

## **5. RISULTATI II PARTE**

---

## Stress ossidativo in *S. cerevisiae*

Nel nostro laboratorio è stata messa in relazione la stabilità dei messaggeri con il processo apoptotico in *S. cerevisiae*. Infatti, mutanti nei geni che codificano proteine essenziali al decapping quali *Lsm4p*, *Lsm1p*, *Dcp1p*, *Dcp2p*, mostrano i tipici marcatori citologici dell'apoptosi (Mazzoni *et al.*, 2003a). Il mutante vitale del gene *LSM4*, da noi costruito, mostra una precoce morte in fase stazionaria e una maggiore sensibilità allo stress ossidativo che sono in parte dipendenti dalla caspasi di lievito *Yca1p* (Mazzoni *et al.*, 2003b).

Il lavoro riportato in questa parte della tesi si è concentrato sul fenomeno dello stress ossidativo poiché il complesso CCR4-NOT, di cui fa parte *Not4p*, contribuisce alla regolazione negativa di geni da stress nella via Ras/PKA (Lenssen *et al.*, 2002) e quindi alla regolazione della risposta cellulare allo stress ossidativo, il principale fenomeno che induce apoptosi. È stato quindi intrapreso lo studio dei mutanti *not4* e *ccr4*, un altro componente del complesso CCR4-NOT, riguardo alla resistenza allo stress ossidativo e alla longevità cellulare, due fenomeni controllati negativamente dalla via Ras/PKA.

### 5.1. I mutanti *ccr4* e *not4* mostrano una maggiore resistenza allo stress ossidativo

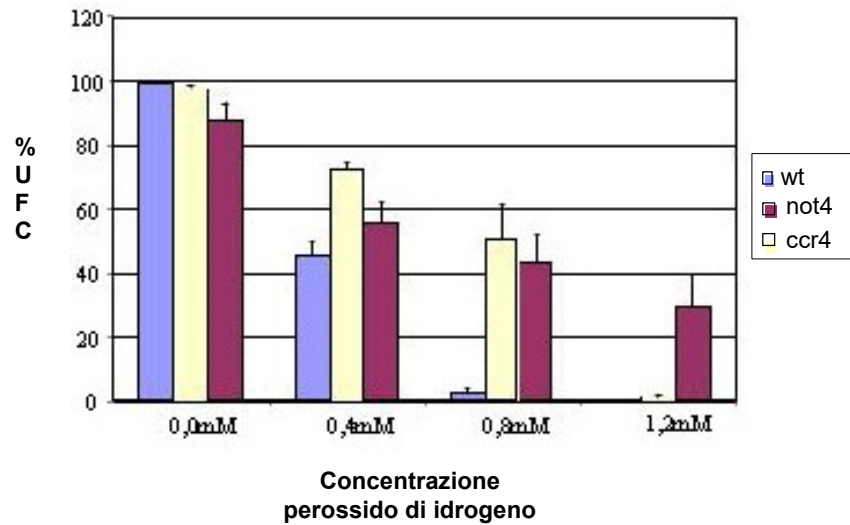
#### 5.1.1. Resistenza al perossido di idrogeno.

La delezione dei geni *NOT4* e *CCR4* aumenta la resistenza al perossido di idrogeno rispetto al ceppo selvatico. Alla concentrazione di 0,8mM, mentre il selvatico mostra una vitalità di appena il 2%, i mutanti *ccr4* e *not4* hanno una vitalità rispettivamente del 50% e 43%. Aumentando la concentrazione di perossido a 1,2 mM si può osservare una maggiore resistenza di *not4* (30% di vitalità) rispetto al mutante *ccr4* (1%) (Fig.28).

