS 0,865 g/l (Formedium)

Todos los medios sólidos contenían 2% agar (Pronadisa).

VI.3. VECTORES Y OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS

VI.3.1. Vectores

Los vectores utilizados en este trabajo han sido los siguientes:

Tabla 5. Vectores		
Nombre del plásmido	Marcador	Procedencia
pESC-URA	URA3 episómico	Stratagene
pESC-URA_CASP10_D	URA3 episómico	Este estudio
pESC-URA_CASP10_D.219A	URA3 episómico	Este estudio
pESC-URA_CASP10_D.401G	URA3 episómico	Este estudio
pESC-URA_CASP10_D.416A	URA3 episómico	Este estudio
pESC-LEU	LEU2 episómico	Stratagene
pESC-LEU_CASP8_C	LEU2 episómico	Este estudio
pESC-LEU_CASP8_S	LEU2 episómico	Este estudio
pKT102	pFA6a-link-yECFP_Kan	Cedido por MA Sheff
pKT103	pFA6a-link-yEVenus_Kan	Cedido por MA Sheff
pKT127	pFA6a-link-yEGFP_Kan	Cedido por MA Sheff
pKT239	pFA6a-link-yECitrine_3HA_SpHIS5	Cedido por MA Sheff
YcpLac111	LEU2-CEN4-Amp ^R	Stratagene
YcpLac111_FAR11	LEU2-CEN4-Amp ^R	Este estudio
YcpLac111_FAR11.S18A	LEU2-CEN4-Amp ^R	Este estudio
pUC57_FAR11.S81A	Vector de clonación. Resistencia a ampicilina	GenScript (USA)
YcpLac111_FAR11.S81A	LEU2-CEN4-Amp ^R	Este estudio
pXN-gate	TRP1-CEN/ARS-Amp ^R	Cedido por P. Orbdlik
pXN-gate-3HA	TRP1-CEN/ARS-Amp ^R	Cedido por P. Orbdlik
pMetYCgate	LEU2-CEN/ARS-Amp ^R	Cedido por P. Orbdlik
YcpLac22_FUS3-GFP	TRP1-CEN4-Amp ^R	Cedido por DE Stone
YcpLac111_FUS3-GFP	LEU2-CEN4-Amp ^R	Este estudio
pUG36_ATG8-GFP	URA3-CEN6-Amp ^R	Cedido por T. Eisenberg
pCRII TOPO_FAM40_A	Vector de clonación de fragmentos de PCR. Resistencia a ampicilina.	Cedido por F. Mollinedo
YcpLac111_FAM40_A	LEU2-CEN4-Amp ^R	Este estudio
YcpLac111_FAM40_B	LEU2-CEN4-Amp ^R	Este estudio

VI.3.2. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se detallan en la tabla siguiente:

Tabla 6. Oligonucleótidos		
Propósito	Nombre del oligonucleótido	Secuencia
Clonación	CASP8_vC-BamHI	5'GCGGATCCATGGACTTCAGCAGAAATCTTTATG 3' (F)
	CASP8_vC-SalI	5'GCGTCGACATCAGAAGGGAAGACAAGTTTTTTTC3'(R)
caspasas	CASP10_vD-NotI	5' GGGCGGCCGCATGAAATCTCAAGGTCAAC 3' (F)
	CASP10_vD-SacI	5' GGGAGCTCCTATAATGAAAGTGCATCC 3' (R)

Tabla 6. Continuación

Mutaciones Caspasa-10	<i>CASP10-D219A-3'</i> <i>CASP10-D416A-5'</i> <i>CASP10-D416A-3'</i> <i>CASP10-C401G-5'</i> <i>CASP10-C401G-3'</i>	5' TTCCAAGAATGTCTTAGCAGCTGTTTGGGA 3' (R) 5' TCCGTATCCATCGAAGCAGCTGCTCTGAAC 3' (F) 5' CTGCTCAGGGTTCAGAGCAGCTGCTTCGAT 3' (R) 5' CTCTTTTTCATCCAGGCCGGCCAAGGTGAA 3' (F) 5' CTGTATCTCTTCACCTTGGCCGGCCTGGAT 3' (R)
Clonación FAR11	<i>FWD_FAR11</i> <i>REV_FAR11</i> <i>FWD_FAR3</i> <i>REV_FAR3</i> <i>FWD_FAR9</i> <i>REV_FAR9</i> <i>FAR11_prom_BamHI</i> <i>FAR11_rev_NcoI</i>	5' GCGGATCCATGAATGCTAGTGGAAAGA 3' (F) 5' TAGGGCCCCGAATATTCAAATACTCGGA 3' (R) 5' GCGGATCGATGAATAGCGGTGGTAGT 3' (F) 5' GCGTCGACTTTCAGTACCTGGTACGT 3' (R) 5' TAGCGGCCGCATGGTAGAACTGGAAAAA 3' (F) 5' GCACTAGTCCTTGTGGCAATTGCTTAAC 3' (R) 5' CGGATCCGTTTATGCATTTTCGTCAA 3' (F) 5' GTTAAGCCATGGAGATTATAAATAG 3' (R)
Clonación FAM40A y FAM40B	<i>FAM40A/NdeI</i> <i>Promotor FAR11/NdeI</i> <i>FAM40A/SalI</i> <i>FWD_FAM40B</i> <i>REV_FAM40B</i>	5' GCATATGGAGCCGGCAGTCGGC 3' (F) 5' GCATATGTTTAGCGAGGCTTATAAA 3' (R) 5' CGTCGACCTGCAGCAGCTCTTCCCAGG 3' (R) 5' GAAGGTTAAGTGACAAATTTTCATTTATAAGCCTCGC TAAACATATGGAGGACCCCGCCGCGCTGGGAC 3' (F) 5' TTACTCGAGGCTTCTTCGGAAATCAACTTCTGTTCCA TGTCGACAGAGCTTTGGGAAGACTCACCATT 3' (R)
Mutaciones FAR11	<i>UNI</i> <i>REV</i> <i>FWD S18_A</i> <i>REV S18_A</i>	5' TGTA AAAACGACGGCCAGT 3' (F) 5' CAGGAAACAGCTATGACC 3' (R) 5' CCATTATAAGGTCTGTGGCTTTAG 3' (F) 5' CTAAAGATCTTCTAAAGCCACAGAC 3' (R)
Localización FAR11	<i>FAR3_F5</i> <i>FAR3_R3</i> <i>FAR7_F5</i> <i>FAR7_R3</i> <i>FAR9_F5</i> <i>FAR9_R3</i> <i>FAR11_F5</i> <i>FAR11_R3</i>	5'AAAAACAGTTGGAATACCTGCAAGACACGTACCAGG ACTGAAAGGTGACGGTGCTGGTTTA 3' (F) 5'TTGCTATTTACAGTCTGCTTACACTTTTGTTCGATCCATC GTAGGTCGATGAATTCGAGCTCG 3' (R) 5'ATATCTCACACTTATAGATTACTACTGAGGTTACATGCA CAAGATGGTGACGGTGCTGGTTTA 3' (F) 5'GTATATTTGTCATCTTGCTTTCATTGGAAGCAAAAGGGC AAAGTTTCGATGAATTCGAGCTCG 3' (R) 5'ATTTTCATTTCGGTTTAGTTGCGACGGCCGTTAAGCAATTG CCACAAGGTGACGGTGCTGGTTTA 3' (F) 5'TTTTTGCTTTGTAGATTATGCTTGTAGTATTTTCTTCTT TCGAGTCGATGAATTCGAGCTCG 3' (R) 5'TCCAGCCAAGATCTGTTAAACAAGGAATCCGAGTATTT GAATATTGGTGACGGTGCTGGTTTA 3' (F) 5'GACAATAACATCGCGCCCCGAGCTCGGTATCCGTAAG TAGAGATTCGATGAATTCGAGCTCG 3' (R)
Interacciones YeVenus	<i>FWD PPH21-F2</i> <i>REV PPH21-R1</i> <i>FWD PPH22-F2</i> <i>REV PPH22-R1</i> <i>FWD PPH3-F2</i> <i>REV PPH3-R1</i> <i>FWD FAR3-F2</i>	5'TGAACCTAGCGTCAGCAGAAAGACGCCAGATTACTTT TTAGTCGACGGATCCCCGGGTT 3' (F) 5'GTGAATATATATCTATATAGATGCATATATGTATACATA CTCGATGAATTCGAGCTCGTT 3' (R) 5'TGAACCAACCGTCACCAGGAAGACACCGGATTATTTCT TAGGTCGACGGATCCCCGGGTT 3' (F) 5'TGAAATAGCGTAGTAAGGATAAAGGTGTAATAGATATA TATCGATGAATTCGAGCTCGTT 3' (R) 5'TATAATTCCAACCAAAAAATCTCAAATGGACTATTTCTT AGTCGACGGATCCCCGGGTT 3' (F) 5'AAGAAAAATGCACTTGACAATTAGAGTGCCTGTAAAA ATTCGATGAATTCGAGCTCGTT 3' (R) 5'ACAGTTGGAATACCTGCAAGACACGTACCAGGTA AGGTCGACGGATCCCCGGGTT 3' (F)

Tabla 6. Continuación

	<i>REV FAR3-R1</i>	5'ATTTACAGTCTGCTTACACTTTTGTTCGATCCATCGTAGTCGATGAATTCGAGCTCGTT 3' (R)
	<i>FWD FAR11-F2</i>	5'CCAAGATCTGTAAACAAGGAATCCGAGTATTTGAATATTGGTCGACGGATCCCCGGGT 3' (F)
	<i>REV FAR11-R1</i>	5'ACATCGCGCCCCGAGCCTCGGTATCCGTAAGTAGAGATTTCGATGAATTCGAGCTCGTT 3' (R)
	<i>FWD TPD3-F2</i>	5'TAAGAAAAGTTTGGCAGAATGTCAAGAACTTTTAAA AAATGGTCGACGGATCCCCGGGT 3' (F)
	<i>REV TPD3-R1</i>	5'AGTGTACATATGTGTATGTATGTATATATTTGAACTAGTATCGATGAATTCGAGCTCGTT 3' (R)
Interacciones SUS (Split Ubiquitin System)	<i>FWD PPH21-B1</i>	5'ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTCCAACCACCATGGATACAGATTTAGATGTG 3' (F)
	<i>REV PPH21-B2</i>	5'TCCGCCACCACCAACCACTTTGACAAGAAAGCTGGGTATAAAAAGTAATCTGGCGTCTT 3' (R)
	<i>FWD PPH22-B1</i>	5'ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTCCAACCACCATGGATATGGAAATTGATGAC 3' (F)
	<i>REV PPH22-B2</i>	5'TCCGCCACCACCAACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATAAGAAATAATCCGGTGTCTT 3' (R)
	<i>FWD PPH3-B1</i>	5'ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTCCAACCACCATGATGGACTTAGATAAGATT 3' (F)
	<i>REV PPH3-B2</i>	5'TCCGCCACCACCAACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATAAGAAATAGTCCATTTGAGA 3' (R)
	<i>FWD FAR3-B1</i>	5'ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTCCAACCACCTGAATAGCGGTGGTAGTGAT 3' (F)
	<i>REV FAR3-B2</i>	5'TCCGCCACCACCAACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTTCAGTACCTGGTACGTGTC 3' (R)
	<i>FWD TPD3-B1</i>	5'ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTCCAACCACCATGTCTGGAGCAAGATCAACA 3' (F)
	<i>REV TPD3-B2</i>	5'TCCGCCACCACCAACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAATTTTTTAAAAGTTCTTGACA 3' (R)
PCR cuantitativa	<i>FWD UCB9</i>	5'CCACGACAGGATCAATTACAACAT 3' (F)
	<i>REV UCB9</i>	5'AAAAAGGCCAACCAAAAACAAAA 3' (R)
	<i>FWD FUS1</i>	5'TGGGCTTTCAATCGGACTTC 3' (F)
	<i>REV FUS1</i>	5'GCTGCGGTATTATGGGTTTG 3' (R)
	<i>FWD ATG8</i>	5'GGAAGGCGGAGTCGGAGAGG 3' (F)
	<i>REV ATG8</i>	5'AAACCCGTCCTTATCCTTGTGTTT 3' (R)
	<i>FWD ATG13</i>	5'CCTTCTCTCCGTTATTTGTTGAC 3' (F)
	<i>REV ATG13</i>	5'GGCTGGCAGGTTTGATTTCGTT 3' (R)
	<i>FWD CASP10</i>	5'TGCCAAGGTGAAGAGATACAGC 3' (F)
	<i>REV CASP10</i>	5'CCAGGGGCACAGGAATACTA 3' (R)

Las abreviaturas (F) y (R) hacen referencia a los oligonucleótidos *forward* 5'-3' y *reverso* 3'-5'.

