

---

Tese de Doutoramento  
Departamento de Biología Celular e Molecular  
Área de Bioquímica e Biología Molecular

---

**Caracterización funcional de SKY1 y su papel en la  
resistencia de las levaduras a cisplatino**

---

Silvia Rodríguez Lombardero



Silvia Rodríguez Lombardero

---

---

**Caracterización funcional de *SKY1* y su papel en la  
resistencia de las levaduras a cisplatino**

---

---

Tese de Doutoramento

Departamento de Biología Celular e Molecular

Área de Bioquímica e Biología Molecular

Directora

M<sup>a</sup> Esperanza Cerdán Villanueva

2012

Portada: Modelo estructural de Sky1p generada con el programa MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) y obtenida de Nolen *et al.*, 2001.

El presente trabajo, **Caracterización funcional de *SKY1* y su papel en la resistencia de las levaduras a cisplatino**, presentado por Dña. Silvia Rodríguez Lombardero para aspirar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de La Coruña.

Revisado el texto, estoy conforme con su presentación para ser juzgado.

La Coruña, a 16 de Octubre de 2012

VºBº  
LA DIRECTORA DEL TRABAJO  
Dra. María Esperanza Cerdán Villanueva  
Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular



La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación obtenida a través del "*Programa de axudas para a consolidación e a estruturación de unidades de investigación competitivas del SUG. Xunta de Galicia-Consellería de Educación y Ordenación Universitaria. (Consolidación D.O.G. 3-12-2008. EN:2008/008 y Consolidación D.O.G. 10-10-2012. EN: 2012/118)*" y el proyecto BFU2009-08854 del Ministerio de Ciencia e Innovación. "Regulación mediada por Ixr1p y dos homólogas humanas en levaduras." Estas ayudas de consolidación y el proyecto de investigación están co-financiados con fondos FEDER.

La autora del presente trabajo durante su realización ha estado contratada con cargo a los anteriores proyectos en los siguientes periodos Marzo 2008- Octubre 2009 con cargo al Programa de axudas para a consolidación, Ref. 2008/008, y Febrero 2010-Octubre 2011 con cargo al proyecto de investigación BFU2009-08854.





A mis padres



## AGRADECIMIENTOS

Realmente no formaba parte de mis planes realizar una Tesis Doctoral, pero aquí estoy, escribiendo las últimas líneas de la misma para mostrar mi agradecimiento a todas las personas que de una manera u otra me han ayudado y apoyado durante los últimos años.

En primer lugar, agradecerle a la Dra. M<sup>a</sup> Esperanza Cerdán la oportunidad brindada, así como la confianza depositada para la realización de este trabajo, que sin su inestimable ayuda no hubiera sido posible.

También quisiera dar las gracias al resto de miembros del Área de Bioquímica, Ana Rodríguez Torres, Esther Rodríguez Belmonte, Isabel González Siso, Manuel Becerra Fernández, Marián Freire Picos y, especialmente, a Mónica Lamas Maceiras por compartir sus trucos y buen hacer, así como su constante disposición. Agradecerle también a la Dra. M<sup>a</sup> Fernanda Rodríguez de la Unidad de Biología Molecular del SAI-UDC su ayuda en la hibridación y obtención de datos de microarrays, así como al Dr. Luís Lombardía de la Unidad de Diagnóstico Molecular del CNIO su ayuda en el análisis de estos datos. A los doctores Cristina Ruiz-Romero y Jesús Mateos de la Unidad de Proteómica del INIBIC, gracias por su ayuda en las técnicas de proteómica.

Gracias también a todos los compañeros que en diferentes momentos pasaron o permanecen en el laboratorio: Ángel P., Rafa, Ana, Olalla, Teresa, Marcos, Fátima, Ángel V., Agustín, Susana, Mariú, Elena, Gerald, Stefan, Bernadette, Vanesa (creo no olvidarme de nadie) y especialmente a mis chicas del café/té doble en vaso de cristal en Arquitectura; gracias a Isabel Carneiro por los momentos del congelador de -80; a Lisi por su permanente sonrisa y sus postres, claro; a María Díaz por su camaradería y ánimo cuando parecía que nada salía bien; a María Sanz por equilibrar mi balanza y a Pili por su ayuda y sus palabras de ánimo cuando los western se resistían. Gracias también a Rosa García y a Irma Vázquez por las charlas cuando estaban en el laboratorio y fuera de él. Gracias a todos por aportar su granito de arena para hacer de un lugar de trabajo un sitio más entrañable.

Agradecer también el afecto de mis amigos sin cuyo aliento nunca habría llegado hasta aquí; gracias a Ana S. por nuestras conversaciones estimulantes; a Celia por los cafés con leche muy, muy cortitos de café; a Chechu, Damián, Juana, Mensi, Rosi y Sole por las tardes en el pueblín. Gracias por tantas cosas que aquí no caben.

A mi familia, mi gran familia, fuente inagotable de energía y cariño necesaria para afrontar cada paso del camino. A mis abuelos, por su constante preocupación y las inmensas cantidades de cariño transmitidas. A mis tíos, en especial a Mensi, por sus innumerables llamadas de ánimo, su amistad incondicional y las noches de charlas y desconexión; y a Noelia por saber siempre que decirme y entenderme como nadie. A mis primos, porque aunque ellos no lo saben, todo ayuda. Mil gracias a todos por las comidas de los sábados y las de los domingos.

A Marco, por haber estado ahí, día tras día, dándome su apoyo para seguir, especialmente en los momentos más difíciles (que él sabe, han sido unos cuantos). Gracias por ser el calor y la fuerza que me ha ayudado a continuar, haciendo que viera siempre la mejor parte. Gracias por extensión a su familia, por su ánimo y apoyo, especialmente a Amalita por tener siempre una palabra reconfortante.

A mi hermana, mi amiga, mi más reciente enfermera a cualquier hora, gracias por las charlas, nocturnas y diurnas, sobre el mundo, y porque sé que siempre que la necesito está, y eso me alienta.

Y, sobre todo, a mis padres. Creo que nunca podré transmitirlos toda la admiración y el respeto que os tengo. Sois para mí un ejemplo de tenacidad y nobleza, siempre entregados a nosotras. Gracias por todos vuestros esfuerzos, vuestro apoyo incondicional y vuestra fe a lo largo de toda mi vida. Os quiero.

## ABREVIATURAS

µg:	microgramo, masa.
µL:	microlitro, volumen.
µM:	micromolar, concentración.
µmol:	micromol, concentración.
x g.:	aceleración centrífuga, fuerza centrífuga relativa (FCR).
°C:	grados centígrados, temperatura.
2D-DIGE:	electroforesis bidimensional diferencial en gel.
2-DE:	electroforesis bidimensional.
A.:	unidad de absorbancia.
Ade:	adenina.
ADN:	ácido desoxirribonucleico.
ADNc:	ácido desoxirribonucleico complementario.
ADNasa:	enzima que degrada ADN.
ADNds:	ácido desoxirribonucleico de doble cadena.
ADP:	adenosín-difostato.
Ala:	alanina.
AMP:	adenosín-monofosfato.
<i>Amp<sup>R</sup></i> :	resistencia a ampicilina.
APS:	persulfato amónico.
Arg:	arginina.
ARN:	ácido ribonucleico.
ARNa:	ácido ribonucleico amplificado.
ARNasa:	ribonucleasa, enzima degradadora de ARN.
ARNm:	ácido ribonucleico mensajero.
ARNr:	ácido ribonucleico ribosómico.
ATP:	adenosín-trifostato.
Ba:	bar, presión.
CAT:	catalasa.
CHAPS:	[3-[(3-Colaamidopropil) dimetilamonio]-1 propano sulfonato].
cis-DPP:	cisplatino.
cm.:	centímetro.
CTD:	dominio de repetición C-terminal.

Cys:	cisteína.
DDR:	daño y reparación del ADN.
DEGs:	genes que se expresan diferencialmente.
DIGE:	electroforesis diferencial en gel.
DMSO:	dimetil sulfóxido.
DMTU:	dimetil tiourea.
DO:	densidad óptica.
dNTPs:	desoxinucleótidos trifosfato, dATP, dTTP, dGTP, dCTP.
DTT:	dithiothreitol.
EDTA:	ácido etilendiamino tetra-acético.
Euroscarf:	archivo europeo para análisis funcional de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
FADH <sub>2</sub> :	flavín adenín dinucleótido reducido.
FDR:	<i>False Discovery Rate</i> .
g.:	gramo, masa.
GDP:	guanosina 5´ difosfato.
GEO:	<i>Gene Expression Omnibus</i> .
Gln:	glutamina.
Gly:	glicina.
GMP:	guanosina 5´ monofosfato.
GSH:	glutación reducido.
GTP:	guanosina 5´ trifosfato.
h.:	horas, tiempo.
HEPES:	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etano-sulfónico.
HMP-P:	hidroximetil pirimidina fosfato.
HMP-PP:	hidroximetil pirimidina bisfosfato.
His:	histidina.
ID:	número de identificación de la proteína.
IEF:	isoelectroenfoque.
IPG:	gradiente de pH inmovilizado.
IVT:	transcripción <i>in vitro</i> .
Kb:	kilobase.
kDa.:	kilodaltons, peso molecular.
L.:	litro, volumen.

Leu:	leucina.
Lys:	lisina.
M:	molar, concentración.
MALDI:	desorción/ionización mediante láser inducida por matriz.
mg.:	miligramo, masa.
MIAME:	información mínima sobre experimentos de microarray.
min.:	minuto, tiempo.
mL.:	mililitro, volumen.
mM.:	milimolar, concentración.
MMR:	sistema de reparación de errores de emparejamiento.
Mr:	peso molecular.
MS:	espectrometría de masas.
MS/MS:	espectrometría de masas en tándem.
NADPH:	nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido.
NAD <sup>+</sup> :	nicotín adenín dinucleótido.
NCBI:	centro nacional de información biotecnológica.
NER:	mecanismos de reparación por escisión de base.
NLS:	señal de localización nuclear.
nm.:	nanómetro.
NPC:	complejo del poro nuclear.
ORF:	pauta abierta de lectura, secuencia codificadora.
<i>Ori</i> :	origen de replicación.
OS:	estrés oxidativo.
P/V:	relación peso/volumen.
PAGE:	electroforesis en gel de poliacrilamida.
pb.:	pares de bases.
PCA:	análisis de componentes principales.
PCIA:	fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa.
PDB:	base de datos de proteínas.
PEG:	polietilenglicol.
pH:	potencial de hidrógeno.
Phe:	fenilalanina.
pI:	punto isoeléctrico.

POD:	oxidación o degradación de proteínas.
qPCR:	PCR cuantitativa.
r.p.m.:	revoluciones por minuto, velocidad de giro.
R:	correlación estadística.
RGG:	dominio rico en arginina y glicina; motivo RGGY/F.
RIN:	número de la integridad del ARN.
RNP:	ribonucleoproteína, complejo ARN-proteína.
RNPhn:	ribonucleoproteína heterogénea nuclear.
ROS:	especies reactivas del oxígeno.
RRM:	motivo de reconocimiento de ARN.
RS:	dominio serina/arginina (S/R) o arginina/serina (R/S).
RT-qPCR:	qPCR con transcriptasa inversa.
S.:	coeficiente de sedimentación.
SDS:	dodecilsulfato sódico.
seg.:	segundo, tiempo.
SRPK:	proteín-quinasa serina-arginina.
TEMED:	N, N, N, N-tetrametiletilendiamina.
Thr:	treonina.
Tm:	temperatura de fusión, temperatura de <i>melting</i> .
Trp:	triptófano.
Tyr:	tirosina.
TOF:	tiempo de vuelo.
TPPII:	tripeptidil peptidasa II.
U.:	unidad enzimática.
Ura:	uracilo.
UV:	ultravioleta.



# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>21</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>22</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>23</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>25</b>
1. EL PAPEL DE LAS PROTEÍN-QUINASAS EN LA REGULACIÓN. ....	27
2. LAS PROTEÍN-QUINASAS SRPKs. ....	27
2.1 Estructura tridimensional y propiedades de Sky1p. ....	29
2.2 El mecanismo de reacción de la fosforilación catalizada por Sky1p. ...	31
3. LOS SUSTRATOS DE LAS SRPKs, LAS PROTEÍNAS SR.....	33
3.1 Npl3p.....	36
3.2 Gbp2p .....	39
4. SKY1 Y RESISTENCIA A ESPERMINA. ....	41
5. SKY1 Y RESISTENCIA A CISPLATINO.....	44
6. ESTRÉS OXIDATIVO Y RESPUESTA CELULAR A CISPLATINO.....	48
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>51</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>55</b>
1. MATERIAL BIOLÓGICO. ....	57
1.1 Líneas bacterianas. ....	57
1.2. Líneas de levaduras. ....	58
2. MEDIOS DE CULTIVO. ....	58
2.1 Medios de cultivo para bacterias. ....	59
2.2 Medios de cultivo para levaduras. ....	60
3. MEDIDA DEL NÚMERO DE CÉLULAS.....	63
3.1 Método turbidimétrico: Espectrofotómetro. ....	63
4. VECTORES DE CLONACIÓN Y MARCADORES DE TAMAÑO MOLECULAR. ....	63
4.1 Vector de clonación empleado. ....	63
4.2 Marcadores moleculares. ....	64
5. INTRODUCCIÓN DE ADN EN LAS CÉLULAS.....	65
5.1 Técnicas de transformación de bacterias. ....	65
5.2 Técnicas de transformación de levaduras. ....	67
6. MANIPULACIÓN DE ADN.....	68
6.1 Extracción de ADN plasmídico de bacterias.....	68
6.2 Extracción de ADN en levaduras.....	69
6.3 Medida de la concentración de ADN. ....	70
6.4 Digestiones enzimáticas.....	71
6.5 Purificación y concentración de fragmentos de ADN.....	71
6.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	71
6.7 PCR cuantitativa (qPCR).....	73
7. OBTENCIÓN DE ARN.....	75
7.1 Extracción de ARN de levaduras.....	76
7.2 Medida de la concentración de ARN. ....	78
8. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS. ....	79
8.1 Extracción de fosfoproteínas de levaduras.....	79

8.2	Medida de la concentración de proteínas.....	80
9.	TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS.....	81
9.1	Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	81
9.2	Electroforesis de ARN en geles de agarosa.....	83
9.3	Electroforesis de proteínas.....	83
10.	ENSAYOS DE SUPERVIVENCIA A CISPLATINO.....	85
11.	ENSAYOS DE RESISTENCIA A ESPERMINA.....	86
12.	ANÁLISIS DE EXPESIÓN MEDIANTE MICROARRAYS.....	87
12.1	Protocolo de amplificación del ARNa.....	88
12.2	Evaluación y fragmentación del ARNa.....	90
12.3	Hibridación.....	91
12.4	Análisis estadístico y extracción de datos.....	93
13.	PROTEÓMICA.....	94
13.1	Electroforesis bidimensional de proteínas DIGE.....	94
13.2	Análisis de muestras mediante Espectrometría de Masas (MS y MS/MS).....	97
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>		<b>101</b>
CAPÍTULO 1.....		103
ANÁLISIS GENÉTICO PARA DETERMINAR LA RELACIÓN ENTRE LOS GENES <i>IXR1</i> Y <i>SKY1</i> DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EN LA RESPUESTA A CISPLATINO Y ESPERMINA.....		103
1.1.	Introducción.....	105
1.2.	Obtención de las cepas.....	106
1.3.	Análisis de resistencia a cisplatino.....	108
1.4.	Análisis de resistencia a espermina.....	111
CAPÍTULO 2.....		115
EFECTO DEL CISPLATINO Y LA DELECIÓN DE <i>SKY1</i> SOBRE EL PROTEOMA DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ENRIQUECIDO EN FOSFOPROTEINAS.....		115
2.1.	Introducción.....	117
2.2.	Diseño experimental.....	117
2.3.	Resultados.....	119
2.4.	Discusión.....	135
CAPÍTULO 3.....		147
ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DE LOS EFECTOS PRODUCIDOS POR CISPLATINO Y LA DELECCIÓN DE <i>SKY1</i> EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..		147
3.1.	Introducción.....	149
3.2.	Diseño experimental.....	149
3.3.	Resultados.....	150
ANEXO AL CAPÍTULO 3 .....		171
Tabla S1.....		173
Tabla S2.....		181
Tabla S3.....		188
Tabla S4.....		202
Tabla S5.....		219
Tabla S6.....		242

CAPÍTULO 4.....	267
DISCUSIÓN: MECANISMOS DE RESISTENCIA A CISPLATINO EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y SU DEPENDENCIA DE Sky1p.....	267
4.1. Interacciones entre los genes de respuesta a cisplatino <i>IXR1</i> y <i>SKY1</i> . .....	269
4.2. Las funciones de Sky1p a la luz de los resultados de proteómica y transcriptómica.....	272
4.3. Mecanismos de acción del cisplatino en las células de levadura y desarrollo de resistencia. ....	277
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>287</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>291</b>



## RESUMEN.

El cisplatino es un fármaco anticancerígeno que contiene platino (II) en su estructura. Actúa inhibiendo la multiplicación de las células tumorales. Forma uniones en la doble hélice de ADN, lo que provoca interferencias importantes en los procesos de división del ADN, y en consecuencia, la muerte celular.

Se han identificado varios genes en *Saccharomyces cerevisiae* cuya inactivación produce resistencia a cisplatino. Entre ellos *SKY1*, que codifica para una proteína-quinasa SR, con un papel potencial en la señalización celular, e *IXR1* que codifica una proteína de unión al ADN con conexiones en la reparación del ADN. En este estudio hemos analizado los fenotipos asociados a las deleciones simples  $\Delta sky1$  y  $\Delta ixr1$ , y la doble  $\Delta sky1\Delta ixr1$  para averiguar las interacciones genéticas que se producen entre ambos genes, comprobando que es dependiente de cepa. También hemos analizado qué parte de la respuesta a cisplatino está mediada por Sky1p y los posibles genes/proteínas diana que se ven implicados en esta respuesta, de forma dependiente o independiente de Sky1p, mediante análisis basados en técnicas de transcriptómica y proteómica.

## RESUMO.

O cisplatino é un fármaco anticanceríxeno que contén platino na súa estrutura. Actúa inhibindo a multiplicación das células tumorais. Forma unions na dobre hélice de ADN, o que provoca interferenzas importantes nos procesos de división do ADN, e en consecuencia, a morte.

Identificáronse varios xenes en *Saccharomyces cerevisiae* cuya inactivación produce resistencia ó cisplatino. Entre eles *SKY1*, que codifica para unha proteín-quinasa SR cun papel potencial na sinalización celular, e *IXR1* que codifica unha proteína de unión ao ADN con conexións na reparación do ADN. Neste estudio analizamos os fenotipos asociados ás deleccións sinxelas  $\Delta sky1$  y  $\Delta ixr1$ , e a dobre  $\Delta sky1\Delta ixr1$  para averiguar as interaccións xenéticas que se producen entre os dous xenes, comprobando que é dependente de cepa. Tamén analizamos qué parte da resposta ó cisplatino esta mediada por Sky1p y os posibles xenes diana que se ven implicados na desposta ó cisplatino, de forma dependente ou independente de Sky1p mediante análises baseados en técnicas de transcriptómica y proteómica.

## ABSTRACT.

Cisplatin is an anticancer drug, which contain platinum (II) in its structure. It acts by inhibiting the multiplication of tumor cells. Form bonds with the DNA double helix, that producing significant interferences to the DNA division processes and, consequently, cell death.

Several genes have been identified in *Saccharomyces cerevisiae* whose inactivation causes resistance to cisplatin. Among them *SKY1*, that encodes a SR protein kinase with a potential role in cell signaling and *IXR1*, which encodes a DNA binding protein interfering in DNA repair. We have tested, through simple  $\Delta sky1$ ,  $\Delta ixr1$  and double  $\Delta sky1\Delta ixr1$  deletions, the genetics interactions between these genes in the production of associated phenotypes, and results show that they are strain-dependent. We have also analyzed the role of Sky1p in the response to cisplatin, and the target genes/proteins that are involved in this response, in a Sky1p-dependent or Sky1p-independent way. Transcriptomic and proteomic techniques have been used in this study.





# **INTRODUCCIÓN**



## Introducción

---

### 1. EL PAPEL DE LAS PROTEÍN-QUINASAS EN LA REGULACIÓN.

La fosforilación enzimática y reversible de las proteínas es la estrategia más utilizada para controlar su actividad en las células eucariotas. La fosforilación de proteínas juega un papel muy importante en casi todos los aspectos de la vida de la célula regulando rutas de señalización, reacciones del metabolismo, la transcripción de los genes, la progresión del ciclo celular, la diferenciación, la organización del citoesqueleto, el movimiento celular, la apoptosis, la comunicación intercelular y funciones neuronales e inmunológicas.

El fosfato se transfiere desde una molécula de ATP a la proteína diana mediante una enzima con actividad proteín-quinasa y es eliminado mediante hidrólisis catalizada por proteín-fosfatasas. Las proteín-quinasas comparten un dominio catalítico conservado, el cual cataliza la transferencia del fosfato de la posición gamma del ATP a residuos de serina, treonina o tirosina de las proteínas. A su vez las proteín-quinasas pueden estar en un estado activo o inactivo y este cambio está regulado por diferentes mecanismos de control, incluida la fosforilación de la quinasa (Johnson, 2009).

Las modificaciones que experimenta la proteína diana por fosforilación y que, a su vez, influyen en su función y/o actividad, están relacionadas con las propiedades del grupo o grupos fosfato que se introducen en su estructura. El grupo fosfato, con un pKa de ~ 6.7, es predominantemente di-aniónico a pH fisiológico. Los efectos de esta doble carga negativa y la capacidad de los átomos de oxígeno del grupo fosfato para participar en la formación de puentes de hidrógeno confieren características especiales a la proteína fosforilada que pueden provocar cambios conformacionales y funcionales en la misma.

La familia de las proteín-quinasas de *Saccharomyces cerevisiae* está formada por, aproximadamente 122 ORFs (Manning *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2000; Ptacek *et al.*, 2005). Estas proteínas se consideran un objetivo muy atractivo para el desarrollo de fármacos útiles para la terapia de una amplia variedad de enfermedades (Cohen *et al.*, 2002).

### 2. LAS PROTEÍN-QUINASAS SRPKs.

Las proteín-quinasas serina-arginina (SRPKs) constituyen una subfamilia de quinasas que fosforilan sus sustratos específicamente en el aminoácido serina si éste se encuentra formando parte de motivos ricos en repeticiones

## Introducción

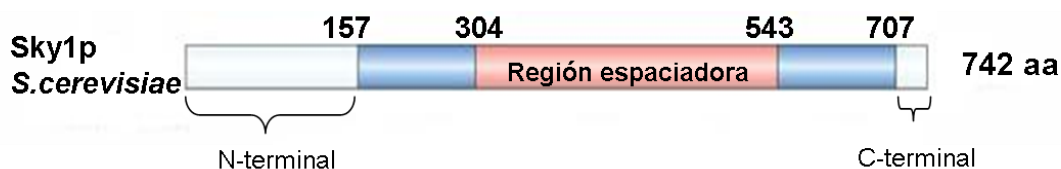
---

serina/arginina (S/R) o arginina/serina (R/S), conocidos como dominios RS. Las SRPKs tienen gran especificidad por estos dominios, ya que modificaciones de una serina por treonina o de una arginina por lisina anulan completamente la fosforilación. Originalmente se consideraba que actuaban en la regulación del *splicing* (corte y empalme) constitutivo y alternativo de ARNm, pero actualmente se sabe que las SRPKs participan en diversos procesos de la maduración del ARNm, así como en otras actividades celulares como la reorganización de la cromatina. También regulan el ciclo celular, el metabolismo o a la proteína p53 (Giannakouros *et al.*, 2011). Las SRPKs tienen además interés como dianas farmacológicas porque su expresión se incrementa en tumores de páncreas, hígado y colon (Hayes *et al.*, 2006, 2007), así como en leucemias de células T inducidas por el virus-1 humano (Hishizawa *et al.*, 2005).

La primera SRPK purificada y caracterizada se nombró como SRPK1, por SR proteín-quinasa 1, y se observó su capacidad para fosforilar proteínas con dominios SR (Gui *et al.*, 1994a, 1994b). Con posterioridad, se clonó el ADNc de SRPK1, lo que reveló que el ortólogo de SRPK1 en *Schizosacharomyces pombe*, *DSK1*, ya había sido clonado y parcialmente caracterizado como una quinasa (Takeuchi y Yanagida, 1993). En 1998 se clonó una proteín-quinasa específica SR altamente homóloga a SRPK1 en humanos y en ratón que se nombró como SRPK2 (Kuroyanagi *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998). En 1999 se encontró una proteín-quinasa SR en la levadura *S. cerevisiae*, Sky1p (Fig.1). Este descubrimiento fue inesperado debido a la prevalencia de genes sin intrones y a la falta de *splicing* alternativo en este organismo. A pesar de esto, Sky1p tiene las características estructurales y funcionales de una proteín-quinasa SR típica, ya que no sólo puede fosforilar factores de *splicing* de mamíferos con la misma alta afinidad y especificidad que las proteínas SRPK1 y SRPK2 (Yeakley *et al.*, 1999), sino que también posee sustratos específicos en *S. cerevisiae*, que son proteínas involucradas en el transporte de ARN entre el núcleo y el citoplasma. Este último descubrimiento llevó a su vez al hallazgo de la implicación de las SRPKs en la regulación de pasos adicionales de la maduración del ARNm en eucariotas superiores (Giannakouros *et al.*, 2011). En células de *S. cerevisiae* en interfase, Sky1p se localiza principalmente en el citoplasma. Cuando se encuentra mayoritariamente en el núcleo Sky1p inhibe el crecimiento celular (Gui *et al.*, 1994a), lo que sugiere que la localización nuclear de las SRPKs puede regular negativamente el procesamiento de ARN (Siebel *et al.*, 1999).

## Introducción

Las proteínas SRPKs están evolutivamente muy conservadas entre distintas especies (50% de similitud entre humanos y levaduras) y contienen dentro del dominio quinasa una región denominada espaciadora, formada por unos 250-300 aminoácidos. En levaduras, esta región es determinante para la regulación de la localización subcelular de la proteína, así como para la viabilidad de las células. Como ya se ha dicho, las SRPKs se localizan principalmente en el citoplasma y en menor medida en el núcleo. La localización citoplasmática depende principalmente de la región espaciadora (Fig. 1) que actúa como un anclaje citoplasmático y es específica de la familia SRPK (Ding *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 1998; Nikolakaki *et al.*, 2001; Koizumi *et al.*, 1999).



**Figura 1.** Dominios de Sky1p mostrando el dominio quinasa en azul y la región espaciadora en rosa (modificada de Lukasiewicz *et al.*, 2007b).

### 2.1 Estructura tridimensional y propiedades de Sky1p.

La estructura de Sky1p (Fig. 2) ha sido determinada mediante difracción de rayos X (Nolen *et al.*, 2001) y presenta un dominio quinasa dividido en dos zonas con distinto plegamiento; la N-terminal, está compuesta principalmente por hebras  $\beta$ , y la C-terminal, está formada mayoritariamente por hélices  $\alpha$ .

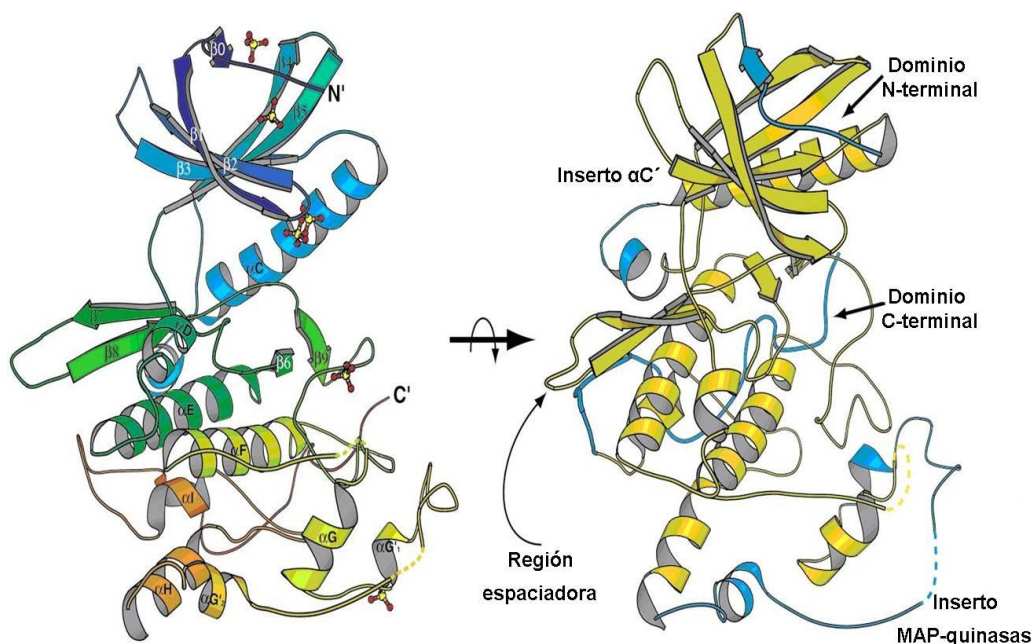
El patrón de plegamiento de Sky1p es similar al de otras proteín-quinasas con algunas modificaciones. Así, los aminoácidos 153 y 154 forman una corta hebra  $\beta_0$  que no se encuentra en otras SRPKs. Sky1p también se diferencia con respecto a su homóloga humana, SRPK1, en que tiene una extensión adicional de 40 aminoácidos en la región C-terminal (Nolen *et al.*, 2001) y que contacta con el *loop* de activación del centro activo. La delección de sólo 10 aminoácidos de esta extensión C-terminal reduce drásticamente la actividad catalítica de Sky1p (Lukasiewicz *et al.*, 2007b).

Además de las extensiones terminales, Sky1p presenta dos insertos internos. El primero está formado por 11 aminoácidos (inserto  $\alpha C'$ ) entre la hélice  $\alpha C$  y la hebra  $\beta_4$  y parece estabilizar la hélice  $\alpha C$ . El segundo inserto tiene una longitud de 47 aminoácidos y se encuentra entre la hélice  $\alpha G$  y la

## Introducción

hélice  $\alpha_H$ . Este inserto se pliega en dos hélices  $\alpha$  cortas ( $\alpha G'_1$  y  $\alpha G'_2$ ) y su composición y longitud se conserva dentro de la familia SRPK. Es estructuralmente similar al de MAP-quinasas y participa en el reconocimiento de las proteínas sustrato (Lukasiewicz *et al.*, 2007b; Nolen *et al.*, 2001).

El plegamiento quinasa puede adoptar muchas conformaciones diferentes, debido tanto a la orientación de los dos dominios N-terminal y C-terminal, como a la flexibilidad de los *loops* presentes en cada uno de ellos (Sowadski *et al.*, 1999; Nolen *et al.*, 2003). Los dos dominios de la estructura de Sky1p se encuentran en una conformación intermedia abierta/cerrada en comparación con los dominios de otras proteín-quinasas.



**Figura 2.** Estructura de Sky1p (Nolen *et al.*, 2001).

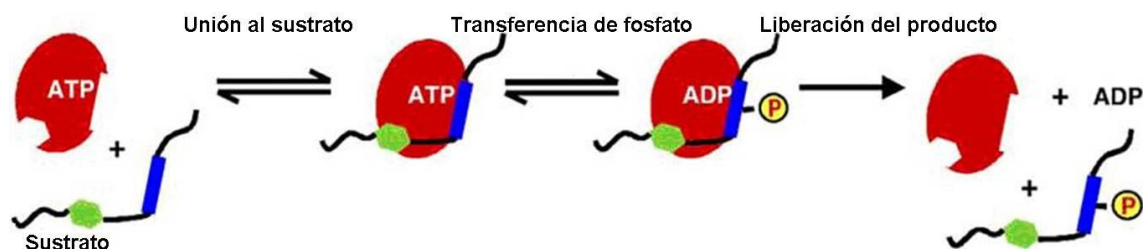
Las SRPKs, incluida Sky1p, son enzimas constitutivamente activas ya que no necesitan modificaciones post-traduccionales o interacción con factores reguladores para activarse y permitir el acceso del sustrato al centro catalítico. A diferencia de otras quinzas, Sky1p no requiere de la fosforilación del *loop* de activación para adquirir la conformación activa, ya que diversas interacciones en su estructura tridimensional bloquean dicho *loop* en la conformación activa. Esta conformación se estabiliza a través de interacciones con residuos del dominio C-terminal, de modo que el centro de unión al sustrato está listo para aceptarlo. Al analizar la estructura de Sky1p se observa que presenta tres características que son esenciales para estabilizar esta conformación activa. Inmediatamente después del *loop* de activación se encuentra el segmento

## Introducción

comprendido entre la hebra  $\beta 9$  y la hélice  $\alpha F$ , denominado *loop* P+1 por su papel en la unión de la posición P+1 del sustrato. El dominio C-terminal y el residuo Gln 566 de la posición P+1 del *loop* son críticos para la conformación activa, del mismo modo que lo es un pequeño inserto dentro del dominio menor y que ayuda a orientar la hélice  $\alpha C$ . El residuo Gln en la posición 566 dentro del *loop* P+1 de Sky1p está bastante conservado en otras SRPKs, aunque es más frecuente encontrar en esa posición Gly o Ala, y juega un papel esencial en la estabilidad de la conformación constitutivamente activa de Sky1p (Nolen *et al.*, 2001).

### 2.2 El mecanismo de reacción de la fosforilación catalizada por Sky1p.

La reacción de fosforilación del sustrato por parte de una proteín-quinasa se compone de tres eventos fundamentales: Unión al sustrato; transferencia del grupo fosfato y liberación irreversible del producto (Fig.3).



**Figura 3.** Fosforilación por una proteín-quinasa (Lieser *et al.*, 2005).

En general las proteínas de la familia SRPK presentan una mayor especificidad de sustrato que otras proteín-quinasas y fosforilan secuencias cortas de péptidos, reconociendo tanto los aminoácidos que van a ser fosforilados como otros aminoácidos distales.

Las proteín-quinasas unen también dos iones de magnesio para favorecer la fosforilación del sustrato (Adams, 2001). Estos dos iones metálicos cumplen dos funciones esenciales. Por una parte neutralizan las cargas negativas de los fosfatos del ATP, y por otra, estabilizan la carga en el estado de transición, lo que facilita la rápida fosforilación del sustrato (Adams y Taylor, 1993). Sin embargo, el  $Mg^{2+}$  unido en el centro activo Sky1p no modifica la afinidad relativa por ATP o ADP (Aubol *et al.*, 2003). Sky1p une ADP con mayor afinidad que ATP; de hecho la afinidad por ATP es baja en comparación con

## Introducción

---

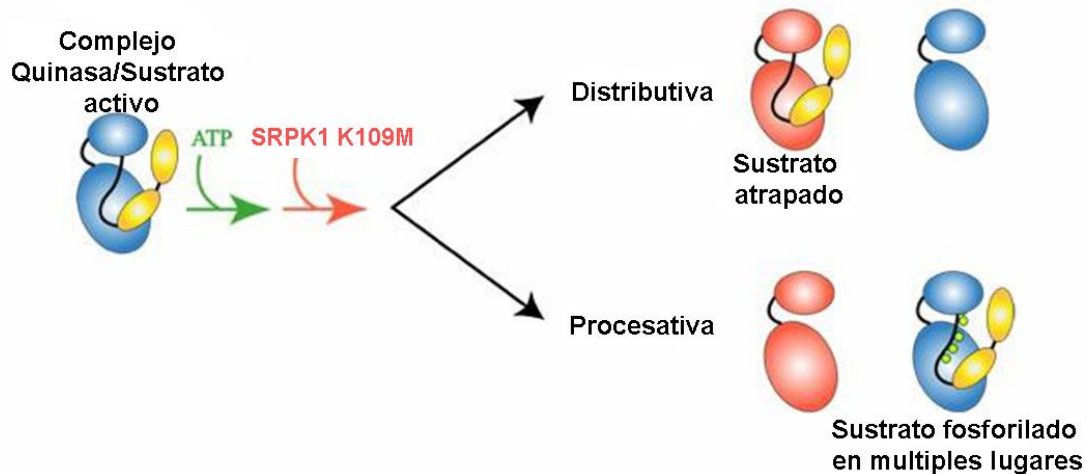
otras SRPKs. Sky1p une Npl3p, su sustrato mejor caracterizado, con una afinidad muy alta, lo que logra mediante una combinación de factores locales y distales en la proteína sustrato. El ATP tiene acceso al sitio de unión de nucleótidos tanto en ausencia como en presencia del sustrato Npl3p, lo que indica que no se exige un patrón de entrada ordenado de los ligandos que son necesarios para la reacción en el centro activo. Npl3p es rápidamente fosforilado en el sitio activo (1/40 seg.) pero la liberación de los productos es lenta (1/0,5 seg.) y el factor limitante para la velocidad de reacción.

El mecanismo de fosforilación de sustratos SR por otras quinasas SRPKs es diferente al descrito para Sky1p, que se conoce como fosforilación distributiva, lo que implica que la enzima realiza varios ciclos de fosforilación disociándose del sustrato tras cada reacción catalítica. Otras SRPKs catalizan varios ciclos de fosforilación sucesivos sin que la enzima se separe del sustrato, es la denominada fosforilación procesativa. Por ejemplo, la enzima de humanos SRPK1 realiza fosforilación procesativa sobre su sustrato natural ASF/SF2 el cual posee un dominio RRM que participa en las interacciones de unión con la enzima.

Para investigar las diferencias potenciales en el mecanismo de fosforilación de ASF/SF2 por parte de Sky1p, Lukasiewicz y colaboradores (Lukasiewicz *et al.*, 2007b) realizaron un ensayo con enzima trampa (Fig. 4). En él preincubaron la quinasa y el sustrato (ASF/SF2), tras lo que iniciaron la reacción con la adición simultánea de un exceso de ATP y el agente de captura (enzima trampa) diseñado para unirse cualquier ASF/SF2 libre. Utilizaron como agente de captura una forma catalíticamente inactiva de longitud completa de SRPK1 K109M (quinasa humana en la que el aminoácido K lisina de la posición 109 se cambió por metionina) que une bien, pero no puede fosforilar al sustrato ASF/SF2 que queda atrapado en el centro catalítico (Velazquez-Dones *et al.*, 2005). Si la reacción es procesativa, no se genera ASF/SF2 libre y la reacción progresa, de modo que la trampa no puede inhibir la reacción. Sin embargo, si la reacción es distributiva uno o más fosfo-intermedios de ASF/SF2, liberados del sitio activo de Sky1p, son fácilmente atrapados por SRPK1 K109M dando lugar a la inhibición de reacción. Los resultados obtenidos en este estudio revelaron que, de forma similar a SRPK1, Sky1p es una enzima procesativa cuando utiliza el sustrato humano ASF/SF2.



## Introducción



**Figura 4.** Diagrama esquemático de las diferencias entre la fosforilación procesativa y distributiva de ASF/SF2 por Sky1p. Las quinasas activas y la trampa (SRPK1 K109M) se indican con azul y rojo, respectivamente. Los sustratos secuestrados por la trampa, debido a su disociación de la quinasa activa después de la fosforilación inicial, no puede ser fosforilados. La fosforilación procesativa necesita una asociación continua quinasa/sustrato para los múltiples eventos de fosforilación (Lukasiewicz *et al.*, 2007b).

En el caso de Sky1p, esta forma un complejo estable con el sustrato ASF/SF2 y lo fosforila de manera procesativa en los mismos sitios que SRPK1, mientras que la fosforilación llevada a cabo sobre sus sustratos naturales es del tipo distributiva. Al contrario que el sustrato ASF/SF2, los dominios RRM de Npl3p no están involucrados en ninguna interacción de unión con la enzima. De estos datos se puede concluir que los contactos adicionales a través del dominio RRM son probablemente necesarios para que se pueda producir una fosforilación de tipo procesativa (Lukasiewicz *et al.*, 2007b).

Algunos autores sugieren que la fosforilación procesativa es ventajosa frente a la distributiva, porque la fosforilación extremadamente rápida lograda a través de este mecanismo permite cambios también muy rápidos en la funcionalidad de los sustratos (Lukasiewicz *et al.*, 2007b).

### 3. LOS SUSTRATOS DE LAS SRPKs, LAS PROTEÍNAS SR.

En los organismos eucariotas, los pre-ARNm recién sintetizados deben ser procesados en el núcleo a través de una serie de modificaciones que incluyen el corte de intrones, el empalme de exones y la poliadenilación de los extremos 3'. Los ARNm así procesados son transportados, por exportación activa y específica, a través del complejo del poro nuclear (NPC) al citoplasma (Stutz y Rosbash, 1998). Los sustratos para estas reacciones y para la

## Introducción

---

exportación son complejos ARN-proteína (RNPs) (Dreyfuss *et al.*, 1993; Daneholt, 1997). Se produce un ciclo dinámico de ensamblaje nuclear y desensamblaje citoplasmático de estos complejos RNPs de modo que las proteínas componentes vuelven al núcleo para volver a transportar ARN (Stutz y Rosbash, 1998). Se conocen dos clases de proteínas transportadoras que se unen al ARN en eucariotas superiores, que son las proteínas RNPhn (RNP heterogénea nuclear), y las proteínas SR (Alzhanova-Ericsson *et al.*, 1996; Nakielny y Dreyfuss, 1997; Nakielny *et al.*, 1997; Cáceres *et al.*, 1998). Ambas contienen uno o más motivos RRM de unión al ARN en su dominio N-terminal. El dominio C-terminal de las proteínas RNPhn es típicamente rico en arginina y glicina (RGG) y es el sitio de dimetilación de arginina (Liu y Dreyfuss, 1995). El dominio C-terminal de las proteínas SR contiene múltiples copias del dipéptido serina-arginina (SR o RS), que son los sitios de fosforilación de la serina (Fu, 1995).

Históricamente, las proteínas RNPhn han sido estudiadas como factores para la exportación de ARNm. El prototipo de esta clase es RNPhnA1, que acompaña al ARNm desde el núcleo hasta el citoplasma (Visa *et al.*, 1996; Daneholt, 1997). La exportación termina con la liberación de los ARNm y la reimportación de RNPhnA1 a través de su receptor de importación, la transportina (Pollard *et al.*, 1996; Siomi *et al.*, 1997).

Las proteínas SR fueron inicialmente identificadas como factores esenciales del *splicing*, pero posteriores descubrimientos sugirieron un papel más amplio para estas proteínas en el metabolismo del ARNm (Cáceres *et al.*, 1998; Gilbert *et al.*, 2001). Juegan un papel esencial en el ensamblaje del espliceosoma en el *splicing* constitutivo y en el alternativo; sirven como adaptadores multifuncionales para enlazar la transcripción con el *splicing* (Misteli y Spector, 1999) y con la exportación de ARN (Huang *et al.*, 2004) de una manera espacial y temporalmente regulada y actúan en diferentes etapas post-transcripcionales durante el proceso de expresión de los genes de eucariotas (Sanford *et al.*, 2005). Las proteínas SR contienen uno o más motivos de reconocimiento de ARN (RRM) en posición N-terminal y el dominio C-terminal rico en serinas/argininas denominado dominio RS. Por razones históricas, el dominio C-terminal se llama dominio RS mientras que la familia de proteínas se llama proteínas SR. Otros factores de *splicing* como U1-70K contienen dominios RS pero no son proteínas SR. Las proteínas SR utilizan su dominio RRM para unir pre-ARNm, mientras que el dominio RS de otras proteínas media la interacción específica proteína-proteína (Aubol *et al.*, 2002).

## Introducción

---

Las funciones de las proteínas SR son moduladas por fosforilación reversible. Dos familias de proteín-quinasas son la clave para la regulación de estas proteínas SR: SRPK y CLK/Sty. Las quinasas SRPK y CLK/Sty fosforilan factores de *splicing* SR, predominantemente en residuos de serina del dominio RS. La fosforilación también regula la correcta localización de las proteínas SR para realizar sus funciones en la célula. Las proteínas SR recién sintetizadas en el citoplasma deben ser transportadas al núcleo para ejercer su función en el procesamiento del ARN. Curiosamente, el dominio RS sirve como NLS (señal de localización nuclear) y su fosforilación facilita la interacción de la proteína con su receptor nuclear para la importación (Kataoka *et al.*, 1999; Lai *et al.*, 2001). Después de entrar en el núcleo, la fosforilación de la serina del dominio RS es necesaria para la interacción con el dominio C-terminal de la subunidad mayor de la ARN polimerasa II y su posterior reclutamiento a los sitios de transcripción activa, de modo que el *splicing* se lleva a cabo co-transcripcionalmente en la célula (Misteli y Spector, 1999).

La existencia en las levaduras que se dividen por gemación (*buding yeasts*) de proteínas SR que sean similares a las de eucariotas superiores fue durante años motivo de controversia. Las proteínas de estas levaduras no contienen ejemplos de tramos extensos de dipéptidos SR/RS característicos de las proteínas SR de mamíferos (Birney *et al.*, 1993). De hecho, las proteínas de *S. cerevisiae* no tienen un clásico dominio RS con largos tramos de repeticiones de arginina/serina (Jurica y Moore, 2003; Dreyfuss *et al.*, 1993) (Fig. 5). En el caso de Npl3p, hay ocho dipéptidos RS dispersos dentro del dominio RGG, y en el dominio C-terminal la mayoría de los dipéptidos RS son fosforilados por Sky1p (Yun y Fu, 2000). Esta modificación es esencial para la importación nuclear de Npl3p, facilitada por una importina, Mtr10p (Senger *et al.*, 1998). Defectos en la fosforilación provocan la acumulación de Npl3p en el citoplasma (Gilbert *et al.*, 2001; Yun y Fu, 2000). En el caso de Gbp2p contiene tres dipéptidos RS sucesivos (Fig. 5), fundamentales para la importación nuclear de Gbp2p (Windgassen y Krebber, 2003).



## Introducción

---

de forma activa su exportación nuclear (Henry *et al.*, 1996; Estrella *et al.*, 2009). La sobre-expresión de Npl3p es tóxica (Häcker y Krebber, 2004) y tiene como resultado la exportación defectuosa del ARNm (Sträßer *et al.*, 2002).

Una vez en el citoplasma no está muy claro el destino Npl3p. Algunos autores describen que Npl3p se disocia del ARNm que está siendo traducido por la acción de Mtr10p, a través de un mecanismo independiente de Sky1p (Windgassen *et al.*, 2004). Sin embargo, otros autores defienden que la disociación de Npl3p del ARNm se produce como consecuencia de su fosforilación por Sky1p y que Npl3p, una vez fosforilada, interacciona con Mtr10p, como se muestra en la Figura 6 (Yun y Fu, 2000; Gilbert *et al.*, 2001; Aubol *et al.*, 2002, Izaurrealde, 2004).

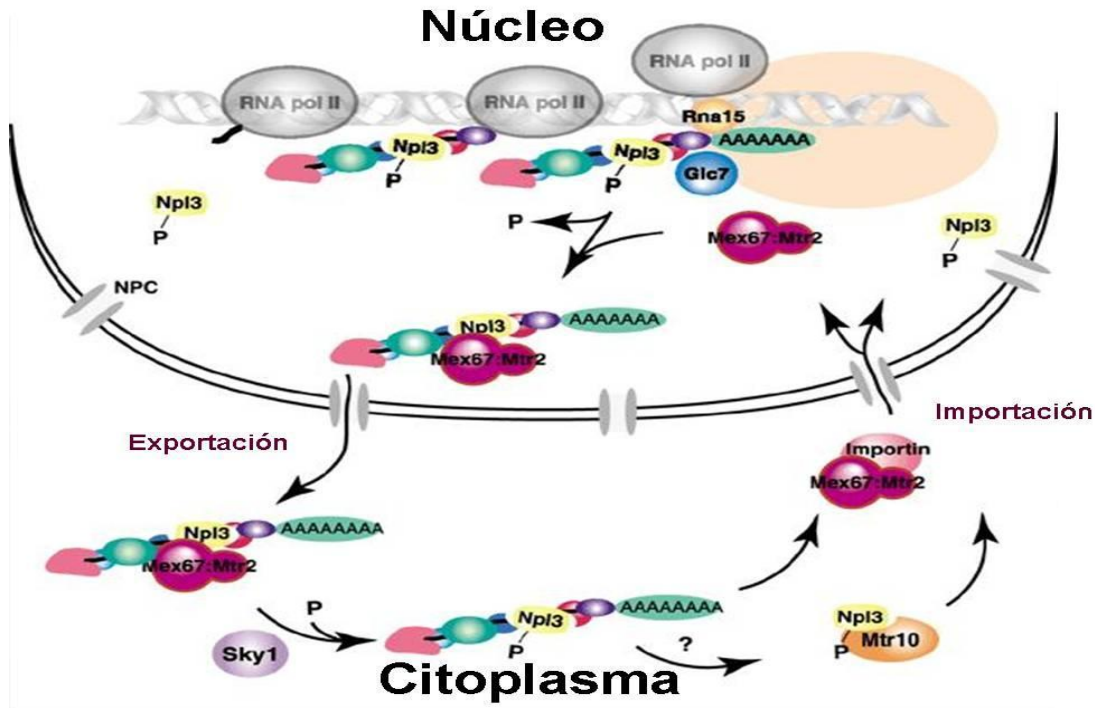
Sky1p fosforila a Npl3p en una única serina en el dominio C-terminal. Cuando las células de levadura expresan la proteína Npl3p en la que se ha deletado esta serina (S411Δ), la proteína mutante se acumula en el citoplasma unida a ARNm poli-A (Yun y Fu, 2000; Gilbert *et al.*, 2001). Un fenotipo similar se observa en células de levadura que carecen de Sky1p. Estos datos están a favor del papel de la fosforilación dependiente de Sky1p en el importe nuclear.

Gilbert *et al.*, sugieren que coexisten al menos los dos mecanismos que promueven la disociación de Npl3p del ARNm poli-A en el citoplasma: la fosforilación por Sky1p y la unión a Mtr10p. El hecho de que la delección simultánea de los genes *SKY1* y *MTR10* sea letal, pero no lo sea la de cada uno de ellos por separado, es consistente con la idea de que ambos mecanismos contribuyen aditivamente al mismo proceso esencial (Yun y Fu, 2000). Si la función de Sky1p fuera simplemente estimular la unión de Npl3p a Mtr10p, la delección de *SKY1* no tendría un efecto añadido sobre la de *MTR10*.

Una vez de vuelta en el núcleo Npl3p sufre desfosforilación por una fosfatasa de tipo PP1, Glc7p, y se une a los genes que están transcribiéndose activamente mediante su interacción con el complejo de transcripción THO2 (Gilbert y Guthrie, 2004; McBride *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2004). La desfosforilación de Npl3p en el núcleo es también esencial para el reclutamiento del receptor de exportación Mex67p al complejo Npl3p/RNPm y su exportación al citoplasma (Gilbert y Guthrie, 2004). Mex67p forma un receptor heterodimérico con la proteína Mtr2 para la exportación. Ambas proteínas interaccionan con las proteínas del poro nuclear y otras proteínas

## Introducción

adaptadoras para facilitar el movimiento del ARN a través del poro nuclear (Yao *et al.*, 2008, 2007; Senay *et al.*, 2003) (Fig. 6).



**Figura 6.** Modelo del ciclo de fosforilación y desfosforilación de Npl3p en su transporte entre núcleo y citoplasma (Izaurrealde, 2004).

La exportación desde el núcleo de Npl3p también requiere la metilación por Hmt1p (Gilbert y Guthrie, 2004; McBride *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 1998; Siebel y Guthrie, 1996; Xu y Henry, 2004). Se ha demostrado que los residuos de la mayoría de las argininas del dominio RGG de Npl3p están mono o dimetilados (McBride *et al.*, 2005). Además de con el complejo de transcripción THO2, Npl3p también se asocia con otras proteínas y con ella misma en el núcleo (Yu *et al.*, 2004; Lei *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 2000; Bucheli y Buratowski, 2005).

Se han observado cantidades significativas (30%) de la proteína Npl3p unida al ARNm durante la fase de elongación de la traducción. Una posible explicación podría ser que las proteínas SR no sólo activan la traducción a través de su disociación regulada del ARNm, si no también a través del reclutamiento de ciertos factores de iniciación de la traducción. Algunos autores sugieren la participación de Npl3p en la incorporación del ARNm a los ribosomas. Npl3p desempeña un papel en la traducción que es independiente de su función en el transporte del ARNm, la transcripción y la importación de

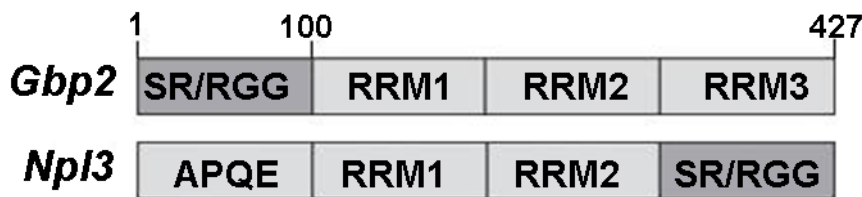
## Introducción

proteínas nucleares (Dermody *et al.*, 2008; Bucheli y Buratowski, 2005). Se ha encontrado Npl3p asociada a polisomas y a otras proteínas involucradas en la traducción como Pab1p, que participa en el ensamblaje del proteosoma (Hurt *et al.*, 2004; Windgassen *et al.*, 2004). Por otra parte, las células que producen una forma mutada de Npl3p (npl3-27) son defectuosas en la liberación de esta proteína del polirribosoma, y muestran alteración en la traducción del ARNm (Windgassen *et al.*, 2004).

En resumen, Npl3p es una proteína de unión a ARN multifuncional con funciones en la transcripción, transporte de ARN y traducción (Estrella *et al.*, 2009) y cuya sobreexpresión es tóxica (Lukasiewicz *et al.*, 2007a).

### 3.2 Gbp2p

Gbp2p es una proteína transportadora de unión a ARN de *S. cerevisiae*. Esta proteína tiene tres motivos de unión a ARN (RRM) y presenta similitud con Npl3p (27%). Los dos primeros dominios RRM de Gbp2p están conservados, mientras que el tercero lo está en menor medida. El dominio N-terminal de Gbp2p muestra similitudes con el dominio C-terminal de Npl3p, ya que contiene cuatro repeticiones del motivo RGG (Arg-Gly-Gly) y nueve motivos RS. En el caso de Gbp2p, los sitios de fosforilación se encuentran en el dominio N-terminal RGG/RS, mientras que la región RGG en Npl3p se encuentra en el dominio C-terminal (Fig. 7). Aunque la orientación física del sitio de fosforilación y el lugar de acoplamiento a Sky1p se invierten en Npl3p y Gbp2p (Fig. 7), su reconocimiento por Sky1p es similar (Lukasiewicz *et al.*, 2007a).

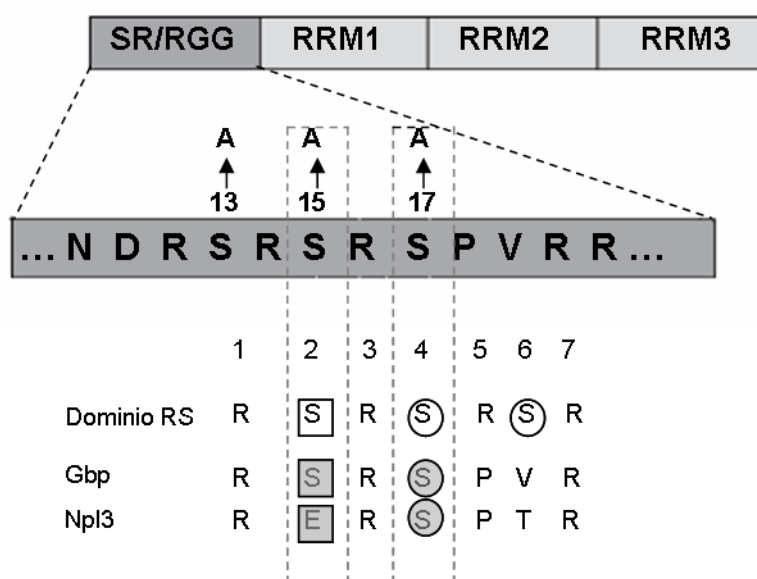


**Figura 7.** Organización de los dominios de Gbp2p y Npl3p (modificada de Windgassen y Krebber, 2003).

Los residuos aminoacídicos entre 12-18 en Gbp2p coinciden con el consenso RRSRSRSP casi a la perfección (Fig. 8). Por esto fue una sorpresa encontrar que el primer residuo de serina no tiene ninguna influencia sobre la localización de Gbp2p, al contrario que los residuos de serina segundo y

## Introducción

tercero que, cuando están mutados, dan lugar a una acumulación citoplásmica de la proteína. Esto, junto con el alineamiento de la secuencia de Gbp2p (residuos del 14-20) y el sitio de reconocimiento de Sky1p para Npl3p (Fig. 8, parte inferior), sugiere que Sky1p podría fosforilar sólo el residuo de serina de la posición 17 en Gbp2p. Además, el alineamiento de Gbp2p y Npl3p sugiere un sitio específico de reconocimiento de Sky1p con el consenso: R(E/S)RSP(T/V)R (Fig. 8), que es ligeramente diferente al sitio de reconocimiento de SRPK de mamíferos. Por lo tanto, se cree que Gbp2p requiere una fosforilación inicial del residuo de serina en la posición 15 para que Sky1p sea capaz de utilizar Gbp2p como sustrato.



**Figura 8.** Secuencia aminoacídica del dominio RGG de Gbp2p (modificada de Windgassen y Krebber, 2003).

La interacción entre Gbp2p y el ARNm en el núcleo es dependiente de Mft1p y Hrp1p, dos componentes del complejo THO, responsables de la elongación de la transcripción (Häcker y Krebber, 2004; Hurt *et al.*, 2004). Al igual que se ha descrito anteriormente para los complejos con Npl3p, para la exportación al citoplasma es necesario el reclutamiento del receptor de exportación Mex67p al complejo Gbp2p/RNPm (Gilbert y Guthrie, 2004). Mex67p forma un receptor heterodimérico con la proteína Mtr2p y que es necesario para la exportación (Yao *et al.*, 2008, 2007; Senay *et al.*, 2003). Sorprendentemente, en cepas mutadas en el receptor Mex67p la deslocalización de Gbp2p no es muy pronunciada. En ambos casos, cepa silvestre y mutada, Gbp2p está atrapada en el núcleo en aproximadamente el



## Introducción

---

40% de las células, por lo que se podría especular sobre la existencia de otros factores de exportación específicos de Gbp2p que quedan por identificar (Windgassen y Krebber, 2003). Una vez en el citoplasma al igual que Npl3p, Gbp2p se disocia del ARNm que está siendo traducido por la acción de Mtr10p por un mecanismo independiente de Sky1p (Windgassen *et al.*, 2004).

La concentración intracelular de Gbp2p es crucial, ya que su sobre-expresión es tóxica (Häcker y Krebber, 2004; Lukasiewicz *et al.*, 2007a) y tiene como resultado la exportación defectuosa del ARNm (Sträßer *et al.*, 2002).

Los dos sustratos de Sky1p, Npl3p y Gbp2p, tienen en común que se distribuyen entre el núcleo y el citoplasma, pero cuando están mutadas en sus dominios RS (Windgassen y Krebber, 2003; Gilbert *et al.*, 2001) su localización mayoritaria se desplaza hacia el citoplasma.

#### **4. SKY1 Y RESISTENCIA A ESPERMINA.**

Las poliaminas, espermidina, espermina y su precursor putrescina son policationes alifáticas presentes de manera generalizada en todas las células. Tienen un peso molecular bajo, una estructura química simple (aminas alifáticas) y son cationes altamente cargados en condiciones fisiológicas. Las poliaminas son esenciales para el mantenimiento del crecimiento celular, la supervivencia y para la biosíntesis macromolecular, probablemente mediante la interacción con ácidos nucleicos, proteínas y membranas a través de interacciones iónicas. Además están involucradas en muchas funciones celulares, incluyendo la estructura de la cromatina, la expresión génica, la transcripción, transducción de señales, el crecimiento celular, la regulación del ciclo celular, proliferación, estabilidad de la membrana, canales iónicos y la señalización celular (Johnson, 1996; Williams, 1997; Morgan, 1999; Igarashi y Kashiwagi, 2000; Bachrach *et al.*, 2001; McCormack y Jonson, 2001; Thomas y Thomas, 2001; Urdiales *et al.*, 2001). La concentración intracelular de las poliaminas está altamente regulada por enzimas implicadas en su síntesis y catabolismo (Pegg, 1988) y sin embargo, la maquinaria que regula su transporte a través de la membrana plasmática es, en su mayor parte, desconocida. La acción de las enzimas que sintetizan y catabolizan las poliaminas es extremadamente importante para mantener la concentración óptima necesaria para las funciones celulares básicas y la viabilidad. Los niveles de poliaminas están fuertemente regulados, ya que bajos niveles no permiten el crecimiento celular, mientras que una acumulación intracelular excesiva de putrescina, como resultado de la mayor absorción del medio o

## Introducción

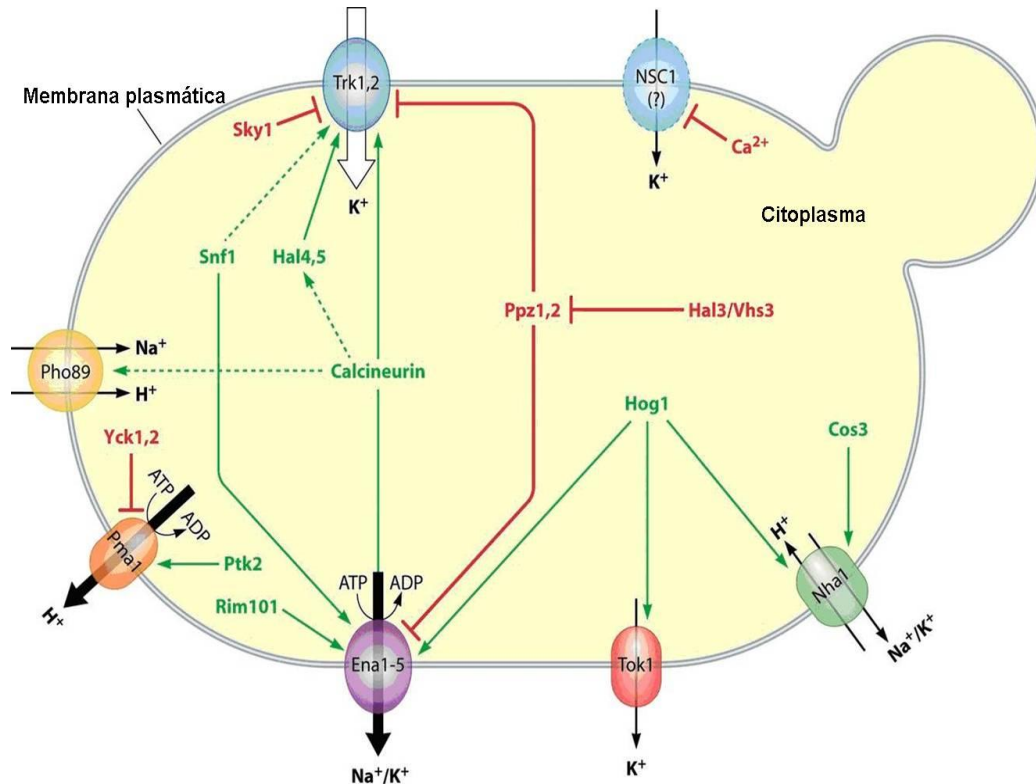
---

debido a la síntesis intracelular aumentada, provoca la apoptosis (Tobias y Kahana, 1995; Xie *et al.*, 1997; Tome *et al.*, 1997).

El potencial de la membrana plasmática es un factor clave que afecta a al transporte de diversos solutos. Los principales factores determinantes del potencial de la membrana plasmática de *S. cerevisiae* son la bomba de protones Pma1p, una H<sup>+</sup>-ATPasa generadora del potencial de membrana, y los transportadores Trk1p y Trk2p que constituyen el principal sistema de alta afinidad de captación de K<sup>+</sup>, consumiendo el potencial de membrana. Pma1p bombea protones fuera de la célula de modo que juega un papel esencial en el mantenimiento del pH intracelular, así como el establecimiento del gradiente electroquímico, que es la fuerza motriz necesaria para el transporte de muchos nutrientes en la célula (Vallejo y Serrano, 1989). Los transportadores Trk1p, Trk2p utilizan el potencial de membrana generado para el transporte de K<sup>+</sup> al interior de la célula (Madrid *et al.*, 1998). Se supone que la actividad relativa de estos dos sistemas establece el valor de equilibrio del potencial electroquímico de membrana que a su vez regula la actividad de sistemas de transporte secundarios, tales como los implicados en la absorción de nutrientes y varios cationes incluidas las poliaminas.

Pma1p está regulado positivamente por Ptk2p, una proteín-quinasa serina/treonina, través de fosforilación (Goossens *et al.*, 2000). El sistema Trk1p, Trk2p está regulado positivamente por las quinasas Hal4p y Hal5p (Mulet *et al.*, 1999), y se ha sugerido que se regula negativamente por la serina/treonina proteín-quinasa Sky1p (Forment *et al.*, 2002). Tanto Sky1p como Ptk2p están involucradas en la regulación de la captación y la tolerancia a poliaminas, ya que células con deleciones en los genes correspondientes pueden crecer en altas concentraciones de espermina (Nozaki *et al.*, 1996; Erez y Kahana, 2001), mientras que la sobre-expresión del gen *SKY1* en células de tipo silvestre aumenta su sensibilidad a esta poliamina (Erez y Kahana, 2001). Además de la tolerancia a espermina, las células  $\Delta sky1$  tienen aumentada su tolerancia a los iones de litio y sodio (Erez y Kahana, 2001; Kaouass *et al.*, 1997) (Fig.9).

## Introducción



**Figura 9.** Red de regulación de los transportadores catiónicos de la membrana plasmática de *S. cerevisiae*. Las líneas discontinuas indican interacciones no documentadas totalmente (Ariño *et al.*, 2010).

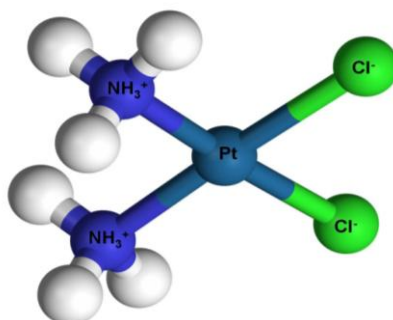
El papel de Sky1p en la tolerancia a cationes y la homeostasis de potasio no está claro. Algunos datos, basados en análisis genéticos y mediciones de absorción de Rb<sup>+</sup>, indican que Sky1p modula los transportadores Trk1p y Trk2p (Forment *et al.*, 2002). Por el contrario, otros autores defienden un papel de Sky1p independiente del sistema Trk1-2 (Erez *et al.*, 2002), y proponen la implicación de Nha1p (anti-transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de la membrana plasmática) y Kha1p (anti-transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de la membrana del Aparato de Golgi), y del canal Tok1p (canal de la membrana plasmática que media el flujo de K<sup>+</sup> al exterior de la célula). Curiosamente, se ha observado que la sobre-expresión de Sky1p aumenta la sensibilidad a LiCl, y que ésta depende de la integridad de Ppz1p, proteína fosfatasa Ser/Thr, pero no de la del transportador de cationes Ena1p (Erez y Kahana, 2001). Ppz1p regula la expresión del gen *ENA1* y la actividad de las proteínas transportadoras Trkp, lo que apoya la idea de que Sky1p ejerza un papel regulador de los sistemas de captación de K<sup>+</sup> (Ariño *et al.*, 2010).

## Introducción

---

### 5. SKY1 Y RESISTENCIA A CISPLATINO.

El cisplatino, cis-diaminodichloroplatinum (II), es un compuesto de platino con fórmula  $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ . Estructuralmente es un complejo plano-cuadrado neutro de platino (Fig. 10) utilizado para el tratamiento de numerosos tipos de cáncer. La quimioterapia basada en platino es curativa en la mayoría de los pacientes con cáncer en estado avanzado de testículo (Einhorn, 2002) y activa frente a cáncer de ovario, vejiga, cuello uterino, cabeza y cuello y cáncer de pulmón (Pérez, 1998; Lokich y Anderson, 1998).



**Figura 10.** Molécula de cisplatino.

Fue sintetizado por primera vez en 1845 por Michel Peyron, por lo que durante cierto tiempo se llamó “sal de Peyron”. Su estructura fue descrita en 1893 por Alfred Werner.

En 1965, un artículo publicado en la revista *Nature* titulado "La inhibición de la división celular en *Escherichia coli* por los productos de la electrólisis de un electrodo de platino", llevó a la conclusión de que el cisplatino inhibe la división celular en bacterias. Cuando se trataba con este compuesto, la bacteria *E. coli* alcanzaba hasta 300 veces su tamaño, pero era incapaz de dividirse. Posteriormente se demostró la eficacia del compuesto contra sarcomas artificialmente implantados en ratas, revelando que el cisplatino era uno de los compuestos más efectivos a la hora de tratar el cáncer en humanos y llegando así a formar parte de uno de los tratamientos con mejores resultados y más usados en quimioterapia.

El cisplatino se inyecta por vía intravenosa y una vez en el suero sanguíneo se cree que entra en las células, dada su carga total neutra, por difusión pasiva a través de la membrana celular, ya que su captación es lineal, no saturable y no se observa competencia con análogos de platino (Sherman *et al.*, 1985; Eastman, 1990; Kerr *et al.*, 1994; Sedletska y Giraud-Panis, 2005).

## Introducción

Una vez en el interior de la célula, uno de los átomos de cloro del cisplatino se reemplaza por una molécula de agua, formando el catión  $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_2\text{Cl}]^+$ ; que al estar cargado positivamente no puede salir de la célula. Este catión puede reaccionar con las macromoléculas intracelulares originando aductos con proteínas, ARN y ADN (Kartalou y Essigmann, 2001). Se cree que el ADN es la diana principal del cisplatino, de modo que, el átomo de platino forma enlaces covalentes con la posición N7 de las bases de purina para formar entrecruzamientos 1,2 ó 1,3 intra-hebra y en menor porcentaje, entrecruzamientos entre hebras (Sedletska y Giraud-Panis, 2005; Jamieson y Lippard, 1999; Eastman, 1987). Estas uniones hacen que la cadena de ADN se distorsione y este cambio es reconocido por el sistema de reparación de errores de emparejamiento (MMR). Las proteínas del sistema MMR reconocen los aductos de cisplatino en la cadena molde, y tratan de reparar el "daño" en la cadena de nueva síntesis. Puesto que no hay una base correcta que se pueda incorporar (complementaria al aducto de cisplatino) se inicia un ciclo inútil de reparación. Esta reparación recurrente mal dirigida puede causar la acumulación de cadenas rotas que pueden generar una detención del ciclo celular y/o una señal de apoptosis (Kartalou y Essigmann, 2001; Sedletska *et al.*, 2007; Yamada *et al.*, 1997; Fourrier *et al.*, 2003; Papouli *et al.*, 2004).

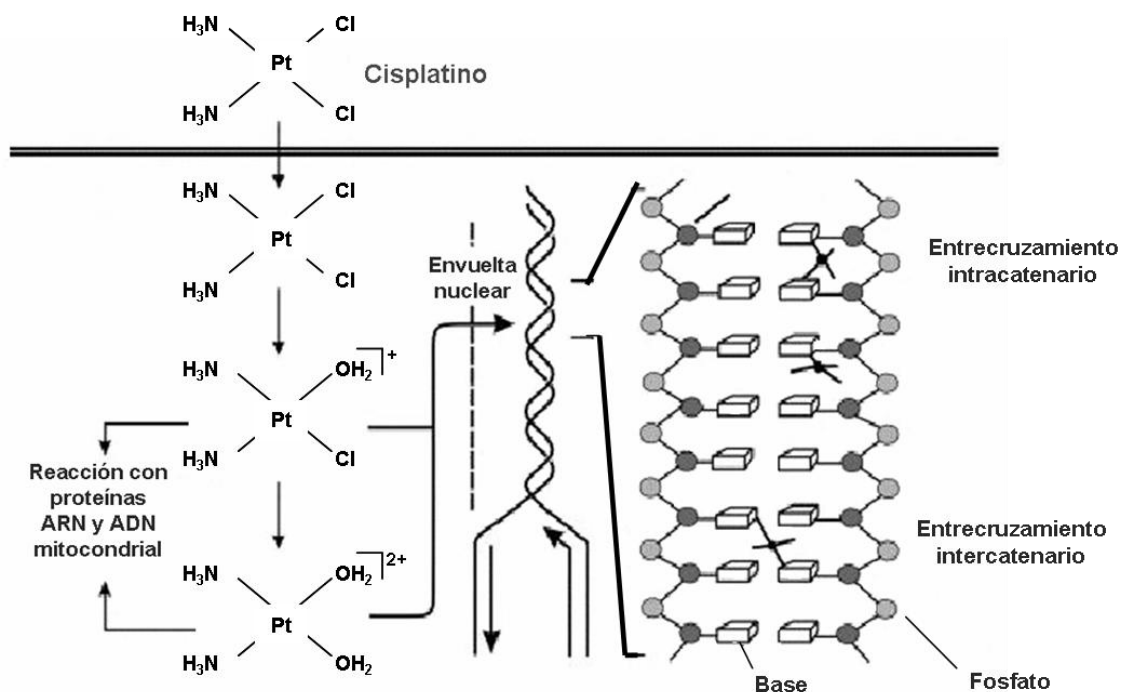


Figura 11. Formación de aductos de cisplatino (modificada de Kartalou y Essigmann, 2001).

## Introducción

---

Lamentablemente, con frecuencia tiene lugar resistencia celular al cisplatino, ya sea en el inicio del tratamiento o por recaída, lo que limita seriamente su potencial terapéutico (Pérez, 1998; Niedner *et al.*, 2001). Los estudios *in vitro* han puesto de manifiesto numerosos mecanismos de resistencia, incluyendo la desintoxicación por el glutatión o metalotioneínas, defectos en el gen p53 o incrementos en la reparación del ADN, una mayor tolerancia al cisplatino, aberraciones en las vías de la modulación de la muerte celular programada y señales anti-apoptóticas (Pérez, 1998; Niedner *et al.*, 2001; Kelland, 2007). Por lo tanto, la acumulación de muy distintos cambios genéticos puede contribuir al fenotipo de resistencia a cisplatino. Desafortunadamente, los mecanismos de resistencia identificados hasta el momento no explican satisfactoriamente la falta de respuesta de tumores específicos a la quimioterapia basada en cisplatino (Schenk *et al.*, 2003).

La levadura *S. cerevisiae* se ha utilizado como sistema modelo para identificar los genes eucariotas relacionados con la sensibilidad o la resistencia a cisplatino (Burger *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2005). Los mecanismos moleculares que causan estos fenotipos y las interconexiones entre las diferentes respuestas provocadas en los mutantes son conocidas sólo para un número limitado de genes, mientras que la mayoría sigue siendo objeto de estudio.

En la búsqueda de genes funcionales cuya eliminación confiere resistencia celular a cisplatino se encontró una resistencia de 4 veces relacionada con la interrupción del gen *SKY1* (Schenk *et al.*, 2001). Debido a que la sobre-expresión constitutiva de *SKY1* a partir de un vector de alto número de copias intracelulares origina células de levadura mucho más sensibles a cisplatino en comparación con una cepa control, puede considerarse *SKY1* un gen de sensibilidad a cisplatino (Schenk *et al.*, 2002). Después del tratamiento con cisplatino los niveles de ARNm de *SKY1* no varían, lo que sugiere que su expresión/actividad debe estar regulada a otro nivel, ya sea por autofosforilación o por otras modificaciones post-traduccionales dependientes de otros factores (Schenk *et al.*, 2001). No se observó ni una menor acumulación intracelular de cisplatino ni menor platinación del ADN en células  $\Delta sky1$ , por lo que la resistencia a cisplatino del nulo no puede atribuirse probablemente a alteraciones importantes en los componentes específicos de la pared celular, a cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática, a una importación nuclear defectuosa o a la reducción en la formación de aductos intracatenarios con el ADN (Pratt *et al.*,

## Introducción

---

1994; Johnson *et al.*, 1998; Schenk *et al.*, 2002). Además, las células  $\Delta sky1$  presentan un fenotipo hiper-mutador, lo que sugiere que Sky1p podría desempeñar un papel importante en la regulación de determinadas vías de reparación del ADN (Schenk *et al.*, 2002).

La proteína SRPK1, homóloga en humanos de Sky1p, se encuentra predominantemente en el testículo, donde fosforila la protamina 1, así como otras proteínas SR citoplásmicas (Papoutsopoulou *et al.*, 1999). Las protaminas son pequeñas proteínas muy básicas que sustituyen a las histonas durante la espermatogénesis, lo que tiene como resultado una extrema condensación de la cromatina (Oliva y Dixon, 1991). En *S. cerevisiae* Sky1p es un regulador clave de transporte hacia el interior de las poliaminas, (Erez y Kahana, 2001) y se ha sugerido que SRPK1 podría tener un papel en la espermatogénesis mediante la regulación directa o indirecta de las concentraciones intracelulares de poliaminas (Schenk *et al.*, 2004). La inactivación de SRPK1 usando oligodesoxinucleótidos antisentido dirigidos contra el sitio de iniciación de la traducción de su ARNm induce resistencia a cisplatino en una línea celular cancerígena de ovario humano y la expresión heteróloga de SRPK1 es capaz de complementar el fenotipo resistente a cisplatino de una cepa de levadura  $\Delta sky1$  (Schenk *et al.*, 2001).

Basándose en los datos de citotoxicidad y en la constatación de que las células  $\Delta sky1$  muestran un fenotipo hiper-mutador, algunos autores proponen que Sky1p podría desempeñar un papel importante en la reparación de apareamientos erróneos (MMR), la reparación por escisión de base (NER) y/o vías Rev3p-dependientes; los genes *REVS* de levaduras codifican la subunidad catalítica de la ADN polimerasa zeta ( $\zeta$  pol), una polimerasa de la familia B que lleva a cabo la síntesis de ADN en células mutadas (Sakamoto *et al.*, 2007). La interrupción de *SKY1* por lo tanto, daría lugar a la desregulación de los mecanismos de reparación y/o tolerancia a cisplatino y, en consecuencia, conducir a la alteración de la sensibilidad al fármaco.

Una de las funciones de Sky1p en la respuesta a fármacos antiproliferativos podría ser la de disminuir el procesamiento del ARN, debido a su efecto sobre la translocación del ARN desde el citoplasma al núcleo (Siebel *et al.*, 1999), lo que puede conducir a la inhibición del crecimiento o incluso la muerte celular (Schenk *et al.*, 2001).

### 6. ESTRÉS OXIDATIVO Y RESPUESTA CELULAR A CISPLATINO.

Los organismos aeróbicos se caracterizan por el uso de oxígeno molecular como aceptor final de electrones en la respiración. En la membrana interna de la mitocondria los complejos respiratorios transportan los electrones y los protones desde FADH y NAD(P)H al oxígeno, produciendo H<sub>2</sub>O. Este mecanismo está acoplado a la generación de energía, pero la reducción incompleta de O<sub>2</sub> provoca la aparición de especies reactivas del oxígeno (ROS), como el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el radical hidroxilo (OH<sup>-</sup>) y el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Las especies reactivas del oxígeno, ROS son altamente reactivas en la célula e interactúan con los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, causando así un amplio espectro de daños. El aumento del nivel de ROS en el estado de equilibrio conduce al estrés oxidativo (Lushchak, 2011) y estimula los sistemas de defensa. A lo largo de la evolución los organismos aeróbicos han desarrollado diversas estrategias antioxidantes. Muchas proteínas tienen la función de eliminar ROS o son capaces de corregir el daño causado por estos.

*S. cerevisiae*, presenta un metabolismo predominantemente fermentativo en condiciones aeróbicas y se considera un modelo eucariota para explorar el complejo mecanismo de respuesta frente a estrés oxidativo (Li *et al.*, 2009; Lushchak, 2010, 2011). En los organismos aeróbicos hay múltiples conexiones entre la respuesta a estrés oxidativo y cambios en las vías metabólicas relacionadas con la producción de energía y la utilización del oxígeno. Además de los oxidantes, como el peróxido de hidrógeno o menadiona, los metales u otros compuestos que contienen metales, como el cisplatino, también inducen la respuesta a estrés oxidativo en las células de levaduras (Martins *et al.*, 2008; Thorsen *et al.*, 2009).

El uso clínico del cisplatino está altamente limitado por su nefrotoxicidad y hepatotoxicidad, efecto causado por el daño mitocondrial inducido por el cisplatino a través de estrés oxidativo generado en las células (Iraz *et al.*, 2006; Mansour *et al.*, 2006; Pratibha *et al.*, 2006; Satoh *et al.*, 2000). En ratas, se ha observado disfunción mitocondrial en el riñón y el hígado tras el tratamiento con cisplatino acompañada de deterioro de la estructura mitocondrial, agotamiento del sistema de defensa antioxidante y la muerte celular por apoptosis (Santos *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2008). En ratas, el tratamiento con cisplatino produce también incremento de la actividad lactato deshidrogenasa y fosfatasa ácida. Sin embargo, las actividades de la malato deshidrogenasa, glucosa-6-fosfatasa, superóxido dismutasa y la catalasa (CAT), así como el transporte de fosfato disminuyen significativamente (Khan *et al.*, 2009).



## Introducción

---

Son numerosas las publicaciones en las que se prueban diferentes antioxidantes para proteger a las células contra el daño oxidativo causado por el cisplatino. Su uso en pacientes representa una posible estrategia para minimizar la nefrotoxicidad inducida por este agente antitumoral. Por ejemplo, la dimetil tiourea (DMTU), que elimina radicales hidroxilo, muestra un efecto protector contra las alteraciones inducidas por cisplatino en las mitocondrias renales (Santos *et al.*, 2008). El consumo de té verde aumenta la actividad de las enzimas de defensa frente al estrés oxidativo (Khan *et al.*, 2009). El carvedilol, un beta-bloqueante con fuertes propiedades antioxidantes, previene la peroxidación de los lípidos, la oxidación de la cardiolipina, la oxidación de proteínas sulfhidrilo y el agotamiento de las defensas antioxidantes no enzimáticas (Rodrigues *et al.*, 2011).

La producción de ROS en células eucariotas se caracteriza también por su capacidad para causar daño al ADN. La tripeptidil peptidasa II (TPPII), una serín peptidasa del citoplasma, se transporta al núcleo de la mayoría de las líneas celulares tumorales en respuesta a irradiación gamma (productora de daño en el ADN) y la producción de ROS. También después del tratamiento con varios tipos de drogas que dañan el ADN como el cisplatino (Preta *et al.*, 2010). Esto demuestra su participación en los mecanismos de respuesta, aún no bien conocidos, provocados por los distintos tratamientos y sugiere conexiones comunes entre la producción de ROS y el daño en el ADN. Los antioxidantes son también capaces de evitar daños en el ADN. Así, la luteína, el segundo carotenoide más frecuente en el suero humano y también abundante en verduras de color verde, reduce la formación de enlaces cruzados y la inestabilidad cromosómica inducida por el cisplatino (Serpeloni *et al.*, 2010). La luteína también aumenta los niveles de glutatión (GSH), sin afectar la actividad de catalasa (CAT) (Serpeloni *et al.*, 2010).



## **OBJETIVOS**



## Objetivos

---

El cisplatino produce numerosos cambios en la célula que determinan su citotoxicidad. Algunas reacciones producidas como consecuencia de la acción de este compuesto resultan en el desarrollo de resistencia frente a él y por lo tanto producen un efecto no deseado para su uso como fármaco en la quimioterapia frente al cáncer.

En este trabajo nos propusimos utilizar un modelo de levadura para profundizar en el estudio de la relación existente entre los genes *IXR1* y *SKY1*, ambos previamente implicados en la respuesta al fármaco. También nos propusimos averiguar qué mecanismos moleculares de sensibilidad y resistencia a cisplatino son dependientes de la función de *SKY1* mediante análisis basados en técnicas de transcriptómica y proteómica.

Con este fin planificamos los siguientes objetivos:

1.- Construcción de un doble nulo  $\Delta sky1 \Delta ixr1$  para comprobar si existe una relación epistática entre ambos genes o, por el contrario funcionan a través de mecanismos independientes. Este estudio se planteó de una forma comparativa en tres fondos genéticos distintos utilizando las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741, W303 y BWG1-7a.

2.- Análisis comparativo de la sensibilidad de las tres cepas utilizadas, y sus derivados  $\Delta sky1$ ,  $\Delta ixr1$  y  $\Delta sky1 \Delta ixr1$  a cisplatino y a espermina.

3.- Análisis de las variaciones producidas en el proteoma de *S. cerevisiae* por tratamiento con cisplatino, la delección de *SKY1* o la combinación de ambos factores, utilizando para ello extractos enriquecidos en fosfoproteínas, ya que la proteína codificada por *SKY1* tiene actividad quinasa.

4.- Análisis mediante métodos genómicos de las modificaciones producidas en el transcriptoma de *S. cerevisiae* como consecuencia de la delección del gen *SKY1* y el tratamiento con cisplatino, así como el papel de *SKY1* en ésta respuesta frente al fármaco.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**





### 1. MATERIAL BIOLÓGICO.

#### 1.1 Líneas bacterianas.

A continuación se describe la línea bacteriana de *Escherichia coli* empleada en este trabajo para la amplificación del plásmido utilizado YEplac195 (Tabla 1).

**Tabla 1.** Línea bacteriana empleada.

Cepa	Genotipo	Referencia
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> <i>[F'proAB lac<sup>r</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]<sup>f</sup></i>	Stratagene Cloning Systems

Esta cepa bacteriana transformada con el plásmido empleado a lo largo de esta Tesis, contiene genes marcadores de resistencia a ampicilina por lo que se conservó en placas de medio LB (ver medios de cultivo para bacterias) suplementado con ampicilina y sembrada en estría a 4°C tras haber sido cultivada a 37°C durante un día. Se resembró periódicamente cada dos meses.

Para el mantenimiento de las cepas transformadas a largo plazo, las bacterias se inocularon en medio líquido LBA y se dejaron crecer en agitación a 37°C, añadiéndose al día siguiente glicerol estéril hasta el 15% y congelando inmediatamente las muestras en tubos de polipropileno de 1,5 mL a -80°C.

## Materiales y métodos

### 1.2. Líneas de levaduras.

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* empleadas fueron las descritas a continuación (Tabla 2).

**Tabla 2.** Listado de cepas de *S. cerevisiae* empleadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Referencia
<b>BWG1-7a</b>	<i>MATa ade1-100 leu2-2 ,112 his4-519 ura 3-52</i>	Zhang y Guarente, 1994.
<b>W303</b>	<i>MATa ade2-1 can1-100 leu2-3 ,112 trp1-100 ura 3-52</i>	Davies y Rine, 2006.
<b>BY4741 (Y00000)</b>	<i>MATa his3-1 leu2-0 met 15-0 ura 3-0</i>	Obtenida de Euroscarf*
<b>W303<math>\Delta</math>ixr 1</b>	<i>MATa ade2-1 can1-100 leu2-3 ,112 trp1-100 ura 3-52 YKL032c::kanMX4</i>	Cedida por Ángel Vizoso Vázquez
<b>BWG1-7a<math>\Delta</math>ixr 1</b>	<i>MATa ade1-100 leu2-2 ,112 his4-519 ura 3-52 YKL032c::kanMX4</i>	Cedida por Ángel Vizoso Vázquez
<b>BY4741<math>\Delta</math>ixr 1</b>	<i>MATa his3-1 leu2-0 met 15-0 ura 3-0 YKL032c::kanMX4</i>	Obtenida de Euroscarf
<b>BY4741<math>\Delta</math>sky1</b>	<i>Mat a; his3-1; leu2-0; met15-0; ura3-0; YMR216c::kanMX4</i>	Obtenida de Euroscarf

Nota: Euroscarf <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>

Las cepas de levaduras de *S. cerevisiae*, se conservaron en placas YPD o CM al 2% de glucosa (ver medios de cultivo para levaduras) a 4°C tras haber sido cultivadas a 30°C durante dos o tres días. Se sembraron periódicamente cada dos o tres meses. Para el mantenimiento de las cepas de levaduras a largo plazo se inocularon en medio YPD o CM, se dejaron crecer en agitación a 30°C, se les añadió glicerol estéril hasta un 50% y se congelaron a -80°C en tubos de polipropileno de 1,5 mL.

### 2. MEDIOS DE CULTIVO.

Seguidamente se describen los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de bacterias y levaduras. Para la preparación de medios sólidos se adicionó 1,5% de Bacto-Agar al correspondiente medio líquido, vertiéndose en placas cuando éste se encontraba a una temperatura de entorno a 65°C.

Todas las soluciones se esterilizaron en autoclave durante 20 min. a 121°C y 2Ba de presión.

### 2.1 Medios de cultivo para bacterias.

#### LB (Luria-Bertani).

Se trata de un medio general para crecimiento de bacterias (Tabla 3).

**Tabla 3.** Composición del medio LB (Luria-Bertani).

Compuesto	Cantidad para 100 mL
<i>Bacto-Tryptona</i>	1 g
<i>Bacto-Yeast-Extract</i>	0,5 g
NaCl	0,5 g
(Agar)	(1,5) g
Agua destilada	Hasta 100 mL

#### LBA (Luria-Bertani suplementado con ampicilina).

Se trata de un medio LB suplementado con una solución de ampicilina, (6-[D(-)-alpha-Aminophenylacetamido]-penicillanic acid sodium Salt de Roche Diagnostics Corporation) que permite el crecimiento de bacterias transformadas con plásmidos que les proporcionan resistencia a este antibiótico, ya que son portadores de un gen que codifica una enzima que es secretada al espacio periplásmico de la bacteria, donde cataliza la hidrólisis del anillo  $\beta$ -lactámico del antibiótico provocando la anulación de su toxicidad.

La solución de ampicilina se preparó a una concentración final de 40 mg/mL con agua destilada estéril y se conservó en alícuotas a una temperatura de -20°C. La concentración final de ampicilina en el medio LBA es de 40  $\mu$ g/mL.