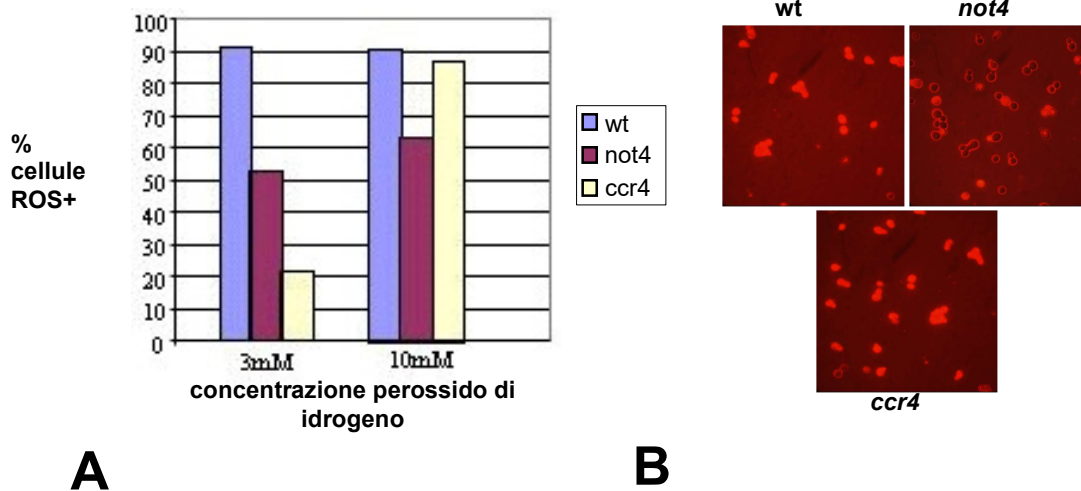
La misura della vitalità, dopo trattamento con perossido, è stata accompagnata dalla colorazione delle cellule con diidrorodamina per mettere in evidenza il danno ossidativo. La diidrorodamina è una molecola che interagisce con i metaboliti reattivi all'ossigeno (ROM) conseguenza della presenza dell'agente ossidante. Le concentrazioni di perossido utilizzate sono state più alte (3mM e 10mM) che nell'esperimento precedente per avere una colorazione apprezzabile delle cellule. Entrambi i mutanti mostrano dopo trattamento una minore percentuale di cellule positive ai ROS (50% nel caso di *not4* e 20% nel caso di *ccr4*) e, come nel caso della vitalità, il mutante *not4* mostra un minore accumulo di danno ossidativo rispetto al mutante *ccr4* a dosi più elevate di perossido (10mM) (Fig.29).

#### 5.1.2. Incremento della longevità cronologica

È stato recentemente sviluppato un metodo per la misura dell'invecchiamento del lievito basato sulla longevità cronologica di una popolazione di cellule di lievito che non si divide, (life span cronologico). Questo metodo è alternativo a quello più comunemente utilizzato nel quale viene contato il numero di gemme generate da una singola cellula madre (life span replicativo) (Longo *et al.*, 1996; Fabrizio *et al.*, 2001; Longo and Fabrizio, 2002). L'aumento della resistenza allo stress ossidativo è spesso associata ad un aumento della longevità cronologica (Fabrizio *et al.*, 2001), infatti cellule invecchiate cronologicamente accumulano danno ossidativo. È stata quindi effettuata una valutazione del "life span cronologico" in colture cellulari dei mutanti *ccr4* e *not4* (Fig.30). Come atteso, entrambi i



**Figura 28.** Sensibilità al perossido di idrogeno dei ceppi BY4741 (wt) Y00207 (*not4*) e Y00387 (*ccr4*). Le cellule cresciute in fase precoce-esponenziale sono state trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alle concentrazioni indicate (vedi materiali e metodi). Quindi è stata misurata la vitalità (percentuale di UFC= Unità Formanti Colonie) in funzione della concentrazione di perossido. I valori riportati corrispondono alle medie di tre esperimenti ripetuti indipendentemente e alle corrispondenti deviazioni standard.