VI.4. PREPARACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

VI.4.1. Obtención de ADN plasmídico de *E.coli*

Para la obtención de ADN plasmídico se emplearon los kits “Magic Wizard” (Promega) y “Pure Yield™ Plasmid Miniprep System” (Amersham Biosciences) de acuerdo a las especificaciones dadas por el proveedor.

VI.4.2. Obtención de ADN genómico de *S. cerevisiae*

Para la obtención de DNA genómico, se utilizó el método descrito por Hoffman y Winston (1987) que consiste en crecer un cultivo de levadura en 5 ml de YPD y recoger las células por centrifugación. Las células se lavan con agua y se les añade 200 µl de tampón de lisis [NaCl 5M, 10% SDS, 1M Tris-HCl pH 8 y 0,5M EDTA], 300 µl de fenol: cloroformo (1:1) mezclado con 100 µl de tampón de lisis y bolitas de vidrio (425 -600 µm de diámetro, Sigma). Tras romper las células mediante agitación con el vórtex a intervalos de 30 s durante 2 minutos, se centrifuga a 13.000 r.p.m. durante 3 minutos y se recoge la fase acuosa. Los ácidos nucleicos se precipitan por adición de 1 ml de etanol absoluto frío. Se centrifuga de nuevo a 13.000 r.p.m. durante 3 min y se resuspende el precipitado en una solución formada por 3M NaOAc (1:10) y Etanol 100% (2,5x). Se incuba 5 min a -80°C. Se centrifuga para eliminar el etanol 100% y se lava con etanol 70%. Finalmente se resuspende el pellet en 25 µl de agua estéril.

VI.5. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS

VI.5.1. Transformación de células de *E. coli*

La preparación de las células competentes y el proceso de transformación se realizaron siguiendo procedimientos estándar (Sambrook y Russell, 2001).

Para la preparación de células electrocompetentes se empleó la cepa DH5α. Un litro de medio LB se inoculó con 10 ml de un preinóculo. El cultivo se creció a 37°C en agitación hasta DO_{600nm} de 0.5. Se enfrió durante 15 minutos en un baño de hielo y se pasó a botes de centrifugación GSA. Las células se recogieron por centrifugación a 1000 g durante 15 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió en 1 litro de glicerol 15% frío. Se recogieron de nuevo las células por centrifugación y se lavaron dos veces con 15% de glicerol frío, un primer lavado con 500 ml y un segundo lavado con 200 ml. Finalmente las células se resuspendieron en 1 ml de GYT (15% glicerol, 0.125% extracto de levadura, y 0.25% triptona), se repartieron en alícuotas de 100 µl que fueron mantenidas hasta su uso a -80°C.

La transformación de células electrocompetentes se realizó previa descongelación de las células en hielo, mezclando 100 µl de células con el ADN transformante (200 ng - 500 ng). Se incubó en hielo durante 20 minutos para posteriormente proceder al choque térmico poniendo la mezcla de transformación a 42°C durante 2 minutos, seguido de 2 minutos en hielo. Luego se

incubó a 37°C durante 1h para finalmente lavar las células y sembrarlas en los medios de selección apropiados.

VI.5.2. Transformación de células de *Saccharomyces cerevisiae*

La transformación de levaduras se realizó mediante el protocolo de AcOLi (Gietz, R. D. y Woods, R. A. 2002). El método está basado en la utilización de acetato de litio, ADN “carrier” y polietilenglicol. Las cepas de levadura fueron sembradas posteriormente al choque térmico a 42° C. En el caso de cepas auxótrofas, las placas de selección fueron suplementadas con los aminoácidos necesarios. En el caso de transformaciones en las que la selección sea un antibiótico, las levaduras fueron recuperadas tras el choque térmico en YPD durante 4 h antes de ser sembradas en las placas con el antibiótico correspondiente.

VI.6. MANIPULACIÓN DE ADN

VI.6.1. Digestión enzimática

Los diversos tratamientos enzimáticos a los que fue sometido el ADN se realizaron siguiendo los procedimientos estándar (Sambrook, Fritsch et al. 1989).

Las diferentes enzimas de restricción utilizadas en este trabajo fueron suministradas por las casas comerciales Fermentas, Promega o New England Biolabs y empleadas de acuerdo a las especificaciones dadas por los proveedores.

La unión entre moléculas de ADN con extremos compatibles se realizó mediante el empleo de la enzima T4 ADN ligasa (Fermentas) y las moléculas de interés se seleccionaron por transformación de células competentes de *E. coli* de las cepas DH5 α con la mezcla de ligación.

VI.6.2. Clonación

Los fragmentos de DNA obtenidos mediante PCR se clonaron en el vector pGEM-T-Easy (Promega), realizando la reacción de ligación durante 1 h a temperatura ambiente. La clonación en vectores de expresión de levadura se llevó a cabo mediante digestión enzimática del vector y del fragmento de ADN a clonar mediante endonucleasas de restricción (utilizando el tampón y las indicaciones sobre condiciones óptimas de reacción proporcionadas por la casa comercial para cada enzima). En la reacción de ligación se mezclan 50 ng del vector del tampón proporcionado por el proveedor y 1 μ l de ADN ligasa (Fermentas) en un volumen final de 10 μ l.

La reacción se deja 1h a temperatura ambiente. La relación de plásmidos utilizados se encuentra en la Tabla 5.

VI.6.3. Electroforesis de ADN

La electroforesis de ADN se realizó en geles de agarosa de 0.8% (p/v). La electroforesis se desarrolló a voltaje constante (100V) en tampón TBE (90 mM Tris-HCl, 90 mM ácido bórico y 2mM EDTA) con Bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Como marcadores de tamaño se utilizó el ADN del fago λ (Sigma) digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. Las bandas se observaron sobre un transiluminador de luz ultravioleta (acoplado a un sistema de fotografía digital Gel Doc 2000 Bio-Rad).

VI.6.4. Electroforesis en campo pulsado (*Pulse Field Gel Electrophoresis: PFGE*)

El PFGE es un sistema basado en el análisis de ADN cromosómico consistente en un electroforesis multidireccional con pulsos eléctricos de diferente duración, que permite (ya que el tiempo que requieren los fragmentos para reorientarse es proporcional a su tamaño) la separación de fragmentos de hasta 10 Mb. El protocolo utilizado fue el descrito por (Gardner, D. C. *et al.* 1993).

Los cultivos celulares de $DO_{600nm} = 2$ fueron recogidos, centrifugados y resuspendidos en 1ml de Solución A (Tris HCl 25 mM pH 7,5, EDTA 25 mM y Sorbitol 1M). Se mezcló con agarosa de bajo punto de fusión 2,5% (Invitrogen). Esta mezcla fue distribuida sobre un soporte hasta solidificarse formándose los bloques de agarosa, los cuales se incubaron en 10 ml de Solución B (1mg/ml Proteasa XIV [Sigma], 0,5 M EDTA y 10% SDS) durante 24h a 50°C. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron lavadas con 10 ml de 0,5 M EDTA.

Para la adecuada separación de los fragmentos de ADN se preparó un gel de agarosa del 1% (p/v) (Bio-Rad) en tampón TBE 0,5X y se colocaron los bloques de ADN inmersos en él. Antes de comenzar la electroforesis se vertían 2200 ml de tampón TBE 0,5X en la cubeta de electroforesis (Bio-Rad) para que recirculara y disminuyera la temperatura hasta 14° C. El gel se desmoldaba del soporte y se introducía en la cubeta de electroforesis, seleccionándose los parámetros para la realización de la electroforesis en un aparato de sistema CHEF-DRII System (Bio-Rad). Se aplicaron pulsos de 70-120 segundos durante 25 horas a 200V y con un ángulo de inclinación de 120°. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se teñía por inmersión en una solución de bromuro de etidio (0,5µg/ml). El exceso de bromuro de etidio del gel era eliminado

posteriormente mediante inmersión de éste en un baño de agua destilada. El gel se visualizaba y fotografiaba en un transiluminador de luz ultravioleta (acoplado a un sistema de fotografía digital Gel Doc 2000 Bio-Rad).

VI.6.5. Análisis del contenido de ADN en el ciclo celular

Para estudiar el contenido en ADN durante el ciclo celular se utilizó el citómetro de flujo mediante tinción con Ioduro de Propidio. Los cultivos celulares analizados fueron centrifugados y lavados con etanol 70%, tras lo cual se añadió 400 µl de la siguiente solución (Citrato Sódico 50 mM con 0,2 µg/µl RNA_{asa}). Las muestras fueron incubadas 15 h a 37°C. A continuación se añadió 200 µl de una nueva solución [Citrato Sódico 50 mM, 55mM HCl y 5mg/ml de pepsina (Sigma Aldrich)]. Se incubó durante 15 min a 37°C y después se añadió 400 µl de una nueva solución que contiene el fluoróforo (Citrato Sódico 50 mM con Ioduro de propicio 10 µg/ml). Las muestras fueron sonicadas para evitar la aglutinación y finalmente se analizaron en el citómetro de flujo FACS SORT (Becton Dickinson) y el software Cell Quest.

VI.6.6. Purificación de un fragmento de ADN en gel de agarosa.

El fragmento de interés, identificado bajo luz ultravioleta de onda larga (366 nm), se recortó del gel de agarosa con un bisturí. Posteriormente, el ADN se purificó con el kit “GFX PCR ADN and Gel Band Purification Kit” (Amersham Biosciences) siguiendo las especificaciones dadas por el proveedor.

VI.6.7. Amplificación de fragmentos de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las amplificaciones de ADN se realizaron empleando diferentes polimerasas dependiendo de las necesidades de cada caso. Para la amplificación fidedigna se empleó la enzima Expand High Fidelity PCR System (Roche). Las PCRs analíticas se realizaron con la GoTaq (Promega). En todos los casos las reacciones se prepararon de acuerdo a las especificaciones dadas por los proveedores de las ADN polimerasas.

El proceso de amplificación incluía una etapa de desnaturalización (5 minutos a 95°C), la etapa de amplificación (30 ciclos) y finalmente una etapa de extensión (10 minutos). Cada ciclo de amplificación incluía 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de anillamiento a temperatura variable dependiendo de la temperatura media de fusión (T_m) de los oligonucleótidos, y un tiempo de extensión de 1 minuto/kb de ADN a polimerizar a una

temperatura que fue de 68°C para fragmentos superiores a 2.5 kb y de 72°C para fragmentos de menor tamaño.

VI.6.8. Mutagénesis dirigida

Las sustituciones introducidas en la ORF de la *CASPASA-10* humana y *FAR11* se llevaron a cabo mediante técnicas de PCR utilizando los oligonucleótidos descritos en la Tabla 6 y partiendo de ADN genómico de *S. cerevisiae*. En el caso de la Caspasa-10 humana, se produjeron diferentes sustituciones, en el residuo Cys⁴⁰¹ que representa el centro activo, el cambio introducido fue a una Glicina y también en Asp²¹⁹ y Asp⁴¹⁶, residuos implicados en la activación proteolítica de las Caspasa-10, que fueron sustituidos por residuos de Alanina en ambos casos.

