

Natàlia Tinoco Gil

CARACTERITZACIÓ DE VHS2 COM A SUPRESSOR MULTICÒPIA DE LA TOXICITAT PER SOBRE EXPRESSIÓ DE LA FOSFATASA PPZ1

Treball de Fi de Grau

(Grau de Biotecnologia)

Tutor Acadèmic: Ricardo Román Cordero Otero

Doble grau de Biotecnologia i Bioquímica i Biologia molecular



**UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI**

Tarragona, juny del 2019

ÍNDEX

1. Dades del centre	2
2. Resum	2
3. Abreviatures	3
4. Introducció.....	4
4.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
4.1.1 Cicle cel·lular	5
4.2 Proteïnes fosfatases.....	8
4.3 Proteïnes fosfatases de tipus Z	8
4.4 Regulació de la proteïna fosfatasa de tipus Z 1	12
4.5 Proteïna viable en un fons HAL3 SIT4 2	13
5. Hipòtesi de treball i objectius.....	16
5.1 Hipòtesi de treball.....	16
5.2 Objectius	16
6. Metodologia	16
6.1 Soques i medis de cultiu	16
6.2 Extracció d'ADN genòmic.....	17
6.3 Amplificació del gen VHS2	18
6.4 Construcció del vector integratiu i obtenció dels transformants.....	19
6.5 Extracció plasmídica i seqüenciació	21
6.6 Mutagenització Ser314	22
6.7 Transformació de llevats.....	24
6.8 Assajos fenotípics.....	25
6.9 <i>Western Blot</i>	26
6.9.1 Rampa de filtratge.....	26
6.9.2 Extracció amb ATC.....	27
7. Resultats	29
7.1 Assajos fenotípics.....	29
7.2 <i>Western Blot</i>	32
8. Discussió	34
9. Conclusions.....	38
10. Bibliografia.....	39
11. Autoavaluació	41
12. Agraïments.....	42

1. DADES DEL CENTRE

Aquest Treball de Final de Grau es basa en la investigació duta a terme durant les pràctiques extracurriculars realitzades a l'Institut de Biomedicina i Biotecnologia (IBB), centre adscrit a l'UAB.

Els grups de recerca que formen part d'aquest institut tenen com a principals àmbits de treball la biotecnologia i la biomedicina. Aquests grups s'estructuren en 7 àrees diferents: Bioinformàtica, Biologia Cel·lular, Biologia Estructural, Genòmica, Immunologia, Microbiologia i Proteòmica. Els diferents grups de recerca que formen part de l'institut s'engloben en 3 unitats diferents:

- Proteòmica aplicada i enginyeria de proteïnes
- Genòmica de l'evolució i la malaltia
- Mecanismes de resposta a l'estrès i les malalties

Actualment l'IBB compta amb 215 investigadors adscrits d'entre els quals hi ha professors de la UAB, investigadors Ramón y Cajal, investigadors ICREA, investigadors post-doctorals, becaris pre-doctorals i tècnics dedicats al recolzament i funcionament dels diferents grups, així com serveis i plataformes tecnològiques que presten els seus serveis als diferents grups de recerca.



2. RESUM

La proteïna fosfatasa de tipus Z 1 (Ppz1) es troba únicament en fongs. Aquesta fosfatasa, juga un paper important en la tolerància osmòtica i salina, participa en el manteniment de la paret cel·lular i a més, es troba implicada en la progressió del cicle cel·lular. Ha estat observat que la sobre expressió d'aquesta proteïna és tòxica per *Saccharomyces cerevisiae*, així, es creu que la seva desregulació podria ser una bona diana per a les

noves teràpies antifúngiques. A dia d'avui, només dos inhibidors d'aquesta fosfatasa han estat descrits, Hal3 i Vhs3. En estudis anteriors realitzats en el mateix grup de recerca, es va observar que al sobre expressar Ppz1 es desfosforilava la proteïna Vhs2, indicant així que aquesta podria estar actuant com a supressora de la toxicitat deguda a la sobre expressió de Ppz1. En aquest treball, es persegueix l'objectiu de caracteritzar Vhs2 com a supressor de la toxicitat derivada de la sobre expressió de Ppz1 així com crear dos mutants diferents de *VHS2* per tal d'analitzar si la fosforilació/desfosforilació d'aquesta proteïna té algun efecte en la recuperació del fenotip tòxic provocat per la sobre expressió de Ppz1. Primerament, a través de tecnologia de l'ADN recombinant es van crear les dues versions mutades de *VHS2*, en les quals es va substituir la Serina en posició 314, per Alanina i Aspàrtic, mimetitzant així una desfosforilació i una fosforilació de la proteïna, respectivament. Posteriorment, es van dur a terme assajos de creixement en els que es va notificar que les soques que presentaven sobre expressió de Vhs2 eren capaces de revertir la toxicitat provocada per la sobre expressió de Ppz1 més efectivament que les soques *wild type* però no de la mateixa manera que ho fan aquelles soques que sobre expressen Hal3. A més, en aquests assajos també es va revelar que no existien diferències entre els fenotips dels dos mutants de *VHS2* estudiats durant el projecte. Per últim, els resultats dels estudis d'*immunoblotting*, van suggerir que la sobre expressió de Ppz1 causa l'augment dels nivells d'expressió de *VHS2*. Tot i això, no es va percebre una relació directa entre els nivells d'expressió d'ambdues proteïnes.

3. ABREVIATURES

ADN: Àcid desoxiribonucleic

C-terminal: Carboxil terminal

Amp: Ampicil·lina

DMSO: Dimetilsulfòxid

ARN: Àcid ribonucleic

Dox: Doxiciclina

ATC: Àcid Tricloroacètic

E. coli: *Escherichia coli*

Cdk: Quinasa dependent de ciclina

Gal: Galactosa

Cln: Ciclina

Glu: Glucosa

H⁺ : Hidrogen	<i>S. cerevisiae</i> : <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
K⁺ : Potassi	Ser : Serina
LB : Medi Luria Bertani	Thr : Treonina
Li⁺ : Liti	TrK : Receptors tirosina-quinasa
Na⁺ : Sodi	Tyr : Tirosina
N-terminal : Amino-terminal	URA : Medi mínim mancat d'uracil
o/n : <i>Over night</i>	Vhs2 : Proteïna viable en un fons HAL3 SIT4 2
PCR : Reacció en cadena de la polimerasa	w-t : <i>Wild type</i>
PP1 : Proteïna fosfatasa de tipus 1	YPD : Medi Yeast Extract-Peptide- Dextrose
PPZ : Proteïna fosfatasa de tipus Z	
Raff : Rafinosa	

4. INTRODUCCIÓ

4.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*) és un organisme eucariota unicel·lular pertanyent al regne *Fungi*, dins del qual es troba classificat en el fílum *Ascomycota* i en la família *Saccharomycetaceae*. Aquest llevat és capaç de créixer tant aeròbicament com anaeròbicament utilitzant diverses fonts de carboni, tot i que la glucosa (Glu) és la preferent. En la natura, aquest fong es troba normalment en la pell de fruits madurs. En el laboratori, les soques de *S. cerevisiae* existeixen en dues formes estables, haploide i diploide. El fet que l'anomenat llevat sigui un organisme fàcilment cultivable i manipulable genèticament, no sigui infecciós per humans, sigui un organisme eucariota i com a tal presenti una complexitat superior als bacteris, presenti un creixement ràpid, i a més, el seu genoma es trobi completament seqüenciat fa que des del punt de vista

de la recerca, *S. cerevisiae* s'hagi consolidat com un dels organismes models més utilitzats per l'estudi de problemes biològics així com per l'estudi de mecanismes moleculars (Karathia et al. 2011).

4.1.1 Cicle cel·lular

El cicle es divideix en dues fases: interfase o estat de no divisió; i l'estat de divisió o fase M.

La interfase és el període comprés entre dues mitosis, consistent en 3 etapes, o fases, diferents. La fase G1 és la primera del cicle cel·lular, en ella es produeix la síntesi de proteïnes i d'àcid ribonucleic (ARN) en un context de creixement cel·lular on la cèl·lula pot arribar a duplicar mida i massa. La segona fase és l'anomenada fase S, durant aquesta es produeix la síntesi d'àcid desoxiribonucleic (ADN). L'última fase d'aquest període és la fase G2, en ella es continua la síntesi proteica i d'ARN.

En la fase M es produeix la divisió asimètrica de la cèl·lula progenitora en una cèl·lula mare i una cèl·lula filla més petita que l'anterior. En aquesta fase es produeix tant la mitosi com la citocinesi.

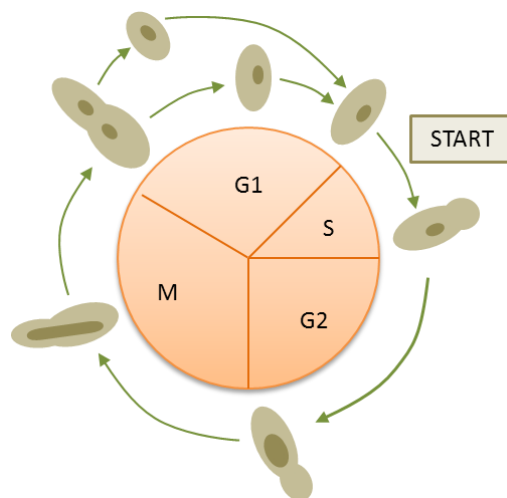


Figura 1. Dibuix esquemàtic de les fases del cicle cel·lular mitòtic de *S. cerevisiae*.

La successió i durada de les fases estan governades a nivell molecular, constituint així una regulació complexa la qual engloba dos punts de control principals. El primer entre

les fases G1 i S, en *S. cerevisiae* aquest punt de control es coneix com a START i és el principal regulador de la progressió del cicle cel·lular. En aquest punt es verifica que les condicions internes i externes siguin propícies per l'inici d'un nou cicle, la mida cel·lular sigui adequada i que l'ADN es trobi en perfecte estat. Un cop es produeixen les verificacions es determina l'inici de la replicació de l'ADN i amb ella un nou cicle. El segon punt de control principal del cicle cel·lular es troba entre les fases G2 i M, en aquest moment es comprova que l'ADN s'hagi duplicat de manera correcta i es regula l'entrada en mitosi (Barnum and O'Connell 2014).

L'execució d'START requereix l'activació de la proteïna quinasa dependent de ciclina 1 (Cdk1) codificada per *CDC28*. A diferència del que succeeix en mamífers, aquesta quinasa dependent de ciclina actua com a única responsable del control de la transició G1/S en *S. cerevisiae* (Alberghina et al. 2012). A l'etapa final de la mitosi, es forma un complex responsable del control de la mida cel·lular constituït per Cdk1 i la ciclina 3 (Cln3). Quan la cèl·lula assoleix les dimensions adequades, el complex Cln3-Cdk1 activa el procés d'inducció de gens que tenen un paper en la transició G1/S, com ara les ciclins 1 i 2 (Cln1, Cln2), i la ciclina B5 (Clb5). La transició entre les fases G1 i S requereix també l'activitat de fosfatases com són Sit4, Ppz1 i Glc7.

El gen *SIT4* de *S. cerevisiae* codifica per una proteïna fosfatasa de tipus 2 anomenada Sit4 que és indispensable per la progressió del cicle cel·lular en la transició G1/S. Sit4 és necessària per a l'expressió de les ciclins específiques de la fase G1, Cln1 i Cln2. A més, s'ha comprovat que les cèl·lules deficientes en aquesta proteïna presenten defectes en el sorgiment de la gemma. La importància del paper de Sit4 en la regulació del cicle cel·lular es veu reflectida en què la deleció del gen que la codifica juntament amb la deleció d'altres gens com el supressor de la letalitat de *sit4* 1 (*SSD1*) és sintèticament letal. Aquesta letalitat es dona quan la mutació *sit4* s'acompanya d'una deleció d'un altre gen determinat. Aquests gens són més de 20, la meitat dels quals estan relacionats amb el cicle cel·lular mitòtic. En altres cèl·lules en les quals no es dona aquest fons genètic determinat, les cèl·lules són viables però presenten un fenotip molt marcat per un creixement alentit. S'ha observat que la sobre expressió de *PP6* en humans o *PPV* en *Drosophila* reverteix el creixement alentit que presenten les cèl·lules mutants *sit4*, indicant així que les proteïnes codificades per aquests gens són homòlogues i que per

tant, Sit4 s'ha conservat en eucariotes durant l'evolució (Ariño, Velázquez, and Casamayor 2019).

Ppz1 també actua com a component regulador de la transició G1/S, la sobre expressió de *PPZ1* provoca nivells baixos d'expressió de les ciclines Cln2 i Clb5, causant un bloqueig en el creixement cel·lular i reduint la quantitat de cèl·lules en divisió. Tots aquests fets són propis d'un retard en la transició G1/S (Merchan et al. 2004). En canvi, la deleció de *PPZ1* accelera el creixement alentit que presenten els mutants *sit4* i resulta en una expressió primerenca de *CLN2* i *CLB5* afavorint així l'entrada a la fase S. A més, una de les unitats reguladores de Ppz1, Hal3, quan és sobre expressada és capaç de recuperar el defecte de creixement presentat per les cèl·lules mutants *sit4* (Di Como, Bose, and Arndt 1995). Aquesta relació patent entre les funcions de Ppz1 i Sit4 evidencia el fet que Ppz1 duu a terme un paper important en la transició G1/S, duent a terme funcions oposades a algunes de les atribuïdes a la fosfatasa Sit4. Específicament, Ppz1 exerceix una regulació negativa en la via de senyalització que regula la transcripció de les ciclines que actuen en la transició G1/S. A més, regula negativament processos implicats en la divisió correcta de les cèl·lules de llevat (Clotet et al. 1999).