#### SOC.

Se trata de un medio líquido empleado para la obtención de bacterias competentes (Tabla 4). Tras su preparación, el medio se esterilizó en autoclave.

**Tabla 4.** Composición del medio SOC.

Compuesto	Cantidad para 100 mL
Bacto-Tryptona	2 g
Bacto-Yeast-Extract	0,5 g
NaCl	58,4 mg
KCl	18,6 mg
Agua destilada	Hasta 100 mL

## Materiales y métodos

---

### 2.2 Medios de cultivo para levaduras.

#### YPD.

Medio general no selectivo para el crecimiento de levaduras (Tabla 5).

**Tabla 5.** Composición del medio YPD (*yeast extract, peptone, dextrose*).

Compuesto	Cantidad para 100 mL
Yeast Extract	1 g
Bacto-Peptona	2 g
Glucosa	2 g
(Agar)	(1,5) g
Agua destilada	Hasta 100 mL

#### YPD-Geneticina (Medio YPD suplementado con geneticina).

Consiste en un medio YPD al que se adicionó una solución de geneticina (G418 disulfate salt de Sigma Aldrich) preparada con agua destilada estéril y conservada en alícuotas a una temperatura de -20°C. Este antibiótico se caracteriza por ser inhibidor ribosomal de muchas células eucariotas.

Se añadió en los medios a una concentración final de 200 µg/mL (Kooistra *et al.*, 2004) a partir de una solución stock de 200 mg/mL en agua.

#### CM (Medio Completo).

Medio sintético utilizado para la selección de transformantes de levaduras mediante complementación de auxotrofías. El medio puede carecer de uno o varios aminoácidos en función de la selección que se vaya a realizar, o puede incluirlos todos, en cuyo caso se trataría de un medio completo no selectivo (Tabla 6).

La fuente de carbono habitualmente empleada fue glucosa al 2%.

## Materiales y métodos

**Tabla 6.** Composición del medio completo, CM.

Compuesto	Cantidad para 100 mL
Fuente de carbono (glucosa, fructosa,...)	2 g
Histidina**	4 mg
Adenina**	4 mg
Uracilo**	4 mg
Leucina**	4 mg
Tirosina**	4 mg
Triptófano**	3 mg
(Agar)	(1,5 g)
Mezcla de aminoácidos (Tabla 7)	0,5 mL
Agua destilada	Hasta 92,8 mL
YNB* (Tabla 8)	6,7 mL

\* Se añadió en condiciones estériles, después de la esterilización por separado del resto de los componentes, cuando el medio de cultivo alcanzó una temperatura de 60°C.

\*\* Se omitió el aminoácido utilizado como marcador auxotrófico.

**Tabla 7.** Composición de la mezcla de aminoácidos 200x para el medio CM.

Compuesto	Cantidad para 100 mL
Arginina	0,2 mg
Isoleucina	1,2 mg
Lisina	0,8 mg
Metionina	0,2 mg
Treonina	0,2 mg
Fenilalanina	1,2 mg
Agua destilada	Hasta 100 mL

La mezcla se esterilizó en autoclave y se guardó a 4 °C.

**Tabla 8.** Composición del YNB (*yeast nitrogen base*) para el medio CM.

Compuesto	Cantidad para 100 mL
Vitaminas (Tabla 9)	5 mL
Sales traza (Tabla 10)	10 mL
Fosfato potásico monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,5 g
Sulfato magnésico	0,75 g
Cloruro sódico	0,15 g
Cloruro cálcico	0,15 g
Agua destilada	Hasta 85 mL
Sulfato amónico	7,5 g

El sulfato amónico se añadió después de que el resto de componentes se encontraban disueltos. La mezcla se esterilizó en autoclave y se guardó a 4 °C.

## Materiales y métodos

**Tabla 9.** Composición de las vitaminas 300x para el YNB.

Compuesto	Cantidad para 100 mL
Biotina	0,06 mg
Pantotenato cálcico	12 mg
Ácido fólico	0,06 mg
Inositol	60 mg
Niacina	12 mg
Ácido p-Aminobenzoico	6 mg
Piridoxina	12 mg
Riboflavina	6 mg
Tiamina	12 mg
Agua destilada	Hasta 100 mL

Se guardó a -20 °C.

**Tabla 10.** Composición de las sales traza 150x para el YNB.

Compuesto	Cantidad para 100 mL
Ácido bórico	7,5 mg
Sulfato cúprico	0,6 mg
Ioduro potásico	1,5 mg
Cloruro férrico	3 mg
Molibdato sódico	3 mg
Sulfato de zinc	6 mg
Agua destilada	Hasta 100 mL

Se guardó a -20 °C.

### SD (Sintético Definido).

Medio sintético completo y mínimo, apropiado para el crecimiento de levaduras sin requerimientos nutricionales. La fuente de carbono empleada fue glucosa al 40%, El pH se ajustó a 6.5 (Tabla 11).

**Tabla 11.** Composición del medio completo, SD.

Compuesto	Cantidad para 100 mL
Fuente de carbono (glucosa) *	2 g
<i>Yeast Nitrogen Base</i> (Difco# 0919-15)	0,67g
Histidina	2 mg
Adenina	2 mg
Leucina	2 mg
Triptófano	2 mg
Agua destilada	100 mL

\* Se añadió en condiciones estériles, después de la esterilización por separado del resto de los componentes, cuando el medio de cultivo alcanzó una temperatura de 65°C.

### 3. MEDIDA DEL NÚMERO DE CÉLULAS.

#### 3.1 Método turbidimétrico: Espectrofotómetro.

La medición de la concentración de los cultivos se realizó con un espectrofotómetro, que mide la cantidad de luz que absorbe o transmite una solución o un cultivo líquido de células microbianas. Cuánto mayor masa de células tenga un cultivo, mayor será su turbidez, se transmitirá menos luz y la lectura en el espectrofotómetro será mayor. Para esto se tomaron 100  $\mu$ L de cultivo, y se llevaron a un volumen final de 1 mL con el medio de cultivo estéril correspondiente. Se eligió siempre esta dilución para facilitar los cálculos posteriores pues de este modo el valor de absorbancia obtenido se multiplicó por un factor de 10. Las mediciones se efectuaron en un espectrofotómetro de registro UV-1700 de *Shimadzu* utilizando cubetas desechables de 1 mL. Se midió la absorbancia de los cultivos a una longitud de onda de 600nm. La concentración real se calculó estableciendo la equivalencia 1 unidad  $A_{600} \approx 10^7$  células/mL.

### 4. VECTORES DE CLONACIÓN Y MARCADORES DE TAMAÑO MOLECULAR.

#### 4.1 Vector de clonación empleado.

**YEplac195** (Gietz y Sugino, 1988). Presenta el promotor y 438 pb del gen de la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* (*lacZ*) (Sambrook *et al.*, 1989),  $Amp^R$ , *URA3*,  $2\mu m$  de la levadura y el *ori* bacteriano (Fig. 12). Es un vector lanzadera que frecuentemente se emplea para la construcción de genotecas. En el presente trabajo se empleó para la construcción de casetes para la delección de genes con el módulo de auxotrofia *URA3*.

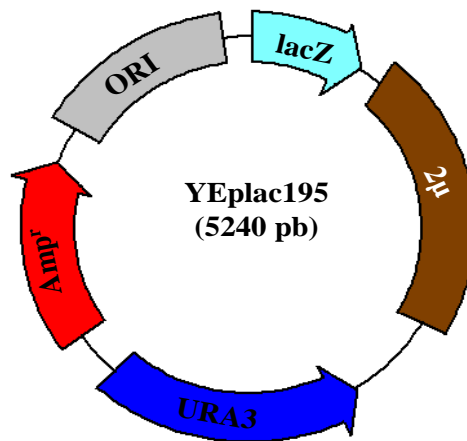


Figura 12. Esquema del vector Yeplac195.

### 4.2 Marcadores moleculares.

Para calcular los tamaños de los fragmentos de ADN digeridos y productos de PCR, empleamos como marcador el preparado comercial, *GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder* (Fermentas) que se muestra en la Figura 13.A.

Como referencia de tamaño de proteínas se utilizó el marcador de pesos moleculares de proteínas de amplio rango *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder™* (Fermentas) que se muestra en la Figura 13.B.

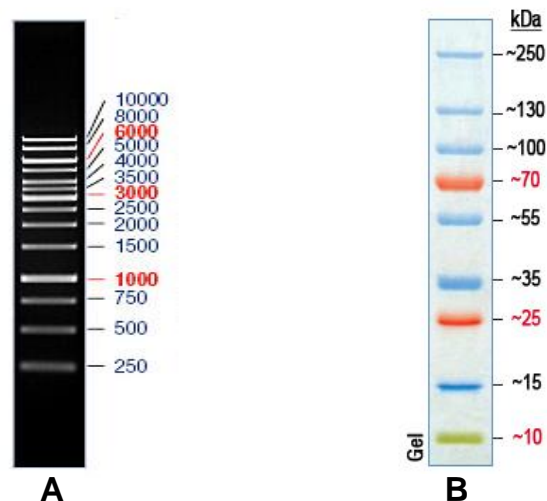


Figura 13. A.- Marcador de tamaño molecular para ADN. B.- Marcador de tamaño molecular para proteínas. Imágenes obtenidas de [www.Fermentas.com](http://www.Fermentas.com).



### 5. INTRODUCCIÓN DE ADN EN LAS CÉLULAS.

#### 5.1 Técnicas de transformación de bacterias.

##### Preparación de células competentes.

Se inoculó medio SOC (ver medios de cultivo) con un volumen adecuado de pre-inóculo, de modo que el cultivo de 300 mL de medio SOC se inició a una  $DO_{600}$  de 0,1.

Se incubó el cultivo a 37°C en agitación hasta alcanzar la DO deseada ( $OD_{600} \approx 0,5-0,6$ ). En ese momento, se introdujo el cultivo en hielo durante 10 min. para detener la división celular y, transcurrido ese tiempo, se vertió el cultivo en tubos de centrifuga estériles y previamente enfriados, tras lo que se realizó una precipitación durante 7 min. a 4500 x g. en una centrifuga refrigerada. Es importante que en todo momento las células se encuentren en un medio frío, por lo que se mantuvieron en un baño de hielo.

Descartado el sobrenadante, se añadió una pequeña cantidad de solución TFB-1 (Tabla 12), previamente enfriada, en cada tubo de centrifuga, se resuspendieron las células hasta que no se observó ningún grumo y se completó el volumen de TFB-1 hasta los 40 mL. Se mantuvo la suspensión en hielo durante 5 min. para permitir la actuación del TFB-1 y transcurrido este tiempo, se centrifugó a 4500 x g durante 7 min. Se descartó el medio dejándose únicamente las células y se añadió una pequeña cantidad de TFB-2 (Tabla 13), previamente enfriada, se resuspendieron las células hasta que no quedaron grumos y se completó el volumen con el TFB-2 restante.

Finalmente se repartió la mezcla celular en alícuotas de 100  $\mu$ L en tubos *Eppendorff* (previamente enfriados) que se mantuvieron en hielo seco hasta su almacenamiento definitivo a -80°C.

## Materiales y métodos

**Tabla 12.** Composición del tampón TBF-1 para la preparación de bacterias competentes.

Compuesto	Cantidades para 80 mL y un uso
RbCl <sub>2</sub>	0,964 g
MnCl <sub>2</sub>	0,788 g
Acetato potásico	0,232 g
Ca Cl <sub>2</sub>	0,116 g
Glicerol	12 mL
Agua bi-destilada	Hasta 80 mL

El tampón se esteriliza por filtración con filtros Minisart® para filtración estéril y ultrafiltración de líquidos: porosidad: 0,2 µm.

**Tabla 13.** Composición del tampón TBF-2 para la preparación de bacterias competentes.

Compuesto	Cantidades para 15 mL y un uso
RbCl <sub>2</sub>	20 mg
CaCl <sub>2</sub>	0,2 g
Glicerol	2,28 mL
Agua destilada	Hasta 15 mL

El tampón se esteriliza por filtración con filtros Minisart® para filtración estéril y ultrafiltración de líquidos: porosidad: 0,2 µm.

### Transformación de bacterias mediante choque térmico.

La transformación se llevó a cabo utilizando alícuotas de 100 µL de células competentes recién descongeladas a las que se añadió el volumen necesario de ADN plasmídico, que depende de la concentración del mismo, y se incubaron a 0°C durante 5 min. Transcurrido este tiempo, se sometieron las células a un choque térmico de 42°C durante 5 min. para luego añadirles 1 mL de medio LB e incubarlas a 37°C durante 1 hora. Pasado este tiempo, las células se precipitaron a 6.000 r.p.m. (Biofuge pico de Heraeus instruments, rotor 188 mm) durante 3 min., se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en un volumen de 100 µL de LB para sembrarlas finalmente en placas selectivas.

### 5.2 Técnicas de transformación de levaduras.

#### Método de acetato de litio modificado para la obtención de nulos por recombinación.

Para la transformación de levaduras por este método (Ito *et al.*, 1983), se tomó un cultivo de 10 mL a una  $DO_{600} \approx 0,6$  y se centrifugó a  $3.000 \times g$  durante 5 min. Las células precipitadas se resuspendieron en 1 mL de tampón Acetato de Litio-0,5x Tris 1M-EDTA 0,5M (LiAc-0,5xTE) (Tabla 14) y se pasaron a un tubo *Eppendorff* estéril. Se centrifugó 15 seg. a 13.000 r.p.m. (Biofuge pico de Heraeus instruments, rotor 188 mm) y se retiró el sobrenadante, tras lo que las células se resuspendieron en 200  $\mu$ L de tampón LiAc-0,5xTE y se dejaron reposar durante 10 min. a temperatura ambiente.

De la suspensión anterior se tomaron 100  $\mu$ L de células, para una transformación, se le añadieron 9  $\mu$ L de ADN procedente de PCR y la mezcla se agitó por inversión o pipeteo. Seguidamente se añadieron 5  $\mu$ L de ADN transportador o *carrier* (Tabla 15, Schiestl y Gietz, 1989), que en este caso era ADN de salmón que favorece la entrada del ADN en las células (*Sigma-Aldrich*), y se mezcló con la ayuda del vortex durante 4 seg. A continuación se añadieron 700  $\mu$ L de una solución estéril compuesta por LiAc, TE y PEG 3350 (Tabla 16). Se agitó nuevamente en el vortex y se incubó 30 min. a 30°C con agitación. Transcurrido este tiempo se añadieron 88  $\mu$ L de dimetil sulfóxido (DMSO) que incrementa la eficiencia de la transformación, y se efectuó una nueva incubación de 7 min. a 42°C sin agitación para inducir un choque térmico. Se precipitaron las células mediante centrifugación y se eliminó el sobrenadante, tras lo que se resuspendieron las células en 1 mL de YPD. Se incubaron las células durante 2 horas a 30°C en agitación. Se centrifugó nuevamente para eliminar el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 100  $\mu$ L de YPD para ser sembradas en las placas selectivas adecuadas y se dejaron crecer durante 2-3 días.

**Tabla 14.** Preparación del tampón AcLi-TE.

Compuesto	Volumen para 1 mL
Acetato de Litio 1 M	950 $\mu$ L
Tampón 10xTE (Tabla 17)	50 $\mu$ L

Las dos soluciones que lo componen se esterilizaron en autoclave por separado.

## Materiales y métodos

**Tabla 15.** Preparación del ADN transportador o *carrier* para la transformación de levaduras.

Compuesto	Cantidad para 1 mL
ADN de testículos de salmón	10 mg
Tampón 1xTE pH 8,0 (Tabla 17)	Hasta 1 mL

La solución una vez preparada se sometió a agitación fuerte y posteriormente a sonicación con una potencia de 14  $\mu$ A, en 15 pulsos de 1 min. Seguidamente se desnaturalizó a 95 °C durante 5 min.

**Tabla 16.** Preparación de la solución para la transformación.

Compuesto	Volumen para 700 $\mu$ L
PEG 3350 al 50% (P/V)	560 $\mu$ L
Tampón 1X TE (Tabla 17)	70 $\mu$ L
Acetato de Litio 1 M	70 $\mu$ L

Las tres soluciones que lo componen se esterilizaron en el autoclave por separado.

**Tabla 17.** Composición del tampón 50xTE

Compuesto	Volumen para 100 mL
Tris 1M pH 8,0	50 mL
EDTA 0,5 M pH 8,0	20 mL
Agua bi-destilada	30 mL

La mezcla se esterilizó en autoclave.

## 6. MANIPULACIÓN DE ADN.

### 6.1 Extracción de ADN plasmídico de bacterias.

Se utilizó el método de columnas de *GeneJET Plasmid Miniprep Kit<sup>TM</sup>* (Thermo Scientific). Se partió de un cultivo bacteriano iniciado el día anterior (12-16 horas) en medio LB suplementado con ampicilina. El cultivo puede ser en placa (máximo 1/4 de placa) o en medio líquido (máximo 10 mL).

Se raspó el sembrado de la placa con un palillo estéril y se resuspendió en 250  $\mu$ L de la solución de resuspensión. A continuación se añadieron 250  $\mu$ L de la solución de lisis y se mezcló mediante inversión repetida de los tubos hasta que la mezcla se observó viscosa y ligeramente transparente. Posteriormente se añadieron 350  $\mu$ L de la solución de neutralización y se mezcló el tubo por inversión. Se precipitaron los restos celulares y el ADN cromosómico mediante centrifugación a 13.000 r.p.m. (Biofuge pico de Heraeus instruments, rotor 188 mm) durante 5 min. El sobrenadante fue transferido a una columna del kit para centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 1 min. tras lo que se eliminó el líquido residual, y se lavó la columna con 500  $\mu$ L de solución de

## Materiales y métodos

---

lavado. Tras una centrifugación de 1 min. a 13.000 r.p.m. y eliminación de nuevo del líquido restante, se añadieron 500  $\mu$ L de solución de lavado. Centrifugación de 1 min. a 13.000 r.p.m., eliminación del tampón residual y nueva centrifugación de 1 min. para descartar los restos de la solución de lavado. A continuación la columna se colocó en un *Eppendorff* limpio y se añadieron 50  $\mu$ L de agua bi-destilada. Tras 2 min. de espera, se centrifugó 1 min. a 13.000 r.p.m. y se recogió la solución de ADN plasmídico.

### 6.2 Extracción de ADN en levaduras.

Se empleó el método de Hoffman y Winston, 1987. Para ello se partió de un cultivo de 10 mL en YPD de levaduras iniciado el día anterior (12-16 horas). Se centrifugó 5 min. a 3.000 x g. y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 500  $\mu$ L de agua bi-destilada que se transfirieron a un tubo *Eppendorff*. A continuación se centrifugaron durante 10 seg. a 13.000 r.p.m. (Biofuge pico de Heraeus instruments, rotor 188 mm), se eliminó el sobrenadante y se disgregó el precipitado agitando en vortex brevemente. Posteriormente se resuspendieron las células en 200  $\mu$ L de tampón de ruptura (Tabla 18) y 2  $\mu$ L de ARNasa 25 mg/mL (*Fermentas*). Se añadieron 0,3 gramos de perlas de vidrio de 425-600  $\mu$ m (Sigma), 200  $\mu$ L de PCIAXTE (Tabla 19) y se agitó en vortex durante 3 min. a baja velocidad (15-20 Hertz). A continuación se añadieron 200  $\mu$ L de tampón 1xTE (Tabla 17) y se agitó en el vortex brevemente. La suspensión se centrifugó 5 min. a 13.000 r.p.m. y temperatura ambiente, tras lo que se transfirió el sobrenadante a un tubo *Eppendorff* limpio. Después se añadió 1 mL de etanol al 95%, se mezcló por inversión y se dejó a temperatura ambiente durante 15 min., tras lo que se centrifugó durante 5 min. a 13.000 r.p.m. Se eliminó el sobrenadante resultante de la centrifugación, se añadió 1 mL de etanol al 75%, se mezcló por inversión y se mantuvo durante 10 min. a temperatura ambiente tras lo que se centrifugó nuevamente durante 5 min. a 13.000 r.p.m. y temperatura ambiente. Finalmente se eliminó el sobrenadante, se secó el ADN en una bomba de vacío y se resuspendió en 40  $\mu$ L de agua bi-destilada. Se conservó a 4°C.

## Materiales y métodos

**Tabla 18.** Composición de la solución de ruptura empleada en la extracción de ADN genómico de levaduras.

Compuesto	Volumen para 10 mL
Triton X-100 2%	200 $\mu$ L
SDS 1%	500 $\mu$ L de SDS 20%
NaCl 100 mM	200 $\mu$ L de NaCl 5 M
Tris-HCl 10 mM, pH 8,0	100 $\mu$ L de Tris-HCl 1 M, pH 8,0
EDTA 1 mM, pH 8,0	20 $\mu$ L de EDTA 0,5 M, pH 8,0

### PCIAxTE.

Se mezcló fenol líquido en una proporción 1:1 con cloroformo y se equilibró con 1xTE en una proporción 3:1 agitando vigorosamente durante varios minutos, tras los cuales se dejó la mezcla a temperatura ambiente y en oscuridad hasta el día siguiente en el que la fase acuosa se separó completamente y se retiró por aspiración. Se repitió el proceso dos veces más. Tras el último equilibrado se añadió 1/25 volumen de alcohol isoamílico a la mezcla. Se conservó en oscuridad a 4°C.

**Tabla 19.** Composición de la solución de PCIAxTE.

Compuesto	Volumen
Fenol	100 mL
Cloroformo	100 mL
1xTE (Tabla17)	200 mL
Alcohol isoamílico	8 mL

### 6.3 Medida de la concentración de ADN.

La medida de la concentración de ADN se realizó empleando el espectrofotómetro NanoPhotometer™ (IMPLEM), que permite la lectura de micro-volúmenes desde 0,3  $\mu$ L, utilizando un programa interno con protocolos ya establecidos para realizar las mediciones.

Se utilizaron entre 1-3  $\mu$ L de muestra para las mediciones y el protocolo para medición de ADN de doble cadena incluido en el programa, que mide la concentración y hace una valoración de la pureza de la muestra.

La relación  $A_{260}/A_{280}$  es un índice del grado de impurezas que contiene la muestra. La relación ideal se ajusta a un valor aproximado de 1,8 (Sambrook *et al.*, 1989).

### 6.4 Digestiones enzimáticas.

El ADN plasmídico fue digerido con endonucleasas de restricción (*Takara*) siguiendo las recomendaciones del fabricante en cuanto a los tampones y temperaturas de reacción e inactivación. El tiempo de digestión fue de 2-3 horas, según la cantidad de ADN a digerir.

### 6.5 Purificación y concentración de fragmentos de ADN.

Para la purificación y concentración de fragmentos de ADN, tanto provenientes de una separación mediante electroforesis en gel de agarosa, de una PCR o de cualquier otro origen, se utilizó el sistema de columnas con filtros de afinidad y tampones del kit *GeneJET™ PCR Purification Kit* (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit es capaz de retirar enzimas de restricción, polimerasas, cebadores y nucleótidos no incorporados durante la PCR, además de eliminar las sales y otros compuestos y contaminantes no deseados que pueden estar presentes en las soluciones de ADN.

Se midió el volumen de la suspensión de ADN y se añadió el mismo volumen de tampón de purificación. Se mezcló mediante pipeteo y se pasó a una columna que contiene un filtro de afinidad. A continuación se centrifugó la columna durante 1 min. a 13.000 r.p.m. (Biofuge pico de Heraeus instruments, rotor 188 mm), de modo que la solución atravesó el filtro y el ADN quedó retenido en él. Se desechó el eluido y se añadieron 700  $\mu$ L de tampón de lavado con etanol a la columna, tras lo que se centrifugó durante 1 min. a 13.000 r.p.m. Nuevamente se desechó el eluido y la columna se centrifugó en vacío a 13.000 r.p.m. durante 1 min. para eliminar los restos de tampón.

Finalmente se pasó la columna a un tubo limpio y se añadió el volumen deseado de agua bi-destilada estéril al filtro contenido en la columna (no menos de 30  $\mu$ L), se dejó que se empapara durante 1 min. y se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante otro minuto. En el agua se disuelve el ADN ya limpio.

### 6.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Hasta la década de 1980, el único método para obtener grandes cantidades de un fragmento de ADN era a través de la técnica de clonación *in vivo* en vectores adecuados, introduciéndolo y multiplicándolo en organismos como bacterias. Entre 1983 y 1986, Kary Mullis desarrolló una técnica que

## Materiales y métodos

permite, a partir de una cantidad muy pequeña de ADN, obtener millones de copias de un fragmento *in vitro*; en unas pocas horas y sin necesidad de usar células vivas. Esta técnica, denominada PCR (del inglés reacción en cadena de la polimerasa) se basa en la actividad de las enzimas ADN polimerasas termoestables, que en presencia de cebadores y desoxinucleótidos trifosfato, son capaces de amplificar la secuencia de ADN que se haya seleccionado, mediante una serie de reacciones cíclicas de replicación *in vitro*. En el presente trabajo se utilizaron la *Dream Taq ADN-polimerasa* y la *Pfu ADN-polimerasa* (Fermentas). En todos los casos se utilizó el tampón de reacción proporcionado por el fabricante y se siguieron las recomendaciones del mismo. Los cebadores empleados en cada proceso se listan en el correspondiente apartado de Resultados y fueron sintetizados por *Roche TIB-Mol* o *Isogen*.

En la Tabla 20 se describen las mezclas empleadas en las reacciones de PCR; los volúmenes de dNTPs, ADN molde y cebadores, que se ajustan en función de la concentración de ADN disponible y de la longitud del producto.

**Tabla 20.** Composición de la mezcla de reacción para PCR.

Compuesto	Volumen para 50 $\mu$ L
Tampón de la ADN Polimerasa 10x	5 $\mu$ L
Mezcla de dNTPs 2,5 mM	3,2 - 5 $\mu$ L
ADN molde	0,2 - 1 $\mu$ L
Cebadores 10 $\mu$ M	1 - 2 $\mu$ L
ADN polimerasa	0,8 - 1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O bi-destilada	Hasta 50 $\mu$ L

Los programas empleados para realizar las amplificaciones de ADN por PCR variaron tanto en la temperatura de hibridación como en el tiempo de elongación.

El esquema general de los ciclos fue el siguiente:

### Ciclos de PCR:

**Tabla 21.** Ciclos PCR.

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Acción
1	95°C	2 min.	Desnaturalización inicial
30	A.- 94°C	45 seg.	Desnaturalización
	B.- X°C	45 seg	Hibridación cebador-ADN molde (La temperatura depende de los cebadores empleados)
	C.- 72°C	X	Elongación (duración en función de la longitud de pares de bases, se toma como referencia 1 min. por cada 1.000 pares de bases).
1	72°C	10 min.	Elongación final



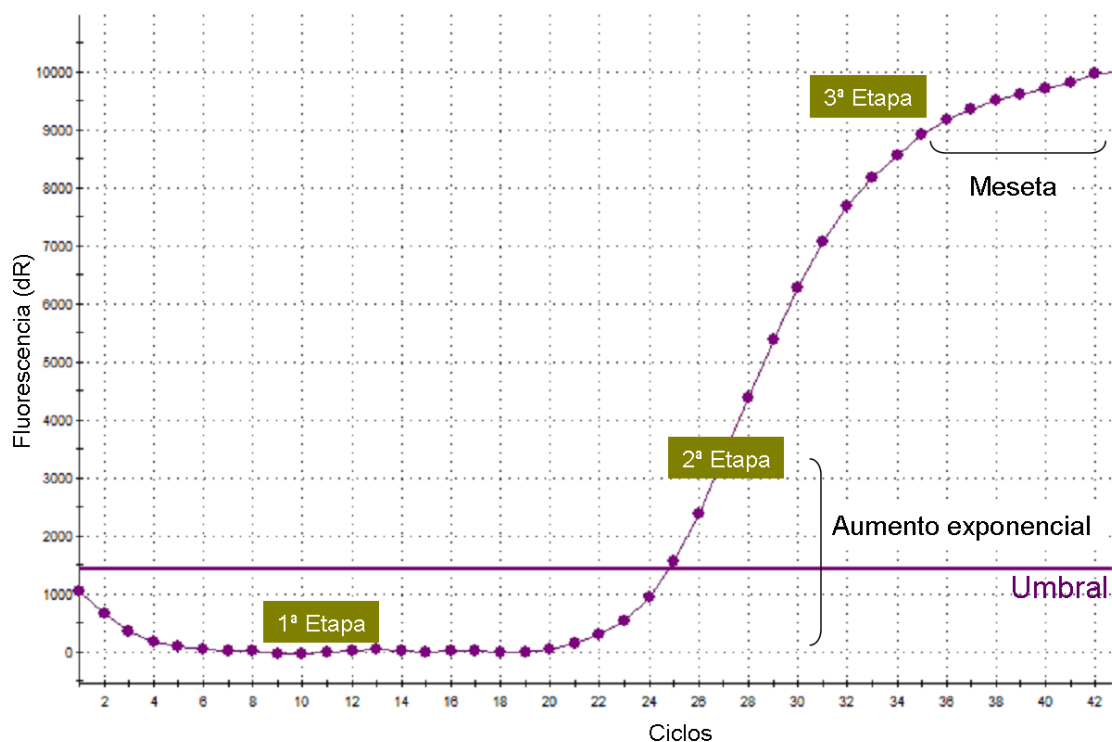
### 6.7 PCR cuantitativa (qPCR)

La PCR cuantitativa, descrita originalmente con el nombre de “Kinetic PCR” por Higuchi *et al.*, 1993, es una variante de la PCR convencional que se basa en la detección y cuantificación simultánea de la fluorescencia emitida por las moléculas de ADN o ADN complementario (ADNc) específicas que se acumulan durante el proceso de amplificación, lo que permite acceder a datos fiables y precisos sobre la expresión génica en las células (Heid *et al.*, 1996).

En la qPCR se suelen generar amplicones muy pequeños (desde 60 pb) lo que permite la detección de cambios cuantitativos en la expresión génica durante el curso de alteraciones celulares patológicas o experimentales, así como la cuantificación de niveles de ARNm en muestras de tejidos con ARN parcialmente degradado (Bustin, 2002). El producto de la PCR se mide al final de cada ciclo y los datos se analizan mediante un programa informático de modo que se puede calcular el número de copias de ARNm o la expresión génica relativa entre varias muestras (Heid *et al.*, 1996). Por esta razón la qPCR con transcriptasa inversa (RT-qPCR) es el método de elección para realizar un examen rápido y cuantitativo de la expresión de genes específicos, que no sería posible con otras metodologías (Walker, 2002).

El resultado de una qPCR se visualiza en un gráfico de amplificación. En él se expresa la fluorescencia leída por el termociclador en el eje de las ordenadas y el número de ciclos de la PCR en el eje de las abscisas. De esta forma, la curva de amplificación consta de una fase inicial donde la producción de fluorescencia (ADN producto) está por debajo del nivel de detección del termociclador, una segunda fase en la que se da un incremento de la fluorescencia, en forma exponencial en su inicio, y una tercera fase en meseta (*plateau*) donde finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia (Fig. 14). En este gráfico es posible establecer un valor de fluorescencia umbral que señala la zona de aumento exponencial. Este valor se representa en el gráfico con una recta horizontal (línea *Threshold* o Umbral).

## Materiales y métodos



**Figura 14.** Gráfico de amplificación de PCR a tiempo real con las tres fases de las que consta.

En el presente trabajo, la detección se basó en la utilización de un agente intercalante *SYBR Green I*, que se une a todas las secuencias de ADNc de doble cadena, tras lo que el fluorocromo emite una señal fluorescente que se procesa en tiempo real (Walker, 2002). Por lo tanto, un aumento del producto de la PCR conlleva un aumento de la fluorescencia detectada en cada ciclo de la PCR; permitiendo cuantificar las concentraciones ADNc (Ririe *et al.*, 1997).

Partimos de muestras de ARN obtenidas según se describe en el apartado 7 de Materiales y métodos. Se utilizó el kit comercial *KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR<sup>TM</sup>* (Kapa Biosystems), que es sensible y adecuado para el desarrollo de qPCR utilizando ARN como molde. Seguimos las indicaciones del fabricante realizando la mezcla de reacción para cada gen con las cantidades indicadas en la Tabla 22. Los cebadores empleados para cada gen seleccionado después del análisis de microarrays, se listan en el correspondiente apartado de Resultados y fueron diseñados con Universal ProbeLibrary Assay Design Center de Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, Indiana, USA ([https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=uplct\\_030000](https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=uplct_030000)) para generar amplicones de 60-85 pares de bases con una  $T_m$  de 59 - 60°C.

## Materiales y métodos

**Tabla 22.** Composición de la mezcla de reacción para qPCR.

Compuesto	Volumen para 10 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas	3.4 $\mu$ L
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X)	5 $\mu$ L
<i>Forward Primer</i> (10 $\mu$ M)	0,2 $\mu$ L
<i>Reverse Primer</i> (10 $\mu$ M)	0,2 $\mu$ L
KAPA RT Mix (50X)	0,2 $\mu$ L
Molde de ARN	1 $\mu$ L

El programa empleado para realizar las amplificaciones de ARN a ADNc mediante qPCR fue el indicado por el fabricante (Tabla 23).

**Tabla 23.** Ciclos de qPCR.

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Acción
1	42°C	5 min.	Síntesis de ADNc
1	95°C	5 min.	Inactivación de la RT
40	95°C	3 seg.	Desnaturalización
	60°C	20 seg.	Anillamiento y elongación

Se utilizó el programa ECO Real-Time PCR System (Illumina, Inc., San Diego, California, USA) y los cálculos se hicieron por el método 2- $\Delta\Delta$ Ct (Livak y Schmittgen, 2001). Los niveles de ARNm de los genes seleccionados fueron corregidos por la media geométrica de los niveles de ARNm de *HHO1*, *TAF10* y *ALG9* (*YPL127C*, *YDR167W* y *YNL219C*, respectivamente), genes que se comprobó previamente que estaban de manera constitutiva en las condiciones ensayadas y que no se ven afectados por la delección  $\Delta$ *sky1*. Se aplicó un t-test para evaluar las diferencias entre los valores  $\Delta$ Ct (valores Ct normalizados con los genes de referencia) del control y las muestras tratadas con un p-valor de 0.05.

### 7. OBTENCIÓN DE ARN.

El ARN es por lo general más sensible que el ADN a la degradación por nucleasas. Las nucleasas que actúan específicamente sobre el ARN, las ARNasas, son abundantes en las muestras biológicas y también están presentes en las manos y en general por toda la superficie de nuestro cuerpo. Además, muchas ARNasas son enzimas bastante estables y difíciles de inactivar, incluso esterilizando el material y las soluciones. Por esto, a la hora de trabajar con ARN, deben tomarse las máximas precauciones para evitar

## Materiales y métodos

---

contaminaciones con ARNasas y la degradación del ARN. Es importante trabajar en un ambiente libre de ARNasas, y debe tratarse todo el material para su eliminación. Deben usarse guantes a lo largo de todo el proceso.

### 7.1 Extracción de ARN de levaduras.

Se empleó el kit comercial *Aurum™ Total RNA Mini Kit* (Bio-Rad). Para ello se iniciaron los cultivos de levaduras a través de preinóculos en 10 mL de medio de cultivo SD puestos el día anterior (12-16 horas). A partir de estos se inocularon matraces de 250 mL de capacidad con 70 mL de medio SD a una  $DO_{600} \approx 0,1$ . Los cultivos se dejaron crecer en agitación a 30°C durante el tiempo necesario para que su  $DO_{600}$  fuera aproximadamente 0,6, momento en el que el cultivo se encuentra en fase exponencial de crecimiento y las células presentan mayor actividad metabólica. Además, durante esta fase, las células son más sensibles a las condiciones adversas, así como los fármacos, que ejercen su efecto al interferir en algunos pasos importantes del proceso de crecimiento y por lo tanto son más perjudiciales para las células durante esta fase.

Cuando el cultivo llegó a una  $DO_{600} \approx 0,6$ , se dividió en dos matraces de 100 mL de capacidad con 25 mL de cultivo; uno de ellos se utilizó como control, por lo que se añadió únicamente dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma), y el otro matraz se trató con una solución de cisplatino (cis-diaminodichloroplatinum de Sigma) en DMSO. La concentración final de cisplatino en el medio fue de 600  $\mu\text{M}$  (Tabla 24).

Tras realizar el tratamiento oportuno a cada cultivo, se incubaron a 30°C en agitación y oscuridad durante 4 horas. Transcurrido este tiempo se comprobó la densidad óptica de los cultivos.

Se procedió a la extracción de ARN con el kit, para lo que se tomó un volumen de cultivo en el que hubiera un número de células equivalente a una  $DO_{600} \approx 3$ , y se centrifugó durante 1 min. a 13.000 r.p.m. Se decantó el sobrenadante y se secó el tubo con papel para eliminar cualquier resto de medio.

A continuación se añadió 1 mL de lincasa (Tabla 25) equilibrada a 30°C, se pipeteó para resuspender el precipitado y se incubó durante 10 min. a temperatura ambiente, tras lo que se centrifugó durante 5 min. a 5.000 r.p.m. y se eliminó el sobrenadante. Seguidamente se añadieron 350  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis suplementado con  $\beta$ -mercaptoetanol al 1% y se mezcló con la pipeta. Se

## Materiales y métodos

---

añadieron 350  $\mu$ L de etanol al 70%, se homogeneizó la mezcla con pipeta y se transfirió la mezcla a una columna suministrada por el kit, a la que se une el ARN. Se centrifugó durante 30 seg. a 13.000 r.p.m. y se eliminó el filtrado recogido en el tubo colector.

Posteriormente se añadieron 700  $\mu$ L de solución de lavado de la columna de baja astringencia, se centrifugó la columna durante 30 seg. a 13.000 r.p.m. y se eliminó el filtrado. Con el fin de eliminar totalmente la solución de lavado, se realizó una segunda centrifugación de 2 min. a 13.000 r.p.m. Acto seguido se incubó la membrana durante 15 min. a temperatura ambiente con 80  $\mu$ L de una disolución de ADNasa (Tabla 27). Tras la incubación se añadieron 700  $\mu$ L de solución de lavado de alta astringencia, se centrifugó la columna durante 30 seg. a 13.000 r.p.m. y se eliminó el filtrado. A continuación se añadieron 800  $\mu$ L de solución de lavado de baja astringencia, se centrifugó la columna durante 1 min. y se eliminó el filtrado. Se centrifugó nuevamente la columna durante 2 min. para eliminar totalmente la solución de lavado.

Finalmente se transfirió la columna a un tubo *Eppendorff* suministrado por el kit y libre de ARNasas, se añadieron a la membrana 80  $\mu$ L de la solución de elución precalentada a 70°C, se mantuvo durante 1min. para saturar la membrana y se centrifugó durante 2 min.

Las muestras de ARN se conservaron a -80°C.

**Tabla 24.** Composición de la solución de cisplatino 6 mM.

Compuesto	Cantidad para 12 mL
Cisplatino	21.6 mg
DMSO	12 mL

Se añadieron 2,5 mL al cultivo a tratar.

**Tabla 25.** Composición de la solución con liticasa.

Compuesto	Cantidad para 40 mL
Liticasa 50 U/mL	0,0010 g
Sorbitol (1 M)	7,286 g
EDTA 0,1 mM	40 mL
$\beta$ -mercaptoetanol 0,1%	40 $\mu$ L

## Materiales y métodos

**Tabla 26.** Composición de la solución EDTA 0,1 M libre se ARNAsas.

Compuesto	Cantidad para 100 mL
EDTA	3,723 g
Agua tratada (Tabla 29)	100 mL

**Tabla 27.** Preparación de la solución de ADNasa.

Compuesto	Cantidad para 250 µL
ADNasa I (liofilizada)	1 Vial suministrado por el kit
Tris 10 mM, pH 7.5 (Tabla 28)	250 µL

**Tabla 28.** Composición de la solución para reconstituir la ADNasa.

Compuesto	Cantidad para 100 mL
Tris (10 mM, pH 7.5)	0,1211 g
Agua tratada (Tabla 29)	100 mL

**Tabla 29.** Preparación de agua tratada.

Compuesto	Volumen para 1 litro
Agua bi-destilada	999 mL
DEPC	1 mL

Después de mezclar el dietil pirocarbonato con el agua se dejó reposar durante una noche y se esterilizó en autoclave.

### 7.2 Medida de la concentración de ARN.

En el caso del ARN la concentración se suele medir a una longitud de onda de 280 nm. El cociente entre la absorbancia obtenida a 260 nm y la obtenida a 280 nm da una idea de la calidad del ARN. Normalmente se considera de buena calidad un ARN cuando el cociente de absorbancia 260nm/280nm se encuentra próximo a 2 (Sambrook *et al.*, 1989).

Las medidas fueron realizadas en un espectrofotómetro NanoPhotometer™ (IMPLEM).

Se utilizaron entre 1-3 µL de muestra para las mediciones y el protocolo para medición de ARN incluido en el programa que mide la concentración y hace una valoración de la pureza de la muestra.

### 8. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.

#### 8.1 Extracción de fosfoproteínas de levaduras.

Se iniciaron los cultivos mediante pre-inóculos en 20 mL de medio SD de cada una de las cepas que se dejaron crecer toda la noche (12-16 horas).

Al día siguiente se midió la densidad óptica de los pre-inóculos, se inocularon en matraces de 1.000 mL con 5000 mL de medio SD a una  $DO_{600}$  de 0,05, y se dejaron crecer a 30°C en agitación durante  $\approx$  14h.

Una vez transcurrido este tiempo se dividió cada uno de los cultivos en dos matraces de 500 mL con 250 mL de cultivo, uno de ellos se utilizó como control, por lo que se añadió únicamente DMSO, y el otro matraz se trató con una solución de cisplatino (cis-diaminodichloroplatinum) en DMSO. La concentración final de cisplatino en el medio fue de 600  $\mu$ M (Tabla 30).

Tras realizar el tratamiento oportuno a cada cultivo, se incubaron a 30°C en agitación y oscuridad durante 4 horas. A continuación se procedió a la extracción de las proteínas totales, para lo que se utilizaron las soluciones incluidas en el kit comercial *Pro-Q Diamond phosphoprotein Enrichment Kit* (Invitrogen) utilizado posteriormente para el aislamiento de fosfoproteínas.

Se precipitaron las células por centrifugación a 7.000 r.p.m. (Beckman Coulter, J2-21 Centrifuge, rotor de radio 371 mm.) durante 10 min. y 4°C. Una vez recogidas las células se resuspendieron en 1 mL de tampón de lisis (incluido en el kit) por gramo de peso húmedo. A continuación se distribuyó el volumen de cada cultivo en varios tubos *Eppendorff* con 1 mL de células cada uno, se les añadieron perlas de vidrio de 425-600  $\mu$ m, hasta la mitad del volumen total y 4  $\mu$ L de inhibidor de proteasas (incluido en el kit). Se rompieron las células mediante agitación vigorosa con vortex; realizando 8 pulsos de agitación de 20 seg. separados por pausas de 40 seg. en hielo para evitar el calentamiento. Una vez finalizada la ruptura mecánica, se centrifugaron los tubos a 8.000 r.p.m. (Beckman Coulter, Allegra™ 21R Centrifuge, rotor F2402) durante 15 min. a 4°C; tras lo que se recuperaron y unificaron los sobrenadantes de cada uno de los cultivos.

Una vez obtenidos los extractos proteicos totales, se añadió a cada uno de ellos 8  $\mu$ L de endonucleasa (25U/ $\mu$ L, incluido en el kit) y se incubó durante 30 min. en hielo, agitando en el vortex durante 1 min. cada 5-10 min. del periodo de incubación, tiempo tras el cual se centrifugó de nuevo a 8.000 r.p.m.

## Materiales y métodos

---

durante 20 min. a 4°C (Beckman Coulter, Allegra™ 21R Centrifuge, rotor F2402). Finalmente se procedió a la cuantificación de las proteínas extraídas mediante Bradford (Bradford 1976).

Para la recuperación/rescate de las fosfoproteínas se utilizó el kit comercial *Pro-Q Diamond phosphoprotein Enrichment Kit* (Invitrogen) siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante.

En primer lugar se prepararon las columnas, para lo que se les añadió a cada una de ellas 200 µL de etanol para humedecer el filtro y se cargó 1 mL de la resina en suspensión en cada columna. Se dejó fluir la solución en la que estaba resuspendida la resina y se lavó cada columna dos veces con 1 mL de agua bi-destilada estéril descartando el eluido.

A continuación se equilibró la resina con 2 mL de tampón de lavado en dos tiempos y se añadió el extracto de proteínas totales. Se lavó la resina tres veces con 1 mL de tampón de lavado hasta que eluyó la totalidad del tampón de lavado y con él las impurezas, quedando únicamente las fosfoproteínas unidas a la resina.

Finalmente se eluyeron las fosfoproteínas añadiendo a la columna un tampón de elución, para esto se añadieron 250 µL de este tampón y se recogió la fracción eluida. Este paso se repitió cinco veces, conservando las fracciones de la segunda y tercera elución según las indicaciones del kit. Ambas fracciones se mezclaron para los análisis posteriores. Las proteínas se cuantificaron mediante Bradford (Bradford 1976).

**Tabla 30.** Composición de la solución de cisplatino 50 mM.

Compuesto	Cantidad para 6,5 mL
Cisplatino	97,5 mg
DMSO	6,5 mL

Se añadieron 3 mL al cultivo a tratar.

### 8.2 Medida de la concentración de proteínas.

La concentración de proteína se midió mediante el método de Bradford (Bradford 1976). Se prepararon 800 µL de las muestras problemas convenientemente diluidas en agua destilada y se le añadieron 200 µL del reactivo *Protean-assay* (Bio-Rad). Las muestras se mezclaron mediante agitación en vortex y se incubaron durante 15 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se midió la DO<sub>595</sub> de cada muestra frente a un blanco sin proteína preparado de igual manera que las muestras.



## Materiales y métodos

---

Para preparar la recta patrón se empleó una solución de proteínas de concentración conocida: Sero-albúmina Bovina (Sigma) 1 mg/mL. Se añadieron 5; 10 y 25  $\mu\text{L}$  de solución proteica en 795; 790 y 775 $\mu\text{L}$  de agua y se añadieron 200  $\mu\text{L}$  del reactivo Protean-assay. Finalmente se representó en una gráfica los valores obtenidos de absorbancia a 595 nm frente a las concentraciones conocidas, obteniéndose una recta de calibrado que permite conocer las concentraciones de las muestras a partir de su valor de absorbancia.

### 9. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS.

La electroforesis consiste en la separación de moléculas (proteínas, ácidos nucleicos) a través de una matriz tamponada (agarosa, acrilamida, almidón). La matriz funciona como un filtro, separando las moléculas en un campo eléctrico, de acuerdo al tamaño y la carga neta que poseen (Maniatis *et al.*, 1989).

#### 9.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato es el responsable de la fuerte carga negativa en condiciones de pH neutro, haciendo que los fragmentos migren hacia el polo positivo (ánodo) durante la electroforesis.

La resolución y velocidad de separación de fragmentos de ADN por electroforesis son reguladas a través de la concentración de agarosa (o acrilamida) en el gel y el voltaje aplicado durante la electroforesis. La agarosa es un polímero natural extraído a partir de algas, que funciona como un filtro en el que los fragmentos de menor tamaño migran más rápidamente hacia el ánodo que aquellos de mayor tamaño. Al aumentar la concentración de agarosa se dificulta el movimiento de los fragmentos ya que a más concentración de agarosa, menor tamaño de poro, permitiendo obtener una mayor resolución en los fragmentos de menor longitud.

Para la preparación de los geles se suspendió agarosa en polvo (Agarosa D-1 Low Eco, Laboratorios Conda) en tampón 1xTAE (Tabla 31). La mezcla se calentó en microondas hasta que esta se fundió, dando lugar a una mezcla transparente y fluida. Después de enfriar brevemente, se vertió en un molde donde se coloca un peine que da lugar a los pocillos del gel. Se dejó enfriar hasta que la agarosa polimerizó, dando lugar a un gel de aspecto gelatinoso, translúcido y uniforme. Una vez preparado el gel, se colocó en una cubeta de electroforesis Mini Sub® Cell GT (Biorad) llenándola con tampón

## Materiales y métodos

1xTAE hasta que el gel quedó cubierto por una capa fina del mismo. Seguidamente se cargaron las muestras a las que previamente se les añadió una mezcla que contiene *GelGreen Nucleic Acid Gel Satín™* (Biotium), agente que se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN permitiendo la posterior visualización del ADN; glicerol, que por su densidad hace que las muestras se carguen con más facilidad al caer al fondo de los pocillos; y colorantes, que facilitan la visualización del avance de las muestras a través del gel (Tabla 32). Posteriormente se tapó la cubeta y se inició la electroforesis. El voltaje utilizado y el tiempo de migración variaron dependiendo del tamaño del gel y de la concentración de agarosa utilizada. Tras la electroforesis el gel se irradió con luz ultravioleta de manera que el ADN se hizo visible y la imagen pudo ser recogida mediante el uso de un sistema adecuado de análisis de imagen. Utilizamos un equipo de documentación de imágenes marca Bio-Rad modelo Gel Doc XR y el protocolo para GelGreen del programa informático *Image Lab™ (Beta1) Versión 3.0.1*.

**Tabla 31.** Preparación del tampón 20xTAE modificado con baja concentración de EDTA.

Compuesto	Cantidad para 1 litro
Tris	96,91 g
EDTA	0,744 g
Ácido acético	35 mL
Agua bi-destilada	Hasta 1 litro

A partir de éste se prepara el 1xTAE en el que se realizan las electroforesis de ADN en geles de agarosa. El Tris y el EDTA se disolvieron en unos 600 mL de agua y es en este momento cuando se añadió el ácido acético, midiendo el pH en evolución, hasta que se alcanzó pH 8,0. Se esterilizó en autoclave.

**Tabla 32.** Preparación del GelGreen 5x.

Compuesto	Volumen para 1 mL
Tampón azul de carga 10x (Tabla 33)	500 µL
<i>GelGreen</i> 10.000x	0,5 µL
Agua bi-destilada	499,5 µL

Utilizado para facilitar la carga, visualizar el avance de muestras en geles de agarosa y visualizar el ADN.

**Tabla 33.** Preparación del tampón azul de carga 10x.

Compuesto	Cantidad para 5 mL
Glicerol	2 mL
Azul de bromofenol	1,5 mg
Xilencianol	1,5 mg
1xTE	3 mL

### 9.2 Electroforesis de ARN en geles de agarosa.

Hay diferentes tipos de ARN presentes en la célula y generalmente se clasifican de acuerdo a su función o por su tamaño, por ejemplo haciendo referencia a su peso molecular o coeficiente de sedimentación (S).

El ARN ribosomal constituye la mayor parte del ARN celular, mientras que el ARN mensajero generalmente está presente en un porcentaje muy pequeño (1-5%) del ácido ribonucleico total, siendo éste el motivo por el que al realizar una electroforesis en gel de agarosa de una muestra de ARN, las bandas que principalmente se observan se corresponden con las 28S y 18S del ARNr. Cuando éste se resuelve en dos bandas discretas, sin manchas significativas debajo, apareciendo la banda ARNr 28S aproximadamente dos veces más intensa que la banda de ARNr 18S, lo que indica ausencia de degradación en el ARNm.

Para determinar la integridad del ARN total extraído se sometió una muestra del mismo a electroforesis en gel de agarosa al 1%, tras lo cual se realizó una tinción con bromuro de etidio, una molécula plana que se intercala de forma estable entre la doble hebra del ARN y cuando se expone a luz ultravioleta, esta es transmitida al bromuro de etidio, que a su vez emite fluorescencia en la región rojo-naranja del espectro visible. El gel se sumergió durante 15-30 min. en una solución de bromuro de etidio preservada de la luz y preparada en tampón TBE x 0,5 a una concentración de 0,5 µg/mL. Esta solución se preparó a partir de una solución madre concentrada a 10 mg/mL, que se conservó a 4°C, también preservada de la luz.

El ARN se visualizó en un equipo de documentación de imágenes marca Bio-Rad modelo Gel Doc XR y el programa Quantity One® versión 4.5.0.

### 9.3 Electroforesis de proteínas.

#### En geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida a una concentración final de acrilamida del 10% en el gel separador, siguiendo el método descrito por Laemmli (1970). Se utilizó la célula de electroforesis Mini Protean II (Bio-Rad) con capacidad para dos geles simultáneos. Se prepararon dos fases dentro del gel, fase inferior separadora y fase superior concentradora.

## Materiales y métodos

Se mezclaron todos los reactivos (Tabla 34) y en el momento de verter se añadió el TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina), un iniciador de la reacción de polimerización, necesario para que esta tenga lugar. Se vertió primero la fase separadora entre los cristales, dejando espacio para colocar el peine. Sobre la superficie libre del gel se dejaron resbalar unas gotas de agua, para evitar el contacto entre el gel y el oxígeno del aire que impide la rápida polimerización del gel. Una vez polimerizado el gel separador (20-30 min.) se eliminó la capa de agua y se rellenó el espacio superior restante del molde con gel concentrador, introduciéndose un peine para la formación de los pocillos donde se colocarán las muestras. Tras la gelificación se retiró el peine y se montaron ambos moldes en la cubeta correspondiente. Se cubrió con la solución tampón de electroforesis (Tabla 37).

Las muestras de proteínas se diluyeron con el tampón de carga 4x (Tabla 36) y seguidamente se calentaron a 98°C durante 10 min., procediéndose a continuación a aplicar la muestra en cada pocillo del gel.

Las electroforesis se llevaron a cabo manteniendo el voltaje constante a 120 V. Cuando el frente, coloreado con azul de bromofenol, llegó al extremo inferior de la placa, o en algunos casos más tarde, se detuvo la electroforesis y se procedió a la extracción del gel del molde para su uso posterior. Como referencia de tamaños se utilizó un marcador de pesos moleculares de proteínas de amplio rango *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder™* (Fermentas).

**Tabla 34.** Composición de gel de poliacrilamida al 10%.

Solución	Separador	Concentrador
Acrilamida-bisacrilamida 45% (Tabla 35)	2,2 mL	0,55 mL
Tris 1,5M pH 8,8	2,5 mL	0,63 mL
SDS 10%	0,1 mL	0,05 mL
APS 10%	0,1 mL	0,05 mL
TEMED	0,004 mL	0,005 mL
H <sub>2</sub> O	5,1 mL	3,68 mL

**Tabla 35.** Preparación de la mezcla de acrilamida/bisacrilamida al 45%.

Compuesto	Cantidad para 500 mL
Acrilamida	217 g
Bisacrilamida	7,5 g
Agua bi-destilada	Hasta 500 mL

Mezclar por agitación.

## Materiales y métodos

**Tabla 36.** Composición del tampón de carga (*Laemmli Sample Buffer*) para muestras de proteínas a concentración 4x.

Compuesto	Cantidad para 500 mL
SDS 10 %	0,8 g
Glicerol 10 %	4 mL
Tris-HCl 1 M (pH 6.8)	2,4 mL
Azul de bromofenol 0.1 %	0,004 g
B-mercaptoetanol	2 mL
Agua bi-destilada	0

**Tabla 37.** Composición del tampón de electroforesis.

Compuesto	Cantidad para 1.000 mL
Glicina 192 mM	14,4 g
Tris-HCl 25 mM pH 8,3	3 g
SDS 0,1 %	1 g
Agua bi-destilada	1.000 mL

### 10. ENSAYOS DE SUPERVIVENCIA A CISPLATINO.

El cisplatino o cis-DPP es uno de los compuestos inorgánicos más comúnmente usados como droga anticancerígena, este actúa dañando el ADN formando aductos con el N7 de los residuos purínicos a través de sus cloros reactivos. Estos aductos distorsionan la conformación del ADN, inhibiendo la replicación y la transcripción.

Se iniciaron los cultivos de levaduras a través de pre-inóculos en 5 mL de medio de cultivo SD puestos el día anterior (12-16 horas). A partir de estos se inocularon cultivos en matraces de 50 mL con 10 mL de medio SD a una  $DO_{600} \approx 1$  y se dejaron crecer en agitación a 30°C hasta el día siguiente. El tercer día se midió la  $DO_{600}$  de los cultivos y, en tubos *Eppendorff*, se realizaron diluciones de 1 mL en agua bi-destilada estéril de modo que cada tubo *Eppendorff* presentaba una  $DO_{600} \approx 1$ , y en consecuencia un número de células  $\approx 10^7$ . Se realizaron diluciones seriadas en volúmenes de 1 mL con agua bi-destilada estéril hasta una  $DO_{600} \approx 5 \times 10^{-4}$ . A continuación se cogieron 5 alícuotas de 194  $\mu$ L de la última dilución de cada cultivo y se trataron con diferentes concentraciones de cisplatino previamente disuelto en DMSO.

Se preparó para cada experimento una solución de partida de cisplatino con concentración 10 mM, y a partir de ésta diferentes diluciones para tratar las alícuotas de cultivo con diferentes concentraciones (Tabla 38).

## Materiales y métodos

A continuación se incubaron durante 3 horas a 30°C en oscuridad (metidos en una caja opaca) y agitación. Tras este tiempo, se sembraron tres réplicas de 50 µL de cada alícuota de cultivo tratado, con idéntico número de bolas de siembra, en placas YPD.

Finalmente, las placas se incubaron durante 2 días a 30°C y se hizo recuento en placa de las colonias emergentes.

El número de colonias presentes en las placas control, las no tratadas con cisplatino, se consideraron el 100%, y el porcentaje de supervivencia de las células tratadas fue calculado en base a él.

**Tabla 38.** Tratamiento con cisplatino.

Dilución cisplatino	Tratamiento
Control 0 mM (DMSO)	0 µM
1,6 mM	50 µM
3,3 mM	100 µM
5 mM	150 µM
10 mM	300 µM

Se añadieron 6 µL de cada concentración de cisplatino (columna izqda) a 194 µL de cultivo para tratarlo a la concentración indicada en la columna de la derecha.

### 11. ENSAYOS DE RESISTENCIA A ESPERMINA.

En primer lugar se hicieron placas con diferentes concentraciones de espermina. Para esto se procedió como se describe en el apartado 2 de materiales y métodos para la preparación de medio sólido de YPD; se esterilizó en autoclave durante 20 min. a 121°C y 2Ba de presión y cuando estaba a una temperatura de 65°C, se añadió la dilución de compuesto necesaria para obtener las diferentes concentraciones a analizar.

La espermina es una poliamina necesaria para varias funciones celulares como el crecimiento y la proliferación, diferenciación, transformación y apoptosis. Los niveles de poliaminas en la célula están altamente regulados; bajos niveles son suficientes para mantener el crecimiento celular, mientras que un exceso parece ser tóxico (Omri y Chaim, 2000).

Se partió de cultivos en YPD iniciados el día anterior (12-16 horas) a los que se midió la  $DO_{600}$ . En base a esta se realizó una dilución de cada cultivo, en un tubo *Eppendorff* tal que su  $DO_{600}$  resultante fuese  $\approx 1$ . A partir de esta, se realizaron diluciones seriadas utilizando agua estéril, en placas *micro-titer* hasta una  $DO_{600} \approx 10^{-5}$ . Finalmente se tomaron 5 mL de cada una de las diluciones y

se sembraron en las placas de YPD con espermina en concentraciones 1, 2 y 4 mM.

### 12. ANÁLISIS DE EXPESIÓN MEDIANTE MICROARRAYS.

Para el análisis de expresión a través de microarrays se empleó el kit comercial *GeneChip® IVT 3' Express Kit* (Affymetrix).

El kit se basa en la amplificación de ARN lineal y emplea un cebador T7 para la transcripción *in vitro*; el ARN total se somete a una transcripción inversa para sintetizar la primera cadena de ADNc. Este ADNc se convierte a continuación en un ADN de doble cadena que servirá de molde para la transcripción. En la transcripción *in vitro* se sintetiza ARNa que incorpora un nucleótido conjugado con biotina (ARNc se conoce también como ARN amplificado o ARNa). El ARNa se purifica para eliminar los nucleótidos no incorporados, sales, enzimas y fosfatos inorgánicos. La fragmentación del ARNa marcado con biotina es el último paso que prepara la muestra para la hibridación en los arrays de expresión *GeneChip® Yeast-Genome-2.0* de Affymetrix Inc. (Wycombe. United Kingdom).

Antes de proceder a la amplificación del ARNa se analizaron una serie de parámetros importantes como:

La cantidad de ARN y el tiempo de incubación para la transcripción *in vitro*.

Se utilizaron 150 µg de ARN y en base a esta cantidad, el tiempo de incubación para la IVT (del inglés *in vitro transcription*) fue de 16 horas.

La pureza del ARN: las muestras de ARN debían estar libres de proteínas, ADN y otros materiales celulares como fenol, etanol y otras sales asociadas al proceso de extracción del ARN. Las impurezas pueden disminuir la eficiencia de la transcripción inversa y en consecuencia el nivel de amplificación. Una medida eficaz de la pureza del ARN es la relación entre las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm. La relación entre A260/A280 debe estar en el rango de 1.7 - 2.1.

La integridad del ARN: esta se evaluó utilizando el bioanalizador Agilent 2100 con el kit comercial *LabChip RNA® Kit* (Affymetrix). El ARN de longitud completa tiene una relación de las bandas del ARNr 28S y 18S que se aproxima a 2.1, por lo que usando este bioanalizador evaluamos la integridad

## Materiales y métodos

---

del ARN a través de un indicador desarrollado por Agilent, el RIN (Número de la integridad del ARN), que incluye información de ambas bandas de ARNr y de fuera de los picos de ARNr (productos potenciales de degradación), proporcionando una cuantificación del estado de degradación del ARN.

### 12.1 Protocolo de amplificación del ARNa.

Tras las comprobaciones anteriores se procedió a la síntesis de la primera cadena de ADNc mediante transcripción inversa utilizando como cebador un cebador (dT), que contiene una secuencia promotora T7, para sintetizar el ADNc. Para esto se incubó durante 2 horas a 42°C en un termociclador la mezcla de reacción (Tabla 39) preparada siguiendo las indicaciones del fabricante.

Tras la incubación se centrifugó unos segundos para recolectar la síntesis de la primera cadena en el fondo del tubo, se puso en hielo y se siguió con la síntesis de la segunda cadena, convirtiendo el ADNc de cadena sencilla en ADN de doble cadena (ADNs), utilizándolo como molde para la transcripción. Para esta reacción se utilizó una ADN polimerasa y una ARNasa H, de modo que simultáneamente se degradó el ARN y se sintetizó la segunda cadena de ADNc. Para esto se añadieron 20 µL de la mezcla maestra de la segunda cadena (Tabla 43) a los 10 µL precedentes que contienen la primera cadena de ADNc (Tabla 39) y se incubó 1 hora a 16°C seguido de 10 min. a 65°C en un termociclador siguiendo las indicaciones del fabricante.

Una vez finalizada la incubación se centrifugó unos segundos para recolectar la síntesis de la segunda cadena en el fondo del tubo, se puso en hielo y se prosiguió con la fase de transcripción *in vitro* para sintetizar ARNa modificado con biotina, utilizando una mezcla maestra de etiquetado que permite generar múltiples copias de ARNa usando como molde el ADNc de doble cadena sintetizado en la etapa anterior. Con este fin, se añadieron 30 µL de la mezcla maestra IVT (Tabla 43) a los 30 µL precedentes con contienen el ADNs (Tabla 40) y se incubó durante 16 horas a 40°C.

Posteriormente se purificó el ARNa para eliminar las enzimas, sales y nucleótidos no incorporados, para lo que se añadió a cada muestra 60 µL de mezcla de unión a ARNa (Tabla 42), se transfirió cada muestra a un pocillo de una placa con fondo en forma de U y se mezcló pipeteando arriba y abajo varias veces. Seguidamente se añadieron 120 µL de etanol 100% a cada muestra y se mezcló pipeteando arriba y abajo varias veces. Se agitó la placa



## Materiales y métodos

suavemente durante 2 min. en un agitador de placas. El ARNa de la muestra se unió a las perlas de unión a ARN, contenidas en mezcla de unión a ARNa (Tabla 41), durante esta incubación.

Se movió la placa a un soporte magnético que capturó las partículas magnéticas, y se mantuvo durante 5 min. Cuando la captura se completa, la mezcla se vuelve transparente y las perlas de unión al ARN se agrupan contra los imanes en el soporte magnético. Sin perturbar el campo magnético se aspiró y descartó el sobrenadante, y se retiró la placa del soporte magnético.

Después, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de solución de lavado ARNa a cada muestra y se agitó a una velocidad moderada durante 1 min. en el agitador de placas, se movió la placa a un soporte magnético y se procedió de igual modo que el paso previo descartando el sobrenadante. Este lavado se realizó dos veces y tras eliminar el sobrenadante del segundo lavado se agitó la placa seca vigorosamente durante 1 min. en el agitador de placas para evaporar el etanol residual que pudieran contener las perlas.

Como último paso de la purificación, para eluir el ARNa de las perlas se añadió a cada muestra 50  $\mu\text{L}$  de solución de elución de ARNa precalentado a 50-60°C, se agitó la placa vigorosamente durante 3 min., se trasladó la placa al soporte magnético y se dejó reposar durante 5 min., tras lo que se transfirió el sobrenadante que contiene el ARNa purificado a un tubo de PCR libre de nucleasas.

**Tabla 39.** Composición de la mezcla de reacción para la síntesis de la 1ª cadena de ADNc.

Compuesto	Volumen para 10 $\mu\text{L}$
Mezcla maestra para la 1ª cadena (Tabla 43)	5 $\mu\text{L}$
ARN	150 $\mu\text{g}$
Mezcla control poly-A (Tabla 43)	2 $\mu\text{L}$
Agua bi-destilada libre de ARNasas	Hasta 10 $\mu\text{L}$

**Tabla 40.** Composición de la mezcla de reacción para la síntesis de la 2ª cadena de ADNc.

Compuesto	Volumen para 30 $\mu\text{L}$
Mezcla maestra para la 2ª cadena (Tabla 43)	20 $\mu\text{L}$
Síntesis 1ª cadena ADNc (Tabla 39)	10 $\mu\text{L}$

## Materiales y métodos

**Tabla 41.** Composición de la mezcla de reacción para la síntesis y etiquetado de ARNa.

Compuesto	Volumen para 60 $\mu$ L
Mezcla maestra IVT (Tabla 43)	30 $\mu$ L
ADNds (Tabla 40)	30 $\mu$ L

**Tabla 42.** Composición de la mezcla de reacción para la unión a ARNa.

Compuesto	Volumen para 60 $\mu$ L
Perlas de unión al ARN	10 $\mu$ L
Tampón concentrado de unión a ARNa	50 $\mu$ L

**Tabla 43.** Composición de las mezclas maestras.

Mezclas maestras		
Reacción	Compuesto	Volumen
Mezcla maestra para la 1 <sup>a</sup> cadena	Tampón de la 1 <sup>a</sup> cadena	4 $\mu$ L
	Enzima de la 1 <sup>a</sup> cadena	1 $\mu$ L
		<b>5 <math>\mu</math>L</b>
Mezcla maestra para la 2 <sup>a</sup> cadena	Tampón de la 2 <sup>a</sup> cadena	5 $\mu$ L
	Enzima de la 2 <sup>a</sup> cadena	2 $\mu$ L
	Agua libre de nucleasas	13 $\mu$ L
		<b>20 <math>\mu</math>L</b>
Mezcla maestra IVT	Biotina	4 $\mu$ L
	Tampón IVT	20 $\mu$ L
	Enzima	6 $\mu$ L
		<b>30 <math>\mu</math>L</b>
Mezcla control poly-A	Concentración para una muestra de ARN	
	<i>lys</i>	1:100.000
	<i>phe</i>	1:50.000
	<i>thr</i>	1:25.000
	<i>dap</i>	1:6667

### 12.2 Evaluación y fragmentación del ARNa.

Se realizó un control de la concentración de ARNa mediante la medición de su absorbancia a 260 nm, con un espectrofotómetro NanoDrop sin realizar diluciones con 2  $\mu$ L de la muestra ARNa directamente. También se evaluó la distribución del tamaño de ARNa con un Bioanalizador Agilent y el kit ARN 6000 Nano cargando 300 ng de ARNa por pocillo. El perfil de ARNa esperado es una distribución de tamaños desde 250-5500 nt con la mayor parte del ARNa entre 600-1200 nt.

## Materiales y métodos

---

Tras analizar la cantidad y tamaño del ARNa se procedió a su fragmentación para su posterior hibridación en los arrays. Para ello se preparó la mezcla de reacción (Tabla 44) que varía en función del formato de array empleado, 169(Mini) en este trabajo, se incubó durante 35 min. a 94°C y se puso en hielo.

Tras la fragmentación realizamos una evaluación del tamaño de los productos de la reacción de fragmentación mediante el procesamiento de una muestra de 300 ng en un Bioanalizador Agilent utilizando el kit ARN Agilent 6000 Nano. La reacción debe producir una distribución de fragmentos de ARNa entre 35-200 nt con un pico aproximadamente a 100-120 nt.

**Tabla 44.** Composición de la mezcla de reacción para la fragmentación del ARNa.

Compuesto	Volumen para 20 $\mu$ L
ARNa	7,5 $\mu$ g (entre 1-16 $\mu$ L)
Tampón 5x de fragmentación del array	4 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas	Hasta 20 $\mu$ L

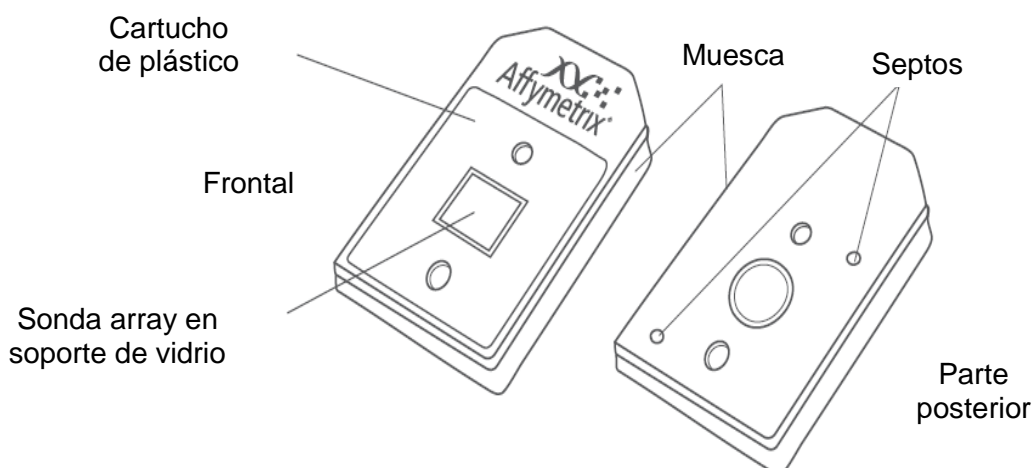
### 12.3 Hibridación.

#### Hibridación del cartucho:

Se realizó una mezcla de reacción (Tabla 45) para cada muestra, llamada cóctel de hibridación, y se calentó durante 5 min. a 99°C, mientras tanto, se mojó la matriz del cartucho con 80  $\mu$ L de mezcla de pre-hibridación llenándolo a través de uno de los septos.

Cada cartucho cuenta con dos septos (Fig. 15). Para llenar la matriz, primero hay que ventilar la cámara insertando una punta limpia, y se mantiene en él sin utilizar, a continuación, se inserta la punta de una micropipeta en el septo restante y es a través de este que se llena la matriz del cartucho con la solución pertinente en cada caso.

## Materiales y métodos



**Figura 15.** Cartucho de Affimetrix para arrays.

Los cartuchos embebidos en la solución de pre-hibridación se incubaron 10 min. a 45°C en rotación, tras lo que se eliminó la solución siguiendo el mismo procedimiento de llenado pero aspirando.

El cóctel de hibridación precalentado se centrifugó durante 5 min. a velocidad máxima para precipitar cualquier material insoluble de la mezcla. A continuación se introdujo en el cartucho de igual manera que la solución de pre-hibridación y se incubó 16 horas a 45°C con una rotación de 60 r.p.m.

**Tabla 45.** Composición del cóctel de hibridación para cada cartucho.

Compuesto	Cantidad para 100 $\mu\text{L}$	Dilución final
ARNa fragmentado y etiquetado	5 $\mu\text{g}$ (13,3 $\mu\text{L}$ )	0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
Oligonucleótido Control B2 (3nM)	1,7 $\mu\text{L}$	50 pM
Controles de la Hibridación 20x (bioB, bioC, bioD, cre)	5 $\mu\text{L}$	1.5, 5, 25 y 100 pM respectivamente
Mezcla de hibridación 2x	50 $\mu\text{L}$	1x
DMSO	10 $\mu\text{L}$	10%
Agua libre de nucleasas	20 $\mu\text{L}$	

### Hibridación de los array con el GeneTitan™.

El kit *GeneTitan™* permite la hibridación, lavado y tinción de los arrays IVT 3' de Affimetrix.

En primer lugar preparamos la estación fluidica 450/250 que se utilizó para lavar y teñir los arrays y se maneja con Affymetrix GeneChip Command Console. Para ello se rellenaron las botellas que contienen las soluciones de lavado de la siguiente manera:

## Materiales y métodos

---

Wash A  $\approx$  400mL (Vía A).

Wash B  $\approx$  250mL (Vía B).

Agua miliQ  $\approx$  500mL.

Procedimos con el encendido de la estación y el inicio del programa *AGCC launcher*.

Tras las 16 horas de hibridación se retiraron los arrays del horno de hibridación, y se purgó el array insertando una punta de pipeta limpia en uno de los septos y se extrajo el cocktail de hibridación mediante pipeta a través del otro septo. Este cocktail se puede reutilizar, para lo que se guarda a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Se inyectó tampón de lavado A (100  $\mu\text{L}$ ) en los cartuchos asegurándose de que no quedaban burbujas, por lo que se rellenaron hasta que se observó salir tampón por el septo opuesto. Si es necesario, en este punto el array se puede almacenar a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta 3 horas antes de proceder con el lavado y la tinción. Hay que equilibrarlo a temperatura ambiente antes de lavar y teñir.

Se alicuotearon los siguientes reactivos de tinción en tubos de 1,5mL libres de ARNasas:

Vial 1: 600  $\mu\text{L}$  de cocktail 1.

Vial 2: 600  $\mu\text{L}$  de cocktail 2.

Vial 3: 800  $\mu\text{L}$  de tampón Holding.

Se colocó cada uno de ellos en la posición correspondiente en la estación fluídica y se inició el protocolo Mini-euk 2V3-450 que duró unos 90 min., tras los cuales se escanearon los arrays en un plazo inferior a 24 horas.

### 12.4 Análisis estadístico y extracción de datos.

Los datos de los arrays se normalizaron y procesaron inicialmente mediante el algoritmo RMA de Affymetrix. Los datos fueron posteriormente analizados a través de la versión 4.3 de Babelomics (Medina *et al.*, 2010). Los análisis estadísticos para identificar DEGs se realizaron utilizando los test LIMMA (modelos lineales para datos de microarrays) un t-test moderado, según se describe en Smyth (2005). El FDR (*False Discovery Rate*) fue estimado para corregir los valores de comparación múltiple (Benjamini y Hochberg, 1995), usando un p-valor ajustado de 0.05. La descripción de los genes y los análisis

## Materiales y métodos

---

comparativos de las listas de genes diferencialmente expresados fueron obtenidas a través *Yeast Mine* (<http://yeastmine.yeastgenome.org/yeastmine/begin.do>). La distribución de los genes diferencialmente regulados en grupos funcionales preferentes se analizó utilizando FunSpec (<http://funspec.cabr.utoronto.ca/>) desarrollado por Robinson y colaboradores (Robinson *et al.*, 2002). Para los análisis se utilizó la base de datos MIPS (FunCatDB, *Functional Catalogue Database*) (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/>). Para estos análisis se seleccionó un p-valor inferior a 0,01. Estos p-valores representan la probabilidad de que la intersección entre una lista dada de genes (agrupación de entrada) y los genes clasificados en una categoría funcional cualquiera se produzca por casualidad. En el informe de los análisis llevados a cabo con FunSpec,  $k$  es el número de genes de la agrupación de entrada (en nuestro caso DEGs) presentes en la categoría funcional dada y  $f$  es el número total de genes clasificados en esa misma categoría funcional.

### 13. PROTEÓMICA.

La proteómica estudia la expresión de las proteínas a nivel global, empleando técnicas que permiten el análisis de todas aquellas proteínas presentes en una muestra biológica; proporcionando así información directa del producto final del genoma (Blackstock y Weir, 1999; Pandey y Mann, 2000; Tyers y Mann, 2003).

#### 13.1 Electroforesis bidimensional de proteínas DIGE.

El protocolo de preparación de un gel bidimensional consta de varias etapas, que incluyen la preparación de la muestra, la primera dimensión mediante isoelectroenfoque (IEF), la segunda dimensión mediante SDS-PAGE, la visualización de las proteínas y la digitalización y análisis de los mapas bidimensionales.

La preparación de la muestra es un paso esencial para desarrollo de la 2-DE, que requiere la eliminación de los posibles contaminantes y/o proteasas presentes en la muestra (Rabilloud, 1996). Los contaminantes se pueden eliminar mediante técnicas como la diálisis, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía en fase reversa o precipitación de proteínas (Englard *et al.*, 1990). A continuación, las proteínas han de solubilizarse en un medio que debe contener: un agente caotrópico neutro para solubilizar las proteína (normalmente urea); un detergente no iónico, para prevenir agregaciones (NP-

## Materiales y métodos

---

40, CHAPS, etc.); un agente reductor, para romper los puentes disulfuro ( $\beta$ -mercaptoethanol, dithiothreitol (DTT), etc.); y finalmente anfolitos, que potencian la solubilidad de las proteínas, minimizando la agregación por interacciones de carga.

### Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF).

Las proteínas son moléculas anfotéricas que pueden estar cargadas positiva o negativamente en función del pH del medio en que se encuentren. El isoelectroenfoque separa las proteínas de acuerdo a su pI. Si se aplica un campo eléctrico a un gradiente de pH, las proteínas que estén dentro migrarán hasta alcanzar el pH equivalente a su pI, donde pierden toda carga y dejan de moverse. Por tanto, para realizar un IEF necesitamos un gradiente de pH (Bjellqvist *et al.*, 1982) y una fuente capaz de generar una diferencia de potencial.

Las proteínas de cada muestra se marcaron con fluorocromos siguiendo el protocolo del fabricante para el etiquetado mínimo. Las muestras se marcaron siempre con Cy3 o Cy5. Además se preparó un control interno que incluyó todas las muestras del experimento, para lo cual se pusieron en un único tubo 45  $\mu$ L de cada una de ellas y esta mezcla se marcó con Cy2.

En cada caso se usaron 360 pmol de fluorocromo para cada 45  $\mu$ g de proteínas. El marcaje se realizó durante 30 min. en hielo y oscuridad. La reacción se paró con 1  $\mu$ L de L-lisina 10 mM durante 10 min. en las mismas condiciones.

Los seis pares de muestras utilizados en este experimento se marcaron con Cy3 y Cy5 (45  $\mu$ g) y se mezclaron con 45  $\mu$ g del control interno marcado con Cy2. La mezcla, que contiene 135  $\mu$ g de proteína (45  $\mu$ g de proteínas de la muestra marcada con Cy3, 45  $\mu$ g con Cy5 y 45  $\mu$ g con Cy2), se diluyó en proporción 1:1 con el tampón de rehidratación 1 (Tabla 46). A continuación se rehidrataron las tiras de IPG (*Immobiline Dry Strip*, GE Healthcare) (24 cm, pH 3-11 no lineal) durante la noche con 450  $\mu$ L de tampón de rehidratación 2 (Tabla 46). Se cargaron las muestras marcadas en el IPG y se aplicó la carga en un sistema IPGphor II IEF (GE Healthcare). El isoelectroenfoque se llevó a cabo durante un total de 70 kV/h totales utilizando las siguientes condiciones:

## Materiales y métodos

Duración	Voltaje
1 hora	120 V
1 hora	500 V
1 hora	1.000 V
1 hora	Subir de 1.000 V a 4.000 V
12 horas	4.000 V

**Tabla 46.** Composición tampones de rehidratación.

Composición	
Tampón de Rehidratación 1	Tampón de Rehidratación 2
Urea 7 M	Urea 7 M
Tiourea 2 M	Tiourea 2 M
CHAPS 4%	CHAPS 4%
Anfolitos 4% (pH 3–11)	Anfolitos 2% (pH 3–11)
Agente reductor DTT 2.4%	Agente reductor DTT 97 mM
	Azul de bromofenol 0,002%

### Segunda dimensión. SDS-PAGE.

Antes de realizar la electroforesis SDS-PAGE según Laemmli (1970), la tira de IPG se trató con un tampón de equilibrado, primero durante 15 min. con el tampón de equilibrado 1 (Tabla 47), y luego durante otros 15 min. con el tampón de equilibrado 2 (Tabla 47).

Este tampón contiene varios reactivos necesarios para la separación en la segunda dimensión. El más importante de ellos es el SDS, que es fundamental en el desarrollo de este tipo de electroforesis, ya que desnaturaliza las proteínas y forma con ellas complejos cargados negativamente que migran hacia el polo positivo durante el proceso. La solución de equilibrado contiene también urea y glicerol, para reducir los efectos electro-endosmóticos (Gorg *et al.*, 1988). El equilibrado se realizó en dos pasos para prevenir la re-oxidación de las proteínas. A continuación, las proteínas enfocadas y equilibradas en la tira de IPG vuelven a ser separadas en base a su masa molecular empleando SDS-PAGE en la segunda dimensión (en dirección perpendicular a la primera).

Las tiras de IPG equilibradas se transfirieron a geles de poliacrilamida 12% fundidos en placas de vidrio de baja fluorescencia utilizando el sistema



## Materiales y métodos

Ettan-DALT (GE Healthcare). La electroforesis se realizó a 2 vatios durante 17 horas a 20°C.

**Tabla 47.** Composición tampones de equilibrado.

Composición	
Tampón de Equilibrado 1	Tampón de Equilibrado 2
Tris-HCl 100 mM (pH 8,0)	Tris-HCl 100 mM (pH 8,0)
Urea 6 M	Urea 6 M
Glicerol 30%	Glicerol 30%
SDS 2%	SDS 2%
DTT 2%	Yodoacetamida 2,5%
	Azul de bromofenol 0,002%

### Visualización.

Las proteínas diferencialmente etiquetadas se observaron a través de imágenes con una resolución de 100 puntos/pulgada utilizando el escáner DIGE Imager scanner (GE Healthcare). Las proteínas marcadas con Cy2, Cy3 y Cy5 se observaron a valores de excitación/emisión de 488/520, 523/580 y 633/ 670nm, respectivamente.

Los geles fueron escaneados directamente entre las placas de vidrio, tras lo que se retiraron de las placas y se tiñeron con Coomassie coloidal siguiendo el procedimiento estándar.

El análisis de las imágenes se realizó con el programa Progenesis SameSpots V3.2. Primero se realizó un control de calidad de las imágenes para detectar los spots saturados. Se realizó un análisis multiplex para comparar los experimentos DIGE y se utilizó una imagen representativa del gel como referencia. Se detectaron los *spots* y los valores de sus volúmenes normalizados que fueron clasificados en base a los valores p de ANOVA y al número de veces de cambio de su expresión (*fold change*).

### **13.2 Análisis de muestras mediante Espectrometría de Masas (MS y MS/MS).**

La ionización MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*), acoplada a un analizador TOF (*Time-Of-Flight*), permite determinar con gran exactitud la masa de los péptidos resultantes de la digestión con tripsina de proteínas extraídas del gel. La medida de la masa de los péptidos genera un espectro de masas, denominado huella peptídica de masa, que es característico de dicha proteína y permite identificarla de forma inequívoca. La

## Materiales y métodos

---

identificación de la proteína se lleva a cabo por comparación de la huella peptídica de masa experimental con las masas predichas por la digestión *in silico* de todas las secuencias incluidas en las bases de datos de proteínas.

La ionización MALDI acoplada a un analizador TOF/TOF, permite determinar las masas de los fragmentos que se derivan de la descomposición metaestable de péptidos. Dicha descomposición genera la denominada huella peptídica de fragmentación del péptido, la cual es característica de la secuencia del mismo y permite su identificación inequívoca. Este estudio puede emplearse en combinación con la huella peptídica de masa para aumentar notablemente la eficacia de la búsqueda en bases de datos.

Las manchas de interés del gel se extrajeron manualmente y se transfirieron a tubos de microcentrífuga. Las muestras seleccionadas para el análisis fueron reducidas, alquiladas y digeridas con tripsina de acuerdo con el método de Sechi y Chait, (1998). Las muestras fueron analizadas utilizando el espectrómetro de masas 4800 Proteomics Analyzer (ABSciex, Framingham, MA, USA) y el programa *4000 Series Explorer™ Software* (ABSciex). Se utilizó el *Data Explorer versión 4.2* (ABSciex) para el análisis de los espectros y la generación de listas de picos. Todos los espectros de masas fueron calibrados internamente usando fragmentos de digestión autolítica de la tripsina y calibrados externamente utilizando una mezcla de péptidos estándar (Sigma-Aldrich). El espectro de fragmentación TOF/TOF se obtuvo mediante la selección de los 10 iones más abundantes de cada uno de los mapas de huella peptídica de masa MALDI-TOF (con exclusión de los péptidos de tripsina autolíticas y otros iones de fondo conocidos).

La masa peptídica monoisotópica obtenida por MS y la secuencia de aminoácidos obtenida de la fragmentación de cada péptido mediante análisis MS/MS se usó para buscar proteínas candidatas a través de la versión 2.2 de Mascot desde Matrix Science (<http://www.matrixscience.com>). La búsqueda de huellas de masa de péptidos y espectros MS tándem se realizó en la base de datos UniProt (2010\_09 versión de lanzamiento, 10 de agosto de 2010), mediante la búsqueda en la base de datos UniProtKB/Swiss-Pro [<http://www.expasy.ch/sprot>] que contiene 519.348 entradas. Se tuvieron en cuenta modificaciones de aminoácidos fijas y variables (Cys en forma de S-carbamidometil-Cys y Met oxidada, respectivamente), permitiendo la falta de un sitio de corte con tripsina y una tolerancia en diferencia de masa de 50 ppm.

## Materiales y métodos

---

Para las identificaciones MS/MS, se toleran diferencias de 50 ppm en el precursor y de 0,3 Da para los fragmentos MS/MS. Las identificaciones fueron aceptadas como positivas cuando coincidieron las secuencias de al menos cinco péptidos y al menos el 20% de la secuencias péptidica cubierta coincidía con una precisión de 50 ó 25 ppm con calibración interna. Las probabilidades fueron significativas a  $P < 0,01$  para todas las coincidencias.

En los análisis estadísticos de los datos de proteómica se utilizaron herramientas de normalización y análisis a través del programa *SameSpots* y *Protein Pilot*. Se consideraron como estadísticamente significativos sólo los cambios con  $p$  valor  $\leq 0.063$  y un cambio de  $\geq 1.2$ .



## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



# **CAPÍTULO 1**

**ANÁLISIS GENÉTICO PARA DETERMINAR LA RELACIÓN  
ENTRE LOS GENES *IXR1* Y *SKY1* DE *Saccharomyces cerevisiae* EN  
LA RESPUESTA A CISPLATINO Y ESPERMINA.**





# Análisis genético para determinar la relación entre los genes *IXR1* y *SKY1* de *Saccharomyces cerevisiae* en la respuesta a cisplatino y espermina.

---

## 1.1. Introducción.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido previamente utilizada, como modelo de un sistema eucariota, para identificar genes funcionalmente implicados en la sensibilidad o resistencia a cisplatino (Burger *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2005). Las proteínas Sky1p e Ixr1p de esta levadura han sido relacionadas con la respuesta a cisplatino (Fox *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 2005; Schenk *et al.*, 2001, 2003). Estudios previos sobre la proteína Sky1p de *S. cerevisiae* indican que su actividad quinasa es esencial para la citotoxicidad causada por el cisplatino en levaduras (Schenk *et al.*, 2001). Sky1p es también un regulador clave del transporte de poliaminas, como putrescina, espermina y espermidina (Erez y Kahana, 2001). Ixr1p es una proteína con dos dominios HMG que se caracteriza por su unión a los principales aductos de ADN con cisplatino (McA'Nulty y Lippard, 1996) y es también un regulador transcripcional de genes hipóxicos (Castro-Prego *et al.*, 2010). Se ha demostrado que en mutantes para los mecanismos de reparación por escisión (*nucleotide excision repair*, NER)  $\Delta rad2$ ,  $\Delta rad4$  y  $\Delta rad14$ , la supresión del gen *IXR1* no aumenta la resistencia de las células de *S. cerevisiae* al cisplatino (McA'Nulty *et al.*, 1996). Este resultado da soporte a la hipótesis de que Ixr1p y otras proteínas con dominios HMG pueden bloquear la reparación de los aductos de ADN y cisplatino *in vivo* (McA'Nulty y Lippard, 1996). Se ha sugerido que la sensibilidad a cisplatino en células que expresan Ixr1p podría ser causada por un papel arquitectónico de esta proteína HMG en el ensamblaje de la cromatina, que protege esa región de la maquinaria de reparación del ADN, induciendo así la muerte celular (Nagatani *et al.*, 2001). Teniendo en cuenta que Sky1p es una proteína-quinasa, por tanto con un papel potencial en la señalización celular, que Ixr1 es una proteína de unión al ADN con conexiones en la reparación del ADN y que ambas están relacionadas con la resistencia a cisplatino, en el presente trabajo se han estudiado las posibles interacciones genéticas que existen entre los genes *IXR1* y *SKY1* en *S. cerevisiae*.

Para realizar este estudio se midió la resistencia a cisplatino y espermina en cepas de *S. cerevisiae* con deleciones simples  $\Delta ixr1$  o  $\Delta sky1$  y deleciones dobles  $\Delta ixr1\Delta sky1$  en tres fondos genéticos diferentes. Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este estudio fueron BY4741 (MATa *his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 met15 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0*), W303 (MATa *ade2-1 can1-100 leu2-3,112 trp1-100 ura3-52*),

## Análisis genético para determinar la relación entre los genes *IXR1* y *SKY1* de *Saccharomyces cerevisiae* en la respuesta a cisplatino y espermina.

y BWG1-7a (MATa *ade1-100 leu2-2,112 his4-519 ura3-52*), así como sus derivados obtenidos por delección de los genes *IXR1* o/y *SKY1*.