La sustitución introducida en el caso de *FAR11* tuvo lugar en el residuo Ser¹⁸ y el cambio introducido fue a un residuo de Alanina. En cambio la sustitución del residuo de Ser¹⁸ de *FAR11* a un residuo de Alanina fue realizada por la empresa GenScript (USA). El plásmido enviado fue pUC57-*FAR11_S81A*, consistente en un fragmento de *FAR11* que presenta la sustitución del residuo de Ser¹⁸ por una Alanina en los sitios de restricción *BamHI-PmeI*. El plásmido YcpLac111-*FAR11* fue digerido con las enzimas de restricción *BamHI-PmeI* y se ligó al fragmento de *FAR11* que presentaba la sustitución del residuo Ser¹⁸ de *FAR11*.

VI.6.9. Secuenciación de ADN

Todas las muestras fueron secuenciadas en el Servicio de Secuenciación Automática de la Universidad de Salamanca (Laboratorio 314, Edificio Departamental. Salamanca. España. e-mail: serv.sadn@usal.es), empleando el método de Sanger (Sanger, F. *et al.* 1977) en un secuenciador automático modelo ABI PRISM 377 (Applied Biosystems) y el kit “ABI PRISM[®] BigDye[™] Primer v.30 Cycle Sequencing Ready Reaction with AmpliTaq[®] ADN Ploymerase, FS” (Applied Biosystems).

VI.7. MANIPULACIÓN DE ARN

VI.7.1. Extracción de ARN

Se partió de cultivos celulares de 25ml de DO_{600nm} = 0,6. Se lavaron con agua estéril y se resuspendieron en 600 µl de tampón TES (10mM Tris pH7,5; 10mM EDTA, 0,5% SDS). Se añadió 400µl de fenol: cloroformo en proporción 5:1 y se incubaron las muestras a 65°C durante

20 min, tras lo cual, se enfriaron a -80°C 30 min. Las muestras fueron centrifugadas 15 min a 13.000 r.p.m. Se recogió la fase acuosa a la que se le añadió 400 μl de fenol: cloroformo en proporción 5:1, se agitó y se centrifugó, añadiendo sobre la fase acuosa 300 μl de cloroformo. Finalmente se transfirió la fase acuosa con 30 ml de 3M NaAc pH 5,3 y 600 μl de etanol absoluto. Se incubó a -20°C durante 1h. Los extractos fueron centrifugados 15 min a 13.000 r.p.m. a 4°C para recoger los pellets en 100 μl de agua autoclavada.

VI.7.2. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR)

Los análisis de qPCR se realizaron en un equipo Light Cycler 480 (Roche) a partir de muestras de cDNA que fueron sintetizadas empleando el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche). Las reacciones fueron preparadas con el kit Light Cycler 480 SYBR Green I Master (Roche) utilizando los oligonucleótidos descritos en la tabla X. Todas las reacciones fueron realizadas en duplicado y, al menos, en dos experimentos independientes empleando muestras diferentes de cDNA. El análisis cuantitativo de los resultados se llevó a cabo con el software Light Cycler 480 (Roche). Para la normalización de los resultados se tomaron los valores de expresión del gen *ACT1* y/o *UBC6*. Los resultados mostrados en las gráficas indican el ratio de los valores de expresión normalizados en presencia o ausencia de expresión de la Caspasa-10.

VI.8. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

VI.8.1. Obtención de extractos proteicos de *S. cerevisiae*

Los cultivos de levadura fueron incubados a 28°C hasta alcanzar $\text{DO}_{600\text{nm}} = 1$. Las células se lavaron con H_2O destilada y se resuspendieron en 5ml de 20 mM Hepes pH 7.4; 80 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% p/v CHAPS. La lisis celular se efectuó mediante la utilización de la French Press a 1120 psi. El lisado se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante fue usado inmediatamente o congelado a -20°C para posteriores utilidades.

VI.8.2. Precipitación de proteínas con Ácido Tricloro Acético (TCA)

Los cultivos celulares de $\text{DO}_{600\text{nm}} = 1$ fueron centrifugados y lavados en un primer momento con H_2O y a continuación con TCA 20%. La lisis celular se efectuó mediante el tratamiento con bolitas de vidrio en la Fast Prep. Posteriormente el lisado celular se lavó dos veces con TCA 5% y se centrifugó durante 5 minutos a 3000 r.p.m. Tras este centrifugado se eliminó el sobrenadante

y el pellet se resuspendió en 100 µl de tampón de carga Laemmli 1,5 x y 50 µl de Tris HCl 1,5 M. Las muestras fueron desnaturalizadas a 65°C durante 5 minutos para finalmente centrifugar 10 minutos a 3000 r.p.m. y recoger el sobrenadante que será el extracto proteico utilizado para los correspondientes ensayos.

VI.8.3. Separación electroforética de proteínas

Para la separación electroforética de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS se siguió el método descrito por Laemmli (1970), utilizando el sistema Miniprotein II (Bio-Rad). La mezcla del gel de separación contenía una concentración variable de la solución acrilamida-bisacrilamida (acrilamida 30: bisacrilamida 0.8) dependiendo del porcentaje del gel, 0.375 mM Tris-HCl pH 8.8 y 0.1% SDS. La polimerización se realizó añadiendo a la mezcla desgasificada 0.05% persulfato amónico y 0.005% TEMED. El gel de empaquetamiento contenía 1.5% de la solución acrilamida-bisacrilamida (acrilamida 30: bisacrilamida 0.8), 120 mM Tris-HCl pH 6.8 y 1% SDS. Para la polimerización se añadió a la mezcla desgasificada 0.05% persulfato amónico y 0.005% TEMED. Antes de ser cargadas las muestras se desnaturalizaron en presencia de tampón de carga (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM DTT, 2% SDS, 10% glicerol, 0.01% azul de bromofenol) a 100°C durante 5 minutos. Los geles se resolvieron en tampón Tris-glicina (25 mM Tris-HCl, 150 mM glicina, 0.1% SDS). Se aplicó una corriente continua de 30 mA por gel. Como marcadores de tamaño de proteínas se empleó la mezcla comercial de péptidos preteñidos "Prestained SDS-PAGE Standards" (Bio-Rad) de peso molecular 19-117 kDa.

VI.8.4. Detección de proteínas con epítomos inmunoreactivos

Las muestras proteicas resueltas en gel fueron transferidas a membrana de polivinilideno (PVDF: Immobilon-P, Millipore) empleando el sistema "Mini Trans-Blot Cell" (Bio-Rad) y tampón de transferencia CAPS (20% metanol, 10 mM NaHCO₃, 3 mM Na₂CO₃). La membrana resultante de la transferencia se bloqueaba durante al menos 30 minutos en leche desnatada (Nestlé®) al 5% en tampón PBS-Tween (2,5 g/l Tris base, 9 g/l NaCl, 0.1% Tween 20). Finalizado el bloqueo se procedió a la inmunodetección empleando el kit "ECL AdvanceTM Western blotting detection" (Amersham) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Todas las soluciones empleadas contenían 0.1% Tween 20. Los anticuerpos empleados fueron: anticuerpos primarios anti-HA monoclonal (Babco), anti-caspase10 p10 (N-19) (Santa Cruz Biotechnology), anti-Rad53 (yC-19) (Santa Cruz Biotechnology), anti-myc monoclonal 9E10 (Roche), anti- p44/42 (Cell signaling) y como anticuerpos secundarios anti-IgG-HRP de ratón

(Amersham), anti-IgG-HRP de conejo (Amersham) y anti-IgG-HRP de cabra. Para la detección de las bandas se utilizaron películas de autorradiografía HiperfilmTM-MP (Amersham).

VI.8.5. Ensayo β -galactosidasa

Para llevar a cabo este ensayo se vertió sobre las placas de medio rico SD-TRP-LEU en las que ya habían crecido las cepas a analizar, una solución formada por 0,5% agarosa, 0,5M Na-P-Buffer pH7; 2mg/ml X-gal y SDS 10%. Las placas se incubaron a 37°C y al cabo de 1h se analizó la coloración azul de cada cepa.

VI.8.6. Método de Sistema de rotura de la ubiquitina o “Split Ubiquitin System” (SUS)

Este sistema permite detectar interacciones físicas entre una pareja de proteínas mediante su capacidad de reconstituir la ubiquitina funcional (Johnsson, N. y Varshavsky, A. 1994). Esta técnica consiste en fusionar el extremo C-terminal y N-terminal de la ubiquitina con las proteínas de interés para determinar la existencia de interacción entre ellas. Estas fusiones se realizaron mediante la técnica de PCR usando los oligonucleótidos descritos en la Tabla 6 y partiendo de ADN genómico de *S. cerevisiae*. Estos fragmentos de PCR fueron clonados in vivo (Fusco, C. *et al.* 1999). Para las fusiones NubG, los vectores pXNgate y pXNgate-3HA fueron digeridos con las enzimas *EcoRI/SmaI* y usados junto con los fragmentos de PCR para transformar la cepa THY.AP5. Los transformantes se seleccionaron en un medio sin triptófano. Para las fusiones de CubPLV, el vector pMetYCgate fue digerido con las enzimas de restricción *PstI/HindIII*. Los transformantes se seleccionaron en un medio sin leucina. Estos plásmidos fueron aislados y comprobados mediante secuenciación. Posteriormente se cruzó la cepa THY.AP4_*FAR11*-Cub con las cepas THY.AP5_*PPH21*-Nub, THY.AP5_*PPH22*-Nub, THY.AP5_*PPH3*-Nub, THY.AP5_*TPD3*-Nub y THY.AP5_*FAR3*-Nub, formando las correspondientes cepas diploides.

Las cepas diploides fueron transformadas con un plásmido derivado del pESC-URA en el que el marcador de selección uracilo (*URA3*) fue sustituido por Geneticina (G418). El análisis de interacción de proteínas consistió en un seguimiento de crecimiento celular en medio mínimo empleando placas microtiter y las lecturas de la DO_{600nm} fueron efectuadas usando el equipo Varioskan Flash (Thermo Scientific).

VI.8.7 Ensayo de Complementación Bimolecular de Fluorescencia (BiFC)

Está basado en la formación de un complejo fluorescente mediante la unión de fragmentos de la proteína amarilla fluorescente (YeVenus) llevada a cabo gracias a la asociación de las proteínas fusionadas a estos fragmentos (Cole, K. C. *et al.* 2007).

Para llevar a cabo este ensayo, el gen *FAR11* se fusionó con el extremo C-terminal de la proteína amarilla fluorescente (YeVenus) y los genes *PPH21*, *PPH22*, *PPH3*, *TPD3* y *FAR3* con el extremo N-terminal de la YeVenus mediante la técnica de PCR usando los oligonucleótidos descritos en la Tabla 6. El plásmido utilizado como molde en la reacción de PCR para la fusión de *FAR11* fue pFA6a-VC-KanMX6 y para las fusiones del resto de genes fue pFA6a-VN-TRP1 (Sung, M. K. y Huh, W. K. 2007). Los productos de PCR fueron verificados mediante secuenciación. El fragmento *FAR11_VC* fue transformado con la cepa BY4741 y cada uno de los genes etiquetados con el extremo N-terminal de la YeVenus se transformaron con la cepa de tipo sexual opuesto THY.AP4 y en ambos casos la integración en el genoma se produjo mediante recombinación homóloga. Posteriormente se crearon las correspondientes cepas diploides cruzando cada una cepas que presentaban las proteínas marcadas con el extremo N-terminal de la YeVenus con la cepa que tenía *FAR11* etiquetado con el extremo C-terminal de la proteína amarilla fluorescente. Estas cepas diploides fueron transformadas con los plásmidos pGILDA o pGILDA_ *CASP10*.