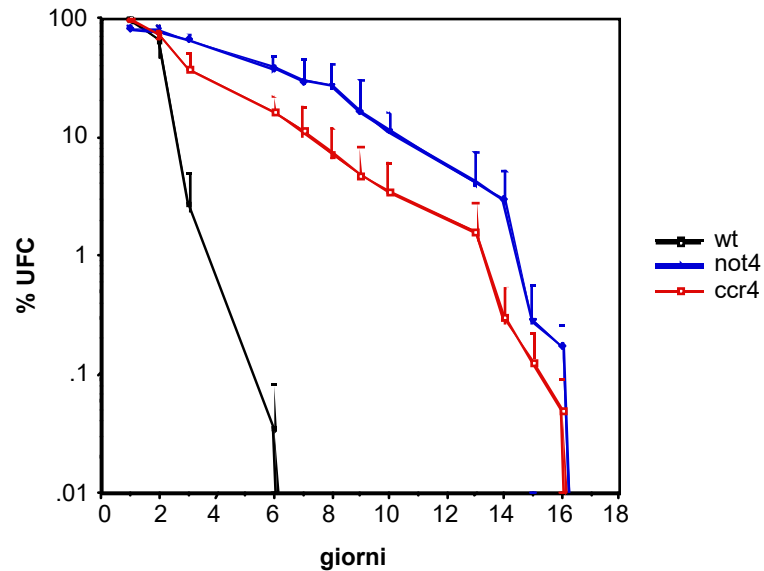


**Figura 29.** Accumulo danno ossidativo nei ceppi BY4741 (wt), Y00207 (*not4*) e Y00387 (*ccr4*) dopo trattamento con perossido di idrogeno. A) Percentuale di cellule positive alla diidrorodamina dopo trattamento con perossido alle concentrazioni indicate. Le percentuali sono state calcolate su un totale di circa 1000 cellule per ceppo. B) Colorazione delle cellule con diidrorodamina dopo trattamento alla concentrazione di 10mM.

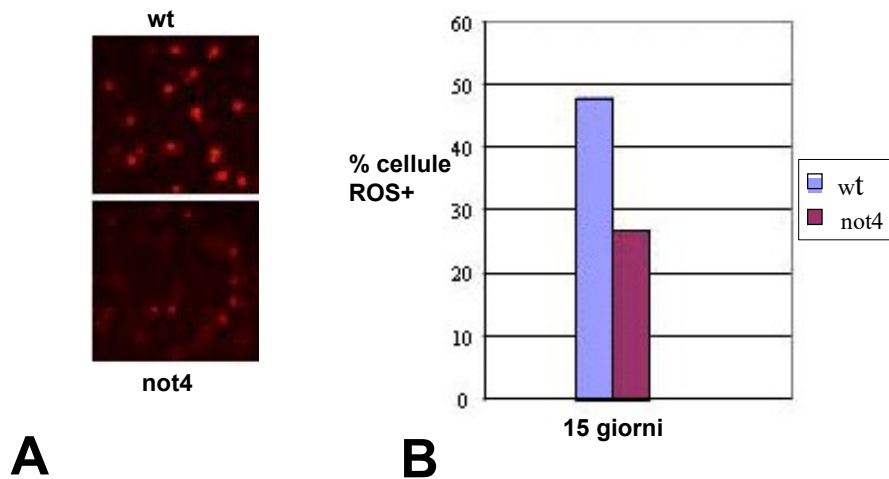
mutanti mostrano un'estesa longevità cronologica rispetto al ceppo selvatico, fenomeno più evidente nel mutante *not4* rispetto al mutante *ccr4*.

La colorazione con diidrorodamina ha messo in evidenza nelle cellule del mutante *not4* un minore accumulo di danno ossidativo rispetto alle cellule del ceppo selvatico (**Fig.31**) confermando che cellule invecchiate cronologicamente accumulano danno ossidativo. A

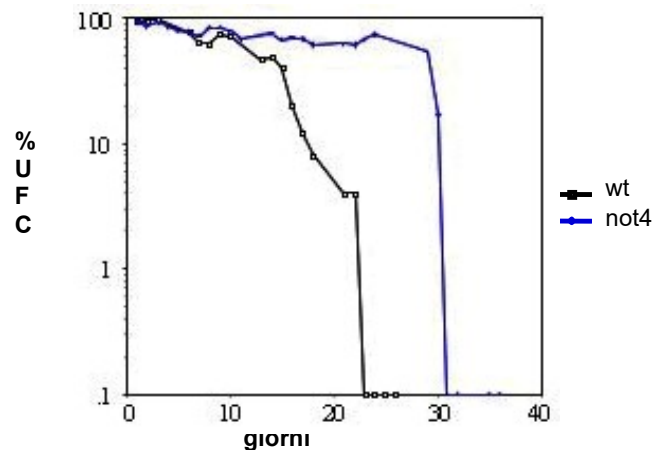
causa della difficoltà della colorazione su cellule cresciute in terreno minimo, l'esperimento è stato condotto su cellule cresciute in terreno massimo dopo 15 giorni di crescita. Anche in queste condizioni, infatti, il mutante *not4* mostra una estensione della longevità (Fig.32).



**Figura 30.** Estensione della longevità cronologica. La vitalità cellulare, come percentuale di Unità Formanti Colonie (% UFC) è stata misurata nei ceppi BY4741 (wt), Y00207 (*not4*) e Y00387 (*ccr4*) cresciuti su terreno minimo (vedi materiali e metodi). I valori riportati corrispondono alle medie di tre esperimenti indipendenti.