### 1.2. Obtención de las cepas.

Las cepas BY4741 $\Delta$ *ixr1* $\Delta$ *sky1*; BWG1-7a $\Delta$ *sky1*; BWG1-7a $\Delta$ *ixr1* $\Delta$ *sky1*; W303 $\Delta$ *sky1* y W303 $\Delta$ *ixr1* $\Delta$ *sky1* se construyeron mediante la interrupción del gen *SKY1* con el marcador *URA3* por recombinación homóloga en las cepas BY4741 $\Delta$ *ixr1*; BWG1-7a; BWG1-7a $\Delta$ *ixr1*; W303 y W303 $\Delta$ *ixr1* respectivamente.

El plásmido YEplac 195 (Gietz y Sugino, 1988) digerido con *EcoRI* se utilizó como molde para amplificar, mediante PCR, un fragmento lineal que contiene el gen *URA3*. Para esto se diseñaron cebadores (Rec-f y Rec-r) con homología a *URA3* y regiones flanqueantes homólogas a los extremos 3' y 5' de la secuencia codificadora de *SKY1* que permitieron, como consecuencia de la transformación de las cepas anteriormente indicadas, la integración por recombinación homóloga como se explica en la Figura 16.

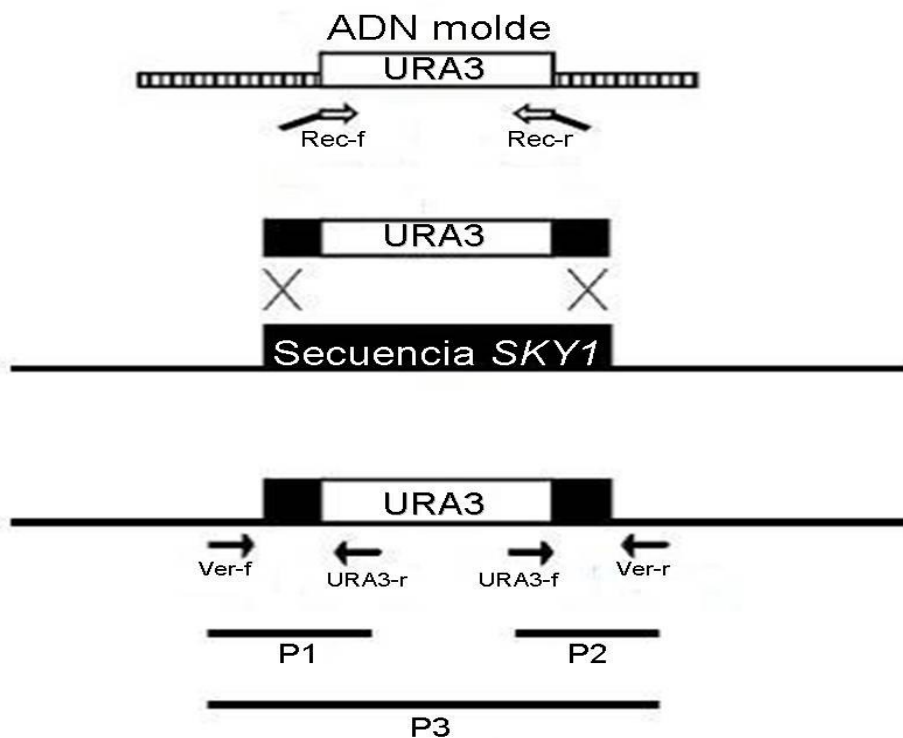


Figura 16. Estrategia para la construcción de los nulos.

**Análisis genético para determinar la relación entre los genes *IXR1* y *SKY1* de *Saccharomyces cerevisiae* en la respuesta a cisplatino y espermina.**

Tras la transformación con estos fragmentos, las células fueron seleccionadas en un medio completo sin uracilo (CM-Ura) y suplementado con geneticina para las cepas  $\Delta ixr1$ , en las que el gen está interrumpido con KanMX4. Se verificó el correcto reemplazamiento en el genoma de *S. cerevisiae* mediante PCR (Tizón *et al.*, 1999). Se amplificó ADN genómico de cada uno de los posibles candidatos con dos pares de cebadores. Los cebadores internos, URA3-f y URA3-r, anillan en *URA3* de manera divergente. Los cebadores externos, Ver-f y Ver-r, anillan de manera convergente en la secuencia del gen *SKY1*, pero en una zona externa a las regiones de homología empleadas para la recombinación (Fig. 16).

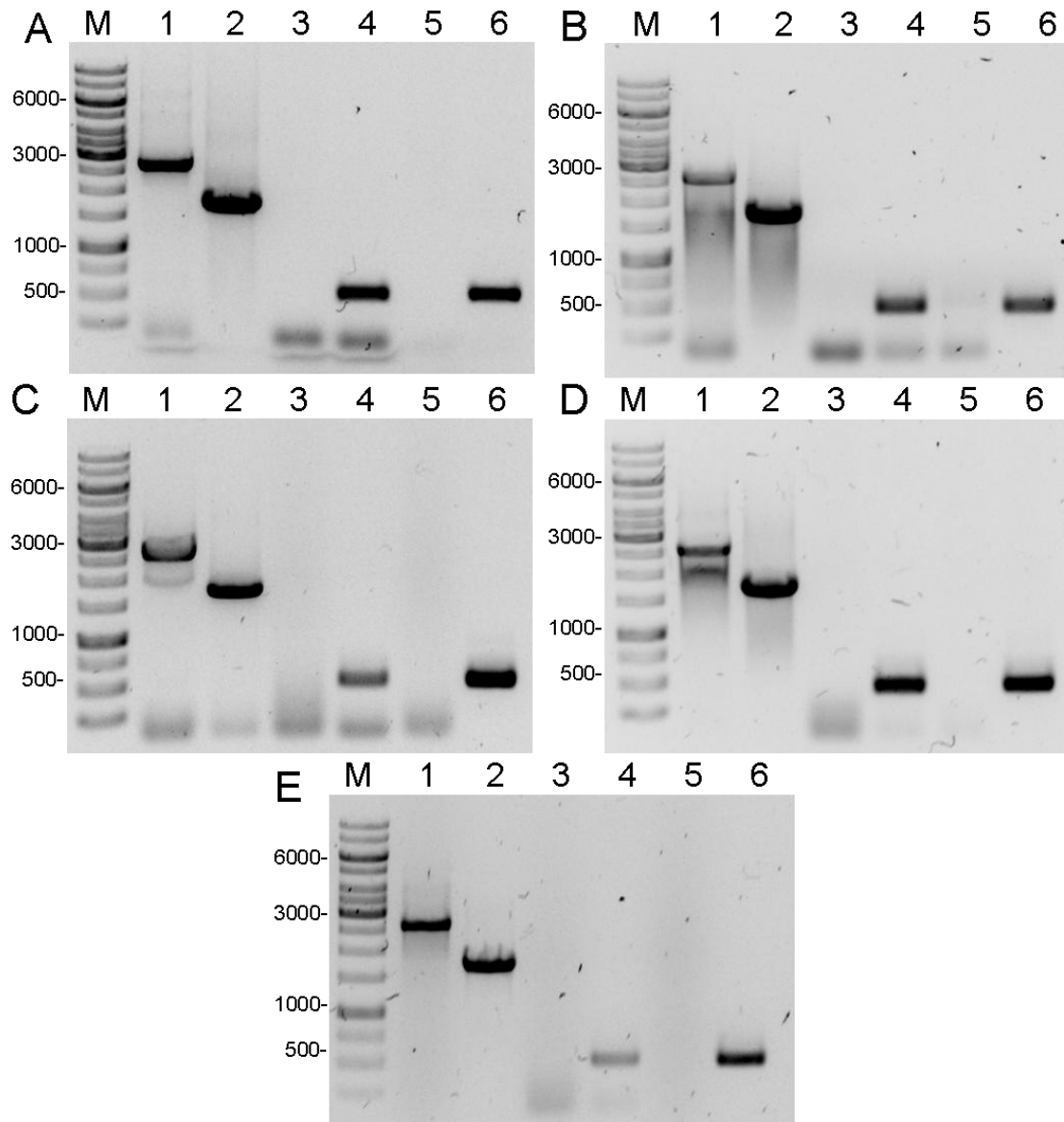
La estrategia y los resultados obtenidos durante la verificación del reemplazamiento de la secuencia codificadora de *SKY1* con el marcador *URA3* se muestran en las Figuras 16 y 17 respectivamente, y los cebadores empleados se muestran en la Tabla 48.

**Tabla 48.** Oligonucleótidos utilizados para la construcción y verificación de los nulos.

Nombre cebador	Código	Secuencia	PH <i>SKY1</i>	PH <i>URA3</i>	Producto PCR	Tamaño PCR (bp)
Rec-f	ECV741	atgggtcatcaattaa ctatcctgggttgCCA CCTGACGTCTA AGAAACC	+1	-312	P1 <i>SKY1</i> P1 $\Delta sky1$ : : <i>URA3</i>	-  481
Rec-r	ECV742	tcaatgtctttatgatcg cggacttcttcCCTTT AGCTGTTCTATA TGCTGC	+2229	+996	P2 <i>SKY1</i> P2 $\Delta sky1$ : : <i>URA3</i>	-  483
Ver-f	ECV717SR	GATCACCTGGC GCTGAGAA	-97	-	P3 <i>SKY1</i> P3 $\Delta sky1$ : : <i>URA3</i>	2562  1701
Ver-r	ECV718SR	CGAGTATGGAT TCAAAAACCGC	+2465	-		
Ura3-f	ECV716SR	GAGAAGATGCG GCCAGCA	-	+780		
Ura3-r	ECV715SR	GGATGAGTAGC AGCACGTTCC	-	+41		

PH, Posición de hibridación. La denominación de los productos de PCR se corresponde con la señalada en la Figura 16.

## Análisis genético para determinar la relación entre los genes *IXR1* y *SKY1* de *Saccharomyces cerevisiae* en la respuesta a cisplatino y espermina.



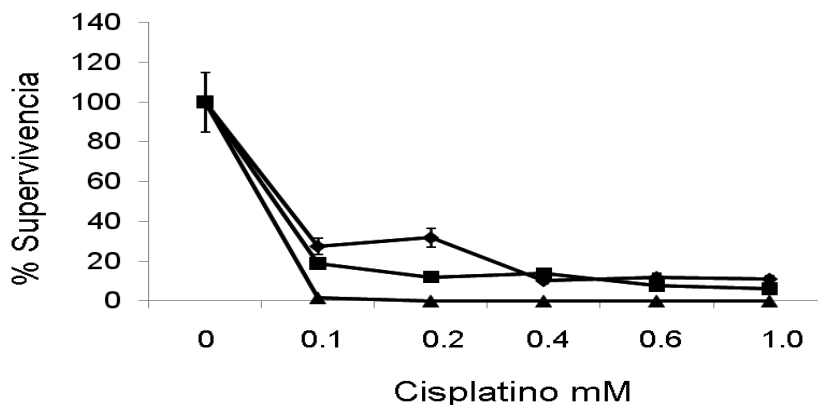
**Figura 17.** Verificación de las interrupciones de los genes en las cepas de *S. cerevisiae* **A.-** BY4741Δixr1Δsky1. **B.-** BWG1-7aΔsky1. **C.-** BWG1-7aΔixr1Δsky1. **D.-** W303Δsky1. **E.-** W303Δixr1Δsky1. M, marcador de pesos moleculares. Posiciones 1 y 2 PCR de amplificación del fragmento P3; 3 y 4, P1; 5 y 6, P2. Las reacciones con las cepas de partida se sitúan en las posiciones 1, 3 y 5, mientras que las reacciones correspondientes a las cepas con el nulo a verificar se sitúan en las posiciones 2, 4 y 6.

### 1.3. Análisis de resistencia a cisplatino.

Las células de las tres cepas de referencia fueron tratadas con cisplatino a diferentes concentraciones que variaron desde 0,1 a 1 mmol/L durante 24 h, y los resultados de supervivencia en tanto por cien se muestran en la Figura

## Análisis genético para determinar la relación entre los genes *IXR1* y *SKY1* de *Saccharomyces cerevisiae* en la respuesta a cisplatino y espermina.

18. BY4741 es la cepa más resistente y BWG1-7a la menos resistente. Se ha descrito en trabajos anteriores que en cepas con mutaciones en la ruta de biosíntesis *de novo* de nucleótidos de purina, en las que se impide la inhibición por retroalimentación causada por AMP o GMP, se incrementa la resistencia a cisplatino (Kowalski *et al.*, 2008). Al contrario que BY4741, las cepas W303 y BWG1-7a contienen mutaciones *ade* y por lo tanto no son capaces de sintetizar adenina. Sin embargo, en las condiciones ensayadas, la diferente actividad de la ruta de biosíntesis de purinas probablemente no es el único determinante de las diferencias encontradas en la resistencia a cisplatino entre las tres cepas, ya que el medio utilizado para los cultivos contenía adenina y su síntesis no es necesaria.



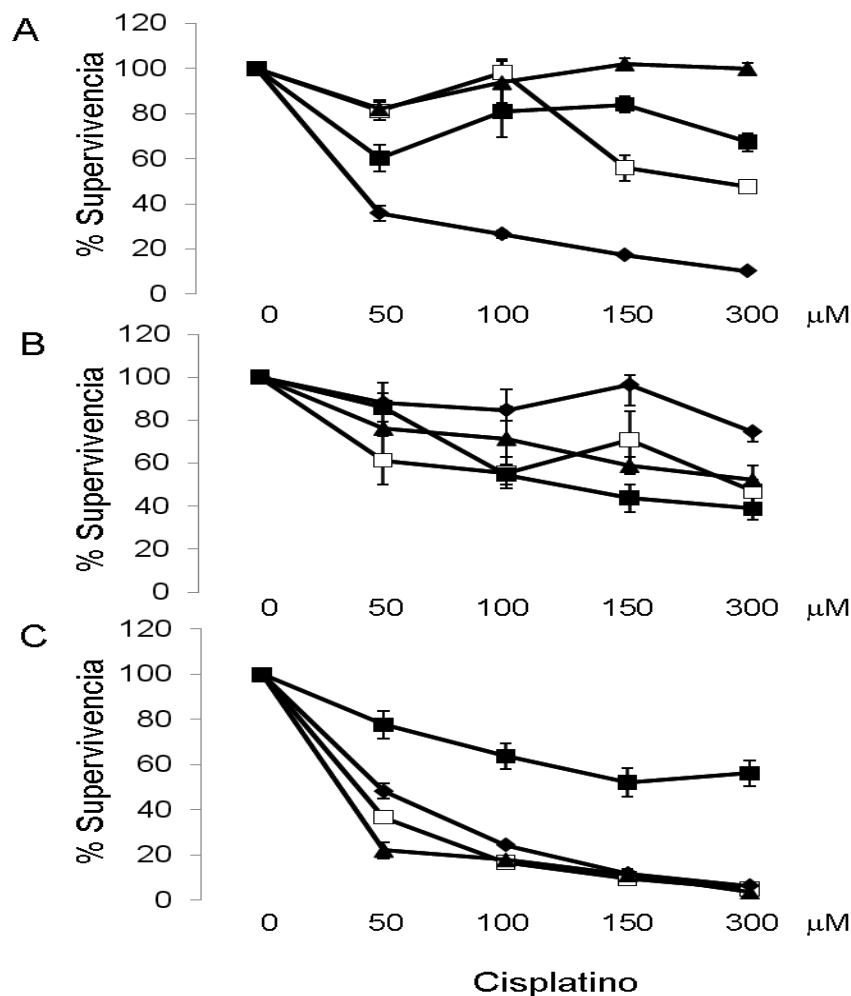
**Figura 18.** Sensibilidad al cisplatino de las cepas de *S. cerevisiae* BY4741 (◆), W303 (■), y BWG1-7a (▲).

Para analizar las interacciones genéticas entre *IXR1* y *SKY1* en el proceso de resistencia a cisplatino, las cepas BY4741, W303 y BWG1 7a, así como sus correspondientes derivados,  $\Delta sky1$ ,  $\Delta ixr1$  y  $\Delta ixr1\Delta sky1$ , se expusieron a tratamiento con cisplatino en concentraciones que variaban desde 50 hasta 300  $\mu\text{mol/l}$  durante 3 h. Los resultados se resumen en la Figura 19. El rango de concentraciones de cisplatino y el tiempo de exposición fueron seleccionados previamente para permitir el recuento de células en los cultivos tratados para cada uno de los tres fondos genéticos ensayados. En las cepas derivadas de BY4741, las deleciones individuales  $\Delta ixr1$  y  $\Delta sky1$  producen un aumento en la resistencia a cisplatino en comparación con la cepa no delecionada. Estos resultados concuerdan con datos anteriores (Brown *et al.*, 1993; Schenk *et al.*, 2001), pero este efecto no se observó cuando la

## Análisis genético para determinar la relación entre los genes *IXR1* y *SKY1* de *Saccharomyces cerevisiae* en la respuesta a cisplatino y espermina.

concentración de cisplatino fue menor de 150  $\mu\text{mol/L}$ . A la inversa, en la cepa BY4741 con la doble delección  $\Delta ixr1\Delta sky1$  la sensibilidad al cisplatino aumentó drásticamente (Fig. 19A).

En las cepas derivadas de W303, las delecciones  $\Delta ixr1$  y  $\Delta sky1$  producen un escaso aumento en la resistencia a cisplatino. No obstante, en la cepa W303  $\Delta ixr1\Delta sky1$ , los efectos de ambas delecciones son aditivos y esta cepa es más resistente a cisplatino que su tipo parental o las delecciones isogénicas individuales (Fig. 19B). En las cepas derivadas de W303, al aumentar la concentración de cisplatino a 600  $\mu\text{M}$  y realizar el tratamiento sobre cultivos de células en fase exponencial, es posible medir un incremento en la resistencia de los mutantes individuales de un 15%.



**Figura 19.** Efectos del tratamiento con cisplatino sobre células mutadas de diferentes cepas. **A.-** Cepa BY4741 y derivadas, **B.-** Cepa W303 y derivadas, y **C.-** Cepa BWG1-7a y derivadas. Cepas parentales ( $\square$ ),  $\Delta ixr1$  ( $\blacktriangle$ ),  $\Delta sky1$  ( $\blacksquare$ ), y  $\Delta ixr1\Delta sky1$  ( $\blacklozenge$ ).

## **Análisis genético para determinar la relación entre los genes *IXR1* y *SKY1* de *Saccharomyces cerevisiae* en la respuesta a cisplatino y espermina.**

---

Sin embargo, en el fondo genético BWG1-7a, la delección de *Δixr1* no causó aumento de la resistencia al cisplatino, al contrario que *Δsky1*, que muestra el fenotipo esperado. Curiosamente, el doble mutante *Δixr1Δsky1* pierde la resistencia al cisplatino exhibida por *Δsky1* (Fig. 19C).

El análisis de nuestros resultados (Fig.19) revela la influencia de la selección de un fondo genético particular en la determinación de las interacciones genéticas. Por lo tanto, en el caso de este trabajo, el análisis de las interacciones genéticas entre *IXR1* y *SKY1* en relación con la resistencia a cisplatino no se pudo evaluar en la cepa BWG1-7a, porque *Δixr1* no mostró un aumento de la resistencia al cisplatino como muestran trabajos anteriores con otras cepas *Δixr1* (Brown *et al.*, 1993; Burger *et al.*, 2000). A partir los resultados obtenidos, llegamos a la conclusión de que incluso en dos cepas diferentes, BY4741 y W303, en las que se observa la resistencia a cisplatino en los dos mutantes individuales, *Δixr1* y *Δsky1*, la interacción genética que se deduce entre los genes *IXR1* y *SKY1* es diferente. El efecto de estas delecciones es aditivo en la cepa W303, lo que podría interpretarse en el sentido en que las proteínas Ixr1p y Sky1p controlan la resistencia a cisplatino a través de dos mecanismos independientes, cada uno contribuyendo en parte al fenotipo final. Sin embargo, los efectos causados por las delecciones *Δixr1* y *Δsky1* no son aditivos en la cepa BY4741. Por el contrario, la ausencia de las dos proteínas suprime el efecto producido por cada una de las delecciones individuales.

Los diferentes resultados obtenidos en los derivados de las tres cepas, BY4741, W303 y BWG1-7a, se pueden explicar teniendo en cuenta que el mecanismo de resistencia a cisplatino es multifactorial y muy complejo. Por lo tanto, la acumulación de cambios genéticos diferentes y desconocidos en cada cepa puede dar lugar a divergencias en la manifestación del fenotipo de resistencia a cisplatino.

### **1.4. Análisis de resistencia a espermina.**

Para evaluar la resistencia a espermina, se sembraron 5μL del cultivo de las células de las cepas BY4741, W303, y BWG1-7a, así como todos sus derivados, en placas petri con concentraciones de 1, 2, ó 4 mmol/L de espermina en medio de cultivo YPD (*yeast extract-peptone-dextrose*). La cepa BY4741 es más resistente que las otras cepas a espermina, y se necesita una

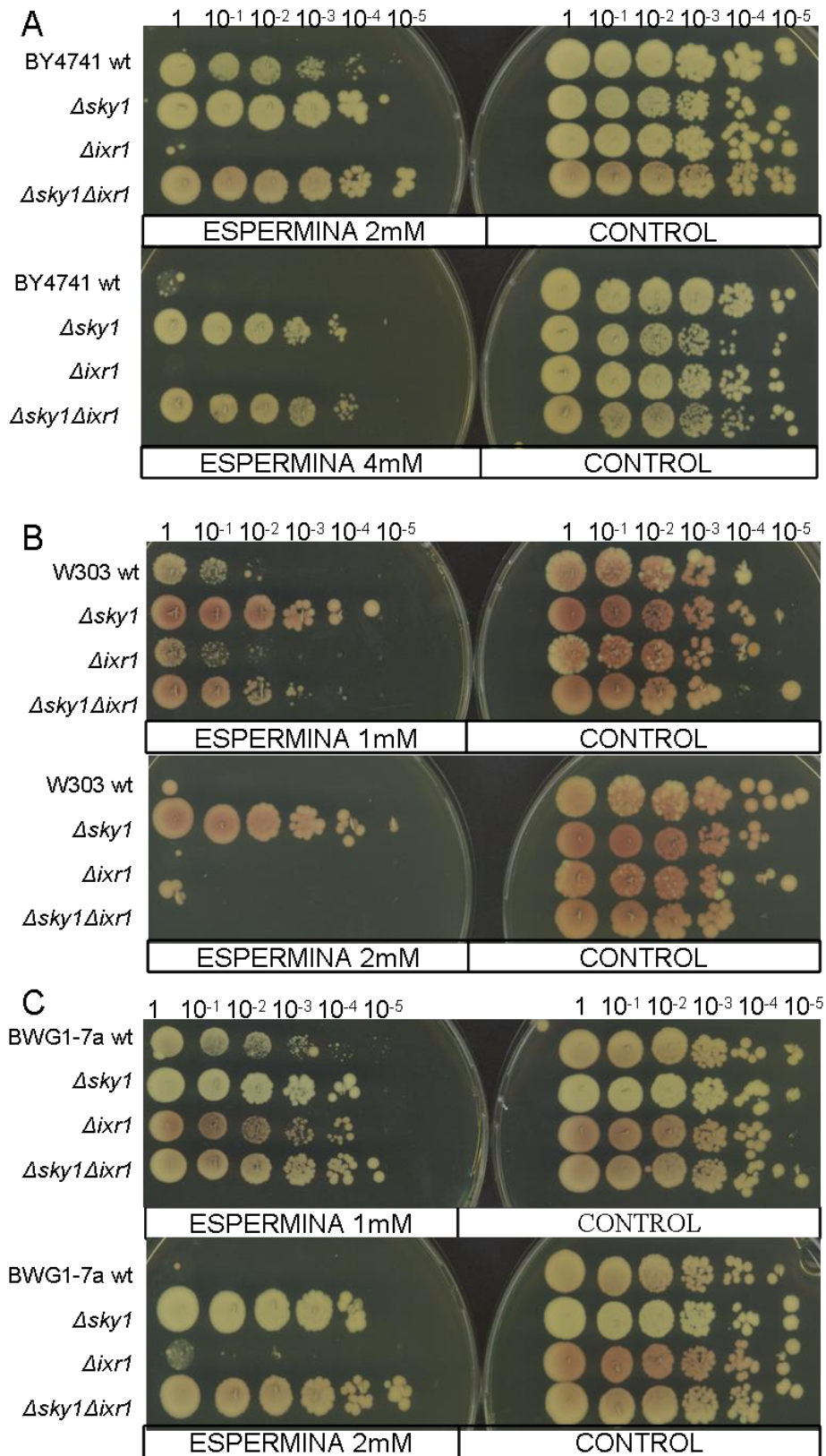
## **Análisis genético para determinar la relación entre los genes *IXR1* y *SKY1* de *Saccharomyces cerevisiae* en la respuesta a cisplatino y espermina.**

---

concentración de 4 mmol/L para inhibir el crecimiento de esta cepa, mientras que W303 y BWG1-7a son sensibles a concentraciones de espermina 2 mmol/L. Por lo tanto, la resistencia a cisplatino y espermina muestran paralelismo en los tres fondos genéticos analizados. La delección  $\Delta sky1$  aumenta la resistencia a la poliamina en los tres fondos genéticos analizados. El efecto de la supresión  $\Delta ixr1$  en la resistencia a poliaminas no se había descrito anteriormente, pero hemos observado (Fig. 20) que en la cepa BY4741 esta supresión aumenta la sensibilidad a espermina, mientras que no se observa efecto alguno en las cepas  $\Delta ixr1$  derivadas de los fondos W303 o BWG1-7a. Las consecuencias de la doble delección  $\Delta ixr1\Delta sky1$  fueron diferentes en las tres cepas estudiadas. En BY4741 y BWG1-7a, la resistencia a espermina es similar en  $\Delta sky1$  y  $\Delta ixr1\Delta sky1$ . Esto es curioso, porque  $\Delta ixr1$  tiene un efecto sobre la resistencia a espermina en BY4741, pero no en BWG1-7a. Por el contrario, la doble delección  $\Delta ixr1\Delta sky1$  causa la pérdida de la resistencia a espermina observada como consecuencia de la delección  $\Delta sky1$  en W303 (Fig. 20). Analizando posibles diferencias genéticas entre las cepas que puedan explicar el diferente fenotipo, observamos que W303 presenta una mutación *can1-100*, mientras que BY4741 y BWG1-7a no tienen mutaciones conocidas en el locus *CAN1*. *CAN1* codifica para una permeasa de arginina de la membrana plasmática, donde se asocia exclusivamente con los denominados *lipid rafts*, que son microdominios (10-200nm) heterogéneos y especializados de la membrana, tanto en su composición como en su funcionalidad, implicados en muchos procesos celulares, fundamentalmente en la dinámica de los componentes de las membranas y en la señalización celular; también son sitios de entrada para virus y toxinas y puntos de ensamblaje y salida para ciertos virus (Opekarová *et al.*, 2002). La mutación de *CAN1* confiere resistencia a canavanina (Opekarová *et al.*, 2002). Se ha descrito que la espermina ejerce presión selectiva en contra de las células resistentes a canavanina, pero el mecanismo para esta selección nunca se ha explicado (McDougall y Lemontt, 1979). Se desconoce por el momento si la mutación del gen *CAN1* puede alterar las interacciones funcionales existentes entre los genes *SKY1* e *IXR1* en la configuración de un fenotipo de resistencia a espermina o poliaminas.



**Análisis genético para determinar la relación entre los genes *IXR1* y *SKY1* de *Saccharomyces cerevisiae* en la respuesta a cisplatino y espermina.**



**Figura 20.** Efecto del tratamiento con espermina sobre células mutadas de diferentes cepas. **A.-** Cepa BY4741 y derivadas, **B.-** Cepa W303y derivadas, y **C.-** Cepa BWG1-7<sup>a</sup> y derivadas.



## **CAPÍTULO 2**

**EFFECTO DEL CISPLATINO Y LA DELECIÓN DE *SKY1* SOBRE  
EL PROTEOMA DE *Saccharomyces cerevisiae* ENRIQUECIDO EN  
FOSFOPROTEINAS**



# Efecto del cisplatino y la delección de *SKY1* sobre el proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecido en fosfoproteínas

---

## 2.1. Introducción.

La proteína Sky1p es el único miembro de la familia de las proteín-quinatas SR que se encuentra presente en *Saccharomyces cerevisiae*. Cuando las células de levadura se tratan con el fármaco anti-cancerígeno cisplatino, es necesaria la actividad quinasa de Sky1p para producir el efecto citotóxico (Schenk *et al.* 2001, 2002). Como las células de *S. cerevisiae* portadoras de la delección  $\Delta sky1$  tienen un fenotipo hipermutador, se ha sugerido que Sky1p interviene en rutas específicas de la reparación del ADN (Schenk *et al.*, 2002). Sin embargo, se desconocen los mecanismos por los que Sky1p modula la sensibilidad a cisplatino en levaduras. Puesto que existen similitudes estructurales y funcionales entre Sky1p y otras proteínas homólogas de eucariotas superiores, el estudio de esta proteína en la levadura puede contribuir a ampliar los conocimientos sobre los mecanismos de sensibilidad y/o resistencia a cisplatino en células eucariotas.

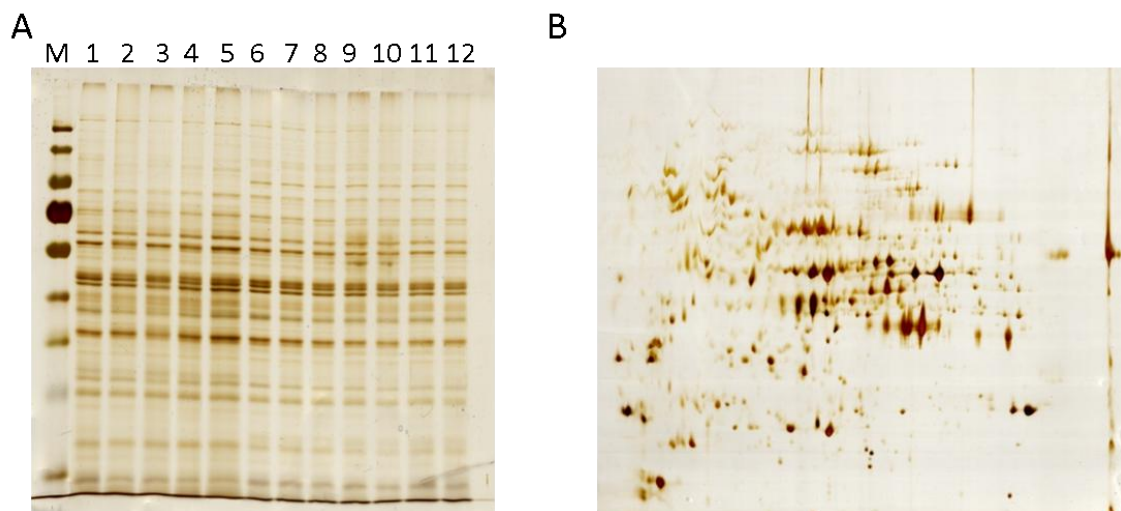
Siguiendo los objetivos planteados, en este capítulo se describen los estudios realizados utilizando técnicas de proteómica. Mediante la evaluación de los efectos producidos por el tratamiento con cisplatino y/o la delección de *SKY1* se pretende avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares de respuesta a cisplatino que puedan estar mediados a través de esta proteín-quinasa SR.

## 2.2. Diseño experimental.

En este análisis se utilizó la cepa de *S. cerevisiae* W303 (MATa *ade2-1 can1-100 leu2-3,112 trp1-100 ura3-52*) y su isogénica  $\Delta sky1$ , cuya construcción se describe en el Capítulo 1. Se realizaron tres réplicas biológicas con o sin tratamiento con cisplatino. Los cultivos para pre-inóculos se iniciaron en 20ml de medio SD a partir de alícuotas de cada una de las cepas conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente se midió la densidad óptica y se re-inocularon nuevos cultivos en matraces de 1 L con 500 mL de medio SD a una  $\text{DO}_{600}$  inicial de 0,05. Estos cultivos se dejaron crecer a  $30^{\circ}\text{C}$  en agitación durante aproximadamente 14h. A continuación, se dividieron los cultivos en dos matraces de 500 mL con 250mL. El primero, utilizado como control, se suplementó con di-metil-sulfóxido (DMSO) y el segundo con cisplatino disuelto en DMSO a una concentración final de  $600\mu\text{M}$ . Se continuó la incubación a  $30^{\circ}\text{C}$  en agitación y oscuridad (en caja opaca) durante 4 horas.

## Efecto del cisplatino y la delección de *SKY1* sobre el proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecido en fosfoproteínas

A continuación se procedió a la obtención de extractos enriquecidos en fosfoproteínas tal y como se describe en el apartado 8.1 de Materiales y métodos. Los extractos obtenidos se precipitaron con TCA separando sobrenadante y sedimento por centrifugación a 9.000 x g y 4°C. Se solubilizó el sedimento mediante agitación suave durante 1 hora en un tampón de lisis con urea compatible con el isoelectroenfoque (Ruiz-Romero *et al.*, 2006). Para cuantificar las proteínas, se diluyeron por triplicado entre 2-4 µL de cada muestra en 50 mL de agua y se utilizó la técnica Pierce BCA (ácido bicinconínico). Se confirmó que la cuantificación era correcta mediante la carga de 5 µg de cada muestra en un gel SDS-page convencional y su posterior tinción con plata (Fig. 21A). Una de las muestras se cargó también en un gel DIGE que se tiñó con plata (Fig. 21B).



**Figura 21.** A.- Gel monodimensional teñido con plata. Muestras: 1-3, W303 sin tratamiento; 4-6, W303 tratadas con cisplatino; 7-9,  $\Delta sky1$  sin tratamiento; 10-12,  $\Delta sky1$  tratadas con cisplatino. B.- Gel DIGE teñido con plata.

La comparación proteómica de las cuatro condiciones experimentales (12 muestras) se realizó a través de seis geles DIGE utilizando 45 µg de proteína total por gel. Se marcaron las proteínas de cada muestra con un conjunto de colorantes fluorescentes de acuerdo con el protocolo del fabricante para el etiquetado mínimo (Tabla 49). Para asegurarse de que no había artefactos por el marcaje, las muestras se marcaron con Cy3 o Cy5, mientras que el control interno se marcó con Cy2, tal y como se describe en el apartado correspondiente de Materiales y métodos.

# Efecto del cisplatino y la delección de *SKY1* sobre el proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecido en fosfoproteínas

**Tabla 49.** Distribución de las muestras en los geles DIGE.

Distribución de las muestras	Cy2	Cy3	Cy5
Gel1	Control	Wt-NT1	Mut-NT1
Gel2	Control	Mut-T1	Wt-NT2
Gel3	Control	Wt-NT3	Wt-T1
Gel4	Control	Mut-NT2	Mut-T2
Gel5	Control	Wt-T2	Mut-NT3
Gel6	Control	Mut-T3	Wt-T3

Wt, W303; Mut,  $\Delta sky1$ ; T tratada con cisplatino; NT, sin cisplatino.

Una vez marcadas las muestras se procedió con la realización de la electroforesis bidimensional DIGE y visualización de la misma. Las manchas de interés visualizadas en el gel DIGE se extrajeron manualmente y se analizaron mediante espectrometría de masas (ms). La masa peptídica monoisotópica obtenida por MS y la secuencia de aminoácidos obtenida de la fragmentación de cada péptido mediante análisis MS/MS se usó para buscar proteínas candidatas a través de la versión 2.2 de Mascot desde Matrix Science. Para los análisis estadísticos se utilizaron herramientas de normalización y análisis a través del programa *SameSpots* y *Protein Pilot*. Todos estos procedimientos aparecen descritos con detalle en el apartado de Materiales y métodos. Se consideraron como estadísticamente significativos sólo los cambios con p-valor  $\leq 0.03$  y un ratio de variaciones de niveles de expresión entre distintas cepas o condiciones de  $\geq 1.2$ .

## 2.3. Resultados.

### 2.3.1.- Análisis DIGE 2-D.

Las células obtenidas a partir de tres cultivos independientes de las cepas de *S. cerevisiae* W303 y su derivado  $\Delta sky1$ , sin tratamiento o con la adición de cisplatino, se utilizaron para el aislamiento de proteínas, el enriquecimiento de fosfoproteínas y el análisis DIGE 2-D. Se obtuvieron imágenes de cada gel, que se corresponden con las muestras marcadas con Cy2, Cy3 y Cy5. Las imágenes de los 12 geles fueron analizadas utilizando el programa *SameSpots Progenesis V3.2* (Dinámica no lineal) disponible a través

## **Efecto del cisplatino y la delección de *SKY1* sobre el proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecido en fosfoproteínas**

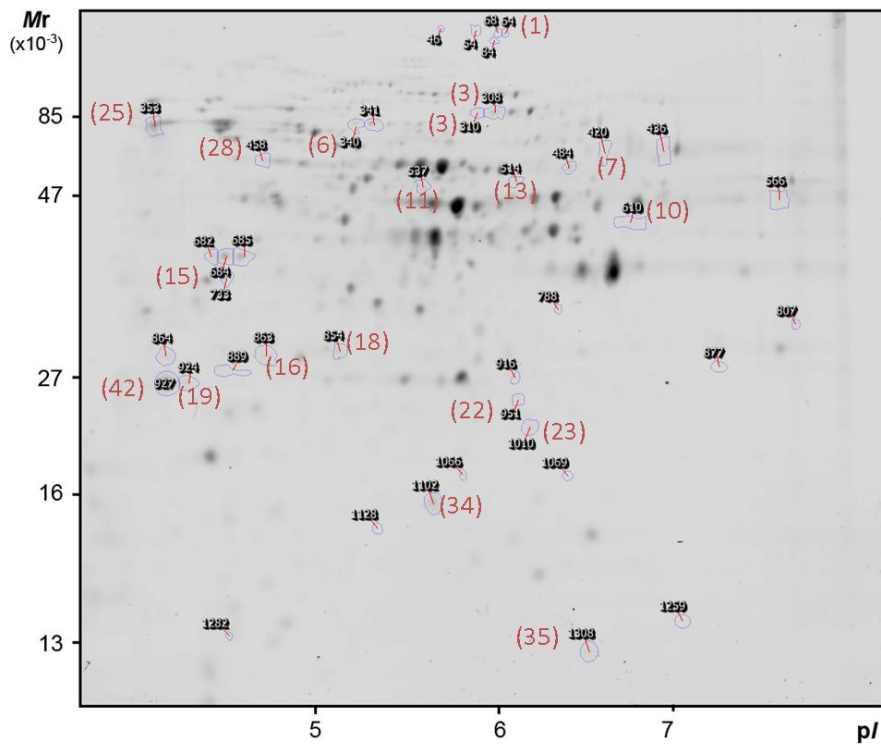
---

de [<http://www.nonlinear.com/products/progenesis/samespots/>]. El análisis de imágenes permitió localizar 953 puntos. La normalización entre geles se llevó a cabo utilizando el programa *SameSpots Progenesis V3.2* (Dinámica no lineal).

Cuando se compararon las proteínas detectadas en la cepa W303 con y sin tratamiento con cisplatino se comprobó que 16 puntos incrementaban su intensidad después del tratamiento y 24 disminuían. Estos puntos se identifican en la imagen de gel DIGE de la Figura 22; la Tabla 50 muestra los que fueron identificados por MALDI-TOF/TOF. Cuando se compararon las proteínas de la cepa  $\Delta sky1$  con y sin tratamiento con cisplatino, se observó que aumentaba la intensidad de 25 puntos y disminuía en 14. Estos puntos se representan en la imagen de gel DIGE en la Figura 23 y las identificaciones se enumeran en la Tabla 51. La comparación de las proteínas de las cepas W303 y  $\Delta sky1$  sin tratamiento mostró que aumentaban 12 puntos en el mutante mientras que disminuían 18. Estos puntos se muestran en la Figura 24 y las identificaciones se muestran en la Tabla 52. La comparación de las proteínas de las cepas W303 y  $\Delta sky1$  ambas tratadas con cisplatino mostró que aumentaba en 22 puntos en el mutante mientras que disminuía en 14. Estos puntos se muestran en la Figura 25 y las identificaciones se detallan en la Tabla 53.



## Efecto del cisplatino y la delección de *SKY1* sobre el proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecido en fosfoproteínas



**Figura 22.** Mapa representativo del fosfoproteoma con el control interno Cy2, que indica las proteínas alteradas en la cepa haploide W303 de *S. cerevisiae* después del tratamiento con cisplatino. Las proteínas se separaron en un rango de pH 3-11 (no lineal) en la primera dimensión y en un gel de acrilamida al 12% en la segunda dimensión. Las proteínas que mostraron una alteración significativa en su expresión después del tratamiento con cisplatino se identificaron con espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF y se enumeran en la Tabla 50 donde están indicadas con el mismo número que aparece en la figura.

**Tabla 50.** Proteínas diferencialmente expresadas en la cepa silvestre tratada con cisplatino *versus* no tratada.

Grupo Funcional	Spot	Anova (p)	Ratio	ID	Identificación	Experimental		Teórico		
						Mr	pl	Mr	pl	
-	64	0.010	3.5	1	No Identificada		135	5.8		
-	1308	0.060	2.0	35	No Identificada		12	6.46		
-	863	0.059	1.7	16	No Identificada		30	4.78		
-	514	0.042	1.3	13	No Identificada		53	5.87		
Metabolismo de aminoácidos	310	0.019	1.3	3	5-metiltetrahydropteriltriglutamato--homocisteina metiltransferasa	<i>MET6;</i> <i>YER091C</i>	73	5.70	85.86	6.07
Metabolismo de aminoácidos	537	0.043	1.3	11	Homocitrato sintasa	<i>LYS20;</i> <i>YDL182W</i>	51	5.58	47.099	6.84
Respuesta a estrés	340	0.056	1.3	6	Proteína de choque térmico ST11	<i>ST11;</i> <i>YOR027W</i>	69	5.34	66.265	5.45
Metabolismo de aminoácidos	308	0.027	1.2	3	5-metiltetrahydropteriltriglutamato--homocisteina metiltransferasa	<i>MET6;</i> <i>YER091C</i>	73	5.74	85.86	6.07
Metabolismo de carbohidratos	458	0.056	1.2	28	Hexoquinasa-2	<i>HXK2;</i> <i>YGL253W</i>	55	4.09	54.136	5.16
Ciclo celular	924	0.060	-1.5	19	Proteína no caracterizada YLR179C	<i>YLR179C</i>	27	3.98	22.151	4.77
-	927	0.059	-1.4	42	No Identificada		27	3.78		
Metabolismo de nucleótidos	684	0.024	-1.4	15	Adenosin quinasa	<i>ADO1;</i> <i>YJR105W</i>	41	4.36	36.372	4.99
Metabolismo de nucleótidos	1010	0.058	-1.4	23	Guanilato quinasa	<i>GUK1;</i> <i>YDR454C</i>	22	5.98	20.637	6.63
-	420	0.024	-1.3	7	No Identificada		59	6.59		
Respuesta a estrés	1102	0.061	-1.3	34	Superoxido dismutasa [Cu-Zn]	<i>SOD1;</i> <i>YJR104C</i>	16	5.62	15.855	5.62
Metabolismo de carbohidratos	610	0.052	-1.3	10	Alcohol dehidrogenasa 1	<i>ADH1;</i> <i>YOL086C</i>	45	6.89	36.849	6.21
Metabolismo de aminoácidos					Fosfo-2-dehidro-3-deoxiheptonato aldolasa, inhibida por tirosina	<i>ARO4;</i> <i>YBR249C</i>			40.009	6.47
Destino de las proteínas	353	0.063	-1.3	25	Carboxipeptidasa S	<i>CPS1;</i> <i>YJL172W</i>	68	3.65	64.597	5.3
Destino de las proteínas					Proteína disulfuro isomerasa	<i>PDI1;</i> <i>YCL043C</i>			58.227	4.38
Destino de las proteínas	951	0.052	-1.2	22	Componente PRE2 del proteosoma	<i>PRE2;</i> <i>YPR103W</i>	25	5.9	31.636	5.82
Metabolismo de carbohidratos	854	0.031	-1.2	18	6-Fosfogluconolactonasa	<i>SOL3;</i> <i>YHR163W</i>	31	5.21	27.784	5.32

Spot, número asignado a cada proteína de acuerdo a las Figuras 22-25.

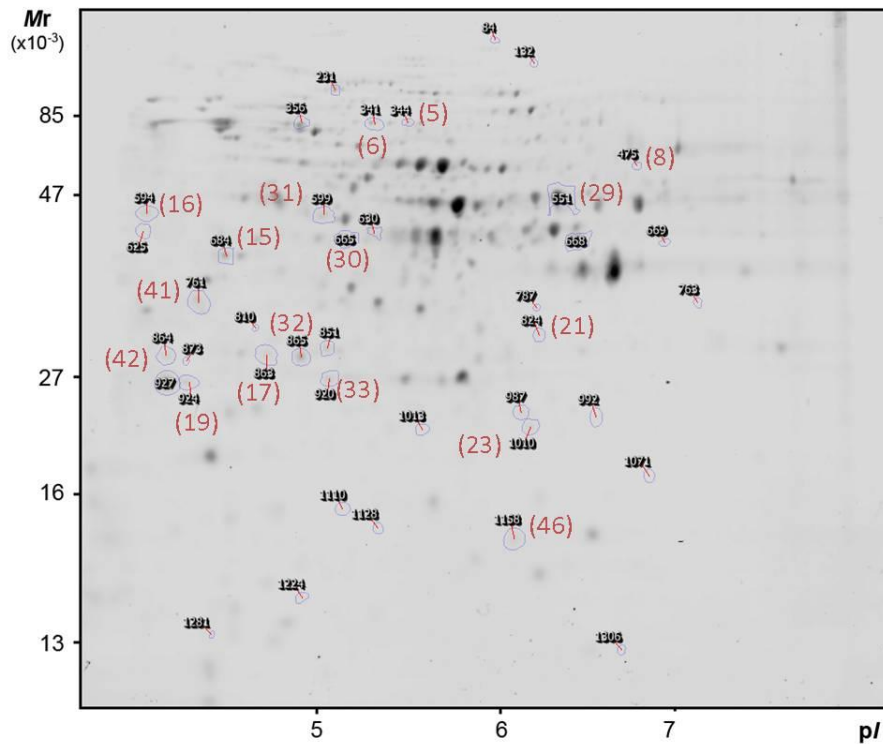
ID, número de identificación de la proteína.

Ratio = Promedio de la ratio, positivo cuando el valor del tratamiento es mayor, negativo cuando el valor del no tratado es mayor.

Mr y pl experimental calculado a través del análisis de las imágenes del gel como se explica en el texto.

Mr y pl teórico previsto en base a la secuencia de la proteína y al resultado de su búsqueda en Mascot.

## Efecto del cisplatino y la delección de SKY1 sobre el proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecido en fosfoproteínas



**Figura 23.** Mapa representativo del fosfoproteoma con el control interno Cy2, y que indica las proteínas alteradas en la cepa mutante W303  $\Delta sky1$  de *S. cerevisiae* después del tratamiento con cisplatino. Las proteínas se separaron en un rango de pH 3-11 (no lineal) en la primera dimensión y en un gel de archilamida al 12% en la segunda dimensión. Las proteínas que mostraron una alteración significativa en su expresión después del tratamiento con cisplatino se identificaron con espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF y se enumeran en la Tabla 51 donde están indicadas con el mismo número que aparece en la figura.

**Tabla 51.** Proteínas diferencialmente expresadas en la cepa mutante  $\Delta sky1$  tratada con cisplatino *versus* no tratada.

Grupo Funcional	Spot	Anova (p)	Ratio	ID	Identificación	Experimental		Teórico		
						Mr	pl	Mr	pl	
Respuesta a estrés	865	0.057	4.4	32	Proteína de choque térmico 26	HSP26; YBR072W	30	5.11	23.88	5.31
-	863	0.051	2.2	17	No Identificada		30	4.78		
Metabolismo de carbohidratos	475	0.049	1.8	8	UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa	UGP1; YKL035W	54	6.89	55.988	6.98
Destino de las proteínas	824	0.033	1.7	21	Cerevisina	PRB1; YEL060C	32	6.04	69.621	5.94
Destino de la célula	599	0.057	1.5	31	Actina OS	ACT1; YFL039C	45	5.22	41.69	5.44
-	594	0.060	1.4	16	No Identificada		46	3.57		
Metabolismo de carbohidratos	920	0.056	1.4	33	Triosefosfato isomerasa	TPI1; YDR050C	27	5.24	26.795	5.74
Metabolismo de carbohidratos	551	0.057	1.3	29	Enolasa 1	ENO1; YGR254W	48	6.16	46.816	6.16
Metabolismo de lípidos	665	0.059	1.3	30	Farnesil pirofosfato sintetasa	ERG9;YH R190W	43	5.3	40.483	5.32
Respuesta a estrés	341	0.038	1.3	6	Proteína de choque térmico STI1	STI1; YOR027W	69	5.4	66.265	5.45
Destino de la célula	761	0.019	1.3	41	Proteína BMH1	BMH1; YER177W	36	4.09	30.091	4.82
-	344	0.039	1.2	5	No Identificada		69	5.53		
Respuesta a estrés	1158	0.056	-1.5	46	Proteína de choque térmico 104	HSP104; YLL026W	15	5.87	102.035	5.31
Síntesis de proteínas	927	0.059	-1.5	42	Proteína homóloga a la Proteína humana tumoral controlada traduccionalmente (TCTP)	TMA19; YKL056C	17	3.78	18.741	4.41
Síntesis de proteínas	864	0.063	-1.4	42	Proteína homóloga a la Proteína humana tumoral controlada traduccionalmente (TCTP)	TMA19; YKL056C	30	3.78		
Ciclo celular	924	0.053	-1.4	19	Proteína no caracterizada YLR179C	YLR179C	27	3.98	22.151	4.77
Metabolismo de nucleótidos	1010	0.004	-1.3	23	Guanilato quinasa	GUK1; YDR454C	22	5.98	20.637	6.63
Metabolismo de nucleótidos	684	0.055	-1.3	15	Adenosin quinasa	ADO1; YJR105W	41	4.36	36.372	4.99

Spot, número asignado a cada proteína de acuerdo a las Figuras 22-25.

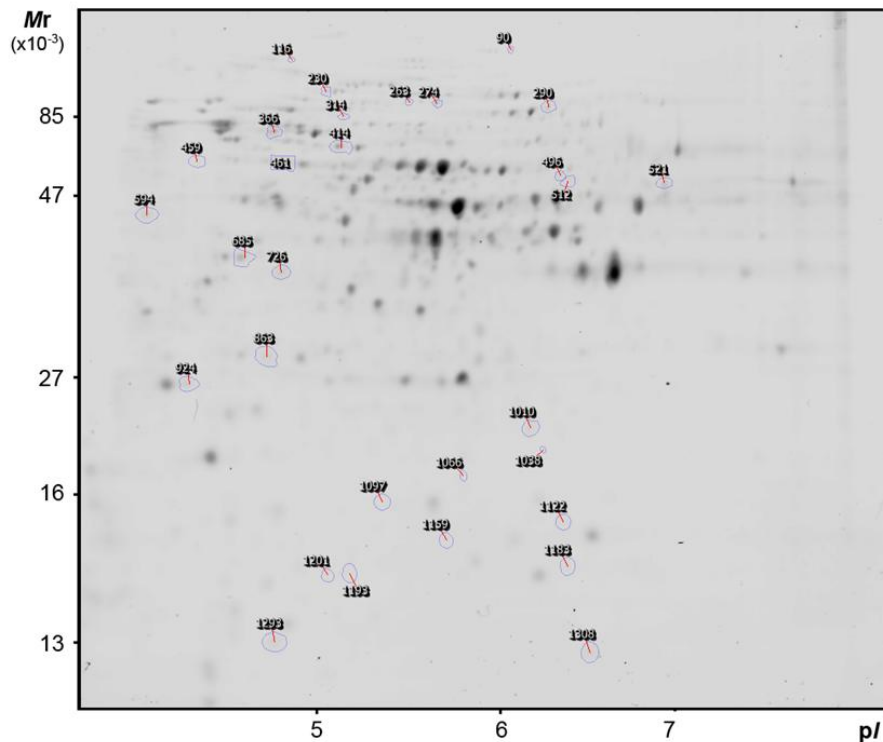
ID, número de identificación de la proteína.

Ratio = Promedio de la ratio, positivo cuando el valor del tratamiento es mayor, negativo cuando el valor del no tratado es mayor.

Mr y pl experimental calculado a través del análisis de las imágenes del gel como se explica en el texto.

Mr y pl teórico previsto en base a la secuencia de la proteína y al resultado de su búsqueda en Mascot.

## Efecto del cisplatino y la delección de SKY1 sobre el proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecido en fosfoproteínas



**Figura 24.** Mapa representativo del fosfoproteoma con el control interno Cy2, y que indica las proteínas alteradas en la cepa de *S. cerevisiae* W303 versus su mutante derivado  $\Delta sky1$ . Las proteínas se separaron en un rango de pH 3-11 (no lineal) en la primera dimensión y en un gel de archilamida al 12% en la segunda dimensión. Las proteínas que mostraron una alteración significativa en su expresión de las muestras  $\Delta sky1$  se identificaron con espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF y se enumeran en la Tabla 52 donde están indicadas con el mismo número que aparece en la figura.

**Tabla 52.** Proteínas diferencialmente expresadas en la cepa mutante  $\Delta sky1$  versus cepa silvestre.

Grupo Funcional	Spot	Anova (p)	Ratio	ID	Identificación	Experimental		Teórico		
						Mr	pl	Mr	pl	
-	1308	0.054	1.8	35	No Identificada	12	6.46			
	230	0.057	1.5	45	No Identificada	89	5.24			
	1097	0.046	1.3	24	No Identificada	16	5.43			
	274	0.041	1.2	4	No Identificada	80	5.63			
Metabolismo de carbohidratos	461	0.025	1.2	28	Hexoquinasa-2	<i>HXK2; YGL253W</i>	55	4.91	53.942	5.16
-	116	0.021	-1.8	44	No Identificada		114	5.01		
Ciclo celular	726	0.056	-1.7	47	Ribonucleosido-difosfato reductasa de cadena corta 2	<i>RNR4; YGR180C</i>	39	4.92	40.055	5.11
Ciclo celular	924	0.051	-1.6	19	Proteína no caracterizada YLR179C	<i>YLR179C</i>	27	3.98	22.151	4.77
Metabolismo de carbohidratos	290	0.048	-1.3	2	Acetil-coenzima A sintetasa 2	<i>ACS2; YLR153C</i>	76	6.1	75.492	6.21
Metabolismo de nucleótidos	521	0.032	-1.3	9	Serina hidroximetiltransferasa, citosólica	<i>SHM2; YLR058C</i>	53	7.24	52.218	6.98
Metabolismo de nucleótidos	1010	0.049	-1.3	23	Guanilato quinasa	<i>GUK1; YDR454C</i>	22	5.98	20.637	6.63
	594	0.059	-1.3	16	No Identificada		46	3.57		
	863	0.048	-1.3	17	No Identificada		30	4.78		
Respuesta a estrés	1293	0.054	-1.3	36	Profilina	<i>PFY1; YOR122C</i>	13	4.85	13.677	5.47
Respuesta a estrés	366	0.044	-1.2	27	Proteína de choque térmico SSB1	<i>SSB1; YDL229W</i>	67	4.86	66.602	5.32
-	512	0.023	-1.2	12	No Identificada		53	6.29		

Spot, número asignado a cada proteína de acuerdo a las Figuras 22-25.

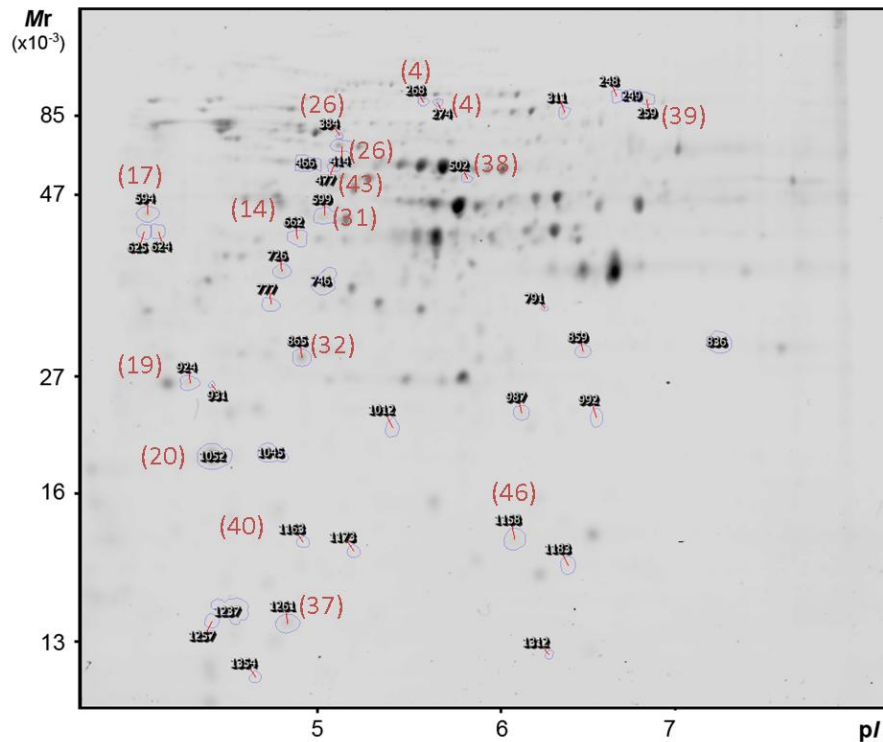
ID, número de identificación de la proteína.

Ratio= Promedio de la ratio, positivo cuando el valor del tratamiento es mayor, negativo cuando el valor del no tratado es mayor.

Mr y pl experimental calculado a través del análisis de las imágenes del gel como se explica en el texto.

Mr y pl teórico previsto en base a la secuencia de la proteína y al resultado de su búsqueda en Mascot.

## Efecto del cisplatino y la delección de SKY1 sobre el proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecido en fosfoproteínas



**Figura 25.** Mapa representativo del fosfoproteoma con el control interno Cy2, y que indica las proteínas alteradas en la cepa de *S. cerevisiae* W303 versus su mutante derivado  $\Delta sky1$ , después del tratamiento con cisplatino. Las proteínas se separaron en un rango de pH 3-11 (no lineal) en la primera dimensión y en un gel de archilamida al 12% en la segunda dimensión. Las proteínas que mostraron una alteración significativa en su expresión de las muestras  $\Delta sky1$  se identificaron con espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF y se enumeran en la Tabla 53 donde están indicadas con el mismo número que aparece en la figura.

**Tabla 53.** Proteínas diferencialmente expresadas en la cepa mutante  $\Delta sky1$  versus cepa silvestre ambas tratadas con cisplatino

Grupo Funcional	Spot	Anova (p)	Ratio	ID	Identificación	Experimental		Teórico		
						Mr	pl	Mr	pl	
-	1163	0.027	1.5	40	No Identificada		15	5.13		
Destino de las proteínas	502	0.057	1.5	38	Aminopeptidasa vacuolar 1	<i>LAP4; YKL103C</i>	53	5.68	57.093	5.55
Respuesta a estrés	865	0.352	1.4	32	Proteína de choque térmico 26	<i>HSP26; YBR072W</i>	30	5.11	23.88	5.31
-	274	0.002	1.3	4	No Identificada		80	5.63		
Metabolismo de carbohidratos	384	0.058	1.3	26	Aldehido dehidrogenasa activada por magnesio, citosólica	<i>ALD6; YPL061W</i>	65	5.28	54.414	5.31
Metabolismo de aminoácidos	477	0.059	1.3	43	Treonin sintetasa	<i>THR4; YCR053W</i>	54	5.26	57.474	5.46
Destino de la célula	599	0.059	1.3	31	Actina OS	<i>ACT1; YFL039C</i>	45	5.22	41.69	5.44
Respuesta a estrés	1052	0.055	1.3	20	Peroxiredoxina tipo-2	<i>AHP1; YLR109W</i>	19	4.21	19.115	5.01
Metabolismo de carbohidratos	414	0.053	1.2	26	Aldehido dehidrogenasa activada por magnesio, citosólica	<i>ALD6; YPL061W</i>	61	5.28	54.414	5.31
-	268	0.046	1.2	4	No Identificada		81	5.58		
-	594	0.040	1.2	17	No Identificada		46	3.57		
Ciclo celular	924	0.011	-1.6	19	Proteína no caracterizada YLR179C	<i>YLR179C</i>	27	3.98	22.151	4.77
Ciclo celular	1158	0.056	-1.5	46	Proteína de choque térmico 104	<i>HSP104; YLL026W</i>	15	5.87	102.035	5.31
Metabolismo de carbohidratos	259	0.057	-1.4	39	Aconitato hidratasa, mitocondrial	<i>ACO1; YLR304C</i>	82	6.97	85.368	8.17
-	662	0.035	-1.2	14	No Identificada		43	5.07		
-	1261	0.013	-1.2	37	No Identificada		14	4.97		

Spot, número asignado a cada proteína de acuerdo a las Figuras 22-25.

ID, número de identificación de la proteína.

Ratio = Promedio de la ratio, positivo cuando el valor del tratamiento es mayor, negativo cuando el valor del no tratado es mayor.

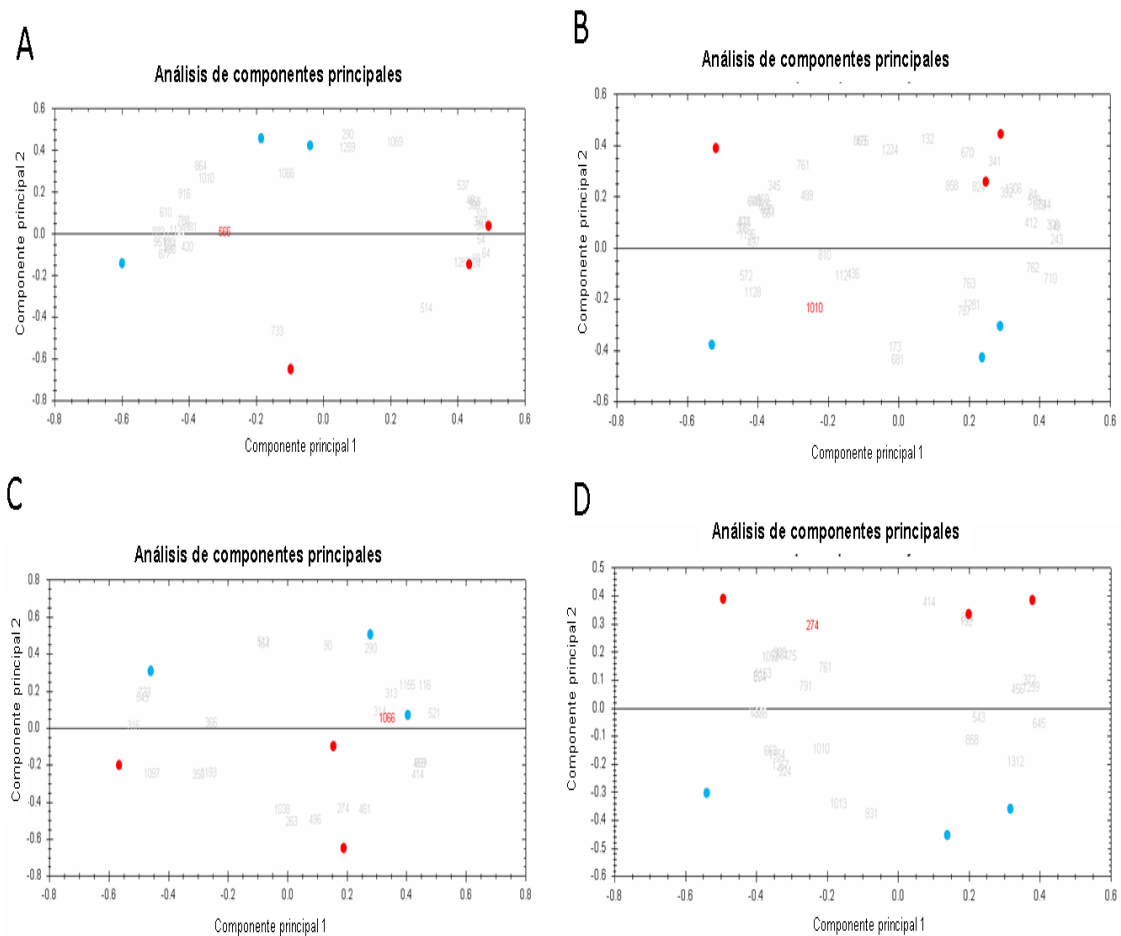
Mr y pl experimental calculado a través del análisis de las imágenes del gel como se explica en el texto.

Mr y pl teórico previsto en base a la secuencia de la proteína y al resultado de su búsqueda en Mascot.



## Efecto del cisplatino y la delección de SKY1 sobre el proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecido en fosfoproteínas

Se realizó un análisis estadístico multivariable para establecer la significación estadística de los cambios en las proteínas identificadas. Como se muestra en la Figura 26, el análisis de componentes principales (PCA) indica las diferencias entre los grupos comparados. La numeración de los puntos de proteínas en los gráficos (Fig. 26 A-D) se corresponde con la de las Tablas 50-53, respectivamente.



**Figura 26.** Análisis no supervisado de componentes principales (PCA) que indica la separación estadística entre los grupos comparados. Los puntos de proteínas numeradas en los gráficos (A-D) se corresponden con la información de las Tablas 50-53, respectivamente.

### 2.3.2.- Identificación de proteínas diferencialmente expresadas.

Para identificar las proteínas seleccionadas se digirieron en el propio gel y se analizaron por MALDI-TOF/TOF. Se recogieron un total de 47 puntos de los que se pudieron identificar 35 como proteínas de *S. cerevisiae*; los puntos muy pequeños se descartaron. Las Tablas 50-53 muestran información

## **Efecto del cisplatino y la delección de SKY1 sobre el proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecido en fosfoproteínas**

---

detallada acerca del peso molecular teórico y experimental, los valores de pI, números de acceso y los parámetros de identificación. La identificación mediante huella peptídica y espectrometría de masas se realizó en UniProt, mediante la búsqueda en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot [<http://www.expasy.ch/sprot>]. En algún caso se identificaron dos proteínas diferentes en el mismo punto (punto 1102 y punto 610 en la Tabla 50). Por último, las diferentes isoformas de las proteínas fueron asignadas por estimación del peso molecular experimental y las diferencias de pI en los geles, que podrían ser atribuibles a modificaciones post-traduccionales o a proteólisis (Met6, puntos 308 y 310 en la Tabla 50; TCTP, puntos 927 y 864 en la Tabla 51; Ald6, puntos 384 y 414 en la Tabla 53).

La mayoría de las proteínas diferencialmente expresadas identificadas en este estudio han sido previamente reconocidas como fosfoproteínas identificadas mediante análisis convencionales o de fosfoproteómica. También en algunos casos se han identificado los aminoácidos específicos que son fosforilados, bajo los tratamientos o condiciones ensayadas en estudios previos. Un resumen de la información disponible a través de bases de datos y bibliografía se muestra en la Tabla 54. Sin embargo, las proteínas 6-fosfogluconolactonasa (codificada por *SOL3*), profilina (codificada por *PFY1*), carboxipeptidasa S (codificada por *CPS1*) y YLR179C no caracterizada, no habían sido descritas previamente a nuestro estudio como fosfoproteínas. Aunque su pI teórico es bajo, la diferencia con el pI calculado experimentalmente podría indicar que se encuentran fosforiladas al menos en el caso de la profilina, carboxipeptidasa S e YLR179C en que la diferencia entre el Pi teórico y el experimental es notable. Ninguna de ellas contiene una secuencia similar a la predicha para el reconocimiento de sustratos de Sky1p, R(E/S)RSP(T/V)R (Nolen *et al.*, 2001).

**Tabla 54.** Aminoácidos previamente identificados como fosforilados en las proteínas identificadas en este estudio.

Spot	ID	Función	Gen	Lugar de fosforilación	Referencia
290	2	Acetil-coenzima A sintetasa 2	ACS2; YLR153C	No hay datos	
308 - 310	3	Metiltransferasa	MET6; YER091C	S89	Li <i>et al.</i> , 2007.
340 - 341	6	Proteína de choque térmico ST11	ST11; YOR027W	S2, S227, S523	Albuquerque <i>et al.</i> , 2008.
475	8	UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa	UGP1; YKL035W	T9, T12, S17, T19, S21/S11/S183	Chi <i>et al.</i> , 2007; Li <i>et al.</i> , 2007; Smolka <i>et al.</i> , 2007.
521	9	Serina hidroximetiltransferasa	SHM2; YLR058C	S26	<a href="http://phosphopep.org/">http://phosphopep.org/</a>
610	10a	Alcohol dehidrogenasa 1	ADH1; YOL086C	S290, S316 /S213, T223/ T325	Gruhler <i>et al.</i> , 2005; Chi <i>et al.</i> , 2007; Albuquerque <i>et al.</i> , 2008.
610	10b	Fosfo-2-dehidro-3-deoxiheptonato aldolasa	ARO4; YBR249C	S2, S4, T44, S47	Albuquerque <i>et al.</i> , 2008.
537	11	Homocitrato sintetasa	LYS20; YDL182W	S395, S396, S401/S410	Chi <i>et al.</i> , 2007; Albuquerque <i>et al.</i> , 2008.
684	15	Adenosin quinasa	ADO1; YJR105W	T254, S283	<a href="http://phosphopep.org/">http://phosphopep.org/</a>
854	18	6-Fosfogluconolactonasa	SOL3; YHR163W	No hay datos	
924	19	Proteína no caracterizada YLR179C	YLR179C	No hay datos	
1052	20	Peroxiredoxina tipo-2	AHP1; YLR109W	S2/S22/S51, S171	Gruhler <i>et al.</i> , 2005; Chi <i>et al.</i> , 2007; Albuquerque <i>et al.</i> , 2008.
824	21	Cerevisina	PRB1; YEL060C	S58	Chi <i>et al.</i> , 2007.
951	22	Componente PRE2 O del proteosoma	PRE2; YPR103W	S51	<a href="http://phosphopep.org/">http://phosphopep.org/</a>
1010	23	Guanilato quinasa	GUK1; YDR454C	S149	Li <i>et al.</i> , 2007.
353	25	Carboxipeptidasa S	CPS1; YJL172W	No hay datos	
353	25	Proteína disulfuro isomerasa	PDI1; YCL043C	S464, Y467	<a href="http://phosphopep.org/">http://phosphopep.org/</a>

**Tabla 54.** Aminoácidos previamente identificados como fosforilados en las proteínas identificadas en este estudio (continuación).

Spot	ID	Función	Gen	Lugar de fosforilación	Referencia
384 - 414	26	Aldehído dehidrogenasa activada por magnesio	<i>ALD6; YPL061W</i>	S262/T487	Li <i>et al.</i> , 2007; Chi <i>et al.</i> , 2007.
366 - 458 - 461	27	Proteína de choque térmico SSB1	<i>SSB1; YDL229W</i>	T461/ S250, T251, S262	Chi <i>et al.</i> , 2007; Albuquerque <i>et al.</i> , 2008.
458-461	28	Hexquinasa-2	<i>HXK2; YGL253W</i>	S158/S15	Heidrich <i>et al.</i> , 1997; Ficarro <i>et al.</i> , 2002.
551	29	Enolasa 1	<i>ENO1; YGR254W</i>	S188/ S10, S119, S404/ S104, S188/ S14, S37, S40, T41, S96, S143, T324	Li <i>et al.</i> , 2007; Chi <i>et al.</i> , 2007; Smolka <i>et al.</i> , 2007; Albuquerque <i>et al.</i> , 2008.
665	30	Farnesil pirofosfato sintetasa	<i>ERG9; YHR190W</i>	No hay datos	
599	31	Actina OS	<i>ACT1; YFL039C</i>	S199, S201, S323, S324	Albuquerque <i>et al.</i> , 2008.
865	32	Proteína de choque térmico 26	<i>HSP26; YBR072W</i>	T42, S208, S211	Ficarro <i>et al.</i> , 2002; Smolka <i>et al.</i> , 2007.
920	33	Triosefosfato isomerasa	<i>TPI1; YDR050C</i>	S96, S100/ S71, S211, S215	Chi <i>et al.</i> , 2007; Albuquerque <i>et al.</i> , 2008.
1102	34	Superoxido dismutasa [Cu-Zn]	<i>SOD1; YJR104C</i>	S99, S112, S117, T132/ S15, S25, S26, S39, S103	Chi <i>et al.</i> , 2007; Albuquerque <i>et al.</i> , 2008.
1293	36	Profilina	<i>PFY1; YOR122C</i>	No hay datos	
502	38	Amino peptidasa 1 vacuolar	<i>LAP4; YKL103C</i>	S356, S452	Albuquerque <i>et al.</i> , 2008.
259	39	Aconitato hidratasa, mitocondrial	<i>ACO1; YLR304C</i>	T351	Albuquerque <i>et al.</i> , 2008.
761	41	Proteína BMH1	<i>BMH1; YER177W</i>	S65, S66, S86, S89	Chi <i>et al.</i> , 2007
927	42	Proteína homóloga a la Proteína humana tumoral controlada traduccionalmente (TCTP)	<i>TMA19; YKL056C</i>	S82, Y86, T101	<a href="http://phosphopep.org/">http://phosphopep.org/</a>
477	43	Treonina sintetasa	<i>THR4; YCR053W</i>	S441	<a href="http://phosphopep.org/">http://phosphopep.org/</a>
1158	46	Proteína de choque térmico 104	<i>HSP104; YLL026W</i>	S206	<a href="http://phosphopep.org/">http://phosphopep.org/</a>
726	47	Ribonucleosido-difosfato reductasa de cadena corta 2	<i>RNR4; YGR180C</i>	S5, S332, T334, S336/ S169	Li <i>et al.</i> , 2007; Chi <i>et al.</i> , 2007.

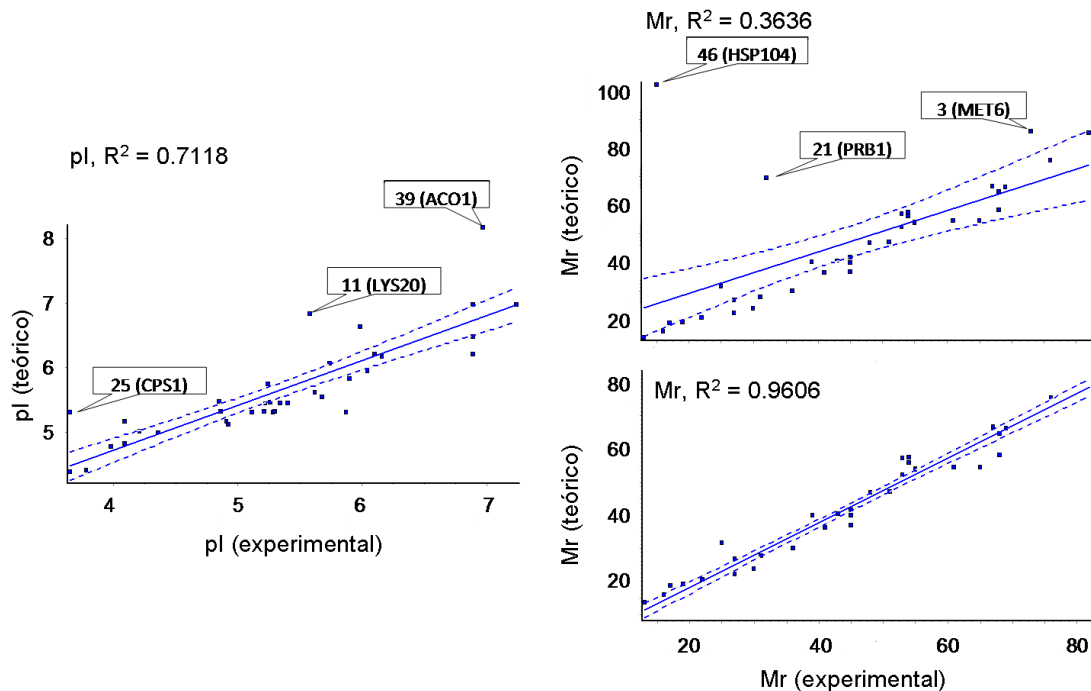
Spot, número asignado a cada proteína de acuerdo a las Figuras 22-25.

ID, número de identificación de la proteína.

## Efecto del cisplatino y la delección de SKY1 sobre el proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecido en fosfoproteínas

### 2.3.3.- Correlación entre los valores teóricos y experimentales de pI y Mr de las proteínas identificadas.

Los valores de pI y Mr resultantes de la predicción teórica y los datos experimentales se analizaron tomando los puntos de las cuatro comparaciones juntas (Fig. 27). La presencia de valores de pI teóricos y experimentales con baja correlación estadística ( $R^2 = 0.7118$ ), sugiere un alto grado de modificaciones post-traduccionales en las proteínas analizadas. Este resultado era esperable debido a que se realizó un enriquecimiento en fosfoproteínas previo al análisis DIGE. Incluso puede observarse en las imágenes que las proteínas se desplazan hacia la región ácida de los geles ya que la mayoría de ellas tiene un pI experimental menor de 6,3.



**Figura 27.** Comparación gráfica del peso molecular (Mr, en kDa) y el punto isoeléctrico (pI) teórico frente al determinado experimentalmente en el gel, para las isoformas de las proteínas identificadas en este estudio.

La correlación entre los valores de Mr experimentales y teóricos fue escasa cuando se analizaron en su conjunto ( $R^2 = 0,3636$ ), pero cuando se eliminaron los puntos más sesgados (Met6, Pbr1 y Hsp104)  $R^2$  aumentó ( $R^2 = 0,9606$ ). Analizando los resultados con detalle se observa que las discrepancias entre los valores Mr teóricos y experimentales se limita a la presencia de formas truncadas de estas tres proteínas y que presentan por

## Efecto del cisplatino y la delección de SKY1 sobre el proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecido en fosfoproteínas

---

tanto menor Mr. La alta correlación encontrada después de su eliminación fue utilizada como un nivel adicional de confianza para la identificación de proteínas, que también contribuye a la validación de los resultados de los análisis proteómicos.

### 2.3.4.- Relación entre la abundancia de las proteínas en la célula y su identificación experimental.

La evaluación del número de moléculas de proteína presentes en la célula de levadura, (de acuerdo a Ghaemmaghami *et al.*, 2003) para las fosfoproteínas identificadas en nuestro estudio, muestra que las proteínas que presentan un número de 721 a 519.000 moléculas/célula están representadas entre las proteínas detectadas (Tabla 55). Este resultado indica que el método utilizado para el enriquecimiento en fosfoproteínas no excluye la captura de aquellas proteínas expresadas en altas o bajas cantidades.

**Tabla 55.** Abundancia celular y estabilidad de las proteínas identificadas en este estudio y en los sustratos conocidos de Sky1p.

Spot	ID	Gen	Moléculas/cel.	Índice de inestabilidad (*)	Clasificación
290	2	ACS2; YLR153C	225.000	32.03	estable
308 - 310	3	MET6; YER091C	264.000	33.76	estable
340 - 341	6	STI1; YOR027W	67.600	39.66	estable
475	8	UGP1; YKL035W	17.200	31.06	estable
521	9	SHM2; YLR058C	67.600	27.27	estable
610	10a	ADH1; YOL086C	No hay datos	20.71	estable
610	10b	ARO4; YBR249C	26.300	34.92	estable
537	11	LYS20; YDL182W	28.100	32.87	estable
684	15	ADO1; YJR105W	22.200	21.59	estable
854	18	SOL3; YHR163W	3.420	36.26	estable
924	19	YLR179C	6.230	34.17	estable
1052	20	AHP1; YLR109W	16.200	34.33	estable
824	21	PRB1; YEL060C	1.600	32.36	estable
951	22	PRE2; YPR103W	8.530	26.26	estable
1010	23	GUK1; YDR454C	20.500	21.06	estable
353	25	CPS1; YJL172W	721	35.40	estable
353	25	PDI1; YCL043C	No hay datos	40.30	inestable
384 - 414	26	ALD6; YPL061W	135.000	28.04	estable
366 - 458 -461	27	SSB1; YDL229W	170.000	36.20	estable
458-461	28	HXK2; YGL253W	114.000	39.75	estable
551	29	ENO1; YGR254W	76.700	31.30	estable
665	30	ERG9; YHR190W	10.800	36.80	estable
599	31	ACT1; YFL039C	No hay datos	40.04	inestable
865	32	HSP26; YBR072W	19.300	48.11	inestable

## Efecto del cisplatino y la delección de SKY1 sobre el proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecido en fosfoproteínas

**Tabla 55.** Abundancia celular y estabilidad de las proteínas identificadas en este estudio y en los sustratos conocidos de Sky1p (continuación).

Spot	ID	Gen	Moléculas/cel.	Índice de inestabilidad (*)	Clasificación
920	33	<i>TPI1; YDR050C</i>	207.000	19.66	Estable
1102	34	<i>SOD1; YJR104C</i>	519.000	24.80	estable
1293	36	<i>PFY1; YOR122C</i>	No hay datos	35.55	estable
502	38	<i>LAP4; YKL103C</i>	5.730	28.83	estable
259	39	<i>ACO1; YLR304C</i>	96.700	25.73	estable
761	41	<i>BMH1; YER177W</i>	158.000	57.99	inestable
927	42	<i>TMA19; YKL056C</i>	27.800	22.18	estable
477	43	<i>THR4; YCR053W</i>	26.000	31.94	estable
1158	46	<i>HSP104; YLL026W</i>	32.800	43.98	inestable
1158	47	<i>RNR4; YGR180C</i>	88.900	41.74	inestable
Sustrato Sky1p		<i>NPL3; YDR432W</i>	No hay datos	66.14	inestable
Sustrato Sky1p		<i>GBP2; YCL011C</i>	2.540	44.70	inestable

Spot, número asignado a cada proteína de acuerdo a las Figuras 22-25.

ID, número de identificación de la proteína.

\* en fase logarítmica y medio SD.

### 2.4. Discusión.

La fosforilación y desfosforilación de las proteínas por quinasas y fosfatasa constituye una red esencial de regulación en las células eucariotas. En este estudio, hemos utilizado un enfoque proteómico para identificar los cambios producidos por el tratamiento con cisplatino y/o la mutación  $\Delta sky1$  en *S. cerevisiae*. Yachie *et al.*, han publicado que casi el 60% de los 6.000 genes de la levadura codifican proteínas que son posteriormente fosforiladas (Yachie *et al.*, 2011). Sin embargo, en un análisis reciente, Amoutzias *et al.*, 2012, han recopilado las fosfoproteínas detectadas en doce estudios de fosfoproteómica llevados a cabo en los últimos años en *S. cerevisiae*, junto con los datos recogidos en la base de datos PhosphoGrid (<http://phosphogrid.org/~V>) y observan una gran variación. El número total de fosfoproteínas detectadas en los trabajos analizados varía desde 160 (Huber *et al.*, 2009) a 1.513 (Albuquerque *et al.*, 2008) y su integración conduce a un conjunto de 2.374 fosfoproteínas, con 9.783 sitios fosforilados (P-sitios) (Amoutzias *et al.*, 2012). Incluso, cuando se aplica un criterio estadístico más restrictivo, a fin de eliminar los llamados eventos de fosforilación “*off target*” (fosforilación de los residuos vecinos de la secuencia consenso de la quinasa correspondiente), el número total alcanza 2.566 P-sitios en 1.112 fosfoproteínas (Amoutzias *et al.*, 2012). El análisis de estos datos sugiere que el inventario de fosfoproteínas en la levadura está cerca de finalizarse, aunque la saturación no se ha alcanzado en

## **Efecto del cisplatino y la delección de SKY1 sobre el proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecido en fosfoproteínas**

---

términos de P-sitios (Amoutzias *et al.*, 2012). En nuestro estudio el análisis de imágenes permitió detectar 953 puntos en los extractos enriquecidos en fosfoproteínas, lo que representa un número razonable en comparación con los anteriores datos publicados. Un total de 35 proteínas fueron identificadas como diferencialmente expresadas en las condiciones ensayadas.

### **2.4.1.- Efecto de la delección $\Delta sky1$ .**

El efecto de la delección de  $\Delta sky1$  en *S. cerevisiae* en ausencia de tratamiento con cisplatino, como se deduce de este estudio, se representa en la Tabla 52. Los dos sustratos de Sky1p, Npl3p (Siebel *et al.*, 1999; Yun y Fu, 2000; Windgassen y Krebber, 2003) y Gbp2p (Windgassen y Krebber, 2003), no se han encontrado diferencialmente expresados en este trabajo. La evaluación comparativa de la estabilidad de las proteínas detectadas en nuestro estudio utilizando la herramienta ProtParam de ExPasy (<http://web.expasy.org/protparam/>) muestra que las proteínas más estables (índice de inestabilidad inferior a 40) predominan sobre las inestables (Tabla 55). Esto podría justificar la ausencia de Npl3p y Gbp2p entre las proteínas detectadas, ya que tienen altos índices de inestabilidad de 66,14 y 44,70 respectivamente.

Entre las proteínas identificadas incluidas en la Tabla 52 sólo una, Hxk2p que está implicada en el metabolismo de carbohidratos y en el estrés oxidativo (Kim *et al.*, 2011; Petti *et al.*, 2011), aumenta en el mutante, mientras que las demás proteínas disminuyen en el mutante. Estas proteínas que muestran niveles más bajos en el mutante están funcionalmente relacionadas con la síntesis de ADN, modificación de la cromatina y/o el estrés oxidativo. Rnr4p forma parte del complejo de la ribonucleótido reductasa (RNR) que cataliza la etapa limitante en la síntesis de dNTPs. El complejo RNR está regulado en respuesta a la replicación del ADN y el punto de control del daño del ADN a través de la localización de las subunidades menores del complejo (Yao *et al.*, 2003). Shm2p está involucrada en la generación de los precursores para la biosíntesis de purina y pirimidina (Kastanos *et al.*, 1997). Guk1p, guanilato quinasa, participa en el metabolismo de nucleótidos (Konrad, 1992). Acs2p cataliza la acetilación de histonas (Takahashi *et al.*, 2006). La profilina Pfy1p, activa la polimerización de actina y aumenta la viabilidad de las células expuestas a estrés oxidativo (Pujol *et al.*, 2009). Por último, Ssb1p también se ha relacionado con la respuesta al estrés oxidativo (Kim *et al.*, 2011).



## **Efecto del cisplatino y la delección de SKY1 sobre el proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecido en fosfoproteínas**

---

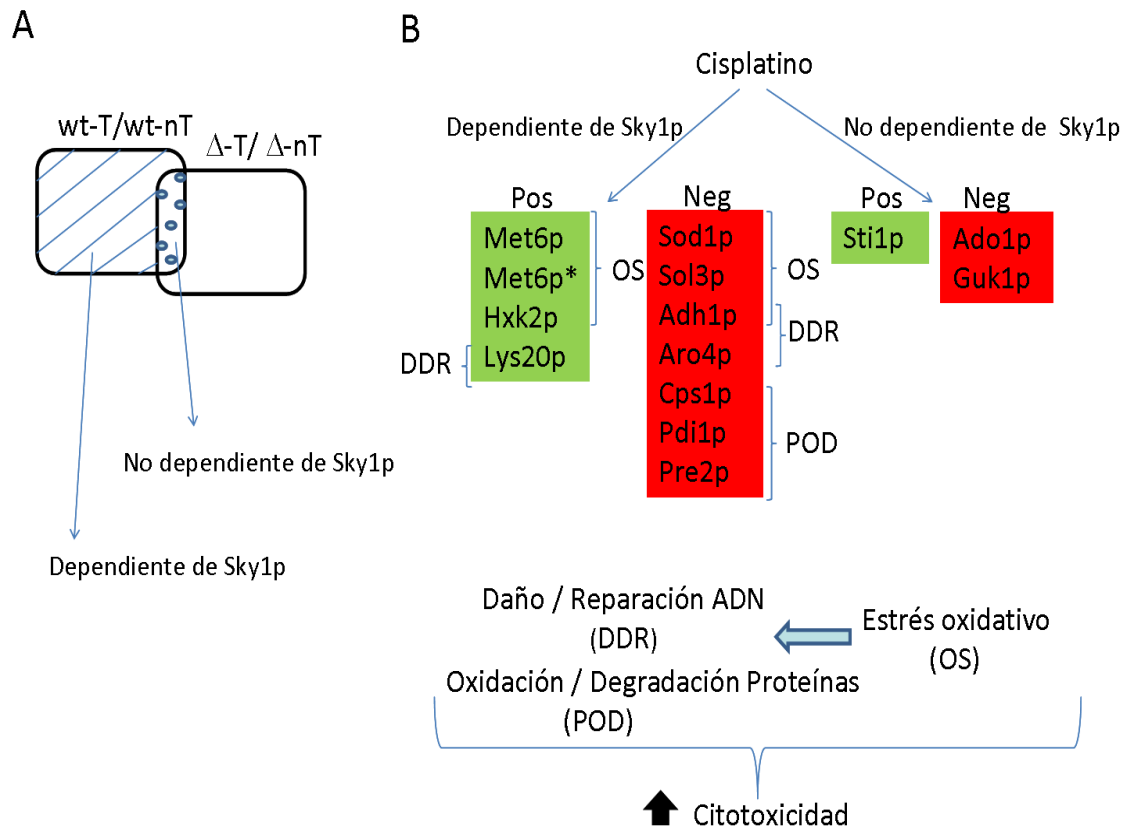
Los sustratos previamente caracterizados de la quinasa Sky1p son proteínas de unión al ARN (Yun y Fu, 2000; Windgassen y Krebber, 2003), sin embargo las proteínas afectadas por la delección de Sky1p en nuestro estudio (Tabla 52) están relacionadas con otras funciones. Por lo tanto se analizaron las secuencias de estas proteínas con el fin de averiguar si contenían dianas de reconocimiento que justificasen un efecto directo de la actividad quinasa de Sky1p sobre ellas o si por el contrario, las variaciones en sus niveles podían producirse mediante otros mecanismos indirectos. Ninguna de las secuencias analizadas tiene múltiples repeticiones RS que se ajusten al consenso anteriormente definido (Nolen *et al.*, 2001) para los sustratos de Sky1p, R(E/S)RSP(T/V)R, y sólo Acs2p, Shm2p y Pfy1p tienen motivos individuales de RS en las posiciones 625, 265 y 76 respectivamente. Considerando que el consenso deducido para el reconocimiento por Sky1p se obtuvo a partir de la alineación de sólo los dos sustratos conocidos hasta ahora, Npl3p y Gbp2p (Nolen *et al.*, 2001), no podemos descartar directamente que estas proteínas pudieran ser sustratos directos de Sky1p.