VI.9. TÉCNICAS DE FLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA

VI.9.1. Detección de proteínas por fluorescencia directa

La proteína verde fluorescente o GFP es una excelente herramienta para analizar la expresión y localización de determinadas proteínas *in vivo* (Chalfie, 1994). Para ello sólo es necesario fusionar el gen de interés con la secuencia de ADN que codifica dicha proteína y observar las células bajo el microscopio de fluorescencia. Además también existen diferentes variantes de la GFP como son la YeVenus (proteína amarilla fluorescente), CFP (proteína azul fluorescente) y RFP (proteína roja fluorescente) lo cual posibilita estudios de colocalización mediante el marcaje de varias proteínas en una misma cepa.

En este estudio las proteínas Far3, Far7, Far9 y Far11 fueron fusionadas en su extremo C-terminal con las proteínas fluorescentes amarilla (YeVenus), azul (CFP) o verde (GFP) mediante técnica de PCR utilizando los oligonucleótidos descritos en la Tabla 6 y partiendo de ADN

genómico de *S. cerevisiae*. El producto de cada PCR fue transformado con la cepa BY4741 de *S. cerevisiae*, produciéndose recombinación homóloga e integrándose correctamente en el genoma. Se cruzaron las cepas de tipo sexual *MAT a* (BY4741) que tenían cada una de las proteínas Far etiquetadas con proteínas fluorescentes con cepas de tipo sexual opuesto *MAT α* (BY4742) que presentaban proteínas de localización conocida marcadas con la proteína roja fluorescente (RFP), entre ellas Arp1 (Golgi), Cop1 (región interna del aparato de Golgi), Chc1 (región externa del aparato de Golgi) y Sec13 (entre Retículo endoplásmico y Golgi). Las correspondientes cepas diploides fueron examinadas mediante microscopía de fluorescencia.

VI.9.2. Tinción de viabilidad celular

La viabilidad celular de las cepas fue analizada mediante varias tinciones vitales, entre ellas, FUN-1 (Molecular Probes) y Resazurina (Sigma).

Para la tinción de FUN-1 se crecieron los cultivos celulares de las cepas a analizar en medio YPD o YPG hasta alcanzar la fase logarítmica (aproximadamente 10^7 células/ml). A continuación se recogieron las células y se lavaron con el buffer formado por 10mM Na-HEPES pH 7,2 y 2% de glucosa. Se añadió el compuesto fluorescente FUN-1 a una concentración final de 10 μ M y se mantuvo a 28°C durante 30 minutos en la oscuridad. Posteriormente se observaron las células al microscopio de fluorescencia utilizando los filtros de GFP (λ excitación 480nm y λ emisión 530 nm) y RFP (λ excitación 531 nm y λ emisión 593 nm).

En el caso de la tinción con Resazurina los cultivos celulares fueron crecidos en un medio SD o SG hasta alcanzar la fase logarítmica. En ese momento se les añadió el compuesto fluorescente de resazurina a una concentración del 10% p/v y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Transcurrido ese periodo de tiempo las células se lavaron con 1x PBS y se visualizaron bajo el microscopio de fluorescencia utilizando el filtro RFP.

VI.9.3. Tinción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Los niveles de estrés oxidativo fueron detectados mediante tinción con el colorante 2'-7' Diclorofluoresceín diacetato (H₂DCF-DA, Sigma) y Dihidroetidio (DHE, Sigma).

En ambos casos los cultivos celulares fueron crecidos hasta alcanzar la fase logarítmica, a partir de ese momento las células fueron recogidas por centrifugación y lavadas con agua estéril. Se les añadió una concentración final de 30 μ M H₂DCF-DA o 10 μ M DHE. Se incubó durante 10

minutos y se volvieron a lavar las células con agua estéril para eliminar el exceso de compuesto. Posteriormente las muestras fueron analizadas al microscopio de fluorescencia con el filtro GFP, para el caso de H₂DCF-DA (λ excitación 504 nm y λ emisión 529 nm) y con el filtro RFP para la tinción de DHE (λ excitación 535 nm y λ emisión 610 nm).

VI.9.4. Tinción AnexinaV/Ioduro de Propidio

Para analizar el fenotipo asociado a muerte celular de externalización de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática se utilizó el kit de AnexinaV/Ioduro de Propidio (Clontech).

Las células fueron crecidas en medio SD o SG hasta alcanzar la fase logarítmica (aproximadamente 10⁵ células/ml). Los cultivos se centrifugaron y lavaron con 1ml de 1x Binding Buffer para posteriormente resuspenderse en 200 μ l 1x Binding buffer. Se añadió 5 μ l de AnexinaV 20 μ g/ml y 10 μ l de Ioduro de propidio 50 μ g/ml y se incubaron las muestras durante 15 minutos en la oscuridad. A continuación se lavaron las células con PBS 1x para eliminar el exceso de compuesto y las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia con los filtros FITC (λ excitación 494 nm y λ emisión 520 nm) y Rodamina (λ excitación 540 nm y λ emisión 570 nm).

VI.9.5. Tinción de diferentes orgánulos celulares

Se realizaron diferentes tinciones: SYTO 18 (Molecular Probes) que tiñe las mitocondria, MDY-64 (Molecular probes) para analizar la tinción de vacuolas y el citoesqueleto de actina fue examinado mediante la tinción con Faloidina (Molecular Probes). En todos los casos, se siguió el protocolo recomendado por el proveedor. Todas observaciones fueron realizadas con el microscopio Nikon Eclipse 90i. Las imágenes fueron procesadas con el programa Metamorph.

VI.9.6. Microscopía electrónica

Las células fueron fijadas con glutaraldehído y teñidas con permanganato potásico según se describió anteriormente (Neiman, A. M. 1998). Las imágenes fueron recogidas mediante un microscopio FEI BioTwin G2 con una cámara digital acoplada AMT XR-60.

VI.10. SOPORTE INFORMÁTICO

El análisis de las secuencias de ADN se llevó a cabo con los diferentes programas: EditSeq, SeqBuilder, MegAlign y SeqManII, suministrados por ADNstar (ADNstar Inc, Madison, WI). La búsqueda de homología de secuencias se realizó mediante los programas FASTA y BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), y las bases de datos GenBank y EMBL (European Molecular Biology Laboratory).

Las imágenes de geles de agarosa con muestras de ADN se tomaron con el equipo de fotografía electrónica Gel Doc 2000 (Bio Rad).

La redacción de esta memoria se hizo con el programa Microsoft Word 2007 (Microsoft Corporation). El análisis de datos de PCR cuantitativa a tiempo real así como la configuración de las distintas gráficas se llevó a cabo con el programa Microsoft Excel. El procesamiento de imágenes se realizó con el programa Adobe Photoshop CS4 (Adobe) y el programa Microsoft PowerPoint. La redacción de la bibliografía se hizo mediante el programa EndNote X3 (UMDNI-Robert Wood Johnson Library of the Health sciences, NJ, USA).

VII. Bibliografía

- Alcasabas, A. A., Osborn, A. J., Bachant, J., Hu, F., *et al.* (2001). "Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53." *Nat Cell Biol* 3(11): 958-965.
- Alvino, G. M., Collingwood, D., Murphy, J. M., Delrow, J., *et al.* (2007). "Replication hydroxyurea: it's a matter of time." *Mol Cell Biol* 27(18): 6396-6406.
- Allen, R. T., Hunter, W. J., 3rd y Agrawal, D. K. (1997). "Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis." *J Pharmacol Toxicol Methods* 37(4): 215-228.
- Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M. T., *et al.* (1997). "Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease." *Histol Histopathol* 12(1): 25-31.
- Aravind, L. y Koonin, E. V. (2002). "Classification of the caspase-hemoglobinase fold: detection of new families and implications for the origin of the eukaryotic separins." *Proteins* 46(4): 355-367.
- Arnoldo, A., Curak, J., Kittanakom, S., Chevelev, I., *et al.* (2008). "Identification of small molecule inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S using a yeast phenotypic screen." *PLoS Genet* 4(2): e1000005.
- Bao, Q. y Shi, Y. (2007). "Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases." *Cell Death Differ* 14(1): 56-65.
- Bartek, J. y Lukas, J. (2001). "Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage." *Curr Opin Cell Biol* 13(6): 738-747.
- Beck, T. y Hall, M. N. (1999). "The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors." *Nature* 402(6762): 689-692.
- Bernales, S., McDonald, K. L. y Walter, P. (2006). "Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response." *PLoS Biol* 4(12): e423.
- Bettiga, M., Calzari, L., Orlandi, I., Alberghina, L., *et al.* (2004). "Involvement of the yeast metacaspase Yca1 in ubp10Delta-programmed cell death." *FEMS Yeast Res* 5(2): 141-147.
- Bevers, E. M., Comfurius, P., Dekkers, D. W., Harmsma, M., *et al.* (1998). "Regulatory mechanisms of transmembrane phospholipid distributions and pathophysiological implications of transbilayer lipid scrambling." *Lupus* 7 Suppl 2: S126-131.
- Bharadwaj, P., Martins, R. y Macreadie, I. (2010). "Yeast as a model for studying Alzheimer's disease." *FEMS Yeast Res* 10(8): 961-969.
- Bicknell, A. A., Tourtellotte, J. y Niwa, M. (2010). "Late phase of the endoplasmic reticulum stress response pathway is regulated by Hog1 MAP kinase." *J Biol Chem* 285(23): 17545-17555.
- Bidlingmaier, S., He, J., Wang, Y., An, F., *et al.* (2009). "Identification of MCAM/CD146 as the target antigen of a human monoclonal antibody that recognizes both epithelioid and sarcomatoid types of mesothelioma." *Cancer Res* 69(4): 1570-1577.
- Blondel, M., Alepuz, P. M., Huang, L. S., Shaham, S., *et al.* (1999). "Nuclear export of Far1p in response to pheromones requires the export receptor Msn5p/Ste21p." *Genes Dev* 13(17): 2284-2300.
- Bonangelino, C. J., Chavez, E. M. y Bonifacino, J. S. (2002). "Genomic screen for vacuolar protein sorting genes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Biol Cell* 13(7): 2486-2501.

- Bova, M. P., Tam, D., McMahon, G. y Mattson, M. N. (2005). "Troglitazone induces a rapid drop of mitochondrial membrane potential in liver HepG2 cells." *Toxicol Lett* 155(1): 41-50.
- Branzei, D. y Foiani, M. (2008). "Regulation of DNA repair throughout the cell cycle." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(4): 297-308.
- Bratton, S. B., Walker, G., Roberts, D. L., Cain, K., *et al.* (2001). "Caspase-3 cleaves Apaf-1 into an approximately 30 kDa fragment that associates with an inappropriately oligomerized and biologically inactive approximately 1.4 MDa apoptosome complex." *Cell Death Differ* 8(4): 425-433.
- Braun, R. J., Buttner, S., Ring, J., Kroemer, G., *et al.* (2010). "Nervous yeast: modeling neurotoxic cell death." *Trends Biochem Sci* 35(3): 135-144.
- Brunk, U. T. y Terman, A. (2002). "The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis." *Eur J Biochem* 269(8): 1996-2002.
- Budovskaya, Y. V., Stephan, J. S., Reggiori, F., Klionsky, D. J., *et al.* (2004). "The Ras/cAMP-dependent protein kinase signaling pathway regulates an early step of the autophagy process in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 279(20): 20663-20671.
- Burhans, W. C., Weinberger, M., Marchetti, M. A., Ramachandran, L., *et al.* (2003). "Apoptosis-like yeast cell death in response to DNA damage and replication defects." *Mutat Res* 532(1-2): 227-243.
- Buttner, S., Bitto, A., Ring, J., Augsten, M., *et al.* (2008). "Functional mitochondria are required for alpha-synuclein toxicity in aging yeast." *J Biol Chem* 283(12): 7554-7560.
- Buttner, S., Eisenberg, T., Carmona-Gutierrez, D., Ruli, D., *et al.* (2007). "Endonuclease G regulates budding yeast life and death." *Mol Cell* 25(2): 233-246.
- Camougrand, N., Grelaud-Coq, A., Marza, E., Priault, M., *et al.* (2003). "The product of the UTH1 gene, required for Bax-induced cell death in yeast, is involved in the response to rapamycin." *Mol Microbiol* 47(2): 495-506.
- Cerretti, D. P., Kozlosky, C. J., Mosley, B., Nelson, N., *et al.* (1992). "Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme." *Science* 256(5053): 97-100.
- Clemenson, C. y Marsolier-Kergoat, M. C. (2009). "DNA damage checkpoint inactivation: adaptation and recovery." *DNA Repair (Amst)* 8(9): 1101-1109.
- Cohen, C., Zavala-Pompa, A., Sequeira, J. H., Shoji, M., *et al.* (2002). "Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression." *Clin Cancer Res* 8(12): 3728-3733.
- Cohen, G. M. (1997). "Caspases: the executioners of apoptosis." *Biochem J* 326 (Pt 1): 1-16.
- Cole, K. C., McLaughlin, H. W. y Johnson, D. I. (2007). "Use of bimolecular fluorescence complementation to study in vivo interactions between Cdc42p and Rdi1p of *Saccharomyces cerevisiae*." *Eukaryot Cell* 6(3): 378-387.
- Cook, J. G., Bardwell, L., Kron, S. J. y Thorner, J. (1996). "Two novel targets of the MAP kinase Kss1 are negative regulators of invasive growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Genes Dev* 10(22): 2831-2848.