**Figura 31.** Accumulo di danno ossidativo nei ceppi BY4741 (wt) e Y00207 (*not4*) in cellule invecchiate cronologicamente. A) Colorazione con diidrorodamina di cellule in fase stazionaria cresciute su terreno ricco (YPD). B) Percentuale di cellule positive alla diidrorodamina. Le percentuali sono state calcolate su un totale di circa 1000 cellule per ceppo.



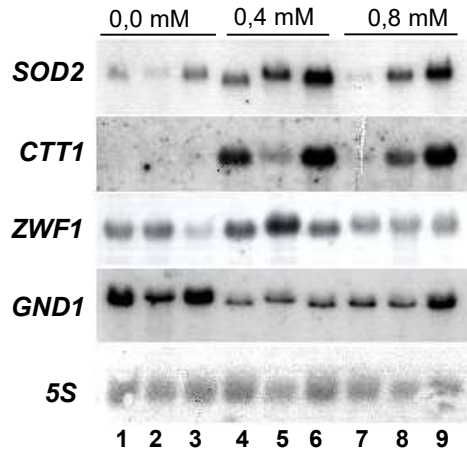
**Figura 32.** Estensione della longevità cronologica in terreno massimo. La vitalità cellulare, come percentuale di Unità Formanti Colonie (% UFC) è stata misurata nei ceppi BY4741 (wt) e Y00207 (*not4*). I valori riportati corrispondono a un esperimento rappresentativo dei due che sono stati eseguiti.

## 5.2. La trascrizione di geni per la resistenza allo stress ossidativo Msn-indipendenti risulta aumentata nei mutanti *not4* e *ccr4*.

I recenti studi, che attribuiscono al complesso CCR4/NOT un importante ruolo nella risposta agli stress, dimostrano che il complesso reprime con un meccanismo di modificazione proteica i fattori di trascrizione Msn2/4p posti a valle della via del segnale Ras/PKA. Le nostre osservazioni sull'aumentata resistenza allo stress ossidativo nei mutanti *ccr4* e *not4* sono probabilmente il risultato della mancata repressione dei fattori Msnp con la conseguente attivazione deregolata dei geni per la resistenza alle specifiche condizioni testate. Accanto a Msn2/4p, esistono altri fattori quali Yap1 e Skn7 importanti per l'induzione di geni per la risposta allo stress ossidativo, (Fig.6). Per essere certi che la resistenza osservata nei mutanti *ccr4* e *not4* fosse dipendente esclusivamente da una attivazione costitutiva dei fattori Msn2/4p, sono stati analizzati i trascritti di geni che non sono sotto il loro controllo. Tra questi sono stati scelti i geni *ZWF1* e *GND1* che codificano rispettivamente la glucosio-6P-deidrogenasi e la gluconato-6P-deidrogenasi della via dei pentosi-fosfato. Questi due enzimi sono i principali responsabili della produzione di NADPH citoplasmatico, necessario alla rigenerazione del glutatione ridotto (GSH). Come controllo dell'aumentata trascrizione dei geni indotti da Msn2/4p sono stati utilizzati i geni *SOD2* (superossido dismutasi) e *CTT1* (catalasi citoplasmatica).

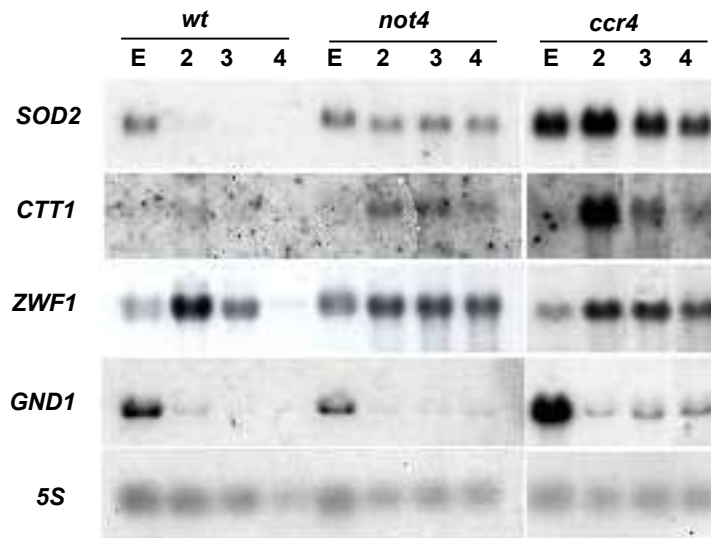
Il trattamento con perossido, in accordo con i dati di letteratura, superinduce i geni *SOD2* e *CTT1* nel mutante *ccr4* sia alla concentrazione di 0,4 che 0,8mM. Nel mutante *not4* si osserva una simile situazione tranne che nel caso del gene *CTT1* per il quale a 0,4mM la quantità di trascritto è paragonabile a quella del ceppo selvatico, se non più bassa. Nel caso dei geni *ZWF1* e *GND1* si osserva un aumento della espressione a 0,4mM nel mutante *not4* e del gene *GND1* a 0.8mM nel mutante *ccr4* (Fig.33).