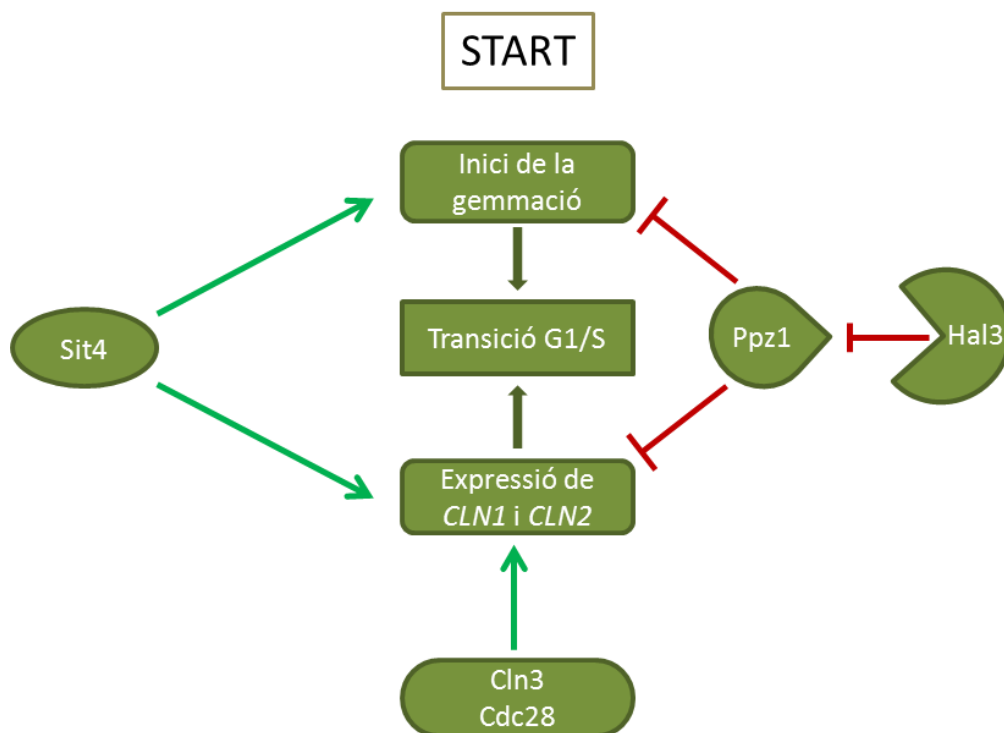


Figura 2. Representació esquemàtica del funcionament del punt de control START així com dels rols que desenvolupen Sit4 i Ppz1 durant la transició G1/S.

4.2 Proteïnes fosfatases

Un dels principals mecanismes de regulació post-traducciona del que disposen les cèl·lules eucariotes és la fosforilació/desfosforilació de proteïnes. L'estat de fosforilació d'una proteïna ve determinat pel balanç entre proteïnes quinases i fosfatases que actuen sobre ella. Les proteïnes quinases actuen lligant covalentment a un residu aminoacídic de la proteïna en qüestió un grup fosfat. La proteïna fosforilada adquireix característiques determinades pel que fa a reactivitat, especificitat o localització cel·lular, entre altres, que donen lloc a què les funcions que desenvolupa siguin diferents de les que duu a terme quan no presenta aquesta modificació. Aquesta fosforilació de proteïnes és reversible. De manera que un cop es desacobla el grup fosfat, a causa de l'acció d'una proteïna fosfatasa, la proteïna desfosforilada recupera la seva prèvia funcionalitat. En els organismes eucariotes hi ha una proporció molt major de proteïnes quinases respecte a la quantitat de fosfatases, aquest fet indica que les proteïnes fosfatases són menys específiques que les quinases, així, una mateixa proteïna fosfatasa pot participar en diversos processos cel·lulars i per això els mecanismes de regulació que actuen sobre elles han de ser més complexos que els de les quinases (Smoly et al. 2017).

En organismes eucariotes, les proteïnes fosfatases es classifiquen en tres tipus, les Tyr fosfatases, que desfosforilen residus de tirosina (Tyr); les Serina/Treonina (Ser/Thr) fosfatases, les quals desfosforilen residus de serina (Ser) i treonina (Thr); i les fosfatases d'especificitat dual, que són les que desfosforilen tant residus de Ser, com de Thr i de Tyr.

Les proteïnes Ser/Thr fosfatases són el tipus més abundant de fosfatases en organismes eucariotes. Aquest grup de proteïnes està dividit en tres famílies diferents, depenent de la seva estructura, seqüència i propietats enzimàtiques (Schulman 2014): fosfoproteïnes fosfatases, proteïnes fosfatases metall dependents i fosfatases basades en aspartat.

4.3 Proteïnes fosfatases de tipus Z

Classificades com a proteïnes Ser/Thr fosfatases, *S. cerevisiae* presenta les proteïnes fosfatases de tipus Z (Ppz). El genoma d'aquest llevat conté dos gens *PPZ1* i *PPZ2* que

codifiquen per dues Ser/Thr fosfatases de tipus Z, Ppz1 i Ppz2, respectivament. Aquestes fosfatases presenten una relació a escala estructural amb la proteïna fosfatasa de tipus 1 (Pp1), proteïna que es troba conservada en eucariotes superiors i que desenvolupa funcions molt importants en diversos mecanismes cel·lulars com són el processament d'ARN en la síntesi proteica, el metabolisme del glucogen i el control de diversos punts de regulació de les diverses etapes del cicle cel·lular (Yu, Deng, and Xiang 2018). Actualment, no es coneixen homòlegs humans de la fosfatasa Ppz1. Altrament, sí que se n'han trobat en altres fongs com són *Candida albicans* (CaPpz1), *Neurospora crassa* (Pz1) o *Schizosaccharomyces pombe* (Pzh1). Dites proteïnes comparteixen tant característiques estructurals com funcionals amb les fosfatases de tipus Z de *S. cerevisiae* (Leiter et al. 2012).

Estructuralment, aquestes dues proteïnes es caracteritzen per presentar dos dominis clarament diferenciats. Un d'ells és l'extrem carboxil-terminal (C-terminal) que comprèn el domini catalític i presenta l'activitat fosfatasa de la proteïna. En l'àmbit de seqüència, aquest domini mostra un 93% d'identitat entre Ppz1 i Ppz2, a més, presenta un 60% d'identitat amb el centre catalític de *PP1*. Per altra banda, la regió amino-terminal (N-terminal) no està relacionada amb *PP1* i la identitat que presenten Ppz1 i Ppz2 en aquesta regió és del 43%. La regió N-terminal conté una seqüència consens per a la N-miristilació. Aquest domini és ric en residus de Ser i Thr fet que resulta en un gran nombre de possibles llocs de fosforilació per diferents proteïnes quinases. S'ha suggerit que aquest extrem N-terminal podria exercir un paper regulador sobre el domini C-terminal (Ariño, Velázquez, and Casamayor 2019).

Tot i que Ppz1 i Ppz2 tenen funcions parcialment superposades, ha estat demostrat que a escala biològica les funcions de Ppz1 són molt més rellevants que les de Ppz2. Aquesta conclusió s'extreu a partir del fet que les soques mutants *ppz2* no mostren diferències fenotípiques respecte les salvatges. Mentre que les soques en les quals es dona una deleció de *PPZ1* són proclius a patir lisis cel·lular sota circumstàncies concretes, per afegitó, aquest fet es veu agreujat quan a més, les soques presenten una deleció de *PPZ2* (Ariño 2002).

La proteïna fosfatasa Ppz1 és clau en la tolerància osmòtica i salina de *S. cerevisiae*, desenvolupant un paper rellevant en l'homeòstasi catiònica. Característiques fonamentals de la cèl·lula com ara la mida, el potencial de membrana o el pH intern, entre d'altres, depenen directament del manteniment d'aquesta homeòstasi. Les cèl·lules tenen la capacitat de regular el pas de ions a través de la seva pròpia membrana, de manera que poden arribar a assolir un equilibri necessari per a la seva supervivència. S'ha demostrat que una concentració intracel·lular alterada dels principals cations monovalents (hidrogen (H^+), potassi (K^+) i sodi (Na^+)) pot arribar a provocar danys greus en la cèl·lula. A banda, el pH intracel·lular pot arribar a afectar de manera notable les proteïnes i les reaccions bioquímiques, per això és tan important la seva regulació estricta. Per tal de dur a terme aquesta regulació les membranes cel·lulars contenen diversos sistemes de transport de cations de manera que es reté una alta concentració de K^+ a l'interior cel·lular i s'expulsen a l'exterior Na^+ i liti (Li^+). Aquest moviment de cations permet mantenir el potencial de membrana necessari per al transport tant de nutrients com de cations. Permetent, alhora, el transport d'aigua a través de la membrana, fent que tant la mida com la turgència de la cèl·lula es vegin afectades (Serrano 1996). Les fosfatases Ppz actuen modulant l'homeòstasi catiònica a causa del fet que afecten els nivells d'expressió del gen *ENA1*. Aquest gen codifica per una proteïna que forma part d'un dels sistemes més importants pel transport de Na^+ , Li^+ i K^+ . S'ha comprovat que la deleció completa del clúster de gens *ENA* en *S. cerevisiae* resulta en un fenotip de sensibilitat a l'alta salinitat i a pHs alcalins. A més, s'ha observat que *ENA1* és el component funcionalment rellevant d'aquest clúster (Marquina et al. 2012). Una soca mutant *ppz1* de *S. cerevisiae* presenta un fenotip tolerant a Na^+ i Li^+ , aquest fenotip es veu pronunciat en un doble mutant *ppz1 ppz2*. Aquesta tolerància, en part, és el resultat d'un increment en l'expressió d'*ENA1*. El mecanisme pel qual Ppz1 regula negativament l'expressió d'*ENA1* comprèn la regulació negativa de la via de la calcineurina/Crz1 (Ruiz, Yenush, and Ariño 2003).

D'altra banda, les proteïnes fosfatases de tipus Z es troben involucrades en la regulació de la concentració intracel·lular de K^+ en *S. cerevisiae*. La importància d'aquest fet rau en què K^+ és el principal catió intracel·lular responsable del manteniment del volum cel·lular, la turgència, i el potencial elèctric de membrana, entre d'altres. *S. cerevisiae*

disposa d'un sistema d'alta afinitat per K^+ intervingut pels receptors tirosina-quinasa (Trk) Trk1 i Trk2, dels quals el Trk1 és el més rellevant des del punt de vista fisiològic. En soques de *S. cerevisiae* on s'ha produït una deleció d'ambdós TRKs s'observa una taxa de creixement reduïda i un defecte en el transport de K^+ provocant una hiperpolarització de la membrana plasmàtica i alhora un increment en la sensibilitat a Na^+ i Li^+ entre altres cations que són tòxics per la cèl·lula (Locascio et al. 2019). Els transportadors Trk estan regulats a nivell post-traduccional per diverses proteïnes quinases i fosfatases, unes d'elles són les proteïnes Ppzs. Tot i que fins a dia d'avui no ha estat descrit com les Ppzs duen a terme el procés de desfosforilació sobre aquests transportadors, sí ha estat demostrat que interaccionen físicament i que una soca de *S. cerevisiae* mutant *ppz1* presenta Trk1 amb un nivell incrementat de fosforilació (Ariño, Velázquez, and Casamayor 2019).

Les Ppzs també es troben implicades en el manteniment de la integritat de la paret cel·lular de *S. cerevisiae*. Aquest manteniment és indispensable per a la supervivència del llevat, ja que la paret actua com a defensa contra factors externs i canvis osmòtics. *S. cerevisiae* disposa d'una cascada de senyalització que s'activa quan es dona un dany en la paret provocat entre d'altres per agents químics i condicions ambientals. Dita cascada culmina amb l'activació final de Slt2/Mpk1. L'activació de Slt2 resulta en la fosforilació de dianes, tan nuclears com citosòliques, capaces d'activar factors de transcripció que al seu torn són capaços de respondre als defectes en la paret cel·lular. S'ha observat que mutacions en qualsevol dels components de la cascada provoquen lisi cel·lular en condicions comprometedores per a la integritat de la paret, com podrien ser exposició a altes concentracions salines o a altes temperatures (Levin 2005). Inicialment, es va relacionar les fosfatases Ppz amb la dita cascada, ja que es va caracteritzar les Ppzs com a supressores del defecte lític associat amb la deleció de SLT2/MPK1 (Lee, Hines, and Levin 1993). A més, posteriorment, s'ha observat que els fenotips observats en les soques deficientes en qualsevol dels components de la cascada Slt2/MPK1 (morfologia allargada, hipersensibilitat als canvis de temperatura i sensibilitat a cafeïna) són similars als que presenten les soques mutants *ppz*. A més, els efectes que provoca la deleció de *PPZ1* i *PPZ2* en les soques de *S. cerevisiae* són additius a aquells causats per la falta de Slt2 (Ariño, Velázquez, and Casamayor 2019). La relació entre la cascada Slt2/Mpk1 i

les Ppz s'explica a partir de la regulació de l'entrada de K^+ que duen a terme aquestes fosfatases. Les soques de *S. cerevisiae* deficientes en ppz1 i ppz2 presenten un increment en la quantitat de K^+ que entra a la cèl·lula, que al seu torn provoca un augment de la turgència cel·lular. Dites soques, en detectar aquestes situacions activarien la cascada Slt2/Mpk1 per tal d'intentar revertir els danys en la paret, i és per aquesta raó, que en la situació descrita, l'activitat de la dita cascada s'incrementa (Merchan et al. 2004). Si a més en aquestes soques també es provoca la deleció d'Slt2, la paret s'afebleix molt més i es pot arribar a situacions en les que es doni un fenotip lític. Això podria explicar l'impacte de Ppz1 en la cascada de senyalització i assentar les bases per entendre els descobriments previs que relacionaven Ppz amb la dita cascada.