- Crespo, J. L. y Hall, M. N. (2002). "Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbiol Mol Biol Rev* 66(4): 579-591, table of contents.
- Cuenca-Lopez, M. D., Brea, D., Galindo, M. F., Anton-Martinez, D., *et al.* (2010). "[Inflammatory response during ischaemic processes: adhesion molecules and immunomodulation]." *Rev Neurol* 51(1): 30-40.
- Chae, H. J., Ke, N., Kim, H. R., Chen, S., *et al.* (2003). "Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast." *Gene* 323: 101-113.
- Chai, J., Du, C., Wu, J. W., Kyin, S., *et al.* (2000). "Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO." *Nature* 406(6798): 855-862.
- Chang, F. y Herskowitz, I. (1990). "Identification of a gene necessary for cell cycle arrest by a negative growth factor of yeast: FAR1 is an inhibitor of a G1 cyclin, CLN2." *Cell* 63(5): 999-1011.
- Chang, N. C., Nguyen, M., Germain, M. y Shore, G. C. (2010). "Antagonism of Beclin 1-dependent autophagy by BCL-2 at the endoplasmic reticulum requires NAF-1." *EMBO J* 29(3): 606-618.
- Chen, R. E. y Thorner, J. (2007). "Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochim Biophys Acta* 1773(8): 1311-1340.
- Chen, Y. y Sanchez, Y. (2004). "Chk1 in the DNA damage response: conserved roles from yeasts to mammals." *DNA Repair (Amst)* 3(8-9): 1025-1032.
- Cheong, H., Nair, U., Geng, J. y Klionsky, D. J. (2008). "The Atg1 kinase complex is involved in the regulation of protein recruitment to initiate sequestering vesicle formation for nonspecific autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Biol Cell* 19(2): 668-681.
- Chipuk, J. E., Bouchier-Hayes, L. y Green, D. R. (2006). "Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario." *Cell Death Differ* 13(8): 1396-1402.
- Choi, Y. J., Kim, S. K., Kim, S. H., Lee, K. S., *et al.* (2000). "*Saccharomyces cerevisiae* Ste5 is important for induction and substrate specificity of Fus3 MAP kinase in the pheromone signaling pathway." *Mol Cells* 10(3): 301-308.
- Chu, C. Y., Tsai, Y. Y., Wang, C. J., Lin, W. L., *et al.* (2001). "Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia cells." *Eur J Pharmacol* 416(1-2): 25-32.
- Chua, C. E. y Tang, B. L. (2006). "alpha-synuclein and Parkinson's disease: the first roadblock." *J Cell Mol Med* 10(4): 837-846.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Milzani, A., Di Simplicio, P., *et al.* (2001). "The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself." *Free Radic Biol Med* 31(12): 1624-1632.
- de Nadal, E., Casadome, L. y Posas, F. (2003). "Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase." *Mol Cell Biol* 23(1): 229-237.
- Djavaheri-Mergny, M., Maiuri, M. C. y Kroemer, G. (2010). "Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1." *Oncogene* 29(12): 1717-1719.
- Deb, I. y Das, S. (2011). "Thyroid hormones protect astrocytes from morphine-induced apoptosis by regulating nitric oxide and pERK 1/2 pathways." *Neurochem Int*.

- Dilda, P. J., Don, A. S., Tanabe, K. M., Higgins, V. J., *et al.* (2005). "Mechanism of selectivity of an angiogenesis inhibitor from screening a genome-wide set of *Saccharomyces cerevisiae* deletion strains." *J Natl Cancer Inst* 97(20): 1539-1547.
- Donepudi, M. y Grutter, M. G. (2002). "Structure and zymogen activation of caspases." *Biophys Chem* 101-102: 145-153.
- Eisenberg, T., Buttner, S., Kroemer, G. y Madeo, F. (2007). "The mitochondrial pathway in yeast apoptosis." *Apoptosis* 12(5): 1011-1023.
- Elion, E. A., Satterberg, B. y Kranz, J. E. (1993). "FUS3 phosphorylates multiple components of the mating signal transduction cascade: evidence for STE12 and FAR1." *Mol Biol Cell* 4(5): 495-510.
- Escote, X., Zapater, M., Clotet, J. y Posas, F. (2004). "Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1." *Nat Cell Biol* 6(10): 997-1002.
- Espinet, C., de la Torre, M. A., Aldea, M. y Herrero, E. (1995). "An efficient method to isolate yeast genes causing overexpression-mediated growth arrest." *Yeast* 11(1): 25-32.
- Farah, M. E. y Amberg, D. C. (2007). "Conserved actin cysteine residues are oxidative stress sensors that can regulate cell death in yeast." *Mol Biol Cell* 18(4): 1359-1365.
- Fahrenkrog, B., Sauder, U. y Aebi, U. (2004). "The *S. cerevisiae* HtrA-like protein Nma111p is a nuclear serine protease that mediates yeast apoptosis." *J Cell Sci* 117(Pt 1): 115-126.
- Festjens, N., Cornelis, S., Lamkanfi, M. y Vandenabeele, P. (2006). "Caspase-containing complexes in the regulation of cell death and inflammation." *Biol Chem* 387(8): 1005-1016.
- Flower, T. R., Chesnokova, L. S., Froelich, C. A., Dixon, C., *et al.* (2005). "Heat shock prevents alpha-synuclein-induced apoptosis in a yeast model of Parkinson's disease." *J Mol Biol* 351(5): 1081-1100.
- Foghsgaard, L., Wissing, D., Mauch, D., Lademann, U., *et al.* (2001). "Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor." *J Cell Biol* 153(5): 999-1010.
- Franssens, V., Boelen, E., Anandhakumar, J., Vanhelimont, T., *et al.* (2010). "Yeast unfolds the road map toward alpha-synuclein-induced cell death." *Cell Death Differ* 17(5): 746-753.
- Fusco, C., Guidotti, E. y Zervos, A. S. (1999). "In vivo construction of cDNA libraries for use in the yeast two-hybrid system." *Yeast* 15(8): 715-720.
- Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., *et al.* (2007). "Cell death modalities: classification and pathophysiological implications." *Cell Death Differ* 14(7): 1237-1243.
- Garrido, C. y Kroemer, G. (2004). "Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins." *Curr Opin Cell Biol* 16(6): 639-646.
- Gartner, A., Jovanovic, A., Jeoung, D. I., Bourlat, S., *et al.* (1998). "Pheromone-dependent G1 cell cycle arrest requires Far1 phosphorylation, but may not involve inhibition of Cdc28-Cln2 kinase, in vivo." *Mol Cell Biol* 18(7): 3681-3691.
- Giaever, G., Shoemaker, D. D., Jones, T. W., Liang, H., *et al.* (1999). "Genomic profiling of drug sensitivities via induced haploinsufficiency." *Nat Genet* 21(3): 278-283.

- Gietz, R. D. y Woods, R. A. (2002). "Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method." *Methods Enzymol* 350: 87-96.
- Gilot, D., Serandour, A. L., Ilyin, G. P., Lagadic-Gossmann, D., *et al.* (2005). "A role for caspase-8 and c-FLIPL in proliferation and cell-cycle progression of primary hepatocytes." *Carcinogenesis* 26(12): 2086-2094.
- Giorgini, F. y Muchowski, P. J. (2006). "Screening for genetic modifiers of amyloid toxicity in yeast." *Methods Enzymol* 412: 201-222.
- Goltsev, Y. V., Kovalenko, A. V., Arnold, E., Varfolomeev, E. E., *et al.* (1997). "CASH, a novel caspase homologue with death effector domains." *J Biol Chem* 272(32): 19641-19644.
- Gonzalez, I. J., Desponds, C., Schaff, C., Mottram, J. C., *et al.* (2007). "Leishmania major metacaspase can replace yeast metacaspase in programmed cell death and has arginine-specific cysteine peptidase activity." *Int J Parasitol* 37(2): 161-172.
- Goudreault, M., D'Ambrosio, L. M., Kean, M. J., Mullin, M. J., *et al.* (2009). "A PP2A phosphatase high density interaction network identifies a novel striatin-interacting phosphatase and kinase complex linked to the cerebral cavernous malformation 3 (CCM3) protein." *Mol Cell Proteomics* 8(1): 157-171.
- Gourlay, C. W. y Ayscough, K. R. (2005). "The actin cytoskeleton: a key regulator of apoptosis and ageing?" *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(7): 583-589.
- Gourlay, C. W. y Ayscough, K. R. (2006). "Actin-induced hyperactivation of the Ras signaling pathway leads to apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 26(17): 6487-6501.
- Gozuacik, D. y Kimchi, A. (2007). "Autophagy and cell death." *Curr Top Dev Biol* 78: 217-245.
- Grallert, B. y Boye, E. (2008). "The multiple facets of the intra-S checkpoint." *Cell Cycle* 7(15): 2315-2320.
- Gross, A., Yin, X. M., Wang, K., Wei, M. C., *et al.* (1999). "Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death." *J Biol Chem* 274(2): 1156-1163.
- Gruhler, A., Olsen, J. V., Mohammed, S., Mortensen, P., *et al.* (2005). "Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway." *Mol Cell Proteomics* 4(3): 310-327.
- Guscetti, F., Nath, N. y Denko, N. (2005). "Functional characterization of human proapoptotic molecules in yeast *S. cerevisiae*." *Faseb J* 19(3): 464-466.
- Gutkind, J. S. (2000). "Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors." *Sci STKE* 2000(40): re1.
- Hagen, D. C., McCaffrey, G. y Sprague, G. F., Jr. (1991). "Pheromone response elements are necessary and sufficient for basal and pheromone-induced transcription of the FUS1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 11(6): 2952-2961.
- Hahn, J. S. y Thiele, D. J. (2002). "Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Slt2 kinase pathway by the stress-inducible Sdp1 dual specificity phosphatase." *J Biol Chem* 277(24): 21278-21284.