### **2.4.2.- Cambios producidos por el tratamiento con cisplatino y su dependencia de Sky1p.**

Se han propuesto varios mecanismos para explicar cómo el daño inducido por el cisplatino en el ADN activa diversas vías de señalización para prevenir o promover la muerte celular. En este trabajo hemos utilizado un enfoque proteómico con el fin de entender los cambios producidos por el tratamiento con cisplatino en levaduras y su dependencia de Sky1p, una quinasa previamente relacionada con la resistencia a cisplatino.

Una comparación de los datos incluidos en las Tabla 50 y Tabla 51 nos permite reconocer las proteínas que están reguladas por la señal provocada por el tratamiento con cisplatino en relación con la expresión del gen *SKY1*. Aquellos que sólo aparecen en la Tabla 50 son dependientes de *SKY1*, mientras que aquellos comunes a ambas Tablas son independientes de *SKY1* (Fig. 28A). Un resumen de las proteínas asignadas a cada grupo y su posible participación en el efecto citotóxico del cisplatino se muestra en la Figura 28B.

## Efecto del cisplatino y la delección de SKY1 sobre el proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecido en fosfoproteínas



**Figura 28.** Proteínas relacionadas con el aumento de la citotoxicidad causada por el tratamiento con cisplatino. **A.-** Esquema de los grupos dependientes e independientes de la proteína Sky1p. **B.-** Proteínas reguladas diferencialmente; verde: regulada positivamente; rojo: regulada negativamente. OS: relacionadas con estrés oxidativo; DDR: relacionadas con el daño y la reparación del ADN; POD: oxidación o degradación de proteínas.

Entre las proteínas cuya expresión aumenta después del tratamiento con cisplatino y también son dependientes Sky1p encontramos Met6p, Lys20p y Hxk2p (Fig. 28B). La proteína Met6p, 5-metiltetrahydropteroltriglutamato-homocisteína metiltransferasa, aumenta 1,3 veces en su variante isogénica con pI de 5,7 y 1,2 veces en la forma isogénica con pI de 5,74. Esta enzima cataliza la transferencia de un grupo metilo desde el metiltetrahydrofolato a la homocisteína que resulta en la formación de metionina. La intensidad del punto correspondiente a la enzima homocitrato sintasa (Lys20p) también aumenta 1,3 veces después del tratamiento con cisplatino. Esta proteína cataliza la biosíntesis de L-lisina a través del ácido aminoadípico. La hexoquinasa 2 (Hxk2p) aumenta 1,2 veces en la cepa de tipo silvestre después del tratamiento con cisplatino. Existen varios estudios previos que muestran una conexión entre la respuesta celular al estrés oxidativo y al cisplatino. Así, en las ratas,

## Efecto del cisplatino y la delección de SKY1 sobre el proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecido en fosfoproteínas

---

después del tratamiento con cisplatino, se observó disfunción mitocondrial, agotamiento del sistema de defensa antioxidante y muerte celular por apoptosis (Santos *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2008). En *S. cerevisiae* Met6p, Lys20p y Hxk2p, o la expresión de los correspondientes genes que las codifican, han sido previamente relacionados con la respuesta a estrés oxidativo. La ausencia de metionina en los mutantes *met6* regula positivamente la protección frente a un aumento del metabolismo oxidativo (Petti *et al.*, 2011) y, en sentido opuesto, podemos especular que el incremento de Met6p podría causar disminución en la protección contra el estrés oxidativo. La expresión del gen *LYS20* también es inducida después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Lee *et al.*, 1999) y, por último, el nivel de hexoquinasa aumenta después de la inducción de estrés oxidativo (Kim *et al.*, 2011). En las plantas la expresión de las hexoquinasas mitocondriales también se ha relacionado con apoptosis (Kim *et al.*, 2006).

Siete proteínas, Sod1p, Sol3p, Adh1p, Aro4p, Cps1p, Pdi1p y Pre2p, disminuyeron su expresión después del tratamiento con cisplatino y su variación es dependiente Sky1p (Fig. 28B). Adh1p, alcohol deshidrogenasa 1 (Kim *et al.*, 2011) y Aro4p, fosfo-2-deshidro-3-desoxiheptonato aldolasa (McDonagh *et al.*, 2009), han sido previamente relacionadas con la respuesta a estrés oxidativo. Sod1p, superóxido dismutasa mitocondrial, que destruye los radicales superóxido, disminuye después del tratamiento con cisplatino en la cepa silvestre. Aunque se ha descrito que el tratamiento con cisplatino activa la respuesta a estrés oxidativo (Martins *et al.*, 2008), es posible que los bajos niveles de Sod1p no puedan hacer frente a la gran cantidad de radicales superóxido producidos, aumentando así el efecto citotóxico de la droga. De manera similar, la disminución observada para Sol3p, 6-fosfogluconolactonasa que cataliza el segundo paso de la ruta de las pentosas fosfato (Stanford *et al.*, 2004), podría causar una disminución en la producción de coenzima NADPH reducido. Esta coenzima, en su forma reducida, es necesaria en muchas reacciones durante la respuesta al estrés oxidativo. En apoyo de esta interpretación hay también otros datos que indican una conexión entre la actividad de la ruta de las pentosas fosfato y la respuesta al estrés oxidativo en levaduras (Tarrío *et al.*, 2008). Por último, tres proteínas de este grupo, Cps1p, Pdi1p y Pre2p, están relacionadas con el destino celular de las proteínas (Tabla 50). Cps1p, que co-purifica con Pdi1p, es necesaria para el uso de ciertos péptidos como única fuente de nitrógeno (Bordillo y Suarez-Rendueles, 1993). Pdi1p es una proteína multifuncional, esencial para la formación de enlaces

## Efecto del cisplatino y la delección de SKY1 sobre el proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecido en fosfoproteínas

---

disulfuro en proteínas secretadas y de la superficie celular, deshace los enlaces disulfuro incorrectos durante el plegamiento de las proteínas y promueve la degradación de proteína en respuesta a mal plegamiento (Laboissiere *et al.*, 1995; Gauss *et al.*, 2011). El gen *PRE2* codifica la subunidad beta 5 del proteosoma 20S, responsable de la actividad quimotriptica del proteosoma (Groll *et al.*, 1999). Es importante tener en cuenta que hay una conexión entre la degradación de las proteínas y la respuesta al estrés oxidativo, ya que el proteosoma juega un papel fundamental en el reconocimiento selectivo y la degradación de proteínas oxidadas (Aiken *et al.*, 2011).

Se analizaron las secuencias de las proteínas identificadas en la respuesta dependiente de Sky1p al cisplatino (Fig. 28B) buscando el consenso para el reconocimiento del sustrato de la quinasa Sky1p, como ya se ha descrito. Entre las proteínas reguladas positivamente, las secuencias de Met6p y Lys20p incluyen motivos SR, aunque ninguno de ellos contiene una combinación perfecta del consenso definido para la fosforilación por Sky1p. La secuencia de Met6p contiene tres dipéptidos SR en las posiciones 393, 527 y 541 y Lys20p un SR en la posición 82. Entre las proteínas reguladas negativamente, sólo tiene un motivo SR Sol3p en la posición 60. Como se explicó anteriormente, y debido a la escasez de datos experimentales empleados para definir la secuencia consenso de reconocimiento de sustratos por Sky1p (Nolen *et al.*, 2001), esta observación no es suficiente para descartar estas proteínas como sustratos directos de Sky1p. Debido a que muchas proteína-quinasa por lo general regulan la actividad de otras quinasa, se realizó un nuevo análisis para encontrar un consenso común que pudiese ser reconocido por alguna otra quinasa en estas proteínas. En eucariotas superiores, se han relacionado varias quinasa (AKT, PKC y MAPK) con la modulación de la apoptosis inducida por cisplatino (revisado en Basu y Krishnamurthy, 2010), pero no se han encontrado consensos para el reconocimiento por sus homólogas de levaduras entre las fosfoproteínas analizadas en nuestro estudio. Se encontraron sin embargo varios consensos para CKI y CKII, CDK1, cAPK o GSK3 (Tabla 56), pero su importancia en la respuesta a cisplatino no se conoce.

**Tabla 56.** Consenso teórico de las quinasas S/T en las proteínas identificadas en este estudio, en Sky1p y en los sustratos conocidos de Sky1p.

ID	Proteína	Consenso teórico	Quinasa caseína I (CKI, CK-1)		Proteín-quinasa CKII		Proteín-quinasa CDK1		Proteín-quinasa Dependiente de AMPc (PKA, cAPK)		Glucógeno Sintetasa Quinasa 3 (GSK3)	
			332-335 393-396 442-445	SRSS SPIS SNNS					333-335 380-383	RSS RRHT	393-397 445-449 449-453	PISS SNFLS SVPHS
-	Sky1	SI										
-	Npl3	SI	224-227	SLET			411-414	SPTR				
-	Gbp2	SI							21-24	RRLS		
2	Acs2	NO										
3	Met6	NO										
6	Sti1	NO										
8	Ugp1	SI									17-21 21-25 183-187	SNTNS SVAAS SFNQS
9	Shm2	NO										
10	Adh1	SI			325-328	TLPE	316-319	SPIK			290-294	SIVGS
	Aro4	NO										
11	Lys20	NO										
15	Ado1	NO										
18	Sol3	NO										
19	YLR179C	NO										
20	Ahp1	NO										
21	Prb1	SI			58-61	SDSE						
22	Pre2	NO										
23	Guk1	SI							147-149	RLS		
25	Cps1	NO										
26	Ald6	NO										
27	Ssb1		298-301	SSLT	47-50 515-518	TPPE SSEE			429-431 513-515	RRT RLS	548-552	SIVAS
28	Hxk2	SI							12-15 394-396	RKGS RLS	158-162	SFPAS
29	Eno1	SI	3-40	SGAS							10-14	SVYDS

**Tabla 56.** Consenso teórico de las quinasas S/T en las proteínas identificadas, en Sky1p y en los sustratos conocidos de Sky1p (continuación).

ID	Proteína	Consenso teórico	Quinasa caseína I (CKI, CK-1)		Proteín-quinasa CKII		Proteín-quinasa CDK1		Proteín-quinasa dependiente de AMPc (PKA, cAPK)		Glucógeno Sintetasa Quinasa 3 (GSK3)	
30	Erg20	NO										
31	Act1	NO										
32	Hsp26	SI	208-211:	SQES			42-45	TPAK				
33	Tpi1	SI							98-100	RRS	96-100	SERRS
34	Sod1	SI									99-103	SFKDS
36	Pfy1	NO										
38	Lap4	NO										
39	Aco1	NO										
41	Bmh1	SI	86-89:	SYRS	65-68 89-92	SSYE SKYE						
42	Tma19	NO										
43	Thr4	NO										
46	Hsp104	NO										
47	Rnr4	SI					334-337	TPSK			169-173 332-336	SNDDS SATPS

ID, número de identificación de la proteína.

Subrayado: Residuos teóricamente fosforilados.

## Efecto del cisplatino y la delección de SKY1 sobre el proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecido en fosfoproteínas

---

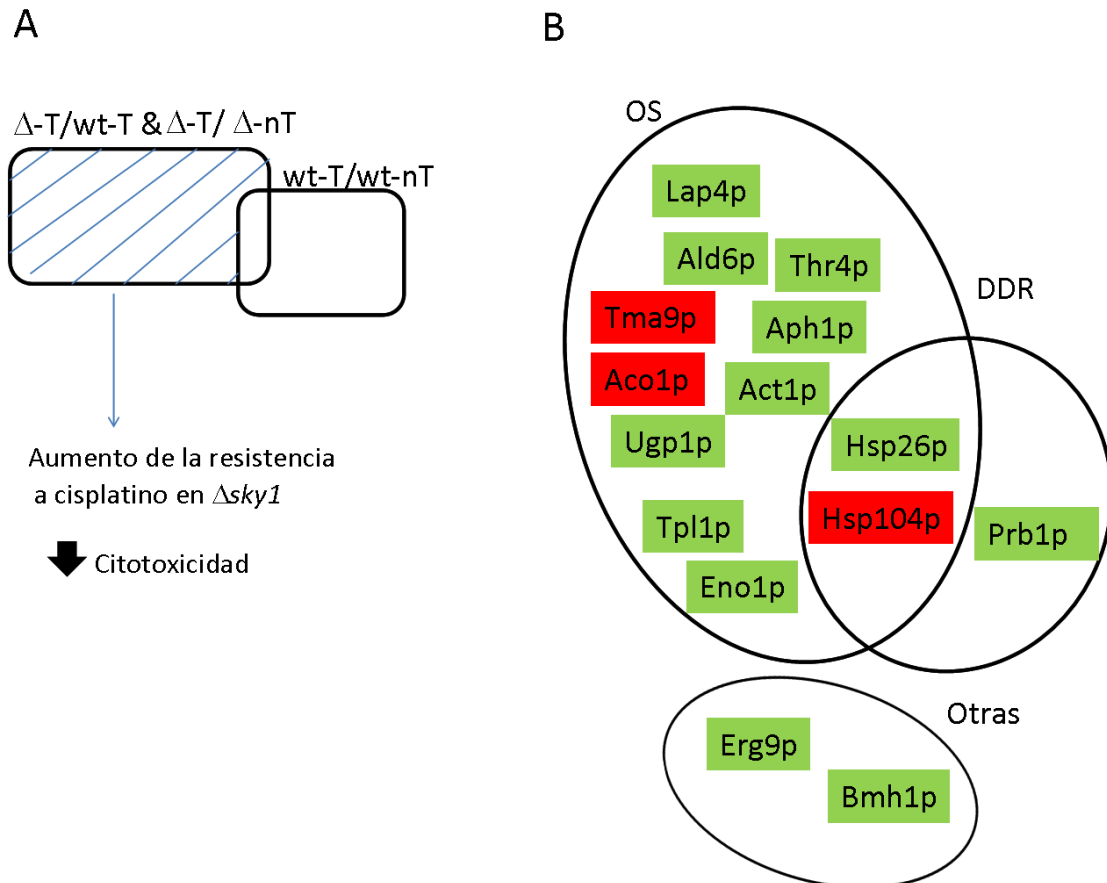
La respuesta independiente de Sky1p a cisplatino obtenida en este estudio incluye sólo tres proteínas, Sti1p, Ado1p y Guk1p (Fig. 28B). La proteína de choque térmico Sti1p aumenta su expresión (1,3 veces) después del tratamiento con cisplatino tanto de la cepa silvestre (Tabla 50) como de la cepa  $\Delta sky1$  (Tabla 51). Sti1p se caracterizó inicialmente como una proteína que se inducía por estrés (Nicolet y Craig, 1989) y se ha relacionado también con la respuesta a daño del ADN (Smolka *et al.*, 2007). Ado1p, adenosina quinasa, y Guk1p, guanilato quinasa, disminuyen sus niveles (Fig. 28B y Tablas 50, 51). Ambas están relacionadas con el metabolismo de nucleótidos y son necesarias para reciclar los nucleótidos AMP y GMP a ADP y GDP y en consecuencia poder regenerar posteriormente ATP y GTP; por lo tanto, la disminución observada en estas enzimas podría causar una disminución en la fuente energética necesaria para sustentar los mecanismos de reparación del ADN, que son necesarios para eliminar la aductos ADN-cisplatino (Basu y Krishnamurthy, 2010). Este déficit podría contribuir al efecto citotóxico producido por el cisplatino. En apoyo de este mecanismo, se ha descrito que la sobre-expresión del gen *ADE4* en células silvestres, incrementa la síntesis *de novo* de nucleótidos de purina, lo que también produce una elevada resistencia a cisplatino (Kowalski *et al.*, 2008). Sin embargo, en aparente contradicción con nuestros resultados, se ha descrito que en el mutante nulo  $\Delta guk1$  aumenta la resistencia a cisplatino (Kowalski *et al.*, 2008). Es posible que la ausencia total de la proteína Guk1p tenga un efecto diferente que su disminución, debido a complejas redes reguladoras que rigen la síntesis *de novo* de nucleótidos de purina.

### 2.4.3.- Proteínas relacionadas con el aumento de la resistencia a cisplatino en el mutante $\Delta sky1$ .

A pesar de que las células  $\Delta sky1$  tienen una mayor resistencia a cisplatino y de que existen indicios sobre el papel de Sky1p en determinadas vías de reparación del ADN (Schenk *et al.*, 2002), los mecanismos por los cuales Sky1p aumenta la sensibilidad a cisplatino, y por lo tanto los mutantes se vuelven más resistentes a este fármaco, son desconocidos. Una comparación de los datos descritos en las Tablas 50, 51 y 53 nos permite sugerir qué proteínas podrían contribuir a este efecto. Entre ellas consideramos las que cambian sus niveles de expresión en la comparación “células  $\Delta sky1$  tratadas con cisplatino frente a células de tipo silvestre tratadas”, así como

## Efecto del cisplatino y la delección de SKY1 sobre el proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecido en fosfoproteínas

aquellas diferenciadas en la comparación “ $\Delta sky1$  tratadas frente a las células no tratadas”, pero que a su vez no cambian en la comparación “tipo silvestre tratadas frente a no tratadas” (Fig. 29). El análisis de este grupo revela doce proteínas reguladas positivamente y tres reguladas negativamente (Fig. 29B).



**Figura 29.** Proteínas relacionadas con el descenso de la citotoxicidad a cisplatino en el mutante  $\Delta sky1$ . **A.-** Esquema del análisis. **B.-** Proteínas diferencialmente reguladas; verde: regulada positivamente; rojo: regulada negativamente. OS: relacionadas con estrés oxidativo; DDR: relacionadas con el daño y la reparación del ADN.

Varias de las proteínas reguladas positivamente que se muestran en la Figura 29B se han relacionado previamente con el estrés oxidativo. Este es el caso de Lap4p (Mirzaei *et al.*, 2008), Ald6p (Saint-Prix *et al.*, 2004), Thr4p (Burger *et al.*, 2000), Aph1p y Act1p (Farah *et al.*, 2011), Ugp1p, Tpl1p y Eno1p (Kim *et al.*, 2011; Petti *et al.*, 2011). Hsp26p también se incrementa y ha sido previamente relacionada tanto con el estrés oxidativo (Kim *et al.*, 2011) como con el daño al ADN (Smolka *et al.*, 2007). Erg9p, está relacionada con el estrés (Montanes *et al.*, 2011) y Bmh1p que modifica las histonas (Walter *et al.*, 2008)



## Efecto del cisplatino y la delección de SKY1 sobre el proteoma de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecido en fosfoproteínas

---

también se regula positivamente en este grupo. Por el contrario, la regulación negativa sólo afecta a un número reducido de proteínas; la proteína codificada por el gen *TMA19*, un homólogo en levaduras de la proteína humana tumoral controlada traduccionalmente (TCTP) (Rinnerthaler *et al.*, 2006), Aco1p (Gleason *et al.*, 2011) y Hsp104p (Kim *et al.*, 2011) también relacionadas con la respuesta al estrés hipóxico y oxidativo, respectivamente.

El cisplatino, al igual que muchos otros fármacos quimioterapéuticos, puede inducir la apoptosis. Por lo tanto, las vías de señalización que regulan la apoptosis tienen un impacto significativo en la decisión de la respuesta celular al cisplatino. La proteína TCTP de humanos, que fue encontrada originariamente en células tumorales, tiene funciones anti-apoptóticas (Rho *et al.*, 2011). Cabe destacar que TCTP es un factor de supervivencia esencial ya que protege a las células cancerosas del estrés oxidativo que induce la muerte celular (Lucibello *et al.*, 2011). Además, la proteína homóloga de levaduras Tma19p (Mmi1p) se ha relacionado con la resistencia a estrés oxidativo y el mutante con el gen *TMA19* deletado presenta resistencia al peróxido de hidrógeno (Rinnerthaler *et al.*, 2006). La proteína Tma19p fusionada a GFP se localiza en el citoplasma y se traslada a la superficie externa mitocondrial al inducirse el estrés oxidativo, un cambio que se ha relacionado con la apoptosis (Rinnerthaler *et al.*, 2006). Una observación interesante de nuestro estudio consiste en que Tma19p se detecta en los geles DIGE en dos puntos, 864 y 927 (Tabla 51) con pI idéntico y Mr observado de 17 y 30 respectivamente. La comparación de estos valores experimentales de Mr con el valor teórico deducido a partir de la secuencia de aminoácidos (18,7) sugiere que la proteína existe en al menos dos formas diferentes. Es posible que la modificación observada pudiera ser necesaria para la interacción con otra proteína/s. Se sabe que Tma19p se une a la mitocondria, aunque la proteína de unión no se ha encontrado todavía (Rinnerthaler *et al.*, 2006). Tanto si la forma de 17 como la de 30 kDa se relacionan específicamente con las funciones de esta proteína en la respuesta a estrés oxidativo, la apoptosis o la resistencia al cisplatino está todavía por dilucidar y es una pregunta interesante abierta a nuevos estudios. Además, vale la pena señalar que varias de las proteínas que cambian en respuesta al cisplatino en nuestro trabajo son mitocondriales, al igual que Tma19. Las mitocondrias son orgánulos muy importantes como sensores e integradores de la compleja información que reciben tanto de los cambios producidos en el medio como de las respuestas intracelulares a éstos,

**Efecto del cisplatino y la delección de SKY1 sobre el proteoma de  
*Saccharomyces cerevisiae* enriquecido en fosfoproteínas**

---

incluyendo la variación en los niveles de ROS y el daño en el ADN. En última instancia, los cambios de la funcionalidad de las mitocondrias ejercen un control sobre la muerte celular.

## **CAPÍTULO 3**

**ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DE LOS EFECTOS  
PRODUCIDOS POR CISPLATINO Y LA DELECIÓN DE *SKY1* EN  
*Saccharomyces cerevisiae***



# Análisis transcripcional de los efectos producidos por cisplatino y la delección de *SKY1* en *Saccharomyces cerevisiae*

---

## 3.1. Introducción.

Recientemente, para encontrar genes relacionados con la sensibilidad celular (Cavill *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2010) o la resistencia a cisplatino (Kim *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2010) en células humanas, se han aplicado técnicas de análisis del transcriptoma para el estudio de perfiles de expresión génica diferencial. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* también se ha utilizado como un modelo eucariota alternativo para encontrar genes de sensibilidad (Burger *et al.*, 2000) o resistencia a cisplatino (Huang *et al.*, 2005), fundamentalmente a través de la utilización de genotecas de mutantes que contienen delecciones individuales de todos los genes presentes en el genoma de esta levadura. También hay un estudio previo del efecto de la exposición al cisplatino sobre el transcriptoma de las células de *S. cerevisiae* (Caba *et al.*, 2005). La principal ventaja de utilizar el modelo de levadura para el análisis del transcriptoma es que permite probar simultáneamente el efecto del tratamiento con cisplatino y la pérdida de la función de un gen específico, sin embargo no se han realizado hasta el momento estudios que combinen ambas variables.

Siguiendo los objetivos planteados en este trabajo, en el presente capítulo se describen los estudios realizados utilizando técnicas de transcriptómica. El objetivo es la evaluación de los efectos producidos por el tratamiento con cisplatino y/o la delección de *SKY1*, a fin de caracterizar nuevos genes implicados en la respuesta a cisplatino y nuevos mecanismos por los que Sky1p pueda participar en esta respuesta.

## 3.2. Diseño experimental.

En este análisis se ha utilizado la cepa de *S. cerevisiae* W303 (MATa *ade2-1 can1-100 leu2-3,112 trp1-100 ura3-52*) y su isogénica  $\Delta$ *sky1*, cuya construcción se describe en el Capítulo 1. Se realizaron tres réplicas biológicas con o sin tratamiento con cisplatino. Los cultivos y tratamientos se realizaron en las mismas condiciones descritas en el Capítulo 2 para los análisis de proteómica. Los cambios producidos en la expresión de genes de la cepa de levadura W303 en medio SD como consecuencia de la adición de 600  $\mu$ M cisplatino se analizaron mediante 12 arrays "Yeast.2" de Affymetrics. La extracción de ARN, procesamiento de las muestras, marcaje, hibridación y análisis se han descrito detalladamente en el apartado correspondiente de Materiales y métodos. Los datos obtenidos se registraron, normalizaron y

## Análisis transcripcional de los efectos producidos por cisplatino y la delección de *SKY1* en *Saccharomyces cerevisiae*

---

analizaron estadísticamente tal como se describe en Materiales y métodos. Sólo aquellos que cambian su nivel de expresión en 1,6 ó más veces en las condiciones comparadas y presentan un p-valor en el análisis de LIMMA (Smyth, 2005) menor de 0,01 se consideraron para una posterior discusión y búsqueda de significado funcional. Los cambios más relevantes han sido también verificados mediante qPCR, técnica que ha sido realizada según el protocolo descrito en Materiales y métodos.

### 3.3. Resultados.

Los ficheros \*.cel que contienen los datos originales de intensidades medidos a través del programa de Affymetrics, como se describe en Materiales y métodos, así como los datos normalizados han sido depositados en la base de datos GEO (*Gene Expression Omnibus*) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) cumpliendo las directrices MIAME (*Minimum Information About a Microarray Experiment*) de acceso público (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/info/linking.html>) con el número de acceso GSE41094. Los datos ya procesados y que incluyen únicamente los valores correspondientes a los genes que se expresan diferencialmente (DEGs) en las condiciones comparadas se encuentran en las Tablas S1-S6. Debido a su extensión se recogen como apéndice de este capítulo. La distribución de los DEGs en grupos funcionales se analizó con el programa FunSpec. Los grupos funcionales que están estadísticamente sobre-representados (p-valor  $\leq 0,01$ ) después del tratamiento de la cepa W303 con cisplatino se resumen en las Tablas 57 y 58. Los que lo están en la comparación entre las cepas W303 y  $\Delta sky1$  se recopilan en las Tablas 59 y 60. Finalmente, los resultados del análisis de las diferencias entre las cepas W303 y  $\Delta sky1$  tratadas con cisplatino se muestran en las Tablas 61 y 62.

**Tabla 57.** Grupos funcionales de genes cuya expresión en la cepa silvestre tratada con cisplatino es mayor que en la cepa no tratada (W303).

Grupo funcional	p-valor	Genes regulados	k	f
Biosíntesis de metionina [GO:0009086]	<1 e <sup>-14</sup>	<i>MET8 MET6 MET10 STR3 MET3 MET5 HOM6 MET14 MET1 MHT1 MET17 ADI1 MET2 MET22 MET16</i>	15	31
Biosíntesis de aminoácidos [GO:0008652]	<1 e <sup>-14</sup>	<i>CYS3 MET8 MET6 MET10 STR3 CYS4 SER33 MET3 MET5 HOM6 MET14 MET1 MHT1 MET17 ADI1 MET2 MET16</i>	17	98
Asimilación de sulfato [GO:0000103]	1.343 e <sup>-14</sup>	<i>MET8 MET10 MET3 MET5 MET14 MET1 MET22 MET16</i>	8	11
Biosíntesis de cisteína [GO:0019344]	3.786 e <sup>-14</sup>	<i>CYS3 MET10 CYS4 MET3 MET5 MET14 MET17 MET16</i>	8	12
Metabolismo de metionina [GO:0006555]	2.608 e <sup>-11</sup>	<i>SAM2 MET3 HOM6 MET14 SAM1 MET17 MET16</i>	7	14
Metabolismo de compuestos monocarbonados [GO:0006730]	4.048 e <sup>-09</sup>	<i>GCV3 GCV1 SAM2 MTD1 SHM2 SAM1</i>	6	15
Procesos de oxidación -reducción [GO:0055114]	3.985 e <sup>-07</sup>	<i>MET8 AAD4 MXR1 AAD6 AAD16 MET10 FMO1 SER33 MET5 HOM6 MTD1 ADI1 ZWF1 MET16</i>	14	272
Metabolismo de aminoácidos celulares [GO:0006520]	5.244 e <sup>-07</sup>	<i>CYS3 STR3 YHR112C SPS100 HOM6 MET17</i>	6	31
Transporte transmembrana de aminoácidos [GO:0003333]	3.385 e <sup>-06</sup>	<i>AGP3 MUP1 MUP3 MMP1 SAM3</i>	5	24
Transporte de aminoácidos [GO:0006865]	3.423 e <sup>-06</sup>	<i>AGP3 MUP1 MUP3 YCT1 MMP1 SAM3</i>	6	42
Trans-sulfuración [GO:0019346]	3.966 e <sup>-06</sup>	<i>CYS3 STR3 CYS4</i>	3	4
Metabolismo de aminoácidos sulfurados [GO:0000096]	9.844 e <sup>-06</sup>	<i>CYS3 MET32 MHT1</i>	3	5
Procesos metabólicos [GO:0008152]	1.637 e <sup>-05</sup>	<i>MET8 DUG2 MET10 CYS4 SER33 YIR042C MET5 HOM6 MET1 MTD1 MET17 ADE17 ZWF1 FOL1 MET16</i>	15	425
Metabolismo de compuestos sulfurados [GO:0006790]	3.395 e <sup>-05</sup>	<i>YHR112C OPT1 MET22</i>	3	7
Biosíntesis de siroheme [GO:0019354]	0.0001	<i>MET8 MET1</i>	2	2
Biosíntesis de cisteína vía cistationina [GO:0019343]	0.0001	<i>CYS3 CYS4</i>	2	2
Metabolismo de aldehído [GO:0006081]	0.0001	<i>AAD4 AAD6 AAD16</i>	3	11
Transporte transmembrana [GO:0055085]	0.0002	<i>SEO1 SUL1 AGP3 MUP1 VHT1 MUP3 OPT1 YCT1 MMP1 SUL2 SAM3</i>	11	303
Biosíntesis de S-adenosilmetionina [GO:0006556]	0.0003	<i>SAM2 SAM1</i>	2	3
Proceso catabólico de la glicina [GO:0006546]	0.0003	<i>GCV3 GCV1</i>	2	3
Metabolismo de la glicina [GO:0006544]	0.0006	<i>GCV1 SHM2</i>	2	4
Proceso de biosíntesis del nucleótido purina [GO:0006164]	0.0007	<i>ADE1 MTD1 ADE17</i>	3	18
Transporte de sulfato [GO:0008272]	0.001	<i>SUL1 SUL2</i>	2	5
Biosíntesis de porfirina [GO:0006779]	0.003	<i>MET8 MET1</i>	2	9
Biosíntesis de compuestos que contienen ácido fólico [GO:0009396]	0.003	<i>MTD1 FOL1</i>	2	9
Biosíntesis 'de novo' de IMP [GO:0006189]	0.003	<i>ADE1 ADE17</i>	2	9

k: número de genes regulados que pertenecen al grupo funcional.

f: número total de genes asignados al grupo funcional.

**Tabla 58.** Grupos funcionales cuya expresión en la cepa silvestre tratada con cisplatino es menor que en la cepa no tratada (W303).

Grupo funcional	p-valor	Genes regulados	k	f
Traducción [GO:0006412]	6.493 e <sup>-13</sup>	<i>RPS8A RPS9B RPS16B RPS17B RPS8B RPL24A RPL9A RPS26A RPL26B RPS0A RPL2B RPL16A RPL22A RPL6B RPS18B RPS1B RPL18B RPL18A RPS7A</i>	19	318
Maduración de SSU-ARNr desde el transcrito ARNr tricistrónico (SSU-ARNr, 5.8S ARNr, LSU-ARNr) [GO:0000462]	8.919 e <sup>-05</sup>	<i>RPS8A RPS9B RPS16B RPS8B RPS1B</i>	5	60
Ensamblaje de la subunidad pequeña del ribosoma [GO:0000028]	0.0001	<i>RPS17B NSR1 RPS0A</i>	3	14
Transporte de amonio [GO:0015696]	0.0008	<i>ATO2 MEP3</i>	2	6
Exportación de ARNr desde el núcleo [GO:0006407]	0.0011	<i>RPS26A RPS0A RPS18B</i>	3	27
Utilización de nitrógeno [GO:0019740]	0.0020	<i>ATO2 MEP3</i>	2	9
Conversión génica en el locus MAT [GO:0000728]	0.0077	<i>HO</i>	1	1
Transporte de citidina [GO:0015861]	0.0077	<i>FCY2</i>	1	1
Transporte de la base purina [GO:0006863]	0.0077	<i>FCY2</i>	1	1
Transporte de citosina [GO:0015856]	0.0077	<i>FCY2</i>	1	1
Catabolismo de adenina [GO:0006146]	0.0077	<i>AAH1</i>	1	1
Rescate de compuestos que contienen purina [GO:0043101]	0.0077	<i>AAH1</i>	1	1
Rescate de hipoxantina [GO:0043103]	0.0077	<i>AAH1</i>	1	1
Regulación positiva de la glucólisis [GO:0045821]	0.0077	<i>TYE7</i>	1	1
Transporte de tirosina [GO:0015828]	0.0077	<i>TAT1</i>	1	1

k: número de genes regulados que pertenecen al grupo funcional.  
f: número total de genes asignados al grupo funcional.



**Tabla 59.** Grupos funcionales cuya expresión en la cepa mutada es mayor que en la cepa silvestre (W303).

Grupo funcional	p-valor	Genes regulados	k	f
Proceso de biosíntesis de tiamina [GO:0009228]	5.281 e <sup>-05</sup>	<i>THI13 THI5 THI11 THI12 THI20</i>	5	17
Metabolismo [GO:0008152]	8.483 e <sup>-05</sup>	<i>GAL1 ARO4 HNT1 GDH2 DPP1 HNT2 URH1 BNA7 PHM8 ICL1 AGX1 POX1 DOG1 PAN5 POT1 YIR007W ILV3 MCD4 ERG27 BNA5 FBP1 FMP41 LSC1 ERG10 GDB1</i>	25	425
Proceso biológico [GO:0008150]	0.0009	<i>YCL021W-A YCR076C SNA4 YDR026C YDR109C YDR182W-A YDR222W YDR239C YDR336W YER152C FMP32 IRC6 YGL081W YGR001C YHR213W-A YIL169C PAU14 YIR007W ICS3 YJL077W-B PAU1 YJR107W YJR141W DAN4 TTI1 YLR156W YLR157W-D YLR157W-E YLR159W YLR161W RRT15 YLR326W YLR342W-A AIM31 YML083C YET2 YMR187C YNL011C FMP41 MPA43 YOL024W YOR192C-C YPL041C LCL1 YPL067C YPL162C YPL191C ASA1</i>	48	1203
Beta-oxidación de ácidos grasos [GO:0006635]	0.0018	<i>POX1 POT1 TES1</i>	3	10
Unión de hemo al citocromo c [GO:0018063]	0.0020	<i>CYT2 CYC2</i>	2	3
Biosíntesis de NAD vía rutas de rescate de nicotinamida riboside [GO:0034356]	0.0020	<i>URH1 PNP1</i>	2	3
Metabolismo de lípidos [GO:0006629]	0.0037	<i>YAT1 POX1 POT1 YJR107W IRS4 YSR3</i>	6	58
Rescate de nucleotide nicotinate [GO:0019358]	0.0038	<i>URH1 PNP1</i>	2	4
Respuesta a estrés [GO:0006950]	0.0059	<i>PAU8 ARO4 MRK1 DFM1 TOS3 PAU14 PAU1 DAN4 ICT1 FMP41</i>	10	152

k: número de genes regulados que pertenecen al grupo funcional.

f: número total de genes asignados al grupo funcional.

**Tabla 60.** Grupos funcionales cuya expresión en la cepa mutada es menor que en la cepa silvestre (W303).

Grupo funcional	p-valor	Genes regulados	k	f
Procesamiento de ARNr [GO:0006364]	<1 e <sup>-14</sup>	<i>SPB1 NOP14 BFR2 FCF1 UTP6 SNM1 NOP16 NSA2 RAI1 NOP7 EFG1 RRP3 IMP3 MRT4 RRP14 EBP2 SOF1 FYV7 DIP2 NOP56 UTP21 UTP15 NOP2 DBP6 NOP58 MOT1 NAN1 BMS1 TIF6 MRD1</i>	30	195
Biogénesis de ribosomas [GO:0042254]	8.427 e <sup>-14</sup>	<i>SPB1 NOP14 FCF1 UTP6 NOP16 NSA2 NOP7 RRP3 IMP3 MRT4 RRP14 EBP2 SOF1 RIX7 DIP2 NOP56 RSA3 UTP21 UTP15 NOP2 DBP6 NOP8 NOC2 NOP58 NAN1 BMS1</i>	26	170
Maduración de SSU-ARNr desde el transcrito tricistronico ARNr (SSU-ARNr, 5.8S ARNr, LSU-ARNr) [GO:0000462]	2.308 e <sup>-06</sup>	<i>NOP14 UTP6 NOP7 EFG1 RRP3 SOF1 FYV7 DIP2 UTP15 NAN1</i>	10	60
Biogénesis de la subunidad grande del ribosoma [GO:0042273]	3.198 e <sup>-06</sup>	<i>NOP16 NSA2 NOP7 MRT4 RRP14 RIX7 NOP8 TIF6</i>	8	37
Escisión endonucleótica en 5'-ETS del transcrito tricistronico ARNr [GO:0000480]	4.871 e <sup>-05</sup>	<i>NOP14 FCF1 UTP6 DIP2 NOP58 MRD1</i>	6	27
Escisión endonucleótica para generar extreme 5' maduro de SSU-ARNr [GO:0000472]	7.492 e <sup>-05</sup>	<i>NOP14 FCF1 UTP6 DIP2 NOP58 MRD1</i>	6	29
Maduración de 5.8S ARNr desde el transcrito tricistronico ARNr [GO:0000466]	0.0003	<i>SPB1 NSA2 RAI1 TIF6</i>	4	14
Escisión endonucleótica en ITS1 para separar SSU-ARNr de 5.8S ARNr y LSU- ARNr del transcrito tricistronico ARNr [GO:0000447]	0.0005	<i>NOP14 FCF1 UTP6 DIP2 NOP58 MRD1</i>	6	40
Transporte de dipéptidos [GO:0042938]	0.0006	<i>DAL5 PTR2</i>	2	2
Maduración de LSU-ARNr desde el transcrito tricistronico ARNr (SSU- ARNr, 5.8S ARNr, LSU- ARNr) [GO:0000463]	0.0009	<i>SPB1 NSA2 RAI1 TIF6</i>	4	18
Metabolismo de aminoácidos celulares [GO:0006520]	0.0010	<i>GDH3 CHA1 IRC7 SPS100 URA2</i>	5	31
Ensamblaje de ribosomas [GO:0042255]	0.0019	<i>NOC2 BMS1</i>	2	3
Regulación de la meiosis [GO:0040020]	0.0023	<i>RCK1 IME1 UME1</i>	3	11
Biogénesis de la subunidad pequeña del ribosoma [GO:0042274]	0.0029	<i>NOP14 RRP14 UTP21 NEW1</i>	4	24
Regulación positiva de la transcripción desde el promoter de la ARN polimeras I [GO:0045943]	0.0030	<i>CTK1 UTP15 NAN1</i>	3	12
Biosíntesis de glutamato [GO:0006537]	0.0039	<i>GDH3 IDP1 GLT1</i>	3	13
Ciclo de asimilación de amonio [GO:0019676]	0.0062	<i>GDH3 GLT1</i>	2	5
Desfosforilación [GO:0016311]	0.0085	<i>PHO11 PHO5 PHO12 SDP1</i>	4	32
Metilación de ARNr [GO:0031167]	0.0091	<i>TRM7 SPB1</i>	2	6

k: número de genes regulados que pertenecen al grupo funcional.  
f: número total de genes asignados al grupo funcional.

**Tabla 61.** Grupos funcionales cuya expresión en la cepa mutada es mayor que en la cepa silvestre (W303) después del tratamiento con cisplatino.

Grupo funcional	p-valor	Genes regulados	k	f
Beta oxidación de ácidos grasos [GO:0006635]	3.466 e <sup>-07</sup>	<i>MDH3 POX1 POT1 FOX2 ECI1 IDP3</i>	6	10
Ciclo del glioxilato [GO:0006097]	2.75 e <sup>-06</sup>	<i>MDH3 ICL1 IDP2 IDP3 MLS1</i>	5	8
Procesos biológicos [GO:0008150]	6.368 e <sup>-06</sup>	<i>FUN14 YBL071C-B YBR053C OM14 YCL021W-A YCL049C YCR076C GPM2 SNA4 ALT2 YDR182W-A YDR336W YER163C IRC6 YGL010W YGL036W YGL081W YGR067C YGR117C YGR201C SPG1 YHR033W YIL001W PAU14 YIR007W PRM10 YJL132W YJL163C YJL185C PAU1 YJR039W YJR107W TT12 YJR142W YJR149W DAN4 YKL091C UBP11 YLL053C YLL066W-B YLR156W YLR157W-D YLR157W-E YLR159W YLR161W BOP2 YLR281C YLR342W-A YLR446W YLR466C-B YML002W AIM31 YMR030W-A YMR182W-A YMR187C YMR206W YMR262W YNL193W YNL195C MPA43 YOL024W PHM7 ZPS1 YOL159C-A YOR022C PNS1 YOR186W LCL1 FMP40 ASA1</i>	70	1203
Procesos metabólicos [GO:0008152]	8.477 e <sup>-05</sup>	<i>BNA4 GAL1 ARO4 GPM2 MDH3 HNT1 HNT2 URH1 BNA7 APA2 PHM8 ICL1 AGX1 POX1 POT1 YIR007W IMA5 YJR149W FOX2 TGL4 ERG27 BNA5 ECI1 FBP1 CYB2 ADH2 GRE2 LSC1 ALD6 ATH1 GDB1</i>	31	425
Ciclo del ácido tricarboxílico [GO:0006099]	0.0005	<i>MDH3 ICL1 IDP2 IDP3 MLS1 LSC1</i>	6	30
Metabolismo de lípidos [GO:0006629]	0.0009	<i>YAT1 POX1 POT1 YJR107W FOX2 YSR3 TGL4 ECI1</i>	8	58
Procesos de oxidación-reducción [GO:0055114]	0.0015	<i>BNA4 MDH3 NDE2 JHD1 POX1 ERV1 HTD2 YJR149W GPX1 FOX2 ERG27 IDP2 CYB2 ARA2 FET3 ADH2 IDP3 GRE2 ALD6 GLR1</i>	20	272
Metabolismo de carbohidratos [GO:0005975]	0.0017	<i>GAL1 MDH3 GUT1 YIR007W IMA5 FBP1 YLR446W MPA43 ATH1 GDB1</i>	10	94
Transporte de sideróforos [GO:0015891]	0.0021	<i>FIT1 SIT1 ARN1</i>	3	8
Procesos de biosíntesis de tiamina [GO:0009228]	0.0025	<i>THI13 THI5 THI11 THI12</i>	4	17
Metabolismo de ácidos grasos [GO:0006631]	0.0027	<i>YAT1 POX1 POT1 FOX2 ECI1</i>	5	28
Transporte de aminoácidos [GO:0006865]	0.0033	<i>GNP1 AVT6 AVT1 LST4 ALP1 PUT4</i>	6	42
Biosíntesis de NAD vía rutas de rescate de nicotinamida riboside [GO:0034356]	0.0037	<i>URH1 PNP1</i>	2	3
Transporte transmembrana [GO:0055085]	0.0052	<i>ADY2 MPH2 GNP1 STL1 SIT1 FCY22 AVT6 VMR1 LEU5 HXT1 YJL163C SFC1 ECM27 MPH3 JEN1 TRK2 ALP1 ODC2 PUT4 PXA1</i>	20	303
Metabolismo de la maltosa [GO:0000023]	0.0059	<i>MPH2 IMA5 MPH3</i>	3	11
Rescate del nucleotide nicotinate [GO:0019358]	0.0072	<i>URH1 PNP1</i>	2	4

k: número de genes regulados que pertenecen al grupo funcional.

f: número total de genes asignados al grupo funcional.

**Tabla 62.** Grupos funcionales cuya expresión en la cepa mutada es menor que en la cepa silvestre (W303) después del tratamiento con cisplatino.

Grupo funcional	p-valor	Genes regulados	k	f
Biogénesis de ribosomas [GO:0042254]	<1 e <sup>-14</sup>	MAK5 SPB1 NOP1 NOP14 FAL1 FCF1 RRP17 NOP16 ENP2 CIC1 RRP3 GAR1 IMP3 UTP18 MRT4 RRP14 EBP2 SOF1 RIX7 FCF2 DIP2 NOP56 UTP13 UTP21 UTP15 ECM16 RLP7 NOP15 KRI1 DBP6 NOP8 YTM1 NOP58 NAN1 NIP7 RRP9	36	170
Procesamiento de ARNr [GO:0006364]	<1 e <sup>-14</sup>	MAK5 SPB1 NOP1 NOP14 FAL1 RRP8 RRP45 BFR2 FCF1 RRP17 SNM1 NOP16 ENP2 RRP3 GAR1 IMP3 MTR4 UTP18 MRT4 RRP14 EBP2 SOF1 FCF2 FYV7 DIP2 NOP56 UTP13 UTP21 TSR2 UTP15 ECM16 NOP15 KRI1 DBP6 YTM1 NOP58 MOT1 NAN1 NIP7 RRP9	40	195
Biogénesis de la subunidad grande del ribosoma [GO:0042273]	4.884 e <sup>-10</sup>	MAK5 YDL063C ARX1 NOP16 CIC1 MRT4 RRP14 RIX7 RLP7 NOP15 NOP8 YTM1 NIP7	13	37
Asimilación de sulfato [GO:0000103]	3.415 e <sup>-08</sup>	MET8 MET3 MET5 MET14 MET1 MET22 MET16	7	11
Biosíntesis de metionina [GO:0009086]	1.341 e <sup>-07</sup>	MET8 IRC7 STR3 MET3 MET5 MET14 MET1 ADI1 MET22 MET16	10	31
Maduración de SSU-ARNr [GO:0000462]	1.466 e <sup>-05</sup>	NOP14 FAL1 RRP3 SOF1 FYV7 DIP2 UTP13 TSR2 UTP15 ECM16 NAN1	11	60
Procesos de biosíntesis de aminoácidos [GO:0008652]	2.05 e <sup>-05</sup>	MET8 LYS4 SER3 IRC7 STR3 CYS4 SER33 LYS1 MET3 MET5 MET14 MET1 ADI1 MET16	14	98
Metilación de ARNr [GO:0031167]	3.066 e <sup>-05</sup>	TRM7 SPB1 NOP1 MTF1	4	6
Biosíntesis de cisteína [GO:0019344]	5.235 e <sup>-05</sup>	CYS4 MET3 MET5 MET14 MET16	5	12
Escisión endonucleotídica en 5'-ETS del transcrito tri-cistrónico ARNr [GO:0000480]	5.395 e <sup>-05</sup>	NOP14 FCF1 UTP18 FCF2 DIP2 UTP13 NOP58	7	27
Escisión endonucleotídica para generar extreme 5' maduro de SSU-ARNr [GO:0000472]	8.873 e <sup>-05</sup>	NOP14 FCF1 UTP18 FCF2 DIP2 UTP13 NOP58	7	29
Escisión endonucleotídica en ITS1 para separar SSU-ARNr de 5.8S ARNr y LSU- ARNr del transcrito tricistronico ARNr [GO:0000447]	0.0001	NOP14 FCF1 UTP18 FCF2 DIP2 UTP13 KRI1 NOP58	8	40
Procesos de biosíntesis de siroheme [GO:0019354]	0.0015	MET8 MET1	2	2
Procesos de biosíntesis de metionina [GO:0006555]	0.0016	SAH1 MET3 MET14 MET16	4	14
modificación del ARNr [GO:0000154]	0.0018	NOP56 MTF1 RRP9	3	7
Metabolismo del fosfato [GO:0006796]	0.0028	PHO11 PHO3 PHO5	3	8
Metabolismo de la porfirina [GO:0006779]	0.0040	MET8 HEM13 MET1	3	9
Selección de los sitios de <i>splicing</i> del ARNm [GO:0006376]	0.0043	LUC7 SKY1	2	3
Formación del complejo de preinicio de la traducción [GO:0001731]	0.0043	PAT1 BUD27	2	3
Metabolismo de aminoácidos celulares [GO:0006520]	0.0062	GDH3 CHA1 IRC7 STR3 SPS100	5	31
Desfosforilación [GO:0016311]	0.0071	PHO11 PHO3 PHO5 PHO12 SDP1	5	32
Procesamiento del extremo 3' de U4 ARNsn [GO:0034475]	0.0075	RRP45 MTR4 PAP2	3	11
Biosíntesis de aminoácidos de la familia de las serinas [GO:0009070]	0.0085	SER3 SER33	2	4
trans-sulfuración [GO:0019346]	0.0085	STR3 CYS4	2	4

k: número de genes regulados que pertenecen al grupo funcional.

f: número total de genes asignados al grupo funcional.

## Análisis transcripcional de los efectos producidos por cisplatino y la delección de *SKY1* en *Saccharomyces cerevisiae*

---

### Efecto del tratamiento con cisplatino sobre el genoma de la levadura.

Se ha publicado previamente un análisis de transcriptoma en el que se analizan las consecuencias del tratamiento con cisplatino en levaduras (Caba *et al.*, 2005). Sin embargo, aunque la concentración de fármaco utilizada fue la misma que en nuestro estudio, los efectos observados eran muy limitados. De hecho, sólo cambiaron su expresión con significación estadística cinco genes. *HUG1*, *ECM4* y *YLR279W* incrementaron su expresión, mientras que *HO* y *SCW11* la disminuyeron. Esto podría explicarse porque el efecto del tratamiento con cisplatino depende de la cepa de levadura, de las condiciones del cultivo y del tratamiento, así como del estado metabólico de las células cuando son tratadas con cisplatino. Hemos analizado cuidadosamente y optimizado estos parámetros, a través de ensayos preliminares, con el fin de obtener una hoja de datos con un número de genes representativo. De esta manera obtuvimos un conjunto de 122 genes expresados diferencialmente; 69 sobre-expresados (Tabla S1) y 53 reprimidos (Tabla S2).

La mayoría de los grupos funcionales significativamente sobre-representados entre los genes que incrementan su expresión tras el tratamiento con cisplatino (Tabla 57) pertenecen al grupo de genes relacionados con el metabolismo de compuestos que contienen azufre. Como por ejemplo los relacionados con el transporte de sulfato (GO: 0008272), el transporte de aminoácidos que contienen azufre (*AGP3*, *MUP1*, *MUP3*, *MMP1*, *SAM3*) o aquellos necesarios para la biosíntesis de metionina (GO: 0009086), cisteína (GO: 0006555) o de S-adenosil-metionina (GO:0006556). Otro de los grupos funcionales representados en la Tabla 57 incluye genes relacionados con reacciones redox (GO:055114).

Se puede deducir de los datos comentados en el apartado anterior que la reorganización del transcriptoma de la levadura después de la adición de cisplatino sufre un cambio drástico en el transporte y en las vías de asimilación de sulfato extracelular y otros compuestos que contienen azufre. El cisplatino por su estructura química exhibe una alta afinidad hacia compuestos con grupos SH, tales como las cisteínas y metioninas, que forman uniones estables Pt-S. Probablemente los cambios observados podrían ser un mecanismo de compensación que incluso podría contribuir al desarrollo de resistencia frente a la droga. Otra consecuencia de esta regulación podría ser el aumento en la biosíntesis de glutatión, procedente de la homocisteína ya que, a su vez, el

## Análisis transcripcional de los efectos producidos por cisplatino y la delección de *SKY1* en *Saccharomyces cerevisiae*

---

glutación puede ser utilizado en la célula para formar complejos con el cisplatino. Esta interpretación de nuestros datos está también apoyada por evidencias anteriores descritas en la bibliografía. En células de osteosarcoma, el agotamiento del glutatión reducido (GSH) disponible en la célula aumenta la sensibilidad a la toxicidad del cisplatino y la formación de conjugados glutatión-cisplatino ha sido propuesta como un mecanismo importante en la resistencia celular a cisplatino (Komiya *et al.*, 1998). Se han podido incluso medir reacciones de derivados del Pt, cis-y trans-PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, con el GSH dentro de los glóbulos rojos intactos (Berners-Price y Kuchel, 1990). Sin embargo, existen todavía discrepancias y datos a favor y en contra de que los dos principales tioles intracelulares, glutatión y metalotioneínas, actúen y funcionen eficazmente en la quelación y desintoxicación del cisplatino (revisado en Basu y Krishnamurthy, 2010).

También se incluyen en la Tabla 57 varios genes relacionados con la biosíntesis de nucleótidos de purina (*ADE1*, *ADE17* y *MTD1*), así como otros del metabolismo de la glicina (*GCV3*, *GCV1*, *SMH2*) y de la ruta de biosíntesis del ácido fólico (*FOL1*). La glicina y el 10-formilo tetrahidrofolato se consumen durante la biosíntesis *de novo* de purinas y se ha demostrado previamente que en *S. cerevisiae*, la síntesis de estos co-sustratos está co-regulada con la síntesis de enzimas de la ruta biosintética de la purinas (Denis y Daignan Fournier, 1998). En este contexto, el incremento de expresión de los genes *SHM2* (necesario para la biosíntesis de la glicina) y *MTD1* (biosíntesis de 10-formilo tetrahidrofolato) podría estar contribuyendo también a aumentar la biosíntesis de las purinas. La hipotética estimulación de las vías de biosíntesis de purinas podría ser útil para obtener los nucleótidos necesarios para la reparación de ADN que se induce tras el tratamiento con cisplatino (Kowalska y Kozik, 2008).

Los grupos funcionales sobre-representados estadísticamente entre los genes que experimentan una disminución de su expresión tras el tratamiento con cisplatino (Tabla 58) están relacionados con la biogénesis de los ribosomas e incluyen *RPS8A*, *RPS9B*, *RPS16B*, *RPS8B* y *RPS1B*, necesarios para la maduración del SSU-ARNr (*small subunit-rRNA*) desde el transcrito de ARNr tricistrónico, o *RPS17B*, *NSR1*, *RPS0A*, *RPS26A* y *RPS18B*, que participan en el ensamblaje de la subunidad pequeña ribosomal y/o en la exportación de ARNr del núcleo al citoplasma. Otros genes, también reprimidos por el tratamiento con cisplatino, pero no directamente relacionados con la biogénesis

## Análisis transcripcional de los efectos producidos por cisplatino y la delección de *SKY1* en *Saccharomyces cerevisiae*

---

de los ribosomas, son *TYE7* (regulador positivo de la glucólisis), *FCY2* (permeasa purina-citosina), *AAH1* (adenina desaminasa), *ATO2* y *MEP3* (transporte de amonio) y *HO* (que codifica una endonucleasa necesaria para la recombinación homotática que permite el cambio de fenotipo haploide Mata/Mat $\alpha$ ). *FCY2* y *HO* han sido previamente relacionados con la respuesta de la levadura al tratamiento con cisplatino (Huang *et al.*, 2005; Caba *et al.*, 2005).

### **El incremento de la expresión de los genes relacionados con el metabolismo de compuestos que contienen azufre depende de la función de Sky1p.**

Con el fin de averiguar el papel de Sky1p en respuesta al cisplatino sobre el transcriptoma de la levadura, se llevó a cabo una intersección de la lista de genes diferencialmente expresados que se muestran en las Tablas del anexo S1 y S6 analizando: los genes que incrementan su expresión en la cepa silvestre tras el tratamiento por el cisplatino pero cuya expresión disminuye en la cepa  $\Delta sky1$  tratada. También se realizó la intersección de las Tablas del anexo S2 y S5 analizando: los genes que disminuyen su expresión por el tratamiento con cisplatino en la cepa silvestre pero incrementan su expresión en la cepa  $\Delta sky1$  tratada. Los datos cuantitativos sobre el número de genes dentro y fuera de la intersección se representan en los diagramas de Venn en la Figura 30A. La información detallada de la función de los genes que se encuentran en la intersección se muestra en las Tablas 63 (26 genes) y 64 (11 genes). Los niveles de expresión de estos genes se muestran en la Figura 30B.

**Tabla 63.** Genes sobre-expresados por el cisplatino y por *SKY1* (reprimidos por la mutación en presencia de cisplatino).

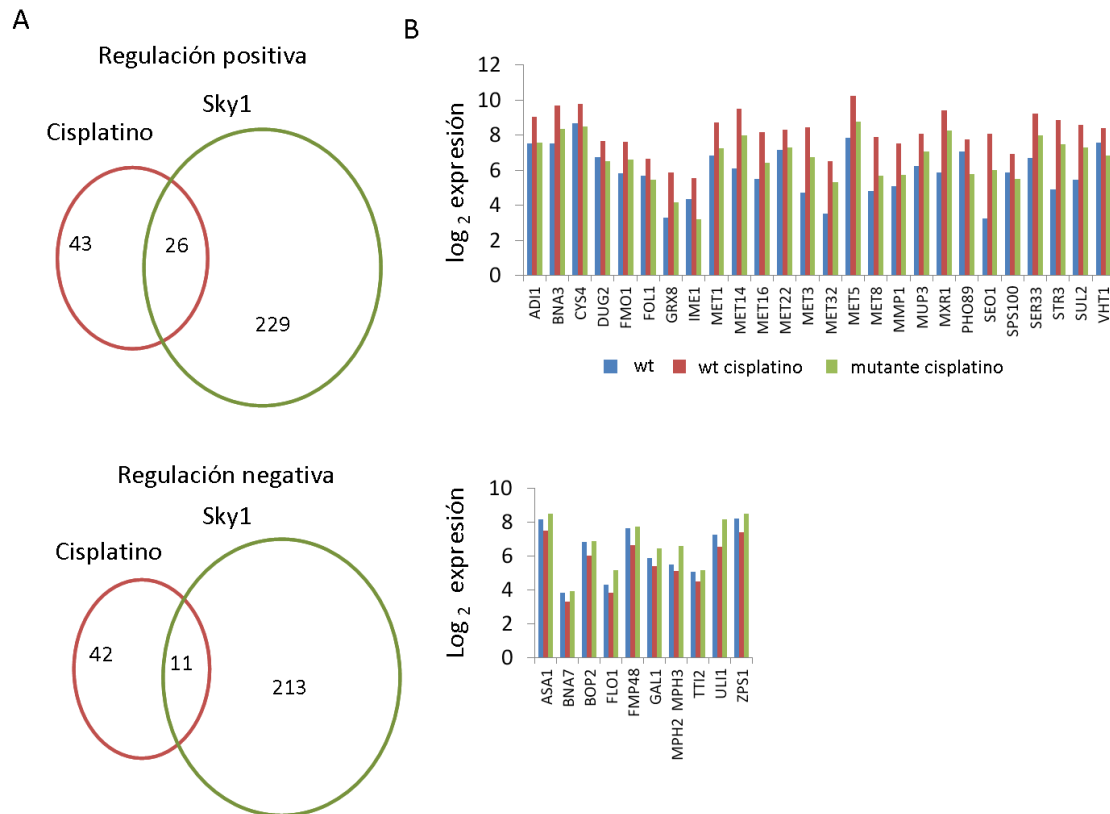
Gen	Función
ADI1	Acireductona dioxigenasa involucrada en rutas de rescate de metionina, ortóloga a la humana MTCBP-1; transcrita con YMR010W y regulada post-transcripcionalmente por escisión ARNasa III (Rnt1p); ADI1 ARNm se induce en condiciones de choque de calor.
BNA3	Kinurenina aminotransferasa. Cataliza la formación de ácido kinurenico a partir de kinureina; sustrato potencial de Cdc28p. Biosíntesis de ácido nicotínico.
CYS4	Cistationina beta-sintetasa. Cataliza la síntesis de cistationina a partir de la serina y la homocisteína, el primer paso de la biosíntesis de cisteína; responsable de la generación de sulfuro de hidrógeno; controla el ciclo celular promoviendo el paso a través de START mediante el crecimiento celular para lo que se requiere su actividad catalítica; además reduciendo el tamaño crítico de las células, lo que es independiente de su actividad catalítica; mutaciones en el ortólogo humano provocan homocistinuria.
DUG2	Componente de la glutamina amidotransferasa (GATase II); forma un complejo con Dug3p que degrada el glutatión (GSH) y otros péptidos que contienen uniones gamma-glu-X en una ruta alternativa para la degradación del GSH por una gamma-glutamil-transpeptidasa (Ecm38p).
FMO1	Monooxigenasa que contiene flavina; localizada en la cara citoplasmática de la membrana del RE; cataliza la oxidación de tioles biológicos para mantener el potencial redox del RE necesario para el correcto plegamiento de los puentes disulfuro de las proteínas.
FOL1	Enzima multifuncional de la ruta de biosíntesis del ácido fólico, tiene actividades dihidropteroate sintetasa, hidroximetilpterin pirofosfoquinasa y dihidroneopterin aldolasa.
GRX8	Glutaredoxina que utiliza un mecanismo ditiol de catálisis; monomérica; su actividad es baja y el mutante nulo no cambia su sensibilidad frente al estrés oxidativo; la proteína de fusiónada a GFT se ha localizado en el citoplasma; expresión fuertemente inducida por arsénico.
IME1	Regulador principal de la meiosis que es activo solo durante eventos meióticos. Activa la transcripción de genes meióticos tempranos a través de la interacción con Ume6p. Es degradada por el proteosoma 26S después de su fosforilación por Ime2p.
MET1	S-adenosil-L-metionina uroporfirinogeno III transmetilasa. Involucrada en la biosíntesis de siroheme, un grupo prostético utilizado por las sulfito reductasas; se necesita para la asimilación de sulfato y la biosíntesis de metionina.
MET14	Adenilil sulfato quinasa necesaria para la asimilación del sulfato e involucrada en el metabolismo de la metionina.
MET16	3'-fosfoadenilil sulfato reductasa. Reduce el 3'-fosfoadenilil sulfato a adenosina-3', 5'-bisfosfato y sulfito libre usando tiorredoxina reducida como cosustrato. Involucrada en la asimilación de sulfato y el metabolismo de metionina.
MET22	Bisfosfato-3'-nucleotidasa. Involucrada en la tolerancia a sales y la biogénesis de metionina; desfosforila la 3'-fosfoadenosina-5'-fosfato y 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato, intermediarios metabólicos en la ruta de asimilación de sulfato
MET3	ATP sulfurilasa. Cataliza el paso inicial de la activación intracelular de sulfato. Esencial para la reducción de la asimilación de sulfato a sulfuro. Involucrada en el metabolismo de metionina.
MET32	Proteína de unión a ADN mediante dedos de Zinc. Implicada en la regulación transcripcional de los genes de biosíntesis de metionina. Similar a Met31p.
MET5	Subunidad beta de la sulfito reductasa. implicada en la biosíntesis de aminoácidos. Su transcripción está reprimida por metionina.
MET8	Enzima bifuncional Deshidrogenasa-ferroquelatasa. Participa en la biosíntesis de siroheme un grupo prostético utilizado por la sulfito reductasa; Es necesaria para la asimilación de sulfato y la biosíntesis de metionina
MMP1	S-metilmetionina permeasa de alta afinidad. Necesaria para la utilización de S-metilmetionina como fuente de azufre; tiene similitud con la S-adenosilmetionina permeasa Sam3p
MUP3	Metionina permeasa de baja afinidad. Similar a Mup1p.
MXR1	Metionina-S-sulfóxido reductasa. involucrada en la respuesta al estrés oxidativo, protege los grupos hierro-azufre de la inactivación oxidativa junto con MXR2; implicadas en la regulación de la duración de la vida de la célula.
PHO89	Cotransportador Na <sup>+</sup> /Pi. activo en la fase temprana de crecimiento, similar a los transportadores de fosfato de <i>Neurospora crassa</i> ; transcripción regulada por las concentraciones de fosfato inorgánico y Pho4p.
SEO1	Permeasa putativa. Miembro de la subfamilia de transportadores de alantoato; su mutación confiere resistencia a sulfóxido etionina.
SPS100	Proteína necesaria para la maduración de la pared de las esporas; expresada durante la esporulación; puede ser un componente de la pared de la espora; expresión inducida también en células tratadas con la micotoxina patulina.
SER33	3-fosfoglicerato deshidrogenasa, cataliza el primer paso en la biosíntesis de serina y glicina; isozima de Ser3p.
STR3	Cistationina beta-liasa del peroxisoma, convierte la cistationina en homocisteína; puede ser regulada por Gto1p mediante cambios redox.
SUL2	Sulfato permeasa de alta afinidad; la captación de sulfato está mediada por transportadores de sulfato específicos Sul1p y Sul2p que controlan la concentración endógena de intermediarios activos de sulfato.
VHT1	Transportador H <sup>+</sup> -biotina (vitamina H) de alta afinidad de la membrana plasmática; la mutación resulta en auxotrofia de ácidos grasos; 12 dominios transmembrana; niveles de ARNm regulados negativamente por la privación de hierro y biotina.



**Tabla 64.** Genes cuya expresión disminuye con el cisplatino y por *SKY1* (activados por la mutación en presencia de cisplatino).

Gen	Función
ASA1	Subunidad del complejo ASTRA. involucrada en la remodelación de cromatina; reguladora de la longitud de los telómeros implicada en la estabilidad o biogénesis de PIKKs tales como TORC1.
BNA7	Formilquinurenina formamidasa. Participa en la biosíntesis <i>de novo</i> de NAD a partir de triptófano a través de la quinurenina.
BOP2	Supresores multicopia de los genes de levadura PAM1 (PAM1 proteína esencial de función desconocida); presenta expresión variable durante la morfogénesis de las colonia. Su sobreexpresión permite la supervivencia en ausencia de <i>protein-fosfatasa 2A</i> . Inhibe el crecimiento e induce un fenotipo filamentoso
FLO1	Proteína similar a la lectina implicada en la floculación. Proteína de la pared celular que se une a las cadenas de manosa de la superficie de otras células. Confiere la capacidad de formación de flóculos que son disgregados por <i>quimotripsina</i> pero son resistentes al calor; similar a Flo5p.
FMP48	Proteína putativa de función desconocida; la proteína no marcada se detecta en las mitocondrias altamente purificadas; inducida por el tratamiento con 8-metoxipsoraleno e irradiación UVA.
GAL1	Galactoquinasa. Fosforila alfa-D-galactosa a alfa-D-galactosa-1-fosfato en la primera etapa del catabolismo de la galactosa; expresión regulada por Gal4p.
MPH2 MPH3	Alfa-glucósido permeasa. Transporta maltosa, maltotriosa, alfa-metilglucósido y turanosa; idéntica a Mph3p; codificada en una región subtelomérica que probablemente haya sido objeto de duplicación.
TTI2	Subunidad del complejo ASTRA. involucrada en la remodelación de cromatina; reguladora de la longitud de los telómeros implicada en la estabilidad o biogénesis de PIKKs tales como TORC1; similar a Tti2p de <i>S. pombe</i> ; puede interactuar con Rsm23p; la proteína de fusión GFP se localiza en el citoplasma.
ULI1	Supuesta proteína de función desconocida que participa y se induce durante la respuesta a proteínas desplegadas ( <i>unfolded protein response</i> ) del retículo endoplasmático.
ZPS1	Supuesta proteína anclada a membrana por GPI, su transcripción es inducida en condiciones de bajo contenido de zinc, mediada por el factor de transcripción Zap1p, y a pH alcalino

## Análisis transcripcional de los efectos producidos por cisplatino y la delección de *SKY1* en *Saccharomyces cerevisiae*



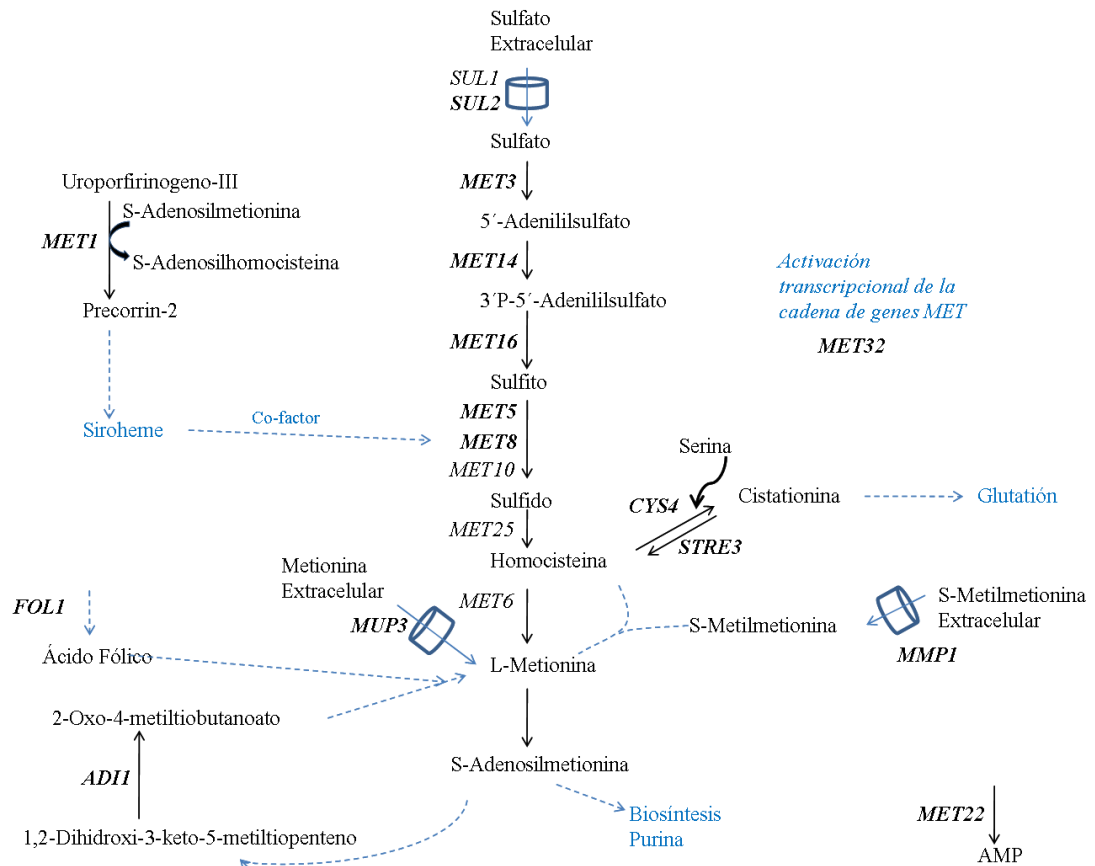
**Figura 30.** Relación entre la respuesta al cisplatino y la función de Sky1p.

Un hecho importante deducido en este estudio es que los cambios en respuesta a cisplatino sobre la expresión de los genes relacionados con la asimilación de compuestos que contienen azufre (*MET1*, *MET14*, *MET16*, *MET22*, *MET3*, *MET32*, *MET5*, *MET8*, *STRE3*, *SUL2*) están mediados por Sky1p. Por otra parte, dentro de este grupo de genes que responden al tratamiento con cisplatino y son dependientes de Sky1p, se encuentran también dos genes que codifican subunidades del complejo de ASTRA y están relacionados con la remodelación de la cromatina (*ASA1* y *TTI2*), tres relacionados con la utilización de los hidratos de carbono (*GAL1*, *MPH2/MPH3*) y los otros que tienen diversas funciones (Tabla 64).

La Figura 31 resume la función de los genes relacionados con las vías de asimilación de compuestos que contienen azufre y son activados por cisplatino. Resaltados en negrita están aquellos que son activados por el cisplatino en una manera dependiente de Sky1p. El efecto opuesto causado por el cisplatino y por la delección del gen *SKY1* sobre estos genes se comprobó también mediante qPCR. Una selección de genes elegida entre los que se

## Análisis transcripcional de los efectos producidos por cisplatino y la delección de *SKY1* en *Saccharomyces cerevisiae*

muestran en la Figura 31 fue sometida a este análisis y los datos se presentan en la Tabla 65. Los resultados obtenidos por qPCR confirman los datos previamente observados con los arrays de ADN.



**Figura 31.** Genes de la asimilación y metabolismo del azufre sobre expresados por el tratamiento con cisplatino y dependientes de Sky1p.

Como se muestra en la Figura 31, no solamente la biosíntesis de metionina producida por la asimilación de sulfato a través de la homocisteína, sino también la incorporación directa de metionina o S-metilmetionina desde el medio extracelular podría tener un papel importante en esta respuesta a cisplatino. Cabe pensar en varios destinos posibles para este incremento de la metionina. La S-adenosilmetionina procedente de esta metionina podría ser utilizada en la biosíntesis de nucleótidos de purina necesarios para la reparación de ADN después de la formación de aductos de ADN con el cisplatino. Además, la S-adenosilmetionina se necesita en la biosíntesis de sirohemo que actúa como cofactor de la enzima sulfito reductasa y que a su vez es necesaria para la asimilación de sulfato. Por otra parte la cistationina es un precursor de glutatión. Por tanto el incremento en la expresión de genes

## Análisis transcripcional de los efectos producidos por cisplatino y la delección de *SKY1* en *Saccharomyces cerevisiae*

---

relacionados con estas rutas es probablemente necesario en las diversas respuestas observadas tras el tratamiento con cisplatino, como la reparación de ADN o la respuesta a estrés oxidativo (Basu y Krishnamurthy, 2010). El papel de la S-adenosil-metionina como donante de grupos metilo en las reacciones de trans-metilación modificadoras de ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y metabolitos secundarios también podría estar relacionado con la respuesta celular a cisplatino. La metilación de ADN, histonas o factores transcripcionales incluso podría tener consecuencias epigenéticas en la activación o represión de genes específicos relacionados con la citotoxicidad o la adquisición de resistencia frente al fármaco. La ingesta de metionina en la dieta se ha asociado con un riesgo reducido de padecer cáncer de colon proximal entre los hombres y de cáncer rectal entre las mujeres (de Vogel *et al.*, 2008), por lo tanto, el efecto citotóxico del cisplatino sobre las células cancerígenas podría estar relacionado con procesos de metilación.

En el análisis de los datos obtenidos con los arrays de ADN, se buscó con interés posibles cambios producidos en la expresión de permeasas, ya que hasta el momento los mecanismos por los que el cisplatino se incorpora al interior de la célula de la levadura no se conocen bien, aunque se ha destacado el papel de un transportador de cobre (Basu y Krishnamurthy, 2010). En la proteína codificada por *SEO1* se predicen ocho regiones transmembrana y presenta similitudes significativas con las permeasas de alantoato (Isnard *et al.*, 1996). No se conocen los sustratos que son transportados por Seo1p, aunque se ha sugerido que podría estar implicada en el transporte de compuestos de azufre distintos de sulfóxido de metionina (Isnard *et al.*, 1996). Los cambios importantes observados en los arrays, en la expresión de *SEO1* en respuesta a cisplatino (incremento) y a la delección de *SKY1* (disminución), fueron también confirmados por qPCR (Tablas 65 y 66). La inducción de *SEO1* después del tratamiento con cisplatino en nuestro conjunto de datos es notable desde el punto de vista cuantitativo (28,5 veces) y es dependiente de Sky1p (Fig. 30B). Teniendo en cuenta que el transportador/es celular del cisplatino, o de los complejos de cisplatino con compuestos de azufre, todavía no se han caracterizado, Seo1p es un buen candidato para poner a prueba en experimentos futuros. Nuestros datos sugieren que el cisplatino, y tal vez otros derivados del Pt, pueden tener un papel directo o indirecto en la activación transcripcional de *SEO1*. Acerca de la regulación del gen *SEO1* también es importante remarcar que aunque es dependiente de Sky1p, no todo el cambio producido por la exposición a cisplatino es eliminado por la delección de *SKY1*

**Análisis transcripcional de los efectos producidos por cisplatino y la  
delección de *SKY1* en *Saccharomyces cerevisiae***

---

(Fig. 30B), lo que sugiere la idea de que el platino o sus derivados podrían tener otro efecto sobre la transcripción *SEO1*. Se ha demostrado que los promotores de *SEO1* de *Hansenula polymorpha* y *S. cerevisiae* son inducibles por cadmio y otros metales pesados, pero el platino no se incluyó en el panel de pruebas, por lo que no podemos extraer un apoyo directo a la hipótesis planteada a partir de dichos estudios (Park *et al.*, 2007).

**Tabla 65.** Cebadores empleados en los ensayos qPCR.

Gene	Nombre del cebador	Secuencia	Nucleótidos	Cadena
<i>Control</i>				
<i>ALG9</i>	AVV115q	gtggccgatcactagatgtg	20	F
<i>ALG9</i>	AVV116q	agggttgaaaacgtctttgtt	22	R
<i>HHO1</i>	AVV35q	gaccacaagtaagggcaaga a	21	F
<i>HHO1</i>	AVV36q	gccttgaagttgatttctcc	21	R
<i>TAF10</i>	AVV37q	gaggagattctagagatgatg gaca	25	F
<i>TAF10</i>	AVV38q	agtctattactgcatcggaatg	23	R
<i>Experimentos</i>				
<i>CTK1</i>	AVV123q	agttgacatgtggggtgtg	20	F
<i>CTK1</i>	AVV124q	ttagagccctggaaaattgc	20	R
<i>DIN7</i>	AVV131q	aaactttgttcagtaaggcgctc	24	F
<i>DIN7</i>	AVV132q	cactcttggattgaaacgcat a	24	R
<i>ECM2</i>	AVV121q	atagtcaaccacaaggcgaa g	21	F
<i>ECM2</i>	AVV122q	gctccccaattcactagatt	21	R
<i>FOX2</i>	AVV155q	tgagggatgggaaaagagc	19	F
<i>FOX2</i>	AVV156q	accttccatgtggcacttc	20	R
<i>GDH3</i>	AVV125q	gccaacattgccagcttc	18	F
<i>GDH3</i>	AVV126q	aaaaacgtctcctgtgcaa	20	R
<i>GLT1</i>	AVV127q	ggtgactgtagaagagggca at	22	F
<i>GLT1</i>	AVV128q	cgacagaggcagcacattt	19	R
<i>HRP1</i>	AVV119q	gcggtgatcgatcgtaa	19	F
<i>HRP1</i>	AVV120q	cacggccgttctctatg	19	R
<i>HUG1</i>	AVV133q	gtcaagaccggctactattcc	22	F
<i>HUG1</i>	AVV134q	acgttcgacggcaatgat	18	R
<i>ICL1</i>	AVV161q	aagagaaattccctgaccaat g	22	F
<i>ICL1</i>	AVV162q	acatggctttggccagtta	20	R
<i>IDP1</i>	AVV129q	aagctacggacacactgatcc	21	F
<i>IDP1</i>	AVV130q	gtgggtgagcagtcgtaggg	20	R
<i>MET1</i>	AVV49q	agaatagaatccactccattttg aa	25	F
<i>MET1</i>	AVV50q	tggtgacgaggattcacta	20	R

**Análisis transcripcional de los efectos producidos por cisplatino y la  
delección de *SKY1* en *Saccharomyces cerevisiae***

---

**Tabla 65.** Cebadores empleados en los ensayos qPCR (continuación).

<b>Gene</b>	<b>Nombre del cebador</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Nucleotidos</b>	<b>Cadena</b>
<i>MET14</i>	AVV141q	gggaggggtgaatcaaggagt	21	F
<i>MET14</i>	AVV142q	aatgtagctctggagctttgg	22	R
<i>MET16</i>	AVV53q	taagccggatggatgtgaa	19	F
<i>MET16</i>	AVV54q	tcccataagaaatccccgta	20	R
<i>MET32</i>	AVV57q	caccgaagtcagcaaaaagc	20	F
<i>MET32</i>	AVV58q	ttccaacgaacatttcgcac	20	R
<i>MET5</i>	AVV51q	ccatggaattttccaagtct	22	F
<i>MET5</i>	AVV52q	aacggcgattttggaacag	20	R
<i>MET8</i>	AVV139q	cgctgtcgtcaaaactagggtg	20	F
<i>MET8</i>	AVV140q	tgacatccttgcgtctggt	20	R
<i>MHT1</i>	AVV151q	gcaccggccgactaataa	18	F
<i>MHT1</i>	AVV152q	cgaccattatcaacgaattt	21	R
<i>ODC2</i>	AVV175q	gactagcaccgggtggttc	19	F
<i>ODC2</i>	AVV176q	tcagatccctgaaaaagtcat c	23	R
<i>POT1</i>	AVV157q	gcggccaagcattatac	18	F
<i>POT1</i>	AVV158q	tgaccacctcttgattta	20	R
<i>POX1</i>	AVV159q	gtttgccgcaataatccagt	20	F
<i>POX1</i>	AVV160q	caacagcgcgatgataagaag g	21	R
<i>SEO1</i>	AVV143q	atgctgcaatgttttggtg	20	F
<i>SEO1</i>	AVV144q	ggcgacaaatcgttttgc	20	R
<i>SPP382</i>	AVV117q	gaattagataattggaacttc acg	25	F
<i>SPP382</i>	AVV118q	caattaaaccataaaaatcca agacc	26	R
<i>STR3</i>	AVV145q	gcctcgaagcttactttgtca	22	F
<i>STR3</i>	AVV146q	ccaagaatccattggggata	20	R
<i>SUL2</i>	AVV135q	gaccctgaatccatggaaaa	20	F
<i>SUL2</i>	AVV136q	gcaatggcctgtcatcttt	20	R

F, forward; R, reverse.

**Análisis transcripcional de los efectos producidos por cisplatino y la  
delección de *SKY1* en *Saccharomyces cerevisiae***

---

**Tabla 66.** Análisis de expresión mediante qPCR.

Gen	W303 T /W303 NT		$\Delta sky1$ T/ W303 T	
	Ratio	p-valor	Ratio	p-valor
<i>MET1</i>	4,08	0,008	-7,13	0,031
<i>MET14</i>	18,26	< 0,001	-2,35	0,025
<i>MET16</i>	6,24	0,003	-2,40	0,003
<i>MET32</i>	4,60	< 0,001	-2,19	< 0,001
<i>MET5</i>	5,24	0,009	-3,07	< 0,001
<i>MET8</i>	1,82	0,034	-1,79	0,025
<i>STR3</i>	13,14	<0,001	-4,14	0,074
<i>SUL2</i>	10,23	0,003	-2,31	0,007
<i>SEO1</i>	5,77	< 0,001	-3,31	0,042

(n=3) T, tratado con cisplatino; NT no tratado. Ratio + activación; Ratio – represión.

**Tabla 67.** Análisis de expresión mediante qPCR.

Gen	$\Delta sky1$ NT/ W303 NT	
	Ratio	p-valor
<i>ICL1</i>	2,79	0,038
<i>SPP382</i>	2,28	0,047
<i>POX1</i>	2,14	0,025
<i>HUG1</i>	2,06	0,001
<i>ODC2</i>	1,77	0,049
<i>MHT1</i>	3,23	0,018
<i>POT1</i>	2,47	0,046
<i>DIN7</i>	2,30	0,049
<i>FOX2</i>	3,04	0,016
<i>IDP1</i>	-2,17	0,033
<i>GDH3</i>	-5,81	0,020
<i>CTK1*</i>	-1,94	0,016
<i>ECM2</i>	-1,78	0,042
<i>GLT1</i>	-2,04	0,018
<i>HRP1</i>	-2,32	0,039

(n=3; \* n=6). NT no tratado. Ratio + activación; Ratio – represión.

## Análisis transcripcional de los efectos producidos por cisplatino y la delección de *SKY1* en *Saccharomyces cerevisiae*

---

**El tratamiento con cisplatino y la delección de *SKY1* producen disminución de la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de ribosomas, pero sus genes diana no son coincidentes.**

El proceso de síntesis de ribosomas ha cobrado gran atención en los últimos años como posible diana para el control del crecimiento de células cancerosas. La estrecha relación entre la síntesis de ribosomas, el crecimiento celular y la tasa de proliferación es bien conocida. La maquinaria transcripcional asociada a la ARN polimerasa I es también considerada como una diana emergente para el tratamiento del cáncer (Drygin, 2010b). Muchos oncogenes y supresores de tumores influyen sobre la transcripción dependiente de la ARN polimerasa I (Trere *et al.*, 2004; Barna *et al.*, 2008) y algunos compuestos utilizados en la quimioterapia contra el cáncer están dirigidos contra la transcripción de ARN ribosómico (Drygin *et al.*, 2010; Drygin *et al.*, 2011). El cisplatino inhibe la síntesis de ARNr en células HeLa, por un mecanismo que afecta a la fase de inicio de la transcripción que lleva a cabo la ARN polimerasa I (Jordan y Carmo Fonseca, 1998). Los resultados de nuestro estudio revelan que el cisplatino también produce en levaduras una disminución de la transcripción de genes relacionados con la biogénesis de ribosomas, pero que son transcritos por la ARN polimerasa II (Tabla 58). La delección de *SKY1* también produce una disminución de la expresión de genes transcritos por la ARN polimerasa II y relacionados con la biogénesis de los ribosomas, pero los genes diana no son coincidentes (Tabla 62). Por lo tanto los mecanismos moleculares desencadenados como consecuencia del tratamiento con cisplatino aparentemente no dependen de Sky1p en lo referente a la biogénesis de ribosomas.

El mecanismo mediante el cual Sky1p podría controlar la biogénesis de ribosomas no se puede deducir sólo del análisis de los resultados obtenidos con los arrays de ADN. Si tenemos en cuenta que datos publicados anteriormente señalan como importantes sustratos de la quinasa Sky1p a proteínas, como Nlp3p o Gbp2p que están relacionadas con la exportación del ARN desde el núcleo al citoplasma y con el procesamiento del ARN (Gilbert *et al.*, 2001; Windgassen y Krebber, 2003; Windgassen *et al.*, 2004), es posible pensar que los mecanismos mediados por Sky1p puedan afectar tanto a procesos transcripcionales como post-transcripcionales.



## Análisis transcripcional de los efectos producidos por cisplatino y la delección de *SKY1* en *Saccharomyces cerevisiae*

---

Un resultado interesante de nuestro estudio es la observación de que en la cepa  $\Delta sky1$  existe una regulación negativa de tres genes, que codifican proteínas que causan una regulación positiva de la transcripción desde el promotor de la ARN polimerasa I (Tabla 60 GO term 0045943). Ctk1 es la subunidad catalítica del complejo CTDK-1 y se activa por fosforilación mediada por CAK1 (Ostapenko y Solomon, 2005). El complejo CTDK-1 regula también el dominio de repetición C-terminal (CTD) de la subunidad mayor de la ARN polimerasa II (Sterner *et al.*, 1995) y se asocia con polisomas para regular la eficacia y la precisión de la traducción (Rother y Strasser, 2007). Además, las mutaciones en las subunidades del complejo CTDK-1 causan una disminución en la eficiencia de la formación de complejos de iniciación en los promotores de genes de ARNr, así como una morfología nucleolar anormal (Bochoux *et al.*, 2004). El efecto sobre la regulación de *CTK1* fue verificado y confirmado por qPCR (Tablas 65 y 67).

### **Funciones de Sky1p que no están relacionadas con la respuesta a cisplatino.**

Hay 177 genes cuya expresión se incrementa (Tabla S3) y 180 cuya expresión disminuye (Tabla S4) cuando *SKY1* se elimina. La distribución funcional se analizó con FunSpec. Los grupos funcionales que están sobre-representados entre los genes que incrementan su expresión se resumen en la Tabla 59. La mayoría de ellos no tienen una función asignada previamente. Entre los genes con función conocida, hay genes de grupos inter-relacionados que intervienen en el metabolismo de los lípidos (GO:0006635 y GO: 0006629), respuesta al estrés (GO: 0006950), los relacionados con la unión de hemo al citocromo *c* (GO: 0018063), biosíntesis de NAD<sup>+</sup> (GO: 0034356) y el proceso de biosíntesis de la tiamina (GO: 0009228). La distribución funcional de genes que disminuyen su expresión tras la delección de *SKY1* muestra como grupos sobre-representados los del procesamiento de ARNr (GO:0006364), metilación del ARNr (GO:0031167), biogénesis de los ribosomas (GO:0042254), el ensamblaje de los ribosomas (GO:0042255) y la regulación positiva de la transcripción del promotor de la ARN polimerasa I (GO:0045943). También se encuentran presentes en esta tabla tres genes de la biosíntesis de glutamato (*GDH3*, *IDP1* y *GLT1*) y cuatro genes relacionados con la desfosforilación (*PHO11*, *PHO5*, *PHO12* y *SDP1*). La regulación de la expresión de una

## Análisis transcripcional de los efectos producidos por cisplatino y la delección de *SKY1* en *Saccharomyces cerevisiae*

---

selección de estos genes se validó mediante qPCR, confirmándose la regulación esperada (Tablas 65 y 67).

Algunos genes relacionados con procesos biológicos como la oxidación de ácidos grasos, el ciclo del glioxalato o rutas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, y que están regulados en respuesta a la delección de *SKY1* no lo están frente al tratamiento con cisplatino. Los genes *THI5*, *THI11*, *THI12* y *THI13* pertenecen a una familia de genes subteloméricos en la que cada gen se localiza en una región subtelomérica de un cromosoma diferente (Wightman y Meacock, 2003). Los genes de esta familia codifican proteínas que catalizan la conversión de piridoxal-fosfato e histidina en hidroximetil pirimidina fosfato (HMP-P) e incrementan su expresión en la cepa  $\Delta sky1$ . El metabolito HMP-P se convierte después en hidroximetil pirimidina bisfosfato (HMP-PP) en una reacción catalizada por la proteína codificada por *THI20*, un gen también sobre-expresado en el mutante  $\Delta sky1$ . En la levadura las rutas de biosíntesis *de novo* de tiamina incluyen la síntesis separada de dos precursores, 4-amino-5-hidroximetil-2-metilpirimidina difosfato y 5-(2-hidroxietil)-4-metiltiazol fosfato, que luego se condensan para formar el monofosfato de tiamina. Se ha sugerido recientemente que la tiamina y su éster fosfato participan en la regulación de la expresión génica ya que influyen en la estructura del ARNm, así como en la reparación del ADN y en la protección de algunos orgánulos contra especies reactivas de oxígeno (Kowalska y Kozik, 2008).