La superinduzione dei geni *SOD2* e *CTT1* si osserva anche in colture invecchiate dei mutanti, con un effetto maggiore per il mutante *ccr4*. Anche in questa condizione l'espressione dei geni *ZWF1* e *GND1* risulta alterata. Infatti mentre nel ceppo selvatico l'espressione di *ZWF1* aumenta al 2° giorno di crescita per poi diminuire gradualmente, in entrambi i mutanti il trascritto si mantiene espresso in quantità pressochè simili. Per quanto



**Figura 33.** Analisi trascrizionale dei ceppi BY4741 (wt), Y00207 (*not4*) e Y00387 (*ccr4*) dopo trattamento con perossido d'idrogeno. Gli RNA totali sono stati estratti da cellule cresciute in terreno YPD e trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alle concentrazioni indicate per 40 minuti. 1,4,7: selvatico; 2,5,8: mutante *not4*; 3,6,9: mutante *ccr4*. Gli RNA sono stati ibridati con le sonde specificate nella figura.

riguarda il gene *GND1* si osserva un significativo aumento di espressione nel mutante *ccr4* (Fig. 34)



**Figura 34.** Analisi trascrizionale dei mutanti *not4* e *ccr4* di colture cellulari invecchiate dei ceppi BY4741 (wt), Y00207 (*not4*) e Y00387 (*ccr4*). Gli RNA totali sono stati estratti da cellule cresciute in terreno minimo in fase esponenziale (E), al 2° 3° e 4° (corsie 2, 3, 4,) giorno. Gli RNA sono stati ibridati con le sonde specificate nella figura.

### 5.3. La resistenza al perossido di idrogeno è solo in parte dipendente dai fattori *Msn2/4* nel mutante *not4*

#### 5.3.1. Inattivazione del gene *NOT4* nel ceppo di *S. cerevisiae* W303 e costruzione del triplo mutante *msn2msn4not4*

Per confermare i risultati ottenuti dall'analisi trascrizionale, il passo successivo è stato quello di costruire un triplo mutante *msn2msn4not4*. Il ceppo selvatico W303 □□ è stato incrociato con il doppio mutante *msn2msn4* W303 STRE-LacZ. Nel diploide ottenuto, ASY1, è stato inattivato il gene *NOT4* e il diploide ASY2 eterozigote per la mutazione è

stato fatto sporulare. Colonie resistenti all'antibiotico G418 portanti la mutazione *not4* sono apparse dopo circa 3gg di incubazione a 28°C. La inserzione nel giusto locus cromosomico è stata verificata per PCR (vedi materiali e metodi) e sono state verificate la termosensibilità a 37°C e il difetto di crescita su etanolo in tutte le spore che portavano la mutazione *not4*.

Lo studio degli effetti dello stress ossidativo sono stati condotti sulle spore ASY2-10B (*NOT4 MSN2 MSN4*), ASY2-6D (*NOT4 msn2 msn4*), ASY2-3C (*not4 MSN2 MSN4*) e ASY2-10A (*not4 msn2 msn4*).

### 5.3.2. Vitalità dopo trattamento con perossido e vitalità di colture invecchiate cronologicamente del triplo mutante *msn2msn4not4*

In **Fig.35** sono mostrate la vitalità cellulare dopo trattamento con perossido di idrogeno (**Fig.35A**) e la vitalità di cellule invecchiate cronologicamente (**Fig. 35B**) dei ceppi mutanti *msn2msn4not4 msn2msn4 not4*. La perdita contemporanea dei geni *MSN* e *NOT4* risulta in entrambe le misurazioni in un aumento della vitalità rispetto all'assenza dei soli geni *MSN*, aumento che è però molto più significativo dopo il trattamento con perossido.