- Hanaoka, H., Noda, T., Shirano, Y., Kato, T., *et al.* (2002). "Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an Arabidopsis autophagy gene." *Plant Physiol* 129(3): 1181-1193.
- Hara, T. y Mizushima, N. (2009). "Role of ULK-FIP200 complex in mammalian autophagy: FIP200, a counterpart of yeast Atg17?" *Autophagy* 5(1): 85-87.
- Hartwell, L. H. y Weinert, T. A. (1989). "Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events." *Science* 246(4930): 629-634.
- He, C., Song, H., Yorimitsu, T., Monastyrska, I., *et al.* (2006). "Recruitment of Atg9 to the preautophagosomal structure by Atg11 is essential for selective autophagy in budding yeast." *J Cell Biol* 175(6): 925-935.
- Heideker, J., Lis, E. T. y Romesberg, F. E. (2007). "Phosphatases, DNA damage checkpoints and checkpoint deactivation." *Cell Cycle* 6(24): 3058-3064.
- Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K. A., Maldener, C., *et al.* (2004). "Chronological aging leads to apoptosis in yeast." *J Cell Biol* 164(4): 501-507.
- Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S. A., Dallaporta, B., *et al.* (1997). "The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death." *Oncogene* 15(13): 1573-1581.
- Ho, P. K. y Hawkins, C. J. (2005). "Mammalian initiator apoptotic caspases." *Febs J* 272(21): 5436-5453.
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., *et al.* (2000). "Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule." *Nat Immunol* 1(6): 489-495.
- Horecka, J. y Sprague, G. F., Jr. (1996). "Identification and characterization of FAR3, a gene required for pheromone-mediated G1 arrest in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 144(3): 905-921.
- Hu, C. D., Chinenov, Y. y Kerppola, T. K. (2002). "Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation." *Mol Cell* 9(4): 789-798.
- Huang, D. C. y Strasser, A. (2000). "BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death." *Cell* 103(6): 839-842.
- Huang, J. y Klionsky, D. J. (2007). "Autophagy and human disease." *Cell Cycle* 6(15): 1837-1849.
- Hutchins, M. U. y Klionsky, D. J. (2001). "Vacuolar localization of oligomeric alpha-mannosidase requires the cytoplasm to vacuole targeting and autophagy pathway components in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 276(23): 20491-20498.
- Inoue, Y. y Klionsky, D. J. (2010). "Regulation of macroautophagy in *Saccharomyces cerevisiae*." *Semin Cell Dev Biol* 21(7): 664-670.
- Ivanovska, I. y Hardwick, J. M. (2005). "Viruses activate a genetically conserved cell death pathway in a unicellular organism." *J Cell Biol* 170(3): 391-399.
- Jacoby, J. J., Nilius, S. M. y Heinisch, J. J. (1998). "A screen for upstream components of the yeast protein kinase C signal transduction pathway identifies the product of the SLG1 gene." *Mol Genet* 258(1-2): 148-155.

- Jia, L., Dourmashkin, R. R., Newland, A. C. y Kelsey, S. M. (1997). "Mitochondrial ultracondensation, but not swelling, is involved in TNF alpha-induced apoptosis in human T-lymphoblastic leukaemic cells." *Leuk Res* 21(10): 973-983.
- Johnsson, N. y Varshavsky, A. (1994). "Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(22): 10340-10344.
- Jung, U. S., Sobering, A. K., Romeo, M. J. y Levin, D. E. (2002). "Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase." *Mol Microbiol* 46(3): 781-789.
- Junttila, M. R., Li, S. P. y Westermarck, J. (2008). "Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival." *FASEB J* 22(4): 954-965.
- Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., *et al.* (2000). "Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex." *J Cell Biol* 150(6): 1507-1513.
- Kamada, Y., Yoshino, K., Kondo, C., Kawamata, T., *et al.* (2010). "Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy." *Mol Cell Biol* 30(4): 1049-1058.
- Kametaka, S., Okano, T., Ohsumi, M. y Ohsumi, Y. (1998). "Apg14p and Apg6/Vps30p form a protein complex essential for autophagy in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 273(35): 22284-22291.
- Kang, J. J., Schaber, M. D., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., *et al.* (1999). "Cascades of mammalian caspase activation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 274(5): 3189-3198.
- Kanki, T. y Klionsky, D. J. (2009). "Atg32 is a tag for mitochondria degradation in yeast." *Autophagy* 5(8): 1201-1202.
- Kanki, T., Wang, K., Cao, Y., Baba, M., *et al.* (2009). "Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy." *Dev Cell* 17(1): 98-109.
- Kanzawa, T., Germano, I. M., Komata, T., Ito, H., *et al.* (2004). "Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells." *Cell Death Differ* 11(4): 448-457.
- Kanzawa, T., Zhang, L., Xiao, L., Germano, I. M., *et al.* (2005). "Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3." *Oncogene* 24(6): 980-991.
- Kawamata, T., Kamada, Y., Kabeya, Y., Sekito, T., *et al.* (2008). "Organization of the pre-autophagosomal structure responsible for autophagosome formation." *Mol Biol Cell* 19(5): 2039-2050.
- Kemp, H. A. y Sprague, G. F., Jr. (2003). "Far3 and five interacting proteins prevent premature recovery from pheromone arrest in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 23(5): 1750-1763.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. y Currie, A. R. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* 26(4): 239-257.
- Kerzendorfer, C. y O'Driscoll, M. (2009). "Human DNA damage response and repair deficiency syndromes: linking genomic instability and cell cycle checkpoint proficiency." *DNA Repair (Amst)* 8(9): 1139-1152.

- Khan, M. A., Chock, P. B. y Stadtman, E. R. (2005). "Knockout of caspase-like gene, YCA1, abrogates apoptosis and elevates oxidized proteins in *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(48): 17326-17331.
- Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N. y Ohsumi, Y. (2001). "Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Biol* 152(3): 519-530.
- Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., *et al.* (1999). "Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast." *J Cell Biol* 147(2): 435-446.
- Khoury, C. M. y Greenwood, M. T. (2008). "The pleiotropic effects of heterologous Bax expression in yeast." *Biochim Biophys Acta* 1783(7): 1449-1465.
- Kiel, J. A. (2010). "Autophagy in unicellular eukaryotes." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365(1541): 819-830.
- Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N. y Ohsumi, Y. (2001). "Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Biol* 152(3): 519-530.
- Kissova, I., Plamondon, L. T., Brisson, L., Priault, M., *et al.* (2006). "Evaluation of the roles of apoptosis, autophagy, and mitophagy in the loss of plating efficiency induced by Bax expression in yeast." *J Biol Chem* 281(47): 36187-36197.
- Klein, S., Reuveni, H. y Levitzki, A. (2000). "Signal transduction by a nondissociable heterotrimeric yeast G protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7): 3219-3223.
- Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Jr., Emr, S. D., *et al.* (2003). "A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes." *Dev Cell* 5(4): 539-545.
- Kremer, A. E., Rust, C., Eichhorn, P., Beuers, U., *et al.* (2009). "Immune-mediated liver diseases: programmed cell death ligands and circulating apoptotic markers." *Expert Rev Mol Diagn* 9(2): 139-156.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., *et al.* (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." *Cell Death Differ* 16(1): 3-11.
- Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P. H., *et al.* (2001). "Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex." *J Biol Chem* 276(23): 20633-20640.
- Kucharczyk, R., Dupre, S., Avaro, S., Haguenaer-Tsapis, R., *et al.* (2000). "The novel protein Ccz1p required for vacuolar assembly in *Saccharomyces cerevisiae* functions in the same transport pathway as Ypt7p." *J Cell Sci* 113 Pt 23: 4301-4311.
- Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N. y Ohsumi, Y. (2002). "Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast." *J Biol Chem* 277(21): 18619-18625.
- Lankiewicz, S., Marc Luetjens, C., Truc Bui, N., Krohn, A. J., *et al.* (2000). "Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death." *J Biol Chem* 275(22): 17064-17071.

- Leadsham, J. E. y Gourlay, C. W. (2008). "Cytoskeletal induced apoptosis in yeast." *Biochim Biophys Acta* 1783(7): 1406-1412.
- Leber, B. y Andrews, D. W. (2010). "Closing in on the link between apoptosis and autophagy." *F1000 Biol Rep* 2: 88.
- Lee, N., Gannavaram, S., Selvapandiyam, A. y Debrabant, A. (2007). "Characterization of metacaspases with trypsin-like activity and their putative role in programmed cell death in the protozoan parasite *Leishmania*." *Eukaryot Cell* 6(10): 1745-1757.
- Legakis, J. E., Yen, W. L. y Klionsky, D. J. (2007). "A cycling protein complex required for selective autophagy." *Autophagy* 3(5): 422-432.
- Leist, M. y Jaattela, M. (2001). "Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(8): 589-598.
- Levine, B. y Klionsky, D. J. (2004). "Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy." *Dev Cell* 6(4): 463-477.
- Li, X., Gerber, S. A., Rudner, A. D., Beausoleil, S. A., *et al.* (2007). "Large-scale phosphorylation analysis of alpha-factor-arrested *Saccharomyces cerevisiae*." *J Proteome Res* 6(3): 1190-1197.
- Lisa-Santamaria, P., Neiman, A. M., Cuesta-Marban, A., Mollinedo, F., *et al.* (2009). "Human initiator caspases trigger apoptotic and autophagic phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochim Biophys Acta* 1793(3): 561-571.
- Liu, H., Krizek, J. y Bretscher, A. (1992). "Construction of a GAL1-regulated yeast cDNA expression library and its application to the identification of genes whose overexpression causes lethality in yeast." *Genetics* 132(3): 665-673.
- Longatti, A. y Tooze, S. A. (2009). "Vesicular trafficking and autophagosome formation." *Cell Death Differ* 16(7): 956-965.
- Lum, J. J., Bauer, D. E., Kong, M., Harris, M. H., *et al.* (2005). "Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis." *Cell* 120(2): 237-248.
- Lum, J. J., Schnepfle, D. J., Nie, Z., Sanchez-Dardon, J., *et al.* (2004). "Differential effects of interleukin-7 and interleukin-15 on NK cell anti-human immunodeficiency virus activity." *J Virol* 78(11): 6033-6042.
- Lynch-Day, M. A. y Klionsky, D. J. (2010). "The Cvt pathway as a model for selective autophagy." *FEBS Lett* 584(7): 1359-1366.
- Ma, J. L., Lee, S. J., Duong, J. K. y Stern, D. F. (2006). "Activation of the checkpoint kinase Rad53 by the phosphatidyl inositol kinase-like kinase Mec1." *J Biol Chem* 281(7): 3954-3963.
- Maddodi, N., Huang, W., Havighurst, T., Kim, K., *et al.* (2010). "Induction of autophagy and inhibition of melanoma growth in vitro and in vivo by hyperactivation of oncogenic BRAF." *J Invest Dermatol* 130(6): 1657-1667.
- Madeo, F., Engelhardt, S., Herker, E., Lehmann, N., *et al.* (2002). "Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine." *Curr Genet* 41(4): 208-216.
- Madeo, F., Frohlich, E. y Frohlich, K. U. (1997). "A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis." *J Cell Biol* 139(3): 729-734.