A més, les Ppz estan implicades en la progressió del cicle cel·lular durant la transició de G1/S. Ha estat descrit que la sobre expressió de Ppz1 provocava un bloqueig en el creixement cel·lular, nivells d'expressió reduïts de *CLN2* i *CLB5* i un increment en la quantitat de cèl·lules que no són capaces de dividir-se. Tots aquests fets es poden relacionar amb un alentiment de la transició G1/S (Merchan et al. 2004).

S'ha observat que la sobre expressió de Ppz1 és molt tòxica pel llevat, fins al punt d'implicar un defecte pronunciat en el creixement cel·lular. Per això, es podria pensar que la desregulació de Ppz1 podria tenir un alt impacte en les teràpies antifúngiques (Molero, Casado, and Ariño 2017).

4.4 Regulació de la proteïna fosfatasa de tipus Z 1

Han estat descrites dues subunitats reguladores negatives de la fosfatasa Ppz1 en totes les seves funcions, les proteïnes Hal3 i Vhs3 (Ariño, Velázquez, and Casamayor 2019).

El gen *HAL3* va ser identificat de manera paral·lela, i de forma independent, en dos laboratoris. Per una banda, com a gen capaç de conferir tolerància salina quan se sobre expressa en soques salvatges de *S. cerevisiae* (Ferrando et al. 1995). I per altra, com a supressor multicòpia del defecte de creixement d'un mutant *sit4* (Di Como, Bose, and Arndt 1995). Aquest gen codifica per la proteïna Hal3, la qual està composta per 562 aminoàcids i posseeix tres dominis: el domini N-terminal, la regió PD i el domini C-

terminal. Dita proteïna està conservada evolutivament, presentant homòlegs en altres fongs, en mamífers i en plantes, en aquests dos últims organismes, però, s'han perdut els dominis N-terminal i C-terminal de manera que només es conserva el domini PD. S'ha observat que Hal3 és capaç d'unir-se a la regió C-terminal de Ppz1 i actuar com a subunitat reguladora d'aquesta proteïna. La sobre expressió d'*HAL3* confereix a les soques de *S. cerevisiae* tolerància a altes concentracions de Na⁺ i Li⁺, mentre que la falta del gen produeix un increment en l'halosensibilitat. Com s'ha esmentat amb anterioritat, la sobre expressió de *PPZ1* comporta una disminució en l'halotolerància. El fet que els fenotips provocats per la sobre expressió dels dos gens siguin totalment oposats ha permès establir una relació de funcionalitat entre ambdues proteïnes (Ariño, Velázquez, and Casamayor 2019).

Existeix una segona subunitat reguladora de Ppz1, Vhs3, paràloga de Hal3. Aquesta proteïna està codificada pel gen *VHS3 (YORO54c)* i es va identificar com a supressora multicòpia del bloqueig en l'etapa G1 del cicle cel·lular en mutants *sit4 hal3*. Vhs3 està composta per 674 aminoàcids i presenta un 49% d'identitat amb Hal3. Vhs3 és capaç de lligar-se al domini C-terminal de Ppz1 inhibint la seva activitat fosfatasa en assajos *in vitro*. Cal apuntar que la funció reguladora de Vhs3 té una rellevància biològica menor que la d'Hal3. Ruiz et. al van constatar que el doble mutant *hal3 vhs3* és sintètic letal. També es va observar que aquesta letalitat no es suprimia amb la deleció de *PPZ1*, *PPZ2* o ambdós gens, fet que indicava que la dita letalitat no era conseqüència d'un excés de l'activitat fosfatasa de les proteïnes de tipus Z (Ruiz et al. 2004).

Se sap que Hal3 i Vhs3 són proteïnes *moonlighting*, així doncs, a més d'actuar com a inhibidores de Ppz1 també desenvolupen un paper molt rellevant com a catalitzadores d'una de les etapes que conformen el procés de biosíntesis del Coenzim A (CoA) (González et al. 2013).

4.5 Proteïna viable en un fons HAL3 SIT4 2

La proteïna viable en un fons HAL3 SIT4 2 (Vhs2) està codificada pel gen *VHS2*, propi del genoma de *S. cerevisiae*, i consta de 436 aminoàcids de llargada. Es tracta d'una proteïna citoplasmàtica que presenta una localització difusa de la qual, avui dia, no se'n coneix ni

la funció ni la seva activitat enzimàtica. A més, en la seva estructura no presenta cap domini conservat que pugui ajudar a dilucidar la seva funció cel·lular (Cassani et al. 2014). No obstant això, en estudis anteriors ha estat indicat que Vhs2 podria contribuir en la regulació del citoesquelet d'actina, en la integritat de la paret cel·lular i en la polarització del creixement cel·lular (Gandhi, Goode, and Chan 2006).

Vhs2 va ser identificada com a supressora multicòpia de la letalitat produïda per la doble mutació *hal3 sit4* que provoca un arrest en la transició entre les fases G1 i S del cicle cel·lular (Muñoz et al. 2003). Aquest fet suggereix que Vhs2 podria estar involucrada en la transició G1-S.

En un estudi posterior, es va identificar Vhs2 com a supressora multicòpia de la termosensibilitat provocada per la mutació *gic1 gic2*, aquestes dues proteïnes promouen la polarització del creixement cel·lular. La seva deleció, en canvi, dona lloc a una acumulació de cèl·lules engrandides i arrodonides. Aquesta pèrdua de la polaritat cel·lular origina el debilitament de la paret cel·lular, que resulta en una letalitat cel·lular a altes temperatures (Gandhi, Goode, and Chan 2006). Aquesta reversió del fenotip termosensible per part de Vhs2 podria indicar que aquesta proteïna està implicada en la regulació de la polarització del citoesquelet cel·lular.

Cassani et al. en l'estudi publicat al 2014 van reportar evidències de què Vhs2 està involucrada en la regulació de la dinàmica de les septines en l'anell de gemmació just després de l'entrada en fase de mitosi, intervenint, sobretot, en l'estabilització de l'estructura de les septines. A més, també van mostrar que Vhs2 està regulada a nivell post-traducciona pel mecanisme de fosforilació cicle-dependent. Particularment, Vhs2 es veu fosforilada per Cdk1 i desfosforilada per Cdc14 abans de la citocinesi (Cassani et al. 2014). Cdk1 és una de les fosfatases principals que regulen la progressió del cicle cel·lular. S'ha comprovat en aquest estudi, que la inhibició de l'activitat de Cdk1 redueix la fosforilació de Vhs2, demostrant així, que Vhs2 és un substrat fisiològic per a Cdk1. Cdc14 és una proteïna fosfatasa considerada una de les principals reguladores de la progressió del cicle cel·lular. L'activació temporal de Cdc14 assegura una coordinació adequada entre la divisió nuclear, el desacoblament del citoesquelet, i la citocinesi. S'ha observat que Vhs2 interactua amb Cdc14 *in vivo*, i que els seus residus fosforilats es desfosforilen en presència de Cdc14 funcional, però en canvi, persisteixen en presència

d'una variant no funcional de la fosfatasa. D'aquesta manera, es creu que Cdc14 podria modular la funció de Vhs2 per tal de permetre el desacoblament de l'anell de septines al final del cicle cel·lular (Cassani et al. 2014).

Cassani et al. també van observar que la falta de Vhs2 no causa defectes evidents en la progressió del cicle cel·lular. No obstant això, sí que causa un defecte sintètic en el creixement en combinació amb mutants de septines i el regulador de septines, Rts1. Això podria indicar que Vhs2 duu a terme un paper regulador en la dinàmica de les septines. Una anàlisi fenotípica de les cèl·lules deficientes en Vhs2 va revelar que la falta d'aquesta proteïna causa un defecte en la dinàmica de les septines en l'anell de gemmació. Específicament, el que provoca la falta de Vhs2 en els dos anells de septines, que normalment es mantenen després de la separació de les cèl·lules, és que aquesta estructura sigui més inestable i es desacobli abans que en les cèl·lules de soques salvatges. Aquest fenotip es fa més evident a altes temperatures, en aquesta situació resulta en una hiperpolarització del creixement de la gemma, cosa que reforça la hipòtesi que les cèl·lules deficientes en septines no són capaces de mantenir correctament la localització de factors de polarització durant el creixement d'aquesta estructura, cosa que causa la formació de gemmes allargades. En canvi, aquest defecte és tolerat en soques salvatges. Així doncs, es podria concloure que Vhs2 juga un paper en el manteniment de l'estabilitat de l'estructura de septines després de la fase mitòtica. Tot i que no es coneix del tot com aquesta proteïna participa en l'organització de septines, es creu que Vhs2 podria controlar l'estabilització de la seva estructura interferint en les modificacions post-traduccionals.

Vhs2 es troba subjecta a modificacions post-traduccionals durant totes les fases del cicle cel·lular. Es tracta d'una fosfoproteïna *in vivo*. Vhs2 és desfosforilada, majoritàriament, en la fase G1. En canvi, durant les fases S, G2 i M del cicle s'acumulen les formes fosforilades d'aquesta proteïna, que comencen a decreixer en el moment que s'inicia la divisió cel·lular. El *timing* de la fosforilació d'aquesta proteïna juntament amb els altres descobriments realitzats en (Cassani et al. 2014), podrien estar indicant que la forma fosforilada de Vhs2 juga un paper important en la preservació de l'estructura de septines abans de la completa divisió cel·lular. En canvi, la seva desfosforilació permet el desacoblament de l'anell de septines i el reciclatge de les subunitats de septines.

Les estructures formades per les septines són importants per a la determinació de la morfologia cel·lular, característica que canvia durant la vida del llevat depenent de les condicions ambientals i durant el creixement de filaments invasius, elements essencials per a la virulència en els llevats patogènics. L'habilitat que tenen les cèl·lules dels llevats per canviar a la forma d'hifa ha estat descrita com una manera de resistir i sobreviure a l'acció fagocítica, fet que fa d'aquesta, una habilitat important i determinant en la virulència del llevat (Clemons et al. 2000). Així doncs, Vhs2 podria tenir implicacions importants en el camp de les teràpies antifúngiques.

5. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS

5.1 Hipòtesi de treball

Vhs2 actua com a supressor de la toxicitat per sobre expressió de Ppz1.

5.2 Objectius

Estudiar la possible acció supressora de Vhs2 sobre Ppz1, duent a terme assajos de creixement així com *Western blots*.

Construir i caracteritzar mutants de Vhs2. Els mutants es construiran utilitzant tecnologia de l'ADN recombinant. Posteriorment, es caracteritzaran els seus fenotips duent a terme assajos de creixement.

6. METODOLOGIA

6.1 Soques i medis de cultiu

Les soques de *S. cerevisiae* es van fer créixer en medi *Yeast Extract-Peptone-Dextrose* (YPD) (20 g/l Glu, 20 g/l peptona i 10 g/l extracte de llevat) a una temperatura constant de 28 °C i agitació de 230 rpm. Les soques utilitzades durant aquest projecte es troben

recollides en la *Taula 1*. En cas de necessitar un medi sòlid es va afegir un 2% d'agar al medi descrit anteriorment.

En els casos en que es va necessitar dur a terme una selecció de les diferents soques de *S. cerevisiae* es va utilitzar medi mínim mancat d'uracil (URA⁻) (6.7 g/l *Yeast Nitrogen Base-amino acids*, 20 g/l Glu (o 20 g/l galactosa (Gal) i 10 g/l rafinosa (Raff), 2 g *Yeast Synthetic Drop-out Mix* (Sigma-Aldrich)). En cas de necessitar un medi sòlid es va afegir un 2% d'agar.

Taula 1. Soques de *S. cerevisiae* utilitzades durant l'experimental.

SOCA	GENOTIP RELLEVANT	ORIGEN/REFERÈNCIA
BY4741	Mat a his3Δ1, leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0	(Winzeler et al. 1999)
MLM04	Mat a his3Δ1, leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 promotor ppz1::tetOFF7 promotor::kanMX4	No ha estat publicat
RF1668	Mat a leu2-3/112 ura3-1 trp1-1 his3-11/15 ade 2-1 can1-100 VHS2-6HA::KanMX	(Cassani et al. 2014)
ZCZ001	Mat a his3Δ1, leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 promotor ppz1::pGAL::kanMX6	No ha estat publicat

Es va utilitzar medi Luria Bertani (LB) (10 g/L NaCl, 10 g/L bactotripton i 5 g/L extracte de llevat) a una temperatura constant de 37 °C i agitació 230 rpm per fer créixer la soca DH5α (F-SupE44DlacU1(f80lacZDM15)hsdR17 recA1 gyrA96 thi-1 relA1) d'*Escherichia coli* (*E. coli*), utilitzada com a hoste pels experiments de clonació d'ADN i emmagatzematge de plasmidis. Aquest medi es va suplementar amb 50 µg/ml d'ampicil·lina (Amp) quan es va haver de dur a terme una selecció plasmídica. En cas de necessitar un medi sòlid es va afegir un 2% d'agar a la barreja.