Los genes *MPH2* (YDL247W), *MPH3* (YJR160C), *PAU1* (YJL223C), *PAU8* (YAL068C) y *PAU14* (YIL176C) también se localizan en regiones subteloméricas de los cromosomas. En relación con estos resultados se puede señalar que recientemente se ha encontrado que una cepa de levadura que contiene una doble delección ( $\Delta sky1 \Delta est1$ ) que anula la expresión de *SKY1* y de la telomerasa, tiene un fenotipo de entrada acelerada en el envejecimiento dependiente de telomerasa (Chang *et al.*, 2011). Esto sugiere que Sky1p podría tener un papel en el mantenimiento de la estructura de los telómeros. Así su ausencia podría influenciar la transcripción de genes localizados en las regiones subteloméricas o bien afectar a la estabilidad de estos transcritos. Esta hipótesis abre interesantes caminos para investigaciones futuras. En este contexto es de destacar que Sky1p interacciona con Tor1p (Breitkreutz *et al.*, 2010) y esta proteína se sabe que ejerce un efecto sobre el mantenimiento de la longitud de los telómeros (Ungar *et al.*, 2011).

## **ANEXO AL CAPÍTULO 3**



**Tabla S1.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa W303 tratada con cisplatino *versus* no tratada.

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>SEO1</i>	YAL067C	Supuesta permeasa, miembro de la subfamilia de transportadores de alantoato de la principal superfamilia facilitadora; la mutación confiere resistencia a sulfóxido de etionina.	1,81e <sup>-07</sup>	28,49
<i>STR3</i>	YGL184C	Cistationina beta-liasa, convierte la homocisteína en cistationina.	1,09 <sup>-07</sup>	15,14
<i>MET3</i>	YJR010W	ATP sulforilasa, cataliza el primer paso de la activación intracelular de sulfato; esencial en la asimilación reductora de sulfato a sulfito; implicada en el metabolismo de la metionina.	5,87e <sup>-08</sup>	12,94
<i>MXR1</i>	YER042W	Metionina-S-sulfóxido reductasa; participa en la respuesta al estrés oxidativo, protege los centros hierro-azufre de la inactivación oxidativa junto con <i>MXR2</i> ; interviene en la regulación de la longevidad.	1,03 <sup>-07</sup>	11,41
<i>SUL1</i>	YBR294W	Permeasa de alta afinidad por el sulfato; la captación de sulfato está mediada por transportadores de sulfato específicos Sul1p y Sul2p, que controlan la concentración de los intermediarios sulfato endógenos activados.	3,16e <sup>-05</sup>	10,94
<i>MET14</i>	YKL001C	Adenililsulfato quinasa, necesaria para la asimilación de sulfato e involucrada en el metabolismo de la metionina.	1,99e <sup>-05</sup>	10,58
<i>SUL2</i>	YLR092W	Permeasa de alta afinidad por sulfato; la captación de sulfato está mediada por transportadores específicos sulfato Sul1p y Sul2p, que controlan la concentración de los intermediarios de sulfato endógenos acivados.	5,63e <sup>-08</sup>	8,75
<i>MET8</i>	YBR213W	Enzima bifuncional con actividad deshidrogenasa y ferroquelatasa; implicada en la biosíntesis de sirohemo, un grupo prostético utilizado por la sulfito reductasa y necesario para la asimilación de sulfato y la biosíntesis de metionina.	9,88 <sup>-07</sup>	8,56
<i>MET32</i>	YDR253C	Proteína de unión ADN con un dedo de zinc; participa en la regulación transcripcional de los genes de biosíntesis de metionina; similar a Met31p.	2,80e <sup>-06</sup>	7,94
<i>MET2</i>	YNL277W	L-homoserina-O-acetiltransferasa, cataliza la conversión de homoserina a O-acetil homoserina que es el primer paso de la vía biosintética de metionina.	3,38e <sup>-05</sup>	6,7

**Tabla S1.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa W303 tratada con cisplatino *versus* no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>RAD59</i>	YDL059C	Proteína implicada en la reparación de rupturas de la doble cadena ADN durante el crecimiento vegetativo mediante recombinación y emparejamiento de las cadena sencillas; empareja las cadena sencillas complementarias del ADN; homóloga a Rad52p.	5,26e <sup>-06</sup>	6,33
<i>MET16</i>	YPR167C	3'-fosfoadenilsulfato reductasa, reduce 3'-fosfoadenilil sulfato a adenosina-3',5'-bisfosfato y sulfito libre usando tioredoxina reducida como co-sustrato; implicada en la asimilación de sulfato y el metabolismo de la metionina.	2,29e <sup>-07</sup>	6,29
<i>GRX8</i>	YLR364W	Glutaredoxina que emplea un mecanismo de catálisis ditiol; monomérica; la actividad es baja y su delección no afecta a la sensibilidad al estrés oxidativo; la proteína de fusión GFP se localiza en el citoplasma, expresión fuertemente inducida por arsénico.	4,01e <sup>-07</sup>	5,95
<i>MET17</i>	YLR303W	Metionina y cisteína sintasa (O-acetil homoserina-O-acetil serina sulfhidrilasa), necesaria para la síntesis de aminoácidos con azufre.	2,67e <sup>-06</sup>	5,93
<i>MUP1</i>	YGR055W	Permeasa de alta afinidad por metionina, proteína integral de membrana con 13 supuestas regiones que atraviesan la membrana; también implicada en la captación de cisteína.	6,53e <sup>-05</sup>	5,93
<i>SER33</i>	YIL074C	3-fosfoglicerato deshidrogenasa, cataliza el primer paso en la biosíntesis de serina y glicina; isozima de Ser3p.	4,08e <sup>-07</sup>	5,76
<i>MMP1</i>	YLL061W	S-metilmetionina permeasa de alta afinidad; necesaria para la utilización de S-metilmetionina como fuente de azufre; tiene similitud con la S-adenosilmetionina permeasa Sam3p.	7,66e <sup>-07</sup>	5,43
<i>MET5</i>	YJR137C	Subunidad beta de la sulfito reductasa, implicada en la biosíntesis de aminoácidos; su transcripción se reprime por metionina.	1,89e <sup>-06</sup>	5,32
<i>MHT1</i>	YLL062C	S-metilmetionina-homocisteína metiltransferasa; funciona junto con Sam4p en la conversión de S-adenosil-metionina (AdoMet) a metionina para controlar la relación de metionina / AdoMet.	8,31e <sup>-07</sup>	4,96
<i>MET10</i>	YFR030W	Subunidad alfa de la reductasa asimiladora de sulfito, que convierte sulfito en sulfuro.	3,30e <sup>-06</sup>	4,63

**Tabla S1.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa W303 tratada con cisplatino *versus* no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>BNA3</i>	YJL060W	kinurenina aminotransferasa, cataliza la formación de ácido kinurénico a partir de kinurenina; sustrato potencial de Cdc28p.	1,12e <sup>-06</sup>	4,43
<i>SAM1</i>	YLR180W	S-adenosilmetionina sintetasa, cataliza la transferencia del grupo adenosil del ATP al átomo de azufre de la metionina; una de las dos isoenzimas diferencialmente reguladas (Sam1p y sam2p).	2,21e <sup>-06</sup>	3,9
<i>TIS11</i>	YLR136C	Proteína de unión a ARNm expresada durante la carencia de hierro; se une a un elemento de secuencia en las regiones 3' no traducidas de los ARNm específicos para mediar su degradación; implicada en la homeostasis del hierro.	3,83e <sup>-04</sup>	3,86
<i>AGP3</i>	YFL055W	Permeasa de baja afinidad por aminoácidos, puede actuar para proveer a la célula de aminoácidos utilizados como fuente de nitrógeno en condiciones deficitarias; su transcripción se induce en condiciones de limitación de azufre; desempeña un papel en la regulación de la transposición deTy1.	2,51e <sup>-04</sup>	3,71
<i>MET1</i>	YKR069W	S-adenosil-L-metionina uroporfirinógeno III transmetilasa, implicada en la biosíntesis de sirohemo, un grupo prostético utilizado por la sulfito reductasa, necesaria para la asimilación de sulfato y la biosíntesis de metionina.	4,07e <sup>-06</sup>	3,62
<i>MUP3</i>	YHL036W	Permeasa de metionina de baja afinidad, similar a Mup1p.	1,27e <sup>-06</sup>	3,53
<i>FMO1</i>	YHR176W	Flavin-monooxigenasa, localizada en la cara citoplásmica de la membrana del RE; cataliza la oxidación de tioles biológicos para mantener es estado redox adecuado del RE para el plegamiento correcto de proteínas unidas por enlaces disulfuro.	4,09e <sup>-06</sup>	3,46
<i>CYS3</i>	YAL012W	Cistationina gamma-liasa, cataliza una de las dos reacciones implicadas en la vía de transulfuración que produce cisteína a partir de la homocisteína con la formación intermediaria de cistationina.	9,04e <sup>-06</sup>	3,39
---	YKL068W-A	---	5,75e <sup>-04</sup>	3,13

**Tabla S1.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa W303 tratada con cisplatino *versus* no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>GCV1</i>	YDR019C	Subunidad T del complejo mitocondrial glicina descarboxilasa; necesaria para el catabolismo de la glicina a 5,10-metileno-THF; su expresión está regulada por los niveles de 5,10-metileno-THF en el citoplasma.	7,68e <sup>-05</sup>	2,86
<i>ADI1</i>	YMR009W	Acireductona dioxigeneasa involucrada en la vía de recuperación de la metionina; ortóloga de <i>MTCBP-1</i> humana; co-transcrito con YMR010W y regulado post-transcripcionalmente por la escisión con la ARNasa III (Rnt1p); el ARNm <i>ADI1</i> es inducido en condiciones de choque térmico.	1,24e <sup>-04</sup>	2,81
<i>PDC6</i>	YGR087C	Isoforma menor de la piruvato descarboxilasa, descarboxila piruvato a acetaldehído; involucrada en el catabolismo de aminoácidos; la transcripción es dependiente de glucosa y de etanol, y está fuertemente inducida durante la limitación de azufre.	4,27e <sup>-06</sup>	2,67
---	YLR194C	---	4,43e <sup>-05</sup>	2,59
<i>ADE17</i>	YMR120C	Enzima de biosíntesis <i>de novo</i> de purina que contiene actividades 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido transformilasa e inosina monofosfato ciclohrolasa; isoenzima de Ade16p; los mutantes <i>ade16</i> y <i>ade17</i> necesitan histidina y adenina.	3,05e <sup>-05</sup>	2,5
---	YBR056W-A	---	1,79e <sup>-04</sup>	2,42
<i>OPT1</i>	YJL212C	Transportador de oligopéptidos acoplado al transporte de protones en la membrana plasmática; también transporta glutatión y fitoquelatina; miembro de la familia OPT.	1,07e <sup>-04</sup>	2,36
<i>IME1</i>	YJR094C	Regulador principal de la meiosis que se activa sólo durante los eventos meióticos; activa la transcripción de genes meióticos tempranos a través de la interacción con Ume6p; es degradada por el proteasoma 26S después de la fosforilación por Ime2p.	5,41e <sup>-04</sup>	2,26
<i>MET22</i>	YOL064C	Bisfosfato-3'-nucleotidasa, implicada en la tolerancia a la sal y la biogénesis de la metionina; desfosforila 3'-fosfoadenosina-5'-fosfato y 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato, ambos intermediarios de la vía de asimilación de sulfato.	2,18e <sup>-05</sup>	2,18



**Tabla S1.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa W303 tratada con cisplatino *versus* no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>SHM2</i>	YLR058C	Serina hidroximetiltransferasa citosólica, convierte la serina a glicina más 5,10 metilentetrahidrofolato; principal isoforma involucrada en la generación de precursores de purina, pirimidina, aminoácidos, y la biosíntesis de lípidos.	1,00e <sup>-04</sup>	2,14
<i>CYS4</i>	YGR155W	Cistationina beta-sintasa, cataliza la síntesis de cistationina a partir de la serina y la homocisteína, el primer paso necesario en la biosíntesis de cisteína; responsable de la generación de sulfuro de hidrógeno; mutaciones en el ortólogo humano causan homocistinuria.	6,93e <sup>-05</sup>	2,12
<i>GCV3</i>	YAL044C	Subunidad H del complejo mitocondrial glicina descarboxilasa, necesaria para el catabolismo de la glicina a 5,10-metileno-THF; también se necesita para todas las lipoilaciones de proteínas; la expresión está regulada por los niveles de 5,10-metileno-THF.	5,01e <sup>-05</sup>	2,1
<i>RIM4</i>	YHL024W	Supuesta proteína de unión a ARN necesaria para la expresión de genes tempranos y medios de esporulación.	3,62e <sup>-05</sup>	2,1
<i>YCT1</i>	YLL055W	Transportador de cisteína específico de alta afinidad con similitud a la familia de transportadores de Dal5p; la proteína fusionada a GFP se localiza en el retículo endoplásmico; <i>YCT1</i> no es un gen esencial.	3,73e <sup>-04</sup>	2,09
<i>MTD1</i>	YKR080W	5,10-methylenetetrahydrofolate dehidrogenasa dependiente de NAD; desempeña un papel catalizador en la oxidación de unidades de un carbono citoplásmicas; la expresión está regulada por Bas1p y Bas2p, reprimida por adenina, y pudiera ser inducida por inositol y colina.	1,10e <sup>-04</sup>	2,09
<i>SPS100</i>	YHR139C	Proteína necesaria para la maduración de la pared de las esporas; expresada durante la esporulación; puede ser un componente de la pared de la espora; expresión inducida también en células tratadas con la micotoxina patulina.	3,01e <sup>-04</sup>	2,08
<i>AAD6</i>	YFL056C	Supuesta aril-alcohol deshidrogenasa con similitud a la aril-alcohol deshidrogenada de <i>P. chrysosporium</i> ; participa en la respuesta al estrés oxidativo; expresión inducida en las células tratadas con la micotoxina patulina.	2,83e <sup>-05</sup>	2,08

**Tabla S1.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa W303 tratada con cisplatino *versus* no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>MET6</i>	YER091C	Metionina sintasa independiente de cobalamina, participa en la biosíntesis y la regeneración de metionina; necesita un mínimo de dos glutamatos sobre el sustrato metiltetrahidrofolato, similar a homólogos metE de bacterianas.	3,11e <sup>-04</sup>	2,06
---	YOR385W	---	6,63e <sup>-04</sup>	2,01
<i>LEE1</i>	YPL054W	Proteína con dedo de zinc de función desconocida.	9,90e <sup>-05</sup>	1,98
<i>DIA1</i>	YMR316W	Proteína de función desconocida, que participan en el crecimiento invasivo y pseudohifal; la proteína de fusión a GFP se localiza en el citoplasma en un patrón puntiforme.	1,85e <sup>-04</sup>	1,97
---	YHR112C	---	6,85e <sup>-05</sup>	1,92
<i>FOL1</i>	YNL256W	Enzima multifuncional de la vía de biosíntesis del ácido fólico, tiene actividad dihidropteroato sintetasa, dihidro-6-hidroxiimetilpterin pirofosfoquinasa y dihidroneopterin aldolasa.	3,76e <sup>-04</sup>	1,91
---	YNR064C	---	1,44e <sup>-04</sup>	1,9
<i>DUG2</i>	YBR281C	Probable di- y tri-peptidasa; forma un complejo con Dug1p y Dug3p para degradar el glutatión (GSH) y otros péptidos que contienen un enlace gamma-glu-X en una vía alternativa a GSH degradación por gamma-glutamil transpeptidasa (Ecm38p).	3,73e <sup>-05</sup>	1,89
---	YIR042C	---	3,61e <sup>-04</sup>	1,88
<i>HOM6</i>	YJR139C	Homoserina deshidrogenasa (L-homoserina: NADP oxidorreductasa), enzima dimérica que cataliza el tercer paso en la vía común para la biosíntesis de metionina y treonina; la enzima tiene regiones de unión a nucleótidos, de dimerización y catalítica.	6,64e <sup>-04</sup>	1,78
<i>GTO1</i>	YGR154C	Glutatión transferasa clase omega, inducida bajo estrés oxidativo, supuesta localización peroxisomal.	1,48e <sup>-04</sup>	1,78
<i>AAD16 /// AAD4</i>	YDL243C /// YFL057C	Supuesta aril-alcohol deshidrogenasa con similitud a la aril-alcohol deshidrogenasa de <i>P. chrysosporium</i> . Participa en la respuesta al estrés oxidativo; expresión inducida en las células tratadas con la micotoxina patulina.	1,92e <sup>-04</sup>	1,77

**Tabla S1.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa W303 tratada con cisplatino *versus* no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>ZWF1</i>	YNL241C	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), cataliza el primer paso de la vía de las pentosas fosfato; involucrada en la adaptación al estrés oxidativo; homóloga humana de la G6PD, que es deficiente en pacientes con anemia hemolítica.	4,35e <sup>-04</sup>	1,77
<i>VHT1</i>	YGR065C	Simportador de H <sup>+</sup> y biotina (vitamina H) de alta afinidad en la membrana plasmática; su mutación causa auxotrofia por ácidos grasos; 12 dominios transmembrana como los miembros de la subfamilia del complejo facilitador mayor; los niveles de ARNm se regulan negativamente por la privación de hierro y biotina.	3,95e <sup>-04</sup>	1,76
<i>YPS3</i>	YLR121C	Aspártico proteasa, unida a la membrana plasmática a través de un anclaje GPI.	4,84e <sup>-04</sup>	1,69
<i>ECM13</i>	YBL043W	Proteína no esencial de función desconocida; inducida por el tratamiento con 8-metoxipsoraleno y la irradiación UVA.	4,83e <sup>-04</sup>	1,65
<i>SAM3</i>	YPL274W	S-adenosilmetionina permeasa de alta afinidad, necesaria para la utilización de S-adenosilmetionina como fuente de azufre; tiene similitud con la S-metilmetionina permeasa Mmp1p.	3,14e <sup>-04</sup>	1,65
<i>SAM2</i>	YDR502C	S-adenosilmetionina sintetasa; cataliza la transferencia del grupo adenosil del ATP al átomo de azufre de la metionina; una de las dos isoenzimas diferencialmente reguladas (Sam1p y sam2p).	3,64e <sup>-04</sup>	1,65
<i>ADE1</i>	YAR015W	N-succinil-5-aminoimidazol-4-carboxamida ribósido (SAICAR) sintetasa, necesaria para la biosíntesis <i>de novo</i> de nucleótidos de purina; en las células mutantes privadas de adenina se acumula un pigmento rojo.	2,48e <sup>-04</sup>	1,64
<i>CTF13</i>	YMR094W	Subunidad del complejo CBF3, que se une al elemento CDE III de los centrómeros, curvando el ADN tras su unión; puede estar implicada en la cohesión de cromátidas hermanas durante la mitosis.	8,02 <sup>-04</sup>	1,64
<i>PHO89</i>	YBR296C	Cotransportador Na <sup>+</sup> /Pi, activo en la fase temprana del crecimiento, similar a los transportadores de fosfato de <i>Neurospora crassa</i> ; su transcripción está regulada por las concentraciones de fosfatos inorgánicos y Pho4p.	8,52e <sup>-04</sup>	1,61

**Tabla S1.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa W303 tratada con cisplatino *versus* no tratada (continuación).

<b>Gen</b>	<b>ORF</b>	<b>Función del gen</b>	<b>p-valor</b>	<b>Ratio</b>
<i>ICY2</i>	YPL250C	Proteína de función desconocida; movilizada a los polisomas tras un cambio de una fuente de carbono fermentable a no fermentable; sustrato potencial de Cdc28p.	9,64e <sup>-04</sup>	1,61
<i>ARG7</i>	YMR062C	Ornitina acetiltransferasa mitocondrial, cataliza el quinto paso en la biosíntesis de arginina; también posee actividad acetilglutamato sintasa, regenera acetilglutamato mientras sintetiza ornitina.	4,52e <sup>-04</sup>	1,6

**Tabla S2.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa W303 tratada con cisplatino *versus* no tratada.

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>RPL40B</i>	YKR094C	Proteína de fusión, idéntica a Rpl40Ap, que se escinde para producir la ubiquitina y una proteína ribosómica de la subunidad ribosómica grande (60S) con similitud a la L40 de rata; la ubiquitina puede facilitar el ensamblaje de la proteína ribosomal en ribosomas.	7,51e <sup>-04</sup>	-1,6
<i>RPS26A</i>	YGL189C	Proteína componente de la subunidad ribosómica pequeña (40S); casi idéntica a Rps26Bp y tiene similitud con la proteína ribosomal de rata S26.	3,80e <sup>-04</sup>	-1,61
---	YKR070W	---	1,12e <sup>-04</sup>	-1,63
<i>RPS26A</i>	YGL189C	Proteína componente de la subunidad ribosómica pequeña (40S); casi idéntica a Rps26Bp y tiene similitud a la proteína ribosomal S26 de rata.	6,72e <sup>-04</sup>	-1,63
<i>RPL26B</i>	YGR034W	Proteína componente de la subunidad ribosomal grande (60S), casi idéntica a Rpl26Ap y tiene similitud a L24 de <i>E. coli</i> y la proteína ribosomal L26 de rata; se une a ARNr 5.8S.	5,97e <sup>-04</sup>	-1,63
<i>HO</i>	YDL227C	Endonucleasa específica necesaria para la conversión de genes en el <i>locus</i> MAT (conmutación homotálica) a través de una rotura del ADN de doble cadena; expresión restringida a las células madre en G1 tardía y controlada por Swi4p-Swi6p, Swi5p y Ash1p.	2,10e <sup>-04</sup>	-1,64
<i>RPS8A</i>	YBL072C	Proteína componente de la subunidad ribosómica pequeña (40S); idéntica a Rps8Bp y tiene similitud a la proteína ribosomal S8 de rata.	5,69e <sup>-04</sup>	-1,64
<i>RPS9B</i>	YBR189W	Proteína componente de la subunidad ribosómica pequeña (40S); casi idéntica a Rps9Ap y tiene similitud con <i>E. coli</i> S4 y la proteína ribosomal S9 de rata.	1,13e <sup>-04</sup>	-1,68
<i>RPL2B</i>	YIL018W	Proteína componente de la subunidad ribosomal grande (60S), idéntica a Rpl2Ap y tiene similitud con L2 de <i>E. coli</i> y la proteína ribosomal de rata L8; expresión regulada positivamente a bajas temperaturas.	5,14e <sup>-04</sup>	-1,69
<i>ULI1</i>	YFR026C	Supuesta proteína de función desconocida involucrada e inducida por el retículo endoplásmico en respuesta a proteínas desplegadas (UPR).	4,50e <sup>-04</sup>	-1,69

**Tabla S2.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa W303 tratada con cisplatino *versus* no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>RPS1B</i>	YML063W	Proteína ribosómica 10 (RP10) de la subunidad pequeña (40S); casi idéntica a Rps1Ap y tiene similitud con la proteína ribosomal de rata S3a.	5,73e <sup>-04</sup>	-1,71
<i>FCY2</i>	YER056C	Purina-citosina permeasa, media la acumulación de purinas (adenina, guanina e hipoxantina) y citosina.	2,28e <sup>-04</sup>	-1,71
<i>RPL18A</i> /// <i>RPL18B</i>	YNL301C /// YOL120C	Proteína componente de la subunidad ribosomal grande (60S), idéntica a Rpl18Bp y tiene similitud con la proteína ribosómica L18 de rata; intrón de pre-ARNm RPL18A forma estructuras tallo-bucle que son una diana para la escisión por Rnt1p que conduce a la degradación.	1,55e <sup>-04</sup>	-1,71
<i>RPS18B</i>	YML026C	Proteína componente de la subunidad ribosómica pequeña (40S); casi idéntica a Rps18Ap y tiene similitud con S13 de <i>E. coli</i> y la proteína ribosomal S18 de rata.	4,03e <sup>-04</sup>	-1,72
<i>BOP2</i>	YLR267W	Proteína de función desconocida.	5,14e <sup>-05</sup>	-1,72
<i>ZAP1</i>	YJL056C	Factor transcripcional regulado por zinc; se une a promotores de respuesta a zinc para inducir la transcripción de ciertos genes en presencia de zinc, reprime otros genes cuando los niveles de zinc son bajos; regula su propia transcripción; contiene siete dominios de dedos de zinc.	3,88e <sup>-04</sup>	-1,73
<i>SUC2</i>	YIL162W	Invertasa, enzima hidrolizante de sacarosa; una forma glicosilada secretada es regulada mediante represión por glucosa, mientras que una enzima intracelular, no glicosilada, se produce constitutivamente.	1,47e <sup>-04</sup>	-1,73
<i>MEP3</i>	YPR138C	Permeasa de amonio de alta capacidad y baja afinidad; pertenece a una familia ubicua de proteínas de membrana citoplasmática que sólo transportan amonio (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ); la expresión se encuentra bajo represión catabólica por nitrógeno.	9,09e <sup>-05</sup>	-1,73
<i>PGA1</i>	YNL158W	Componente esencial de GPI-mannosiltransferasa II, responsable de la segunda adición de manosa a los precursores GPI junto con Gpi18p; necesaria para la maduración de Gas1p y Pho8p; tiene interacciones genéticas sintéticas con genes de la vía secretora.	3,55e <sup>-04</sup>	-1,73

**Tabla S2.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa W303 tratada con cisplatino *versus* no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>RPS17B</i>	YDR447C	Proteína ribosomal 51 (RP51) de la subunidad pequeña (40S); casi idéntica a Rps17Ap y tiene similitud con la proteína ribosomal S17 de rata.	2,95e <sup>-04</sup>	-1,73
<i>ASC1</i>	YMR116C	Subunidad beta de la proteína G e inhibidor de la disociación nucleótidos de guanina para Gpa2p; ortóloga de RACK1 que inhibe la traducción; componente del núcleo de la subunidad ribosómica pequeña (40S); reprime Gcn4p cuando no hay carencia de aminoácidos.	1,42e <sup>-04</sup>	-1,75
<i>HLR1</i>	YDR528W	Proteína implicada en la regulación de la composición de la pared celular y la integridad y la respuesta al estrés osmótico; la sobreproducción suprime la una mutación de PKC sensible a la lisis; similar a Lre1p, que funciona antagónicamente a la proteína-quinasa A.	2,94e <sup>-04</sup>	-1,75
<i>RPL6B</i>	YLR448W	Proteína componente de la subunidad ribosomal grande (60S), tiene similitud con Rpl6Ap y la proteína ribosomal de rata L6; se une a ARNr 5.8S.	6,77e <sup>-04</sup>	-1,76
<i>TAT1</i>	YBR069C	Proteína de transporte de aminoácidos para la valina, leucina, isoleucina, y tirosina; transportador de baja afinidad de triptófano e histidina; la sobreexpresión confiere resistencia a FK506 y FTY720.	2,05e <sup>-04</sup>	-1,76
<i>ADH4</i>	YGL256W	Alcohol deshidrogenasa, isoenzima de tipo IV; la enzima dimérica es dependiente de cinc a pesar de su similitud de secuencia con las alcohol deshidrogenasas activadas por hierro; la transcripción se induce en respuesta a la deficiencia de zinc.	1,15e <sup>-04</sup>	-1,76
<i>ZPS1</i>	YOL154W	Supuesta proteína anclada por GPI; su transcripción es inducida bajo condiciones de bajo contenido de zinc y mediada por el factor de transcripción Zap1p y el pH alcalino.	8,11e <sup>-04</sup>	-1,76
<i>RPS8B</i>	YER102W	Proteína componente de la subunidad ribosómica pequeña (40S); idéntica a Rps8Ap y tiene similitud a la proteína ribosomal S8 de rata.	4,35e <sup>-04</sup>	-1,79
<i>PEA2</i>	YER149C	Proteína <i>coiled-coil</i> del polarisoma; necesaria para la morfogénesis en la diferenciación polar, la fusión celular, y el flujo de baja afinidad de Ca <sup>2+</sup> ; forma complejos polarisoma con Bni1p, Bud6p y Spa2p; se localiza en sitios de crecimiento polarizado.	5,10e <sup>-04</sup>	-1,79

**Tabla S2.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa W303 tratada con cisplatino *versus* no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>HTB2</i>	YBL002W	Histona H2B, núcleo de la proteína histona necesario para el ensamblaje de la cromatina y la función del cromosoma; casi idéntica a <i>HTB1</i> ; su ubiquitinación por Rad6p-Bre1p-Lge1p regula la activación transcripcional, la formación meiótica DSB y la metilación de la histona H3.	2,53e <sup>-04</sup>	-1,82
<i>DSE2</i>	YHR143W	Proteína secretada específica de las célula hija con similitud a glucanasas; degrada la pared celular desde el lado de la célula hija causando que esta se separe de la célula madre; expresión reprimida por AMPc.	3,02e <sup>-04</sup>	-1,83
<i>TYE7</i>	YOR344C	Proteína rica en serina que contiene un motivo de unión a ADN de tipo bHLH (basic hélix loop hélix); se une a las cajas reguladoras E en los promotores de genes glicolíticos y contribuye a su activación; puede funcionar como un activador transcripcional de la expresión génica mediada por Ty1.	6,42e <sup>-05</sup>	-1,86
<i>RPS16B</i>	YDL083C	Proteína componente de la subunidad ribosómica pequeña (40S); idéntica a Rps16Ap y tiene similitud con S9 de <i>E. coli</i> y la proteína ribosomal S16 de rata.	7,05e <sup>-04</sup>	-1,86
<i>RPL24A</i>	YGL031C	Proteína ribosómica L30 de la subunidad ribosomal grande (60S), casi idéntica a Rpl24Bp y tiene similitud con la proteína ribosómica L24 de rata; no es esencial para la traducción, pero puede ser necesaria para la tasa normal de traducción.	3,72e <sup>-04</sup>	-1,87
<i>RPS7A</i>	YOR096W	Proteína componente de la subunidad ribosomal pequeña (40S), casi idéntica a Rps7Bp; interactúa con Kti11p; la deleción causa hipersensibilidad a zimocina; tiene similitud a las proteínas ribosomales S7 de rata y S8 de <i>Xenopus</i> .	2,56e <sup>-04</sup>	-1,87
---	YLR413W	---	4,96e <sup>-04</sup>	-1,88



**Tabla S2.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa W303 tratada con cisplatino *versus* no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>ATO2</i>	YNR002C	Supuesta proteína transmembrana involucrada en la exportación de amoníaco; una señal de ayuno que promueve la muerte celular en las colonias envejecidas; se encuentra fosforilada en las mitocondrias; miembro de la familia TC 9.B.33 YaaH; homóloga de Ady2p y también de Gpr1p de <i>Yarrowia lipolytica</i> .	4,83e <sup>-05</sup>	-1,9
---	YDR042C	---	3,67e <sup>-05</sup>	-1,9
<i>RPL22A</i>	YLR061W	Proteína componente de la subunidad ribosomal grande (60S), tiene similitud con Rpl22Bp y la proteína ribosomal de rata L22.	3,04e <sup>-04</sup>	-1,91
<i>FMP48</i>	YGR052W	Supuesta proteína de función desconocida; la proteína no marcada se detecta en las mitocondrias altamente purificadas en estudios localización subcelular a gran escala; inducida por el tratamiento con 8-metoxipsoraleno y la irradiación UVA.	5,27e <sup>-04</sup>	-1,94
<i>HOR2</i>	YER062C	Una de las dos DL-glicerol-3-fosfatidas redundantes (RHR2/GPP1 codifica la otra) que participan en la biosíntesis de glicerol; inducida en respuesta al estrés hiperosmótico y el estrés oxidativo, y durante la transición diauxica.	7,36e <sup>-04</sup>	-1,97
<i>TOS6</i>	YNL300W	Proteína de la pared celular dependiente de glicosilfosfatidilinositol, la expresión es cíclica y disminuye en respuesta al ergosterol o la entrada en fase estacionaria; la delección aumenta la resistencia al ácido láctico.	3,63e <sup>-04</sup>	-1,99
<i>PNS1</i>	YOR161C	Proteína de función desconocida; tiene similitud a Torpedo californica tCTL1p, que se postula como un transportador de colina; ni su delección ni la sobreexpresión afectan al transporte de colina.	6,96e <sup>-04</sup>	-1,99
<i>REC104</i>	YHR157W	Proteína implicada en las etapas iniciales de la recombinación meiótica; necesaria el entrecruzamiento meiótico; forma un complejo con Rec102p y Spo11p necesario durante el inicio de la recombinación.	2,01e <sup>-04</sup>	-1,99
<i>RPL18A</i>	YOL120C	Proteína componente de la subunidad ribosomal grande (60S), idéntica a Rpl18Bp y tiene similitud con la proteína ribosomal L18 de rata; intrón del pre-ARNm RPL18A forma estructuras tallo-bucle que son diana para el corte por Rnt1p lo que conduce a la degradación.	2,11e <sup>-04</sup>	-2,01

**Tabla S2.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa W303 tratada con cisplatino *versus* no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>RPS0A</i>	YGR214W	Proteína componente de la subunidad ribosomal pequeña (40S), casi idéntica a Rps0Bp; necesaria para la maduración del ARNr 18S junto con Rps0Bp; la supresión de cualquiera de los dos genes reduce la tasa de crecimiento; la delección de ambos genes es letal.	7,75e <sup>-05</sup>	-2,05
<i>PHO5</i>	YBR093C	Fosfatasa ácida reprimible (1 de 3) que también media la hidrólisis extracelular de fosfato de derivados de nucleótidos; glicoproteína de superficie celular derivada de la vía secretora; inducida por la carencia de fosfato y coordinadamente regulada por <i>PHO4</i> y <i>PHO2</i> .	7,10e <sup>-05</sup>	-2,08
<i>AAH1</i>	YNL141W	Adenina deaminasa (aminohidrolasa adenina), convierte adenina a hipoxantina, implicada en la recuperación de purinas; transcripcionalmente regulada por los niveles de nutrientes y la fase de crecimiento; Aah1p es degradada a la entrada en quiescencia por SCF y el proteasoma.	1,06e <sup>-04</sup>	-2,16
<i>NSR1</i>	YGR159C	Proteína nucleolar que se une a secuencias de localización nuclear, necesaria para el procesamiento del pre-ARNr y la biogénesis de ribosomas.	5,79e <sup>-05</sup>	-2,17
<i>RPL16A</i>	YIL133C	Proteína acetilada en el extremo N-terminal, componente de la subunidad ribosómica grande (60S), se une a ARNr 5,8S; tiene similitud con Rpl16Bp, L13 de <i>E. coli</i> y la proteína ribosomal L13A de rata; regulada transcripcionalmente por Rap1p.	1,26e <sup>-04</sup>	-2,2
<i>DBP2</i>	YNL112W	ARN helicasa esencial dependiente de ATP de la familia de proteínas DEAD-box, que participa en la degradación mediada por el ARNm sin sentido y en el procesamiento de ARNr.	1,87e <sup>-04</sup>	-2,22
---	YJL107C	---	4,70e <sup>-04</sup>	-2,24
<i>RPL9A</i>	YGL147C	Proteína componente de la subunidad mayor de ribose (60S) y casi idéntica a Rpl9Bp; tiene similitud con las proteínas ribosomales L6 y L9 de <i>E. coli</i>	1,35e <sup>-04</sup>	-2,52

**Tabla S2.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa W303 tratada con cisplatino *versus* no tratada (continuación).

<b>Gen</b>	<b>ORF</b>	<b>Función del gen</b>	<b>p-valor</b>	<b>Ratio</b>
<i>STL1</i>	YDR536W	Simportador de glicerol y protones de la membrana plasmática; sometido a inactivación inducida por glucosa; el gen está fuertemente, pero transitoriamente, inducido cuando las células están sometidas a choque osmótico.	7,14e <sup>-04</sup>	-3,47

**Tabla S3.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada.

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>SFC1</i>	YJR095W	Transportador mitocondrial succinato-fumarato, transporta succinato al interior y fumarato al exterior de la mitocondria, necesario para la utilización de etanol y acetato.	8,21e <sup>-05</sup>	5,48
<i>FBP1</i>	YLR377C	Fructosa-1,6-bifosfatasa, enzima reguladora clave en la ruta de la gluconeogénesis, necesaria para el metabolismo de la glucosa, experimenta degradación mediada por el proteosoma o por autofagia dependiendo de las condiciones de crecimiento, interactúa con Vid30p.	2,49e <sup>-05</sup>	4,75
<i>IDP2</i>	YLR174W	Isocitrato deshidrogenas NADP específica citosólica, cataliza la oxidación de isocitrato a $\alpha$ -cetoglutarato; los niveles son elevados durante el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables y reducidos durante el crecimiento en glucosa.	8,07e <sup>-06</sup>	4,39
---	snR73 /// YMR013W-A	---	1,21e <sup>-05</sup>	4,04
<i>ICL1</i>	YER065C	Isocitrato liasa que cataliza la formación de succinato y glioxalato desde isocitrato, una reacción clave del ciclo del glioxalato; la expresión de <i>ICL1</i> se induce por el crecimiento en etanol y se reprime por el crecimiento en glucosa.	3,74e <sup>-04</sup>	3,69
<i>PCK1</i>	YKR097W	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, enzima clave en la gluconeogénesis, cataliza la primera reacción en la biosíntesis de carbohidratos; la glucosa reprime su transcripción y acelera la degradación de ARNm, es regulado por Mcm1p y Cat8p; localizada en el citosol.	1,92e <sup>-04</sup>	3,66
<i>AGX1</i>	YFL030W	Alanina glioxilato aminotransferasa (AGT), cataliza la síntesis de glicina desde el glioxalato, una de las tres rutas para la biosíntesis de glicina en levaduras; tiene similitudes con la AGT de mamíferos y plantas.	1,64e <sup>-04</sup>	3,54
---	YIL057C	---	6,28e <sup>-04</sup>	3,43
<i>MPA43</i>	YNL249C	Supuesta proteína con función desconocida; la proteína no marcada se detecta en las mitocondrias altamente purificadas en estudios a gran escala..	7,24e <sup>-06</sup>	3,26
---	YMR187C	---	6,03e <sup>-06</sup>	3,23
---	YOR192C-C	---	1,02e <sup>-04</sup>	3,17
<i>REC102</i>	YLR329W	Proteína involucrada en las primeras etapas de la recombinación meiótica; necesaria para la sinapsis de cromosomas; forma un complejo con Rec104p y Spo11p necesario durante el inicio de la recombinación.	1,02e <sup>-06</sup>	3,14

**Tabla S3.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>THI11</i> /// <i>THI12</i> /// <i>THI13</i> /// <i>THI5</i>	YDL244W /// YFL058W /// YJR156C /// YNL332W	Proteína implicada en la síntesis del precursor de tiamina hidroximetil pirimidina (HMP), miembro de una familia de genes subteloméricos incluyendo <i>THI5</i> , <i>THI11</i> , <i>THI12</i> y <i>THI13</i> .	8,72e <sup>-05</sup>	3,06
<i>CTR3</i>	YLR411W	Transportador de cobre de alta afinidad de la membrana plasmática; actúa como un trímero; el gen está interrumpido por la inserción del transposón Ty2 en muchas cepas de laboratorio de <i>S. cerevisiae</i> .	5,15e <sup>-04</sup>	3,04
<i>ULI1</i>	YFR026C	Supuesta proteína de función desconocida involucrada e inducida por la respuesta a proteínas desplegadas en (UPR, <i>Unfolded Protein Response</i> ) el retículo endoplásmico	3,38e <sup>-05</sup>	2,96
<i>ECM27</i>	YJR106W	Proteína no esencial de función desconocida.	1,78e <sup>-04</sup>	2,93
<i>DOG1</i>	YHR044C	2-desoxiglucosa-6-fosfato fosfatasa, similar a Dog2p, miembro de una familia de fosfatasas de bajo peso molecular; confiere resistencia a 2-desoxiglucosa cuando se sobreexpresa; su sustrato <i>in vivo</i> no ha sido identificado todavía.	4,24e <sup>-04</sup>	2,93
---	YLR156W /// YLR157W-E /// YLR159W /// YLR161W	---	6,02e <sup>-06</sup>	2,93
---	YLR156W /// YLR157W-D /// YLR159W /// YLR161W	---	2,81e <sup>-05</sup>	2,88
<i>YAT1</i>	YAR035W	Carnitina acetil-transferasa mitocondrial externa; etanol-inducible e implicada en el transporte de grupos acilo activados desde el citoplasma a la matriz mitocondrial; fosforilada.	2,41e <sup>-05</sup>	2,83
---	YLR342W-A	---	3,13e <sup>-04</sup>	2,82
<i>SPO11</i>	YHL022C	Proteína específica de la meiosis que inicia la recombinación meiótica al catalizar la formación de la ruptura de la doble hélice de ADN a través de una reacción de transesterificación; necesaria para la asociación de cromosomas homólogos y la formación del complejo sinaptonémico.	3,92e <sup>-04</sup>	2,70
<i>SCS3</i>	YGL126W	Proteína necesaria para la prototrofia de inositol, identificada como una ortóloga de la familia FIT de las proteínas implicadas en la biosíntesis de gotas de triglicéridos; controvertido papel en la síntesis de fosfolípidos de inositol a partir de inositol.	5,56e <sup>-05</sup>	2,67

**Tabla S3.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
YET2	YMR040W	Proteína de función desconocida que puede interactuar con los ribosomas, en base a experimentos de co-purificación; homóloga de la proteína humana BAP31.	2,57e <sup>-04</sup>	2,66
NDT80	YHR124W	Factor de transcripción específico de la meiosis necesario para la salida de paquiteno y para la recombinación meiótica completa; activa los genes de la esporulación intermedia; compite con Sum1p por la unión a los promotores que contienen elementos de la esporulación (MSE, <i>middle sporulation elements</i> ).	1,67e <sup>-04</sup>	2,63
---	YIR007W	---	6,77e <sup>-06</sup>	2,56
DIN7	YDR263C	La nucleasa mitocondrial funciona en la reparación y replicación del ADN, modula la estabilidad del genoma mitocondrial, es inducida por la exposición a mutágenos, también se induce durante la meiosis en un momento casi coincidente con la recombinación	7,70e <sup>-06</sup>	2,55
HUG1	YML058W-A	Proteína implicada en la vía de control mediada por Mec1p que responde a daños en el ADN o detención de la replicación; su transcripción es inducida por daño en el ADN.	2,35e <sup>-05</sup>	2,52
TUL1	YKL034W	Ubiquitin ligasa (E3) localizada en el Golgi, que participan en ubiquitinación y localización de las proteínas de membrana que contienen dominios transmembrana polares en los cuerpos multivesiculares para la entrada a la vacuola.	2,37e <sup>-05</sup>	2,46
POX1	YGL205W	Coenzima A oxidasa de ácidos grasos que participa en la vía de la beta-oxidación de ácidos grasos.	9,02e <sup>-05</sup>	2,43
PMT5	YDL093W	Proteína O-mannosiltransferasa, transfiere residuos de manosa desde dolcicil-fosfato-D-manosa a residuos serina/treonina de proteínas; actúa en un complejo con Pmt3p; puede interactuar con Pmt2p en algunas condiciones; considerada diana para nuevos antifúngicos.	2,71e <sup>-05</sup>	2,36
MED4	YOR174W	Subunidad del complejo mediador de la ARN polimerasa II; se asocia con el núcleo de subunidades de la polimerasa para formar la holoenzima ARN polimerasa II; esencial para la regulación transcripcional.	1,05e <sup>-04</sup>	2,35
PGM1	YKL127W	Fosfoglucomutasa, isoforma menor; cataliza la conversión de glucosa-1-fosfato en glucosa-6-fosfato, que es un paso clave en el metabolismo de hexosas.	7,65e <sup>-05</sup>	2,35
MPH2 /// MPH3	YDL247W /// YJR160C	Alfa-glucósido permeasa, transporta maltosa, maltotriosa, alfa-metilglucósido, y turanosa; idéntica a Mph3p; codificada en una posición subtelomérica que ha sido probablemente duplicada.	6,39e <sup>-05</sup>	2,34
---	YJR107W	---	1,79e <sup>-05</sup>	2,33
ERG27	YLR100W	3-ceto esteroil reductasa, cataliza el último de los tres pasos necesarios para eliminar dos grupos metilo C-4 de un intermediario en la biosíntesis de ergosterol; los mutantes	4,73e <sup>-05</sup>	2,32

**Tabla S3.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
		presentan auxotrofia a esteroles.		
<i>THI20</i>	YOL055C	Proteína multifuncional con actividad quinasa hidroximetilpirimidina fosfato (HMP-P) y actividad tiaminasa; participa en la biosíntesis y degradación de tiamina; se incluye en una familia de genes con <i>THI21</i> y <i>THI22</i> ; la actividad quinasa HMP-P es redundante con Thi21p.	1,41e <sup>-04</sup>	2,32
<i>MPH2</i>	YDL247W	Alfa-glucósido permeasa, transporta maltosa, maltotriosa, alfa-metilglucósido, y turanosa; idéntica a Mph3p; codificada en una posición subtelomérica probablemente duplicada.	4,34e <sup>-04</sup>	2,31
---	YPL056C	---	1,35e <sup>-04</sup>	2,30
<i>SIP2</i>	YGL208W	Una de las tres subunidades beta del complejo serina/treonina proteína quinasa Snf1 implicada en la respuesta a agotamiento de glucosa; los mutantes nulos exhiben envejecimiento acelerado; proteína con modificaciones N-miristoil y localizada en el citoplasma y la membrana plasmática.	2,28e <sup>-05</sup>	2,27
<i>GOT1</i>	YMR292W	Proteína homodimérica que se empaqueta en vesículas COPII y circula entre el RE y el Golgi, participa en el transporte secretor pero no es directamente necesaria para el transporte <i>in vitro</i> ; puede influir en la composición de la membrana.	7,29e <sup>-05</sup>	2,26
---	YJL077W-B	---	5,27e <sup>-05</sup>	2,26
<i>PHM8</i>	YER037W	Proteína de función desconocida; su expresión es inducida por bajos niveles de fosfato y por la inactivación de Pho85p.	1,41e <sup>-04</sup>	2,25
---	YML083C	---	3,18e <sup>-04</sup>	2,23
---	YCL021W-A	---	2,67e <sup>-05</sup>	2,20
<i>DFM1</i>	YDR411C	Miembro de la familia <i>derlin-like</i> del RE; involucrada en el estrés del RE y la homeostasis interactúa con Cdc48, contiene cuatro dominios transmembrana y dos dominios SHP.	8,69e <sup>-05</sup>	2,19
<i>ODC2</i>	YOR222W	Transportador de la membrana mitocondrial interna; exporta 2-oxoadipate y 2-oxoglutarato desde la matriz mitocondrial al citosol para su uso en la biosíntesis de lisina y glutamato y en el catabolismo de la lisina.	4,16e <sup>-04</sup>	2,19
---	YDR026C	---	3,52e <sup>-05</sup>	2,19
<i>YSR3</i>	YKR053C	Dihidroesfingosin-1-fosfato fosfatasa; proteína de membrana que participa en el metabolismo de esfingolípidos; tiene similitud con Lcb3p.	7,06e <sup>-05</sup>	2,16
<i>FMP32</i>	YFL046W	Supuesta proteína con función desconocida; la proteína no marcada se detecta en las mitocondrias altamente purificadas en estudios a gran escala.	9,14e <sup>-05</sup>	2,12
<i>RRI1</i>	YDL216C	Subunidad catalítica del complejo <i>COP9 signalosome</i> (CSN) que actúa como una	2,93e <sup>-04</sup>	2,12

**Tabla S3.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
---	---	isopeptidasa en la escisión de la proteína tipo ubiquitina Nedd8; metaloendopeptidasa involucrada en la adaptación a la señalización por feromonas		
---	YJR141W	---	1,61e <sup>-04</sup>	2,12
<i>SRO77</i>	YBL106C	Proteína con papeles en la exocitosis y la homeostasis de cationes; funciones de unión y fusión de vesículas post-Golgi con la membrana plasmática; homólogo a Sro7p y al supresor de tumores letales de larvas gigantes de <i>Drosophila</i> ; interactúa con la proteína SNARE Sec9p.	4,42e <sup>-05</sup>	2,11
<i>TPO5</i>	YKL174C	Proteína implicada en la excreción de putrescina y espermidina; supuesto transportador de poliamina en el aparato de Golgi o vesículas post-Golgi.	8,19e <sup>-05</sup>	2,11
<i>TOS3</i>	YGL179C	Proteína quinasa, relacionada y funcionalmente redundante con Elm1p y Sak1p en la fosforilación y activación de Snf1p; funcionalmente ortóloga a LKB1, una quinasa de mamífero asociada al síndrome de Peutz-Jeghers (síndrome de susceptibilidad a cáncer).	2,13e <sup>-04</sup>	2,10
---	YGL081W	---	1,29e <sup>-04</sup>	2,10
<i>URH1</i>	YDR400W	Uridin-citidin N-ribohidrolasa); escinde enlaces N-glucosídicos en nucleósidos, implicado en las tareas de recuperación de pirimidina y mecanismos de recuperación de nicotinamida ribósido,	3,08e <sup>-05</sup>	2,10
<i>SPP382</i>	YLR424W	Proteína esencial que forma un dímero con Ntr2p; también forma un trímero, con Ntr2p y Prp43p que está implicado en el desensamblaje del spliceosoma; encontrado también en un complejo multimérico con el factor de empalme Clf1p; supresor de la mutación prp38-1.	1,54e <sup>-04</sup>	2,03
---	YDR109C	---	3,90e <sup>-04</sup>	2,01
<i>DIA3</i>	YDL024C	Proteína de función desconocida, que participa en el crecimiento invasivo y pseudo-hifal.	1,64e <sup>-04</sup>	2,00
<i>PUS2</i>	YGL063W	ARNt mitocondrial: pseudouridina sintasa; acúa en las posiciones 27 y 28, pero no en la posición 72;,, específicamente dedicado a la modificación del ARNt mitocondrial.	9,23e <sup>-05</sup>	1,97
<i>GDH2</i>	YDL215C	Glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD (+); degrada glutamato a amoníaco y alfa-cetoglutarato; expresión sensible a la represión catabólica por nitrógeno y a los niveles intracelulares de amoníaco.	1,23e <sup>-04</sup>	1,97
<i>FKS3</i>	YMR306W	Proteína implicada en ensamblaje de la pared de la espora; tiene similitud con las subunidades catalíticas Fks1p y Gsc2p de la enzima 1,3-beta-D-glucano sintasa; se detecta en las mitocondrias altamente purificadas en estudios a gran escala.	4,78e <sup>-04</sup>	1,96
<i>CKS1</i>	YBR135W	Proteín-quinasa dependiente de ciclina; modula la proteólisis de las dianas de la fase M a través de interacciones con el proteasoma; papel en la regulación transcripcional,	2,94e <sup>-04</sup>	1,96



**Tabla S3.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
		reclutando subunidades del proteasoma en los promotores de genes diana.		
<i>IRC6</i>	YFR043C	Supuesta proteína de función desconocida; los mutantes nulos muestran mayores niveles de Rad52p <i>foci</i> .	1,10e <sup>-04</sup>	1,95
<i>BNA5</i>	YLR231C	Kinureninasa, necesaria para la biosíntesis <i>de novo</i> de NAD a partir de triptófano vía quinurenina; expresión regulada por Hst1p.	6,82e <sup>-04</sup>	1,95
<i>JEN1</i>	YKL217W	Transportador de lactato, necesario para la absorción de lactato y piruvato; se encuentra fosforilada; la expresión se desreprime por el activador transcripcional Cat8p durante el crecimiento respiratorio, y es reprimida en presencia de glucosa, fructosa y manosa.	1,81e <sup>-04</sup>	1,95
<i>SPC25</i>	YER018C	Componente del evolutivamente conservado complejo asociado al kinetocoro Ndc80 (Ndc80p-Nuf2p-Spc24p-Spc25p), implicado en la segregación cromosómica y otras actividades.	2,17e <sup>-04</sup>	1,95
<i>ADD66</i>	YKL206C	Proteína implicada en el ensamblaje del proteasoma 20S; forma un heterodímero con Pba1p que se une a los precursores del proteasoma, similar a la humana PAC2 constituyente del complejo PAC1-PAC2, involucrado en el ensamblaje del proteasoma.	5,18e <sup>-04</sup>	1,93
<i>YPS3</i>	YLR121C	Proteasa aspártica, unida a la membrana plasmática a través de un anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI).	1,66e <sup>-04</sup>	1,92
<i>UBP5</i>	YER144C	Supuesta proteasa específica de ubiquitina; análoga más cercana de Doa4p pero no tiene ningún solapamiento funcional; se concentra en el cuello de la gema.	1,08e <sup>-04</sup>	1,92
<i>ARA2</i>	YMR041C	Arabinosa deshidrogenasa dependiente de NAD; implicada en la biosíntesis de deshidro-D-arabinono-1,4-lactona; similar a la L-galactosa deshidrogenasa de plantas.	3,54e <sup>-04</sup>	1,92
<i>ICS3</i>	YJL077C	Proteína de función desconocida.	2,42e <sup>-04</sup>	1,91
<i>ARG3</i>	YJL088W	Ornitina carbamoil-transferasa (carbamoilfosfatoL-ornitina carbamoil-transferasa), cataliza la sexta etapa en la biosíntesis de la arginina con ornitina como precursor.	3,64e <sup>-04</sup>	1,91
---	YDR239C	---	8,34e <sup>-05</sup>	1,91
---	YCR061W	---	2,90e <sup>-05</sup>	1,91
<i>ARO4</i>	YBR249C	3-desoxi-D-arabino-heptuloseonato-7-fosfato (DAHP) sintasa, cataliza el primer paso en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y es inhibida por retroalimentación por tirosina o altas concentraciones de fenilalanina o triptófano	2,72e <sup>-04</sup>	1,91
<i>RRT15</i>	YLR162W-A	Supuesta proteína de función desconocida identificada por comparaciones de homología con hongos y RT-PCR; identificada en una búsqueda de mutantes con disminución de los niveles de transcripción de ADNr.	2,44e <sup>-04</sup>	1,90
<i>IBA57</i>	YJR122W	Proteína de la matriz mitocondrial implicada en la incorporación de complejos hierro-	1,15e <sup>-04</sup>	1,90

**Tabla S3.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
		azufre en las proteínas mitocondriales tipo aconitasa; activa Bio2p y Lip5p (familia radical-SAM); interactúa con Ccr4p en el sistema de doble híbrido.		
---	YPL041C	---	6,45e <sup>-05</sup>	1,90
<i>AIM31</i>	YML030W	Supuesta proteína de función desconocida; la proteína de fusión GFP se localiza en las mitocondrias, puede interactuar con los complejos de la cadena respiratoria III o IV; el mutante nulo es viable y muestra reducción en la frecuencia de la pérdida del genoma mitocondrial	1,51e <sup>-04</sup>	1,89
<i>DER1</i>	YBR201W	Proteína de membrana del retículo endoplásmico, necesaria para la degradación de proteínas asociadas al RE y de proteínas mal plegadas o sin plegar; los extremos N-y C-terminales sobresalen hacia el citoplasma, tiene similitud con Dfm1p	4,00e <sup>-04</sup>	1,87
<i>VMR1</i>	YHL035C	Proteína de función desconocida que puede interactuar con los ribosomas, en experimentos de co-purificación; miembro de la familia ABC (ATP-binding cassette); potencial sustrato de Cdc28p; detectada en mitocondrias purificadas en estudios de localización subcelular a gran escala.	1,80e <sup>-04</sup>	1,86
<i>SIP1</i>	YDR422C	Subunidad beta alternativa del complejo de quinasa Snf1p; puede conferir especificidad de sustrato; proteína vacuolar que contiene dominio KIS (quinasa que interactúa con secuencia) y dominio ASC (asociación con el complejo quinasa Snf1).	8,06e <sup>-05</sup>	1,86
<i>GRH1</i>	YDR517W	Modificada por acetilación; proteína localizada en cis-Golgi involucrada en el transporte entre el RE a Golgi; su homólogo humano es GRASP65; forma un complejo con la proteína Bug1p; sus mutantes tienen comprometida la fusión de vesículas derivadas del RE con las membranas del Golgi.	2,92e <sup>-04</sup>	1,86
<i>PAN5</i>	YHR063C	2-dehidropantoato 2-reductasa, parte de la ruta del ácido pantoténico, estructuralmente homóloga a panE de <i>E. coli</i> .	6,87e <sup>-04</sup>	1,86
---	YDR182W-A	---	4,76e <sup>-04</sup>	1,85
<i>HTD2</i>	YHR067W	3-hidroxiacil-tioéster deshidratasa mitocondrial; implicada en la biosíntesis de ácidos grasos; necesaria para el crecimiento respiratorio y para la morfología mitocondrial normal.	1,19e <sup>-04</sup>	1,85
<i>TRK2</i>	YKR050W	Componente del sistema de transporte de potasio Trk1p-Trk2p	2,66e <sup>-04</sup>	1,85
<i>HNT1</i>	YDL125C	Adenosina 5'-monofosforamidasa; interactúa físicamente y genéticamente con Kin28p (subunidad componente de CDK y TFIIK); genéticamente con <i>CAK1</i> ; es miembro de la superfamilia de proteínas HIT ( <i>histidine triad</i> ) de unión a nucleótidos y similar Hint.	4,36e <sup>-04</sup>	1,85
<i>FRE3</i>	YOR381W	Fero reductasa, reduce el hierro unido al sideróforo antes de la absorción por los transportadores; su expresión es inducida por niveles bajos de hierro.	4,55e <sup>-04</sup>	1,84

**Tabla S3.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada *Δsky1* versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>DMC1</i>	YER179W	Proteína específica de la meiosis necesaria para la reparación de roturas de cadena doble y el apareamiento entre cromosomas homólogos; homóloga de Rad51p y de la proteína bacteriana RecA	2,63e <sup>-04</sup>	1,84
<i>BNA7</i>	YDR428C	Formilquinurenina formamidasa; participa en la biosíntesis <i>de novo</i> de ADN a partir de triptófano vía quinurenina.	3,31e <sup>-04</sup>	1,83
---	YOL024W	---	2,97e <sup>-04</sup>	1,83
<i>DSD1</i>	YGL196W	D-serina deshidratasa (también conocida como D-serina amoniaco liasa); convierte D-serina en piruvato y amoniaco mediante una reacción dependiente de piridoxal 5'-fosfato y zinc; puede jugar un papel en la desintoxicación de D-serina, L-serina no es un sustrato	5,16e <sup>-05</sup>	1,82
<i>ICT1</i>	YLR099C	Ácido lisofosfatídico aciltransferasa, responsable del incremento de la síntesis de fosfolípidos durante el estrés causado por disolventes orgánicos; los nulos muestran un aumento de la sensibilidad a calcofluor blanco; altamente expresada durante el estrés por solvente orgánico.	7,91e <sup>-05</sup>	1,82
<i>MUD1</i>	YBR119W	Proteína U1 snRNPA; ; homóloga a la humana U1-A; involucrada en el <i>splicing</i> de ARNm nuclear	2,80e <sup>-04</sup>	1,81
<i>TTI1</i>	YKL033W	Supuesta proteína de función desconocida; subunidad del complejo ASTRA que es parte de la maquinaria de remodelación de la cromatina; similar a Tti1p de <i>S. pombe</i> ; detectada en las mitocondrias altamente purificadas en estudios de localización subcelular a gran escala.	4,13e <sup>-04</sup>	1,81
---	YCR076C	---	5,79e <sup>-04</sup>	1,81
<i>REG2</i>	YBR050C	Subunidad reguladora de la proteína fosfatasa tipo-1 Glc7p; involucrada con Reg1p, Glc7p y Snf1p en la regulación de genes glucosa-reprimibles; también involucrada en la proteólisis inducida por glucosa de la maltosa permeasa.	3,30e <sup>-05</sup>	1,80
<i>ASA1</i>	YPR085C	Supuesta proteína de función desconocida; subunidad del complejo ASTRA (Rvb1p, Rvb2p, Tra1p, Tti1p, Tti2, Asa1p y Tra1p) que es parte de la maquinaria de remodelación de la cromatina.	1,08e <sup>-04</sup>	1,80
<i>CDC13</i>	YDL220C	Proteína da unión a ADN monocatenario que se encuentra las colas-G (TG1-3) de los telómeros; regula la replicación telómero a través de reclutamiento de subcomplejos específicos, pero la función esencial es el bloqueo de los telómeros.	1,68e <sup>-04</sup>	1,80
<i>NDE2</i>	YDL085W	NADH deshidrogenasa mitocondrial externa; cataliza la oxidación de NADH citosólico; Nde1p y Nde2p están implicadas en el suministro del NADH citosólico a la cadena respiratoria mitocondrial.	4,29e <sup>-04</sup>	1,79

**Tabla S3.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>PAU1 PAU14</i>	YIL176C YJL223C	Miembros de la familia multigénica seripauperina; codificada principalmente en lregiones subtelerómicas; los genes son activos durante la fermentación alcohólica, activados en anaerobiosis; reprimidos por hemo; idéntica a Pau14p.	$1,35e^{-04}$	1,79
<i>CLP1</i>	YOR250C	Subunidad del factor de corte (CFI); involucrada en el corte endonucleolítico (splicing) y pasos de poliadenilación en la maduración del extremo 3' del ARNm	$4,69e^{-04}$	1,79
<i>PDR15</i>	YDR406W	Transportador ABC de la membrana plasmática; transportador de múltiples fármacos y factor general de respuesta al estrés implicado en la desintoxicación celular; regulado por Pdr1p, Pdr3p y Pdr8p; su promotor contiene un elemento de respuesta <i>PDR</i>	$2,57e^{-04}$	1,79
<i>GIP1</i>	YBR045C	Subunidad reguladora de la proteína-fofosfatasa Glc7p específica de meiosis; regula la formación de la pared de las esporas y la organización de septos; necesaria para la expresión de algunos genes meióticos tardíos y para la localización subcelular de Glc7p	$1,06e^{-04}$	1,79
---	YDR336W	---	$1,27e^{-04}$	1,79
---	YNL011C	---	$1,59e^{-04}$	1,79
<i>OXA1</i>	YER154W	Insertasa de la membrana mitocondrial interna, media la inserción de proteínas codificadas tanto en la mitocondria como en el núcleo desde la matriz mitocondrial a la membrana interna mitocondrial; interactúa con los ribosomas mitocondriales; evolutivamente conservada desde las bacterias a los animales	$1,40e^{-04}$	1,78
<i>INP53</i>	YOR109W	Polifosfatidilinositol fosfatasa, defosforila múltiples fosfatidilinositoles; el estrés hiperosmótico provoca la translocación a los agrupamientos de actina; contiene dominios Sac1 y 5-fosfatasa.	$4,42e^{-04}$	1,78
---	YDR222W	---	$1,28e^{-04}$	1,77
<i>YTH1</i>	YPR107C	Se une a RNA y es un componente esencial del factor de corte y poliadenilación; contiene cinco dedos de zinc; necesaria para el procesamiento y poliadenilación del extremo 3' del pre-ARNm.	$2,76e^{-04}$	1,77
<i>ECM3</i>	YOR092W	Proteína no esencial de función desconocida; implicada en la transducción de la señal y la respuesta genotóxica; inducida rápidamente en respuesta al tratamiento con 8-metoxipsoraleno y la radiación UVA.	$6,90e^{-04}$	1,77
<i>SCC4</i>	YER147C	Subunidad del factor de carga del complejo cohesin (Scc2p-Scc4p en los cromosomas; involucrada en el establecimiento de la cohesión de cromátidas hermanas durante la reparación de la ruptura de la doble cadena a través de la histona fosforilada H2AX	$9,56e^{-05}$	1,77
<i>AFG2</i>	YLR397C	ATPasa de la familia CDC48/PAS1/SEC18(AAA); forma un complejo hexamérico; es esencial para la maduración de pre-60S y liberación de varios factores de maduración preribosómicos; puede estar implicada en la degradación de ARNm aberrantes.	$5,21e^{-05}$	1,77

**Tabla S3.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada *Δsky1* versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>PAU8</i>	YAL068C	Proteína de función desconocida, miembro de la familia multigénica seripauperin codificada principalmente en regiones subteloméricas.	1,22e <sup>-04</sup>	1,77
<i>SWD1</i>	YAR003W	Subunidad del complejo COMPAS (Set1C), que metila la histona H3 en la lisina 4 y se necesita en el silenciamiento transcripcional cerca de los telómeros, miembro de la superfamilia WD40 hélice beta con similitud al de mamíferos Rbbp7.	5,40e <sup>-04</sup>	1,76
<i>POT1</i>	YIL160C	3-cetoacil-CoA tiolasa con amplia especificidad de longitud de cadena, escinde 3-cetoacil-CoA en acil-CoA y acetil-CoA durante la beta-oxidación de los ácidos grasos.	2,08e <sup>-04</sup>	1,75
---	YHR213W-A	---	1,20e <sup>-04</sup>	1,75
---	YER152C	---	1,97e <sup>-04</sup>	1,75
<i>RAM2</i>	YKL019W	Subunidad alfa de la farnesiltransferasa y de la geranil geraniltransferasa tipo I que catalizan prenilación de las proteínas que contienen un motivo consenso CAAX; proteína esencial necesaria para la localización en la membrana de las proteína Ras y el factor de mating a.	2,90e <sup>-04</sup>	1,75
<i>AKR2</i>	YOR034C	Proteína que contiene repeticiones ankyrina, similar a Akr1p; miembro de una familia de supuestas palmitoiltransferasas que contienen un dominio rico en Asp-His-His-Cys-cisteína (DHHC-CRD); posiblemente implicada en la endocitosis constitutiva de Ste3p	3,23e <sup>-04</sup>	1,75
<i>PNP1</i>	YLR209C	Purina nucleósido fosforilasa, metaboliza específicamente nucleósidos inosina y guanosina; implicada en la vía de recuperación de ribósido de nicotinamida	5,52e <sup>-04</sup>	1,74
<i>PPE1</i>	YHR075C	Proteína con actividad de carboxil metil esterasa que puede tener un papel en la desmetilación de la subunidad catalítica de la fosfoproteína fosfatasa; también identificada como una proteína de la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial	2,05e <sup>-04</sup>	1,74
---	YIL169C	---	2,59e <sup>-04</sup>	1,74
<i>ALP1</i>	YNL270C	Transportador de arginina; su expresión es normalmente muy baja y no está claro qué condiciones podrían inducir su expresión significativa	3,59e <sup>-04</sup>	1,73
<i>VHS1</i>	YDR247W	Proteína quinasa Serina / treonina citoplásmica; identificada como un supresor, en alta número de copias, de la letalidad sintética de un doble mutante <i>sis2 sit4</i> , lo que sugiere un papel en la progresión de la fase G1/S; homóloga de Sks1p.	1,64e <sup>-04</sup>	1,73
<i>MCD4</i>	YKL165C	Proteína implicada en la síntesis del anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI); proteína con múltiples dominios de membrana que se localiza en el retículo endoplasmático; altamente conservadas entre los eucariotas	4,78e <sup>-04</sup>	1,72
<i>CYC2</i>	YOR037W	Proteína periférica de la membrana mitocondrial interna, contiene un cofactor FAD en un dominio expuesto en el espacio intermembrana; exhibe actividad redox <i>in vitro</i> ; probable participación en la ligación del hemo en los citocromos c y c1 (Cyc1p y Cyt1p).	3,12e <sup>-04</sup>	1,72

**Tabla S3.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>ERG10</i>	YPL028W	Acetil-CoA C-acetiltransferasa (acetoacetil-CoA tiolasa), enzima citosólica que transfiere un grupo acetilo de una molécula de acetil-CoA a otra, formando acetoacetil-CoA; implicada en el primer paso en la biosíntesis de la mevalonato.	$3,61e^{-04}$	1,72
<i>FMP41</i>	YNL168C	Supuesta proteína de función desconocida; proteína GFP de fusión inducida en respuesta al agente MMS que daña el ADN; se detecta en las mitocondrias altamente purificadas en estudios de localización celular a gran escala.	$4,99e^{-04}$	1,72
---	YLR326W	---	$2,16e^{-04}$	1,71
<i>SIR1</i>	YKR101W	Proteína implicada en la represión de la transcripción en los loci de tipo de apareamiento HML y HMR silenciados; sureclutamiento a la cromatina silenciada requiere la interacción con Orc1p y con Sir4p, a través de un dominio Sir1p común; se une a la cromatina centromérica.	$1,63e^{-04}$	1,71
<i>YFH7</i>	YFR007W	Quinasa putativa con similitud a la fosforribulo quinasa / uridina quinasa o pantotenato quinasa bacteriana (PRK / URK / PANK); subfamilia de quinasas con P-loop.	$4,52e^{-05}$	1,71
---	YPL191C	---	$6,23e^{-04}$	1,71
<i>TYW3</i>	YGL050W	ARNt metiltransferasa necesaria para la síntesis de wybutosina, una guanosina modificada encontrada en la posición 3'adyacente al anticodón de ARNt fenilalanina y que favorece el mantenimiento de la pauta de lectura correcta mediante la estabilización de las interacciones anticodón-codón	$6,52e^{-04}$	1,70
<i>SIL1</i>	YOL031C	Factor de intercambio de nucleótidos de la chaperona Hsp70/Kar2p del retículo endoplásmico (;necesaria para la translocación de la proteína en el RE; homóloga de SLS1 de <i>Yarrowia lipolytica</i> ; proteína similar a GrpE.	$4,47e^{-04}$	1,70
<i>DAN4</i>	YJR151C	Manoproteína de la pared celular con similitud a Tir1p, Tir2p, Tir3p, y Tir4p; se expresa bajo condiciones anaeróbicas, completamente reprimida durante el crecimiento aeróbico.	$3,56e^{-04}$	1,69
<i>LSC1</i>	YOR142W	Subunidad alfa de succinil-CoA ligasa, que es una enzima mitocondrial del ciclo TCA que cataliza la conversión dependiente de nucleótidos de succinil-CoA a succinato; se encuentra fosforilada.	$6,58e^{-04}$	1,69
<i>RNH1</i>	YMR234W	Ribonucleasa H1; capaz de unirse ARNs de doble hebra e híbridos ARN-ADN; Se asocia con ARNasa polimerasa I; es homóloga a ARNasa HII de mamífero.	$2,84e^{-04}$	1,68
<i>HNT2</i>	YDR305C	Dinucleósido trifosfato hidrolasa; tiene similitud con el supresor de tumores FHIT y pertenece a la superfamilia HIT (triada de histidina) de proteínas de unión a nucleótidos.	$3,61e^{-04}$	1,68
---	YGR001C	---	$2,50e^{-04}$	1,66
<i>GDB1</i>	YPR184W	Enzima glucógeno desramificante tiene actividades glucanotransferasa y alfa-1 ,6-	$4,43e^{-04}$	1,66

**Tabla S3.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
		amiloglucosidasa, necesarias para la degradación del glucógeno; se encuentra fosforilada en las mitocondrias.		
<i>MHT1</i>	YLL062C	S-metilmetionina-homocisteína metiltransferasa, funciones junto con Sam4p en la conversión de S-adenosil-metionina (AdoMet) a metionina para controlar la relación de metionina / AdoMet.	1,02e <sup>-04</sup>	1,66
<i>CYT2</i>	YKL087C	Citocromo c1 hemo liasa, implicada en la maduración del citocromo c1, que es una subunidad de la ubiquinol citocromo-c- reductasa mitocondrial; una covalentemente hemo al apocitocromo c1.	2,38e <sup>-04</sup>	1,66
<i>IRS4</i>	YKR019C	Proteína que contiene un dominio EH e implicadas en la regulación de los niveles de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato y la autofagia; Irs4p y Tax4p unen y activan la fosfatidilinositol fosfatasa Inp51p; Irs4p y Tax4p están implicadas en la localización de Atg17p.	5,10e <sup>-04</sup>	1,66
<i>PET100</i>	YDR079W	Chaperona que específicamente facilita el ensamblaje de la citocromo c oxidasa; integrada en la membrana interna mitocondrial; interactúa con un subcomplejo de subunidades VII, VIIa y VIII (Cox7p, Cox9p, y Cox8p), pero no con la holoenzima.	3,99e <sup>-04</sup>	1,66
<i>GAL1</i>	YBR020W	Galactoquinasa, fosforila alfa-D-galactosa a alfa-D-galactosa-1-fosfato en la primera etapa del catabolismo de la galactosa; expresión regulada por Gal4p.	9,93e <sup>-05</sup>	1,65
<i>MSS11</i>	YMR164C	Factor de transcripción implicado en la regulación del crecimiento invasivo y degradación de almidón; controla la activación de <i>MUC1</i> y <i>STA2</i> en respuesta a señales nutricionales.	2,17e <sup>-04</sup>	1,65
<i>ARP4</i>	YJL081C	Actina nuclear relacionada con proteínas involucradas en la remodelación de la cromatina, componente de los complejos enzimáticos de remodelación de la cromatina.	2,75e <sup>-04</sup>	1,65
<i>DPP1</i>	YDR284C	Diacilglicerol pirofosfato (DGPP) fosfatasa,; fosfatasa lipídica regulada por zinc asociada a la membrana vacuolar, desfosforila DGPP a fosfatidato (PA) y Pi, a continuación, PA a diacilglicerol; participa en la señalización por lípidos y el metabolismo de la célula.	7,11e <sup>-04</sup>	1,65
<i>KTR1</i>	YOR099W	Alfa-1,2-manosiltransferasa involucrada en O- y N-glicosilación de proteínas; proteína de membrana tipo II; miembro de la familia KRE2/MNT1 de manosiltransferasas.	3,31e <sup>-04</sup>	1,65
<i>ILV3</i>	YJR016C	Dihidroxiácido deshidratasa; cataliza el tercer paso en la ruta común que conduce a la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada.	4,22e <sup>-04</sup>	1,64
<i>THI73</i>	YLR004C	Supuesta permeasa de la membrana plasmática; se ha propuesto que está involucrada en la absorción de ácido carboxílico y reprimida por tiamina; es sustrato de la quinasa Dbf2p/Mob1p; la transcripción se altera si se produce disfunción mitocondrial.	2,30e <sup>-04</sup>	1,64

**Tabla S3.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada *Δsky1* versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>SNA4</i>	YDL123W	Proteína de función desconocida, localizada en la membrana vacuolar externa; se predice que esté palmitoilada.	3,87e <sup>-04</sup>	1,64
---	YPL162C	---	2,28e <sup>-04</sup>	1,64
<i>TRS130</i>	YMR218C	Una de 10 subunidades de la partícula de transporte de proteínas (TRAPP); complejo del cis-Golgi que media el acoplamiento y la fusión de vesículas; implicado en el tráfico de membrana de RE a Golgi; la mutación activa la transcripción de <i>OCH1</i> .	2,58e <sup>-04</sup>	1,64
<i>ECM32</i>	YER176W	ATPasa dependiente de ADN/ADN helicasa que pertenece a la familia Dna2p-y Nam7p-similar de helicasas que está involucrada en la modulación de la terminación de la traducción; interacciona con los factores de terminación de la traducción; se localiza en los polisomas.	4,77e <sup>-04</sup>	1,63
<i>ARG1</i>	YOL058W	Arginosuccinato sintetasa, cataliza la formación de L-argininosuccinato a partir de citrulina y L-aspartato en la ruta de biosíntesis de arginina; sustrato potencial de Cdc28p.	6,62e <sup>-04</sup>	1,63
<i>TES1</i>	YJR019C	Acil-CoA tioesterasa del peroxisoma con probabilidad de estar involucradas en la oxidación de ácidos grasos en vez de en la síntesis; proteína conservada que también se encuentra en los peroxisomas humanos; los niveles de ARNm de <i>TES1</i> aumentan durante el crecimiento en ácidos grasos.	1,40e <sup>-04</sup>	1,63
<i>UBC8</i>	YEL012W	Enzima de conjugación con ubiquitina que regula negativamente la gluconeogénesis; media la ubiquitinación inducida por glucosa de la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa); enzima citoplasmática que también cataliza la ubiquitinación de las histonas <i>in vitro</i> .	5,05e <sup>-04</sup>	1,62
---	YPL067C	---	1,35e <sup>-04</sup>	1,62
<i>MRK1</i>	YDL079C	Homóloga a la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3); una de las cuatro homólogas de GSK-3 en <i>S. cerevisiae</i> que funciona activando la transcripción dependiente de Msn2p de genes que responden a estrés y que funcionan en la degradación de proteínas.	2,56e <sup>-04</sup>	1,62
<i>MDM1</i>	YML104C	Proteína del filamento intermedio, necesaria para la transmisión de nucleos y mitocondrias a las células hijas; contiene un dominio con homología a Phox (PX) y une específicamente fosfatidilinositol 3-fosfato (PtdIns-3-P).	5,49e <sup>-04</sup>	1,61
<i>erf3</i>	---	Factor de liberación de la traducción eRF3 (clase II).	1,17e <sup>-05</sup>	1,61
<i>MTQ1</i>	YNL063W	Metiltransferasa de pendiente de S-adenosilmetionina; metila el factor de liberación de la traducción Mrf1p; similar a PRMC de <i>E. coli</i> ; no es un gen esencial.	4,40e <sup>-04</sup>	1,61
<i>SPR1</i>	YOR190W	Exo-1,3-beta-glucanasa específica de esporulación; contribuye a la termorresistencia de las ascosporas.	5,33e <sup>-04</sup>	1,61
<i>COX18</i>	YGR062C	Proteína mitocondrial integral de la membrana interna necesaria para la inserción en la	3,26e <sup>-04</sup>	1,61



**Tabla S3.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
		membrana del extremos C-terminal de Cox2p; interactúa genética y físicamente con Mss2p y Pnt1p; similar a <i>S. cerevisiae</i> Oxa1, <i>N. crassa</i> Oxa2p, y <i>E. coli</i> YidC		
<i>YHI9</i>	YHR029C	Proteína de función desconocida; el mutante nulo es defectuoso en respuesta a proteínas desplegadas (UPR); posiblemente involucrada en una vía de regulación metabólica de membrana; miembro de la superfamilia PhzF, aunque no parece probable que participe en la producción de fenazina.	5,52e <sup>-04</sup>	1,61
<i>PSD2</i>	YGR170W	Fosfatidilserina descarboxilasa del aparato de Golgi y las membranas vacuolares, convierte fosfatidilserina a fosfatidiletanolamina.	3,75e <sup>-04</sup>	1,61
<i>PBA1</i>	YLR199C	Proteína involucrada en el ensamblaje del proteasoma 20S, forma un heterodímero con Add66p que se une a los precursores del proteasoma, similar a PAC1 humano, componente del complejo PAC1-PAC2 involucrado en el ensamblaje del proteasoma.	2,82e <sup>-04</sup>	1,60
<i>APS2</i>	YJR058C	Subunidad pequeña del complejo AP-2 (adaptador asociado a clatrina), que está implicado en la localización de proteínas de la membrana plasmática; relacionada con la subunidad sigma del complejo de de mamífero (AP-2).	1,82e <sup>-04</sup>	1,60
<i>ALG6</i>	YOR002W	Alfa 1,3 glucosiltransferasa, participaa en la transferencia de oligosacáridos a partir de dolcil pirofosfato a residuos de asparagina de las proteínas durante la N-glicosilación de las proteínas; mutaciones en el ortólogo humano se asocian con enfermedades.	4,42e <sup>-04</sup>	1,60
<i>HPF1</i>	YIL169C /// YOL155C	Manoproteína protectora que reduce el tamaño de las partículas de agregados de proteínas en los vinos blancos.	3,12e <sup>-04</sup>	1,60
<i>AFG3</i>	YER017C	Componente, con Yta12p, de la m-AAA proteasa de la membrana mitocondrial interna que media la degradación de las proteínas mal plegadas o sin ensamblar y es también necesaria para el correcto ensamblaje de los complejos enzimáticos mitocondriales.	5,18e <sup>-04</sup>	1,60
<i>YMC1</i>	YPR058W	Proteína mitocondrial, supuesto transportador de la membrana interna con un papel en el metabolismo de oleato y la biosíntesis de glutamato; miembro de la familia de transportadores mitocondriales (MCF); tiene similitud con Ymc2p.	4,23e <sup>-04</sup>	1,60

**Tabla S4.** Genes cuya expresión disminuyen la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada.

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
---	YLR143W	---	$6,92e^{-05}$	-1,6
STE6	YKL209C	Transportador ABC necesario para la exportación del factor a, cataliza la hidrólisis de ATP acoplada al transporte del factor a; contiene 12 dominios transmembrana y dos dominios de unión a ATP; se expresa sólo en células MATa.	$5,12e^{-04}$	-1,6
RLI1	YDR091C	Proteína hierro-azufre esencial, necesaria para la biogénesis de ribosomas y el inicio de la traducción; facilita la unión de un complejo multifactorial (MFC) de los factores de iniciación de la traducción a la subunidad pequeña ribosómica; se predice como miembro de la familia familia ABC ATPasa.	$2,31e^{-04}$	-1,6
---	YHR022C	---	$1,13e^{-04}$	-1,6
NTE1	YML059C	Esterasa de serina, homóloga de la esterasa humana NTE ( <i>neuropathy target esterase</i> ); El recambio de fosfatidilcolina mediado por Nte1p influye en la localización del factor de transcripción Opi1p, afectando a la regulación transcripcional de los genes de la biosíntesis de fosfolípidos.	$2,33e^{-04}$	-1,6
KRI1	YNL308C	Proteína nucleolar esencial necesaria para la biogénesis de ribosomas 40S, interactúa física y funcionalmente con Krr1p.	$2,92e^{-04}$	-1,6
NTR2	YKR022C	Proteína esencial que forma un dímero con Ntr1p; también forma un trímero, con Ntr2p y la DExD / H-box ARN helicasa Prp43p, que está implicada en el desensamblaje del spliceosoma.	$2,35e^{-04}$	-1,6
KAR3	YPR141C	Motor del microtúbulo dirigido al extremo <i>Minus</i> ; funciona en la mitosis y la meiosis, se localiza en el cuerpo del polo del huso y la localización depende de Cik1p funcional; necesaria para la fusión nuclear durante el apareamiento a/alfa; es un sustrato potencial de Cdc28p.	$3,31e^{-04}$	-1,61
ATO2	YNR002C	Supuesta proteína transmembrana involucrada en la exportación de amoníaco, una señal de ayuno que promueve la muerte celular en las colonias envejecidas; fosforilada en las mitocondrias; miembro de la familia TC 9.B.33 YaaH; homóloga de Ady2p y Gpr1p de <i>Yarrowia lipolytica</i> .	$2,86e^{-04}$	-1,61
RPF2	YKR081C	Proteína esencial involucrada en el procesamiento de pre-ARNr y el ensamblaje de la subunidad 60S ribosomal, interactúa con la proteína ribosomal L11; se localiza predominantemente en el nucléolo; constituyente de las partículas 66s pre-ribosomales.	$4,09e^{-04}$	-1,61

**Tabla S4.** Genes cuya expresión disminuyen la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
---	YPR157W	---	$2,81e^{-04}$	-1,61
<i>SPT7</i>	YBR081C	Subunidad de complejo transcripcional regulador SAGA, que participa en el ensamblaje correcto del complejo; también está presente como una forma C-terminal truncada en el complejo regulador de la transcripción SLIK/SALSA.	$5,53e^{-04}$	-1,62
<i>MRPS5</i>	YBR251W	Proteína mitocondrial de la subunidad pequeña del ribosoma.	$1,54e^{-04}$	-1,62
<i>UTR4</i>	YEL038W	Proteína con similitud de secuencia a 2,3-diceto-5-methylthiopentyl-1-fosfato enolasa-fosfatasa; implicada en la ruta de la metionina; se encuentra tanto en el citoplasma como en el núcleo.	$1,89e^{-04}$	-1,62
<i>CFT1</i>	YDR301W	Subunidad de unión a ARN del factor de corte y poliadenilación; implicada en el reconocimiento del sitio poli (A) y necesaria por tanto para la escisión del pre-ARNm y la poliadenilación; 51% de similitud con la subunidad de unión a la secuencia AAUAA de CPSF de mamíferos.	$7,61e^{-05}$	-1,62
<i>KTR6</i>	YPL053C	Probable mannosilfosfato transferasa implicada en la síntesis del oligosacárido central en la ruta de glicosilación de proteínas; miembro de la familia KRE2/MNT1 de manosiltransferasas.	$5,74e^{-04}$	-1,63
<i>DIE2</i>	YGR227W	alfa-1,2 glucosiltransferasa del RE dependiente de dolicol-fosfoglucosa; funciona en la vía que sintetiza el precursor oligosacárido ligado a dolicol para la N-glicosilación de proteínas; tiene un papel en la regulación de <i>ITR1</i> e <i>INO</i> .	$2,90e^{-04}$	-1,63
<i>CTK1</i>	YKL139W	Subunidad catalítica (alfa) del dominio C-terminal de la quinasa I (CTDK-I), que fosforila tanto la subunidad Rpo21p de la ARN polimerasa II para modular la transcripción y el procesamiento del extremo 3' del pre-ARNm, como la proteína ribosomal Rps2p para aumentar la fidelidad de la traducción.	$2,98e^{-04}$	-1,64
<i>PAC10</i>	YGR078C	Parte del complejo heteromérico co-chaperona GIMC/prefoldina, que promueve el plegamiento eficiente de proteínas.	$2,35e^{-04}$	-1,64
<i>APC11</i>	YDL008W	Subunidad catalítica del núcleo del complejo APC/C ( <i>Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome</i> ), que es una ubiquitín-proteína ligasa necesaria para la degradación de los inhibidores de la anafase, incluyendo ciclinas mitóticas, durante la transición de metafase a anafase.	$6,17e^{-04}$	-1,64
<i>MRT4</i>	YKL009W	Proteína implicada en el recambio de ARNm y en el ensamblaje del ribosoma, se localiza en el nucléolo.	$1,42e^{-04}$	-1,64

**Tabla S4.** Genes cuya expresión disminuyen la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>FPR4</i>	YLR449W	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (PPIasa) (isomerasa de prolina) localizada en el núcleo; cataliza la isomerización de los residuos de prolina en las histonas H3 y H4 lo que afecta a la metilación de lisinas de estas histonas.	$5,64e^{-04}$	-1,65
<i>IDP1</i>	YDL066W	Isocitrato deshidrogenasa mitocondrial NADP específica, cataliza la oxidación de isocitrato a alfa-cetoglutarato; no necesaria para la respiración mitocondrial y puede funcionar para desviar el alfa-cetoglutarato a los procesos biosintéticos.	$6,76e^{-04}$	-1,65
<i>RIM4</i>	YHL024W	Supuesta proteína de unión a ARN necesaria para la expresión de genes tempranos y medios de esporulación.	$6,72e^{-04}$	-1,65
<i>SAP185</i>	YJL098W	Proteína que forma un complejo con la proteína fosfatasa Sit4p y es necesaria para su función; miembro de una familia de proteínas similares que incluyen Sap4p, Sap155p y Sap190p.	$7,11e^{-05}$	-1,65
<i>PHD1</i>	YKL043W	Activador de la transcripción que aumenta el crecimiento pseudohifal, regula la expresión de <i>FLO11</i> , una adhesina necesaria para la formación de filamentos pseudohifales, similar a Stua, un regulador del desarrollo de <i>A. nidulans</i> ; sustrato potencial de Cdc28p.	$4,02e^{-04}$	-1,65
<i>BMS1</i>	YPL217C	GTPasa necesaria para la síntesis de las subunidades ribosomales de 40S y para el procesamiento del pre-ARNr 35S en los sitios A0, A1, y A2; interacciona con Rcl1p, que estimula su actividad GTPasa y su unión a U3 y snoARN; tiene similitud con Tsr1p.	$5,49e^{-04}$	-1,65
<i>ECM33</i>	YBR078W	Proteína con anclaje a GPI de función desconocida; tiene un posible papel en el crecimiento apical de la gema; el anclaje GPI a la membrana plasmática es crucial para su función; se encuentra fosforilada en las mitocondrias; similar a Sps2p y Pst1p.	$6,90e^{-04}$	-1,65
<i>OAC1</i>	YKL120W	Transportador de la membrana mitocondrial interna; transporta oxaloacetato, sulfato, tiosulfato e isopropilmalato; miembro de la familia de transportadores mitocondriales.	$5,39e^{-04}$	-1,65
<i>NUP133</i>	YKR082W	Subunidad del subcomplejo Nup84p del complejo del poro nuclear (NPC); se localiza a ambos lados del NPC; necesaria para establecer un gradiente nucleocitoplasmico normal de concentración de la proteína Gsp1p con actividad GTPasa.	$1,49e^{-04}$	-1,66
<i>PTR2</i>	YKR093W	Transportador de péptidos integral de membrana; media el transporte de di- y tri-péptidos; proteína conservada que contiene 12 dominios transmembrana; su expresión está regulada por la regla del extremo N-terminal a través de la represión por Cup9p.	$5,16e^{-04}$	-1,66