- Madeo, F., Frohlich, E., Ligr, M., Grey, M., *et al.* (1999). "Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast." *J Cell Biol* 145(4): 757-767.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., *et al.* (2002). "A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast." *Mol Cell* 9(4): 911-917.
- Madhani, H. D., Galitski, T., Lander, E. S. y Fink, G. R. (1999). "Effectors of a developmental mitogen-activated protein kinase cascade revealed by expression signatures of signaling mutants." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22): 12530-12535.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S. M. y Saito, H. (1994). "A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast." *Nature* 369(6477): 242-245.
- Madeo, F., Frohlich, E. y Frohlich, K. U. (1997). "A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis." *J Cell Biol* 139(3): 729-734.
- Maiuri, M. C., Ciriollo, A. y Kroemer, G. "Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome." *Embo J* 29(3): 515-516.
- Manjithaya, R., Jain, S., Farre, J. C. y Subramani, S. (2010). "A yeast MAPK cascade regulates pexophagy but not other autophagy pathways." *J Cell Biol* 189(2): 303-310.
- Mari, M. y Reggiori, F. (2010). "Atg9 reservoirs, a new organelle of the yeast endomembrane system?" *Autophagy* 6(8): 1221-1223.
- Martin, D. A., Siegel, R. M., Zheng, L. y Lenardo, M. J. (1998). "Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal." *J Biol Chem* 273(8): 4345-4349.
- Martin, E. R., Scott, W. K., Nance, M. A., Watts, R. L., *et al.* (2001). "Association of single-nucleotide polymorphisms of the tau gene with late-onset Parkinson disease." *Jama* 286(18): 2245-2250.
- Martin, H., Rodriguez-Pachon, J. M., Ruiz, C., Nombela, C., *et al.* (2000). "Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 275(2): 1511-1519.
- Marzella, L., Ahlberg, J. y Glaumann, H. (1982). "Isolation of autophagic vacuoles from rat liver: morphological and biochemical characterization." *J Cell Biol* 93(1): 144-154.
- Matsuura, K., Wakasugi, M., Yamashita, K. y Matsunaga, T. (2008). "Cleavage-mediated activation of Chk1 during apoptosis." *J Biol Chem* 283(37): 25485-25491.
- Mattison, C. P., Spencer, S. S., Kresge, K. A., Lee, J., *et al.* (1999). "Differential regulation of the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast by the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3." *Mol Cell Biol* 19(11): 7651-7660.
- Mazon, M. J., Behrens, M. M., Morgado, E. y Portillo, F. (1993). "Low activity of the yeast cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit Tpk3 is due to the poor expression of the TPK3 gene." *Eur J Biochem* 213(1): 501-506.
- Mazzoni, C., Herker, E., Palermo, V., Jungwirth, H., *et al.* (2005). "Yeast caspase 1 links messenger RNA stability to apoptosis in yeast." *EMBO Rep* 6(11): 1076-1081.
- McClean, M. N., Mody, A., Broach, J. R. y Ramanathan, S. (2007). "Cross-talk and decision making in MAP kinase pathways." *Nat Genet* 39(3): 409-414.

- McDonell, K. M. (1989). "The Indiana Medical History Museum: historic site and museum of medical history." *Caduceus* 5(3): 32-45.
- Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., *et al.* (1997). "FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC)." *Embo J* 16(10): 2794-2804.
- Meijer, A. J. y Codogno, P. (2009). "Autophagy: regulation and role in disease." *Crit Rev Clin Lab Sci* 46(4): 210-240.
- Melendez, A., Tallozy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E. L., *et al.* (2003). "Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*." *Science* 301(5638): 1387-1391.
- Melo, J. A., Cohen, J. y Toczyski, D. P. (2001). "Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo." *Genes Dev* 15(21): 2809-2821.
- Melo, J. y Toczyski, D. (2002). "A unified view of the DNA-damage checkpoint." *Curr Opin Cell Biol* 14(2): 237-245.
- Mendenhall, M. D. (1998). "Cyclin-dependent kinase inhibitors of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*." *Curr Top Microbiol Immunol* 227: 1-24.
- Meyen, J. Jahresbericht uber die resultate der arbeiten im felde der physiologischen Botanik vom der jahre. Wiegmann Archiv fur Naturgeschichte 2, 1-186.
- Mills, K. R., Reginato, M., Debnath, J., Queenan, B., *et al.* (2004). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(10): 3438-3443.
- Mitsui, K., Nakagawa, D., Nakamura, M., Okamoto, T., *et al.* (2005). "Valproic acid induces apoptosis dependent of Yca1p at concentrations that mildly affect the proliferation of yeast." *FEBS Lett* 579(3): 723-727.
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., *et al.* (1998). "A protein conjugation system essential for autophagy." *Nature* 395(6700): 395-398.
- Naiki, T., Wakayama, T., Nakada, D., Matsumoto, K., *et al.* (2004). "Association of Rad9 with double-strand breaks through a Mec1-dependent mechanism." *Mol Cell Biol* 24(8): 3277-3285.
- Nakatogawa, H., Ichimura, Y. y Ohsumi, Y. (2007). "Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion." *Cell* 130(1): 165-178.
- Neiman, A. M. (1998). "Prospore membrane formation defines a developmentally regulated branch of the secretory pathway in yeast." *J Cell Biol* 140(1): 29-37.
- Nern, A. y Arkowitz, R. A. (1999). "A Cdc24p-Far1p-Gbetagamma protein complex required for yeast orientation during mating." *J Cell Biol* 144(6): 1187-1202.
- Ng, P. W., Porter, A. G. y Janicke, R. U. (1999). "Molecular cloning and characterization of two novel pro-apoptotic isoforms of caspase-10." *J Biol Chem* 274(15): 10301-10308.
- Nixon, R. A., Wegiel, J., Kumar, A., Yu, W. H., *et al.* (2005). "Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study." *J Neuropathol Exp Neurol* 64(2): 113-122.

- Nolan, S., Cowan, A. E., Koppel, D. E., Jin, H., *et al.* (2006). "FUS1 regulates the opening and expansion of fusion pores between mating yeast." *Mol Biol Cell* 17(5): 2439-2450.
- O'Neill, B. M., Szyjka, S. J., Lis, E. T., Bailey, A. O., *et al.* (2007). "Pph3-Psy2 is a phosphatase complex required for Rad53 dephosphorylation and replication fork restart during recovery from DNA damage." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(22): 9290-9295.
- Ohsumi, Y. (2001). "Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(3): 211-216.
- Okada, Y., Maeno, E. y Mori, S. (2004). "Anion channel involved in induction of apoptosis and necrosis." *Adv Exp Med Biol* 559: 205-209.
- Oltvai, Z. N., Milliman, C. L. y Korsmeyer, S. J. (1993). "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death." *Cell* 74(4): 609-619.
- Ozaki, K., Tanaka, K., Imamura, H., Hihara, T., *et al.* (1996). "Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*." *EMBO J* 15(9): 2196-2207.
- Pasteur, L. (1872). Nouvelles experiences pour demontrer que le germe de la levure qui fait le vin provient de l-exterieur des grains de Raisin. *Comptes rendus de l'Academie des Science de Paris* 75, 781-796.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., *et al.* (2005). "Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy." *Cell* 122(6): 927-939.
- Pattison, L. R., Kotter, M. R., Fraga, D. y Bonelli, R. M. (2006). "Apoptotic cascades as possible targets for inhibiting cell death in Huntington's disease." *J Neurol* 253(9): 1137-1142.
- Pellett, P. E., McKnight, J. L., Jenkins, F. J. y Roizman, B. (1985). "Nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of a protein encoded in a small herpes simplex virus DNA fragment capable of trans-inducing alpha genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(17): 5870-5874.
- Peter, M. y Herskowitz, I. (1994). "Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1." *Science* 265(5176): 1228-1231.
- Peter, M. E. y Krammer, P. H. (2003). "The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond." *Cell Death Differ* 10(1): 26-35.
- Priault, M., Salin, B., Schaeffer, J., Vallette, F. M., *et al.* (2005). "Impairing the bioenergetic status and the biogenesis of mitochondria triggers mitophagy in yeast." *Cell Death Differ* 12(12): 1613-1621.
- Proskuryakov, S. Y., Gabai, V. L. y Konoplyannikov, A. G. (2002). "Necrosis is an active and controlled form of programmed cell death." *Biochemistry (Mosc)* 67(4): 387-408.
- Puryer, M. A. y Hawkins, C. J. (2006). "Human, insect and nematode caspases kill *Saccharomyces cerevisiae* independently of YCA1 and Aif1p." *Apoptosis* 11(4): 509-517.
- Putnam, C. D., Jaehnig, E. J. y Kolodner, R. D. (2009). "Perspectives on the DNA damage and replication checkpoint responses in *Saccharomyces cerevisiae*." *DNA Repair (Amst)* 8(9): 974-982.
- Pyo, J. O., Jang, M. H., Kwon, Y. K., Lee, H. J., *et al.* (2005). "Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death." *J Biol Chem* 280(21): 20722-20729.

- Ravikumar, B., Acevedo-Arozena, A., Imarisio, S., Berger, Z., *et al.* (2005). "Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins." *Nat Genet* 37(7): 771-776.
- Reggiori, F., Shintani, T., Nair, U. y Klionsky, D. J. (2005). "Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts." *Autophagy* 1(2): 101-109.
- Reggiori, F., Tucker, K. A., Stromhaug, P. E. y Klionsky, D. J. (2004). "The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure." *Dev Cell* 6(1): 79-90.
- Riedl, S. J. y Shi, Y. (2004). "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(11): 897-907.
- Rohn, T. T., Kokouline, P., Eaton, C. R. y Poon, W. W. (2009). "Caspase activation in transgenic mice with Alzheimer-like pathology: results from a pilot study utilizing the caspase inhibitor, Q-VD-OPh." *Int J Clin Exp Med* 2(4): 300-308.
- Roth, W. (2009). "[Apoptosis resistance in malignant tumors: novel apoptosis-based therapeutic approaches]." *Pathologie* 30 Suppl 2: 113-116.
- Roux, P. P. y Blenis, J. (2004). "ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions." *Microbiol Mol Biol Rev* 68(2): 320-344.
- Saiki, S., Sasazawa, Y., Imamichi, Y., Kawajiri, S., *et al.* (2011). "Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition." *Autophagy* 7(2): 176-187.
- Saito, H. y Tatebayashi, K. (2004). "Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast." *J Biochem* 136(3): 267-272.
- Sakaki, K., Wu, J. y Kaufman, R. J. (2008). "Protein kinase C θ is required for autophagy in response to stress in the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 283(22): 15370-15380.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-5467.
- Saxena, M. y Mustelin, T. (2000). "Extracellular signals and scores of phosphatases: all roads lead to MAP kinase." *Semin Immunol* 12(4): 387-396.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., *et al.* (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." *Embo J* 17(6): 1675-1687.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H. y Peter, M. E. (1999). "The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis." *J Biol Chem* 274(3): 1541-1548.
- Scott, R. C., Schuldiner, O. y Neufeld, T. P. (2004). "Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body." *Dev Cell* 7(2): 167-178.
- Schell-Steven, A., Stein, K., Amoros, M., Landgraf, C., *et al.* (2005). "Identification of a novel, intraperoxisomal pex14-binding site in pex13: association of pex13 with the docking complex is essential for peroxisomal matrix protein import." *Mol Cell Biol* 25(8): 3007-3018.
- Schmelzle, T., Beck, T., Martin, D. E. y Hall, M. N. (2004). "Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast." *Mol Cell Biol* 24(1): 338-351.

- Schuler, M. y Green, D. R. (2005). "Transcription, apoptosis and p53: catch-22." *Trends Genet* 21(3): 182-187.
- Schweichel, J. U. y Merker, H. J. (1973). "The morphology of various types of cell death in prenatal tissues." *Teratology* 7(3): 253-266.
- Shi, Y. (2008). "Apoptosome assembly." *Methods Enzymol* 442: 141-156.
- Shoemaker, D. D., Lashkari, D. A., Morris, D., Mittmann, M., *et al.* (1996). "Quantitative phenotypic analysis of yeast deletion mutants using a highly parallel molecular bar-coding strategy." *Nat Genet* 14(4): 450-456.
- Silva, R. D., Sotoca, R., Johansson, B., Ludovico, P., *et al.* (2005). "Hyperosmotic stress induces metacaspase- and mitochondria-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Microbiol* 58(3): 824-834.
- Sinha, S. y Levine, B. (2008). "The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein." *Oncogene* 27 Suppl 1: S137-148.
- Skulachev, V. P. (2002). "Programmed death in yeast as adaptation?" *FEBS Lett* 528(1-3): 23-26.
- Smolka, M. B., Albuquerque, C. P., Chen, S. H. y Zhou, H. (2007). "Proteome-wide identification of *in vivo* targets of DNA damage checkpoint kinases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(25): 10364-10369.
- Soulard, A., Cremonesi, A., Moes, S., Schutz, F., *et al.* (2010). "The rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that TOR controls protein kinase A toward some but not all substrates." *Mol Biol Cell* 21(19): 3475-3486.
- Staleva, L., Hall, A. y Orlow, S. J. (2004). "Oxidative stress activates FUS1 and RLM1 transcription in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an oxidant-dependent manner." *Mol Biol Cell* 15(12): 5574-5582.
- Stennicke, H. R. y Salvesen, G. S. (1998). "Properties of the caspases." *Biochim Biophys Acta* 1387(1-2): 17-31.
- Stephan, C., Reidegeld, K. A., Hamacher, M., van Hall, A., *et al.* (2006). "Automated reprocessing pipeline for searching heterogeneous mass spectrometric data of the HUPO Brain Proteome Project pilot phase." *Proteomics* 6(18): 5015-5029.
- Stephan, J. S., Yeh, Y. Y., Ramachandran, V., Deminoff, S. J., *et al.* (2009). "The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(40): 17049-17054.
- Stephan, J. S., Yeh, Y. Y., Ramachandran, V., Deminoff, S. J., *et al.* (2010). "The Tor and cAMP-dependent protein kinase signaling pathways coordinately control autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*." *Autophagy* 6(2): 294-295.
- Stromhaug, P. E., Reggiori, F., Guan, J., Wang, C. W., *et al.* (2004). "Atg21 is a phosphoinositide binding protein required for efficient lipidation and localization of Atg8 during uptake of aminopeptidase I by selective autophagy." *Mol Biol Cell* 15(8): 3553-3566.
- Sung, M. K. y Huh, W. K. (2007). "Bimolecular fluorescence complementation analysis system for *in vivo* detection of protein-protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* 24(9): 767-775.