6.2 Extracció d'ADN genòmic

Inicialment, es va dur a terme una extracció d'ADN genòmic de la soca RF1668 de *S. cerevisiae* que conté en el seu genoma el gen *VHS2* i una etiqueta amb l'epítotop HA. Per fer-ho, es van picar diverses colònies d'RF1668 en URA⁻ i es van deixar en incubació a 28 °C i 200 rpm d'agitació *over night* (o/n). Posteriorment, es van afegir 1.5 ml de cultiu o/n en un tub de 2 ml. A continuació, es va dur a terme una centrifugació a 13000 xg

durant 1 min, per posteriorment descartar el sobrenedant. Al pellet se li van afegir 100 µl d'STET (8% sucrosa; 50 mM Tris pH 8; 50 mM EDTA; 5% Tritó X-100). Un cop resuspès, es van afegir 0.2 g de *Zirconia/Silica 0.5 mm beads* (BioSpec). Seguidament es va alternar 1 min de vòrtex amb 1 min d'incubació en gel, durant 3 cicles. Un cop realitzada l'última incubació, es van afegir 125 µl d'STET i es van vortejar breument els tubs, per tal d'homogeneïtzar-ne el contingut. Es van bullir les mostres durant 3 min utilitzant un bloc a 95 °C i posteriorment, es va dur a terme una incubació en gel durant 1 min. Es van centrifugar 10 min a 4 °C i 500 xg, per tal d'acabar recollint 100 µl del sobrenedant en tubs de 2 ml nous en els quals seguidament es van afegir 50 µl d'acetat amònic (8 M). Es va dur a terme un procés de congelació de les mostres a -20 °C durant 1 h. Un cop finalitzat aquest període, es van centrifugar durant 10 min a 4 °C i 12000 xg. Tot seguit, es van recollir 100 µl del sobrenedant en tubs nous on, posteriorment, es van afegir 200 µl d'etanol (100%) fred. Es va dur a terme una centrifugació a 12000 xg i 4 °C durant 10 min, per seguidament, descartar el sobrenedant. Els pellets es van rentar amb 500 µl d'etanol (70%), es van tornar a centrifugar durant 1 min a 4 °C i 12000 xg i es va descartar el sobrenedant. Finalment, es van deixar assecar els pellets amb els tubs oberts a 37 °C i un cop secs, es van resuspendre en 50 µl d'H₂O MiliQ.

6.3 Amplificació del gen VHS2

Un cop realitzada l'extracció d'ADN genòmic de la soca RF1668, s'havia d'amplificar la seqüència compresa pel gen VHS2 i l'etiqueta 6HA. Per fer-ho, es va dur a terme una Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilitzant com a motlle l'ADN genòmic prèviament extret de la soca RF1669. El mix de PCR estava constituït per 0.5 µl de cada un dels encebadors (Sacl Fw VHS2 prom i KpnI Rev VHS2 term), 10 µl de *buffer* Q5 5x (New England Biolabs), 10 µl de deoxinucleòtids (dNTPs) (Sigma-Aldrich), 2 µl d'ADN genòmic RF1668, 0.5 µl de Q5 *High-fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs) i 26.5 µl d'H₂O, tenint així un volum final de 50 µl. Els encebadors utilitzats en aquesta reacció estan recollits en la *Taula 2*.

Taula 2. Oligonucleòtids utilitzats en la PCR d'amplificació de VHS2 + 6HA.

ENCEBADOR	SEQÜÈNCIA
KpnI Rev vhs2HA term	ACCGGTACCGTCAAGACTGTCAAGGAG
SacI Fw vhs2 prom	ACCGAGCTCGCATGTCACAAGATACTTGA

La PCR es va iniciar amb una fase d'inicialització, amb una durada de 30 seg a 98 °C. Posteriorment, es van programar 22 cicles, constituïts per tres etapes diferents: desnaturalització, etapa en la qual les mostres s'escalfen a 98 °C durant 30 seg; Alineament, la temperatura baixa fins els 50 °C durant 30 seg per tal de que l'encebador s'uneixi a les seqüències; I extensió, fase que té 1:30 min de durada a una temperatura de 72 °C. Un cop finalitzats els 22 cicles, es va programar una fase d'elongació final, amb una durada de 2 min a 72 °C. Finalment, per conservar el resultat de la reacció a curt termini, es va programar una fase de conservació a 4 °C i temps indefinit.

Per tal de tenir la certesa que durant la PCR s'havia amplificat la seqüència d'interès, es va preparar un gel a l'1% d'agarosa, en cada pou del qual es van dipositar 5 µl del producte de PCR i 1 µl de *buffer* de càrrega 6X (ThermoFisher). Un cop corregut el gel, es van visualitzar les bandes amb un transiluminador i es va confirmar que presentessin la mida esperada (2142pb).

6.4 Construcció del vector integratiu i obtenció dels transformants

Per tal de purificar els productes de la PCR es va utilitzar el *kit PCR clean-up Gel extraction* (NucleoSpin). En el tub de PCR es van afegir 100 µl del *buffer* NT1. Es va homogeneïtzar el contingut del tub i es va traspasar a una columna la qual es va introduir en l'interior d'un tub de recol·lecció. Es va dur a terme una centrifugació a 11000 xg durant 30 seg i posteriorment es va descartar l'eluït. Seguidament, 700 µl de *buffer* NT3 van ser afegits a la columna, es va tornar a centrifugar a 11000 xg durant 30 seg i es va descartar l'eluït. Aquest pas es va realitzar per duplicat. Posteriorment, es va deixar la columna oberta 10 min de manera que la membrana de *Silica* s'assequés. Es va dur a terme una centrifugació a 11000 xg durant 1 min. Es va traslladar la columna a un tub d'1.5 ml, on es van afegir 30 µl de *buffer* NE i es va dur a terme una incubació a

temperatura ambient durant 10 min. Finalment, es va realitzar una centrifugació a 11000 xg durant 1 min, per posteriorment conservar l'eluit.

Un cop purificat el producte de la PCR, es va dur a terme la seva restricció, així com la del plasmidi Yep195. Per tal de realitzar la restricció del producte de PCR es van introduir en el tub: 30 µl del producte de PCR purificat, 4 µl *FastDigest Green Buffer* (10X) (Thermo Fisher), 1 µl de *SacI* i 1 µl de *KpnI*. Per altra banda, per tal de dur a terme la restricció del plasmidi, es van introduir en un tub de PCR: 500 ng del plasmidi Yep195, 10 µl d'aigua, 2 µl de *FastDigest Green Buffer* (10X) (Thermo Fisher), 1 µl *FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (1 U/µl) (Thermo Fisher), 1 µl de *SacI* i 1µl de *KpnI*. Un cop es van tenir els tubs preparats, es van incubar 30 min al termociclador a 37 °C. Un cop esgotat el temps d'incubació, es va córrer un gel d'agarosa a l'1%. Amb el transiluminador es van localitzar les dues bandes d'interès, corresponents al plasmidi obert i a l'insert, i amb l'ajuda d'un bisturí es va tallar el gel i es van introduir els fragments en un tub d'1.5 ml prèviament pesat. Tot seguit, es va tornar a pesar el tub per tal de conèixer el pes dels fragments. Les bandes es van purificar mitjançant el protocol *DNA extraction from agarose gel* (Nucleospin Gel and PCR clean-up). Així doncs, es va afegir en cada tub d'1.5 ml la quantitat requerida de *buffer* NT1, tenint en compte que per cada 100 mg de gel d'agarosa s'havien d'afegir 200 µl de *buffer*. Es van incubar els tubs a 50 °C durant 10 min, vortejant-los cada 2 min. En l'interior d'un tub de recol·lecció es va disposar una columna on es van introduir 700 µl de mostra. Es va dur a terme una centrifugació a 11000 xg durant 30 seg. Posteriorment, es va descartar l'eluit i es van afegir 700 µl de *buffer* NT3 en la columna. Es va centrifugar a 11000 xg durant 30 seg, i es va descartar el sobrenedant. Tant el rentat com la centrifugació es van realitzar per duplicat. Seguidament, es va dur a terme una centrifugació a 11000 xg durant 1 min. Es va descartar l'eluit i es va introduir la columna en un nou tub d'1.5 ml. Es van afegir 30 µl de *buffer* NE i es va deixar incubar durant 10 min a temperatura ambient. Finalment, es va dur a terme una centrifugació a 11000 xg durant 1 min i es va conservar l'eluit.

Un cop purificat l'ADN es va realitzar una lligació *fast*. Per fer-ho, es van introduir en dos tubs de PCR les quantitats indicades en la *Taula 3* de plasmidi Yep195, *T4 DNA ligase* (Thermo Fisher), *5X rapid ligation buffer* (Thermo Fisher) e insert/H₂O.

Taula 3. Quantitats de cada reactiu compreses en els tubs, tant de plasmidi com de control.

REACTIU	TUB PLASMIDI	TUB CONTROL
Insert/H ₂ O	12 µl Insert	12 µl H ₂ O
Plàsmid Yep195	4 µl	4 µl
Lligasa (<i>T4 DNA ligase</i>)	1 µl	1 µl
<i>Buffer (5X rapid ligation buffer)</i>	4 µl	4 µl

Els tubs de PCR van ser incubats en el termociclador durant 20 min a 22 °C, de manera que es produís la lligació. Seguidament, es va dur a terme la transformació d'*E. coli*. Es van introduir 50 µl d'*E. coli* competents¹ en cadascun dels tubs de PCR, es van resuspendre i es va traslladar el contingut a tubs d'1.5 ml estèrils. Posteriorment, es va realitzar una incubació de 30 min en gel. Es va dur a terme un xoc tèrmic a 42 °C durant 1:30 h i posteriorment, es van incubar 2 min en gel. Després, es van afegir 400 µl de medi de brou superòptim o SOC (2% triptona, 0.5% extracte de llevat, 20 mM de Glu, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ i 2.5 mM KCl) i es van incubar les mostres durant 1 h a 37 °C i agitació suau. A continuació, es va dur a terme una centrifugació a 12000 rpm durant 1 min. Es va descartar la major part del sobrenedant, de manera que el restant es va utilitzar per a resuspendre el pellet, que es va plaquejar en plaques LB + Amp, les quals van ser incubades o/n a 37 °C. Un cop crescudes les colònies d'*E. coli* es va comprovar que en les plaques del control negatiu (*E. coli* transformades amb plasmidi buit) hi hagués molt poques colònies en comparació amb les plaques d'*E. coli* transformades amb el plasmidi Yep195 + l'insert.

6.5 Extracció plasmídica i seqüenciació

Posteriorment, es van picar dues colònies de cada placa d'insert en tubs LB ens els quals prèviament s'havien afegit 50 µl d'Amp. Aquests tubs es van incubar o/n a 37 °C i amb una agitació de 200 rpm.

¹ En aquest laboratori es disposa d'un stock d'*E. coli* competents. El qual es prepara seguint el protocol descrit anteriorment (Ausubel 1987).

Per tal de dur a terme l'extracció plasmídica, es va utilitzar el kit *NucleoSpin® Plasmid* (Macherey-Nagel) i es va seguir el seu propi protocol. Així doncs, quan l'OD₆₀₀ de les mostres va assolir uns valors d'entre 0.6 i 0.7 es va interrompre la incubació. Es van vortejar els tubs i es va passar 1 ml de cada un d'ells a un tub d'1.5 ml. Seguidament, es va dur a terme una centrifugació a 11000 xg durant 30 seg i es va descartar el sobrenedant. Es van afegir 250 µL de reactiu A1 i 250 µL de reactiu A2. A continuació, es van incubar durant 7 min a temperatura ambient mentre cada 2 min es resuspenia el contingut dels tubs. Es van afegir 300 µL de reactiu A3 i posteriorment es van invertir els tubs fins que va desaparèixer la coloració blava. Es van centrifugar a 11000 xg durant 12 min i es va traspasar el sobrenedant a la columna. Seguidament, es va dur a terme una centrifugació a 11000 xg durant 1 min i es va descartar l'eluit. Es van afegir 500 µL de reactiu AW i es van centrifugar a 11000 xg durant 1 min. Posteriorment, l'eluit va ser descartat i es van afegir 600 µL de reactiu A4 a la columna. Aquestes es van centrifugar a 11000 xg durant 1 min i es va descartar l'eluit. Es va tornar a realitzar una centrifugació a 11000 xg durant 2 min. A continuació, es van afegir 50 µL de reactiu AE en cada tub d'1.5 ml i es van deixar incubant 15 min a temperatura ambient. Es va realitzar una última centrifugació a 11000 xg durant 1 min de la qual es va conservar el sobrenedant traspasant-lo a un altre tub. Un cop aïllades les diferents mostres d'ADN es va dur a terme la mesura de les seves concentracions, utilitzant el Biospectrometer Basic (Bioscreen). Els plasmidis van ser seqüenciats en els servei de genòmica de l'IBB.

6.6 Mutagenització Ser314

Un cop es va comprovar que la seqüència plasmídica era correcta, es va procedir a la mutagenització de la Ser314. Per fer-ho, es van dur a terme dues QuickChange PCRs diferents, una primera en la que la Ser314 va ser mutagenitzada per Alanina (Ala) (S314A), i una segona en que es va mutagenitzar per àcid aspàrtic (Asp) (S314D).

El mix de PCR utilitzat en ambdós casos va ser el mateix, només es van variar els encebadors.

Taula 4. Mix utilitzat en la realització de les QuickChange PCRs.

REACTIU	VOLUM (μ l)
Encebador <i>forward</i>	0.5
Encebador <i>reverse</i>	0.5
Q5® <i>High-Fidelity DNA polymerase</i>	0.5
DNA motlle (plasmidi)	1
<i>Reaction Buffer Q5 5X</i>	10
dNTPs (2mM)	2
H ₂ O	36
Volum final: 50 μ l	

Taula 5. Oligonucleòtids utilitzats en la QuickChange PCR de mutagenització de la serina en posició 314 per alanina. Subratllat en groc s'observa el codó que codificarà per l'alanina.

ENCEBADOR	SEQÜÈNCIA
Vhs2 <i>S314A</i> Fw	ACTTAAACAACAAAGGGCACCTTCAGGGAGCGCCC
Vhs2 <i>S314A</i> Rev	GGGCGCTCCCTGAAGGTGGCCTTTGTTGTTAAGT

Taula 6. Oligonucleòtids utilitzats en la QuickChange PCR de mutagenització de la serina en posició 314 per aspàrtic. Subratllat en groc s'observa el codó que codificarà per l'aspàrtic.