Questi dati suggeriscono quindi che la proteina Not4p possa reprimere l'espressione di altre attività, indipendenti da Msn2/4p, necessarie alla detossificazione di molecole ossidanti.

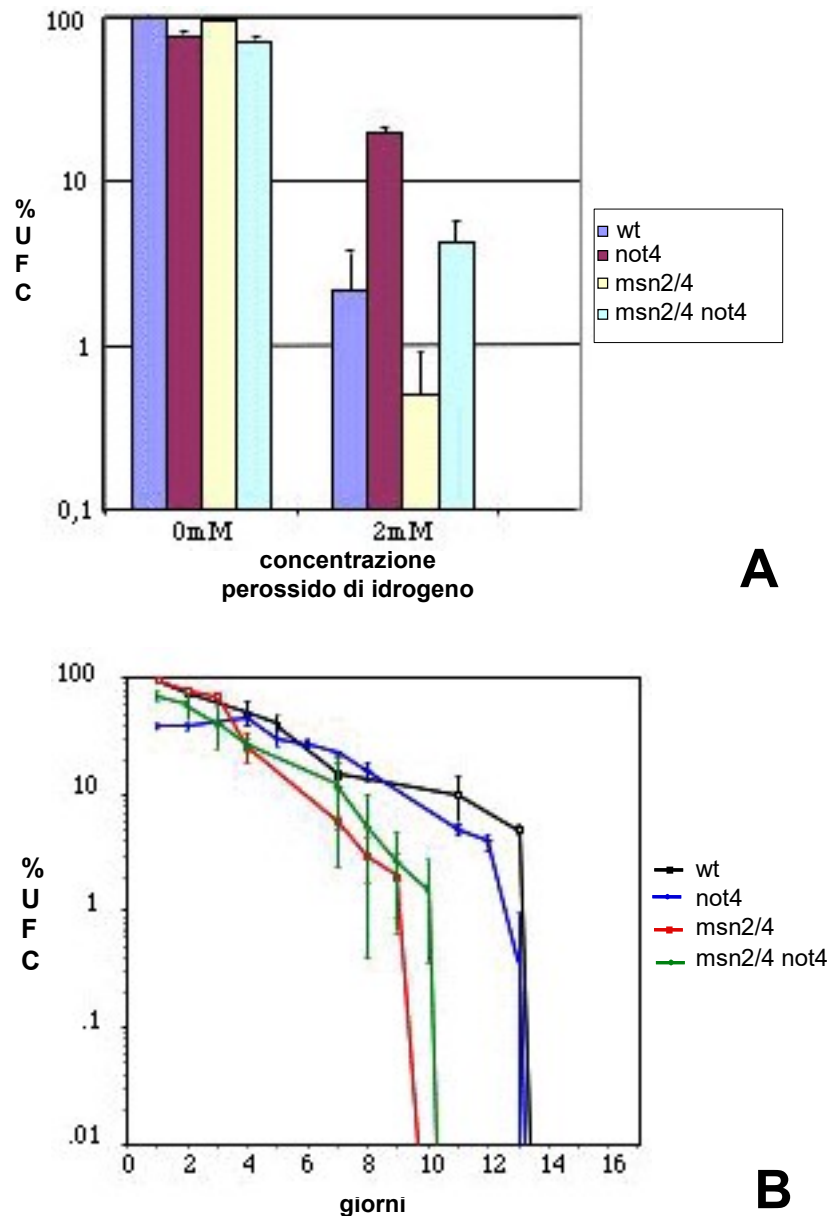
E' stata sottolineata l'importanza del contesto genico nell'espressione fenotipica dei mutanti del complesso CCR4-NOT (Collart 2003). L'inattivazione del gene *ScNOT4* nel diverso contesto genico del ceppo W303, seppur mantiene la termosensibilità a 37°C, il difetto di crescita su etanolo (dati non mostrati) e la resistenza al perossido di idrogeno, non causa l'estensione della longevità in fase post-diauxica (**Fig.35B**).