**Tabla S4.** Genes cuya expresión disminuyen la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>POR2</i>	YIL114C	Supuesta porina mitocondrial (canal de aniones dependiente de voltaje), relacionada con Por1p pero no se necesita para la permeabilidad de la membrana mitocondrial o para la estabilidad osmótica de las mitocondrias.	1,57e <sup>-04</sup>	-1,66
---	YPL071C	---	3,91e <sup>-04</sup>	-1,67
<i>DBP6</i>	YNR038W	Proteína esencial implicada en la biogénesis de los ribosomas; supuesta ARN helicasa ATP-dependiente de la familia de las proteínas DEAD-box.	3,84e <sup>-04</sup>	-1,68
<i>NAN1</i>	YPL126W	Proteína U3 snoRNP, componente de SSU ( <i>small ribosomal subunit</i> ) procesosoma; necesaria para la biogénesis de ARNr de 18S.	2,05e <sup>-04</sup>	-1,68
<i>SNM1</i>	YDR478W	Subunidad de la ARNasa MRP, que escinde pre-ARNr y tiene un papel en la degradación del ARNm específico de células hijas regulado por ciclo celular; se une a la subunidad NME1 ARN de la ARNasa MRP.	1,20e <sup>-04</sup>	-1,68
<i>GLT1</i>	YDL171C	Glutamato sintasa dependiente de NAD <sup>+</sup> (GOGAT); sintetiza glutamato a partir de glutamina y alfa-cetoglutarato; con Gln1p, forma la vía secundaria para la biosíntesis de glutamato a partir de amoníaco; su expresión está regulada por la fuente de nitrógeno.	5,97e <sup>-04</sup>	-1,68
<i>UTP21</i>	YLR409C	Subunidad del preribosoma de 90S que contiene U3 y también subunidad del complejo del SSU procesosoma; involucrada en la producción de ARNr de 18S y en el ensamblaje de la subunidad menor del ribosoma; su homóloga humana está relacionado con el glaucoma.	4,70e <sup>-05</sup>	-1,68
<i>RSA4</i>	YCR072C	Proteína con regiones WD (repeticiones de tirtófano y aspártico) implicada en la biogénesis de los ribosomas; puede interactuar con los ribosomas, necesaria para la maduración y el transporte eficiente intra-nuclear de subunidades ribosomales pre-60S; se localiza en el nucléolo.	1,69e <sup>-04</sup>	-1,68
<i>PUS1</i>	YPL212C	ARNt: pseudouridina sintasa, introduce pseudouridinas en las posiciones 26-28, 34-36, 65, y 67 del ARNt; proteína nuclear que parece estar implicada en la exportación de ARNt; también actúa sobre el snARN U2.	1,33e <sup>-04</sup>	-1,69
<i>MOT1</i>	YPL082C	Proteína esencial abundante implicada en la regulación de la transcripción; elimina Spt15p (TBP) de su unión a ADN a través de su actividad ATPasa C-terminal; forma un complejo con TBP que se une a las cajas TATA del ADN con alta afinidad pero con especificidad alterada.	5,69e <sup>-05</sup>	-1,69

**Tabla S4.** Genes cuya expresión disminuyen la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>NOP58</i>	YOR310C	Proteína implicada en el procesamiento del pre-rRNA, síntesis del ARNr 18S y la síntesis de ARNsno; componente del complejo SSU procesoma, que se requiere para el procesamiento de pre-18S rRNA.	$3,08e^{-04}$	-1,69
---	YHL044W	---	$3,18e^{-04}$	-1,69
<i>KAP104</i>	YBR017C	Transportina o karioferina beta 2 citosólica; funciona en la localización rg-nuclear mediada por señal para la importación al núcleo del ARNm unido a las proteínas Nab2p y Hrp1p; regula la síntesis asimétrica de proteínas en las células hijas durante la mitosis.	$5,71e^{-04}$	-1,69
<i>SCM3</i>	YDL139C	Componente de la cromatina centromérica no histona que se une estequiométricamente a las histonas CenH3-H4; necesaria para el ensamblaje de cinetocore; contiene señal de exportación nuclear (NES); necesaria para la progresión del ciclo celular de la fase G2 a la M y para la localización de Cse4p.	$3,38e^{-05}$	-1,69
<i>PSF2</i>	YJL072C	Subunidad del complejo GINS (Sld5p, Psf1p, Psf2p, Psf3p), que se localiza en los orígenes de replicación de ADN e implicada en el ensamblaje de la maquinaria de replicación del ADN.	$7,26e^{-05}$	-1,7
<i>RSA3</i>	YLR221C	Proteína con un probable papel en la maduración ribosomal, necesaria para la acumulación de subunidades ribosomales grandes (60S) de tipo silvestre; se une a la helicasa Dbp6p en las partículas ribosomales pre-60S en el nucléolo.	$3,26e^{-04}$	-1,7
<i>NOP7</i>	YGR103W	Componente de varias partículas pre-ribosomales diferentes; forma un complejo con Ytm1p y Erb1p que es necesario para la maduración de la subunidad ribosómica grande; requerida para la salida de la fase G <sub>0</sub> y la iniciación de la proliferación celular.	$2,52e^{-04}$	-1,7
<i>VHT1</i>	YGR065C	Simportador de H <sup>+</sup> junto con biotina (vitamina H) de alta afinidad en la membrana plasmática; la mutación causa auxotrofia de ácidos grasos; 12 dominios transmembrana como los miembros de la subfamilia del complejo facilitador mayor; los niveles de ARNm se regulan negativamente por la privación de hierro y biotina.	$3,12e^{-04}$	-1,7
<i>CCT8</i>	YJL008C	Subunidad del complejo citosólico chaperonina Cct-ring; relacionada con Tcp1p, necesaria para el ensamblaje de actina y tubulinas <i>in vivo</i> .	$1,84e^{-04}$	-1,7
<i>MRPS16</i>	YPL013C	Proteína de la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial.	$6,19e^{-04}$	-1,7

**Tabla S4.** Genes cuya expresión disminuyen la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>CDC27</i>	YBL084C	Subunidad del complejo APC/ C ( <i>Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome</i> ) que es una proteína ubiquitina-ligasa necesaria para la degradación de los inhibidores de la anafase, incluyendo ciclinas mitóticas, durante la transición metafase/anafase.	1,86e <sup>-04</sup>	-1,7
<i>PRM7</i>	---	Proteína regulada por feromonas, con un segmento transmembrana predecible; el promotor del gen contiene elementos de unión al regulador Gcn4p.	2,58e <sup>-04</sup>	-1,71
<i>FIT2</i>	YOR382W	Manoproteína que se incorpora en la pared celular a través de un anclaje GPI, y que participa en la retención de sideróforos de hierro en la pared celular.	4,78e <sup>-04</sup>	-1,71
---	YPL107W	---	6,83e <sup>-04</sup>	-1,72
<i>SLY41</i>	YOR307C	Proteína implicada en el transporte del RE al Golgi.	1,23e <sup>-04</sup>	-1,72
---	YOL114C	---	3,60e <sup>-04</sup>	-1,73
<i>MRPL33</i>	YMR286W	Proteína de la subunidad mayor del ribosoma mitocondrial.	4,41e <sup>-04</sup>	-1,73
<i>RVB1</i>	YDR190C	Proteína esencial que interviene en la regulación de la transcripción; componente de los complejos de remodelación de la cromatina; necesaria para el ensamblaje y la función del complejo INO80; también nombrada como pontina; miembro de la familia de proteínas de tipo RuvB.	1,62e <sup>-04</sup>	-1,74
<i>MRD1</i>	YPR112C	Proteína esencial conservada que forma parte de los preribosomas 90S; necesaria para la producción de ARNr 18S y la subunidad ribosómica pequeña; contiene cinco dominios consenso de unión a ARN.	2,94e <sup>-04</sup>	-1,75
<i>RRG9</i>	YNL213C	Proteína de función desconocida; el mutante nulo carece de ADN mitocondrial y no puede crecer en glicerol; se detecta en las mitocondrias altamente purificadas en estudios de localización celular a gran escala.	7,56e <sup>-05</sup>	-1,75
<i>TIF6</i>	YPR016C	Constituyente de la partículas pre-ribosomales de 66S; tiene similitud con el factor 6 de inicio de la traducción humano (eIF6); puede estar implicada en la biogénesis y/o estabilidad de subunidades ribosomales de 60S.	1,83e <sup>-04</sup>	-1,75
<i>TRM7</i>	YBR061C	2'-O-ribosa metiltransferasa; metila el 2'-O-ribosa de los nucleótidos en las posiciones 32 y 34 del bucle anticodón del ARNt	6,92e <sup>-04</sup>	-1,75
<i>MRH1</i>	YDR033W	Proteína que se localiza principalmente en la membrana plasmática, también se encuentra en la envoltura nuclear, se detecta en las mitocondrias en un estado fosforilado; tiene similitud con Hsp30p y Yro2p.	2,42e <sup>-04</sup>	-1,75

**Tabla S4.** Genes cuya expresión disminuyen la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>PSK2</i>	YOL045W	Uno de las dos (véase también <i>PSK1</i> ) proteín-quinasas S/T que contienen dominios PAS; regula el flujo de azúcares y la traducción en respuesta a un metabolito desconocido fosforilando <i>Ugp1p</i> y <i>Gsy2p</i> (flujo de azúcar) o <i>Caf20p</i> , <i>Tif11p</i> y <i>Sro9p</i> (traducción).	$7,48e^{-05}$	-1,76
<i>GPM3</i>	YOL056W	Homólogo de <i>Gpm1p</i> , fosfoglicerato mutasa que convierte el 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato en la glucólisis; puede ser un derivado no funcional de un evento de duplicación de genes.	$4,98e^{-04}$	-1,76
<i>RPC40</i>	YPR110C	Subunidad AC40 de la ARN polimerasa, común a las ARN polimerasas I y III.	$8,92e^{-05}$	-1,76
<i>NRD1</i>	YNL251C	Proteína de unión a ARN que interacciona con el dominio C-terminal de la subunidad grande de la ARN polimerasa II ( <i>Rpo21p</i> ), preferentemente en la Ser5 fosforilada; necesaria para la terminación de la transcripción y maduración del extremo 3' de ARNs no poliadenilados.	$4,25e^{-04}$	-1,76
<i>RLF2</i>	YPR018W	Subunidad mayor (p90) del complejo de ensamblado de la cromatina (CAF-1) con <i>Cac2p</i> y <i>Msi1p</i> que ensambla a las histonas recientemente sintetizadas con el ADN recién replicado; implicada en el mantenimiento de la cromatina transcripcionalmente silenciada.	$7,18e^{-05}$	-1,76
<i>MAD1</i>	YGL086W	Proteína <i>coiled-coil</i> implicada en el control del ensamblaje del huso; fosforilada por <i>Mps1p</i> tras la activación que conduce a la inhibición de la actividad del complejo promotor de la anafase; forma un complejo con <i>Mad2p</i> .	$9,55e^{-05}$	-1,78
<i>RRP3</i>	YHR065C	Proteína implicada en el procesamiento del ARNr; necesaria para la maduración del transcrito primario de pre-ARNr 35S y para la escisión que conduce a ARNr de 18S maduro; homóloga a eIF-4a, que es ATPasa dependiente de ARN con una caja DEAD y actividad helicasa.	$7,62e^{-05}$	-1,78
<i>FUN12</i>	YAL035W	GTPasa, necesaria para la iniciación general de la traducción mediante la promoción de la unión de Met-tRNA cargado con Met a ribosomas y la unión de las subunidades ribosomales; homólogo a IF2 bacteriano.	$3,02e^{-04}$	-1,78
<i>TRL1</i>	YJL087C	ARNt ligasa, necesaria para el <i>splicing</i> del ARNt; compuesta por tres dominios esenciales que confieren actividad fosfodiesterasa, polinucleótido quinasa, y ligasa; localizada en la membrana interna de la envoltura nuclear.	$4,38e^{-04}$	-1,79
<i>NNF2</i>	YGR089W	Proteína que exhibe interacciones físicas y genéticas con <i>Rpb8p</i> , que es una subunidad de las ARN polimerasas I, II, y III; el estudio a gran escala de las interacciones proteína-proteína sugiere un papel en la segregación cromosómica.	$3,34e^{-04}$	-1,79



**Tabla S4.** Genes cuya expresión disminuyen la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
---	YKR023W	---	$3,98e^{-04}$	-1,79
---	YDR034W-B	---	$4,34e^{-04}$	-1,79
<i>GIR2</i>	YDR152W	Proteína citoplásmica altamente ácida que contiene el dominio RWD; de función desconocida, interactúa con Rbg1p y Gcn1p; se asocia con los ribosomas que están activos traduciendo; proteína no estructurada.	$2,17e^{-04}$	-1,8
---	YCR100C	---	$6,03e^{-04}$	-1,8
<i>PET117</i>	YER058W	Proteína necesaria para el ensamblaje de la citocromo c oxidasa.	$3,50e^{-04}$	-1,81
<i>IMP3</i>	YHR148W	Componente del SSU procesoma, que se requiere para el procesamiento del pre-ARNr de 18S; proteína esencial que interactúa con Mpp10p y media las interacciones de Imp4p y Mpp10p con el snoARN U3.	$3,82e^{-04}$	-1,81
<i>NCA3</i>	YJL116C	Proteína que funciona con Nca2p para regular la expresión mitocondrial de las subunidades 6 (Atp6p) y 8 (Atp8p) de la ATP sintasa Fo-F1; miembro de la familia SUN; expresión inducida en las células tratadas con la micotoxina patulina.	$1,38e^{-04}$	-1,81
<i>SLK19</i>	YOR195W	Proteína asociada cinetocoro necesaria para la segregación normal de cromosomas en la meiosis y mitosis; componente del sistema regulador FEAR, que promueve la liberación de Cdc14p del nucleolo durante la anafase; sustrato potencial de Cdc28p.	$4,24e^{-04}$	-1,82
<i>TRM5</i>	YHR070W	ARNt (m (1) G37) metiltransferasa; metila una guanina del ARNt adyacente al anticodón que tiene un papel en la prevención del salto de pauta de lectura; altamente conservada a través de Archaea, Bacteria y Eukaria.	$4,58e^{-04}$	-1,83
<i>GAL7</i>	YBR018C	Galactosa-1-fosfato uridil transferasa, sintetiza glucosa-1-fosfato y UDP-galactosa desde la UDP-D-glucosa y alfa-D-galactosa-1-fosfato en el segundo paso del catabolismo de la galactosa.	$2,39e^{-04}$	-1,83
<i>PAU24</i>	YBR301W	Manoproteínas de la pared celular con similitud a Tir1p, Tir2p, Tir3p, y Tir4p; miembro de la familia multigénica seripauperin codificada principalmente en regiones subtelméricas; se expresa bajo condiciones anaeróbicas; el gen está completamente reprimido durante el crecimiento aeróbico.	$6,61e^{-05}$	-1,83
<i>CTR9</i>	YOL145C	Componente del complejo Paf1p que se une y modula la actividad de las ARN polimerasas I y II; necesaria para la expresión de un subconjunto de genes, incluyendo genes de ciclina; contiene repeticiones TPR.	$5,50e^{-04}$	-1,84
<i>SCY1</i>	YGL083W	Supuesta quinasa, supresora de la mutación GTPasa, similar a la rodopsina quinasa bovina.	$5,44e^{-04}$	-1,84

**Tabla S4.** Genes cuya expresión disminuyen la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>IRC7</i>	YFR055W	Cistationina beta-liasa putativa, implicada en la homeostasis de iones de cobre y el metabolismo de azufre; los mutantes nulos muestran mayores niveles espontáneos de <i>foci</i> Rad52p; expresión inducida por la limitación de nitrógeno de forma dependiente de los reguladores GLN3 y GAT1.	2,66e <sup>-04</sup>	-1,85
<i>PRP39</i>	YML046W	Proteína snRNP U1 involucrada en el <i>splicing</i> , contiene múltiples repeticiones del tetratricopeptido.	4,50e <sup>-05</sup>	-1,85
<i>UTP6</i>	YDR449C	Proteína nucleolar, componente del SSU- procesoma que contiene el snoARN U3 y que está implicada en el procesamiento de pre-ARNr de 18S.	1,19e <sup>-04</sup>	-1,85
<i>SKS1</i>	YPL026C	Supuesta proteín-quinasa serina/treonina; interviene en la adaptación a bajas concentraciones de glucosa e independientemente de la vía regulada por Snf3.	3,56e <sup>-04</sup>	-1,85
<i>TOS1</i>	YBR162C	Proteína covalentemente enlazada a la pared celular de función desconocida; identificado como un gen del ciclo celular regulado por SBF; los mutantes por delección son altamente resistentes al tratamiento con beta-1 ,3-glucanasa; tiene similitud de secuencia con YJL171C.	3,82e <sup>-04</sup>	-1,86
<i>TAF1</i>	YGR274C	Subunidad TFIID (145 kDa); implicada en la iniciación de la transcripción por la ARN polimerasa II; posee actividad histona acetiltransferasa <i>in vitro</i> pero su papel <i>in vivo</i> parece ser menor; implicada en la unión a promotores y en la progresión G1/S en el ciclo celular.	6,75e <sup>-05</sup>	-1,86
<i>SPS100</i>	YHR139C	Proteína necesaria para la maduración de la pared de las esporas; expresada durante la esporulación; puede ser un componente de la pared de la espóra; expresión inducida también en células tratadas con la micotoxina patulina.	6,17e <sup>-04</sup>	-1,87
<i>RSC58</i>	YLR033W	Componente del complejo de remodelación de la cromatina RSC; RSC participa en la regulación de la transcripción y la elongación, la estabilidad cromosómica, y el establecimiento de la cohesión de cromátidas hermanas; implicada en el mantenimiento de los telómeros.	4,49e <sup>-04</sup>	-1,87
<i>FIR1</i>	YER032W	Proteína implicada en el procesamiento del extremo 3' del ARNm; interactúa con Ref2p; sustrato potencial de Cdc28p.	2,95e <sup>-04</sup>	-1,88
<i>LAS1</i>	YKR063C	Proteína nuclear esencial posiblemente implicada en la formación de gemas y la morfogénesis; los mutantes necesitan el alelo SSD1-v para ser viables.	1,00e <sup>-04</sup>	-1,89

**Tabla S4.** Genes cuya expresión disminuyen la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>NOC2</i>	YOR206W	Proteína que forma un complejo nucleolar con Mak21p que se une a los pre-ribosomas de 90S y 66S, así como un complejo nuclear con Noc3p que se une a pre-ribosomas 66S; ambos complejos median el transporte intranuclear de precursores ribosomales.	$3,64e^{-04}$	-1,89
<i>AST1</i>	YBL069W	Proteína periférica asociada a la membrana ; interactúa con la ATPasa Pma1p de la membrana plasmática y tiene un papel en su orientación en la membrana plasmática, posiblemente influenciando su incorporación dentro de los <i>lipid rafts</i> (balsas de lípidos).	$2,16e^{-04}$	-1,89
<i>RAI1</i>	YGL246C	Proteína nuclear que se une y estabiliza la exoribonucleasa Rat1p, necesaria para el procesamiento del pre-ARNr.	$4,69e^{-04}$	-1,9
<i>ARO10</i>	YDR380W	Fenilpiruvato descarboxilasa, cataliza la descarboxilación de fenilpiruvato a fenilacetaldehído, que es el primer paso específico en la ruta de Ehrlich.	$6,95e^{-04}$	-1,9
<i>ARF3</i>	YOR094W	Factor deADP-ribosilación reprimible por la glucosa; GTPasa de la superfamilia Ras involucrada en el desarrollo de la polaridad celular.	$2,88e^{-04}$	-1,91
<i>TIF3</i>	YPR163C	Factor de iniciación de la traducción eIF-4B, tiene actividad de hibridación de ARN; contiene un motivo de reconocimiento de ARN y se une al ARN monocatenario.	$2,13e^{-04}$	-1,91
<i>CDC31</i>	YOR257W	Componente de unión a calcio del cuerpo del polo del huso (SPB); necesaria para la duplicación de SPB en la mitosis y meiosis II; homóloga a la centrina de mamíferos; une proteínas multi-ubiquitinadas y está implicada en la degradación de proteínas del proteasoma.	$2,74e^{-04}$	-1,91
<i>TBS1</i>	YBR150C	Supuesta proteína de función desconocida; la proteína no marcada se detecta en las mitocondrias altamente purificadas en estudios de localización celular a gran escala.	$1,84e^{-04}$	-1,91
---	YLR225C	---	$9,77e^{-05}$	-1,91
---	YBR056W-A	---	$1,98e^{-04}$	-1,91
<i>LYS4</i>	YDR234W	Homoaconitasa, cataliza la conversión de homocitrato a homoisocitrato, que es un paso en la ruta de biosíntesis de lisina.	$4,51e^{-04}$	-1,91
<i>SEN2</i>	YLR105C	Subunidad de la endonucleasa de splicing de ARNt, que se compone de Sen2p, Sen15p, Sen34p, y Sen54p; Sen2p contiene el sitio activo para la escisión 5' para el <i>splicing</i> del ARNt y tiene similitud con Sen34p y la endonucleasa de <i>splicing</i> del ARNt de <i>Arquea</i> .	$8,20e^{-05}$	-1,93

**Tabla S4.** Genes cuya expresión disminuyen la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>SPB1</i>	YCL054W	Metiltransferasa dependiente de AdoMet implicada en el procesamiento del ARNr y la maduración de la subunidad 60S ribosomal; metila G2922 en el sitio de acoplamiento del ARNt en la subunidad mayor del ARNr y en ausencia de snR52, metila U2921; supresor de los mutantes en <i>PAB1</i> .	$2,81e^{-04}$	-1,94
<i>NSA2</i>	YER126C	Proteína constituyente de las partículas pre-ribosomales 66S, contribuye al procesamiento del pre-ARNr de 27S.	$4,72e^{-04}$	-1,94
<i>YEH1</i>	YLL012W	Ester estearílico hidrolasa; uno de los tres productos génicos (Yeh1p, Yeh2p, Tgl1p) con esta actividad hidrolasa de éster estearílico; participa en la homeostasis de esteroides; localizada en partículas lipídicas de membrana.	$3,17e^{-05}$	-1,94
<i>TAH1</i>	YCR060W	Cofactor de Hsp90; interactúa con Hsp82p, Pih1p, Rvb1 y Rvb2, contiene un único dominio TPR con al menos dos motivos TPR.	$1,67e^{-04}$	-1,95
<i>DIP2</i>	YLR129W	Proteína nucleolar, específicamente asociada con el snoRNA U3; forma parte del complejo mayor de ribonucleoproteínas conocido como SSU-procesoma, necesario para la biogénesis de ARNr de 18S; parte del complejo de procesamiento activo pre-ARNr.	$1,85e^{-04}$	-1,95
<i>NOP2</i>	YNL061W	Probable metiltransferasa ARNm (5) C, esencial para el procesamiento y maduración del pre-ARNr de 27S y la biogénesis de la subunidad grande del ribosoma; localizada en el nucleolo; constituyente de las partículas pre-ribosomal de 66S.	$4,16e^{-04}$	-1,95
<i>FCF1</i>	YDR339C	Supuesta nucleasa con dominios PINc; nucleasa necesaria para los cortes iniciales del pre-ARNr 35S y maduración del ARNr 18S, componente del complejo SSU-procesoma involucrado en la biogénesis de la subunidad ribosomal 40S; copurifica con Faf1p.	$1,93e^{-04}$	-1,96
<i>SLO1</i>	YER180C-A	Proteína de interacción con Arl3p, que es una GTPasa de la superfamilia Ras involucrada en retención de vesículas en el aparato de Golgi; su posible ortólogo humano es SCOCO.	$2,04e^{-04}$	-1,96
<i>SME1</i>	YOR159C	Codifica la proteína Sm E; parte del complejo heteroheptamérico (con Smb1p, Smd1p, Smd2p, Smd3p, Smx3p, y Smx2p) que es parte de las snRNPs spliceosomales U1, U2, U4, U5; homóloga a la humana Sm E.	$2,30e^{-04}$	-1,98
<i>NEW1</i>	YPL226W	Proteína ABC que cosedimenta con polisomas y es necesaria para la biogénesis de la subunidad ribosómica pequeña; la región rica en Asn/Gln apoya la formación de priones [NU <sup>*</sup> ] y la susceptibilidad a la inducción del prion [PSI <sup>*</sup> ].	$2,77e^{-04}$	-1,99

**Tabla S4.** Genes cuya expresión disminuyen la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>NMA111</i>	YNL123W	Serin proteasa y chaperona molecular general; implicada en la respuesta al estrés por calor y promoción de la apoptosis puede contribuir a la homeostasis de los lípidos; secuencia similar a la familia de serin-proteasas de mamíferos Omi/HtrA2.	$4,31e^{-05}$	-1,99
<i>URA2</i>	YJL130C	Enzima bifuncional con actividad carbamoilfosfato sintetasa y (CPSase)-aspartato transcarbamilasa (ATCase); cataliza los dos primeros pasos enzimáticos en la biosíntesis <i>de novo</i> de las pirimidinas; ambas actividades están sujetas a inhibición por retroalimentación por UTP	$2,62e^{-04}$	-1,99
---	YLR455W	---	$1,01e^{-04}$	-1,99
---	YLR218C	---	$5,30e^{-04}$	-2
<i>MCM5</i>	YLR274W	Componente del complejo hexamérico MCM, que es importante para los orígenes de replicación del ADN en G1 y activa la helicasa dependiente de ATP que promueve la apertura de la doble hebra del ADN y el alargamiento cuando se activa por Cdc7p-Dbf4p en la fase S.	$1,93e^{-05}$	-2
<i>EBP2</i>	YKL172W	Proteína esencial necesaria para la maduración de ARNr 25S y el ensamblaje de la subunidad ribosomal grande 60S; se localiza en el nucleolo; constituyente de las partículas ribosomales 66S.	$6,94e^{-04}$	-2,01
<i>RRP14</i>	YKL082C	Proteína esencial, constituyente de las partículas ribosomales 66S; interactúa con las proteínas implicadas en la biogénesis ribosomal y la polaridad celular, miembro de la familia SURF-6.	$6,08e^{-04}$	-2,01
<i>NOP14</i>	YDL148C	Proteína nucleolar, forma un complejo con Noc4p que media la maduración y la exportación nuclear de las subunidades ribosomales 40S; también presente en la subunidad pequeña del complejo del procesoma, que se necesita para el procesamiento de pre-ARNr 18S.	$2,89e^{-05}$	-2,03
<i>IME1</i>	YJR094C	Regulador principal de la meiosis que es activo sólo durante los eventos meióticos; activa la transcripción de genes meióticos tempranos a través de la interacción con Ume6p; es degradada por el proteasoma 26S después de la fosforilación por Ime2p	$4,78e^{-04}$	-2,03
<i>GIC2</i>	YDR309C	Efecto Cdc42p redundante similar a la GTPasa rho; homólogo de Gic1p; implicado en la iniciación de la gemación y la polarización celular; interactúa con Cdc42p a través del dominio Cdc42/Rac (CRIB) y con PI (4,5) P2 a través de una región polibásica.	$2,88e^{-04}$	-2,04

**Tabla S4.** Genes cuya expresión disminuyen la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>MSN4</i>	YKL062W	Activador transcripcional relacionado con Msn2p; activado en condiciones de estrés, lo que resulta en su translocación desde el citoplasma al núcleo; se une al ADN a través de elementos reguladores de respuesta al estrés en los genes diana, induciendo la expresión génica.	$8,00e^{-05}$	-2,04
<i>STD1</i>	YOR047C	Proteína implicada en el control de la expresión génica regulada por la glucosa; interactúa con la proteína-quinasa Snf1p, con los sensores de glucosa Snf3p y Rgt2p y con la proteína de unión a TATA Spt15p; actúa como un regulador del factor de transcripción Rgt1p.	$8,31e^{-05}$	-2,04
<i>RPC10</i>	YHR143W-A	Subunidad de ARN polimerasa ABC10-alfa, que se encuentra en los complejos de ARN polimerasas I, II, y III.	$5,57e^{-04}$	-2,04
<i>PHO5</i>	YBR093C	Fosfatasa ácida reprimible (1 de 3) que también media la hidrólisis extracelular de fosfato en derivados de nucleótidos; glicoproteína de superficie celular derivada de la ruta secretora; inducida por la carencia de fosfato y coordinadamente regulada por <i>PHO4</i> y <i>PHO2</i> .	$2,45e^{-04}$	-2,05
<i>NOP8</i>	YOL144W	Proteína nucleolar necesaria para la biogénesis de la subunidad ribosómica 60S	$3,35e^{-04}$	-2,06
---	YBL081W	---	$4,92e^{-04}$	-2,08
<i>MDH2</i>	YOL126C	Malato deshidrogenada citoplásmica, una de las tres isoenzimas que catalizan la interconversión de malato y oxaloacetato; involucrada en el ciclo del glioxilato y la gluconeogénesis durante el crecimiento en medios con compuestos de dos carbonos; interactúa con Pck1p y Fbp.	$8,30e^{-05}$	-2,09
<i>CIN5</i>	YOR028C	Factor de transcripción de la familia YAP-1 con una cremallera básica de leucina (bZIP), media la resistencia pleiotrópica a las drogas y la tolerancia a la sal; se localiza en el núcleo bajo estrés oxidativo y es secuestrada en el citoplasma por Lot6p en condiciones reductoras.	$2,74e^{-04}$	-2,1
<i>SRP40</i>	YKR092C	Nucleolar, proteína rica en serina con una función en el ensamblaje o transporte del pre-ribosoma; puede funcionar como una chaperona de las pequeñas partículas nucleolares de las ribonucleoproteínas (snoRNPs); similar inmunológicamente y estructuralmente a la Nopp140 de rata.	$1,86e^{-04}$	-2,11
<i>UME1</i>	YPL139C	Regulador negativo de la meiosis, se necesita para la represión de un subconjunto de genes meióticos durante el crecimiento vegetativo; la unión de la histona deacetilasa Rpd3p es necesaria para la actividad, contiene una caja NEE y un motivo de repetición WD; homóloga a Wtm1p, Wtm2p.	$1,30e^{-04}$	-2,11

**Tabla S4.** Genes cuya expresión disminuyen la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>RCR1</i>	YBR005W	Proteína de la membrana del RE involucrada en la deposición de quitina en la pared celular; puede funcionar en el tráfico endosoma-vacuola, ayudando a determinar si las proteínas de la membrana plasmática se degradan o se redirigen a la membrana plasmática.	1,63e <sup>-05</sup>	-2,12
---	YCR099C	---	3,05e <sup>-04</sup>	-2,14
<i>VPS3</i>	YDR495C	Componente del complejo CORVET; proteína citoplasmática necesaria para la localización y el procesamiento de proteínas solubles en las vacuolas, la acidificación del lumen vacuolar y el ensamblaje de la H <sup>+</sup> -ATPasa vacuolar.	1,63e <sup>-04</sup>	-2,15
<i>CRP1</i>	YHR146W	Proteína que se une a estructuras de ADN cruciforme.	5,93e <sup>-05</sup>	-2,16
<i>SUT1</i>	YGL162W	Factor transcripcional de la familia con dedos de Zn de tipo Zn [II] 2Cys6; involucrada en la absorción de esterol y en la inducción de la expresión de genes de hipoxia.	4,36e <sup>-04</sup>	-2,16
<i>MDG1</i>	YNL173C	Proteína de membrana plasmática implicada en la vía de señalización de feromonas mediada por proteínas G; su sobreexpresión suprime las mutaciones <i>bem1</i> .	6,19e <sup>-05</sup>	-2,16
<i>OAZ1</i>	YPL052W	Regulador de la ornitina descarboxilasa (Spe1p), antienzima que se une a Spe1p para regular su degradación independiente de ubiquitina; el salto de pauta de lectura durante la síntesis de Oaz1p en el ribosoma y su degradación mediada por ubiquitina son ambos regulados por poliaminas.	4,30e <sup>-04</sup>	-2,17
---	YDR042C	---	3,08e <sup>-05</sup>	-2,18
---	YBR072C-A	---	4,80e <sup>-04</sup>	-2,2
<i>ECM2</i>	YBR065C	Factor de <i>splicing</i> del pre-ARNm de, facilita la formación cooperativa de la hélice II U2/U6 en asociación con el <i>stem</i> II en el espliceosoma; su función puede ser regulada por Slu7p.	5,60e <sup>-04</sup>	-2,23
<i>DAL5</i>	YJR152W	Allantoato permeasa; ureidosucinato permeasa; también transporta dipéptidos, aunque con menor afinidad que el allantoato y el ureidosucinato; expresión constitutiva pero sensible a la represión catabólica por nitrógeno.	3,87e <sup>-04</sup>	-2,25
<i>RRN11</i>	YML043C	Componente del CF (CoreFactor) del complejo del factor transcripcional de ADNr; CF se necesita para la transcripción de los genes ARNr 35S por la ARN polimerasa I y se compone de Rrn6p, Rrn7p, y Rrn11p.	8,56e <sup>-06</sup>	-2,25
<i>BFR2</i>	YDR299W	Proteína esencial que es un componente del pre-ribosoma 90S; puede estar implicada en el procesamiento del ARNr; supresor multicopia de la sensibilidad a la Brefeldina A; su expresión se induce durante la fase lag y también por shock frío.	2,11e <sup>-05</sup>	-2,26

**Tabla S4.** Genes cuya expresión disminuyen la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
---	YCR101C	---	$5,90e^{-06}$	-2,27
<i>UTP15</i>	YMR093W	Proteína nucleolar, componente de la subunidad pequeña (SSU) del procesoma que contiene el snoARN U3 que está implicado en el procesamiento de pre-ARNr 18S.	$6,44e^{-05}$	-2,28
<i>BAR1</i>	YIL015W	Aspartil proteasa secretada en el espacio periplásmico tipo haploide Mat a; ayuda a las células a encontrar células Mat alfa; corta e inactiva el factor alfa permitiendo que las células se recuperen de la detención del ciclo celular que provoca el factor alfa para favorecer la formación del diploide.	$6,42e^{-05}$	-2,29
<i>PST1</i>	YDR055W	Proteína de la pared celular que contiene un anclaje GPI; es secretada durante la regeneración de protoplastos; regulada positivamente por la activación de la vía de integridad celular, mediada por Rlm1p; regulada positivamente por daños de la pared celular a través de la interrupción del gen <i>FKS1</i> .	$3,40e^{-05}$	-2,29
<i>SOF1</i>	YLL011W	Proteína esencial necesaria para la biogénesis de la subunidad ribosómica pequeña de 40S; tiene similitud con la subunidad beta de las proteínas G triméricas y el factor de <i>splicing</i> Prp4p.	$3,19e^{-05}$	-2,37
<i>RTT107</i>	YHR154W	Proteína implicada en la reparación del ADN, dependiente de Mms22, durante la fase S; el daño del ADN induce la fosforilación por Mec1p en uno o más motivos SQ/TQ; interactúa con Mms22p y Slx4p; tiene cuatro dominios BRCT; tiene un papel en la regulación de la transposición de Ty1.	$8,66e^{-05}$	-2,38
<i>EFG1</i>	YGR271C-A	Proteína esencial necesaria para la maduración del ARNr 18S; el mutante nulo es sensible a la hidroxurea y se retrasa en la recuperación de la detención de ciclo celular causada por factor alfa; se localiza en el nucléolo.	$4,40e^{-04}$	-2,42
<i>NOP16</i>	YER002W	Constituyente de las partículas pre-ribosomales 66S, que participan en la biogénesis de la subunidad ribosomal 60S.	$1,55e^{-04}$	-2,42
<i>ARO9</i>	YHR137W	Aminotransferasa aromática II, cataliza el primer paso del catabolismo del triptófano, fenilalanina y tirosina.	$6,51e^{-05}$	-2,45
<i>RPI1</i>	YIL119C	Supuesto regulador transcripcional; su sobreexpresión suprime la sensibilidad al choque térmico de la cepa silvestre <i>RAS2</i> y también suprime el defecto en la lisis celular de la mutación <i>mpk1</i> .	$4,07e^{-06}$	-2,46
<i>YRO2</i>	YBR054W	Supuesta proteína de función desconocida; la proteína fosforilada se detecta en las mitocondrias altamente purificadas en estudios de localización subcelular a gran escala; regulada transcripcionalmente por Haa1p.	$3,89e^{-05}$	-2,47



**Tabla S4.** Genes cuya expresión disminuyen la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>RIX7</i>	YLL034C	Supuesta ATPasa de la familia AAA, necesaria para la exportación desde el núcleo de las subunidades grandes del pre-ribosoma; se distribuye entre el nucleolo, nucleoplasma, y la periferia nuclear en función de las condiciones de crecimiento.	1,40e <sup>-05</sup>	-2,48
<i>URA1</i>	YKL216W	Dihidroorotato deshidrogenasa, cataliza la cuarta etapa enzimática en la biosíntesis de novo de las pirimidinas, la conversión de ácido dihidroorótico en ácido orótico.	2,35e <sup>-05</sup>	-2,55
<i>RCK1</i>	YGL158W	Proteín-quinasa implicada en la respuesta al estrés oxidativo; identificada como supresora de mutaciones de los punto de control del ciclo celular de <i>S. pombe</i> .	1,33e <sup>-04</sup>	-2,59
<i>YAP6</i>	YDR259C	Supuesto factor transcripcional con la cremallera básica de leucinas bZIP; la sobreexpresión aumenta la tolerancia a a sodio y litio; análisis computacionales sugieren un papel en la regulación de la expresión de genes implicados en el metabolismo de carbohidratos.	1,46e <sup>-04</sup>	-2,62
<i>HRP1</i>	YOL123W	Subunidad de factor de corte I (CF1), un complejo de cinco subunidades necesario para la escisión y la poliadenilación de los extremos 3' del pre-ARNm; proteína de unión a ARN heteronuclear que contiene motivos RRM y miembro de la familia hnRNPA/B que se une las secuencias señal poli (A).	2,94e <sup>-05</sup>	-2,72
<i>CHA1</i>	YCL064C	L-serina (L-treonina) desaminasa catabólica; cataliza la degradación de la L-serina y L-treonina; necesaria para utilizar serina o treonina como la única fuente de nitrógeno, transcriptionalmente inducida por serina y treonina.	4,26e <sup>-04</sup>	-2,74
<i>NOP56</i>	YLR197W	Proteína nucleolar esencial evolutivamente conservada; componente de los complejos snoRNP con caja C/D y que dirige la 2'-O metilación del pre-ARNr durante su maduración; la sobreexpresión causa defectos en la orientación del huso.	3,69e <sup>-05</sup>	-2,81
<i>GAC1</i>	YOR178C	Subunidad reguladora para la proteín-fosfatasa Glc7p tipo-1 (PP1); dirige a Glc7p hacia la glucógeno sintasa Gsy2p; se une al factor transcripcional de choque térmico Hsf1p; necesaria para la inducción de algunos genes regulados por <i>Heat-Shock-Factor</i> bajo choque térmico.	3,53e <sup>-05</sup>	-2,91
<i>SDP1</i>	YIL113W	Proteína con actividad MAP quinasa y fosfatasa inducible por estrés; regula negativamente la MAP-quinasa Slt2p por desfosforilación directa; localización difusa en condiciones normales y puntiforme después de choque térmico.	5,13e <sup>-06</sup>	-3

**Tabla S4.** Genes cuya expresión disminuyen la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 no tratada (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>MFA2</i>	YNL145W	Factor-a, feromona de apareamiento, sintetizada por las células haploides Mat a; interactúa con las células Mat alfa para inducir la detención del ciclo celular y otras respuestas que conducen al apareamiento; la biogénesis implica la modificación del extremo C-terminal, proteólisis del N-terminal y la exportación; también codificada por <i>MFA1</i> .	$4,14e^{-05}$	-3,18
<i>FYV7</i>	YLR068W	Proteína esencial necesaria para la maduración del ARNr 18S; necesaria para la supervivencia después de la exposición a la toxina <i>killer</i> K1.	$4,20e^{-04}$	-3,44
---	YDL218W	---	$1,41e^{-05}$	-3,55
<i>GDH3</i>	YAL062W	Glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP (+), sintetiza glutamato a partir de amoníaco y alfa-cetoglutarato; tasa de utilización del alfa-cetoglutarato difiere de Gdh1p; expresión regulada por fuentes de nitrógeno y carbono.	$5,29e^{-05}$	-3,65
<i>PHO11</i> /// <i>PHO12</i>	YAR071W /// YHR215W	Una de las tres fosfatasas ácidas reprimibles, una glicoproteína que se transporta a la superficie celular por la vía secretora; inducida por inanición de fosfato y coordinadamente reguladas por <i>PHO4</i> y <i>PHO2</i> . Una de las tres fosfatasas ácidas reprimibles, una glicoproteína que se traslada a la superficie celular por la vía secretora; casi idéntica a Pho11p; regulada positivamente por la carencia de fosfato.	$6,28e^{-05}$	-3,93
---	YGR035C	---	$3,34e^{-04}$	-5,38
<i>REC104</i>	YHR157W	Proteína implicada en las etapas iniciales de la recombinación meiótica; necesaria en el entrecruzamiento meiótico; forma un complejo con Rec102p y Spo11p necesario durante el inicio de la recombinación.	$2,81e^{-06}$	-6,11
SKY1	YMR216C	SR proteína-quinasa (SRPK) que participan en la regulación de proteínas implicadas en el metabolismo del ARNm y la homeostasis de cationes; similar a la humana SRPK1.	$4,51e^{-04}$	-155,44

**Tabla S5.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303, después del tratamiento con cisplatino.

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
---	YIL057C	---	$1,15e^{-07}$	10,19
<i>STL1</i>	YDR536W	Simportador de glicerol y protones de la membrana plasmática; sometido a inactivación inducida por glucosa; inducido fuertemente, pero transitoriamente, cuando las células están sometidas a choque osmótico.	$3,17e^{-07}$	5,92
<i>IDP2</i>	YLR174W	Isocitrato deshidrogenasa citosólica NADP específica, cataliza la oxidación de isocitrato a $\alpha$ -cetoglutarato; los niveles son elevados durante el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables y reducidos durante el crecimiento en glucosa.	$5,10e^{-07}$	4,87
<i>NDE2</i>	YDL085W	NADH deshidrogenasa mitocondrial externa, cataliza la oxidación de NADH citosólico; Nde1p y Nde2p están implicados en el suministro del NADH citosólico a la cadena respiratoria mitocondrial.	$7,71e^{-07}$	4,74
<i>AGX1</i>	YFL030W	Alanina glioxilato aminotransferasa (AGT), cataliza la síntesis de glicina desde el glioxalato, que es una de las tres rutas para la biosíntesis de glicina en levaduras, tiene similitudes con la AGT de mamíferos y plantas.	$6,43e^{-07}$	4,69
<i>FIT1</i>	YDR534C	Manoproteína que se incorpora a la pared celular a través de un anclaje GPI, participa en la retención de sideróforos de hierro en la pared celular.	$4,17e^{-07}$	4,52
<i>PUT4</i>	YOR348C	Prolin permeasa, necesaria para el transporte de alta afinidad de la prolina; también transporta el análogo tóxico de prolina azetidín-2-carboxilato de etilo (AZC); la transcripción de <i>PUT4</i> es reprimida en células cultivadas en amoníaco.	$2,50e^{-06}$	4,4
<i>ADY2</i>	YCR010C	Transportador de acetato necesario para la esporulación normal; se detecta fosforilada en las mitocondrias.	$2,37e^{-05}$	4,33
<i>REC102</i>	YLR329W	Proteína involucrada en las primeras etapas de la recombinación meiótica; necesaria para la sinapsis de cromosomas; forma un complejo con Rec104p y Spo11p necesario durante el inicio de la recombinación.	$4,11e^{-06}$	4,28
---	YGR067C	---	$4,27e^{-06}$	4,22

**Tabla S5.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303, después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>FBP1</i>	YLR377C	Fructosa-1,6-bifosfatasa, enzima reguladora clave en la ruta de la gluconeogénesis; necesaria para el metabolismo de la glucosa; experimenta degradación mediada por el proteosoma o por autofagia dependiendo de las condiciones de crecimiento, interactúa con Vid30p.	$2,84e^{-05}$	4,22
---	snR73 /// YMR013W-A	---	$1,90e^{-06}$	4,18
---	YLR342W-A	---	$2,73e^{-06}$	4,15
<i>DIN7</i>	YDR263C	Nucleasa mitocondrial funciona en la reparación y replicación del ADN, modula la estabilidad del genoma mitocondrial, es inducida por la exposición a mutágenos, también se induce durante la meiosis en un momento casi coincidente con la recombinación.	$1,52e^{-06}$	4,06
<i>SFC1</i>	YJR095W	Transportador mitocondrial succinato-fumarato, transporta succinato al interior y fumarato al exterior de la mitocondria, necesario para la utilización de etanol y acetato.	$6,87e^{-05}$	4,05
---	YMR206W	---	$5,87e^{-06}$	4,03
<i>PNS1</i>	YOR161C	Proteína de función desconocida; tiene similitud a Torpedo californica tCTL1p, que se postula como un transportador de colina; sin embargo, ni en el nulo ni por sobreexpresión se afecta el transporte de colina en <i>S. cerevisiae</i> .	$1,40e^{-06}$	3,9
<i>POX1</i>	YGL205W	Acil-CoA oxidasa; participa en la vía de la beta-oxidación de ácidos grasos.	$5,64e^{-06}$	3,83
---	YLR156W /// YLR157W-E /// YLR159W /// YLR161W	---	$5,91e^{-06}$	3,78
---	YHR033W	---	$2,65e^{-06}$	3,69

**Tabla S5.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada *Δsky1* versus W303, después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
---	YMR187C	---	1,36e <sup>-06</sup>	3,64
<i>ULI1</i>	YFR026C	Supuesta proteína de función desconocida involucrada e inducida por la respuesta a proteínas desplegadas (UPR).	6,70e <sup>-07</sup>	3,37
<i>GOT1</i>	YMR292W	Proteína homodimérica que se empaqueta en vesículas COPII y circula entre el RE y el Golgi, participa en el transporte secretor pero no es directamente necesaria para diversos aspectos del transporte ensayados <i>in vitro</i> ; puede influir en la composición de membrana.	1,85e <sup>-06</sup>	3,36
<i>POT1</i>	YIL160C	3-cetoacil-CoA tiolasa con amplia especificidad de longitud de cadena, escinde 3-cetoacil-CoA en acil-CoA y acetil-CoA durante la beta-oxidación de los ácidos grasos.	1,29e <sup>-05</sup>	3,19
---	YLR156W /// YLR157W-D /// YLR159W /// YLR161W	---	7,53e <sup>-06</sup>	3,18
<i>CSM4</i>	YPL200W	Proteína necesaria para la segregación cromosómica precisa durante la meiosis; participa en la agrupación meiótica de telómeros (formación ramo) y en los movimientos rápidos profase dirigidos por telómeros.	2,14e <sup>-06</sup>	3,12
---	YCL021W-A	---	6,52e <sup>-06</sup>	3,12
<i>MPH2</i> /// <i>MPH3</i>	YDL247W /// YJR160C	Alfa-glucósido permeasa, transporta maltosa, maltotriosa, alfa-metilglucósido, y turanosa; idéntica a Mph3p; codificada en una posición subtelomérica en una probable región objeto de duplicación genómica.	1,90e <sup>-06</sup>	3,11
<i>SPG1</i>	YGR236C	Proteína necesaria para la supervivencia a altas temperaturas durante la fase estacionaria; no se necesita para el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables; la proteína no marcada se detecta en las mitocondrias altamente purificadas en estudios de localización subcelular a gran escala.	4,34e <sup>-06</sup>	3,1

**Tabla S5.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada *Δsky1* versus W303, después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>MBR1</i>	YKL093W	Proteína implicada en las funciones mitocondriales y la respuesta de estrés; la sobreexpresión suprime los defectos de crecimiento de los mutantes <i>hap2</i> , <i>hap3</i> y <i>hap4</i> .	5,89e <sup>-06</sup>	3,07
<i>PCK1</i>	YKR097W	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, enzima clave en la gluconeogénesis, cataliza la primera reacción en la biosíntesis de carbohidratos; la glucosa reprime su transcripción y acelera la degradación de ARNm, es regulada por Mcm1p y Cat8p; localizada en el citosol.	1,04e <sup>-06</sup>	3,04
---	YNL193W	---	1,19e <sup>-05</sup>	3,02
<i>JEN1</i>	YKL217W	Transportador de lactato, necesario para la absorción de lactato y piruvato; se encuentra fosforilada; la expresión del gen se desreprime por el activador transcripcional Cat8p durante el crecimiento respiratorio y está reprimida en presencia de glucosa, fructosa y manosa.	1,40e <sup>-05</sup>	2,98
<i>SIP2</i>	YGL208W	Una de las tres subunidades beta del complejo serina/treonina proteína quinasa Snf1 implicada en la respuesta a la carencia de glucosa; los mutantes nulos exhiben envejecimiento acelerado; es una proteína que sufre modificación por introducción de grupos N-miristoilo; se localiza en el citoplasma y la membrana plasmática.	1,24e <sup>-05</sup>	2,97
<i>CCE1</i>	YKL011C	Endonucleasa mitocondrial de corte cruciforme; rompe las uniones Holliday formadas durante la recombinación del ADN mitocondrial.	1,33e <sup>-05</sup>	2,96
<i>YOX1</i>	YML027W	Represor transcripcional que contiene un homeodominio; se une a Mcm1p y a las secuencias ECB ( <i>early cell cycle boxes</i> ) en los promotores de los genes reguladores del ciclo celular expresados en las fases M/G1; expresión regulada por el ciclo celular; sustrato potencial de Cdc28p.	3,24e <sup>-06</sup>	2,96
<i>PHM7</i>	YOL084W	Proteína de función desconocida; expresión regulada por los niveles de fosfato; la proteína de fusión a GFP se localiza en la periferia de la célula y en la vacuola.	1,03e <sup>-05</sup>	2,96
<i>YIG1</i>	YPL201C	Proteína que interactúa con la glicerol-3-fosfatasa y juega un papel en la producción de glicerol anaerobico; localizada en el núcleo y el citosol.	2,78e <sup>-05</sup>	2,95

**Tabla S5.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada *Δsky1* versus W303, después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>ARA2</i>	YMR041C	Arabinosa deshidrogenasa dependiente de NAD, implicada en la biosíntesis de deshidro-D-arabinono-1,4-lactona; similar a la L-galactosa deshidrogenasa de plantas.	4,34e <sup>-06</sup>	2,94
<i>PRM10</i>	YJL108C	Proteína regulada por feromonas; probablemente implicada en mating <i>a</i> /alfa; se prevé que tiene 5 segmentos transmembrana; inducida por el tratamiento con 8-metoxipsoraleno y la irradiación UVA.	3,97e <sup>-06</sup>	2,93
<i>GUT1</i>	YHL032C	Glicerol quinasa, convierte el glicerol en glicerol-3-fosfato; la represión por glucosa de la expresión es mediada por Adr1p e Ino2p-Ino4p; la desrepresión de la expresión en fuentes de carbono no fermentables está mediada por Opi1p y Rsf1p.	5,42e <sup>-05</sup>	2,93
<i>HXT1</i>	YHR094C	Transportador de glucosa de baja afinidad de la superfamilia del complejo facilitador mayor; la expresión se induce por Hxk2p en presencia de glucosa y se reprime por Rgt1p cuando la glucosa está limitada.	1,14e <sup>-05</sup>	2,92
<i>PDR15</i>	YDR406W	Transportador ABC, transportador de múltiples fármacos y factor general de respuesta al estrés implicado en la desintoxicación celular; el gen está regulado por Pdr1p, Pdr3p y Pdr8p; su promotor contiene un elemento de respuesta <i>PDR</i> .	5,64e <sup>-06</sup>	2,91
<i>FLO1</i>	YAR050W	Proteína similar a lectinas implicada en la floculación; proteína de la pared celular que se une a las cadenas de manosa de la superficie de otras células, confiere la capacidad de formación de flóculos que son sensibles al tratamiento con quimotripsina y resistentes al calor; es similar a Flo5p.	7,01e <sup>-06</sup>	2,9
<i>VMR1</i>	YHL035C	Proteína de función desconocida que puede interactuar con los ribosomas, según experimentos de co-purificación; miembro de la familia ABC (ATP-binding cassette); potencial sustrato de Cdc28p; detectada en mitocondrias purificadas en estudios de localización subcelular a gran escala.	3,99e <sup>-06</sup>	2,89
<i>TUL1</i>	YKL034W	Ubiquití ligasa (E3) localizada en el Golgi que participan en ubiquitinación y envío de las proteínas de membrana que contienen dominios transmembrana polares hacia los cuerpos multivesiculares para la entrega a la vacuola.	3,75e <sup>-06</sup>	2,89

**Tabla S5.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada *Δsky1* versus W303, después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>USV1</i>	YPL230W	Supuesto factor de transcripción que contiene un dedo de zinc C2H2; su mutación afecta a la regulación transcripcional de genes implicados en el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables, la respuesta al estrés salino y la biosíntesis de la pared celular.	1,07e <sup>-05</sup>	2,88
---	YDR336W	---	4,02e <sup>-06</sup>	2,81
<i>UBP11</i>	YKR098C	Ubiquitina proteasa específica que escinde ubiquitina de proteínas ubiquitinadas.	6,77e <sup>-06</sup>	2,8
<i>ALP1</i>	YNL270C	Transportador de arginina; su expresión es normalmente muy baja y no está claro qué condiciones podrían inducir expresión significativa.	4,59e <sup>-05</sup>	2,8
---	YPL056C	---	1,85e <sup>-05</sup>	2,79
<i>BNA4</i>	YBL098W	Quinurenina 3-mono oxigenasa, necesaria para la biosíntesis <i>de novo</i> de NAD a partir de triptófano vía quinurenina; expresión regulada por Hst1p; supuesto objetivo terapéutico para la enfermedad de Huntington.	8,01e <sup>-06</sup>	2,78
<i>YSR3</i>	YKR053C	Dihidroesfingosina 1-fosfato fosfatasa; proteína de membrana que participa en el metabolismo de esfingolípidos; tiene similitud con Lcb3p.	5,45e <sup>-06</sup>	2,77
---	YNL195C	---	3,43e <sup>-05</sup>	2,75
<i>MPA43</i>	YNL249C	Supuesta proteína con función desconocida; la proteína no marcada se detecta en las mitocondrias altamente purificadas en estudios de localización subcelular a gran escala.	3,47e <sup>-05</sup>	2,73
<i>IRC6</i>	YFR043C	Supuesta proteína de función desconocida; los mutantes nulos muestran mayores niveles del foci espontáneo Rad52p.	6,92e <sup>-07</sup>	2,73
<i>ICL1</i>	YER065C	Isocitrato lisa que cataliza la formación de succinato y glioxalato desde isocitrato, una reacción clave del ciclo del glioxalato; la expresión de <i>ICL1</i> se induce por el crecimiento en etanol y se reprime por el crecimiento en glucosa.	2,19e <sup>-05</sup>	2,72
<i>REG2</i>	YBR050C	Subunidad reguladora de la proteína fosfatasa tipo-1 Glc7p; involucrada con Reg1p, Glc7p y Snf1p en la regulación de genes glucosa-reprimibles, también involucrada en la proteólisis inducida por glucosa de la maltosa permeasa.	7,10e <sup>-06</sup>	2,72



**Tabla S5.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada *Δsky1* versus W303, después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
SCS3	YGL126W	Proteína necesaria para la prototrofia de inositol, identificada como una ortóloga de la familia FIT de las proteínas implicadas en la biosíntesis de triglicéridos; controvertido papel en la síntesis de fosfolípidos de inositol a partir de inositol.	2,47e <sup>-05</sup>	2,68
FET3	YMR058W	Ferro-O <sub>2</sub> -oxidorreductasa necesaria para la captación de hierro, de alta afinidad; involucrada en la mediación de la resistencia a la toxicidad de iones de cobre, pertenece a la clase de oxidasas multicobre integrales de membrana.	2,15e <sup>-05</sup>	2,66
SRO77	YBL106C	Proteína con papeles en la exocitosis y la homeostasis de cationes; tiene funciones de unión y fusión de vesículas post-Golgi con la membrana plasmática; homólogo a Sro7p y al supresor de tumores letales de larvas gigantes de <i>Drosophila</i> ; interactúa con la proteína SNARE Sec9p.	8,89e <sup>-06</sup>	2,64
ADH2	YMR303C	Alcohol deshidrogenasa II reprimible por glucosa; cataliza la conversión de etanol a acetaldehído; implicada en la producción de ciertos ésteres de carboxilato; regulada por <i>ADR1</i> .	1,37e <sup>-05</sup>	2,62
YAT1	YAR035W	Carnitina acetiltransferasa de la membrana mitocondrial externa; actividad enzimática menor inducible por etanol; implicada en el transporte de grupos acilo activados desde el citoplasma a la matriz mitocondrial; fosforilada.	1,35e <sup>-05</sup>	2,57
CUS2	YNL286W	Proteína que se une a snARN U2 y a Prp11p; puede estar involucrada en el plegamiento de snARN U2; contiene dos motivos de reconocimiento de ARN (RRM).	5,10e <sup>-06</sup>	2,57
---	YOL024W	---	1,34e <sup>-05</sup>	2,56
ERV1	YGR029W	Sulfidril-oxidasa ligada a FAD del espacio intermembrana mitocondrial (IMS); oxida a Mia40p como parte de un sistema de relé de disulfuro que promueve la retención en el IMS de proteínas importadas; ortólogo de hepatopoiatina humana (ALR).	3,61e <sup>-06</sup>	2,56
---	YKL091C	---	1,18e <sup>-05</sup>	2,53
---	YJL132W	---	2,92e <sup>-05</sup>	2,52
---	YGL036W	---	1,52e <sup>-05</sup>	2,51

**Tabla S5.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada *Δsky1* versus W303, después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>RPS14B</i>	YJL191W	Proteína ribosómica 59 de la subunidad pequeña, necesaria para el ensamblaje del ribosoma y el procesamiento del pre-ARNr de 20S; las mutaciones confieren resistencia a criptopleurina; casi idéntica a Rps14Ap y similar a las proteínas ribosomales S11 de <i>E. coli</i> y S14 de rata.	6,90e <sup>-05</sup>	2,49
---	YOR186W	---	5,90e <sup>-06</sup>	2,47
<i>GNP1</i>	YDR508C	Glutamina permeasa de alta afinidad, también transporta Leu, Ser, Thr, Cys, Met y Asn; expresión totalmente dependiente de Grr1p y modulada por el sensor de aminoácidos extracelulares Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p (SPS).	1,42e <sup>-05</sup>	2,47
<i>SIT1</i>	YEL065W	Transportador de ferrioxamina B, miembro de la familia de transportadores de ARN que reconocen específicamente sideróforos de hierro en forma de quelatos; la transcripción se induce durante la privación de hierro y el cambio de diáxico; potencialmente fosforilado por Cdc28p.	1,53e <sup>-05</sup>	2,45
<i>CYB2</i>	YML054C	Citocromo B2 (L-lactato-citocromo <i>c</i> oxidorreductasa), componente del espacio intermembrana mitocondrial, necesario para la utilización de lactato; expresión reprimida por glucosa y condiciones anaeróbicas.	2,00e <sup>-05</sup>	2,45
<i>ARN1</i>	YHL040C	Transportador, miembro de la familia de transportadores de ARN que reconocen específicamente sideróforos de hierro en forma de quelatos; responsable de la captación de hierro unido a ferrirubina, ferrirodina y sideróforos relacionados.	2,24e <sup>-05</sup>	2,45
<i>ROM1</i>	YGR070W	Proteína de intercambio GDP/GTP (GEP) para Rho1p; las mutaciones son sintéticamente letales con mutaciones con <i>rom2</i> que también codifica una GEP.	4,72e <sup>-05</sup>	2,44
<i>PIG2</i>	YIL045W	Supuesta subunidad de la proteína-fosfatasa tipo-1 responsable de dirigir la proteína-fosfatasa Glc7p tipo-1 hacia su sustrato: la glucógeno sintasa Gsy2p.	1,60e <sup>-05</sup>	2,43
<i>FOX2</i>	YKR009C	Enzima multifuncional de la vía de la beta-oxidación de ácidos grasos peroxisomal; tiene actividad 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y enoil-CoA hidratasa.	1,89e <sup>-05</sup>	2,42
---	YGL081W	---	6,72e <sup>-06</sup>	2,4
---	YGR117C	---	1,72e <sup>-05</sup>	2,4

**Tabla S5.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada *Δsky1* versus W303, después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>FMP48</i>	YGR052W	Supuesta proteína de función desconocida; la proteína no marcada se detecta en las mitocondrias altamente purificadas en estudios de localización celular a gran escala; inducida por el tratamiento con 8-metoxipsoraleno y la irradiación UVA.	8,88e <sup>-06</sup>	2,39
---	YJR107W	---	7,26e <sup>-06</sup>	2,39
<i>PPE1</i>	YHR075C	Proteína con actividad de carboxil metil esterasa que puede tener un papel en la desmetilación de la subunidad catalítica de la fosfoproteína fosfatasa; también identificada como una proteína subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial.	5,82e <sup>-06</sup>	2,39
<i>BAG7</i>	YOR134W	Proteína GTPasa activadora de Rho (RhoGAP); estimula la actividad GTPasa intrínseca de Rho1p que desempeña un papel en la organización del citoesqueleto de actina y el control de la síntesis de la pared celular; estructural y funcionalmente relacionada con Sac7p.	7,79e <sup>-05</sup>	2,39
<i>ALD6</i>	YPL061W	Aldehído deshidrogenasa citosólica, activada por Mg <sup>2+</sup> y utiliza NADP <sup>+</sup> como coenzima preferente; necesaria para la conversión de acetaldehído a acetato de etilo; se expresa constitutivamente; situada en la superficie externa mitocondrial bajo condiciones de estrés oxidativo.	3,77e <sup>-05</sup>	2,38
---	YML002W	---	7,79e <sup>-06</sup>	2,37
<i>GAL1</i>	YBR020W	Galactoquinasa, fosforila alfa-D-galactosa a alfa-D-galactosa-1-fosfato en la primera etapa del catabolismo de la galactosa; expresión regulada por Gal4p.	8,06e <sup>-06</sup>	2,35
<i>HNT1</i>	YDL125C	Adenosina 5'-monofosforamidasas; interactúa físicamente y genéticamente con Kin28p, una subunidad de CDK y TFIIK, y genéticamente con CAK1, miembro de la superfamilia de proteínas HIT (tríada de histidinas) de unión a nucleótidos y similar Hint.	2,74e <sup>-05</sup>	2,35
---	YJL216C	---	9,48e <sup>-06</sup>	2,34
<i>MUD1</i>	YBR119W	Codifica snRNP U1-A; homóloga a la humana U1-A; involucrada en el <i>splicing</i> de ARNm nuclear.	5,44e <sup>-05</sup>	2,34
---	YMR262W	---	1,04e <sup>-06</sup>	2,33

**Tabla S5.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada *Δsky1* versus W303, después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
---	YDR182W-A	---	3,39e <sup>-06</sup>	2,33
<i>ODC2</i>	YOR222W	Transportador de membrana mitocondrial interna, exporta 2-oxoadipate y 2-oxoglutarato desde la matriz mitocondrial al citosol para su uso en la biosíntesis de lisina y glutamato y en el catabolismo de la lisina.	5,80e <sup>-06</sup>	2,33
<i>PXA1</i>	YPL147W	Subunidad del complejo transportador ABC ( <u>A</u> TP- <u>b</u> inding <u>c</u> assette) heterodimérico peroxisomal (Pxa1p-Pxa2p); necesaria para la importación de ácidos grasos de cadena larga en los peroxisomas; similar al transportador de adrenoleucodistrofia humano y a proteínas relacionadas con ALD.	1,50e <sup>-05</sup>	2,33
<i>ZPS1</i>	YOL154W	Supuesta proteína con anclaje GPI; la transcripción es inducida bajo condiciones de bajo contenido de zinc y mediada por el factor de transcripción Zap1p y el pH alcalino.	5,14e <sup>-06</sup>	2,31
<i>LPX1</i>	YOR084W	Lipasa inducida por ácido oleico, localizada en la matriz peroxisomal; transcripcionalmente activada por Yrm1p junto con genes implicados en la resistencia a múltiples fármacos; la importación peroxisomal es dependiente del receptor PTS1, Pex5p y de la auto-interacción.	6,90e <sup>-05</sup>	2,29
<i>DFM1</i>	YDR411C	Análoga a la familia derlin localizada en el RE e involucrada en el estrés del RE y la homeostasis; no participa en ERAD o retrotranslocación del sustrato; interacciona con Cdc48, contiene cuatro dominios transmembrana y dos cajas SHP.	8,54e <sup>-06</sup>	2,29
<i>GRH1</i>	YDR517W	Acetilada; proteína localizada en cis-Golgi involucrada en el transporte entre el RE y Golgi; homóloga de GRASP65 humano; forma un complejo con la proteína Bug1p; en los mutantes la fusión de vesículas derivadas del RE con membranas de Golgi se ve comprometida.	2,33e <sup>-05</sup>	2,29
<i>GDB1</i>	YPR184W	Enzima glucógeno desramificante tiene actividades glucanotransferasa y alfa-1 ,6-amiloglucosidasa, necesarias para la degradación del glucógeno; se localiza fosforilada en las mitocondrias.	4,87e <sup>-05</sup>	2,29

**Tabla S5.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303, después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
---	YBL109W /// YDR544C /// YHR217C /// YLL066W-B /// YLR466C-B /// YNL338W	---	$3,43e^{-05}$	2,28
<i>ALT2</i>	YDR111C	Supuesta alanina transaminasa (glutámico pirúvico transaminasa)	$5,82e^{-05}$	2,27
<i>SNA4</i>	YDL123W	Proteína de función desconocida, localizada en la membrana vacuolar exterior; se prevé que está palmitoilada.	$4,19e^{-05}$	2,25
<i>VPS55</i>	YJR044C	Proteína endosomal tardía implicada en el tráfico entre el endosoma tardío y la vacuola; homólogo funcional de OB-RGRP ( <i>obesity receptor gene-related protein</i> ).	$4,23e^{-05}$	2,24
---	YMR182W-A	---	$1,16e^{-05}$	2,24
<i>DAN4</i>	YJR151C	Manoproteína de la pared celular con similitud a Tir1p, Tir2p, Tir3p, y Tir4p; se expresa bajo condiciones anaeróbicas; gen completamente reprimido durante el crecimiento aeróbico.	$5,76e^{-06}$	2,24
---	YMR030W-A	---	$1,37e^{-05}$	2,24
<i>DMC1</i>	YER179W	Proteína específica de la meiosis necesaria para la reparación de roturas de cadena doble y el apareamiento entre cromosomas homólogos; homóloga de Rad51p y la proteína bacteriana RecA.	$4,74e^{-05}$	2,22
---	YJR039W	---	$5,62e^{-06}$	2,22
<i>MRK1</i>	YDL079C	Homóloga a la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3); una de las cuatro homólogas de GSK-3 en <i>S. cerevisiae</i> que activa la transcripción dependiente de Msn2p de genes de estrés que funcionan en la degradación de proteínas.	$1,48e^{-05}$	2,22

**Tabla S5.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada *Δsky1* versus W303, después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>VHS1</i>	YDR247W	Serina / treonina proteín quinasa citoplásmica; identificada como un supresor de alta copia de la letalidad sintética de un doble mutante <i>sis2 sit4</i> , lo que sugiere un papel en la progresión de la fase G1/S; homóloga de Sks1p.	2,20e <sup>-05</sup>	2,21
<i>XBP1</i>	YIL101C	Represor transcripcional que se une a secuencias promotoras de los genes de ciclina, <i>CYS3</i> y <i>SMF2</i> ; expresión inducida por el estrés o ayuno durante la mitosis y la meiosis tardía; miembro de la familia Swi4p/Mbp1p; sustrato potencial de Cdc28p.	6,28e <sup>-05</sup>	2,21
<i>FMP40</i>	YPL222W	Supuesta proteína de función desconocida, propuesta como implicada en la respuesta al estrés ambiental; la proteína no marcada se detecta en las mitocondrias altamente purificadas en estudios de localización subcelular a gran escala.	3,90e <sup>-05</sup>	2,21
<i>UPS3</i>	YDR185C	Proteína mitocondrial de función desconocida; similar a Ups1p y Ups2p que está involucrada en la regulación de cardiolipina mitocondrial y los niveles de fosfatidil etanolamina; el nulo es viable pero interactúa sintéticamente con las mutaciones <i>ups1</i> y <i>sai2</i> .	3,77e <sup>-05</sup>	2,21
<i>LSC1</i>	YOR142W	Subunidad alfa de succinil-CoA ligasa, que es una enzima mitocondrial del ciclo TCA (tricarboxilic acids) que cataliza la conversión de succinil-CoA a succinato dependiente de nucleótidos; se encuentra fosforilada.	1,66e <sup>-05</sup>	2,21
<i>ASA1</i>	YPR085C	Supuesta proteína de función desconocida; subunidad del complejo ASTRA (Rvb1p, Rvb2p, Tra1p, Tti1p, Tti2, Asa1p y Tra1p) que es parte de la maquinaria de remodelación de la cromatina.	2,21e <sup>-05</sup>	2,19
<i>OM14</i>	YBR230C	Proteína mitocondrial integral de la membrana externa; su abundancia disminuye en las células cultivadas en glucosa con respecto a otras fuentes de carbono; parece contener 3 segmentos transmembrana alfa-helicoidales; la ORF contiene un intrón de 97 pares de bases.	3,08e <sup>-05</sup>	2,17
<i>ARG3</i>	YJL088W	Ornitina carbamoiltransferasa (carbamoilfosfato: L-ornitina carbamoiltransferasa), cataliza la sexta etapa en la biosíntesis de la arginina con ornitina como precursor.	1,41e <sup>-05</sup>	2,15

**Tabla S5.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada *Δsky1* versus W303, después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>RRI1</i>	YDL216C	Subunidad catalítica del complejo COP9 signalosome (CSN) que actúa como una isopeptidasa en la escisión de la proteína tipo ubiquitina Nedd8 desde la ubiquitina ligasa SCF; metaloendopeptidasa involucrada en la adaptación a la señalización por feromonas.	1,92e <sup>-05</sup>	2,14
<i>DSD1</i>	YGL196W	D-serina deshidratasa (también conocida como D-serina amoníaco liasa); convierte D-serina en piruvato y amoníaco mediante una reacción dependiente de piridoxal 5'-fosfato y zinc; puede jugar un papel en la desintoxicación de D-serina; L-serina no es un sustrato.	3,75e <sup>-05</sup>	2,13
<i>MOB1</i>	YIL106W	Componente de la señal de salida de la mitosis; se asocia con y es necesaria para la activación y fosforilación dependiente de Cdc15p de la quinasa Dbf2p; necesaria para la citocinesis y la separación de células; componente del complejo transcripcional CCR4.	1,04e <sup>-05</sup>	2,1
<i>IBA57</i>	YJR122W	Proteína de la matriz mitocondrial implicada en la incorporación de complejos hierro-azufre en las proteínas mitocondriales tipo aconitasa; activa los miembros de la familia <i>radical</i> -SAM Bio2p y Lip5p; interactúa con Ccr4p en el sistema de doble híbrido.	2,47e <sup>-05</sup>	2,1
---	YGR201C	---	1,61e <sup>-05</sup>	2,1
---	YMR087W	---	1,17e <sup>-05</sup>	2,1
<i>AKR2</i>	YOR034C	Proteína que contiene repeticiones ankyrina similar a Akr1p; miembro de una familia de supuestas palmitoiltransferasas que contienen un dominio Asp-His-His-Cys-cisteín-rich (DHHC-CRD); posiblemente implicada en la endocitosis constitutiva de Ste3p.	5,89e <sup>-05</sup>	2,1
<i>ADD66</i>	YKL206C	Proteína implicada en el ensamblaje del proteasoma 20S; forma un heterodímero con Pba1p que se une a los precursores del proteasoma, similar a la humana PAC2 constituyente del complejo PAC1-PAC2 involucrada en el ensamblaje del proteasoma.	2,84e <sup>-05</sup>	2,09
<i>ATH1</i>	YPR026W	Trehalasa ácida necesaria para la utilización de la trehalosa extracelular.	3,94e <sup>-05</sup>	2,08

**Tabla S5.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada *Δsky1* versus W303, después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
SCC4	YER147C	Subunidad del factor de carga cohesina (Scc2p-Scc4p), complejo necesario para la carga de complejos cohesina en los cromosomas; involucrada en el establecimiento de la cohesión de cromátidas hermanas durante la reparación de la ruptura de la doble cadena a través de la histona fosforilada H2AX.	1,31e <sup>-05</sup>	2,08
---	YBL071C-B	---	3,55e <sup>-05</sup>	2,08
THI11 /// THI12 /// THI13 /// THI5	YDL244W/// YFL058W/// YJR156C/// YNL332W		2,91e <sup>-05</sup>	2,08
ERG27	YLR100W	3-ceto esterol reductasa, cataliza el último de los tres pasos necesarios para quitar dos grupos metilo C-4 de un intermediario en la biosíntesis de ergosterol; los mutantes presentan auxotrofia a esteroides.	3,37e <sup>-05</sup>	2,07
CWP1	YKL096W	Manoproteína de la pared celular que se localiza específicamente en las cicatrices de nacimiento de células hijas, vinculada a un heteropolímero beta-1, 3- y beta-1,6-glucano a través de un enlace fosfodiéster; necesaria para la resistencia a ácido propiónico.	3,15e <sup>-05</sup>	2,06
HNT2	YDR305C	Dinucleósido trifosfato hidrolasa; tiene similitud con el supresor de tumores FHIT y pertenece a la superfamilia HIT (histidine triad) de proteínas de unión a nucleótidos.	6,58e <sup>-05</sup>	2,05
---	YOR019W	---	3,59e <sup>-05</sup>	2,05
---	YCR076C	---	3,97e <sup>-05</sup>	2,05
ORC4	YPR162C	Subunidad del complejo de reconocimiento del origen, que dirige la replicación del ADN mediante la unión a los orígenes de replicación y también está implicada en el silenciamiento transcripcional.	4,01e <sup>-06</sup>	2,04
ECM27	YJR106W	Proteína no esencial de función desconocida.	5,74e <sup>-05</sup>	2,04
---	YJL185C	---	6,78e <sup>-05</sup>	2,04
RRM3	YHR031C	ADN helicasa involucrada en la replicación ADNr y la transposición de Ty1; elimina las pausas de la replicación en las regiones teloméricas; estructural y funcionalmente relacionada con Pif1p.	3,53e <sup>-05</sup>	2,04



**Tabla S5.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada *Δsky1* versus W303, después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>GIP2</i>	YER054C	Supuesta subunidad reguladora de la proteín-fosfatasa Glc7p, involucrada en el metabolismo del glucógeno; contiene un motivo conservado (motivo GVNK) que también se encuentra en Gac1p, Pig1p, y Pig2p.	1,38e <sup>-05</sup>	2,04
<i>FCY22</i>	YER060W-A	Presunta permeasa de purina-citosina, muy similar a Fcy2p pero no puede sustituir a su función.	6,03e <sup>-07</sup>	2,03
<i>SPC25</i>	YER018C	Componente del evolutivamente conservado complejo Ndc80 (Ndc80p-Nuf2p-Spc24p-Spc25p) asociado a cinetocoro; implicada en la segregación cromosómica, control de la actividad del huso y el agrupamiento del cinetocoro.	4,22e <sup>-05</sup>	2,03
---	YIR007W	---	1,12e <sup>-05</sup>	2,02
<i>HTD2</i>	YHR067W	3-hidroxiacil-tioéster deshidratasa mitocondrial implicada en la biosíntesis de ácidos grasos; necesaria para el crecimiento respiratorio y para la morfología mitocondrial normal.	1,02e <sup>-05</sup>	2,02
---	YCR061W	---	7,71e <sup>-05</sup>	2,01
<i>GIP1</i>	YBR045C	Subunidad reguladora de la proteín-fosfatasa Glc7p, meiosis-específica; regula la formación de la pared de esporas y organización de septos, necesaria para la expresión de algunos genes meióticos tardíos y para la normal localización de Glc7p.	9,93e <sup>-06</sup>	2,01
<i>ARO4</i>	YBR249C	3-desoxi-D-arabino-heptulosonate-7-fosfato (DAHP) sintasa; cataliza el primer paso en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y es inhibida por retroalimentación por tirosina o altas concentraciones de fenilalanina o triptófano.	1,12e <sup>-05</sup>	2,01
---	YJR149W	---	4,13e <sup>-05</sup>	2
---	YIL001W	---	1,21e <sup>-05</sup>	2
<i>SRP101</i>	YDR292C	Subunidad alfa del receptor de SRP(Signal recognition particle); contiene dominios GTPasa; involucrada en localización de proteínas SRP dependiente; interactúa con Srp102p.	7,59e <sup>-05</sup>	1,98
<i>MDH3</i>	YDL078C	Malato deshidrogenada peroxisomal, cataliza la interconversión de malato y oxaloacetato, participa en el ciclo del glioxilato.	3,54e <sup>-05</sup>	1,98

**Tabla S5.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada *Δsky1* versus W303, después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>HUL4</i>	YJR036C	Proteína con similitud a las E3 ubiquitin-protein ligasas con dominio hect que no son esenciales para la viabilidad.	1,34e <sup>-05</sup>	1,98
<i>AIM31</i>	YML030W	Supuesta proteína de función desconocida; la proteína de fusión GFP se localiza en las mitocondrias, puede interactuar con los complejos de la cadena respiratoria III o IV; el mutante nulo es viable y muestra reducción en la frecuencia de la pérdida del genoma mitocondrial.	6,76e <sup>-06</sup>	1,97
<i>GLG2</i>	YJL137C	Iniciador de la síntesis de glucógeno que se auto-glicosila; también glicosila n-dodecil-beta-D-maltósido; similar a glucogenina de mamíferos.	7,35e <sup>-06</sup>	1,96
<i>HUG1</i>	YML058W-A	Proteína implicada en el punto de control mediado por Mec1p que responde a daños en el ADN o a la detención de la replicación; su transcripción es inducida por daño en el ADN.	3,75e <sup>-05</sup>	1,95
<i>MLS1</i>	YNL117W	Malato sintasa, enzima del ciclo de glioxilato, implicada en la utilización de fuentes de carbono no fermentables; expresión sujeta a la represión catabólica por carbono; se localiza en los peroxisomas durante el crecimiento en medio con ácido oléico.	2,14e <sup>-05</sup>	1,95
<i>APA2</i>	YDR530C	Diadenosina 5',5"-P1,P4-tetrafosfato fosforilasa II (AP4A fosforilasa), que participa en el catabolismo de bis(5'-nucleosidil) tetrafosfatos; tiene similitud con Apa1p.	3,01e <sup>-05</sup>	1,95
<i>HBT1</i>	YDL223C	Sustrato de la proteína Hub1p similar a ubiquitina que se localiza en la punta <i>shmoo</i> (proyección de apareamiento); los mutantes son defectuosos para la formación de la proyección de apareamiento, lo que implica a Hbt1p en la morfogénesis de células polarizadas.	5,58e <sup>-05</sup>	1,95
<i>PEX2</i>	YJL210W	Peroxina RING-finger; proteína de la membrana peroxisomal con un dominio RING de unión al zinc en el extremo C-terminal; forma un subcomplejo de translocación con Pex10p y Pex12p que funciona en el transporte de proteínas a la matriz del peroxisoma.	1,47e <sup>-05</sup>	1,94
<i>LST4</i>	YKL176C	Proteína posiblemente involucrada en una vía secretora post-Golgi; necesaria para el transporte de la permeasa de amino ácidos Gap1p desde el Golgi a la superficie de la célula regulado por nitrógeno.	3,27e <sup>-05</sup>	1,92
<i>BOP2</i>	YLR267W	Proteína de función desconocida.	1,66e <sup>-05</sup>	1,91

**Tabla S5.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada *Δsky1* versus W303, después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>ECI1</i>	YLR284C	Peroxisomal; delta3, delta2-enoil-CoA isómeras; proteína hexamérica que convierte la 3-hexenoil-CoA a trans-2-hexenoil-CoA, esencial para la beta-oxidación de los ácidos grasos insaturados; inducida por oleato.	2,68e <sup>-05</sup>	1,91
<i>SCO1</i>	YBR037C	Proteína de unión a cobre de la membrana mitocondrial interna; necesaria para la actividad citocromo c oxidasa y la respiración; puede funcionar para entregar cobre a la citocromo c oxidasa; tiene similitud con tioredoxinas.	1,89e <sup>-05</sup>	1,91
---	YOR022C	---	1,81e <sup>-05</sup>	1,9
---	YOL083W	---	2,12e <sup>-05</sup>	1,9
<i>AVT6</i>	YER119C	Exportador vacuolar de aspartato y glutamato; miembro de una familia de siete genes ( <i>AVT1-7</i> ) relacionados con los transportadores vesiculares GABA de glicina; implicada en compartimentar aminoácidos ácidos en respuesta a la privación de nitrógeno.	6,63e <sup>-05</sup>	1,89
<i>TOS4</i>	YLR183C	Proteína que contiene un dominio <i>forkhead</i> ; probable factor de transcripción asociado a la cromatina; diana del factor de transcripción SBF; su expresión es cíclica con un pico máximo en G1; similar a <i>PLM2</i> .	1,02e <sup>-05</sup>	1,89
<i>TOS3</i>	YGL179C	Proteín quinasa, relacionada con y funcionalmente redundante a Elm1p y Sak1p en la fosforilación y activación de Snf1p; funcionalmente ortóloga a LKB1, una quinasa de mamífero asociada al síndrome de Peutz-Jeghers, síndrome de susceptibilidad a cáncer.	7,30e <sup>-05</sup>	1,88
<i>BNA5</i>	YLR231C	Kinureninasa, necesaria para la biosíntesis de <i>de novo</i> de NAD a partir de triptófano a través de la kinurenina; expresión regulada por Hst1p.	1,83e <sup>-05</sup>	1,86
<i>TRK2</i>	YKR050W	Componente del sistema de transporte de potasio Trk1p-Trk2p.	5,52e <sup>-05</sup>	1,86
<i>BNA7</i>	YDR428C	Formilkinurenina formamidasa, participa en la biosíntesis <i>de novo</i> de NAD a partir de triptófano vía kinurenina.	3,04e <sup>-05</sup>	1,86
<i>GPM2</i>	YDL021W	Homóloga de la fosfoglicerato mutasa Gpm1p, que convierte 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato en la glucólisis, puede ser no funcional y deriva de un evento de duplicación de genes.	5,15e <sup>-05</sup>	1,85

**Tabla S5.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada *Δsky1* versus W303, después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>CRF1</i>	YDR223W	Correpressor transcripcional implicado en la represión de la transcripción de genes de proteínas ribosomales (RP) a través de la vía de señalización TOR que promueve la acumulación de Crf1p en el núcleo; el papel en la represión de genes RP varía según la cepa.	6,45e <sup>-05</sup>	1,85
<i>ECM5</i>	YMR176W	Proteína no esencial de función desconocida, contiene motivo A de unión a ATP/GTP; los mutantes nulos presentan un volumen celular hasta cuatro veces mayor que el de tipo salvaje, también amplias gemas con cuellos alargados.	7,36e <sup>-05</sup>	1,84
<i>AVT1</i>	YJR001W	Transportador vacuolar, importa grandes aminoácidos neutros en la vacuola; miembro de una familia de siete genes de <i>S. cerevisiae</i> (AVT1-7) relacionada con transportadores vesiculares de GABA-glicina.	4,91e <sup>-05</sup>	1,83
<i>TTI2</i>	YJR136C	Supuesta proteína de función desconocida; subunidad del complejo ASTRA que forma parte de la maquinaria de remodelación de la cromatina; similar a Tti2p de <i>S. pombe</i> ; puede interactuar con Rsm23p; la proteína de fusión a GFP se localiza en el citoplasma.	3,51e <sup>-05</sup>	1,83
<i>URH1</i>	YDR400W	Uridin nucleosidasa (uridina-citidina N-ribohidrolasa), escinde enlaces N-glucosídicos en nucleósidos, implicada en las tareas de recuperación de pirimidina y mecanismos de recuperación de nicotinamida ribósido.	4,74e <sup>-05</sup>	1,83
<i>UBC8</i>	YEL012W	Enzima de conjugación a ubiquitina que regula negativamente la gluconeogénesis por mediación de la ubiquitinación inducida por glucosa de la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa); enzima citoplasmática que también cataliza la ubiquitinación de las histonas <i>in vitro</i> .	5,42e <sup>-05</sup>	1,82
<i>TPK1</i>	YJL164C	Subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de AMPc; promueve el crecimiento vegetativo en respuesta a los nutrientes a través de la vía de señalización Ras-cAMP; inhibida por la subunidad reguladora Bcy1p en ausencia de cAMP; parcialmente redundante con Tpk2p y Tpk3p.	6,75e <sup>-05</sup>	1,82
<i>PHM8</i>	YER037W	Proteína de función desconocida, su expresión es inducida por bajos niveles de fosfato y por la inactivación de Pho85p.	3,53e <sup>-05</sup>	1,82

**Tabla S5.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada *Δsky1* versus W303, después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>PPH22</i>	YDL188C	Subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 2A (PP2A); funcionalmente redundante con Pph21p; metilada en el extremo C terminal; forma alternativamente complejos con varias subunidades reguladoras; involucrada en la transducción de señales y regulación de la mitosis.	3,59e <sup>-05</sup>	1,81
<i>AHA1</i>	YDR214W	Co-chaperona que se une a Hsp82p y activa su actividad ATPasa; similar a Hch1p; expresión regulada por diferentes formas de estrés tales, como por calor.	6,88e <sup>-05</sup>	1,8
---	YLR446W	---	4,36e <sup>-05</sup>	1,8
---	YLL053C	---	5,33e <sup>-05</sup>	1,79
<i>GRE2</i>	YOL151W	3-metilbutanal reductasa y metilglioxal reductasa dependiente de NADPH (D-lactaldehído deshidrogenasa); inducida por estrés (osmótico, iónico, oxidativo, calor y metales pesados); regulada por la vía HOG.	5,25e <sup>-05</sup>	1,78
<i>GPX1</i>	YKL026C	Fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa inducida por carencia de glucosa; protege a las células de hidroperóxidos de fosfolípidos y de otros peróxidos no fosfolípidos durante el estrés oxidativo.	6,91e <sup>-05</sup>	1,78
<i>NDT80</i>	YHR124W	Factor de transcripción específico de la meiosis necesario para la salida de paquiteno y para la recombinación meiótica completa; activa los genes de la esporulación intermedia; compite con Sum1p por la unión a los promotores que contienen elementos medios de la esporulación (MSE).	9,06e <sup>-06</sup>	1,78
<i>UBP5</i>	YER144C	Supuesta proteasa específica de ubiquitina; análoga más cercana de Doa4p pero no tiene ningún solapamiento funcional; se concentra en el cuello de la gema.	6,86e <sup>-05</sup>	1,77
<i>FUN14</i>	YAL008W	Proteína mitocondrial de función desconocida.	3,63e <sup>-05</sup>	1,76
---	YLR281C	---	3,54e <sup>-05</sup>	1,76
<i>VPS54</i>	YDR027C	Componente del complejo GARP ( <i>Golgi-associated retrograde protein</i> ), Vps51p-Vps52p-Vps53p-Vps54p, necesario para el reciclaje de proteínas desde los endosomas al Golgi tardío; potencialmente fosforilada por Cdc28p.	8,10e <sup>-05</sup>	1,76

**Tabla S5.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada *Δsky1* versus W303, después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
COQ9	YLR201C	Proteína necesaria para la biosíntesis de ubiquinona (coenzima Q), y el crecimiento respiratorio; se localiza en la cara matriz de la membrana mitocondrial interna en un gran complejo de enzimas biosintéticas de ubiquinona.	2,40e <sup>-05</sup>	1,76
PAU1 /// PAU14	YIL176C /// YJL223C	Miembro de la familia multigénica seripauperin codificada principalmente en las regiones subteloméricas; genes activos durante la fermentación alcohólica, regulados por la anaerobiosis, regulados negativamente por oxígeno, reprimidos por hemo; idéntica a Pau14p ;	5,49e <sup>-05</sup>	1,75
RUP1	YOR138C	Proteína implicada en la regulación de Rsp5p, que es un elemento esencial de la ubiquitina ligasa HECT; tiene un dominio WW motivo consenso de PPSY (residuos 131-135) que media la unión de Rsp5p a Ubp2p; contiene un dominio UBA.	6,41e <sup>-05</sup>	1,75
---	YER163C	---	2,71e <sup>-05</sup>	1,75
TVP15	YDR100W	Proteína integral de membrana localizada en vesículas de Golgi tardío junto con el v-SNARE Tlg2p.	3,56e <sup>-05</sup>	1,74
PET100	YDR079W	Chaperona que específicamente facilita el ensamblaje de la citocromo c oxidasa; proteína integral de la membrana interna mitocondrial; interactúa con un subcomplejo de subunidades VII, VIIa y VIII (Cox7p, Cox9p, y Cox8p), pero no con la holoenzima.	2,24e <sup>-05</sup>	1,74
---	YJL163C	---	5,69e <sup>-05</sup>	1,74
HEM4	YOR278W	Uroporfirinógeno III sintasa, que cataliza la conversión de hidroximetilbilano a uroporfirinógeno III, el cuarto paso en la biosíntesis de hemo; deficiencias en el homólogo humano puede causar la enfermedad porfiria eritropoyética congénita.	1,24e <sup>-05</sup>	1,73
LYS5	YGL154C	Fosfopanteteinil transferasa implicada en la biosíntesis de la lisina; convierte la forma apo inactiva de Lys2p (alfa- aminoacido reductasa) en la holo-forma catalíticamente activa por adición postraducciona de fosfopanteteína.	1,93e <sup>-05</sup>	1,73

**Tabla S5.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada *Δsky1* versus W303, después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>DMA1</i>	YHR115C	Proteína implicada en la unión de la ubiquitina; desempeña un papel en la regulación de la posición y orientación del huso; redundante funcionalmente con Dma2p; ortólogo de la proteína humana RNF8, también tiene similitud de secuencia con Chfr humano.	4,27e <sup>-05</sup>	1,72
---	YGL010W	---	5,50e <sup>-05</sup>	1,72
---	YJR142W	---	4,54e <sup>-05</sup>	1,72
---	YCL049C	---	3,33e <sup>-05</sup>	1,72
<i>SWE1</i>	YJL187C	Proteín-quinasa que regula la transición G2/M por inhibición de la actividad quinasa de Cdc28p; se localiza en el núcleo y en el lado de la célula hija en el cuello de la gema de la célula madre; homóloga de <i>S. pombe</i> Wee1p; sustrato potencial de Cdc28p.	3,88e <sup>-05</sup>	1,71
<i>FRT2</i>	YAL028W	Proteína anclada a la membrana del retículo endoplásmico, interacciona con el homólogo Frt1p, pero no es un sustrato de la calcineurina (a diferencia de Frt1p); promueve el crecimiento en condiciones de alta concentración de Na <sup>+</sup> , pH alcalino o estrés de la pared celular; sustrato potencial de Cdc28p.	6,14e <sup>-05</sup>	1,71
---	YBR053C	---	6,58e <sup>-05</sup>	1,71
<i>SIR1</i>	YKR101W	Proteína implicada en la represión de la transcripción de los loci de apareamiento HML y HMR silenciados; el reclutamiento a la cromatina silenciada requiere la interacción con Orc1p y con Sir4p, a través de un dominio Sir1p común; se une a la cromatina centromérica.	4,31e <sup>-05</sup>	1,7
<i>IDP3</i>	YNL009W	Isocitrato deshidrogenasa peroxisomal dependiente de NADP, cataliza la oxidación de isocitrato a la alfa-cetoglutarato con la formación de NADP(H <sup>+</sup> ); necesaria para el crecimiento en ácidos grasos insaturados.	4,46e <sup>-05</sup>	1,69
<i>TGL4</i>	YKR089C	Triacilglicerol lipasa multifuncional, esteril éster hidrolasa, y fosfolipasa A2 Ca <sup>2+</sup> -independiente; cataliza la acilación dependiente de acil-CoA de LPA a PA;junto con Tgl3p es necesaria para la formación de gemas; fosforilada y activada por Cdc28p.	5,69e <sup>-05</sup>	1,68
<i>RNH1</i>	YMR234W	Ribonucleasa H1; capaz de unirse ARNs de doble hebra e híbridos ARN-ADN; se asocia con ARNasa polimerasa I; el homólogo de mamífero ARNasa HIII.	1,79e <sup>-05</sup>	1,66

**Tabla S5.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada *Δsky1* versus W303, después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>JHD1</i>	YER051W	Demetilasa específica para histona H3-K36, con dominio JmjC; similar a las proteínas encontradas en humanos, ratón, <i>Drosophila</i> , <i>X. laevis</i> , <i>C. elegans</i> , y <i>S. pombe</i> .	7,53e <sup>-05</sup>	1,66
<i>EXO70</i>	YJL085W	Subunidad del complejo de exocitosis (Sec3p, Sec5p, Sec6p, Sec8p, Sec10p, Sec15p, Exo70p, y Exo84p), que dirige las vesículas secretoras a los sitios activos de la exocitosis; actúa con Sec3p direccionando a la membrana el exocisto a través de la unión de PI (4,5) P2.	4,21e <sup>-05</sup>	1,66
<i>MRPL10</i>	YNL284C	Proteína de la subunidad ribosomal grande de la mitocondria; aparece como dos manchas de proteínas (YmL10 y YmL18) en geles de SDS de dos dimensiones.	7,92e <sup>-05</sup>	1,66
<i>GLR1</i>	YPL091W	Glutación oxidorreductasa citosólica y mitocondrial, convierte el glutati6n oxidado a glutati6n reducido; la isoforma mitocondrial, pero no la citos6lica, tiene un papel en la resistencia a la hiperoxia.	7,99e <sup>-05</sup>	1,65
---	YOL159C-A	---	7,14e <sup>-05</sup>	1,65
<i>LEU5</i>	YHR002W	Proteína portadora mitocondrial implicada en la acumulaci6n de CoA en la matriz mitocondrial; hom6loga de la prote6na humana de la enfermedad de Graves; no codifica una isoenzima de Leu4p, como primeramente se hipotetiz6.	5,62e <sup>-05</sup>	1,65
<i>ATG14</i>	YBR128C	Subunidad del complejo I fosfatidilinositol 3-quinasa (con Vps34/15/30p) espec6fica de autofagia; Atg14p dirige al complejo I al PAS (phagophore assembly site); necesaria para la localizaci6n de prote6nas adicionales ATG a PAS; hom6logo humano de Barkor.	2,48e <sup>-05</sup>	1,65
<i>PNP1</i>	YLR209C	Purin nucle6sido fosforilasa, metaboliza espec6ficamente nucle6sidos inosina y guanosina; implicada en la v6a de recuperaci6n de nicotinamida rib6sido.	6,66e <sup>-05</sup>	1,65
<i>SMP3</i>	YOR149C	Alfa 1,2-manosiltransferasa involucrada en la bios6ntesis de glicosil fosfatidil inositol (GPI); necesaria para la adici6n de la cuarta manosa en el sitio de ramificaci6n a la estructura del n6cleo GPI.	8,11e <sup>-05</sup>	1,64
<i>PRM2</i>	YIL037C	Prote6na regulada por feromonas; se prev6 que tiene 4 segmentos transmembrana y un dominio <i>coiled coil</i> ; regulada por Ste12p; necesaria para la fusi6n nuclear eficiente.	4,95e <sup>-05</sup>	1,63



**Tabla S5.** Genes cuya expresión aumenta en la cepa mutada *Δsky1* versus W303, después del tratamiento con cisplatino (continuación).