ENCEBADOR	SEQÜÈNCIA
Vhs2 <i>S314D</i> Fw	ACTTAAACAACAAAGGGATCCTTCAGGGAGCGCCC
Vhs2 <i>S314D</i> Rev	GGGCGCTCCCTGAAGGATCCCTTTGTTGTTAAGT

La PCR es va iniciar amb una fase d'inicialització, amb una durada de 30 seg a 98 °C. Posteriorment, es van programar 22 cicles, constituïts per tres etapes diferents: desnaturalització, etapa en la qual les mostres s'escalfen a 98 °C durant 30 seg; Alineament, la temperatura baixa fins els 50 °C durant 30 seg per tal de que l'encebador s'uneixi a les seqüències; I extensió, fase que té 1:30 min de durada a una temperatura de 72 °C. Un cop finalitzats els 22 cicles, es va programar una fase d'elongació final, amb una durada de 2 min a 72 °C. Finalment, per conservar el resultat de la reacció a curt termini, es va programar una fase de conservació a 4 °C i temps indefinit.

Els 50 µl del producte de PCR es van tractar amb el kit *PCR Clean-up* (Machery Nagel) per tal d'eliminar les sals del tampó de PCR i reemplaçar-lo. Un cop finalitzat el protocol, es van tractar 30 µl de l'eluit (producte de PCR) amb 3.3 µl de *Fast Digest Buffer* (Thermo Scientific) i 1 µl de *DpnI Fast Digest* (Thermo Scientific). Seguidament, es va dur a terme una incubació de 30 min a 37 °C.

Seguidament, es va procedir a transformar 15 µl de cada un dels plasmidis mutants en 50 µl de cèl·lules d'*E. coli* supercompetents seguint el procediment explicat amb anterioritat en aquest mateix document.

L'extracció plasmídica es va dur a terme gràcies a la utilització del kit *NucleoSpin® Plasmid* (Macherey-Nagel) i seguint el protocol descrit prèviament en aquest mateix treball.

6.7 Transformació de llevats

Es va inocular una colònia de la soca desitjada (prèviament plaquejada en el medi adequat) en un tub que contenia 5 ml de medi YPD. Aquest tub es va incubar o/n en un agitador rotacional a 220 rpm i 28 °C. Després d'aproximadament 16 h de creixement, es va determinar l'OD₆₀₀ de cada tub. Es va preparar per a cada tub un erlenmeyer de 100 ml amb 50 ml d'YPD. Seguidament, es va introduir en cada erlenmeyer la quantitat necessària de cada soca per tal de que l'OD₆₀₀ final fos de 0.2. Es van incubar els erlenmeyers a 28 °C i en agitació de 220 rpm, fins que l'OD₆₀₀ va ser d'entre 0.6 i 0.8 (normalment aquest procés s'allarga entre 3 i 4 h). Un cop assolida l'OD₆₀₀ d'interès, es va passar el contingut de cada erlenmeyer a tubs de 50 ml i es va dur a terme una centrifugació a 3000 rpm durant 5 min. Posteriorment, es va descartar el sobrenedant i es va resuspendre el pellet amb 5 ml d'aigua estèril. Es va tornar a repetir el procés de centrifugat, i un cop descartat el sobrenedant es va resuspendre el pellet en 0.5 ml de solució TE/LiAc (10% TE 10X pH 7.5, 10% LiAc 10X i 80% d'aigua miliQ). En un tub d'1.5 ml es van afegir 10 µl d'ssADN, 2 µl del plasmidi d'interès, 100 µl de la suspensió de cèl·lules + Te/LiAc i 600 µL de solució PEG (10% TE 10X pH 7.5, 10% LiAc 10X i 80% PEG (50%)). Es va dur a terme un vòrtex vigorós, i es van incubar els tubs al Thermomixer (Eppendorf) a 28 °C i 800 rpm un mínim de 30 min. Un cop esgotat el temps d'incubació

es van afegir 70 µL de dimetilsulfòxid (DMSO) a cada tub d'1.5 ml, es van barrejar per inversió i es van incubar en el Thermomixer (Eppendorf) a 42 °C, sense agitació, un total de 15 min. Posteriorment, es van centrifugar els tubs a 13000xg durant 1 min i es va descartar el sobrenedant amb pipeta. Es va resuspendre el pellet amb 0.1 ml d'aigua estèril i es va plaquejar aquesta solució. Les plaques s'incuben a 28 °C durant 48 h. Tot el procés es va dur a terme en esterilitat.

En la *Taula 7*, es troben indicades les soques amb les que s'ha treballat durant aquest projecte així com també, els plasmidis utilitzats per transformar-les i els inserts amb què han estat transformades.

Taula 7. Recull de les soques amb les que s'ha treballat durant el projecte així com dels plasmidis e inserts amb els que han sigut transformades.

SOCA	PLASMIDI	INSERT
BY4741	YEp195	∅
MLM04	YEp195	∅
MLM04	YEp195	<i>HAL3</i>
MLM04	YEp195	<i>VHS2-6HA</i>
MLM04	YEp195	<i>VHS2-6HA S314A</i>
MLM04	YEp195	<i>VHS2-6HA S314D</i>
RF1668	pYES2	∅
RF1668	pYES2	<i>PPZ1</i>
ZCZ001	YEp195	∅
ZCZ001	YEp195	<i>VHS2-6HA</i>
ZCZ001	YEp195	<i>VHS2-6HA S314A</i>
ZCZ001	YEp195	<i>VHS2-6HA S314D</i>

6.8 Assajos fenotípics

Primerament, es va picar una colònia de cada placa d'interès en tubs de vidre Ura⁻ complementats amb 100 µl de doxiciclina (Dox). Aquests tubs van ser introduïts en l'agitador a 220rpm i 28°C durant 4.5 h. Un cop superat el període d'incubació, es va vortejar cada tub i es va passar el contingut de cada un d'ells a un tub de plàstic. Aquests últims es van centrifugar a 3000 rpm durant 5 min i, posteriorment, es va descartar el sobrenedant. Els pellets es van rentar amb 10 ml d'Ura⁻, es van vortejar i es van tornar

a centrifugar en les mateixes condicions. Es va tornar a repetir el mateix procediment per tal de rentar el pellet amb Ura^- . Un cop es va rentar el pellet i es va tornar a realitzar una centrifugació, es va descartar el sobrenedant, es va resuspendre el pellet en 10 ml d' Ura^- i es va passar aquesta solució a tubs de vidre estèrils. Els tubs de vidre es van portar a l'incubador a 28 °C amb agitació a 220 rpm i es van deixar incubar durant 5 h, de manera que es va donar un creixement de les colònies. Un cop superat el període d'incubació, es van mesurar les OD_{600} de cada tub. Per fer-ho, en cada cubeta es van introduir 950 μl d' Ura^- i 50 μl de les solucions procedents de cada tub, vortejant prèviament el contingut. Un cop mesurades les absorbàncies utilitzant l'espectrofotòmetre Novaspec Plus (GE Healthcare Life Science), es va ajustar l' OD_{600} de cada mostra a 0.05 en tubs estèrils. A continuació, es va procedir amb el procés de plaquetatge el qual es va realitzar en campana de flux. Primerament, es va esterilitzar la campana de flux. Es va preparar una banyera estèril amb 10 ml d' Ura^- . Es va utilitzar una placa estèril de 96 pous *Multi Screen 96-well filter plate* (Millipore), en cada pou de la qual es van introduir 250 μl de cada tub. En les dues files següents es van realitzar dilucions seriades 1/5 de les mostres (200 μl d' Ura^- + 50 μl de les mostres anteriors). Per últim, utilitzant una pipeta multicanal es van dipositar 3 μl del contingut de cada pou en les plaques d'interès, creant així els *dots*. Les plaques es van incubar en l'estufa a 28 °C. Transcorregudes 72 h, es van realitzar les fotografies de les plaques utilitzant ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad). Tot el procés es va dur a terme en esterilitat.

6.9 Western Blot

Per tal de dur a terme els *Western Blots*, el primer que es va realitzar va ser l'extracció proteica. Per fer-ho, en aquest projecte es van utilitzar dos mètodes diferents, rampa de filtratge i extracció amb àcid tricloroacètic (ATC).

6.9.1 Rampa de filtratge

En tubs de vidre es va picar una colònia de cada una de les soques d'interès. Els tubs es van incubar o/n a 28 °C i 220 rpm d'agitació. Es van preparar erlenmeyers de 100 ml amb el mateix medi que els dels tubs i es va traspasar el contingut de cada tub en cadascun dels erlenmeyers. Aquests erlenmeyers es van tornar a incubar a 28 °C i agitació de 220 rpm durant 4 h. Un cop transcorregut aquest període, es va utilitzar la rampa de

filtratge per extreure mostra a temps 0. Amb aquest sistema s'utilitza una bomba de buit per tal de que la mostra quedi retinguda en un filtre. Un cop extreta la mostra, es va dur a terme la inducció introduint en cada erlenmeyer 4.5 ml de Gal. Es va tornar a incubar els erlenmeyers, interrompent aquest procés als 30 min, 60 min, 120 min i 240 min per tal d'extreure mostra. Cada un dels filtres es va dipositar en un tub de 15 ml adequadament retolat. Es va dur a terme un rentat dels filtres amb 1 ml d'aigua miliQ freda, es van resuspendre i es va traspasar el contingut a un tub amb rosca prèviament retolat. Es va realitzar una centrifugació a 10000 xg i 4 °C durant 3 min. El sobrenedant resultant va ser introduït a tubs de rosca en cada un dels quals es van introduir 100 µl de *buffer* de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 0.1% Tritó X-100, 2 mM Ditrioteitol (DTT) i inhibidor de proteases *CompleteTM protease inhibitor mixture* (Roche Applied Science) i 100 µl *Zirconia/Silica 0.5 mm beads* (BioSpace). La lisi cel·lular es va causar mitjançant agitació mecànica, utilitzant l'equip *Fast Prep Cell Breaker* a una potència de 5.5 m/s durant 45 seg. Aquest procés es va repetir 3 vegades realitzant una incubació de 3 min de les mostres a -20 °C entre cada cicle. Posteriorment, es van afegir 25 µl de *buffer* de lisis en cadascun dels tubs per tal de facilitar la recuperació i es van centrifugar a 750 xg durant 10 min a 4 °C. El sobrenedant es va transferir a nous tubs d'1,5 ml.

6.9.2 Extracció amb ATC

Es va picar cada una de les colònies d'interès en tubs Ura⁻. Els tubs es van incubar o/n a 28 °C i 220 rpm d'agitació. Un cop transcorregut el període d'incubació es van preparar erlenmeyers de 100 ml amb 50 ml del medi indicat en cada cas², en els quals es va introduir la quantitat de cultiu dels tubs necessària per tal de que es trobessin a una OD₆₀₀ de 0.3. Els erlenmeyers es van tornar a incubar a 28 °C i 220 rpm, fins que l'OD₆₀₀ va ser d'entre 0.6 i 0.8. Un cop transcorregut aquest període (4.5 h aproximadament), es va interrompre la incubació dels erlenmeyers i es van traspasar 9 ml del seu contingut a tubs de 15 ml on prèviament s'havia introduït 1 ml d'ATC. El tub de 15 ml es

² Els medis utilitzats en les exponencials varien depenent de la soca. Per treballar amb les soques RF1668 i MLM004 es va utilitzar URA-RAff. En canvi, amb BY4741 i ZCZ001 es va utilitzar YPP-RAff.

manté en gel a partir d'aquest moment. Un cop feta aquesta operació, es va dur a terme la inducció, introduint 5 ml de Gal en cada un dels erlenmeyers. Seguidament, es tornen a dipositar en l'incubador. La retirada de les mostres de cada erlenmeyer es va repetir al cap de 30 min, 60 min, 120 min i 240 min. Un cop traspassats els 9 ml dels erlenmeyers als tubs, aquests es van incubar en gel entre 15 min i 120 min. Transcorregut aquest període, es van retirar els tubs del gel i es va dur a terme una centrifugació a 3000 rpm i 4 °C durant 5 min. Es va descartar gran part del sobrenedant, de manera que només es va deixar 1 ml d'aquest dins el tub de 15 ml. Es va resuspendre el contingut del tub i es va passar a un tub de rosca. Es va dur a terme una centrifugació a 10000 rpm i 4 °C durant 1 min i es va descartar el sobrenedant. Es va afegir 1 ml d'acetona (100%) freda en cada tub, es va resuspendre bé el seu contingut i es va tornar a centrifugar a 10000 rpm i 4 °C durant 1 min. Es va repetir el procés de rentat amb acetona i la centrifugació i, posteriorment, es va descartar completament el sobrenedant amb l'ajuda d'una pipeta. En cada tub es van afegir 100 µL del *buffer* d'urea (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 6 M urea, 1% SDS) i 100 µL *Zirconia/Silica 0.5 mm beads* (BioSpace). La lisi cel·lular es va causar mitjançant agitació mecànica, utilitzant l'equip *Fast Prep Cell Breaker* a unes condicions de 5 m/s durant 45 seg. Aquest procés es va repetir 5 vegades, realitzant una incubació de les mostres de 2 min de durada a -20°C entre cada cicle. Un cop realitzat el trencament, es van introduir 25 µl de *buffer* urea a cada tub i es van incubar durant 15 min en el bloc a 65 °C. Un cop finalitzada la incubació, els tubs es van mantenir durant 1 min en gel i a continuació es va realitzar una centrifugació a 15800 xg i 4 °C durant 15 min. El sobrenedant va ser recuperat i traspassat a tubs nous d'1.5 ml.