- Suzuki, K. y Ohsumi, Y. (2007). "Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*." *FEBS Lett* 581(11): 2156-2161.
- Sweeney, F. D., Yang, F., Chi, A., Shabanowitz, J., *et al.* (2005). "*Saccharomyces cerevisiae* Rad9 acts as a Mec1 adaptor to allow Rad53 activation." *Curr Biol* 15(15): 1364-1375.
- Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., *et al.* (1992). "Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction." *J Cell Biol* 119(2): 301-311.
- Tao, X. J., Tilly, K. I., Maravei, D. V., Shifren, J. L., *et al.* (1997). "Differential expression of members of the bcl-2 gene family in proliferative and secretory human endometrium: glandular epithelial cell apoptosis is associated with increased expression of bax." *J Clin Endocrinol Metab* 82(8): 2738-2746.
- Tate, J. J., Feller, A., Dubois, E. y Cooper, T. G. (2006). "*Saccharomyces cerevisiae* Sit4 phosphatase is active irrespective of the nitrogen source provided, and Gln3 phosphorylation levels become nitrogen source-responsive in a sit4-deleted strain." *J Biol Chem* 281(49): 37980-37992.
- Tatebayashi, K., Yamamoto, K., Tanaka, K., Tomida, T., *et al.* (2006). "Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway." *EMBO J* 25(13): 3033-3044.
- Tedford, K., Kim, S., Sa, D., Stevens, K., *et al.* (1997). "Regulation of the mating pheromone and invasive growth responses in yeast by two MAP kinase substrates." *Curr Biol* 7(4): 228-238.
- Teter, S. A., Eggerton, K. P., Scott, S. V., Kim, J., *et al.* (2001). "Degradation of lipid vesicles in the yeast vacuole requires function of Cvt17, a putative lipase." *J Biol Chem* 276(3): 2083-2087.
- Thevelein, J. M. y de Winder, J. H. (1999). "Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Microbiol* 33(5): 904-918.
- Tibbetts, M. D., Zheng, L. y Lenardo, M. J. (2003). "The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis." *Nat Immunol* 4(5): 404-409.
- Torres, J., Di Como, C. J., Herrero, E. y De La Torre-Ruiz, M. A. (2002). "Regulation of the cell integrity pathway by rapamycin-sensitive TOR function in budding yeast." *J Biol Chem* 277(45): 43495-43504.
- Travesa, A., Duch, A. y Quintana, D. G. (2008). "Distinct phosphatases mediate the deactivation of the DNA damage checkpoint kinase Rad53." *J Biol Chem* 283(25): 17123-17130.
- Tseng, S. F., Lin, J. J. y Teng, S. C. (2006). "The telomerase-recruitment domain of the telomere binding protein Cdc13 is regulated by Mec1p/Tel1p-dependent phosphorylation." *Nucleic Acids Res* 34(21): 6327-6336.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., *et al.* (2000). "A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*." *Nature* 403(6770): 623-627.
- Uren, A. G., O'Rourke, K., Aravind, L. A., Pisabarro, M. T., *et al.* (2000). "Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma." *Mol Cell* 6(4): 961-967.
- van der Vaart, A. y Reggiori, F. (2010). "The Golgi complex as a source for yeast autophagosomal membranes." *Autophagy* 6(6): 800-801.
- Vaughn, A. E. y Deshmukh, M. (2007). "Essential postmitochondrial function of p53 uncovered in DNA damage-induced apoptosis in neurons." *Cell Death Differ* 14(5): 973-981.

- Vercammen, D., Declercq, W., Vandenabeele, P. y Van Breusegem, F. (2007). "Are metacaspases caspases?" *J Cell Biol* 179(3): 375-380.
- Vialard, J. E., Gilbert, C. S., Green, C. M. y Lowndes, N. F. (1998). "The budding yeast Rad9 checkpoint protein is subjected to Mec1/Tel1-dependent hyperphosphorylation and interacts with Rad53 after DNA damage." *EMBO J* 17(19): 5679-5688.
- Vicencio, J. M., Galluzzi, L., Tajeddine, N., Ortiz, C., *et al.* (2008). "Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review." *Gerontology* 54(2): 92-99.
- Vilella, F., Herrero, E., Torres, J. y de la Torre-Ruiz, M. A. (2005). "Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress." *J Biol Chem* 280(10): 9149-9159.
- Vinod, P. K., Sengupta, N., Bhat, P. J. y Venkatesh, K. V. (2008). "Integration of global signaling pathways, cAMP-PKA, MAPK and TOR in the regulation of FLO11." *PLoS One* 3(2): e1663.
- Wadskog, I., Maldener, C., Proksch, A., Madeo, F., *et al.* (2004). "Yeast lacking the SRO7/SOP1-encoded tumor suppressor homologue show increased susceptibility to apoptosis-like cell death on exposure to NaCl stress." *Mol Biol Cell* 15(3): 1436-1444.
- Walker, P. R., Leblanc, J., Smith, B., Pandey, S., *et al.* (1999). "Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis." *Methods* 17(4): 329-338.
- Wang, C. W., Stromhaug, P. E., Kauffman, E. J., Weisman, L. S., *et al.* (2003). "Yeast homotypic vacuole fusion requires the Ccz1-Mon1 complex during the tethering/docking stage." *J Cell Biol* 163(5): 973-985.
- Wang, K., Yin, X. M., Chao, D. T., Milliman, C. L., *et al.* (1996). "BID: a novel BH3 domain-only death agonist." *Genes Dev* 10(22): 2859-2869.
- Wang, X. (2001). "The expanding role of mitochondria in apoptosis." *Genes Dev* 15(22): 2922-2933.
- Weber, A., Wasiliew, P. y Kracht, M. (2010). "Interleukin-1 (IL-1) pathway." *Sci Signal* 3(105): cm1.
- Weinberger, M., Ramachandran, L., Feng, L., Sharma, K., *et al.* (2005). "Apoptosis in budding yeast caused by defects in initiation of DNA replication." *J Cell Sci* 118(Pt 15): 3543-3553.
- Widlak, P. y Garrard, W. T. (2005). "Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G." *J Cell Biochem* 94(6): 1078-1087.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. y Johnson, G. L. (1999). "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human." *Physiol Rev* 79(1): 143-180.
- Winderickx, J., Delay, C., De Vos, A., Klinger, H., *et al.* (2008). "Protein folding diseases and neurodegeneration: lessons learned from yeast." *Biochim Biophys Acta* 1783(7): 1381-1395.
- Winzler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., *et al.* (1999). "Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis." *Science* 285(5429): 901-906.
- Wissing, S., Ludovico, P., Herker, E., Buttner, S., *et al.* (2004). "An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast." *J Cell Biol* 166(7): 969-974.
- Xie, Z. y Klionsky, D. J. (2007). "Autophagosome formation: core machinery and adaptations." *Nat Cell Biol* 9(10): 1102-1109.

- Xu, Q. y Reed, J. C. (1998). "Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast." *Mol Cell* 1(3): 337-346.
- Xue, L., Fletcher, G. C. y Tolkovsky, A. M. (2001). "Mitochondria are selectively eliminated from eukaryotic cells after blockade of caspases during apoptosis." *Curr Biol* 11(5): 361-365.
- Yan, W., Tiruppathi, C., Lum, H., Qiao, R., *et al.* (1998). "Protein kinase C beta regulates heterologous desensitization of thrombin receptor (PAR-1) in endothelial cells." *Am J Physiol* 274(2 Pt 1): C387-395.
- Yang, Z., Huang, J., Geng, J., Nair, U., *et al.* (2006). "Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy." *Mol Biol Cell* 17(12): 5094-5104.
- Yang, Z. y Klionsky, D. J. (2009). "An overview of the molecular mechanism of autophagy." *Curr Top Microbiol Immunol* 335: 1-32.
- Yorimitsu, T., He, C., Wang, K. y Klionsky, D. J. (2009). "Tap42-associated protein phosphatase type 2A negatively regulates induction of autophagy." *Autophagy* 5(5): 616-624.
- Yorimitsu, T., Zaman, S., Broach, J. R. y Klionsky, D. J. (2007). "Protein kinase A and Sch9 cooperatively regulate induction of autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Biol Cell* 18(10): 4180-4189.
- Yoshida, A., Pommier, Y. y Ueda, T. (2006). "Endonuclease activation and chromosomal DNA fragmentation during apoptosis in leukemia cells." *Int J Hematol* 84(1): 31-37.
- Young, C., Mapes, J., Hanneman, J., Al-Zarban, S., *et al.* (2002). "Role of Ptc2 type 2C Ser/Thr phosphatase in yeast high-osmolarity glycerol pathway inactivation." *Eukaryot Cell* 1(6): 1032-1040.
- Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., *et al.* (2006). "Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis." *Nat Cell Biol* 8(10): 1124-1132.
- Yu, L., Qi, M., Sheff, M. A. y Elion, E. A. (2008). "Counteractive control of polarized morphogenesis during mating by mitogen-activated protein kinase Fus3 and G1 cyclin-dependent kinase." *Mol Biol Cell* 19(4): 1739-1752.
- Yuga, M., Gomi, K., Klionsky, D. J. y Shintani, T. (2011). "Aspartyl aminopeptidase is imported from the cytoplasm to the vacuole by selective autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem*.
- Zhang, N. N., Dudgeon, D. D., Paliwal, S., Levchenko, A., *et al.* (2006). "Multiple signaling pathways regulate yeast cell death during the response to mating pheromones." *Mol Biol Cell* 17(8): 3409-3422.
- Zheng, W. H. y Quirion, R. (2006). "Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) induces the activation/phosphorylation of Akt kinase and cAMP response element-binding protein (CREB) by activating different signaling pathways in PC12 cells." *BMC Neurosci* 7: 51.
- Zhou, F., Yang, Y. y Xing, D. (2011). "Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis." *FEBS J* 278(3): 403-413.
- Zivny, J., Klener, P., Jr., Pytlik, R. y Andera, L. (2010). "The role of apoptosis in cancer development and treatment: focusing on the development and treatment of hematologic malignancies." *Curr Pharm Des* 16(1): 11-33.

- Zong, W. X., Lindsten, T., Ross, A. J., MacGregor, G. R., *et al.* (2001). "BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak." *Genes Dev* 15(12): 1481-1486.
- Zurita-Martinez, S. A. y Cardenas, M. E. (2005). "Tor and cyclic AMP-protein kinase A: two parallel pathways regulating expression of genes required for cell growth." *Eukaryot Cell* 4(1): 63-71.