<b>Gen</b>	<b>ORF</b>	<b>Función del gen</b>	<b>p-valor</b>	<b>Ratio</b>
<i>DIA4</i>	YHR011W	Probable seril-ARNt sintetasa mitocondrial; los mutantes muestran un aumento en el crecimiento invasivo y pseudohifal.	3,61e <sup>-05</sup>	1,62
<i>ERS1</i>	YCR075C	Proteínas con similitud a cistinosina humana, que es un transportador impulsado por H <sup>(+)</sup> ; interviene en la exportación de L-cisteína de los lisosomas y está implicada en la enfermedad cistinosis; contiene siete dominios transmembrana.	4,11e <sup>-05</sup>	1,61
---	YOR161C-C	---	8,14e <sup>-05</sup>	1,6
<i>LDB17</i>	YDL146W	Proteína implicada en la regulación de la endocitosis; transitoriamente reclutada a los paquetes de actina corticales en una manera dependiente de <i>SLA1</i> ; la proteína de fusión a GFP se localiza en la periferia, citoplasma, gema y cuello de la gema.	1,85e <sup>-05</sup>	1,6

**Tabla S6.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 después del tratamiento con cisplatino.

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>DDI1</i>	YER143W	Proteína de unión a v-SNARE inducida por daño en el DNA, contiene un dominio ubiquitina-asociado (UBA); puede actuar como un regulador negativo de la exocitosis constitutiva; puede jugar un papel en el punto de control de la fase S.	6,82e <sup>-05</sup>	-1,62
<i>SRL2</i>	YLR082C	Proteína de función desconocida; la sobreexpresión suprime la letalidad causada por una mutación nula <i>rad53</i>	2,19e <sup>-05</sup>	-1,62
<i>SIR3</i>	YLR442C	Proteína silenciadora que interactúa con Sir2p y Sir4p, y las colas de las histonas H3 y H4, para establecer un estado de cromatina transcripcionalmente silencioso; necesaria para la expansión de la cromatina silenciada; es reclutada a la cromatina a través de la interacción con Rap1p.	6,90e <sup>-05</sup>	-1,63
<i>RLP7</i>	YNL002C	Proteína nucleolar con similitud a las proteínas L7 de la subunidad ribosomal grande; constituyente la partícula pre-ribosomal 66S; desempeña un papel esencial en el procesamiento de los precursores del ARN de la subunidad ribosómica grande.	6,66e <sup>-05</sup>	-1,63
<i>ELP3</i>	YPL086C	Subunidad del complejo elongador, que se necesita para la modificación de nucleósidos de titubeo en ARNt; presenta actividad histona acetiltransferasa que se dirige a las histonas H3 y H4; su interrupción confiere resistencia a la zymotoxin de <i>K. lactis</i> .	7,38e <sup>-05</sup>	-1,64
<i>GIR2</i>	YDR152W	Proteína citoplásmica altamente ácida que contiene un dominio RWD, de función desconocida; interactúa con Rbg1p y Gcn1p; se asocia con los ribosomas que están activos traduciendo; proteína intrínsecamente no estructurada.	8,01e <sup>-05</sup>	-1,64
<i>RBG1</i>	YAL036C	Miembro de la familia DRG de las proteínas de unión a GTP, se asocia con los ribosomas que están activos traduciendo; interactúa con Tma46p, Ygr250cp, Gir2p y Yap1p a través de doble híbrido.	7,71e <sup>-05</sup>	-1,65
<i>SKO1</i>	YNL167C	bZIP- factor de transcripción de la familia ATF/CREB; forma un complejo con Tup1p y Ssn6p tanto para activar como para reprimir la transcripción; proteína citosólica y nuclear implicada en las respuestas a estrés osmótico y oxidativo.	6,86e <sup>-05</sup>	-1,65
<i>RMD8</i>	YFR048W	Proteína citosólica necesaria para la esporulación.	3,76e <sup>-05</sup>	-1,66
---	YJR054W	---	3,80e <sup>-05</sup>	-1,66
---	YPL107W	---	4,48e <sup>-05</sup>	-1,67

**Tabla S6.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>RRP17</i>	YDR412W	Componente de las partículas pre-ribosomales 60S; necesaria para la viabilidad celular en condiciones normales (aeróbica), pero no bajo condiciones anaeróbicas.	6,05e <sup>-05</sup>	-1,68
<i>SFK1</i>	YKL051W	Proteína de la membrana plasmática que puede actuar junto con Stt4p (o por encima de Stt4 en la señalización) para generar niveles normales del fosfolípido esencial PI4P; al menos parcialmente media la localización adecuada de Stt4p en la membrana plasmática.	5,22e <sup>-05</sup>	-1,68
<i>MOT1</i>	YPL082C	Proteína esencial abundante implicada en la regulación de la transcripción; separa a Spt15p (TBP) de su unión a ADN a través de su actividad ATPasa C-terminal; forma un complejo con TBP que se une a las cajas TATA del ADN con alta afinidad pero con especificidad alterada.	3,88e <sup>-05</sup>	-1,68
<i>SPA2</i>	YLL021W	Componente del polarisoma que funciona en la organización del citoesqueleto de actina durante el crecimiento polarizado; actúa como un andamio para el anclaje de Mkk1p y Mpk1p, componentes de señalización de la integridad de la pared celular; sustrato potencial de Cdc28p.	7,28e <sup>-05</sup>	-1,69
<i>TPA1</i>	YER049W	Proteína de unión Poli(rA) implicada en la eficiencia de la terminación de la traducción, en la determinación de la longitud de la cola poli (A) del ARNm y la estabilidad del ARNm; interactúa con Sup45p (eRF1), Sup35p (eRF3) y Pab1p; similar a la prolil 4-hidroxilasas; une Fe(III) y 2-oxoglutarato.	4,90e <sup>-05</sup>	-1,7
<i>PAT1</i>	YCR077C	Topoisomerasa II asociada al factor ARNm-decapping dependiente de deadenylation, también es necesario para la transmisión fiel de cromosomas, el mantenimiento de la estabilidad del locus ADNr, y la protección del recorte de los 3'-UTRs del ARNm; vinculada funcionalmente con Pab1p.	5,52e <sup>-05</sup>	-1,71
<i>RPN14</i>	YGL004C	Proteína de interacción con el Proteasoma involucrada en el ensamblaje del subcomplejo base de las partículas reguladoras del proteasoma 19S (RP); los mutantes nulos acumulan Gcn4p ubiquitinado y presentan una disminución de la estabilidad del proteosoma 26S; interactúa con Rpt5p.	1,77e <sup>-05</sup>	-1,71
<i>SEN34</i>	YAR008W	Subunidad de la endonucleasa de <i>splicing</i> ARNt, que se compone de Sen2p, Sen15p, Sen34p, y Sen54p; Sen34p; contiene el sitio activo para la escisión del ARNt del sitio de <i>splicing</i> 3' y tiene similitud con Sen2p y la endonucleasa de <i>splicing</i> ARNt de Arqueas.	2,45e <sup>-05</sup>	-1,72

**Tabla S6.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>NTE1</i>	YML059C	Esterasa de serina, homóloga de la esterasa humana diana de neuropatía (NTE); El recambio de fosfatidilcolina mediado por Nte1p influye en la localización factor de transcripción Opi1p, afectando a la regulación transcripcional de los genes de la biosíntesis de fosfolípidos.	3,77e <sup>-05</sup>	-1,73
<i>YHB1</i>	YGR234W	Oxidorreductasa del óxido nítrico; flavohemoglobin implicada en la desintoxicación de óxido nítrico; desempeña un papel en las respuestas de estrés oxidativo y nitrosativo.	7,44e <sup>-05</sup>	-1,73
<i>MSH1</i>	YHR120W	Proteína de unión a ADN de las mitocondrias participa en la reparación del ADN mitocondrial, tiene actividad ATPasa y se une a los emparejamientos erróneos del ADN; tiene homología con MutS de <i>E. coli</i> ; su transcripción se induce durante la meiosis.	1,32e <sup>-05</sup>	-1,74
<i>SMC3</i>	YJL074C	Subunidad del complejo multiproteico cohesina necesario para la cohesión de cromátidas hermanas en células mitóticas; también se necesita, con Rec8p, para la cohesión y la recombinación durante la meiosis; filogenéticamente conservado; miembro de la familia ATPasa SMC cromosómica.	6,02e <sup>-05</sup>	-1,74
<i>GAB1</i>	YLR459W	Subunidad GPI transamidasa, implicada en la unión de glicosilfosfatidilinositol (GPI) a las proteínas; puede tener un papel en el reconocimiento de la señal de fijación o de la porción lipídica de GPI.	2,80e <sup>-05</sup>	-1,75
<i>RRP45</i>	YDR280W	Componente no catalítico del núcleo del exosoma; implicado en procesamiento del ARN 3'-5' y la degradación tanto en el núcleo como en el citoplasma; tiene similitud con la ARNasa PH de <i>E. coli</i> y hRrp45p (PM/SCL-75, EXOSC9) de humanos.	2,01e <sup>-05</sup>	-1,76
---	YPR013C	---	2,51e <sup>-05</sup>	-1,76
<i>SRP102</i>	YKL154W	Subunidad beta del receptor de señales de reconocimiento de partículas (SRP); involucrada en el marcaje de proteínas SRP-dependiente; ancla a Srp101p a la membrana del ER.	5,07e <sup>-05</sup>	-1,77
<i>TIF35</i>	YDR429C	Subunidad eIF3g del núcleo del complejo del factor de iniciación de la traducción 3 (eIF3), que es esencial para la traducción.	3,99e <sup>-05</sup>	-1,78
<i>NOP15</i>	YNL110C	Constituyente de las partículas de 66S pre-ribosomal; participa en la biogénesis de la subunidad 60S ribosomal; se localiza en nucleolo y citoplasma.	3,95e <sup>-05</sup>	-1,79
<i>SRM1</i>	YGL097W	Factor de intercambio de nucleótidos para Gsp1p, localizado en el núcleo, necesario para el tráfico nucleo-citoplasma de macromoléculas; supresor de la vía de respuesta a las feromonas; potencialmente fosforilado por Cdc28p.	6,49e <sup>-05</sup>	-1,79

**Tabla S6.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>PRM5</i>	YIL117C	Proteína regulada por feromonas; se prevé que contiene un segmento transmembrana; inducida en la señalización por la integridad de celular.	8,15e <sup>-05</sup>	-1,79
<i>ASK10</i>	YGR097W	Componente de la holoenzima ARN polimerasa II; fosforilado en respuesta al estrés oxidativo; tiene un papel en la destrucción de Ssn8p, que alivia la represión de genes de respuesta al estrés.	6,02e <sup>-05</sup>	-1,8
<i>CTS1</i>	YLR286C	Endoquitinasa, necesaria para la separación de las células después de la mitosis; su activación transcripcional durante la fase G1 del ciclo celular está mediada por el factor de transcripción Ace2p.	6,48e <sup>-05</sup>	-1,81
<i>YTM1</i>	YOR272W	Constituyente de las partículas 66S pre-ribosomales; forma un complejo con Nop7p y Erb1p que es necesario para la maduración de la subunidad ribosómica grande; tiene siete repeticiones WD C-terminales.	2,28e <sup>-05</sup>	-1,81
<i>NAN1</i>	YPL126W	Proteína snoRNP U3, componente de SSU del proceosoma que contiene snoARN U3; necesaria para la biogénesis de ARNr de 18S.	7,17e <sup>-05</sup>	-1,81
<i>DIE2</i>	YGR227W	alfa-1,2glucosiltransferasa del RE dependiente de dolícil-fosfoglucoosa ; funciona en la vía que sintetiza el precursor oligosacárido ligado a dolícilol para la N- glicosilación de proteínas, tiene un papel en la regulación de <i>ITR1</i> e <i>INO1</i> .	6,93e <sup>-05</sup>	-1,81
<i>MIF2</i>	YKL089W	Proteína cinetocoro con homología a la humana CENP-C, necesaria para la integridad estructural del huso durante el alargamiento del huso en la anafase, interactúa con las histonas H2A, H2B y H4; fosforilada por Ipl1p.	2,28e <sup>-05</sup>	-1,81
<i>RAD6</i>	YGL058W	Enzima de conjugación ubiquitina (E2); implicada en la reparación postreplicación (como un heterodímero con Rad18p), DSBR y el de punto de control (como un heterodímero con Bre1p), en la degradación mediada por ubiquitina según la regla del extremo N terminal de las proteínas (como un heterodímero con Ubr1p).	4,95e <sup>-05</sup>	-1,82
<i>KAP123</i>	YER110C	Carioferina beta, media la importación nuclear de las proteínas ribosomales antes del ensamblaje en los ribosomas y la importación de las histonas H3 y H4; se localiza en el poro nuclear, el núcleo y el citoplasma; muestra interacciones genéticas con <i>RAI1</i> .	2,92e <sup>-05</sup>	-1,82
<i>PAU24</i>	YBR301W	Manoproteína de la pared celular con similitud a Tir1p, Tir2p, Tir3p, y Tir4p; miembro de la familia multigénica seripauperin codificada principalmente en regiones subtelméricas; se expresa bajo condiciones anaeróbicas, completamente reprimido durante el crecimiento aeróbico.	1,31e <sup>-05</sup>	-1,83

**Tabla S6.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>FPR4</i>	YLR449W	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (PPLasa) (isomerasa de prolina) localizada en el núcleo; cataliza la isomerización de los residuos de prolina en las histonas H3 y H4, que afecta a la metilación de la lisina de las histonas.	4,02e <sup>-05</sup>	-1,83
<i>ECM16</i>	YMR128W	ARN helicasa esencial ATP-dependiente con un DEAH-box, específica para la snoRNP U3; distribución predominantemente nucleolar; necesaria para la síntesis de ARNr de 18S.	3,43e <sup>-05</sup>	-1,83
<i>GUF1</i>	YLR289W	GTPasa de la matriz mitocondrial que se asocia con los ribosomas mitocondriales; importante para la traducción en condiciones de stress de temperatura y de nutrientes; puede tener un papel en la fidelidad de la traducción; similar al factor de elongación bacteriano LEPA.	2,13e <sup>-05</sup>	-1,83
<i>MNN1</i>	YER001W	Alfa-1,3-manosiltransferasa, glicoproteína integral de membrana del complejo de Golgi, necesaria para la adición de alfa1,3-manosa a los oligosacáridos por unidos por enlaces N y O; una de las cinco proteínas de <i>S. cerevisiae</i> de la familia MNN1.	7,58e <sup>-05</sup>	-1,84
<i>KTR6</i>	YPL053C	Probable mannosilfosfato transferasa implicada en la síntesis de oligosacáridos centrales en la ruta de glicosilación de las proteínas; miembro de la familia KRE2/MNT1 manosiltransferasa.	6,68e <sup>-05</sup>	-1,84
<i>TFC4</i>	YGR047C	Una de las seis subunidades del factor de iniciación de la transcripción (TFIIIC) del complejo de la ARN polimerasa III; parte del dominio TauA de TFIIIC que se une al BoxA de promotores de ADN del ARNt y genes similares; tiene motivos TPR; homólogo de TFIIIC-102 humano.	5,73e <sup>-05</sup>	-1,84
<i>MCM5</i>	YLR274W	Componente del complejo hexamérico MCM, que es importante para cebar los orígenes de replicación del ADN en G1 y se convierte en una helicasa activa dependiente de ATP, que promueve la fusión del ADN y la elongación de la replicación, cuando es activada por Cdc7p-Dbf4p en la fase S.	2,22e <sup>-05</sup>	-1,85
<i>AST1</i>	YBL069W	Proteína periférica de membrana que interactúa con la ATPasa Pma1p de la membrana plasmática y tiene un papel en su orientación en la membrana plasmática, posiblemente por influencia de su incorporación en los <i>lipid rafts</i> .	5,16e <sup>-05</sup>	-1,85
<i>SER3</i>	YER081W	3-fosfoglicerato deshidrogenasa, cataliza el primer paso en la biosíntesis de serina y glicina; isozima de Ser33p.	5,14e <sup>-05</sup>	-1,85
<i>URA4</i>	YLR420W	Dihidrorotasa, cataliza la tercera etapa enzimática en la biosíntesis <i>de novo</i> de las pirimidinas, la conversión de carbamoil-L-aspartato en dihidrorotato.	7,89e <sup>-05</sup>	-1,85

**Tabla S6.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>CDC27</i>	YBL084C	Subunidad del complejo APC / C (Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome), que es una proteína ubiquitina-ligasa necesaria para la degradación de los inhibidores de la anafase, incluyendo ciclinas mitóticas, durante la transición metafase/anafase.	7,58e <sup>-05</sup>	-1,86
<i>OCA4</i>	YCR095C	Proteína citoplasmática necesaria para la replicación del virus del mosaico del <i>Brome</i> en <i>S. cerevisiae</i> , es un sistema modelo para estudiar la replicación de ARNs víricos de cadena positiva en sus huéspedes naturales.	7,70e <sup>-05</sup>	-1,86
<i>DBP6</i>	YNR038W	Proteína esencial implicada en la biogénesis de los ribosomas; supuesta ARN helicasa ATP-dependiente de la familia de las proteínas DEAD-box.	4,69e <sup>-05</sup>	-1,87
<i>DLT1</i>	YMR126C	Proteína de función desconocida; el mutante es sensible a 6-azauracilo (6AU) y ácido micofenólico (MPA).	3,42e <sup>-05</sup>	-1,87
<i>PRP3</i>	YDR473C	Factor de <i>splicing</i> componente del complejo U4/U6-U5 snRNP.	2,34e <sup>-05</sup>	-1,87
<i>TOM70</i>	YNL121C	Componente de TOM (translocasa de la membrana externa) complejo responsable del reconocimiento y las etapas iniciales de importación para todas las proteínas dirigidas a la mitocondria; actúa como un receptor para las proteínas precursoras entrantes.	7,28e <sup>-05</sup>	-1,88
<i>RRG9</i>	YNL213C	Proteína de función desconocida; el mutante nulo carece de ADN mitocondrial y no puede crecer en glicerol; la proteína no marcada se detecta en las mitocondrias altamente purificadas en estudios de localización subcelular a gran escala.	7,20e <sup>-05</sup>	-1,88
<i>FMO1</i>	YHR176W	Flavina monooxigenasa, localizada en la cara citoplásmica de la membrana del RE; cataliza la oxidación de tioles biológicos para mantener el potencial redox del RE para posibilitar el plegamiento correcto de proteínas unidas por disulfuros.	7,78e <sup>-05</sup>	-1,89
<i>SRL3</i>	YKR091W	Proteína citoplasmática que, cuando se sobreexpresa, inhibe la letalidad de una mutación nula <i>rad53</i> ; sustrato potencial de Cdc28p.	3,48e <sup>-05</sup>	-1,89
<i>CDC31</i>	YOR257W	Componente de unión a calcio del puente medio del polo del huso (SPB); necesaria para la duplicación de SPB en la mitosis y meiosis II; homólogo a la centrina de mamíferos ; une proteínas multi-ubiquitinadas y está implicada en la degradación de proteínas proteasomales.	7,36e <sup>-05</sup>	-1,89
<i>MXR1</i>	YER042W	Metionina-S-sulfóxido reductasa; participa en la respuesta al estrés oxidativo; protege las agrupaciones hierro-azufre de la inactivación oxidativa junto con <i>MXR2</i> ; interviene en la regulación de la longevidad de la célula.	4,67e <sup>-05</sup>	-1,9
---	YIL067C	---	7,11e <sup>-05</sup>	-1,9

**Tabla S6.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
---	YLR064W	---	1,85e <sup>-05</sup>	-1,9
RSC1	YGR056W	Componente del complejo RSC de remodelación de la cromatin; necesaria para la expresión de genes medios-tardíos específicos de esporulación; contiene dos bromodominios esenciales, uno BAH (bromo-adjacent homology) y otro AT (AT hook).	1,80e <sup>-05</sup>	-1,9
MET22	YOL064C	Bisfosfato-3'-nucleotidasa, implicada en la tolerancia a la sal y la biogénesis de la metionina; desfosforila 3'-fosfoadenosina-5'-fosfato y 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato, intermediarios de la vía de asimilación de sulfato.	2,66e <sup>-05</sup>	-1,9
TEF4	YKL081W	Factor de elongación de la traducción EF-1 gamma.	4,65e <sup>-05</sup>	-1,9
CCT8	YJL008C	Subunidad del complejo chaperonina <i>Cct ring</i> citosólico; relacionada con Tcp1p; necesaria para el ensamblaje de actina y tubulina <i>in vivo</i> .	5,29e <sup>-05</sup>	-1,91
MUP3	YHL036W	Permeasa de metionina de baja afinidad, similar a Mup1p.	3,10e <sup>-05</sup>	-1,91
SDP1	YIL113W	MAP quinasa y fosfatasa inducible por estrés; regula negativamente la quinasa MAP Sit2p por desfosforilación directa; localización difusa en condiciones normales que varía a puntiforme después de choque térmico.	4,28e <sup>-05</sup>	-1,91
MCM21	YDR318W	Proteína implicada en el mantenimiento de minicromosomas; componente del complejo COMA (Ctf19p, Okp1p, Mcm21p, Ame1p) que hace de puente entre las subunidades del cinetocoro que están en contacto con el ADN centromérico y las subunidades se unen a los microtúbulos.	8,64e <sup>-06</sup>	-1,92
---	YDL157C	---	4,14e <sup>-05</sup>	-1,92
CPR7	YJR032W	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (ciclofilina); cataliza la isomerización cis-trans de los enlaces peptídicos N-terminal a los residuos de prolina; se une a Hsp82p y contribuye a la actividad chaperona.	5,13e <sup>-05</sup>	-1,92
RIB4	YOL143C	Lumazcne sintasa (6,7-dimetil-8-ribityllumazine sintasa, también conocida como sintasa DMRL); cataliza la síntesis del precursor inmediato de la riboflavina.	5,12e <sup>-05</sup>	-1,92
---	YPL071C	---	5,49e <sup>-05</sup>	-1,92
---	YLR036C	---	8,54e <sup>-06</sup>	-1,93
---	YNL247W	---	4,26e <sup>-05</sup>	-1,94
PRP24	YMR268C	Factor de <i>splicing</i> que reasocia snRNPs U4 y U6 durante el reciclado del espliceosoma.	1,20e <sup>-05</sup>	-1,94



**Tabla S6.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>RRP3</i>	YHR065C	Proteína implicada en el procesamiento del ARNr; necesaria para la maduración del transcrito primario de pre-ARNr 35S y para la escisión que conduce a la maduración del ARNr 18S; homóloga a eIF-4A que es una ATPasa dependiente de ARN con caja DEAD y actividad helicasa.	6,65e <sup>-05</sup>	-1,95
<i>SHG1</i>	YBR258C	Subunidad del complejo COMPASS (Set1C), que metila la histona H3 en la lisina 4 y se necesita en el silenciamiento transcripcional cerca de los telómeros.	6,94e <sup>-06</sup>	-1,95
<i>MRPL40</i>	YPL173W	Proteína mitocondrial ribosomal de la subunidad grande.	3,89e <sup>-05</sup>	-1,95
<i>NOP1</i>	YDL014W	Proteína nucleolar, forma un complejo con Noc4p que media la maduración y la exportación nuclear de las subunidades ribosomales 40S; también presente en la subunidad pequeña del complejo del procesoma, que se necesita para el procesamiento de pre-ARNr 18S.	3,11e <sup>-05</sup>	-1,96
<i>PEF1</i>	YGR058W	Proteína con cinco manos EF necesaria para el crecimiento de las gemas polares y abscisión de la pared celular; se une a calcio y zinc, con una afinidad diferente, se localiza en el sitio de gema en G1, y en el cuello de la gema en G2.	3,85e <sup>-05</sup>	-1,97
<i>RHB1</i>	YCR027C	Supuesta GTPasa relacionada con Rheb involucrada en la regulación de la resistencia a canavanina y la captación de arginina, miembro de la superfamilia Ras de proteínas G.	2,48e <sup>-05</sup>	-1,97
<i>MTF1</i>	YMR228W	Factor de especificidad de la ARN polimerasa mitocondrial con una estructura similar a la methyltransferases dependiente de S-adenosilmetionina y similitud funcional a factores bacterianos sigma, interactúa con el núcleo de la polimerasa mitocondrial Rpo41p.	3,53e <sup>-06</sup>	-1,98
---	YLR143W	---	5,06e <sup>-05</sup>	-1,98
<i>MEX67</i>	YPL169C	Proteína de unión de ARN Poly(A) involucrada en la exportación nuclear de ARNm, componente del poro nuclear; ortólogo humano de <i>TAP</i> .	3,72e <sup>-05</sup>	-1,99
<i>FCF2</i>	YLR051C	Proteína esencial nucleolar implicada en las etapas tempranas del procesamiento del ARNr 35S; interactúa con Faf1p; miembro de un conjunto de genes transcriptionalmente co-regulados llamados regulón RRB.	3,21e <sup>-05</sup>	-1,99
---	YNR064C	---	2,08e <sup>-05</sup>	-1,99
<i>FAL1</i>	YDR021W	Proteína nucleolar necesaria para la maduración del ARNr 18S, miembro de la subfamilia eIF4A de ARN helicasas ATP-dependientes con DEAD-box.	2,81e <sup>-05</sup>	-1,99

**Tabla S6.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>DSS1</i>	YMR287C	3'-5' exoribonucleasa, componente del degradosoma mitocondrial junto con la ARN helicasa Suv3p dependiente de ATP; el degradosome se asocia con el ribosoma y media el recambio de los ARNs aberrantes o sin procesar.	1,17e <sup>-05</sup>	-2
<i>ATC1</i>	YDR184C	Proteína nuclear, posiblemente implicada en la regulación de respuestas de estrés a cationes y/o en el establecimiento de gemación bipolar.	5,72e <sup>-05</sup>	-2
<i>TPK3</i>	YKL166C	Subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de AMPc; promueve el crecimiento vegetativo en respuesta a los nutrientes a través de la vía de señalización Ras-cAMP; parcialmente redundante con Tpk1p y Tpk2p; localizada en los cuerpos-P durante la fase estacionaria.	1,92e <sup>-05</sup>	-2
<i>YPT53</i>	YNL093W	GTPasa de la familia Rab, similar a Ypt51p y Ypt52p y a rab5 de mamífero; necesario para el destino de las proteínas a la vacuola y la endocitosis.	2,42e <sup>-06</sup>	-2,01
<i>CSM1</i>	YCR086W	Proteína nucleolar que forma un complejo con Lrs4p y luego Mam1p en los cinetocoros durante la meiosis I para mediar la segregación homóloga exacta; necesaria para el reclutamiento de condensina al sitio de la frontera de la horquilla de replicación y segregación de las repeticiones de ADNr.	4,47e <sup>-05</sup>	-2,01
<i>DLD3</i>	YEL071W	D-lactato deshidrogenasa, parte del regulón retrógrado que consiste en genes cuya expresión es estimulada por el daño a la mitocondria y se reduce en células cultivadas con glutamato como única fuente de nitrógeno; se localiza en el citoplasma.	2,30e <sup>-05</sup>	-2,01
<i>BIO2</i>	YGR286C	Biotin sintasa, cataliza la conversión de ditiotiotina a biotina, que es el último paso de la ruta de biosíntesis de biotina; complementa el mutante bioB en <i>E. coli</i> .	8,07e <sup>-05</sup>	-2,01
<i>PRP39</i>	YML046W	Proteína snRNP U1 involucrada en el <i>splicing</i> , contiene múltiples repeticiones del tetraatricoceptido.	5,25e <sup>-06</sup>	-2,01
<i>RSC8</i>	YFR037C	Componente del complejo de remodelación de la cromatina RSC, esencial para la viabilidad y el crecimiento mitótico; homólogo de la subunidad Swi3p SWI/SNF, pero a diferencia de Swi3p, no activa la transcripción de reporteros.	3,45e <sup>-05</sup>	-2,02
---	YLR455W	---	4,92e <sup>-05</sup>	-2,02
<i>CCT3</i>	YJL014W	Subunidad la chaperonina citosólico Cct <i>ring complex</i> ; relacionada con Tcp1p; necesaria para el ensamblaje de actina y tubulinas <i>in vivo</i> .	3,36e <sup>-05</sup>	-2,04

**Tabla S6.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>SNM1</i>	YDR478W	Subunidad de la ARNasa MRP, que escinde pre-ARNr y tiene un papel en la degradación mRNAs específicos de células hijas regulado por ciclo; se une a la subunidad NME1 ARN de la ARNasa MRP.	2,42e <sup>-05</sup>	-2,05
---	YDL063C	---	7,81e <sup>-06</sup>	-2,06
<i>RVB1</i>	YDR190C	Proteína esencial que interviene en la regulación de la transcripción; componente de los complejos de remodelación de la cromatina; necesaria para el montaje y la función del complejo INO80; también se referenciada como pontina; miembro de la familia de proteínas de tipo RuvB.	3,28e <sup>-05</sup>	-2,06
<i>LIN1</i>	YHR156C	Componente no esencial de snRNP U5; proteína nuclear; interacciona físicamente con Irr1p del complejo cohesina; puede unir las proteínas que participan en la segregación cromosómica, el <i>splicing</i> del ARNm y la replicación del ADN.	4,09e <sup>-05</sup>	-2,07
<i>SPT7</i>	YBR081C	Subunidad de complejo transcripcional regulador SAGA, que participa en el ensamblaje correcto del complejo, también está presente como una forma C-terminal truncada en el complejo regulador de la transcripción SLIK / SALSA.	3,68e <sup>-05</sup>	-2,07
<i>HMT1</i>	YBR034C	Mono y asimétrica arginina dimetilante metiltransferasa nuclear dependiente de SAM que modifica hnRNPs, incluyendo Npl3p y Hrp1p afectando a su actividad y la exportación nuclear; también metila la proteína ribosomal Rps2p.	4,38e <sup>-05</sup>	-2,08
<i>YEH1</i>	YLL012W	Ester estearílico hidrolasa, uno de los tres productos génicos (Yeh1p, Yeh2p, Tgl1p) responsable de la actividad de la hidrolasa de éster estearílico y que participa en la homeostasis de esteroides; localizada en partículas lipídicas de membrana.	2,81e <sup>-05</sup>	-2,08
<i>BUB1</i>	YGR188C	Proteín-quinasa que forma un complejo con Mad1p y Bub3p que es crucial en el mecanismo de punto de control necesario para prevenir la progresión del ciclo celular en la anafase en la presencia de daño del huso; se asocia con el ADN del centrómero través Skp1p.	8,79e <sup>-06</sup>	-2,08
<i>HSH155</i>	YMR288W	Factor de <i>splicing</i> asociado a snRNP U2 que forma asociaciones extensas con el sitio-3' de ramificación del sitio-3' de <i>splicing</i> de la región del exón tras la formación del prespliceosoma; similitud con el factor de <i>splicing</i> SAP155 de mamíferos asociado a snRNP U2.	3,74e <sup>-05</sup>	-2,08

**Tabla S6.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
ACO2	YJL200C	Supuesta isozima aconitasa mitocondrial; similitud con Aco1p, una aconitasa necesaria para el ciclo TCA; expresión inducida durante el crecimiento en glucosa, por carencia de aminoácidos a través de Gcn4p, y reprimida en etanol.	1,82e <sup>-05</sup>	-2,09
---	YOR385W	---	4,80e <sup>-05</sup>	-2,1
FOL1	YNL256W	Enzima multifuncional de la vía de biosíntesis del ácido fólico, tiene actividades dihidropteroato sintetasa, dihidro-6-hidroximetilpterin pirofosfoquinasa y dihidroneopterin aldolasa.	2,60e <sup>-05</sup>	-2,11
KAR3	YPR141C	Motor del Microtúbulo dirigido al extremo menos que funciona en la mitosis y la meiosis, se localiza en el cuerpo del polo del huso y la localización depende de Cik1p funcional; necesario para la fusión nuclear durante el apareamiento; sustrato potencial de Cdc28p.	2,03e <sup>-05</sup>	-2,11
FUN12	YAL035W	GTPasa, necesaria para la iniciación general de la traducción mediante la promoción de la unión de Met-tRNA cargado con Met a ribosomas y la unión de las subunidades ribosomales; homólogo a IF2 de bacterias.	3,70e <sup>-05</sup>	-2,12
---	YHR127W	---	3,35e <sup>-06</sup>	-2,12
PAP2	YOL115W	Polimerasa poli(A) no canónica, participa en la degradación del ARN nuclear como un componente del complejo TRAMP; cataliza la poliadenilación del ARNt hipomodificado, y precursores snoARN y ARNr; funciones superpuestas pero no redundantes con Trf5p.	2,24e <sup>-05</sup>	-2,12
---	YML007C-A	---	5,25e <sup>-05</sup>	-2,12
KRS1	YDR037W	Lisil-ARNt sintetasa.	2,88e <sup>-05</sup>	-2,12
MVD1	YNR043W	Mevalonato pirofosfato descarboxilasa, una enzima esencial que interviene en la biosíntesis de isoprenoides y esteroides, incluyendo ergosterol; actúa como un homodímero.	4,59e <sup>-05</sup>	-2,13
UTP21	YLR409C	Subunidad del preribosoma 90S que contiene U3 y de SSU-proteosoma involucrados en la producción de ARNr 18S y el ensamblaje de la subunidad ribosómica pequeña; defectos sintético con ST11 Hsp90 cochaperone; su homóloga humana está relacionado con el glaucoma.	3,26e <sup>-05</sup>	-2,13
CIC1	YHR052W	Proteína esencial que interactúa con los componentes del proteasoma y tiene un posible papel en la especificidad de sustrato del proteasoma; también copurifica con las partículas pre-ribosomales 66S.	2,69e <sup>-06</sup>	-2,13

**Tabla S6.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>FIR1</i>	YER032W	Proteína implicada en el procesamiento 3' del ARNm; interactúa con Ref2p; sustrato potencial de Cdc28p.	4,63e <sup>-06</sup>	-2,14
<i>GPI8</i>	YDR331W	Subunidad glicoproteica del complejo glicosilfosfatidilinositol transamidasa de la membrana del RE que añade glicosilfosfatidilinositol (GPI) de anclaje a las proteínas recién sintetizadas; la proteína humana PIG-K es una homóloga funcional.	3,65e <sup>-05</sup>	-2,14
<i>ENP2</i>	YGR145W	Proteína nucleolar esencial, necesaria para la biogénesis de la subunidad ribosómica pequeña; contiene repeticiones WD; interactúa con Mpp10p y Bfr2p, y tiene homología con Spb1p.	8,40e <sup>-06</sup>	-2,14
<i>PHO5</i>	YBR093C	Fosfatasa ácida reprimible (1 de 3) que también media la hidrólisis de fosfato extracelular de derivados de nucleótidos; glicoproteína de superficie celular derivada de la vía secretora; inducida por la carencia de fosfato y coordinadamente regulada por <i>PHO4</i> y <i>PHO2</i> .	1,44e <sup>-05</sup>	-2,16
<i>SER33</i>	YIL074C	3-fosfoglicerato deshidrogenasa, cataliza el primer paso en la biosíntesis de serina y glicina; isozima de Ser3p.	1,23e <sup>-05</sup>	-2,16
<i>MET32</i>	YDR253C	Proteína de unión ADN con dedo de zinc que participa en la regulación transcripcional de los genes de biosíntesis de metionina, similar a Met31p.	3,96e <sup>-05</sup>	-2,16
<i>DUG2</i>	YBR281C	Probable di- y tri-peptidasa; forma un complejo con Dug1p y Dug3p para degradar el glutatión (GSH) y otros péptidos que contienen un enlace gamma-glu-X en una vía alternativa a GSH degradación por gamma-glutamil transpeptidasa (Ecm38p).	1,46e <sup>-05</sup>	-2,16
<i>DIP2</i>	YLR129W	Proteína nucleolar, específicamente asociada con la snoRNA U3, parte del complejo de ribonucleoproteínas conocido como SSU-procesoma; necesaria para la biogénesis de ARNr 18S, parte del complejo de procesamiento activo pre-ARNr.	1,44e <sup>-05</sup>	-2,18
<i>RRP14</i>	YKL082C	Proteína esencial, constituyente de las partículas ribosomales 66S; interactúa con las proteínas implicadas en la biogénesis ribosomal y la polaridad celular, miembro de la familia SURF-6.	1,59e <sup>-05</sup>	-2,18
<i>ATX2</i>	YOR079C	Proteína de membrana del Golgi implicada en la homeostasis de manganeso; la sobreproducción suprime la mutación nula de <i>sod1</i> (cobre, zinc superóxido dismutasa).	1,06e <sup>-05</sup>	-2,18
<i>CPS1</i>	YJL172W	Carboxipeptidasa vacuolar yscS, su expresión se induce en condiciones bajas de nitrógeno.	3,91e <sup>-05</sup>	-2,19
<i>RTS3</i>	YGR161C	Supuesto componente del complejo de la proteín-fosfatasa de tipo 2A.	3,16e <sup>-05</sup>	-2,19

**Tabla S6.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>NOP14</i>	YDL148C	Proteína nucleolar, forma un complejo con Noc4p que media la maduración y la exportación nuclear de las subunidades ribosomales 40S; también presente en SSU procesoma, que se necesita para el procesamiento de pre-ARNr 18S.	4,06e <sup>-05</sup>	-2,21
<i>BUD27</i>	YFL023W	Proteína implicada en la selección del sitio de formación de las gemas, la señalización por nutrientes, y la expresión de genes controlados por la quinasa TOR; los mutantes diploides muestran un patrón aleatorio de gemación en lugar del patrón de tipo salvaje bipolar; desempeña un papel en la regulación de la transposición Ty1.	4,65e <sup>-05</sup>	-2,21
<i>STE12</i>	YHR084W	Factor de transcripción que se activa por una cascada de señalización MAP quinasa, activa los genes implicados en el apareamiento o las vías de crecimiento pseudohifal/invasivo; coopera con el factor de transcripción Tec1p para regular los genes específicos para el crecimiento invasivo.	7,53e <sup>-06</sup>	-2,21
<i>RTT107</i>	YHR154W	Proteína implicada en la reparación dependiente de Mms22 del ADN durante la fase S; el daño del ADN induce la fosforilación por Mec1p en uno o más motivos SQ/TQ; interactúa con Mms22p y Slx4p; tiene cuatro dominios BRCT; tiene un papel en la regulación de la transposición de Ty1.	1,81e <sup>-05</sup>	-2,22
<i>TSR2</i>	YLR435W	Proteína con un papel potencial en el procesamiento del pre-ARNr.	1,27e <sup>-05</sup>	-2,22
<i>GPI18</i>	YBR004C	Ortólogo humano funcional de PIG-V, que es una manosiltransferasa que transfiere la segunda manosa en la biosíntesis de glicosilfosfatidilinositol; la proteínas no etiquetada se localiza en las mitocondrias.	4,23e <sup>-05</sup>	-2,22
<i>GAR1</i>	YHR089C	Proteína componente del complejo H/ACA snoRNP pseudouridilasa, implicado en la modificación y división de pre-ARNr 18S	4,79e <sup>-05</sup>	-2,22
<i>CMK2</i>	YOL016C	Proteín-quinasa dependiente de calmodulina; puede jugar un papel en la respuesta al estrés; se ha demostrado <i>in vitro</i> la existencia de muchos sustratos de fosforilación dependientes de Ca <sup>++</sup> /calmodulina; secuencia de aminoácidos similar a Cmk1p y a la quinasa II CaM de mamíferos.	1,52e <sup>-05</sup>	-2,22
<i>LYS1</i>	YIR034C	Sacaropina deshidrogenasa (NAD <sup>+</sup> , L-lisina-formación), cataliza la conversión de sacaropina a L-lisina, que es el paso final en la ruta de biosíntesis de lisina.	2,28e <sup>-05</sup>	-2,23
<i>RPI1</i>	YIL119C	Supuesto regulador transcripcional; su sobreexpresión suprime la sensibilidad al choque térmico de la cepa silvestre que sobreexpresa RAS2 y también suprime el defecto de lisis celular de la mutación mpk1.	1,62e <sup>-05</sup>	-2,23

**Tabla S6.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>NOP8</i>	YOL144W	Proteína nucleolar necesaria para la biogénesis de la subunidad ribosómica 60S.	4,08e <sup>-06</sup>	-2,23
<i>PUT1</i>	YLR142W	Prolina oxidasa, proteína mitocondrial codificada en el núcleo implicada en la utilización de prolina como única fuente de nitrógeno; la transcripción de <i>PUT1</i> es inducida por Put3p en presencia de prolina y la ausencia de otra fuente de nitrógeno preferida.	4,08e <sup>-05</sup>	-2,24
<i>MAK5</i>	YBR142W	Proteína esencial nucleolar, supuesta ARN helicasa DEAD-box necesaria para el mantenimiento del virus ARNds M1; implicada en la biogénesis de las subunidades ribosomales mayores (60S).	2,98e <sup>-05</sup>	-2,24
<i>FCF1</i>	YDR339C	Supuesta nucleasa con dominios PINc necesaria para los cortes iniciales del pre-ARNr 35S y maduración del ARNr 18S, componente de la SSU (subunidad pequeña) del procesoma involucrado en la biogénesis de la subunidad ribosomal 40S; copurifica con Faf1p.	6,14e <sup>-06</sup>	-2,24
<i>KRI1</i>	YNL308C	Proteína nucleolar esencial necesaria para la biogénesis de ribosomas 40S; interactúa física y funcionalmente con Krr1p.	8,91e <sup>-06</sup>	-2,25
---	YBR016W	---	2,62e <sup>-05</sup>	-2,25
<i>TRS20</i>	YBR254C	Una de 10 subunidades de la partícula de transporte de proteínas (TRAPP) del complejo Golgi cis que media el acoplamiento y fusión de vesículas; mutaciones en el homólogo humano causan el trastorno displasia espondiloepifisaria tarda (SEDL).	8,37e <sup>-06</sup>	-2,26
<i>PRI1</i>	YIR008C	Subunidad de la ADN primasa, necesaria para la síntesis de ADN y reparación de roturas de doble hebra.	2,43e <sup>-06</sup>	-2,26
<i>CIT3</i>	YPR001W	Actividades citrato y metilcitrato sintasa mitocondrial; cataliza la condensación de la acetil-CoA y oxalacetato para formar citrato, y de propionil-CoA y oxalacetato para formar 2-metilcitrato.	7,08e <sup>-05</sup>	-2,26
<i>NOP58</i>	YOR310C	Proteína implicada en el procesamiento del pre-rRNA, síntesis del ARNr 18S y la síntesis de ARNsno; componente del complejo de la subunidad pequeña del (SSU) procesome, que se requiere para el procesamiento de pre- rRNA de 18S.	2,50e <sup>-05</sup>	-2,28
<i>RPC40</i>	YPR110C	Subunidad AC40 de la ARN polimerasa, común a la ARN polimerasa I y III.	9,27e <sup>-06</sup>	-2,28
<i>CYS4</i>	YGR155W	Cistationina beta-sintasa, cataliza la síntesis de cistationina a partir de serina homocisteína, el primer paso necesario en la biosíntesis de cisteína; responsable de la generación de sulfuro de hidrógeno; mutaciones en el ortólogo de humanos causa homocistinuria.	2,95e <sup>-05</sup>	-2,28

**Tabla S6.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>HEM13</i>	YDR044W	Coproporfirinógeno III oxidasa, enzima que requiere oxígeno para catalizar el sexto paso en la vía de biosíntesis de hemo; la transcripción está reprimida por el oxígeno y el grupo hemo (a través de Rox1p y Hap1p).	2,70e <sup>-05</sup>	-2,29
<i>NIP7</i>	YPL211W	Proteína nucleolar necesaria para la biogénesis de la subunidad ribosomal 60S; constituyente las partículas pre-ribosomales 66S; interacciona físicamente con Nop8p y la subunidad Rrp43p del exosoma.	3,49e <sup>-06</sup>	-2,29
<i>SUL2</i>	YLR092W	Permeasa de alta afinidad por sulfato; la captación de sulfato está mediada por los transportadores específicos de sulfato Sul1p y Sul2p, que controlan la concentración de los intermediarios de sulfato endógenos acivados.	1,04e <sup>-05</sup>	-2,29
<i>UTP18</i>	YJL069C	Posible proteína snoRNP U3 implicada en la maduración del pre-ARNr 18S.	7,74e <sup>-06</sup>	-2,3
<i>RRT14</i>	YIL127C	Supuesta proteína de función desconocida; identificada en un <i>screen</i> de mutantes con disminución de los niveles de transcripción de ADNr; la proteína de fusión a GFP se localiza en el nucleolo; se prevé que participe en la biogénesis de ribosomas.	1,99e <sup>-06</sup>	-2,3
<i>CDC123</i>	YLR215C	Proteína implicada en el control nutricional del ciclo celular; regula la abundancia del factor de iniciación de la traducción eIF2; ortólogo de la proteína humana D123.	1,25e <sup>-05</sup>	-2,31
<i>TAF1</i>	YGR274C	Subunidad de TFIID (145 kDa), implicado en el inicio de la transcripción por la ARN polimerasa II; posee actividad histona acetiltransferasa <i>in vitro</i> pero su papel <i>in vivo</i> parece ser menor; implicada en la unión al promotor y la progresión de G1/S.	2,81e <sup>-05</sup>	-2,33
<i>ELM1</i>	YKL048C	Proteín-quinasa serina/treonina que regula la morfogénesis celular, el comportamiento de la septina, y la citocinesis; necesaria para la regulación de otras quinasas; forma parte del anillo en el cuello de la gema.	1,23e <sup>-05</sup>	-2,34
<i>GAC1</i>	YOR178C	Subunidad reguladora para la proteín-fosfatasa Glc7p tipo-1 (PP1); dirige a Glc7p a su unión con la glucógeno sintasa Gsy2p; se une al factor transcrpcional de choque térmico Hsf1p; necesaria para la inducción de algunos genes regulados por <i>HSF</i> bajo choque térmico.	3,41e <sup>-05</sup>	-2,34
<i>PHO3</i>	YBR092C	Fosfatasa ácida similar a Pho5p constitutivamente expresada; transportada a la superficie de la célula por vesículas de transporte; hidroliza los fosfatos de tiamina en el espacio periplásmico, aumentando la captación celular de tiamina; expresión reprimida por tiamina.	2,01e <sup>-05</sup>	-2,36



**Tabla S6.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>HAM1</i>	YJR069C	Proteína conservada con actividad desoxirribonucleósido trifosfato pirofosfohidrolasa; media la exclusión de las purinas no canónicas de los <i>pools</i> de desoxirribonucleósido trifosfato; su mutación causa sensibilidad al análogo de basa 6-N-hidroxilaminopurina.	$6,67e^{-05}$	-2,36
<i>MOD5</i>	YOR274W	Delta 2-isopentenil pirofosfato-ARNt isopentenil transferasa; necesaria para la biosíntesis de la base modificada isopenteniladenosina en los ARNt mitocondriales y citoplasmáticos; el gen es nuclear y codifica dos formas isoenzimáticas.	$7,72e^{-05}$	-2,37
<i>APS3</i>	YJL024C	Subunidad pequeña del adaptador asociado a clathrin del complejo AP-3, que está implicado en la clasificación de proteínas vacuolares; relacionada con la subunidad sigma del complejo AP-3 clathrin de mamíferos; supresor de la pérdida de la función de la caseín-quinasa 1.	$7,29e^{-05}$	-2,41
<i>UTP13</i>	YLR222C	Proteína nucleolar, componente de la subunidad pequeña (SSU) del procesoma que contiene el snoARN U3 que está implicado en el procesamiento del pre-ARNr de 18S.	$4,62e^{-06}$	-2,42
<i>STR3</i>	YGL184C	Cistationina beta-liasa, convierte la cistationina en homocisteína.	$3,90e^{-05}$	-2,43
---	YLR363W-A	---	$2,54e^{-05}$	-2,43
<i>RCR1</i>	YBR005W	Proteína de la membrana del RE involucrada en la deposición de quitina en la pared celular; puede funcionar en la vía de tráfico endosoma-vacuola, ayudando a determinar si las proteínas de la membrana plasmática se degradan o se dirigen a la membrana plasmática.	$2,94e^{-06}$	-2,44
---	YMR122W-A	---	$5,63e^{-05}$	-2,44
<i>THP2</i>	YHR167W	Subunidad del complejo THO, que conecta la elongación de la transcripción y la recombinación mitótica, y del complejo TREX, que es reclutado para activar genes y acopla la transcripción a la exportación del ARNm; implicada en el mantenimiento del telómero.	$1,85e^{-05}$	-2,45
<i>NOP16</i>	YER002W	Constituyente de las partículas pre-ribosomales 66S, que participan en la biogénesis de la subunidad ribosomal 60S.	$1,37e^{-05}$	-2,47
<i>SAH1</i>	YER043C	S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa, cataboliza S-adenosil-L-homocisteína, que se forma después de la donación del grupo metilo activado de S-adenosil-L-metionina (AdoMet) a un aceptor.	$5,38e^{-05}$	-2,48

**Tabla S6.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>TRL1</i>	YJL087C	ARNt ligasa, necesaria para el <i>splicing</i> del ARNt; compuesta de tres dominios esenciales que contienen las actividades fosfodiesterasa, polinucleótido quinasa, y actividad ligasa necesaria para la ligación; localizada en la membrana interna de la envoltura nuclear.	1,43e <sup>-06</sup>	-2,49
<i>BNA3</i>	YJL060W	Kinurenina aminotransferasa, cataliza la formación de ácido kinurénico a partir de kinurenina; sustrato potencial de Cdc28p.	1,40e <sup>-05</sup>	-2,5
<i>HRP1</i>	YOL123W	Subunidad del factor de escisión I (CFI), un complejo de cinco subunidades necesario para la escisión y la poliadenilación de los extremos 3' del pre-ARNm; proteína de unión a ARN heteronuclear que contiene dominios RRM y miembro de la familia hnRNPA/B que se une a las secuencias señal poli (A).	9,86e <sup>-06</sup>	-2,52
<i>MET1</i>	YKR069W	S-adenosil-L-metionina uroporfirinógeno III transmetilasa, implicada en la biosíntesis de siroheme, un grupo prostético utilizado por la sulfito reductasa; necesario para la asimilación de sulfato y la biosíntesis de metionina.	2,06e <sup>-05</sup>	-2,54
<i>ADI1</i>	YMR009W	Acireductona dioxigenasa involucrada en la vía de recuperación de la metionina; ortólogo humano de <i>MTCBP-1</i> ; transcrito con YMR010W y regulado post-transcripcionalmente por escisión por la ARNasa III (Rnt1p); el ARNm <i>ADI1</i> es inducido en condiciones de choque térmico.	8,04e <sup>-06</sup>	-2,54
<i>MET5</i>	YJR137C	Subunidad beta de la sulfito reductasa, implicada en la biosíntesis de aminoácidos; su transcripción se reprime por metionina.	5,47e <sup>-05</sup>	-2,54
<i>ARX1</i>	YDR101C	Shuttling factor pre-60S factor; implicado en la biogénesis de la subunidad ribosomal grande; interactúa directamente con Alb1; responsable de los defectos de reciclaje de Tif6 en ausencia de Rei1; asociado con el complejo ribosomal de exportación.	6,03e <sup>-06</sup>	-2,54
<i>LUC7</i>	YDL087C	Proteína esencial asociada con el complejo snRNP U1; factor de <i>splicing</i> implicado en el reconocimiento del sitio de <i>splicing</i> 5'; contiene dos motivos dedo de zinc; el dedo de zinc N-terminal de se une al pre-ARNm.	4,38e <sup>-05</sup>	-2,55
<i>SPS100</i>	YHR139C	Proteína necesaria para la maduración de la pared de las esporas; expresada durante la esporulación; puede ser un componente de la pared de la espora; expresión inducida también en células tratadas con la micotoxina patulina.	5,57e <sup>-06</sup>	-2,57
<i>RRN11</i>	YML043C	Componente del factor del núcleo del complejo del factor transcripcional de ADN (CF); CF se necesita para la transcripción de los genes ARNr 35S por la ARN polimerasa I y se compone de Rrn6p, Rrn7p, y Rrn11p.	1,37e <sup>-05</sup>	-2,57

**Tabla S6.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>JJJ3</i>	YJR097W	Proteína de función desconocida, contiene un dominio J, que es una región con homología con la proteína DnaJ de <i>E. coli</i> .	2,91e <sup>-06</sup>	-2,58
<i>TRM7</i>	YBR061C	2'-O-ribosa metiltransferasa, metila el 2'-O-ribosa de los nucleótidos en las posiciones 32 y 34 del bucle anticodón del ARNt.	6,78e <sup>-06</sup>	-2,58
<i>RRP8</i>	YDR083W	Proteína nucleolar implicada en el procesamiento del ARNr, escisión del pre-ARNr en el sitio A2; también participa en el mantenimiento del telómero; la mutación es sintéticamente letal con una mutación <i>gar1</i> .	1,34e <sup>-05</sup>	-2,59
<i>EBP2</i>	YKL172W	Proteína esencial necesaria para la maduración de ARNr 25S y el ensamblaje de la subunidad ribosomal grande 60S; se localiza en el nucleolo; constituyente de las partículas ribosomales 66S.	2,76e <sup>-06</sup>	-2,6
---	YBR141C	---	3,62e <sup>-05</sup>	-2,6
<i>SMP1</i>	YBR182C	Supuesto factor de transcripción implicado en la regulación de la respuesta al estrés osmótico; miembro de la familia MADS-box de factores de transcripción.	2,58e <sup>-05</sup>	-2,6
<i>CRP1</i>	YHR146W	Proteína que se une a estructuras de ADN cruciforme.	5,55e <sup>-06</sup>	-2,62
<i>GAT2</i>	YMR136W	Proteína que contiene motivos dedo de zinc de la familia GATA, similar a Gln3p y Dal80p; su expresión está reprimida por leucina.	1,57e <sup>-05</sup>	-2,63
<i>IMP3</i>	YHR148W	Componente de SSU procesome, que se requiere para el procesamiento del pre-ARNr de 18S; proteína esencial que interactúa con Mpp10p y media las interacciones de Imp4p y Mpp10p con snoARN U3.	4,76e <sup>-05</sup>	-2,64
<i>TOS1</i>	YBR162C	Proteína covalentemente enlazada a la pared celular de función desconocida; el gen fue identificado como un gen del ciclo celular regulado por SBF; su delección causa resistencia al tratamiento con beta-1,3-glucanasa; tiene similitud de secuencia con YJL171C.	7,30e <sup>-06</sup>	-2,64
<i>GPM3</i>	YOL056W	Homóloga de Gpm1p fosfoglicerato mutasa, que convierte el 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato en la glucólisis; puede ser un derivado no funcional de un evento de duplicación de genes.	6,37e <sup>-06</sup>	-2,65
<i>NMA111</i>	YNL123W	Serin proteasa y chaperona molecular general; implicada en la respuesta al estrés por calor y promoción de la apoptosis puede contribuir a la homeostasis de los lípidos; secuencia similar a la de la familia Omi/HtrA2 de serin proteasas de mamíferos.	9,79e <sup>-06</sup>	-2,65

**Tabla S6.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>GIC2</i>	YDR309C	Efectores de Cdc42p redundantes a la GTPasa rho; homólogo de Gic1p; implicado en la iniciación de la gemación y la polarización celular; interactúa con Cdc42p a través del dominio Cdc42/Rac (CRIB) y con PI (4,5) P2 a través de una región polibásica.	3,00e <sup>-05</sup>	-2,66
<i>SPB1</i>	YCL054W	Metiltransferasa dependiente de AdoMet implicada en el procesamiento del ARNr y la maduración de la subunidad 60S ribosomal; metila G2922 el ARNt en el sitio de acoplamiento de la subunidad grande del ARNr y en ausencia de snR52 metila U2921; supresor de los mutantes del gen <i>PAB1</i> .	3,13e <sup>-06</sup>	-2,67
<i>DAL5</i>	YJR152W	Allantoato permeasa y ureidosucinato permeasa; también transporta dipéptidos, aunque con menor afinidad que el allantoato y el ureidosucinato; expresión constitutiva pero sensible a la represión catabólica por nitrógeno.	3,98e <sup>-05</sup>	-2,67
<i>LRG1</i>	YDL240W	Supuesta proteína de activación de GTPasa (GAP) que participan en la vía de señalización mediada por Pkc1p que controla la integridad de la pared celular; parece regular específicamente la síntesis de 1,3-beta-glucano.	1,50e <sup>-05</sup>	-2,67
<i>PRM7</i>	YDL039C	Proteína regulada por feromonas; se prevé que tiene un segmento transmembrana; el promotor del gen contiene elementos de enlace a Gcn4p.	4,97e <sup>-06</sup>	-2,69
<i>MAM1</i>	YER106W	Monopolin, proteína asociada al cinetocoro, implicada en la unión del cromosoma al huso meiótico.	1,73e <sup>-05</sup>	-2,69
<i>RSA4</i>	YCR072C	Proteína con repeticiones WD implicada en la biogénesis de los ribosomas; puede interactuar con los ribosomas, necesaria para la maduración y el transporte eficiente intra-nuclear de pre-subunidades de 60S del ribosoma; se localiza en el nucléolo.	1,01e <sup>-06</sup>	-2,69
<i>MET14</i>	YKL001C	Adenilil sulfato quinasa, necesaria para la asimilación de sulfato e involucrada en el metabolismo de la metionina.	5,87e <sup>-05</sup>	-2,7
<i>GDH3</i>	YAL062W	Glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP (+)-, sintetiza glutamato a partir de amoníaco y alfa-cetoglutarato; la tasa de utilización del alfa-cetoglutarato difiere de la de Gdh1p; expresión regulada por fuentes de nitrógeno y carbono.	7,74e <sup>-06</sup>	-2,76
<i>RRP9</i>	YPR137W	Proteína implicada en el procesamiento del pre-ARNr, asociada con snRNP U3, componente de la subunidad ribosómica pequeña (SSU) del procesosoma; ortóloga de la proteína humana U3-55k.	9,22e <sup>-07</sup>	-2,78

**Tabla S6.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>VHT1</i>	YGR065C	Simportador de H <sup>+</sup> y biotina (vitamina H) de alta afinidad de la membrana plasmática; su mutación resulta en auxotrofia por ácidos grasos; posee los 12 dominios transmembrana habituales típicos de la familia del complejo facilitador mayor; los niveles de ARNm se regulan negativamente por la privación de hierro y biotina.	8,00e <sup>-05</sup>	-2,79
<i>LYS4</i>	YDR234W	Homoaconitasa, cataliza la conversión de homocitrato a homoisocitrato que es un paso en la ruta de biosíntesis de lisina.	1,97e <sup>-06</sup>	-2,79
<i>SRB7</i>	YDR308C	Subunidad del complejo mediador de la ARN polimerasa II; se asocia con subunidades del núcleo de la polimerasa para formar la holoenzima ARN polimerasa II; esencial para la regulación de la transcripción; objetivo del represor global Tup1p.	2,36e <sup>-05</sup>	-2,8
<i>PST1</i>	YDR055W	Proteínas de la pared celular que contiene un supuesto sitio de unión GPI; secretada por protoplastos en regeneración; regulada positivamente por la activación de la vía de señalización de integridad de la pared celular mediada por Rlm1p; regulada positivamente por daños de la pared celular a través de la interrupción del gen <i>FKS</i> .	9,46e <sup>-06</sup>	-2,82
<i>UME1</i>	YPL139C	Regulador negativo de la meiosis, se necesita para la represión de un subconjunto de genes meióticos durante el crecimiento vegetativo; la unión de la histona deacetilasa Rpd3p es necesaria para la actividad; contiene una caja NEE y un motivo de repetición WD; homóloga a Wtm1p y Wtm2p.	2,63e <sup>-05</sup>	-2,84
<i>OAZ1</i>	YPL052W	Regulador de la ornitina descarboxilasa ( <i>Spe1p</i> ); antienzima que se une a <i>Spe1p</i> para regular su degradación independiente de ubiquitina; el salto de trama ribosomal durante la síntesis de <i>Oaz1p</i> y su degradación mediada por ubiquitina son ambos regulados por poliaminas.	4,67e <sup>-06</sup>	-2,87
---	YCR101C	---	6,06e <sup>-05</sup>	-2,95
<i>MTR4</i>	YJL050W	3'-5' ARN helicasa ATP-dependiente que participa en el procesamiento del ARN nuclear su degradación, tanto como componente del complejo de TRAMP como en procesos independientes de TRAMP; miembro de la familia de helicasas DEAD-box.	1,44e <sup>-05</sup>	-2,95
<i>GRX8</i>	YLR364W	Glutaredoxina que emplea un mecanismo de catálisis ditiol; monomérica, la actividad es baja y la mutación nula no afecta a la sensibilidad al estrés oxidativo; la proteína de fusión a GFP se localiza en el citoplasma; expresión fuertemente inducida por arsénico.	3,10e <sup>-05</sup>	-2,97

**Tabla S6.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>IRC7</i>	YFR055W	Cistationina beta-liasa putativa, implicada en la homeostasis de iones de cobre y el metabolismo de azufre; los mutantes nulos muestran mayores niveles espontáneos de focos de Rad52p; expresión inducida por la limitación de nitrógeno en forma dependiente de <i>GLN3</i> y de <i>GAT1</i> .	3,34e <sup>-05</sup>	-2,98
<i>EXG1</i>	YLR300W	Principal exo-1,3-beta-glucanasa de la pared celular que participa en el ensamblaje de beta-glucano en la pared celular; existen tres isoenzimas diferencialmente glicosiladas.	1,20e <sup>-05</sup>	-2,98
<i>OAC1</i>	YKL120W	Transportador de la membrana mitocondrial interna; transporta oxaloacetato, sulfato, tiosulfato, y isopropilmalato; miembro de la familia de transportadores mitocondriales.	4,65e <sup>-06</sup>	-3,01
<i>PRM7</i>	---	Proteína regulada por feromonas; se prevé que tiene un segmento transmembrana; el promotor contiene elementos de enlace a <i>Gcn4p</i> .	5,89e <sup>-05</sup>	-3,01
<i>MET3</i>	YJR010W	ATP sulfurilasa, cataliza el primer paso de la activación de sulfato intracelular, esencial para la asimilación reductora de sulfato a sulfuro; participa en el metabolismo de la metionina.	2,80e <sup>-06</sup>	-3,02
<i>MRT4</i>	YKL009W	Proteína implicada en la producción de ARNm y en el ensamblaje del ribosoma, se localiza en el nucléolo.	2,89e <sup>-05</sup>	-3,03
<i>NCA3</i>	YJL116C	Proteína que funciona con <i>Nca2p</i> para regular la expresión mitocondrial de las subunidades 6 ( <i>Atp6p</i> ) y 8 ( <i>Atp8p</i> ) de la ATP sintasa Fo-F1; miembro de la familia SUN; expresión inducida en las células tratadas con la micotoxina patulina.	2,95e <sup>-06</sup>	-3,04
<i>RPA49</i>	YNL248C	Subunidad A49 de la ARN polimerasa I.	4,13e <sup>-06</sup>	-3,05
---	YBL081W	---	1,21e <sup>-05</sup>	-3,09
<i>RCN1</i>	YKL159C	Proteína implicada en la regulación de la calcineurina durante la señalización por calcio; tiene similitud con <i>DSCR1</i> de <i>H. sapiens</i> que se encuentra en la región de los candidatos con síndrome de Down.	1,15e <sup>-05</sup>	-3,12
<i>MEP2</i>	YNL142W	Permeasa de amonio implicada en la regulación del crecimiento pseudohifal; pertenece a una familia ubicua de proteínas de membrana citoplasmática que sólo transporta amonio (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ); la expresión se encuentra regulada por represión catabólica por nitrógeno.	8,34e <sup>-06</sup>	-3,13
---	YER187W	---	4,44e <sup>-08</sup>	-3,14

**Tabla S6.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>MET16</i>	YPR167C	3'-fosfoadenilsulfato reductasa, reduce 3'-fosfoadenilil sulfato a adenosina-3',5'-bisfosfato y sulfito libre usando tioredoxina reducida como cosustrato; implicada en la asimilación de sulfato y el metabolismo de la metionina.	1,18e <sup>-05</sup>	-3,2
<i>KAR1</i>	YNL188W	Proteína esencial que interviene en la cariogamia durante el apareamiento y en la duplicación del cuerpo del polo del huso durante la mitosis; se localiza en el puente medio del cuerpo del polo del huso; interactúa con Spc72p durante la cariogamia y también interactúa con Cdc31p.	3,92e <sup>-05</sup>	-3,26
<i>ERG5</i>	YMR015C	C-22 esteroles desaturasa, una enzima del citocromo P450 que cataliza la formación del enlace doble C-22 (23) en la cadena lateral del esteroles en la biosíntesis de ergosterol; puede ser una diana de fármacos antifúngicos azólicos.	7,01e <sup>-06</sup>	-3,3
<i>BAR1</i>	YIL015W	Aspartil proteasa secretada en el espacio periplásmico en las células de tipo Mat a; ayuda a las células a encontrar células alfa para el apareamiento; escinde e inactiva el factor alfa permitiendo que las células se recuperen del factor alfa que induce la detención del ciclo celular.	2,10e <sup>-06</sup>	-3,31
<i>MMP1</i>	YLL061W	S-metilmetionina permeasa de alta afinidad, necesaria para la utilización de S-metilmetionina como fuente de azufre; tiene similitud con la S-adenosilmetionina permeasa Sam3p.	9,70e <sup>-06</sup>	-3,31
<i>SOF1</i>	YLL011W	Proteína esencial necesaria para la biogénesis de la subunidad pequeña ribosómica de 40S; tiene similitud con la subunidad beta de las proteínas G triméricas y el factor de <i>splicing</i> Prp4p.	3,05e <sup>-05</sup>	-3,33
<i>NOP56</i>	YLR197W	Proteína nucleolar esencial evolutivamente conservada, componente de los complejos caja C/D de snoRNP que dirige la metilación 2'-O del pre-ARNr durante su maduración; la sobreexpresión causa defectos en la orientación del huso.	1,96e <sup>-05</sup>	-3,36
<i>MFA2</i>	YNL145W	Factor-a, feromona de apareamiento; interactúa con las células alfa para inducir la detención del ciclo celular y otras respuestas que conducen al apareamiento; su biogénesis implica modificación del extremo C-terminal, proteólisis del extremo N-terminal y la exportación; también codificada por <i>MFA1</i> .	1,06e <sup>-05</sup>	-3,49
<i>UTR2</i>	YEL040W	Quitina transglicosilasa que funciona en la transferencia de quitina a los glucanos beta(1-6) y beta(1-3) de la pared celular; similar a y funcionalmente redundante con <i>CRH1</i> ; proteína anclada por GPI y localizada en el cuello de la gema.	7,92e <sup>-05</sup>	-3,51

**Tabla S6.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>UTP15</i>	YMR093W	Proteína nucleolar, componente de la subunidad pequeña (SSU) del procesoma que contiene el snoARN U3 que está implicado en el procesamiento del pre-ARNr de 18S.	$6,52e^{-06}$	-3,52
<i>URA1</i>	YKL216W	Dihidrorotato deshidrogenasa, cataliza la cuarta etapa enzimática en la biosíntesis <i>de novo</i> de las pirimidinas, la conversión de ácido dihidrorotico en ácido uracilo.	$1,02e^{-05}$	-3,57
<i>GLN1</i>	YPR035W	Glutamina sintetasa (GS), sintetiza glutamina a partir de glutamato y amoníaco; junto con Glt1p, forma la vía secundaria para la biosíntesis de glutamato a partir de amoníaco; expresión regulada por la fuente de nitrógeno y por la limitación de aminoácidos.	$2,60e^{-06}$	-3,59
<i>FYV7</i>	YLR068W	Proteína esencial necesaria para la maduración del ARNr 18S; necesaria para la supervivencia después de la exposición a la toxina <i>killer</i> K1.	$2,28e^{-05}$	-3,78
<i>BFR2</i>	YDR299W	Proteína esencial que es un componente del pre-ribosoma 90S; puede estar implicada en el procesamiento del ARNr; supresor multicopia de la sensibilidad a la Brefeldina A; su expresión se induce durante la fase lag y también por shock frío.	$2,11e^{-07}$	-3,82
<i>RIX7</i>	YLL034C	Supuesta ATPasa de la familia AAA, necesaria para la exportación de las subunidades grandes del pre-ribosoma a partir del núcleo; su localización se distribuye entre el nucleolo, nucleoplasma y la periferia nuclear en función de las condiciones de crecimiento.	$1,16e^{-05}$	-3,89
---	YBR056W-A	---	$6,57e^{-06}$	-4,08
<i>PHO89</i>	YBR296C	Cotransportador $Na^+/Pi$ , activo en la fase temprana del crecimiento; similar a los transportadores de fosfato de <i>Neurospora crassa</i> , transcripción regulada por las concentraciones de fosfatos inorgánicos y Pho4p.	$1,41e^{-06}$	-4,19
<i>CHA1</i>	YCL064C	L-serina (L-treonina) desaminasa catabólica; cataliza la degradación de la L-serina y L-treonina; necesaria para utilizar serina o treonina como la única fuente de nitrógeno, transcriptionalmente inducida por serina y treonina.	$1,23e^{-06}$	-4,19
<i>PHO11</i> /// <i>PHO12</i>	YAR071W /// YHR215W		$1,27e^{-07}$	-4,23
<i>IME1</i>	YJR094C	Regulador principal de la meiosis que es activo sólo durante los eventos meióticos; activa la transcripción de genes meióticos tempranos a través de la interacción con Ume6p; es degradada por el proteasoma 26S después de la fosforilación por Ime2p.	$3,76e^{-05}$	-4,33



**Tabla S6.** Genes cuya expresión disminuye en la cepa mutada  $\Delta sky1$  versus W303 después del tratamiento con cisplatino (continuación).

Gen	ORF	Función del gen	p-valor	Ratio
<i>MET8</i>	YBR213W	Enzima bifuncional con actividades deshidrogenasa y ferroquelatasa; implicada en la biosíntesis de siroheme, un grupo prostético utilizado por la sulfito reductasa y necesario para la asimilación de sulfato y la biosíntesis de metionina.	$8,00e^{-07}$	-4,4
---	YDL241W	---	$1,83e^{-05}$	-4,52
---	YPL014W	---	$3,41e^{-06}$	-4,75
<i>SEO1</i>	YAL067C	Supuesta permeasa, miembro de la subfamilia de transportadores allantoato de la superfamilia del facilitador mayor; la mutación confiere resistencia a sulfóxido de etionina.	$2,81e^{-06}$	-4,77
<i>REC104</i>	YHR157W	Proteína implicada en las etapas iniciales de la recombinación meiótica; necesaria el entrecruzamiento meiótico; forma un complejo con Rec102p y Spo11p necesario durante el inicio de la recombinación.	$6,01e^{-07}$	-5,46
<i>SKY1</i>	YMR216C	SR proteín-quinasa (SRPK) que participan en la regulación de proteínas implicadas en el metabolismo del ARNm y la homeostasis de cationes; similar a la humana SRPK1.	$5,85e^{-06}$	-114,4



## **CAPÍTULO 4**

**DISCUSIÓN: MECANISMOS DE RESISTENCIA A CISPLATINO  
EN *Saccharomyces cerevisiae* Y SU DEPENDENCIA DE Sky1p.**



## Discusión: Mecanismos de resistencia a cisplatino en *Saccharomyces cerevisiae* y su dependencia de Sky1p.

---

En los capítulos precedentes se han descrito varios estudios desarrollados durante la realización de esta Tesis Doctoral y que aportan nuevos datos sobre los procesos celulares desencadenados en la levadura como consecuencia del tratamiento con cisplatino, así como sobre el papel de Sky1p en esta respuesta. En este capítulo se discuten de forma integrada los resultados obtenidos y se compara la información disponible en eucariotas superiores y en levaduras, poniendo en relieve las aportaciones al conocimiento de los mecanismos de sensibilidad y resistencia a cisplatino realizadas por este trabajo. También se discuten futuras líneas de investigación derivadas de los resultados obtenidos.

### 4.1. Interacciones entre los genes de respuesta a cisplatino *IXR1* y *SKY1*.

En la primera parte de este trabajo se ha realizado un análisis para averiguar la interacción genética entre dos genes de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, *IXR1* y *SKY1*, relacionados con la sensibilidad a cisplatino. La delección de cada uno de ellos se conocía que causaba en las cepas portadoras un incremento de la resistencia frente al fármaco. En este estudio hemos comprobado que tanto las delecciones simples  $\Delta sky1$  y  $\Delta ixr1$  como la doble  $\Delta sky1\Delta ixr1$  tienen efectos diferentes en función de la cepa de *S. cerevisiae* utilizada. Este resultado corrobora que el efecto citotóxico del cisplatino, y por tanto también los mecanismos de resistencia, dependen de muchos factores controlados por diversos genes.

Huang y colaboradores (Huang *et al.*, 2005) realizaron un análisis a escala genómica, el más completo hasta el momento, utilizando la colección EUROSCARF de cepas de *S. cerevisiae* delecionadas en cada uno de los genes de la levadura para buscar todos aquellos que se relacionan con la respuesta a cisplatino. Esta colección está basada en delecciones sobre las cepas haploides BY4741 (Mat a) BY4742 (Mat  $\alpha$ ) o sobre la diploide, para los genes de función esencial. Los genes seleccionados en esta búsqueda fueron 22 y se pueden agrupar en distintas categorías funcionales que incluyen el metabolismo de nucleótidos (*FCY2* y *HPT1*), el catabolismo de ARN (*NMD2*, *UPF3*, *SKI3*), regulación de genes que se transcriben por la ARN Polimerasa II (*NOT3*, *SNF6*, *STP1*, *IXR1*, *SOK1*) el transporte a través de membranas (*SKY1*, *SEM1*, *VPS29*, *ITR1*) y otros (*ECM30*, *BUL1*, *ELG1*, *YGL214W*,

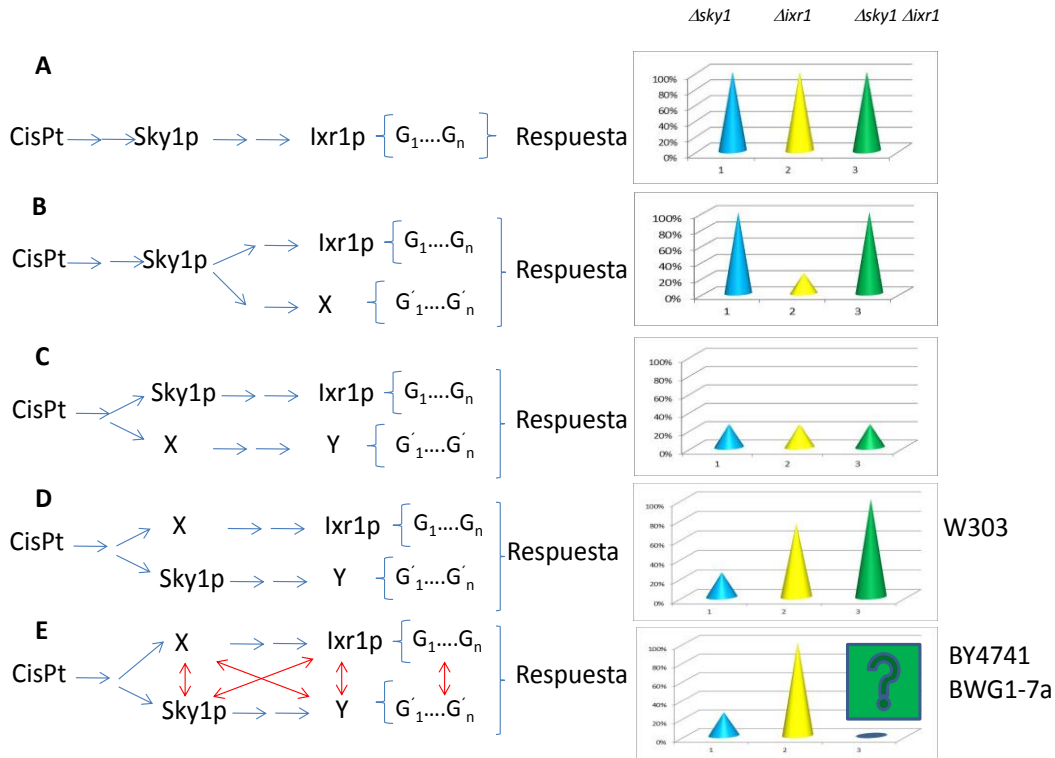
## Discusión: Mecanismos de resistencia a cisplatino en *Saccharomyces cerevisiae* y su dependencia de Sky1p.

---

*YJL175W*, *YLR352W*, *YDL173W*). Además de estos 22 genes inicialmente seleccionados, hay probablemente otros que también contribuyen a la respuesta a cisplatino, pero de una forma menos relevante y que por tanto no fueron considerados teniendo en cuenta los criterios de discriminación utilizados.

Probablemente la acción de muchos de esos genes de respuesta a cisplatino está relacionada entre sí y sería posible distribuirlos en cascadas de regulación interconectadas, pero todavía no hay suficientes datos experimentales para poder realizar una clasificación de este tipo. Por este motivo, en una primera aproximación, seleccionamos únicamente dos genes de interés ya que uno de ellos está relacionado con la respuesta a nivel transcripcional (*IXR1* codifica para una proteína que puede actuar como un factor transcripcional) y el otro lo está con una cascada de señalización (*SKY1* es una proteína-quinasa). En un modelo de regulación sencillo, si ambos genes estuviesen relacionados en la misma cascada de respuesta a cisplatino y si ésta fuese única, el efecto producido por las deleciones individuales o el producido por la deleción doble debiera ser idéntico (Fig. 32A). En mecanismos más complejos en los que *SKY1* fuese necesario para la función de *IXR1*, pero otros genes (*X*, *Y*, *G*, *G'*) o complejas interacciones entre ellos modificasen el fenotipo de respuesta a cisplatino, la respuesta esperada en el doble mutante  $\Delta sky1 \Delta ixr1$  podría ser de varios tipos, como se muestra en la Figura 32 en los apartados B, C y E.

**Discusión: Mecanismos de resistencia a cisplatino en *Saccharomyces cerevisiae* y su dependencia de Sky1p.**



**Figura 32.** Esquema de posibles respuestas a cisplatino (CisPt) en los mutantes  $\Delta sky1$ ,  $\Delta ixr1$  y  $\Delta sky1\Delta ixr1$  en función de diversos modelos de estructuración de la respuesta. X representa a otros factores adicionales de señalización e Y a otros factores de transcripción no identificados en el esquema.  $G_1 \dots G_n$  son los genes regulados por *Ixr1p* y  $G'_1 \dots G'_n$  son los de respuesta a otros factores transcripcionales. Las flechas rojas indican posibles interacciones genéticas. En el margen derecho se señalan las cepas analizadas en este estudio que se adaptan a los modelos descritos en el esquema.

Los resultados de respuesta a cisplatino obtenidos en este trabajo para las cepas BY4741 y BWG1-7a se corresponden con el modelo descrito en el apartado E, sin embargo los obtenidos con la cepa W303 se adaptan al modelo descrito en el apartado D (Figura 32). Puesto que diferencias genéticas entre las cepas pueden estar modificando, y de modo diverso en cada cepa, la función de proteínas que participan en la respuesta a cisplatino y este modelo es complejo, no es sorprendente que los resultados obtenidos sean dependientes de cepa.

Una vez descartado un mecanismo de señalización directa de Sky1p sobre *Ixr1p* (modelos A, B y C en la Figura 32). Sólo los resultados obtenidos con la cepa W303 pueden adaptarse a un modelo más sencillo (Fig. 32D) y por este motivo se seleccionó esta cepa para llevar a cabo los estudios de

## **Discusión: Mecanismos de resistencia a cisplatino en *Saccharomyces cerevisiae* y su dependencia de Sky1p.**

---

proteómica y genómica. Dichos estudios han estado dirigidos a averiguar qué parte de la respuesta a cisplatino está mediada por Sky1p y los posibles genes diana que se ven implicados en la respuesta a cisplatino de forma dependiente o independiente de Sky1p. No obstante, dado que no hay datos previos a nivel genómico sobre la función de Sky1p y en este trabajo hemos abordado ese estudio tanto a nivel proteoma como transcriptoma, también es necesaria una discusión previa sobre los resultados obtenidos y la posible relación existente entre ellos.

### **4.2. Las funciones de Sky1p a la luz de los resultados de proteómica y transcriptómica.**

#### **Comparativa proteómica *versus* transcriptómica.**

Antes de comparar los resultados obtenidos en los capítulos 2 y 3 debemos tener en cuenta una reflexión previa sobre la metodología utilizada y qué repercusión tiene en la comparación.

En el estudio de proteómica que hemos realizado en este trabajo hemos partido de un extracto de proteínas enriquecido en fosfo-proteínas. En realidad el kit de extracción utilizado está basado en una resina con capacidad de unión a proteínas de carácter ácido y, puesto que el grupo fosfato acidifica la proteína modificada covalentemente, las fosfoproteínas se encuentran mayoritariamente representadas en dichos extractos. El hecho de que en la comparación cepa  $\Delta sky1$  frente a cepa silvestre una proteína aparezca diferencialmente expresada no sólo puede deberse a un cambio en la fosforilación que haga variar sus niveles en los extractos enriquecidos en proteínas ácidas. También puede suceder que esa proteína (fosforilada por otra quinasa diferente a Sky1p o no fosforilada pero de pl bajo) presente una variación en sus niveles que se deba a procesos de regulación transcripcional o post-transcripcional que estén afectados directa o indirectamente por la delección de gen *SKY1*.

Al comparar los resultados obtenidos en los estudios de proteómica realizados en este trabajo con los de transcriptómica debemos tener en cuenta que los primeros (por el diseño experimental utilizado) están circunscritos a un número más reducido de candidatos (fosfoproteínas o proteínas de carácter ácido), mientras que los segundos se extienden a todos los genes de la levadura.



## Discusión: Mecanismos de resistencia a cisplatino en *Saccharomyces cerevisiae* y su dependencia de Sky1p.

---

### Efecto de Sky1p sobre transportadores de cationes.

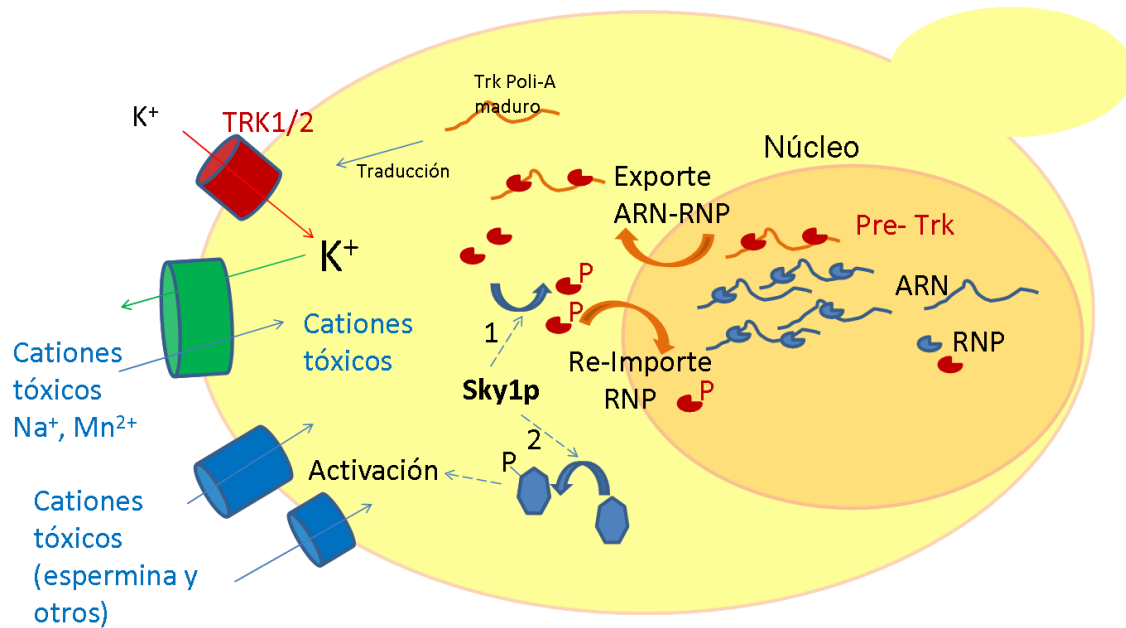
Entre las funciones de Sky1p aparentemente no relacionadas con la respuesta a cisplatino, se ha descrito el mantenimiento del potencial de membrana mediante su acción sobre transportadores de cationes. Se ha sugerido que el sistema de transporte de  $K^+$ , Trk1p/Trk2p, está regulado negativamente por Sky1p a través de un mecanismo post-transcripcional (Forment *et al.*, 2002). El mutante nulo  $\Delta sky1$  presenta un incremento en la tolerancia a diversos cationes tóxicos como  $Na^+$ ,  $Li^+$ , espermina, tetrametil-amonio, hygromicina-B,  $Mn^{2+}$ . El transporte de  $Na^+$  y  $Mn^{2+}$  es dependiente del sistema Trk1p/Trk2p. Según el modelo propuesto por Forment y colaboradores (Forment *et al.*, 2002), la anulación del gen *SKY1* provocaría un incremento del transporte de  $K^+$  al interior de la célula a través de los transportadores Trk1p/Trk2p causando una disminución del potencial de membrana y una disminución de la captación de cationes tóxicos. Sin embargo, en el caso de la toxicidad producida por  $Li^+$ , espermina, tetrametil-amonio o hygromicina-B no existe una dependencia del sistema de transporte Trk1p/Trk2p, por lo que se sospecha que Sky1p esté también implicada en la regulación de otros transportadores de membrana aún no identificados (Forment *et al.*, 2002).

Como se ha comentado en la introducción de este trabajo, la proteína Sky1p fosforila a proteínas, como Npl3p o Gbp2, que a su vez interaccionan con las moléculas de ARN transcrito y participan en el transporte núcleo-citoplasma del mismo (Senger *et al.*, 1998; Windgassen y Krebber, 2003). Se ha propuesto que la fosforilación dependiente de Sky1p (Senger *et al.*, 1998; Windgassen y Krebber, 2003) permite la vuelta desde el citoplasma al núcleo de estas proteínas para iniciar un nuevo ciclo en el transporte de ARN. Se conoce que existe una especificidad entre determinadas proteínas de transporte de ARN y las moléculas transportadas (Hogan *et al.*, 2008). Los datos sobre la relación de especificidad existente entre Npl3p y/o Gbp2p y las funciones de las proteínas codificadas por los ARN transportados nos pueden también ayudar a comprender las funciones de Sky1p en la célula.