Un cop realitzada l'extracció proteica, es va realitzar la quantificació de les proteïnes utilitzant el mètode Bradford (Sigma Chemical Co.). Un cop determinades les concentracions de cada proteïna, es va calcular el volum de cada una d'elles i d'aigua que s'havia d'introduir a cada tub per tal de que tots es trobessin en la mateixa concentració i es van realitzar les dilucions. Posteriorment, es va afegir la quantitat requerida de *buffer* de càrrega 4X (0.25M Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS, 30% Glicerol, 0.02% Blau de bromofenol i 10% 2-Mercaptoetanol) en cada un dels tubs d'1.5 ml. Es van bullir les mostres a 95 °C durant 5 min i es van centrifugar a 13000 xg durant 1 min. Posteriorment, es van carregar les mostres en el gel i es va fer córrer. Un cop el front va

sortir del gel, es va interrompre el procés d'electroforesi i es va procedir a la transferència. L'activació de la membrana es va realitzar mullant-la en metanol durant 15 seg, rentant-la amb H₂O fins que es va tornar hidrofílica i deixant-la en agitació en *buffer* de transferència (1% SDS, 3% Tris, 9% Glicina, i 87% H₂O MiliQ). També es van preparar 6 papers de filtre que es van deixar agitant en *buffer* de transferència. Un cop activats, es va fer un "sandwich" comprés per 3 papers, la membrana, el gel i 3 papers més. La transferència del gel a la membrana es va produir en el transferidor a 60 mA/gel (1mA/m²) durant 90 min. Un cop acabada la transferència es va bloquejar la membrana durant 1 h amb TBST al 5% de llet. Posteriorment es va dur a terme una incubació o/n a 4 °C amb l'anticòs primari Anti-HA (dilució 1:1000 en TBST 5% llet) o bé amb l'anticòs primari anti-Ppz1 (dilució 1:250 en TBST 5% llet). Es van fer dos rentats amb TBST, de 15 min i 5 min respectivament. Seguidament, es va dur a terme una incubació amb l'anticòs secundari (1:20000 en TBST 5% llet) durant 2 h. Per últim, es van realitzar dos rentats amb TBST de 15 min i 10 min de duració cadascun i 3 rentats de 5 min cadascun. Un cop acabats els rentats es va dur a terme el revelatge. Es va utilitzar el kit *Westar eta C ultra 2.0 (Cyanagen)*, de manera que la membrana es va incubar amb 800 µl de solució de revelatge durant 5 min en una caixa negra. Finalment, es va col·locar la membrana sobre el plàstic, es va treure l'excés de líquid i es va dur a terme el procés de revelatge en el Molecular Imager® VersaDoc™ MP 4000 system (Bio-Rad).

7. RESULTATS

7.1 Assajos fenotípics

Durant aquest projecte es van realitzar assajos de creixement per tal d'analitzar si tant Vhs2 com les seves versions mutagenitzades creades durant l'estudi eren capaces de rescatar el fenotip letal provocat per la sobre expressió de Ppz1. Per fer-ho, es van realitzar *drop tests* en plaques de medi sintètic mancat d'uracil (Ura⁻) utilitzant diferents fonts de carboni (Glu, Gal i Raff). Aquests assajos es van realitzar en dos fons genètics diferents, MLM04 i ZCZ001. Ambdues soques van ser transformades amb Vhs2 *wild type* (*w-t*) i les seves versions, *S314A* i *S314D*.

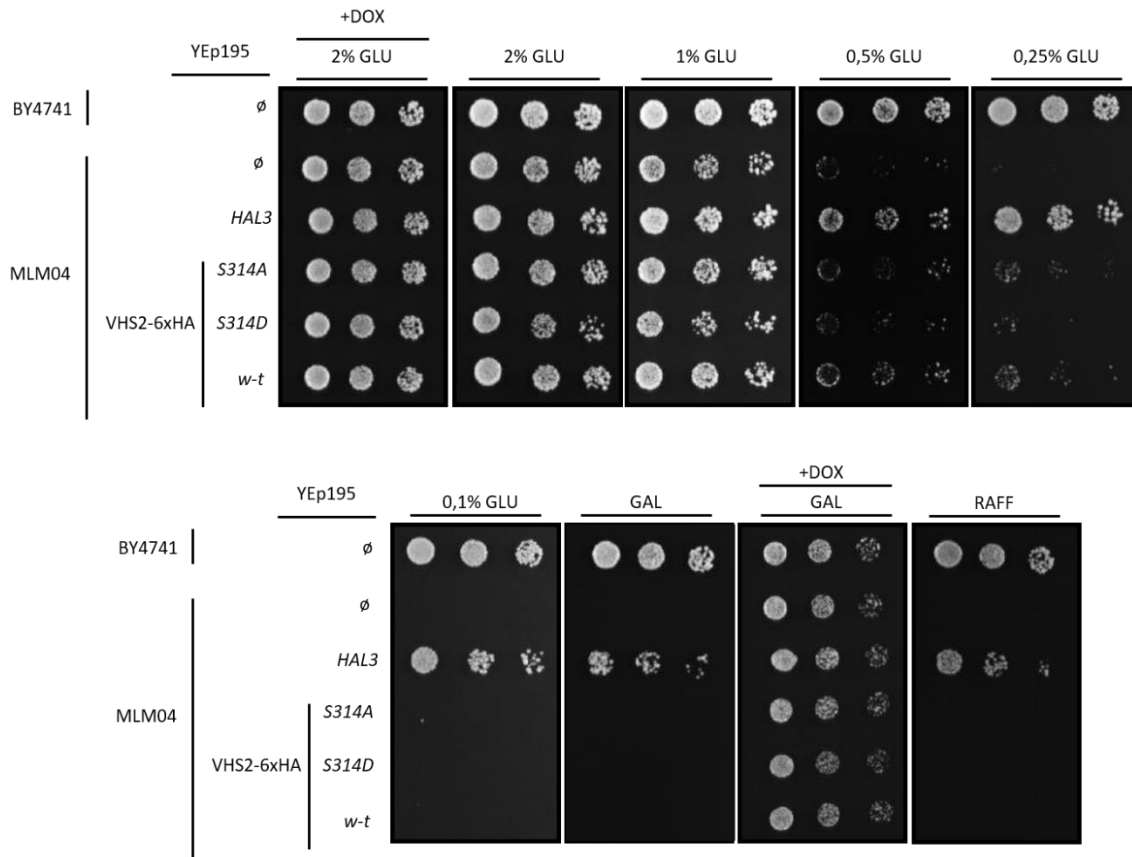


Figura 3. Caracterització fenotípica de Vhs2 i les seves versions mutagenitzades. Els cultius de les soques BY4741 i MLM04 transformades amb YEp195 i els plasmidis indicats, van ser dipositats en placa a una $OD_{600} = 0,05$ i dues dilucions 1/5 seriadades. Les plaques contien medi sintètic mancant d'uracil (URA) i les concentracions indicades de cadascun de les fonts de carboni: glucosa (Glu), galactosa (gal) o rafinosa (Raff). Dues de les plaques també contien doxiciclina (Dox). Fotografies preses a les 72h.

Per una banda, en la *Figura 3* es poden observar les fotografies, realitzades 72h després de la realització de l'assaig, de les plaques amb el fons genètic MLM04. En aquest assaig es van utilitzar com a controls la soca BY4741 transformada amb el plasmidi buit (\emptyset), la soca MLM04 YEp195 \emptyset i la soca MLM04 transformada amb Yep195 *HAL3*. Tal i com es pot veure en la *Figura 3*, en presència de Dox totes les soques creixen de la mateixa manera. També es pot observar, que conforme la quantitat de Glu en el medi disminueix, la capacitat de creixement tant de la soca MLM04 *w-t* com de les soques MLM04 transformades amb Vhs2 i les seves versions també ho fa. Així doncs, amb un percentatge del 0.5% de Glu, el creixement d'aquestes tres últimes soques disminueix en més de la meitat respecte el que presenten en un 1% de Glu. En la placa de 0.25% de Glu sembla ser que el creixement d'aquestes tres soques es manté respecte el que presenten en 0.5% de Glu, i en canvi, en 0.1% ja no s'observa creixement. També s'ha

notificat que a concentracions de Glu de 0.5% i 0.25% la soca MLM04 YEp195 Vhs2 *w-t* presenta una capacitat de creixement major que les altres dues. Aquesta disminució en la capacitat de creixement presentada per les soques MLM04 YEp195 VHS2 *w-t*, MLM04 YEp195 VHS2 S314A i MLM04 YEp195 VHS2 S314D també la presenta la soca MLM04 YEp195 \emptyset , tot i que aquesta última a 0.25% de Glu ja no presenta creixement. En les plaques en les que es substitueix la Glu per Gal o Raff com a font de carboni cap de les tres soques estudiades no presenten creixement, com tampoc ho fa la soca MLM04 YEp195 \emptyset .

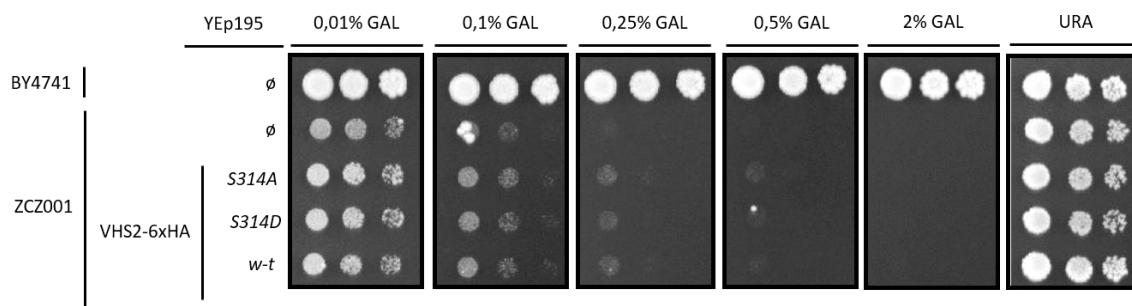


Figura 4. Caracterització fenotípica de Vhs2 i les seves versions mutagenitzades. Els cultius de les soques BY4741 i ZCZ001 transformades amb YEp195 i els plasmidis indicats, van ser dipositats en placa a una $OD_{600} = 0,05$ i dues dilucions 1/5 seriadades. Les plaques contien medi sintètic mancant d'uracil (URA⁻) i les concentracions indicades de galactosa (Gal). Fotografies preses a les 72h d'haver dipositat els cultius en placa.

D'altra banda, en la *Figura 4* es poden observar les fotografies de les plaques dels assajos fenotípics amb fons genètic ZCZ001. Aquest segon estudi fenotípic es va realitzar en plaques amb diferents concentracions de Gal i una placa URA⁻, que servia de control. Com a soca control es va utilitzar BY4741 transformada amb YEp195 \emptyset . En aquest cas, es pot observar que tant la soca transformada amb Vhs2, com les soques transformades amb les seves versions, perden capacitat de creixement a mesura que el percentatge de Gal en el medi augmenta, fins que en arribar a una concentració del 2% de Gal no s'observa creixement de cap de les tres soques estudiades. El fenotip presentat per les tres soques estudiades coincideix amb el de la soca ZCZ001 *w-t*, tot i que aquesta a 0.25% de Gal ja no presenta quasi creixement.

7.2 Western Blot

Finalment, per tal de confirmar la hipòtesi de que Vhs2 actua com a supressor de la toxicitat per sobre expressió de Ppz1, es van dur a terme dos Western Blots utilitzant anticòs primari anti-HA i anti-Ppz1, respectivament. En els dos assajos es va utilitzar la soca RF1668, la qual conté el gen *VHS2* així com l'etiqueta 6HA, transformada amb el plasmidi pYES2 o bé buit, o bé amb *PPZ1* integrat. El plasmidi pYES2 conté un promotor gal, així doncs, l'expressió de la seqüència inserida s'activa en presència de Gal. Tal i com es detalla en l'apartat corresponent de *material i mètodes* d'aquest mateix treball, les mostres a partir de les quals es va realitzar aquest estudi es van prendre a temps 0 min, 30 min, 1 h, 2 h i 4 h després de la inducció amb Gal.

Primerament, es va realitzar un *Western Blot* amb les mostres extretes seguint els protocols descrits anteriorment en els *apartats 6.9.1 i 6.9.2 de materials i mètodes*, i utilitzant un anticòs primari HA. D'aquesta manera, en la *Figura 5.A*, es pot observar la fotografia de la membrana en la qual es poden distingir bandes corresponents a la quantitat de Vhs2 (55KDa) present en cada una de les mostres. A temps 0, la soca *w-t* no presenta banda mentre que la soca transformada amb Ppz1 sí que ho fa. Al carril corresponent als 30 min posteriors a la inducció amb Gal de la soca *w-t*, es pot apreciar una lleu banda, mentre que la banda corresponent a la soca transformada té un gruix visiblement superior al que presentava la de la mesura anterior. Després d'1 h de la inducció amb galactosa, la banda de la soca *w-t* segueix sent fina tot i que perceptiblement més gruixuda que a temps anterior. En canvi, sembla ser que la quantitat de Vhs2 present en les cèl·lules de la soca transformada amb pYES2 Ppz1 es manté en el temps, ja que la intensitat de la banda corresponent a la mostra presa 1 h després de la inducció amb Gal sembla ser el mateix que la corresponent als 30 min posteriors a aquest fenomen. A les 2 h de la inducció, la banda que presenta la soca *w-t* té un gruix superior a la banda corresponent a temps 1 h. En canvi, la de la soca RF1668 transformada amb pYES2 Ppz1 té una intensitat similar a la que presenta en la mesura anterior. Finalment, la banda corresponent a temps 4 h, posteriors a la inducció amb galactosa, que presenta la soca *w-t* és més gruixuda que la que presenta a les 2 h, indicant-se així que la quantitat de Vhs2 en les cèl·lules d'aquesta soca es veu incrementada en el temps. Ara bé, la banda de 4 h presentada per la soca RF1668 pYES2

Ppz1, té un gruix similar que la presentada a les 2 h, fet que indica que la quantitat de Vhs2 es manté en el temps. Així doncs, en un període de temps de 4 h a partir de la inducció amb Gal, la quantitat de vhs2 presentada per la soca RF1668 *w-t* es veu incrementada arribant a un punt àlgid a les 4 h. En canvi, la quantitat d'aquesta proteïna present en les cèl·lules de la mateixa soca RF1668 transformada amb pYES2 Ppz1, i per tant, sobre expressant Ppz1, augmenta en els primers 30 min i posteriorment es manté en el temps. Tot i això, els nivells finals de Vhs2 presentats per la soca *w-t* són molt inferiors als inicials de la soca transformada.

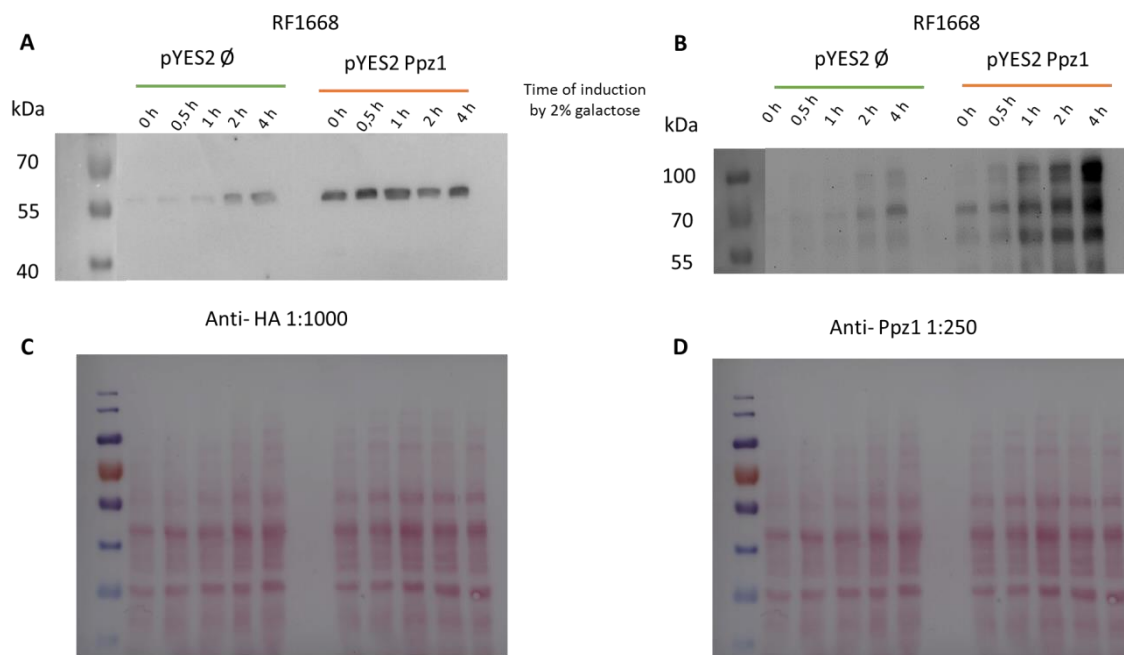


Figura 5. Western blot de les diferents mostres recollides de les soques RF1668 *w-t* i RF1668 transformada amb pYES2 Ppz1. (A) Detecció de la quantitat de Vhs2 present en cadascuna de les mostres. Es va utilitzar anticòs primari anti-HA. (B) Detecció de la quantitat de Ppz1 present en cadascuna de les mostres. Es va utilitzar anticòs primari anti-Ppz1. (C) (D) Tinció amb Ponceau de les membranes d'(A) i (B). Es va utilitzar per tal d'assegurar que la càrrega de cadascuna de les mostres fos l'adequada.

Per últim, es va realitzar un *Western Blot* en el qual es va utilitzar com a anticòs primari un anticòs anti-Ppz1 (*Figura 5.B*). D'aquesta manera, es va poder estudiar la quantitat de Ppz1 (bandes de 100 KDa) present en les cèl·lules tant de la soca RF1668 *w-t* com de la mateixa soca transformada amb pYES2 Ppz1, a diferents temps dins d'un període de 4 h posteriors a la inducció amb Gal. Tal i com s'observa en la *Figura 5.B*, a temps 0, en cap dels dos casos hi ha presència de la proteïna. Al cap de 30 min de la inducció amb

Gal, la mostra corresponent a RF1668 *w-t* no presenta banda, mentre que la corresponent a la soca RF1668 pYES2 Ppz1 sí que ho fa. A temps 1 h després de la inducció, la soca *w-t* segueix sense presentar banda mentre que la transformada amb pYES2 Ppz1 en presenta una de més gruixuda que al temps anterior. La mostra extreta 2h després de la inducció amb Gal corresponent a la soca *w-t* presenta una banda difícilment perceptible, mentre que la que correspon a la soca RF1668 pYES2 Ppz1 presenta una banda més gruixuda que la corresponent a temps 1 h. Finalment, la soca RF1668 *w-t* a temps 4 h presenta una fina banda, mentre que al mateix temps, la soca transformada amb pYES2 Ppz1 presenta una banda més gruixuda que la que presentava en la mesura anterior. Així doncs, segons aquests resultats, es podria dir que l'acumulació de Ppz1 en la soca RF1668 *w-t* és mínima tot i que a temps 2 h i 4 h post-inducció es pot detectar una petita quantitat de la fosfatasa. En canvi, es pot observar que realment la inducció amb Gal provoca una sobre expressió de Ppz1 en la soca RF1668 pYES2 Ppz1, la qual presenta un increment en la quantitat de la proteïna en un període de 4 h. Així doncs, la soca RF1668 *w-t* només presenta una acumulació de Ppz1 a les 2 h i a les 4 h posteriors a la inducció amb Gal, en canvi, la soca transformada amb pYES2 Ppz1 presenta una sobre expressió de Ppz1 que es veu incrementada en el temps, així doncs, l'acumulació de Ppz1 en aquestes cèl·lules comença a detectar-se a temps 30 min i va augmentant progressivament en cadascuna de les mesures.

8. DISCUSSIÓ

Aquest treball tenia com a un dels objectius la caracterització de dues versions mutants de *VHS2*, en les quals s'havia produït una mutagenització de la Ser314 per Ala i Asp. Per tal de dur a terme un estudi al voltant d'aquestes versions es va realitzar un assaig de creixement per a analitzar si *VHS2* era capaç de recuperar el fenotip letal provocat per la sobre expressió de Ppz1 i si les seves mutacions alteraven aquesta capacitat. Aquest assaig es va realitzar amb dues soques de *S. cerevisiae* diferents, MLM04 i ZCZ001.

La soca MLM04 disposa d'un sistema tet *off* que regula l'expressió de *PPZ1*, de manera que en presència de Dox l'expressió d'aquest gen es troba reprimida, en canvi, en

absència de l'antibiòtic l'expressió de *PPZ1* s'activa, donant-se així una sobre expressió del gen. Per a realitzar aquest estudi, es van utilitzar plaques URA⁻, amb diferents fonts de carboni, com són la Glu (a diferents concentracions), la Gal i la Raff. Es van utilitzar també dues plaques complementades amb Dox, una que tenia com a font de carboni la Glu i l'altra en la qual aquest paper el jugava la Gal. Tal i com es pot observar en la *Figura 3* de l'apartat de resultats d'aquest mateix treball, la soca utilitzada com a control durant aquest assaig, BY4741 transformada amb YEp195 \emptyset , no presenta un creixement alterat en ninguna de les diferents condicions estudiades. La soca MLM04 *w-t*, en canvi, presenta una disminució en la capacitat de creixement en absència de Dox i conforme disminueix la quantitat de Glu, fins que a concentracions iguals o inferiors al 0.25% no és capaç de créixer. Aquest fenotip és el que s'esperava, ja que en absència de Dox es dona una sobre expressió de Ppz1 que se sap que provoca la letalitat de les cèl·lules (Ariño, Velázquez, and Casamayor 2019). Utilitzant Gal com a font de carboni i en absència de Dox aquesta soca presenta un fenotip letal, de manera que no s'observa cap tipus de creixement. El mateix es pot observar si la font de carboni utilitzada en comptes de ser Gal és Raff. La soca MLM04 transformada amb YEp195 *HAL3*, presenta una disminució del creixement conforme la quantitat de Glu en placa baixa, així com en les plaques que presenten Gal i Raff com a font de carboni, tot i que les colònies segueixen sent capaces de créixer. Aquest fenotip concorda amb el fet que Hal3 actua com a inhibidor de Ppz1, per tant, al sobre expressar *HAL3*, per molt que es sobreexpressi *PPZ1*, Hal3 és capaç d'inhibir-ne una quantitat i de revertir la toxicitat provocada per la seva sobre expressió. Les soques estudiades, MLM04 transformada amb *VHS2 w-t*, MLM04 transformada amb el mutant de *VHS2 S314A* i la soca MLM04 transformada amb *VHS2 S314D*, presenten un fenotip similar al de la soca MLM04 transformada YEp195 \emptyset , és a dir, tenint com a font de carboni Gal o Raff no presenten creixement, mentre que conforme decreix la concentració de Glu el creixement d'aquestes tres soques es veu reduït. No obstant, a concentració de Glu del 0.5%, aquestes tres soques creixen més que MLM04 YEp195 \emptyset i a 0.25% de Glu en placa, on MLM04 YEp195 \emptyset no presenta creixement, les tres soques estudiades sí que ho fan, tot i que reduït. Aquests resultats estarien indicant que la sobre expressió de *VHS2* o dels seus mutants, dissenyats durant aquest estudi, fa que es reverteixi parcialment la

toxicitat provocada per la sobre expressió de Ppz1 a concentracions de Glu iguals o superiors al 0.25%. En canvi, a concentracions inferiors d'aquesta font de carboni sembla ser que l'expressió tant de Vhs2 com dels seus mutants no és capaç de revertir el fenotip letal causat per la sobre expressió de Ppz1.

Per altra banda, es va realitzar un assaig de creixement alternatiu amb una altra soca de *S. cerevisiae*, ZCZ001. Es tracta d'una soca que conté un promotor gal regulant l'expressió del gen *PPZ1*. Així doncs, el promotor només és actiu en presència de Gal i a més, es dona una relació directament proporcional entre la quantitat de Gal i l'expressió del gen, en aquest cas *PPZ1*. Aquest segon estudi tenia com a objectiu revalidar els resultats obtinguts en l'estudi anterior però amb un fons genètic diferent. Per realitzar aquest assaig es van utilitzar plaques amb diferent contingut de Gal i com a control una placa URA⁻, en la qual s'esperava que tots els transformants creixessin de la mateixa manera. En aquest cas, també s'observa que conforme es sobreexpressa Ppz1 (la quantitat de Gal en placa augmenta), la toxicitat provocada per aquest fenomen augmenta i la soca ZCZ001 *w-t* no és capaç de revertir-la, de manera que a partir d'una concentració de Gal del 0.5% les colònies d'aquesta soca no són capaces de créixer en placa (*Figura 4*). Tal i com s'observava en l'altre assaig de creixement, les soques ZCZ001 transformades amb *VHS2 w-t* i els dos mutants d'interès es comporten de manera similar a la *w-t*, acabant presentant un fenotip letal davant d'una major sobre expressió de *PPZ1*. Tot i això, de la mateixa manera que en l'estudi anterior, sembla que tant *VHS2* com els seus dos mutants, són capaços de créixer davant d'una major sobre expressió de *PPZ1* que no pas la soca *w-t*, indicant així que si bé, *VHS2* no és capaç de revertir amb totalitat la toxicitat derivada de la sobre expressió de *PPZ1*, sí que ho fa en major mesura que si no es dona una sobre expressió de *VHS2*.

La mutació de la Ser314 de *VHS2* per Ala i Asp, es va dur a terme per tal de mimetitzar una desfosforilació i una fosforilació d'aquest residu, respectivament. Aquests assajos es van dur a terme ja que en estudis fosfoproteòmics realitzats en el mateix grup de recerca, i que no han estat publicats, es va observar que al sobre expressar *PPZ1* es desfosforilava la proteïna Vhs2, indicant així que la desfosforilació de Vhs2 podria rescatar el fenotip letal provocat per la sobre expressió de *PPZ1*. Així doncs, es podria pensar que el fenotip mutant per àcid aspàrtic recuperaria pitjor la letalitat. No obstant,

el que s'ha observat en ambdós assajos de creixement és que no hi ha ninguna diferència entre els mutants de *VHS2* estudiats.

Finalment, per tal de realitzar un anàlisi de la possible regulació de la proteïna Vhs2 sobre Ppz1 es van dur a terme dos *Western Blots* amb les mostres recollides de les soques RF1668 *w-t* i RF1668 pYES2 Ppz1, utilitzant anticòs primari anti-HA i anti-Ppz1 respectivament.