Cabe al menos pensar en dos posibles mecanismos por los que Sky1p puede modular a los transportadores de membrana (Trk1p/Trk2p y otros). En el primero, Sky1p afectaría al procesamiento y transporte de los ARN que codifican para los transportadores. El segundo implicaría la participación de Sky1p en una cascada de señalización que afectase a los transportadores de

## Discusión: Mecanismos de resistencia a cisplatino en *Saccharomyces cerevisiae* y su dependencia de Sky1p.

membrana. Alguno de los componentes de este sistema de regulación debiera ser una proteína susceptible de ser fosforilada por Sky1p (Fig. 33). Por supuesto ambos mecanismos pueden co-existir en la célula actuando sobre los mismos transportadores de cationes o ejercer una función diferenciada sobre distintos transportadores.



**Figura 33.** Esquema de posibles mecanismos de acción de Sky1p sobre la respuesta a cationes tóxicos. El mecanismo 1 se relaciona con la función de Sky1p en el reimporte de proteínas de unión a ARN desde el citoplasma al núcleo. El mecanismo 2 con una hipotética cascada de señalización en el que una proteína fosforilada por Sky1p ejerce directa o indirectamente un control sobre los transportadores, aún no identificados, de dichos cationes.

Una fosfoproteína que vea su concentración disminuida en la cepa  $\Delta sky1$  respecto a la cepa isogénica W303 y que contenga un motivo SR similar al descrito para la quinasa Sky1p sería un buen candidato a participar en el mecanismo de acción de Sky1p respecto al transporte de cationes tóxicos, incluida la espermina. Si esta proteína al analizar su secuencia contuviese regiones RMN de unión a ARN probablemente pudiese ejercer su acción a través del mecanismo de re-importe al núcleo de las proteínas de unión a ARN. En caso contrario su acción podría ejercerse a través de una cascada de señalización que controlase un sistema de regulación directo o indirecto. Ninguna de las proteínas identificadas en este estudio que disminuyen sus niveles en el mutante  $\Delta sky1$  respecto a la cepa isogénica W303 (Tabla 52)

## Discusión: Mecanismos de resistencia a cisplatino en *Saccharomyces cerevisiae* y su dependencia de Sky1p.

---

presenta dominios de unión a ARN típicos de otros sustratos de Sky1p. Tampoco ninguna de ellas se ha relacionado previamente con la función de Sky1p en la sensibilidad frente a cationes tóxicos. Al analizar si las variaciones observadas en los niveles de expresión de las proteínas están relacionadas con las variaciones en los niveles de ARNm, observamos que tras el tratamiento con cisplatino existe un paralelismo entre el incremento en los niveles de ARNm de *MET6* (Tabla S1) y los niveles de las dos isoformas de la proteína Met6p detectadas en el análisis de proteómica (Tabla 50). Otras proteínas identificadas en el estudio de proteómica (Tabla 54) no muestran variaciones paralelas en las tablas de resultados de los estudios de transcriptómica (Tablas S1-S6) al comparar las variaciones debidas a cepa o a tratamiento. Por tanto la interpretación más probable de los resultados obtenidos es que la mayoría de las proteínas identificadas en el análisis de proteómica se vean modificadas de forma directa o indirecta por el tratamiento con cisplatino y/o Sky1p a nivel post-traduccional.

En la Tabla 68 se recopilan algunos genes relacionados con el transporte de cationes que ven modificados los niveles de sus ARNm al comparar la cepa W303 con la cepa en la que se ha deletado el gen *SKY1*. Estos datos han sido extractados de la Tabla S3.

**Tabla 68.** Genes relacionados con el transporte de cationes cuyos niveles de ARN cambian al comparar las cepas  $\Delta sky1$  y W303.

Gen	ORF	Función	Ratio ARN $\Delta sky1/W303$
<i>SRO77</i>	YBL106C	Proteína relacionada con la regulación del balance de cationes. Promueve la fusión de las vesículas post-Golgi con la membrana plasmática.	2,1
<i>CTR3</i>	YLR411W	Transportador de alta afinidad por el cobre de la membrana plasmática.	3,0
<i>TRK2</i>	YKR050W	Componente del sistema Trk1p-Trk2p de transporte de potasio.	1,8
<i>TPO5</i>	YKL174C	Proteína implicada en la excreción de putrescina y espermidina; transportador putativo de poliaminas en las vesículas del Golgi o post-Golgi.	2,1

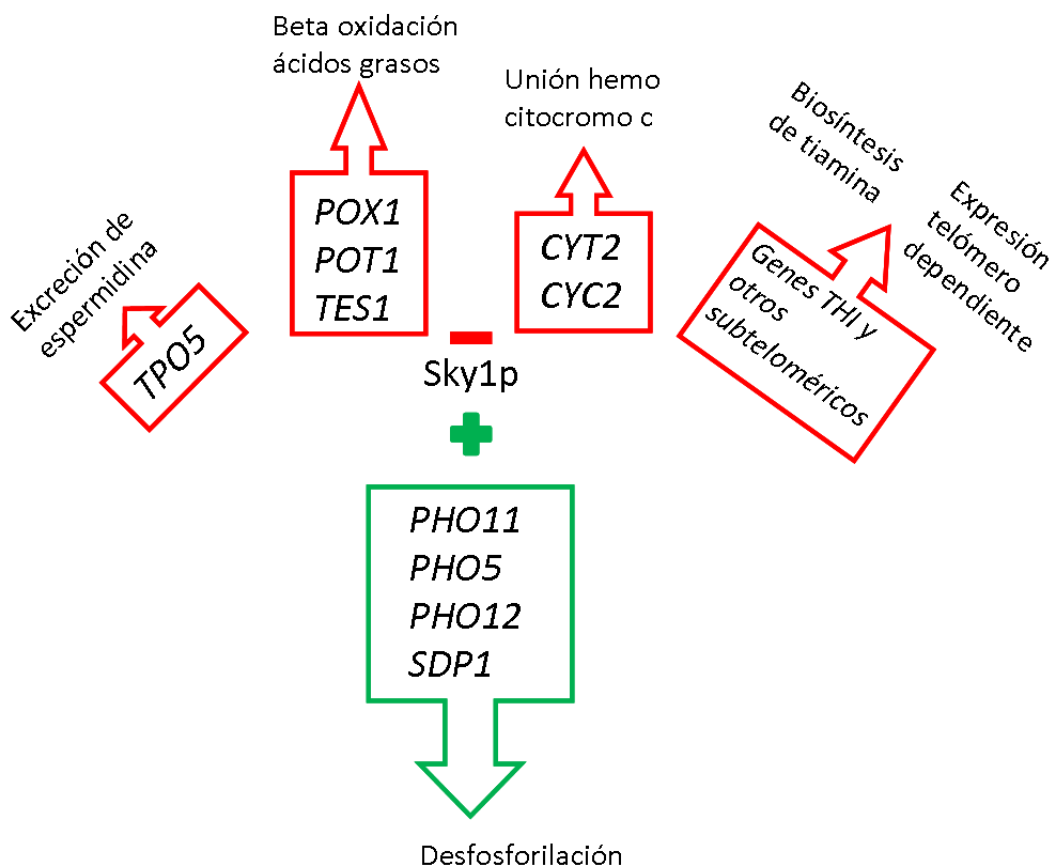
Como se puede observar en la Tabla 68 estos datos pueden indicar que Sky1p reprime de forma directa o indirecta la expresión del gen *TPO5* relacionado con la excreción de espermidina. De esta forma, aunque los estudios de proteómica o transcriptómica realizados no nos han permitido

## Discusión: Mecanismos de resistencia a cisplatino en *Saccharomyces cerevisiae* y su dependencia de Sky1p.

identificar ningún gen o proteína relacionados con el importe de poliaminas que dependa de Sky1p, la regulación de *TPO5* podría también contribuir al aumento de resistencia a espermidina observado en el mutante  $\Delta sky1$ , ya que se promovería su excreción.

### Otras funciones de Sky1p no relacionadas con la respuesta a cisplatino.

Al analizar los genes que varían su expresión al comparar las cepas W303 y su isogénica  $\Delta sky1$  de una forma que no es dependiente del tratamiento con cisplatino puede deducirse que Sky1p además de modular los procesos de sensibilidad/resistencia a cisplatino participa en otras funciones en la célula. En la Figura 34 se resumen estas funciones que ya han sido previamente comentadas en el Capítulo 3.



**Figura 34.** Funciones de Sky1p en el control de genes aparentemente no relacionados con la respuesta a cisplatino.

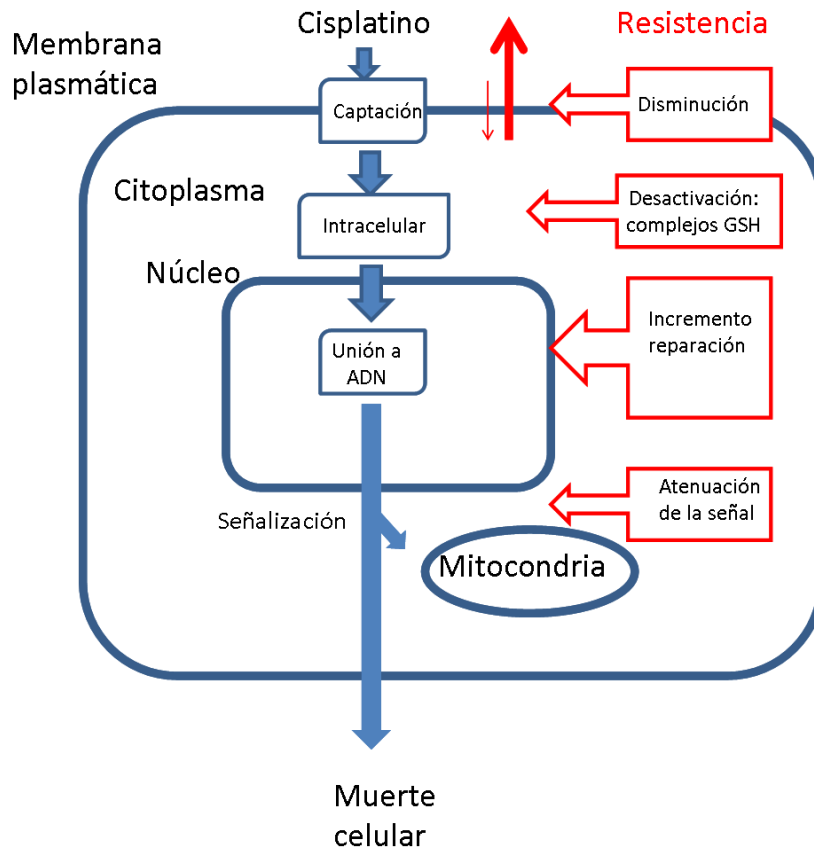
## Discusión: Mecanismos de resistencia a cisplatino en *Saccharomyces cerevisiae* y su dependencia de Sky1p.

---

### 4.3. Mecanismos de acción del cisplatino en las células de levadura y desarrollo de resistencia.

En la Figura 35 se muestran cuatro niveles en los mecanismos de acción del cisplatino en los que puede producirse el desarrollo de resistencia frente a este compuesto utilizado en quimioterapia frente al cáncer. Los mecanismos por los que se desarrolla la resistencia pueden ser muy variados y pueden ser diferentes para cada tipo de tumor, dependiendo de las células que lo han originado. Entre ellos cabe citar, una disminución en la captación celular de la droga, su inactivación intracelular, el incremento en los mecanismos de reparación del ADN, o mecanismos que inhiben la propagación de la señal de daño en el ADN hasta la maquinaria apoptótica. Entre estos últimos cabe citar la pérdida de la capacidad de reconocimiento de los daños en el ADN, sobre-expresión de HER-2/neu, activación de PI3-K/Akt, pérdida de función de p53, sobre-expresión del anti-apoptótico Bcl-2 o interferencia en la activación de las caspasas (Siddik, 2003). Aunque el desarrollo de resistencia es multifactorial, la imposibilidad en la captación de la droga es el proceso más consistentemente identificado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* (Holzer *et al.*, 2004).

## Discusión: Mecanismos de resistencia a cisplatino en *Saccharomyces cerevisiae* y su dependencia de Sky1p.

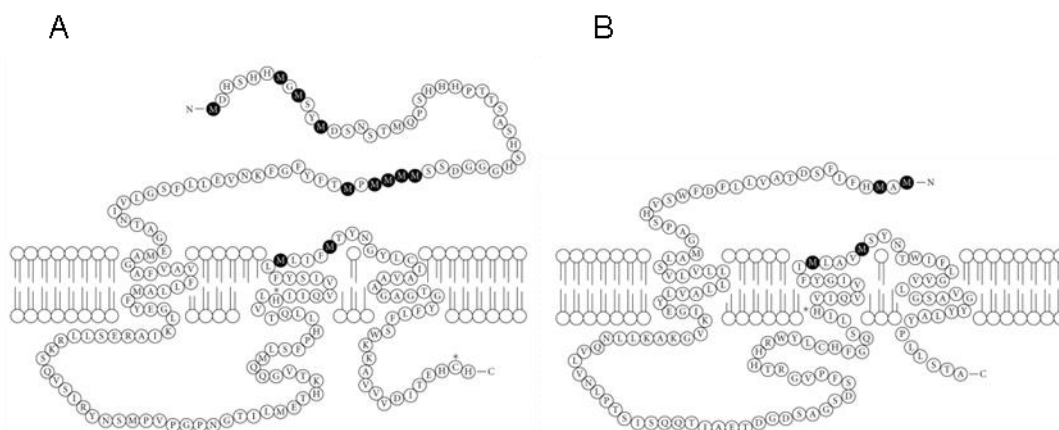


**Figura 35.** Niveles de desarrollo de resistencia a cisplatino (modificada de Fuertes *et al.*, 2002).

Se ha propuesto que el cisplatino puede entrar en la célula tanto por procesos de transporte activo como por difusión pasiva. El primer sistema de transporte activo de cisplatino se halló en levaduras y se trata de una proteína de membrana, Ctr1p, que también transporta cobre (Ishida *et al.*, 2002), por lo que frecuentemente los fenotipos de sensibilidad a  $\text{Cu}^{++}$  y a cisplatino suelen ir emparejados en levaduras (Ishida *et al.*, 2002). La anulación de *CTR1* en levaduras produce un 50% de disminución en la captación de cisplatino por lo que se supone que el otro 50% atraviesa la membrana por difusión pasiva o a través de transportadores aún no caracterizados. En células de ratón también se encontró un gen homólogo a *CTR1* relacionado con la sensibilidad a cisplatino (Ishida *et al.*, 2002). En células humanas se han encontrado dos proteínas homólogas a *CTR1* de levadura hCTR1 y hCTR2 (Fig. 36) y su implicación en la captación de cisplatino ha sido demostrada. hCTR1 es una proteína de 190 aminoácidos que se organiza en tres dominios transmembrana y que posee en el dominio amino terminal, en la zona externa a la membrana, una serie de aminoácidos Met, His y Cys que son esenciales para el transporte

## Discusión: Mecanismos de resistencia a cisplatino en *Saccharomyces cerevisiae* y su dependencia de Sky1p.

de  $\text{Cu}^{++}$ . La eliminación del motivo MMMPM (situado en el extremo amino-terminal entre las posiciones 40 y 45) imposibilita el transporte de cisplatino (Sze *et al.*, 2009; Larson *et al.*, 2010).



**Figura 36.** Organización de los transportadores **A.- hCTR1. B.- hCTR2.** Las metioninas (en fondo negro) y otros residuos (C\*, H\*) importantes para el transporte de metales y derivados se señalan en la figura (modificada de Abada y Howell, 2010).

Ctr1p de levaduras también posee en su extremo amino terminal una composición peculiar con 8 motivos ricos en Met que se extienden desde la posición 1 a la posición 127 y aparecen subrayados en la Figura 37.

```

MEGMNMGSSMNMDAMSSASKTVASSMASMSMDAMSSASKTILSSMSMSMEAMSSASKTL
ASTMSMASMSMGSSSSMSGMSMSMSSTPTSSASAQTTSDDSSMSGMSGMSSSDNSSSSGMD
MDMSMGMNYYLTPTYKNYPVLFHHLHANNNGKAFGIFLLFVVAAFVYKLLLFVSWCLEVH
WFKKWDKQNKYSTLPSANSKDEGKHYDTENNFEIQGLPKLPNLLSDIFVPSLMDLFHDI
RAFLVFTSTMI IYMLMLATMSFVLT YVFAVITGLALSEVFFNRCKIAMLRWDIQREIQK
AKSCPFGFNCQGRHPEPSDPDPIAVADTTSQSDQSTRLEKNNESKVAISENNQKKTPTQE
EGCNCA TDSGKNQANIERDILENSK LQE QSGNMDQNLLPAEKFTHN
    
```

**Figura 37.** Secuencia de Ctr1p de *S. cerevisiae* mostrando los 8 motivos ricos en metioninas.

Ni en los análisis de transcriptómica ni en los de proteómica hemos observado en nuestro estudio un incremento en la expresión de *CTR1* o de la proteína por él codificada como consecuencia de la adición de cisplatino. Este resultado era esperable ya que este transportador es de alta afinidad y presenta una regulación negativa de forma que altos niveles de  $\text{Cu}^{++}$  o cisplatino condicionan una disminución del número de transportadores expuestos en la membrana (Ishida *et al.*, 2002; Ooi *et al.*, 1996) que son internalizados y probablemente degradados. También el cisplatino produce una disminución muy rápida del transportador hCTR1 en células de carcinoma de

## Discusión: Mecanismos de resistencia a cisplatino en *Saccharomyces cerevisiae* y su dependencia de Sky1p.

---

ovario (Holzer *et al.*, 2004; Holzer y Howell, 2006). Desde el punto de vista funcional tiene importancia el hecho de que se observa una disminución del 85% del transportador con una concentración de cisplatino 2  $\mu\text{M/L}$  y al cabo de tan sólo 5 min. de tratamiento, lo que indica que puede funcionar en pacientes sometidos a tratamiento (Holzer y Howell, 2006)

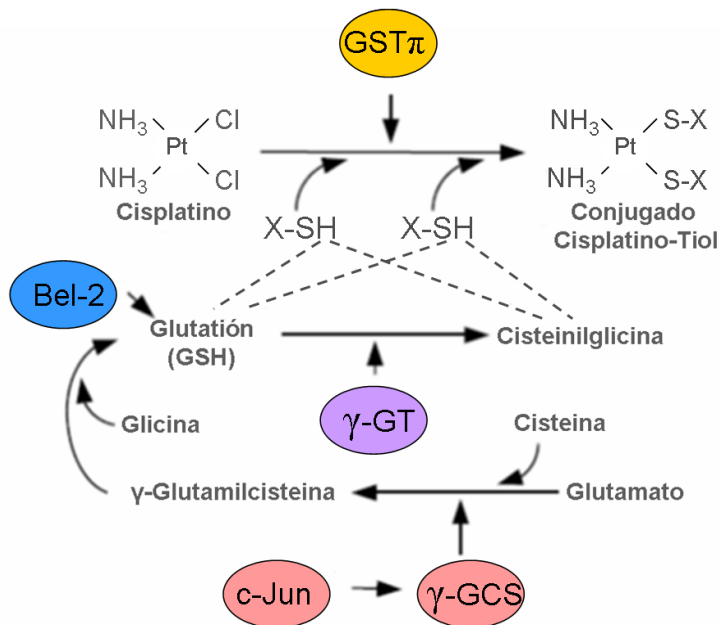
Como se recoge en la Tabla S3, *CTR3*, un gen que codifica en *S. cerevisiae* para otro transportador de  $\text{Cu}^{++}$  no homólogo a *CTR1* (Pena *et al.*, 2000) aumenta su expresión 3 veces en la cepa mutante  $\Delta\text{sky1}$ , y sin embargo este efecto no se observa en presencia de cisplatino (Tabla S5). Se podrían interpretar estos datos en el sentido de que directa o indirectamente Sky1p actuase en la célula como un represor de la expresión de *CTR3*, pero esta represión cesase en presencia de cisplatino, lo que permitiría un uso alternativo de este transportador a medida que Ctr1p es degradado. Futuros estudios son necesarios para explorar esta posibilidad.

En el análisis de transcriptoma (Tabla S1) observamos un incremento de expresión de 28,49 veces, al comparar W303 no tratada y tratada con cisplatino, de una permeasa codificada por *SEO1* (Isnard *et al.*, 1996). Esta permeasa carece de los motivos ricos en metioninas típicos de los transportadores de metales, por lo que no parece probable que actúe como un transportador directo de cisplatino. Datos precedentes (Isnard *et al.*, 1996) la han asociado con el transporte de un compuesto de S, sulfóxido de etionina, que podría utilizarse como precursor metabólico de otros compuestos de azufre necesarios en la respuesta a cisplatino. Otra posibilidad es que también pueda actuar como un mecanismo de extrusión de cisplatino unido a glutatión o derivados de glutatión. Varios mecanismos de detoxificación de metales, como por ejemplo cadmio, o metaloides como el arsenato, están basados en transportadores de este tipo que disminuyen los niveles intracelulares expulsando el metal fuera de la célula o dirigiéndolo al interior de la vacuola (Ortiz *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1997; Nagy *et al.*, 2006; Prévéral *et al.*, 2009). En eucariotas superiores se conocen también sistemas de transporte que permiten la extrusión del cisplatino como MRP2 y ATP7B (Kawabe *et al.*, 1999; Komatsu *et al.*, 2000). Por el momento no se han demostrado experimentalmente sistemas con función homóloga en levaduras y por tanto la función de *SEO1* en relación a este proceso se plantea como una posibilidad a explorar en futuras investigaciones.



## Discusión: Mecanismos de resistencia a cisplatino en *Saccharomyces cerevisiae* y su dependencia de Sky1p.

En eucariotas superiores se ha descrito que uno de los mecanismos de neutralización del efecto tóxico del cisplatino consiste en su unión a glutatión y/o a cisteinil glicina derivada de él por eliminación del glutamato (X-SH en la Figura 38). Por lo tanto, como consecuencia de este proceso, cabe esperar que el descenso en los niveles de glutatión produzca un efecto compensador que tienda a restaurar los niveles de este tripéptido tan necesario para el correcto mantenimiento del estado redox de la célula. En el análisis de proteómica no hemos encontrado ninguna proteína que modifique su expresión y que esté relacionada con la biosíntesis del glutatión. En el de transcriptómica si que se observan diferentes cambios que pueden relacionarse con un incremento en la biosíntesis de glutatión. Por una parte se produce un incremento en la expresión de genes relacionados con la asimilación de compuestos de azufre que puede promover la síntesis de glutatión a partir de homocisteína. Por otra parte tanto los resultados obtenidos en el estudio de proteómica como en los de transcriptómica se pone de manifiesto que se producen variaciones relacionadas con el control redox en la célula. Hay varios mecanismos por los que el cisplatino puede desencadenar esta respuesta redox, incluyendo la disfunción mitocondrial, pero sin duda uno de ellos puede estar causado por la formación de complejos cisplatino-glutatión.



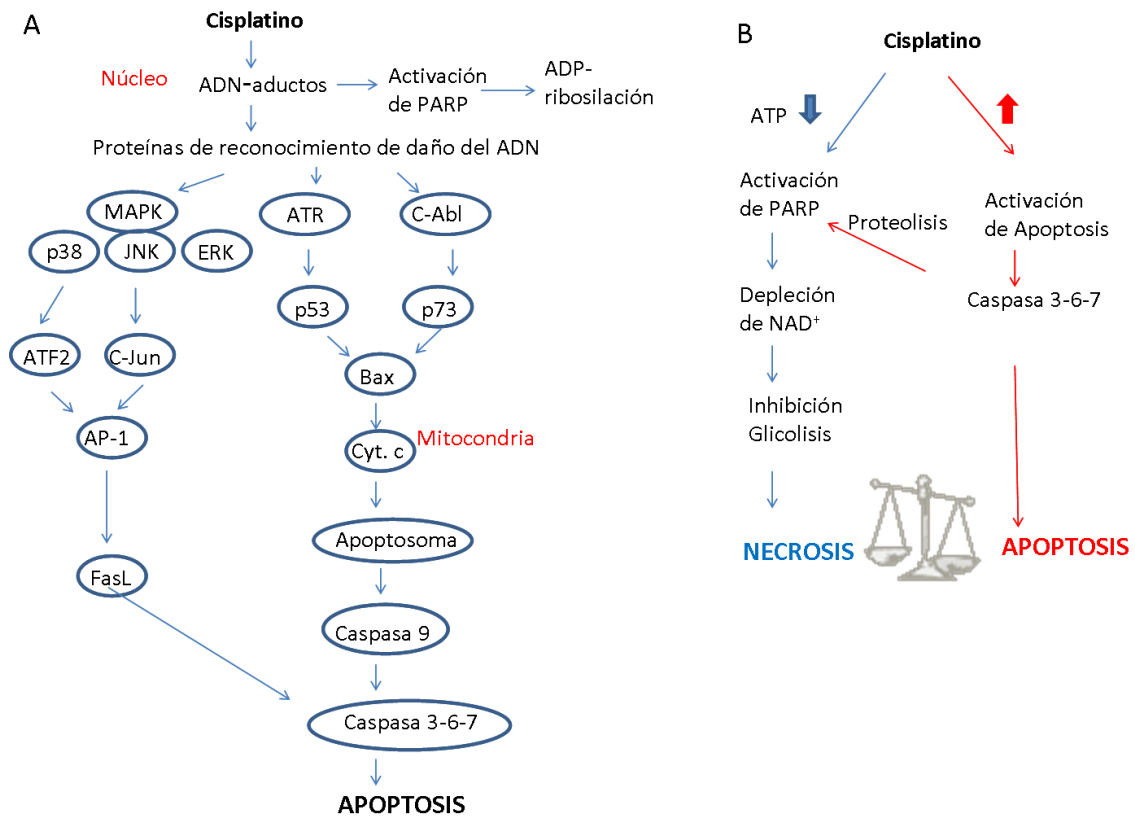
**Figura 38.** Inactivación del cisplatino por glutatión reducido GSH o cisteinil-glicina derivada del glutatión. γGCS, γ-glutamilcisteína sintetasa; γGT, γ-glutamilttransferasa; GSTπ, GSH-S-transferasa π (modificada de Siddick, 2003).

## **Discusión: Mecanismos de resistencia a cisplatino en *Saccharomyces cerevisiae* y su dependencia de Sky1p.**

---

En numerosos estudios, llevados a cabo en eucariotas superiores para determinar tanto los mecanismos que sustentan el efecto citotóxico del cisplatino como el desarrollo de mecanismos de resistencia al fármaco, se han encontrado varias cascadas de señalización implicadas. Aunque no se conoce el sistema por el que el cisplatino accede al núcleo, el cisplatino forma aductos intra-catenarios con el ADN que pueden promover la muerte celular por necrosis o desencadenar varias cascadas de señalización intracelular (ATR, p53, p73 y MAPK) que causan finalmente activación de la apoptosis (revisado en Fuertes *et al.*, 2002; Siddik, 2003; Tanida *et al.*, 2012). La disponibilidad de ATP condiciona si la muerte celular se producirá por necrosis o apoptosis (Fuertes *et al.*, 2002). Así, los daños en el ADN, si no son adecuadamente reparados porque se produce un fallo en los mecanismos de “mismatch repair” (MMR), promueven la activación de la enzima ADP-ribosa-polimerasa (PARP) que se une al ADN a través de un dedo de Zn y también cataliza la ruptura del NAD<sup>+</sup> para obtener, liberando nicotín-amida, grupos ADP-ribosa que incorpora a las proteínas nucleares. Como consecuencia se produce una depleción de NAD<sup>+</sup> causando inhibición de la glucólisis y una caída en los niveles de ATP, que si llegan a bajar por debajo de los considerados inductores de letalidad producen la necrosis celular. Los mecanismos de señalización celular que producen apoptosis y el balance entre necrosis y apoptosis en función de la disponibilidad de ATP se muestran en la Figura 39.

## Discusión: Mecanismos de resistencia a cisplatino en *Saccharomyces cerevisiae* y su dependencia de Sky1p.



**Figura 39. A.-** Esquema de las cascadas de señalización implicadas en los procesos de apoptosis desencadenados por cisplatino en eucariotas superiores. **B.-** Balance entre apoptosis y necrosis en función de la disponibilidad de ATP. Esquema elaborado a partir de los datos de las revisiones de Fuertes *et al.*, 2002; Siddik, 2003 y Tanida *et al.*, 2012.

En levaduras los mecanismos de citotoxicidad desencadenados por cisplatino no son bien conocidos. La actividad PARP se encuentra presente en todas las células eucariotas pero no en levaduras y la expresión heteróloga de la enzima PARP-1 humana produce un retraso en el crecimiento de la levadura (Tao *et al.*, 2009). Tampoco la medida de marcadores ha puesto de manifiesto que el tratamiento con cisplatino promueva la apoptosis en levaduras (Hostetter *et al.*, 2012). Sólo hay datos parciales de la posible activación de algunas cascadas de señalización. Por ejemplo se ha sugerido que la serín-treonín quinasa Kin3p puede participar en una cascada de señalización desencadenada por la respuesta a daño en el ADN (Moura *et al.*, 2011).

Los resultados aportados en este trabajo nos abren nuevos caminos para entender los procesos de citotoxicidad y resistencia a cisplatino en levaduras. Tanto en el estudio de proteómica como en el de transcriptómica hemos podido encontrar variaciones en los patrones de expresión de proteínas

## Discusión: Mecanismos de resistencia a cisplatino en *Saccharomyces cerevisiae* y su dependencia de Sky1p.

---

y ARN que sugieren que se produce una respuesta a daño en ADN y que se modifican mecanismos de respuesta a estrés oxidativo que a su vez han sido previamente relacionados con la respuesta a cisplatino en eucariotas superiores (Iraz *et al.*, 2006; Mansour *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2008; Pratibha *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2008). Además, los resultados de transcriptómica indican que el aumento en el metabolismo de los compuestos de azufre se ve estimulado, y como hemos comentado anteriormente este efecto puede estar relacionado con la neutralización del agente citotóxico vía formación de compuestos con el glutatión. Pero además, el estímulo observado en las vías de captación y síntesis de metionina abre la posibilidad de interpretar los procesos de resistencia a cisplatino a través de modificaciones epigenéticas, por metilación de determinadas regiones de ADN que modifiquen la expresión de los genes implicados en la respuesta. Este modelo epigenético no sería exclusivo de levaduras pues se ha visto recientemente que el cisplatino ejerce un control epigenético sobre células de cáncer de ovario (Yu *et al.*, 2011; Zeller *et al.*, 2012). Respecto a los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral en relación con la implicación de Sky1p en la respuesta a cisplatino resulta interesante señalar que precisamente la proteína Sky1p se ha demostrado que es necesaria para la activación de estas vías de síntesis y captación de compuestos con azufre.

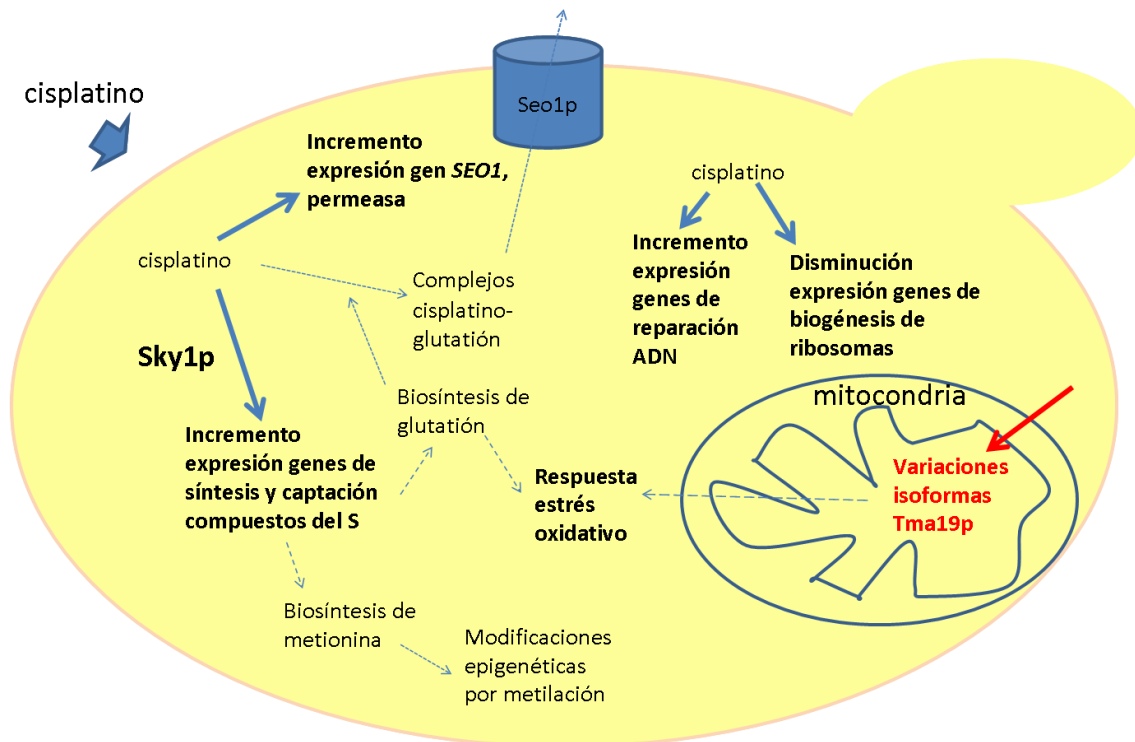
Podemos asumir, puesto que PARP está ausente, que en levaduras la muerte celular por necrosis no se desencadena por la ruta habitual en eucariotas superiores. Tal vez una señal alternativa, derivada de los resultados de nuestros estudios, pudiera estar relacionada con la observación de que el cisplatino produce en levaduras una disminución de la transcripción de genes relacionados con la biogénesis de ribosomas. La incapacidad para la síntesis y reposición de proteínas esenciales pudiera llegar a comprometer la viabilidad celular. Aunque Sky1p también afecta a genes relacionados con la biogénesis de ribosomas, nuestros estudios no parecen indicar que sea a través de mecanismos interdependientes, si nos basamos en el hecho de que los genes que varían su expresión tras el tratamiento con cisplatino y los que lo hacen tras la delección de *SKY1* son diferentes.

Respecto a las modificaciones tras el tratamiento con cisplatino que pueden afectar a la viabilidad mitocondrial y/o a la producción de ROS el dato más destacado de nuestro estudio es el encontrado respecto a la proteína mitocondrial Tma19. Tras el tratamiento con cisplatino se detectan dos

## Discusión: Mecanismos de resistencia a cisplatino en *Saccharomyces cerevisiae* y su dependencia de Sky1p.

isoformas de Tma19 del mismo pl y diferente Mr (17 y 30 kD). Esta proteína presenta especial relevancia para estudios futuros ya que es homóloga a una proteína humana (TCTP) encontrada en tumores y que está regulada traduccionalmente (Rinnerthaler *et al.*, 2006).

En la Figura 40 se muestra un resumen de los datos más relevantes obtenidos en este trabajo y de las posibles interpretaciones, interconexiones y nuevas hipótesis de trabajo que abren nuevas líneas de investigación futura.



**Figura 40.** Esquema de la respuesta a cisplatino en *S. cerevisiae* basado en los resultados obtenidos en la realización de esta Tesis Doctoral. Las flechas en trazo continuo indican datos demostrados a través de los resultados de transcriptómica (en azul) o proteómica (en rojo) y las flechas en trazo discontinuo sugieren hipótesis a comprobar en futuros experimentos.



## **CONCLUSIONES**





## Conclusiones

---

De los resultados obtenidos en este trabajo podemos extraer las siguientes conclusiones:

1.- Tras realizar un estudio de las interacciones genéticas existentes entre los genes *IXR1* y *SKY1*, en tres cepas de levaduras BY4741, W303 y BWG1-7a, al analizar los fenotipos de resistencia a cisplatino y espermina en cepas haploides  $\Delta ixr1$ ,  $\Delta sky1$  y  $\Delta ixr1\Delta sky1$  observamos:

1.1. La interacción es compleja y dependiente de cepa, existiendo un paralelismo entre los fenotipos asociados a resistencia a espermina y cisplatino.

1.2. El modelo más sencillo de interacción, efectos aditivos que indicarían que Ixr1p y Sky1p no participan en la misma cascada de respuesta, se obtiene en la cepa W303.

2.- El estudio proteómico de las variaciones en los niveles de expresión de proteínas en extractos enriquecidos en fosfoproteínas procedentes de la cepa W303 y su isogénica  $\Delta sky1$ , en condiciones control o tras tratamiento con cisplatino 600  $\mu\text{M}$  revela:

2.1. El tratamiento con cisplatino produce cambios en proteínas relacionadas con procesos de estrés oxidativo. El aumento de citotoxicidad se caracteriza por una disminución en las defensas contra el estrés oxidativo, junto con respuestas relacionadas con el daño en el ADN y las proteínas. Por el contrario, la disminución de la citotoxicidad está acompañada por un aumento en las defensas contra el estrés oxidativo. En conclusión, el destino de las células de levadura después del tratamiento con cisplatino depende del balance final entre efectos opuestos que afectan a la respuesta al estrés oxidativo y este balance se ve influenciado por la delección  $\Delta sky1$ .

2.2. El tratamiento con cisplatino produce la aparición de dos isoformas de la proteína Tma19p que es homóloga a una proteína humana identificada en tumores (TCTP). La proteína Tma19p está relacionada con el incremento de resistencia a cisplatino en la cepa  $\Delta sky1$ .

3.- El estudio de transcriptómica llevado a cabo utilizando arrays de ADN que incluyen todos los genes de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y ARN extraído de la cepa W303 y su isogénica  $\Delta sky1$ , en condiciones control o tras tratamiento con cisplatino 600  $\mu\text{M}$  revela:

## Conclusiones

---

3.1. El tratamiento con cisplatino produce un incremento de la expresión de los genes relacionados con el metabolismo de compuestos que contienen azufre y este efecto depende de la función de Sky1p.

3.2. El tratamiento con cisplatino y la delección de *SKY1* producen disminución de la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de ribosomas, pero sus genes diana no son coincidentes.

3.3. Algunos genes regulados en respuesta a la delección de *SKY1* no lo están por el tratamiento con cisplatino, lo que indica que Sky1p participa en otras funciones en la célula. Entre los genes que incrementan su expresión en la cepa  $\Delta sky1$  se incluyen algunos relacionados con procesos biológicos como la oxidación de ácidos grasos, el ciclo del glioxalato o rutas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos. También se incluyen diversos genes de localización cercana a los telómeros, entre ellos varios de la familia de genes de biosíntesis de tiamina. Entre los que disminuyen su expresión en la cepa  $\Delta sky1$  se incluyen algunos relacionados con la biogénesis de los ribosomas, la biosíntesis de glutamato y la desfosforilación.

## **BIBLIOGRAFÍA**



## Bibliografía

---

- Abada P., Howell SB. Hindawi Publishing Corporation Metal-Based Drugs Volume 2010, Article ID317581, 9pages.
- Adams JA. (2001) Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chem. Rev.* **101**: 2271-2290.
- Adams JA., Taylor SS. (1993) Divalent metal ions influence catalysis and active-site accessibility in the cAMP-dependent protein kinase. *Protein Sci.* **2**: 2177-2186.
- Aiken, C.T.; Kaake, R.M.; Wang, X.; Huang, L. (2011) Oxidative stress-mediated regulation of proteasome complexes. *Mol. Cell. Proteomics.* **10(5)**, R110.006924.
- Albuquerque CP., Smolka MB., Payne SH., Bafna V., Eng J., Zhou H. (2008) A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis. *Mol. Cell. Proteomics.* **7(7)**: 1389-1396.
- Alzhanova-Ericsson AT., Sun X., Visa N., Kiseleva E., Wurtz T., Daneholt B. (1996) A protein of the SR family of splicing factors binds extensively to exonic Balbiani ring pre-mRNA and accompanies the RNA from the gene to the nuclear pore. *Genes & Dev.* **10**: 2881–2893.
- Amoutzias GD., He Y., Lilley KS., Van de Peer Y., Oliver SG. (2012) Evaluation and properties of the budding yeast phosphoproteome. *Mol. Cell. Proteomics.* doi: 10.1074/mcp.M111.009555 .
- Ariño J., Ramos J., Sychrova H. (2010) Alkali Metal Cation Transport and Homeostasis in Yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev.* **74**: 95–120.
- Aubol BE., Nolen B., Shaffer J., Ghosh G., Adams JA. (2003) Novel Destabilization of Nucleotide Binding by the  $\gamma$  Phosphate of ATP in the Yeast SR Protein Kinase Sky1p. *Biochemistry.* **42**: 12813-12820.
- Aubol BE., Nolen B., Vu D., Ghosh G., Adams JA. (2002) Mechanistic Insights into Sky1p, a Yeast Homologue of the Mammalian SR Protein Kinases. *Biochemistry.* **41**: 10002-10009.
- Bachrach U., Wang YC., Tabib A. (2001) Polyamines: new cues in cellular signal transduction. *News Physiol. Sci.* **16**:106–109.
- Basu A., Krishnamurthy S. (2010) Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *J. Nucleic Acids.* **2010(ID 201367)**: 16 pag.
- Benjamini Y., Hochberg Y. (1995) Controlling the False Discovery Rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological).* **57(1)**: 289-300.
- Berners-Price SJ., Kuchel PW. (1990) Reaction of cis- and trans-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] with reduced glutathione inside human red blood cells, studied by <sup>1</sup>H and <sup>15</sup>N-[<sup>1</sup>H] DEPT NMR. *J Inorg Biochem.* **38(4)**: 327-45.
- Birney E., Kumar S., Krainer AR. (1993) Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: Conservation in metazoan premRNA splicing factors. *Nucleic Acids Res.* **21**: 5803–5816.
- Bjellqvist B., Ek K., Righetti PG., *et al.* (1982) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods.* **6**: 317-39.
- Blackstock WP., Weir MP. (1999) Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.* **17(3)**: 121-7
- Bordallo J., Suarez-Rendueles P. (1993) Control of *Saccharomyces cerevisiae* carboxypeptidase S (CPS1) gene expression under nutrient limitation. *Yeast.* **9(4)**: 339-349.

## Bibliografía

---

- Bouchoux C., Hautbergue G., Grenetier S., Carles C., Riva M., Goguel V. (2004) CTD kinase I is involved in RNA polymerase I transcription. *Nucleic Acids Res.* **32(19)**: 5851-60.
- Bradford AA. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.
- Breitskreutz A. *et al.* (2010) A global protein kinase and phosphatase interaction network in yeast. *Science.* **328(5981)**: 1043-6.
- Brown SJ., Kellett PJ., Lippard SJ. (1993) Ixr1, a yeast protein that binds to platinated DNA and confers sensitivity to cisplatin. *Science.* **261(5121)**: 603–605.
- Bucheli ME., Buratowski S. (2005) Npl3 is an antagonist of mRNA 3' end formation by RNA polymerase II. *EMBO J.* **24**: 2150–2160.
- Bucheli ME., He X., Kaplan CD., Moore CL., Buratowski S. (2007) Polyadenylation site choice in yeast is affected by competition between Npl3 and polyadenylation factor CFI. *RNA.* **13**: 1756–1764.
- Burger H., Capello A., Schenk PW., Stoter G., Brouwer J., Nooter K. (2000) A genome-wide screening in *Saccharomyces cerevisiae* for genes that confer resistance to the anticancer agent cisplatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269(3)**: 767–774.
- Bustin SA. (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* **29(1)**: 23-39.
- Caba E., Dickinson DA., Warnes GR., Aubrecht J. (2005) Differentiating mechanisms of toxicity using global gene expression analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res.* **575**: 34-46.
- Caceres JF., Sreaton GR., Krainer AR. (1998) A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes & Dev.* **12**: 55–66.
- Castro-Prego R., Lamas-Maceiras M., Soengas P., Carneiro I., González-Siso I., Cerdán ME. (2010) Regulatory factors controlling transcription of *Saccharomyces cerevisiae* *IXR1* by oxygen levels: a model of transcriptional adaptation from aerobiosis to hypoxia implicating *ROX1* and *IXR1* cross-regulation. *Biochem. J.* **425(1)**: 235–243.
- Cavill R., Kamburov A., Ellis JK., Athersuch TJ., Blagrove MS., Herwig R., Ebbels TM., Keun HC. (2011) Consensus-phenotype integration of transcriptomic and metabolomic data implies a role for metabolism in the chemosensitivity of tumour cells. *PLoS Comput Biol.* **7**: e1001113.
- Chi A., Huttenhower C., Geer LY., Coon JJ., Syka JE., Bai DL., Shabanowitz J., Burke DJ., Troyanskaya OG., Hunt DF. (2007) Analysis of phosphorylation sites on proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104(7)**: 2193-2198.
- Cohen P. (2002) Protein kinases the major drug targets of the twenty-first century. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**: 309–315.
- Daneholt B. (1997) A look at messenger RNP moving through the nuclear pore. *Cell.* **88**: 585–588.
- Davies BSJ., Rine J. (2006) A role for sterol levels in oxygen sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **174(1)**: 191–201.

## Bibliografía

---

- de Vogel S., Dindore V., van Engeland M., Goldbohm RA., van den Brandt PA., Weijnenberg MP. (2008) Dietary folate, methionine, riboflavin, and vitamin B-6 and risk of sporadic colorectal cancer. *J Nutr.* **138(12)**: 2372-8.
- Denis V., Daignan-Fornier B. (1998) Synthesis of glutamine, glycine and 10-formyl tetrahydrofolate is coregulated with purine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* **259(3)**: 246-55.)
- Dermody JL., Dreyfuss JM., Villen J., Ogundipe B., Gygi SP., Park PJ. (2008) Unphosphorylated SR-like protein Npl3 stimulates RNA polymerase II elongation. *PLoS ONE.* **3(9)**:e3273.
- Ding JH., Zhong XY., Hagopian JC., Cruz MM., Ghosh G., Feramisco J., Adams JA., Fu XD. (2006) Regulated cellular partitioning of SR protein-specific kinases in mammalian cells. *Mol Biol Cell.* **17**: 876–885.
- Dreyfuss G., Matunis MJ., Pinol-Roma S., Burd CG. (1993) hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem.* **62**: 289–321.
- Drygin D., Lin A., Bliesath J., Ho CB., O'Brien SE., Proffitt C., Omori M., Haddach M., Schwaebe MK., Siddiqui-Jain A., Streiner N., Quin JE., Sanij E., Bywater MJ., Hannan RD., Ryckman D., Anderes K., Rice WG. (2011) Targeting RNA polymerase I with an oral small molecule CX-5461 inhibits ribosomal RNA synthesis and solid tumor growth. *Cancer. Res.* **71(4)**:1418-30.
- Drygin D., Rice WG., Grummt I. (2010) The RNA polymerase I transcription machinery: an emerging target for the treatment of cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **50**: 131-56. Review.
- Eastman A. (1987) The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacology and Therapeutics.* **34**: 155–166.
- Eastman A. (1990) Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer Cell.* **2(8-9)**: 275-280.
- Einhorn LH. (2002) Curing metastatic testicular cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 4592–4595.
- Englard S., Seifter S. (1990) Precipitation techniques. *Methods Enzymol.* **182**: 285-300.
- Erez O., Goldstaub D., Friedman J., Kahana C. (2002) Putrescine activates oxidative stress dependent apoptotic death in ornithine decarboxylase overproducing mouse myeloma cells. *Exp Cell Res.* **281**: 148–156.
- Erez O., Kahana C. (2001) Screening for modulators of spermine tolerance identifies Sky1, the SR protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, as a regulator of polyamine transport and ion homeostasis. *Mol Cell Biol.* **21(1)**: 175–184.
- Erez O., Kahana C. (2002) Deletions of *SKY1* or *PTK2* in the *Saccharomyces cerevisiae*  $\Delta trk1\Delta trk2$  mutant cells exert dual effect on ion homeostasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**: 1142–1149.
- Estrella LA., Wilkinson MF., González CI. (2009) The shuttling protein Npl3 promotes translation termination accuracy in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **394**: 410–422.
- Farah ME., Sirotkin V., Haarer B., Kakhniashvili D., Amberg DC. (2011) Diverse protective roles of the actin cytoskeleton during oxidative stress. *Cytoskeleton (Hoboken).* **68(6)**: 340-354.

## Bibliografía

---

- Ficarro SB., McClelland ML., Stukenberg PT., Burke DJ., Ross MMJ., Hunt DF., White FM. (2002) Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol.* **20(3)**: 301-305.
- Forment J., Mulet JM., Vicente O., Serrano R. (2002) The yeast SR protein kinase Sky1p modulates salt tolerance, membrane potential and the Trk1,2 potassium transporter. *Biochim. Biophys. Acta.* **1565**: 36–40.
- Fourrier L., Brooks P., Malinge JM. (2003) Binding discrimination of MutS to a set of lesions and compound lesions (base damage and mismatch) reveals its potential role as a cisplatin-damaged DNA sensing protein. *Journal of Biological Chemistry.* **278**: 21267–21275.
- Fox ME., Feldman BJ., Chu G. (1994) A novel role for DNA photolyase: binding to DNA damaged by drugs is associated with enhanced cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **14**: 8071–8077.
- Fu XD. (1995) The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *RNA.* **1**: 663–680.
- Fuertes *et al.*, 2002. PLoS One. 2011;6(12):e29450.
- Gauss R., Kanehara K., Carvalho P., Ng DT., Aebi M. (2011) A complex of Pdi1p and the mannosidase Htm1p initiates clearance of unfolded glycoproteins from the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell.* **42(6)**: 782-793.
- Ghaemmaghami S., Huh WK., Bower K., Howson RW., Belle A., Dephoure N., O'Shea EK., Weissman JS. (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature.* **425(6959)**: 737-741.
- Giannakouros T., Nikolakaki E., Mylonis I., Georgatsou E. (2011) Serine-arginine protein kinases: a small protein kinase family with a large cellular presence. *FEBS Journal.* **278**: 570–586.
- Gietz RD., Sugino A. (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene.* **74**: 527-534.
- Gilbert W., Guthrie C. (2004) The Glc7p nuclear phosphatase promotes mRNA export by facilitating association of Mex67p with mRNA. *Mol. Cell.* **13**: 201–212.
- Gilbert W., Siebel CW., Guthrie C. (2001) Phosphorylation by Sky1p promotes Npl3p shuttling and mRNA dissociation. *RNA.* **7**: 302–313.
- Gleason JE., Corrigan DJ., Cox JE., Reddi AR., McGinnis LA., Culotta VC. (2011) Analysis of hypoxia and hypoxia-like states through metabolite profiling. *PLoS One.* **6(9)**: e24741.
- Goossens A., De La Fuente N., Forment J., Serrano R., Portillo F. (2000) Regulation of yeast H<sup>(+)</sup>-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 7654–7661.
- Gorg A., Postel W., Gunther S. (1988) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* **9**: 531-46.
- Groll M.; Heinemeyer W.; Jager S.; Ullrich T.; Bochtler M.; Wolf DH.; Huber R. (1999) The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96(20)**: 10976-10983.



## Bibliografía

---

- Gruhler A., Olsen JV., Mohammed S., Mortensen P., Faergeman NJ., Mann M., Jensen ON. (2005) Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway. *Mol. Cell. Proteomics*. **4(3)**: 310-327.
- Gui JF., Lane WS., Fu XD. (1994a) A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature*. **369**: 678–682.
- Gui JF., Tronchere H., Chandler SD., Fu XD. (1994b) Purification and characterization of a kinase specific for the serine and arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *Proc Natl Acad. Sci*. **91**: 10824–10828.
- Guisbert K., Duncan K., Li H., Guthrie C. (2005) Functional specificity of shuttling hnRNPs revealed by genome-wide analysis of their RNA binding profiles. *RNA*. **11**: 383–393.
- Häcker S., Krebber H. (2004) Differential Export Requirements for Shuttling Serine/Arginine-type mRNA-binding Proteins. *J Biol Chem* . **279**: 5049–5052.
- Hayes GM., Carrigan PE., Beck AM., Miller LJ. (2006) Targeting the RNA splicing machinery as a novel treatment strategy for pancreatic carcinoma. *Cancer Res*. **66**: 3819–3827.
- Hayes GM., Carrigan PE., Miller LJ. (2007) Serinearginine protein kinase 1 overexpression is associated with tumorigenic imbalance in mitogen-activated protein kinase pathways in breast, colonic, and pancreatic carcinomas. *Cancer Res*. **67**: 2072–2080.
- Heid CA., Stevens J., Williams PM. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res*. **6(10)**: 986-994.
- Heidrich K., Otto A., Behlke J., Rush J., Wenzel KW., Kriegel T. (1997) Autophosphorylation-inactivation site of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*. **36(8)**: 1960-1964.
- Henry M., Borland CZ., Bossie M., Silver PA. (1996) Potential RNA binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae* identified as suppressors of temperature-sensitive mutations in *NPL3*. *Genetics*. **142**: 103–115.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. **11(9)**: 1026-1030.
- Hishizawa M., Imada K., Sakai T., Ueda M., Hori T., Uchiyama T. (2005) Serological identification of adult T-cell leukaemia-associated antigens. *Br J Haematol*. **130**: 382–390.
- Hoffman CS., Winston F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*. **57**: 267-272.
- Hogan DJ., Riordan DP., Gerber AP., Herschlag D., Brown PO. (2008) Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS Biol*. **6(10)**: e255.
- Holzer AK., Howell SB. (2006) The internalization and degradation of human copper transporter 1 following cisplatin exposure. *Cancer Res*. **66(22)**: 10944-52.
- Holzer AK., Katano K., Klomp LW., Howell SB. (2004) Cisplatin rapidly down-regulates its own influx transporter hCTR1 in cultured human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res*. **10(19)**: 6744-9.

## Bibliografía

---

- Hostetter RB., Yan M., Vaghefi H., Pennington K., Cornette G. (2012) The first documented case of high-grade synovial cell sarcoma of the rectum. *J Natl Compr Canc Netw.* **10(8)**: 947-50.
- Huang RY., Eddy M., Vujcic M., Kowalski D. (2005) Genomewide screen identifies genes whose inactivation confer resistance to cisplatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cancer Res.* **65**: 5890– 5897.
- Huang Y., Yario TA. Steitz JA. (2004) A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 9666–9670.
- Huber A., Bodenmiller B., Uotila A., Stahl M., Wanka S., Gerrits B., Aebersold R., Loewith R. (2009) Characterization of the rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis. *Genes Dev.* **23(16)**: 1929-1943.
- Hurt E., Luo MJ., Rother S., Reed R, Strasser K. (2004) Cotranscriptional recruitment of the serine– arginine-rich (SR)-like proteins Gbp2 and Hrb1 to nascent mRNA via the TREX complex. *Proc. Natl Acad. Sci.* **101**: 1858–1862.
- Igarashi K., Kashiwagi K. (2000) Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**: 559–564.
- Iraz M., Ozerol E., Gulec M., Tasdemir S., Idiz N., Fadillioglu E., Naziroglu M., Akyol O. (2006) Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) administration on cisplatin-induced oxidative damage to liver in rat. *Cell Biochemistry and Function.* **24**: 357-361.
- Ishida S., Lee J., Thiele DJ., Herskowitz I. (2002) Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99(22)**: 14298-302.
- Isnard AD., Thomas D., Surdin-Kerjan Y. (1996) The study of methionine uptake in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a new family of amino acid permeases. *J MolBiol.* **262(4)**: 473-84.
- Ito H., Fukuda Y., Murata K., Kimura A. (1983) Transformation of intact yeast treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168.
- Izaurralde E. (2004) Directing mRNA export. *Nature Structural & Molecular Biology.* **11**: 210–212.
- Jamieson E.R., Lippard S.J. (1999) Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chemical Reviews.* **99**: 2467–2498.
- Johnson L.N.(2009) The regulation of protein phosphorylation. *Biochem Soc Trans.* **37**:627-41.
- Johnson SW., Ferry KV., Hamilton TC. (1998) Recent insights into platinum drug resistance in cancer. *Drug Resist Updates.* **1**: 243–254.
- Johnson TD. (1996) Modulation of channel function by polyamines. *Trends Pharmacol. Sci.* **17**: 22–27.
- Jordan P., Carmo-Fonseca M. (1998) Cisplatin inhibits synthesis of rRNA in vivo. *Nucleic Acids Res.* **26**: 2831–6.
- Jurica MS., Moore MJ. (2003) Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol. Cell.* **12**: 5–14.
- Kaouass M., Audette M., Ramotar D., Verma S., De Montigny D., Gamache I. *et al.*, (1997) The *STK2* gene, which encodes a putative Ser/Thr protein kinase, is required for high-affinity spermidine transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 2994–3004.

## Bibliografía

---

- Kartalou M., Essigmann JM. (2001) Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutat Res-Rev Mutat.* **478**: 1–21.
- Kastanos EK., Woldman YY., Appling DR. (1997) Role of mitochondrial and cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase isozymes in *de novo* purine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry.* **36(48)**: 14956-14964.
- Kataoka N., Bachorik JL., Dreyfuss G. (1999) Transportin-SR, a nuclear import receptor for SR proteins. *J. Cell Biol.* **145**: 1145–1152.
- Kawabe T., Chen Z., Wada M., Uchiumi T., Ono M., Akiyama S., Kuwano M. (1999) Enhanced transport of anticancer agents and leukotriene C4 by the human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT/MRP2). *FEBS Lett.* **456**: 327–331.
- Kelland L. (2007) The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer.* **7**: 573–584.
- Kerr JFR., Winterford CM., Harmon BV. (1994) Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer.* **73**: 2013–2026.
- Khan SA., Priyamvada S., Khan W., Khan S., Farooq N., Yusufi AN. (2009) Studies on the protective effect of green tea against cisplatin induced nephrotoxicity. *Pharmacological Research.* **60**: 382-391.
- Kim IS., Sohn HY., Jin I. (2011) Adaptive stress response to menadione-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. *J. Microbiol.* **49(5)**: 816-823.
- Kim M., Lim JH., Ahn CS., Park K., Kim GT., Kim WT., Pai HS. (2006) Mitochondria-associated hexokinases play a role in the control of programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell.* **18(9)**: 2341-2355.
- Koizumi J., Okamoto Y., Onogi H., Mayeda A., Krainer AR., Hagiwara M. (1999) The subcellular localization of SF2/ASF is regulated by direct interaction with SR protein kinases (SRPKs). *J Biol Chem.* **274**: 11125–11131.
- Komatsu M., Sumizawa T., Mutoh M., Chen ZS., Terada K., Furukawa, T., Yang XL., Gao H., Miura N., Sugiyama T., Akiyama S. (2000) Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance. *Cancer Res.* **60**: 1312–1316
- Komiya S., Gebhardt MC., Mangham DC., Inoue A. (1998) Role of glutathione in cisplatin resistance in osteosarcoma cell lines. *J Orthop Res.* **16(1)**: 15-22.
- Konrad M. (1992) Cloning and expression of the essential gene for guanylate kinase from yeast. *J. Biol. Chem.* **267(36)**: 25652-25655.
- Kooistra R., Hooykaas PJJ., Steensma HY. (2004) Efficient gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. *Yeast.* **21**: 781-792.
- Kowalska E., Kozik A. (2008) The genes and enzymes involved in the biosynthesis of thiamin and thiamin diphosphate in yeasts. *Cell Mol Biol Lett.* **13(2)**: 271-82.
- Kowalski D., Pendyala L., Daignan-Fornier B., Howell SB., Huang RY. (2008) Dysregulation of purine nucleotide biosynthesis pathways modulates cisplatin cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Pharmacol.* **74(4)**: 1092-1100.
- Kraulis PJ. (1991) MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **24**: 946–950.

## Bibliografía

---

- Kress TL., Krogan NJ., Guthrie C. (2008) A single SR-like protein, Npl3, promotes pre-mRNA splicing in budding yeast. *Mol. Cell.* **32**: 727–734.
- Kuroyanagi N., Onogi H., Wakabayashi T., Hagiwara M. (1998) Novel SR-protein-specific kinase, SRPK2, disassembles nuclear speckles. *Biochem Biophys Res Commun.* **242**: 357–364.
- Laboissiere MC., Sturley SL., Raines RT. (1995) The essential function of protein-disulfide isomerase is to unscramble non-native disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* **270(47)**: 28006-28009.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-5.
- Lai MC., Lin RL., Tarn WY. (2001) Transportin-SR2 mediates nuclear import of phosphorylated SR proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 10154–10159.
- Larson CA., Adams PL, Jandial DD., Blair BG., Safaei R., Howell SB. (2010) The role of the N-terminus of mammalian copper transporter1 in the cellular accumulation of cisplatin. *Biochemical Pharmacology.* **80(4)**: 448–454.
- Lee J., Spector D., Godon C., Labarre J., Toledano MB. (1999) A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense properties in yeast. *J. Biol. Chem.* **274(8)**: 4537-4544.
- Lei EP., Krebber H., Silver PA. (2001) Messenger RNAs are recruited for nuclear export during transcription. *Genes Dev.* **15**: 1771–1782.
- Li Q., Harvey LM., McNeil B. (2009) Oxidative stress in industrial fungi. *Critical. Reviews in Biotechnology.* **29**: 199-213.
- Li X., Gerber SA., Rudner AD., Beausoleil SA., Haas W., Villen J., Elias JE., Gygi SP. (2007) Large-scale phosphorylation analysis of alpha-factor-arrested *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Proteome Res.* **6(3)**: 1190-1197.
- Li ZS., Lu YP., Zhen RG., Szczypka M., Thiele DJ., Rea PA. (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94(1)**:42-7.
- Lieser SA., Aubol BE., Wong., Jennings PA., Adams JA. (2005) Coupling phosphoryl transfer and substrate interactions in protein kinases. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1754**: 191–199
- Liu Q., Dreyfuss G. (1995) *In vivo* and *in vitro* arginine methylation of RNA-binding proteins. *Mol Cell Biol.* **15**: 2800–2808.
- Livak KJ., Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods 2001.* **25(4)**: 402-408.
- Lokich J., Anderson N. (1998) Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature. *Ann. Oncol.* **9(1)**: 13–21.
- Lucibello M., Gambacurta A., Zonfrillo M., Pierimarchi P., Serafino A., Rasi G., Rubartelli A., Garaci E. (2011) *TCTP* is a critical survival factor that protects cancer cells from oxidative stress-induced cell-death. *Exp. Cell Res.* **317(17)**: 2479-2489.
- Lukasiewicz R., Nolen B., Adams JA., Ghosh G. (2007a) The RGG Domain of Npl3p Recruits Sky1p Through Docking Interactions. *J. Mol. Biol.* **367**: 249–261.
- Lukasiewicz R., Velazquez-Dones A., Huynh N., Hagopian J., Fu XD., Adams J., Ghosh G. (2007b) Structurally Unique Yeast and Mammalian

## Bibliografía

---

- Serine-Arginine Protein Kinases Catalyze Evolutionarily Conserved Phosphorylation Reactions. *J Biol Chem.* **282**: 23036–23043.
- Lushcha VI. (2011) Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology and Pharmacology : CBP.* **153**: 175-190.
  - Lushchak VI. (2010) Oxidative stress in yeast. *Biochemistry.Biokhimiia.* **75**: 281-296.
  - Madrid R., Gomez MJ., Ramos J., Rodriguez-Navarro A. (1998) Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J. Biol. Chem.* **273**: 14838–14844.
  - Maniatis A., Tsakanikas S., Stamatellou M., Papanastasiou K. (1989) Intermediate-dose melphalan for refractory myeloma. *Blood.* **74(3)**: 1177.
  - Manning G., Whyte D. B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science.* **298**: 1912–1934.
  - Mansour HH., Hafez HF., Fahmy NM. (2006) Silymarin modulates cisplatin-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* **39**: 656-661.
  - Martins NM., Santos NA., Curti C., Bianchi ML., Santos AC. (2008) Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver. *J. Appl. Toxicol.* **28(3)**: 337-344.
  - McA'Nulty MM., Lippard SJ. (1996) The HMG-domain protein Ixr1 blocks excision repair of cisplatin–DNA adducts in yeast. *Mutat. Res.* **362(1)**: 75–86.
  - McA'Nulty MM., Whitehead JP. Lippard SJ. (1996) Binding of Ixr1, a yeast HMGdomain protein, to cisplatin-DNA adducts *in vitro* and *in vivo*. *Biochemistry.* **35**: 6089-6099.
  - McBride AE., Cook JT., Stemmler EA., Rutledge KL., McGrath KA., Rubens JA. (2005) Arginine methylation of yeast mRNA-binding protein Npl3 directly affects its function, nuclear export, and intranuclear protein interactions. *J. Biol. Chem.* **280**: 30888–30898.
  - McCormack SA., Johnson LR. (2001) Polyamines and cell migration. *J. Physiol. Pharmacol.* **52**: 327–349.
  - McDonagh B., Ogueta S., Lasarte G., Padilla CA., Barcena JA. (2009) Shotgun redox proteomics identifies specifically modified cysteines in key metabolic enzymes under oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Proteomics.* **72(4)**: 677-689.
  - McDougall KJ., Lemontt JF. (1979) Effects of spermine on the detection of induced forward mutation at the Can1 locus in yeast: evidence for selection against canavanine-resistant mutants. *Mutat. Res.* **63(1)**: 21–34.
  - Medina I., Carbonell J., Pulido L., Madeira SC., Goetz S., Conesa A., Tarraga J., Pascual-Montano A., Nogales-Cadenas R., Santoyo J., Garcia F., Marba M., Montaner D., Dopazo J. (2010) Babelomics: an integrative platform for the analysis of transcriptomics, proteomics and genomic data with advanced functional profiling. *Nucleic Acids Res.* **38(Web Server issue)**: W210-3.

## Bibliografía

---

- Mirzaei H., Regnier F. (2008) Protein:protein aggregation induced by protein oxidation. *J. Chromatogr. B. Analyt Technol. Biomed. Life. Sci.* **873(1)**: 8-14.
- Misteli T., Spector DL. (1999) RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites *in vivo*. *Mol. Cell.* **3**: 697–705.
- Montanes FM., Pascual-Ahuir A., Proft M. (2011) Repression of ergosterol biosynthesis is essential for stress resistance and is mediated by the Hog1 MAP kinase and the Mot3 and Rox1 transcription factors. *Mol. Microbiol.* **79(4)**: 1008-1023.
- Morgan DM. (1999) Polyamines: an overview. *Mol. Biotechnol.* **11**: 229–250.
- Moura DJ., Castilhos B., Immich BF., Cañedo AD., Henriques JA., Lenz G., Saffi J. (2010) Kin3 protein, a NIMA-related kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, is involved in DNA adduct damage response. *Cell Cycle.* **9(11)**: 2220-9.
- Mulet JM., Leube MP., Kron SJ., Rios G., Fink GR., Serrano R. (1999) A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 3328–3337.
- Nagatani G., Nomoto M., Takano H., Ise T., Kato K., Imamura T., Izumi H., Makishima K., Kohno K. (2001) Transcriptional activation of the human *HMG1* gene in cisplatin-resistant human cancer cells. *Cancer Research.* **61**: 1592-1597.
- Nagy Z., Montigny C., Leverrier P., Yeh S., Goffeau A., Garrigos M., Falson P. (2006) Role of the yeast ABC transporter Yor1p in cadmium detoxification. *Biochimie.* **88(11)**: 1665-71.
- Nakielny S., Dreyfuss G. (1997) Nuclear export of proteins and RNAs. *Curr Opin Cell Biol.* **9**: 420–429.
- Nakielny S., Fischer U., Michael WM., Dreyfuss G. (1997) RNA transport. *Annu Rev Neurosci.* **20**: 269–301.
- Nicolet CM., Craig EA. (1989) Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **9(9)**: 3638-3646.
- Niedner H., Christen R., Lin X., Kondo A., Howell SB. (2001) Identification of genes that mediate sensitivity to cisplatin. *Mol Pharmacol.* **60**: 1153–1160.
- Nikolakaki E., Kohen R., Hartmann AM., Stamm S., Georgatsou E., Giannakouros T. (2001) Cloning and characterization of an alternatively spliced form of SR protein kinase 1 that interacts specifically with scaffold attachment factor B. *J Biol Chem.* **276**: 40175–40182.
- Nolen B., Ngo J., Chakrabarti S., Vu D., Adams JA., Ghosh G. (2003) Nucleotide-induced conformational changes in the *Saccharomyces cerevisiae* SR protein kinase, Sky1p, revealed by X-ray crystallography. *Biochemistry.* **42**: 9575-9585.
- Nolen B., Yun CY., Wong CF., McCammon JA., Fu XD., Ghosh G. (2001) The structure of Sky1p reveals a novel mechanism for constitutive activity. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 176–183.
- Nozaki T., Nishimura K., Michael AJ., Maruyama T., Kakinuma Y., Igarashi K. (1996) A second gene encoding a putative serine/threonine protein kinase which enhances spermine uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **228**: 452–458.

## Bibliografía

---

- Oliva R., Dixon GH. (1991) Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **40**: 25–94.
- Omri E., Chain K. (2000) Screening for modulators of spermine tolerance identifies Sky1, the SR protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, as a regulator of polyamine transport and ion homeostasis. *Mol Cell Biol.* **21(1)**: 175-84
- Ooi CE., Rabinovich E., Dancis A., Bonifacino JS., Klausner RD. (1996) Copper-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane copper transporter Ctr1p in the apparent absence of endocytosis. *EMBO J.* **15**: 3515–23.
- Opekarová M., Robl I., Tanner W. (2002) Phosphatidyl ethanolamine is essential for targeting the arginine transporter Can1p to the plasma membrane of yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* **1564(1)**: 9–13.
- Ortiz DF., Ruscitti T., McCue KF., Ow DW. (1995) Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J Biol Chem.* **270(9)**: 4721-8.
- Ostapenko D., Solomon MJ. (2005) Phosphorylation by Cak1 regulates the C-terminal domain kinase Ctk1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **25(10)**: 3906-13.
- Pandey A., Mann M. (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature.* **405**: 837-46.
- Papouli E., Cejka P., Jiricny J. (2004) Dependence of the cytotoxicity of DNA-damaging agents on the mismatch repair status of human cells. *Cancer Research.* **64**: 3391–3394.
- Papoutsopoulou S., Nikolakaki E., Chalepakis G., Krufft V., Chevaillier P., Giannakouros T. (1999) SR protein – specific kinase 1 is highly expressed in testis and phosphorylates protamine 1. *Nucleic Acids Res.* **15**: 2972–2980.
- Park JN., Sohn MJ., Oh DB., Kwon O., Rhee SK., Hur CG., Lee SY., Gellissen G., Kang HA. (2007) Identification of the cadmium-inducible *Hansenula polymorpha* SEO1 gene promoter by transcriptome analysis and its application to whole-cell heavy-metal detection systems. *Appl Environ Microbiol.* **73(19)**: 5990-6000.
- Pegg AE. (1988) Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. *Cancer Res.* **48**: 759–774.
- Pena MM., Puig S, Thiele DJ. (2000) Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *J Biol Chem.* **275(43)**: 33244-51.
- Perez RP. (1998) Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur J Cancer.* **34**: 1535-42.
- Petti AA., Crutchfield CA., Rabinowitz JD., Botstein D. (2011) Survival of starving yeast is correlated with oxidative stress response and nonrespiratory mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108(45)**: E1089-98.
- Pollard VW., Michael WM., Nakielny S., Siomi MC., Wang F., Dreyfuss G. (1996) A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell.* **86**: 985–994.
- Pratibha R., Sameer R., Rataboli PV., Bhiwgade DA., Dhume CY. (2006) Enzymatic studies of cisplatin induced oxidative stress in hepatic tissue of rats. *European Journal of Pharmacology.* **532**: 290-293.

## Bibliografía

---

- Pratt WB., Ruddon RW., Ensminger WD., Maybaum J. (1994) The Anticancer Drugs. *Oxford University Press, New York, NY*.
- Preta G., de Klark R., Chakraborti S., & Glas, R. (2010) MAP kinase-signaling controls nuclear translocation of tripeptidyl-peptidase II in response to DNA damage and oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **399**: 324-330.
- Prévéral S., Gayet L., Moldes C., Hoffmann J., Mounicou S., Gruet A., Reynaud F., Lobinski R., Verbavatz JM., Vavasseur A., Forestier C. (2009) A common highly conserved cadmium detoxification mechanism from bacteria to humans: heavy metal tolerance conferred by the ATP-binding cassette (ABC) transporter SpHMT1 requires glutathione but not metal-chelating phytochelatin peptides. *J Biol Chem*. **284(8)**:4936-43.
- Ptacek J., Devgan G., Michaud G., Zhu H., Zhu H. (2005) Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature*. **438**: 679–684.
- Pujol N., Bonet C., Vilella F., Petkova MI., Mozo-Villarias A., de la Torre-Ruiz MA. (2009) Two proteins from *Saccharomyces cerevisiae*: Pfy1 and Pkc1, play a dual role in activating actin polymerization and in increasing cell viability in the adaptive response to oxidative stress. *FEMS Yeast Res*. **9(8)**: 1196-1207.
- Rabilloud T. (1996) Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis*. **17**: 813-29.
- Rho SB., Lee JH., Park MS., Byun HJ., Kang S., Seo SS., Kim JY., Park SY. (2011) Anti-apoptotic protein TCTP controls the stability of the tumor suppressor p53. *FEBS Lett*. **585(1)**: 29-35.
- Rinnerthaler M., Jarolim S., Heeren G., Palle E., Perju S., Klinger H., Bogengruber E., Madeo F., Braun RJ., Breitenbach-Koller L., Breitenbach M., Laun P. (2006) *MMI1* (YKL056c, *TMA19*), the yeast orthologue of the translationally controlled tumor protein (TCTP) has apoptotic functions and interacts with both microtubules and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*. **1757(5-6)**: 631-638.
- Ririe KM., Rasmussen RP., Wittwer CT. (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*. **245**: 154-160.
- Robinson MD., Grigull J., Mohammad N., Hughes TR. (2002) FunSpec: a webbased cluster interpreter for yeast. *BMC Bioinformatics*. **3**: 35.
- Rodrigues MA., Rodrigues JL., Martins NM., Barbosa F., Curti C., Santos NA., Santos AC. (2011) Carvedilol protects against cisplatin-induced oxidative stress, redox state unbalance and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Chemico-Biological Interactions*. **189**: 45-51.
- Röther S., Strässer K. (2007) The RNA polymerase II CTD kinase Ctk1 functions in translation elongation. *Genes Dev*. **21(11)**: 1409-21.
- Ruiz-Romero C., Lopez-Armada MJ., Blanco FJ. (2006) Mitochondrial proteomic characterization of human normal articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. **14(6)**: 507-518.
- Saint-Prix F., Bonquist L., Dequin S. (2004) Functional analysis of the ALD gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: the NADP<sup>+</sup>-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation. *Microbiology*. **150(Pt 7)**: 2209-2220.



## Bibliografía

---

- Sakamoto AN., Stone JE., Kissling GE., Mcculloch SD., Pavlov YI., Kunkel TA. (2007) Mutator alleles of yeast DAN polymerasa Z. *DNA repair*. **6(12)**: 1829-1838.
- Sambrook J., Fritsch EJ., Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. Cold Spring Harbor. N.Y.
- Sanford JR., Ellis J., Caceres JF. (2005) Multiple roles of arginine/serine-rich splicing factors in RNA processing. *Biochem. Soc. Trans.* **33**: 443–446.
- Santos NA., Bezerra CS., Martins NM., Curti C., Bianchi ML., Santos AC. (2008) Hydroxyl radical scavenger ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by preventing oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **61(1)**: 145-155.
- Satoh M., Shimada A., Zhang B., Tohyama C. (2000) Renal toxicity caused by cisplatin in glutathione-depleted metallothionein-null mice. *Biochemical Pharmacology*. **60**: 1729-1734.
- Schenk PW, Boersma AWM, Brandsma JA, den Dulk H, Burger H, Stoter G, Brouwer J, and Nooter K (2001) SKY1 is involved in cisplatin-induced cell kill in *Saccharomyces cerevisiae*, and inactivation of its human homologue, SRPK1, induces cisplatin resistance in a human ovarian carcinoma cell line. *Cancer Res* **61(19)**:6982–6986.
- Schenk PW, Boersma AWM, Brok M, Burger H, Stoter G, and Nooter K (2002) Inactivation of the *Saccharomyces cerevisiae* SKY1 gene induces a specific modification of the yeast anticancer drug sensitivity profile accompanied by a mutator phenotype. *Mol Pharmacol* **61(3)**:659–666.
- Schenk PW, Brok M, Boersma AWM, Brandsma JA, den Dulk H, Burger H, Stoter G, Brouwer J, and Nooter K (2003). Anticancer drug resistance induced by disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* NPR2 gene: a novel component involved in cisplatin and doxorubicin provoked cell kill. *Mol Pharmacol* **64**, 259 – 268.
- Schenk PW., Stoop H., Bokemeyer C., Mayer F., Stoter G., Oosterhuis JW., Wiemer E., Looijenga LH., Nooter K. (2004) Resistance to platinum-containing chemotherapy in testicular germ cell tumors is associated with downregulation of the protein kinase SRPK1. *Neoplasia*. **6**: 297-301.
- Schiestl RH., Gietz RD. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* **16**: 339-346.
- Sechi S., Chait BT. (1998) Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification. *Analytical Chemistry*. **70(24)**: 5150-5158.
- Sedletska Y., Fourrier L., Malinge JM. (2007) Modulation of MutS ATP-dependent functional activities by DNA containing a cisplatin compound lesion (base damage and mismatch). *Journal of Molecular Biology*. **369**: 27–40.
- Sedletska Y., Giraud-Panis MJ. (2005) Malinge JM. Cisplatin is a DNA-damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways. *Current Medicinal Chemistry: Anti-Cancer Agents*. **5**: 251–265.

## Bibliografía

---

- Senay C., Ferrari P., Rocher C., Rieger KJ., Winter J., Platel D., Bourne Y. (2003) The Mtr2–Mex67 NTF2-like domain complex. Structural insights into a dual role of Mtr2 for yeast nuclear export. *J. Biol. Chem.* **278**: 48395–48403.
- Senger B., Simos G., Bischoff FR., Podtelejnikov A., Mann M., Hurt E. (1998) Mtr10p functions as a nuclear import receptor for the mRNA-binding protein Npl3p. *EMBO J.* **17**: 2196–2207.
- Serpeloni JM., Grotto D., Mercadante AZ., de Lourdes Pires Bianchi M., Antunes LM. (2010) Lutein improves antioxidant defence *in vivo* and protects against DNA damage and chromosome instability induced by cisplatin. *Archives of Toxicology.* **84**: 811-822.
- Shen EC., Henry MF., Weiss VH., Valentini SR., Silver PA., Lee MS. (1998) Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes Dev.* **12**: 679–691.
- Shen EC., Stage-Zimmermann T., Chui P., Silver PA. (2000) The yeast mRNA-binding protein Npl3p interacts with the cap-binding complex. *J. Biol. Chem.* **275**: 23718–23724.
- Sherman SE., Gibson D., Wang AHJ., Lippard SJ. (1985) X-ray structure of the major adduct of the anticancer drug cisplatin with DNA: cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>{d(pGpG)}]. *Science.* **230**: 412–417.
- Siddik ZH. (2002) Biochemical and molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Cancer Treat Res.* **112**: 263-84.
- Siebel CW, Feng L, Guthrie C, and Fu X-D (1999) Conservation in budding yeast of a kinase specific for SR splicing factors. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**: 5440–5445.
- Siebel CW., Guthrie C. (1996) The essential yeast RNA binding protein Np13p is methylated. *Proc. Natl Acad. Sci.* **93**: 13641–13646.
- Siomi MC., Eder PS., Kataoka N., Wan L., Liu Q., Dreyfuss G. (1997) Transportin-mediated nuclear import of heterogeneous nuclear RNP proteins. *J Cell Biol.* **138**: 1181–1192.
- Smolka MB., Albuquerque CP., Chen SH., Zhou H. (2007) Proteome-wide identification of *in vivo* targets of DNA damage checkpoint kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104(25)**: 10364-10369.
- Smyth GK. (2005) Limma: linear models for microarray data. In: *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*, R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry, W. Huber (eds.), *Springer, New York.* 397–420.
- Sowadski JM., Epstein LF., Lankiewicz L., Karlsson R. (1999) Conformational diversity of catalytic cores of protein kinases. *Pharmacol. Ther.* **82**: 157-164.
- Stanford DR., Whitney ML., Hurto RL., Eisaman DM., Shen WC., (2004) Hopper AK. Division of labor among the yeast Sol proteins implicated in tRNA nuclear export and carbohydrate metabolism. *Genetics.* **168(1)**: 117-127.
- Sterner DE., Lee JM., Hardin SE., Greenleaf AL. (1995) The yeast carboxyl-terminal repeat domain kinase CTDK-I is a divergent cyclin-cyclin-dependent kinase complex. *Mol Cell Biol.* **15(10)**: 5716-24.
- Sträßler K., Masuda S., Mason P., Pfannstiel J., Oppizzi M., Rodríguez-Navarro S., Rondón AG., Aguilera A., Struhl K., Reed R., Hurt E. (2002)

## Bibliografía

---

- TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature*. **417**: 304–308.
- Stutz F., Rosbash M. (1998) Nuclear RNA export. *Genes & Dev.* **12**: 3303–3319.
  - Sze CM., Khairallah GN., Xiao Z, Donnelly PS., O’Hair RAJ., Wedd AG. (2009) Interaction of cisplatin and analogues with a Met-rich protein site. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. **14(2)**: 163–165.
  - Takahashi H., McCaffery JM., Irizarry RA., Boeke JD. (2006) Nucleocytosolic acetyl-coenzyme a synthetase is required for histone acetylation and global transcription. *Mol. Cell*. **23(2)**: 207-217.
  - Takeuchi M., Yanagida M. (1993) A mitotic role for a novel fission yeast protein kinase dsk1 with cell cycle stage dependent phosphorylation and localization. *Mol Biol Cell*. **4**: 247–260.
  - Tanida S., Mizoshita T., Ozeki K., Tsukamoto H., Kamiya T., Kataoka H., Sakamuro D., Joh T. (2012) Mechanisms of cisplatin-induced apoptosis and of cisplatin sensitivity: potential of BIN1 to act as a potent predictor of cisplatin sensitivity in gastric cancer treatment. *Int J Surg Oncol*. **2012**: 862879.
  - Tao Z., Gao P., Liu HW. (2009) Studies of the expression of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of PARP-1 substrates by yeast proteome microarray screening. *Biochemistry*. **48(49)**: 11745-54
  - Tarrío N., García-Leiro A., Cerdán ME., González-Siso MI. (2008) The role of glutathione reductase in the interplay between oxidative stress response and turnover of cytosolic NADPH in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res*. **8(4)**: 597-606.
  - Thomas T., Thomas TJ. (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell. Mol. Life Sci*. **58**: 244–258.
  - Thorsen M., Perrone GG., Kristiansson E., Traini M., Ye T., Dawes IW., Nerman O., Tamas MJ. (2009) Genetic basis of arsenite and cadmium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*. **10**: 105.
  - Tizón B., Rodríguez-Torres AM., Cerdán ME. (1999) Disruption of six novel *Saccharomyces cerevisiae* genes reveals that YGL129c is necessary for growth in non-fermentable carbon sources, YGL128c for growth at low or high temperatures and YGL125w is implicated in the biosynthesis of methionine. *Yeast*. **15(2)**: 145–154.
  - Tobias KE., Kahana C. (1995) Exposure to ornithine results in excessive accumulation of putrescine and apoptotic cell death in ornithine decarboxylase overproducing mouse myeloma cells. *Cell Growth Differ*. **6**: 1279–1285.
  - Tome ME., Fiser SM., Payne CM., Gerner EW. (1997) Excess putrescine accumulation inhibits the formation of modified eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A) and induces apoptosis. *Biochem. J*. **328**: 847–854.
  - Treré D., Ceccarelli C., Montanaro L., Tosti E., Derenzini M. (2004) Nucleolar size and activity are related to pRb and p53 status in human breast cancer. *J Histochem Cytochem*. **52(12)**: 1601-7.
  - Tyers M., Mann M. (2003) From genomics to proteomics. *Nature*. **422**: 193-7.

## Bibliografía

---

- Ungar L., Harari Y., Toren A., Kupiec M. (2011) Tor complex 1 controls telomere length by affecting the level of Ku. *Curr Biol.* **21(24)**: 2115-20.
- Urdiales JL., Medina MA., Sanchez-Jimenez F. (2001) Polyamine metabolism revisited. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **13**: 1015–1019.
- Vallejo CG., Serrano R. (1989) Physiology of mutants with reduced expression of plasma membrane Hp-ATPase. *Yeast.* **5**: 307–319.
- Velazquez-Dones A., Hagopian JC., Ma CT., Zhong XY., Zhou H., Ghosh G., Fu XD., Adams JA. (2005) Mass spectrometric and kinetic analysis of ASF/SF2 phosphorylation by SRPK1 and Clk/Sty. *J. Biol. Chem.* **280**: 41761–41768.
- Visa N., Alzhanova-EricssonAT., Sun X., Kiseleva E., Bjorkroth B., Wurtz T., Daneholt B. (1996) A pre-mRNA-binding protein accompanies the RNA from the gene through the nuclear pores and into polysomes. *Cell.* **84**: 253–264.
- Walter NJ. (2002) Tech.Sight. A technique whose time has come. *Science.***296**: 557-559.
- Walter W., Clynes D., Tang Y., Marmorstein R., Mellor J., Berger SL. (2008) 14-3-3 interaction with histone H3 involves a dual modification pattern of phosphoacetylation. *Mol. Cell. Biol.* **28(8)**: 2840-2849.
- Wang HY., Lin W., Dyck JA., Yeakley JM., Songyang Z., Cantley LC., Fu XD. (1998) SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *J Cell Biol.* **140**: 737–750.
- Wightman R., Meacock PA. (2003) The THI5 gene family of *Saccharomyces cerevisiae*: distribution of homologues among the hemiascomycetes and functional redundancy in the aerobic biosynthesis of thiamin from pyridoxine. *Microbiology.* **149(6)**: 1447-60.
- Williams K. (1997) Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem. J.* **325**: 289–297.
- Windgassen M., Krebber H. (2003) Identification of Gbp2 as a novel poly(A)<sup>+</sup> RNA-binding protein involved in the cytoplasmic delivery of messenger RNAs in yeast. *EMBO Rep.* **4**: 278–283.
- Windgassen M., Sturm D., Cajigas IJ., González CI., Seedorf M., Bastians H., Krebber H. (2004) Yeast shuttling SR proteins Npl3p, Gbp2p, and Hrb1p are part of the translating mRNPs, and Npl3p can function as a translational repressor. *Mol Cell Biol.* **24**: 10479–10491.
- Xie X., Tome ME., Gerner EW. (1997) Loss of intracellular putrescine pool-size regulation induces apoptosis. *Exp. Cell Res.* **230**: 386–392.
- Xu C., Henry MF. (2004) Nuclear export of hnRNP Hrp1p and nuclear export of hnRNP Npl3p are linked and influenced by the methylation state of Npl3p. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 10742–10756.
- Yachie N., Saito R., Sugiyama N., Tomita M., Ishihama Y. (2011) Integrative features of the yeast phosphoproteome and protein-protein interaction map. *PLoS Comput. Biol.* **7(1)**: e1001064.
- Yamada M., O'Regan E., Brown R., Karran P. (1997) Selective recognition of a cisplatin-DNA adduct by human mismatch repair proteins. *Nucleic Acids Research.* **25**: 491–496.
- Yao R., Zhang Z., An X., Bucci B., Perlstein DL., Stubbe J., Huang M. (2003) Subcellular localization of yeast ribonucleotide reductase regulated

## Bibliografía

---

- by the DNA replication and damage checkpoint pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100(11)**: 6628-6633.
- Yao W., Lutzmann M., Hurt E. (2008) A versatile interaction platform on the Mex67–Mtr2 receptor creates an overlap between mRNA and ribosome export. *EMBO J.* **27**: 6–16.
  - Yao W., Roser D., Kohler A., Bradatsch B., Bassler J., Hurt E. (2007) Nuclear export of ribosomal 60S subunits by the general mRNA export receptor Mex67–Mtr2. *Mol. Cell.* **26**: 51–62.
  - Yeakley JM., Tronchere H., Olesen J., Dyck JA., Wang HY., Fu XD. (1999) Phosphorylation regulates *in vivo* interaction and molecular targeting of serine/arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *J Cell Biol.* **145**: 447–455.
  - Yu MC., Bachand F., McBride AE., Komili S., Casolari JM., Silver PA. (2004) Arginine methyltransferase affects interactions and recruitment of mRNA processing and export factors. *Genes Dev.* **18**: 2024–2035.
  - Yu W., Jin C., Lou X., Han X., Li L., He Y., Zhang H., Ma K., Zhu J., Cheng L., Lin B. (2011) Global analysis of DNA methylation by Methyl-Capture sequencing reveals epigenetic control of cisplatin resistance in ovarian cancer cell. *PLoS One.* **6(12)**: e29450.
  - Yun CY., Fu XD. (2000) Conserved SR protein kinase functions in nuclear import and its action is counteracted by arginine methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **150**: 707–718.
  - Zhang L., Guarente L. (1994) Evidence that Tup1/Ssn6 has a positive effect on the activity of the yeast activator Hap1. *Genetics.* **136(3)**: 813–817.
  - Zeller C., Dai W., Steele NL., Siddiq A., Walley AJ., Wilhelm-Benartzi CS., Rizzo S., van der Zee A., Plumb JA., Brown R. (2012) Candidate DNA methylation drivers of acquired cisplatin resistance in ovarian cancer identified by methylome and expression profiling. *Oncogene.* doi: 10.1038/onc.2011.611.
  - Zhu H., Klemic JF., Chang S., Bertone P. (2000) Analysis of Yeast protein kinases using protein chips. *Nature Genet.* **26**: 283–289.