El *western blot* realitzat amb l'anticòs primari Anti-HA tenia com a objectiu determinar la quantitat de Vhs2 present en les mostres recollides a diferents temps de la soca estudiada. Tal i com s'ha descrit en l'apartat de resultats, la quantitat de Vhs2 present en les cèl·lules de la soca RF1668 *w-t* va en augment conforme transcorre el temps a partir del moment de la inducció amb Gal. En canvi, en el cas de la soca RF1668 transformada amb pYES2 Ppz1 els nivells de Vhs2 augmenten durant mitja hora després de la inducció i, posteriorment, es mantenen constants en el temps. A més, a diferència de la soca *w-t*, la soca RF1668 pYES2 Ppz1 presenta uns nivells basals detectables a temps 0. Per altra banda, si es compara el gruix de la banda presentada per la soca *w-t* a temps 4 h després de la inducció i la de la soca RF1668 transformada a temps 0 h, es pot observar que el d'aquesta última és molt major. Així doncs, es podria dir que la quantitat de Vhs2 en les cèl·lules transformades just en el moment de la inducció és molt superior a les de les cèl·lules *w-t* 4 h després de la inducció. D'aquesta manera, pot ser afirmat que el fet de que es doni una sobre expressió de *PPZ1* fa que la cèl·lula expressi més Vhs2. Establint-se així una relació directa entre l'expressió d'ambdues proteïnes.

El segon *Western blot* realitzat en aquest treball només es diferencia del primer en què l'anticòs primari utilitzat és anti-Ppz1, de manera que en aquest cas la proteïna quantificada és aquesta fosfatasa. Així doncs, s'observa que els nivells de Ppz1 de la soca RF1668 *w-t* augmenten a mesura que passa el temps, de tal manera que a les 2 h després de la inducció amb galactosa apareix una banda perceptible que incrementa de gruix a les 4 h. El mateix succeeix en la soca RF1668 pYES2 Ppz1, la qual presenta un increment en la quantitat de Ppz1. En aquest cas, la banda corresponent a aquesta proteïna és

perceptible des de mitja hora després de la inducció amb galactosa i el seu gruix va en augment fins a arribar a un màxim a les 4 h.

Si es contrasten els resultats obtinguts dels dos *Western*, es detecta que els nivells de Ppz1 de la soca RF1668 *w-t* segueixen el mateix patró que els de Vhs2, de manera que són detectables 2 h després de la inducció amb Gal i s'incrementen perceptiblement transcorregudes 2 h més. En canvi, els nivells de Vhs2 de la soca RF1668 transformada amb pYES2 Ppz1 no es corresponen als de PPZ1. D'aquesta manera, mentre que els nivells de Vhs2 ja són elevats en el moment de la inducció, els de Ppz1 no. A més, els nivells de Vhs2 en la soca transformada augmenten la mitja hora posterior a la inducció, i a partir d'aquest moment es mantenen estables fins a la conclusió de l'estudi (4 h). En canvi, els nivells de Ppz1 de la mateixa soca es veuen incrementats en cadascuna de les mesures fins a arribar a un màxim a les 4 h. Així doncs, tot i que del primer assaig d'*immunoblotting* es derivava la idea de que la sobre expressió de Ppz1 provocava que les cèl·lules expressessin més Vhs2, comparant els resultats dels dos assajos es pot concloure que no existeix una clara relació entre els nivells d'expressió d'ambdues proteïnes. Ja que a temps 0 h RF1668 pYES2 Ppz1 presenta acumulació de Vhs2 però no s'observen nivells augmentats de Ppz1. A més, mentre que els nivells de Vhs2 de la soca RF1668 transformada amb pYES2 Ppz1 augmenten fins a la mitja hora després de la inducció i posteriorment són mantinguts en el temps, els nivells de Ppz1 presentats per la mateixa soca es veuen incrementats a mesura que passa el temps, sense deixar de fer-ho, fins que arriben a un màxim a les 4 h post-inducció.

9. CONCLUSIONS

En els estudis de creixement realitzats en aquest projecte s'ha pogut comprovar que Vhs2 és capaç de recuperar parcialment la toxicitat provocada per la sobre expressió de PPZ1. De manera que les soques que sobre expressen VHS2 no reverteixen la toxicitat deguda a la sobre expressió de PPZ1 en la mateixa mesura que ho fa una soca que sobre expressi HAL3, però presenten més capacitat de creixement que la soca *w-t*.

Els resultats dels estudis d'*immunoblotting* suggereixen que una sobre expressió de *PPZ1* provoca uns nivells augmentats de Vhs2 tot i que no es percep una relació directa entre els nivells d'expressió d'ambdues proteïnes.

En aquest projecte, s'han creat dues versions mutagenitzades de *VHS2*, *S314A* i *S314D*. Com ja ha estat descrit amb anterioritat, la mutagenització de la Ser 314 per Ala mimetitza la desfosforilació de Vhs2, mentre que la mutagenització per Asp mimetitza la fosforilació d'aquesta proteïna. La construcció d'aquests mutants es va dur a terme ja que en estudis anteriors en el mateix grup de recerca s'havien vist indicis de que la desfosforilació de Vhs2 podria rescatar el fenotip letal degut a la sobre expressió de Ppz1. No obstant això, els resultats dels assajos de creixement realitzats no mostren diferències fenotípiques entre ambdós mutants, indicant així que la fosforilació/desfosforilació de Vhs2 no juga un paper clau en el procés de revertir la toxicitat provocada per la sobre expressió de Ppz1.

10. BIBLIOGRAFIA

- Alberghina L., Mavelli G., Drovandi G., Palumbo P., Pessina S., Tripodi S., Coccetti P., et al. (2012, January). Cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*: basic regulatory design and protein–protein interaction network. *Biotechnology advances* 30(1), 52–72.
- Ariño J. (2002, February). Novel protein phosphatases in yeast. *European journal of biochemistry* 269(4), 1072–1077.
- Ariño J., Velázquez D., and Casamayor A. (2019, April). Ser/Thr protein phosphatases in fungi: structure, regulation and function. *Microbial Cell* 6(5), 217–256.
- Barnum K. J. and O'Connell M. J. (2014). Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods in molecular biology* 1170, 29–40.
- Cassani C., Raspelli E., Chiroli E., and Fraschini R. (2014). Vhs2 is a novel regulator of septin dynamics in budding yeast. *Cell cycle* 13(10), 1590–1601.
- Clemons KV., Calich V. L., Burger E., Filler S. G., Graziutti M., Murphy J., Roilides E., et al. (2000). Pathogenesis I: interactions of host cells and fungi. *Medical mycology* 38(1), 99–111.
- Clotet J., Garí E., Aldea M., and Ariño J. (1999, March). The yeast Ser/Thr phosphatases Sit4 and Ppz1 play opposite roles in regulation of the cell cycle. *Molecular and cellular biology* 19(3), 2408–2415.

- Di Como C. J., Bose R., and Arndt K. T. (1995, January). Overexpression of *SIS2*, which contains an extremely acidic region, increases the expression of *SWI4*, *CLN1* and *CLN2* in *Sit4* mutants. *Genetics* 139(1), 95–107.
- Ferrando A., Kron S. J., Rios G., Fink G. R., and Serrano R. (1995, October). Regulation of cation transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the salt tolerance gene *HAL3*. *Molecular and cellular biology* 15(10), 5470–5481.
- Frederick M. *Current protocols in molecular biology*; John Wiley & sons: New York, 1987.
- Gandhi M., Goode B. L., and Chan C. S. (2006, October). Four novel suppressors of Gic1 Gic2 and their roles in cytokinesis and polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 174 (2), 665–78.
- González A., Casado C., Petrežsélyová S., Ruiz A., and Ariño J. (2013, April). Molecular analysis of a conditional *Hal3 Vhs3* yeast mutant links potassium homeostasis with flocculation and invasiveness. *Fungal genetics and biology* 53, 1–9.
- Karathia H., Vilaprinyo E., Sorribas A., and Alves R. (2011, February). *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PloS one* 6(2), e16015.
- Lee K. S., Hines L. K., and Levin D. E. (1993, September). A pair of functionally redundant yeast genes (*PPZ1* and *PPZ2*) encoding type 1-related protein phosphatases function within the *PKC1*-mediated pathway. *Molecular and cellular biology* 13(9), 5843–5853.
- Leiter E., González A., Erdei E., Casado C., Kovács L., Ádám C., Oláh J., et al. (2012, September). Protein phosphatase z modulates oxidative stress response in fungi. *Fungal genetics and biology* 49(9), 708–716.
- Levin D. E. (2005, June). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews* 69(2), 262–291.
- Locascio A., Andrés-Colás N., Mulet J. M., and Yenush L. (2019, May). *Saccharomyces cerevisiae* as a tool to investigate plant potassium and sodium transporters. *International journal of molecular sciences* 20(9), 21-33.
- Marquina M., González A., Barreto L., Gelis S., Muñoz I., Ruiz A., Alvarez M. C., et al. (2012, April). Modulation of yeast alkaline cation tolerance by Ypi1 requires calcineurin. *Genetics* 190(4), 1355–1364.
- Merchan, S., Bernal D., Serrano R., and Yenush L. (2004, February). Response of the *Saccharomyces cerevisiae* Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway to increases in internal turgor pressure caused by loss of Ppz protein phosphatases. *Eukaryotic cell* 3(1), 100–107.
- Molero C., Casado C., and Ariño J. (2017, August). The inhibitory mechanism of Hal3 on the yeast Ppz1 phosphatase: a mutagenesis analysis. *Scientific reports* 7(1), 88-109.
- Muñoz I., Simón E., Casals N., Clotet J., and Ariño J.. (2003, February). Identification of multicopy suppressors of cell cycle arrest at the G₁-S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 20(2), 157–169.
- Ruiz A., Muñoz I., Serrano R., González A., Simón E., and Ariño J. (2004, August). Functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *VHS3* gene. *Journal of biological chemistry* 279(33), 34421–34430.

- Ruiz A., Yenush L., and Ariño J. (2003, October). Regulation of *ENA1* Na(+)-ATPase gene expression by the Ppz1 protein phosphatase is mediated by the calcineurin pathway. *Eukaryotic cell* 2(5), 937–948.
- Schulman H. *From molecules to networks*, 3rd ed.; Academic press: Cambridge, 2014.
- Serrano R. (1996). Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *International review of cytology* 165, 1–52.
- Smoly I., Shemesh N., Ziv-Ukelson M., Ben-Zvi A., and Yeger-Lotem E. (2017, January). An asymmetrically balanced organization of kinases versus phosphatases across eukaryotes determines their distinct impacts. *PLoS computational biology* 13(1), e1005221.
- Winzler E. A., Shoemaker D. D., Astromoff A., Liang H., Anderson K., Andre B., Bangham R., et al. (1999, August). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285(5429), 901–906.
- Yu J., Deng T., and Xiang S. (2018, December). Structural basis for protein phosphatase 1 recruitment by glycogen-targeting subunits. *The FEBS journal* 285(24), 4646–59.

11. AUTOAVALUACIÓ

A l'inici de les pràctiques tenia molta inseguretats ja que tot i que durant el doble grau havíem realitzat diverses assignatures que tenien crèdits de pràctiques, no estava segura de tenir tots els coneixements necessaris per desenvolupar-me de manera adequada en un laboratori. A més, el Dr. Joaquín Ariño es va posar en contacte amb mi, prèviament a la meua estada en el laboratori, per explicar-me en què estaven treballant i en quina branca de la investigació m'incorporaria. En aquell moment em vaig adonar de que no tenia suficients coneixements sobre el tema, i tot i que vaig buscar molta informació i vaig intentar posar-me al dia, la incertesa que sentia en un primer moment, només feia que augmentar conforme passava el temps.

El primer dia que vaig arribar al laboratori totes les meves pors es van esvaïr, ja que des del primer moment tots els integrants del grup de recerca em van donar el seu suport i em van ajudar en tot el que anava necessitant.

Crec que aquests 4 mesos de pràctiques m'han ajudat a créixer com a investigadora, he pogut millorar les tècniques que ja coneixia de la carrera així com aprendre'n de noves que espero poder aplicar en un futur. A més, he desenvolupat la capacitat de poder analitzar els resultats dels experiments de forma crítica i poder traçar un pla per tal de

seguir amb l'experimental de forma lògica i conseqüent amb aquests resultats. També agraeixo molt el grau de llibertat i la confiança que els membres del grup han depositat en mi, ja que això m'ha ajudat a haver de donar un pas cap endavant i organitzar-me i planificar tots els experiments que havia de fer durant la setmana així com també, a haver de pensar en els següents passos que havia de fer. A més, el fet de basar el TFG en aquestes pràctiques ha fet que hagués d'analitzar cada resultat obtingut detalladament, així com que cada cop que donàvem un pas en la experimental hagués de buscar informació i adquirir nous coneixements per tal de poder dur a terme la meva feina de forma correcta.

Així doncs, l'avaluació que faig d'aquestes pràctiques és molt positiva, ja que he adquirit experiència en el treball de laboratori i a més sento que he millorat molt i que ara soc capaç de treballar millor i més eficientment.

12. AGRAÏMENTS

Primerament, vull agrair al Dr. Joaquín Ariño per haver-me donat l'oportunitat de poder treballar en el grup de recerca de Biologia Molecular de Llevats de l'IBB, grup en el que he pogut desenvolupar les meves tasques de manera adequada i rodejada dels millors professionals.

També m'agradaria deixar palès el meu agraïment a la persona que ha tutoritzat aquest treball, el professor Ricardo Román Cordero Otero, qui m'ha guiat en el procés d'escriptura, m'ha donat els millors consells i ha tingut sempre un moment per resoldre tots els dubtes que em sorgien.

Agraeixo també tot el suport rebut per part dels membres del grup de recerca de Biologia Molecular de Llevats, i especialment a Diego Velázquez qui ha estat al meu costat en tot moment i ha depositat tota la seva confiança en mi.

Per últim, vull agrair als meus pares i germana tot el suport rebut, no només durant la realització d'aquest treball, sinó durant aquests 5 anys, en els quals cada dia he sentit el

seu escalf i m'han donat tot el suport que necessitava per seguir endavant i no rendir-me en els pitjors moments.