### 5.4. L'espressione di *KINot4Δ2p* causa un'estensione della longevità nel mutante *not4*.

Durante gli esperimenti di cross-complementazione tra *K. lactis* e *S. cerevisiae* è stato ottenuto un risultato particolarmente interessante. Il mutante *not4* di *S. cerevisiae* che esprime la proteina tronca *KINot4Δ2p* di *K. lactis* mostra difetti di crescita intermedi tra quelli del mutante *not4* e quelli dello stesso ceppo che esprime il gene intero *KINOT4*. Nel test per la valutazione dell'invecchiamento cronologico l'espressione della proteina intera di *K. lactis* ristabilisce una vitalità paragonabile a quella del ceppo selvatico (BY4741) mentre l'espressione della proteina tronca conferisce ancora un ritardo nell'invecchiamento, anziché un'accelerazione, come ci si sarebbe aspettati basandosi sulla parziale soppressione degli altri fenotipi (**Fig.36**). Questo risultato potrebbe indicare che la regione deleta abbia un ruolo importante nella regolazione della longevità cronologica.

### 5.5. Osservazione al microscopio della proteina di fusione Not4-GFPp dopo stress ossidativo

A tutt'oggi non esistono studi approfonditi riguardanti la localizzazione delle proteine del complesso CCR4-NOT. Le differenti funzioni svolte dai componenti del complesso indicano una localizzazione sia nucleare che citoplasmatica.



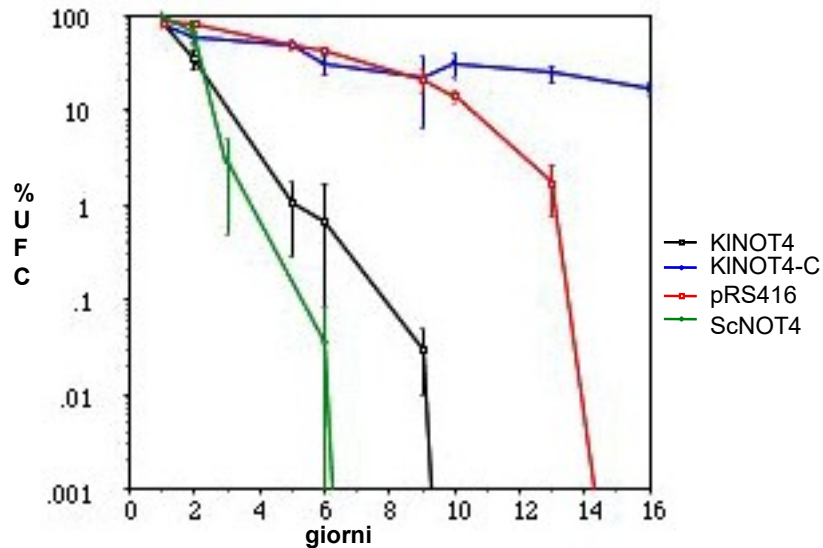
**Figura 35.** Sensibilità al perossido di idrogeno (A) ed estensione della longevità cronologica (B). La vitalità cellulare, come percentuale di Unità Formanti Colonie (% UFC), è stata misurata nei ceppi ASY2-10B (selvatico), ASY2-3C (*not4*), ASY2-6D (*msn2/4*) e ASY2-10A (*not4 msn2/4*). I valori riportati corrispondono alle medie di tre esperimenti indipendenti e alle corrispondenti deviazioni standard.

Abbiamo quindi voluto studiare la localizzazione di Not4p in condizioni fisiologiche e di stress mediante fusione con la Green Fluorescent Protein (GFP).

La costruzione NOT4-GFP (vedi materiali e metodi) è stata ottenuta unendo la proteina di Gfp alla estremità C-terminale di Not4p. Tale costrutto si trova sotto il controllo del promotore MET25 il quale è represso in presenza di metionina; per poter regolare la quantità di metionina gli esperimenti sono stati pertanto condotti su terreno minimo.

Poiché i mutanti utilizzati hanno un genotipo *met*, per poter esprimere la proteina senza però incorrere nella deplezione di nutrienti ne è stata ridotta la concentrazione nel terreno di crescita. I ceppi da analizzare sono stati cresciuti su terreno minimo con una





**Figura 36** Estensione della longevità cronologica dei ceppi BY4741 (selvatico), Y002007Kln (*not4/KINOT4*) Y00207Kln2 (*not4/KINOT4-C*) e Y00207 (*not4*). I valori riportati corrispondono alle medie di tre esperimenti indipendenti e alle corrispondenti deviazioni standard. La vitalità cellulare è riportata come percentuale di Unità Formanti Colonie (% UFC).

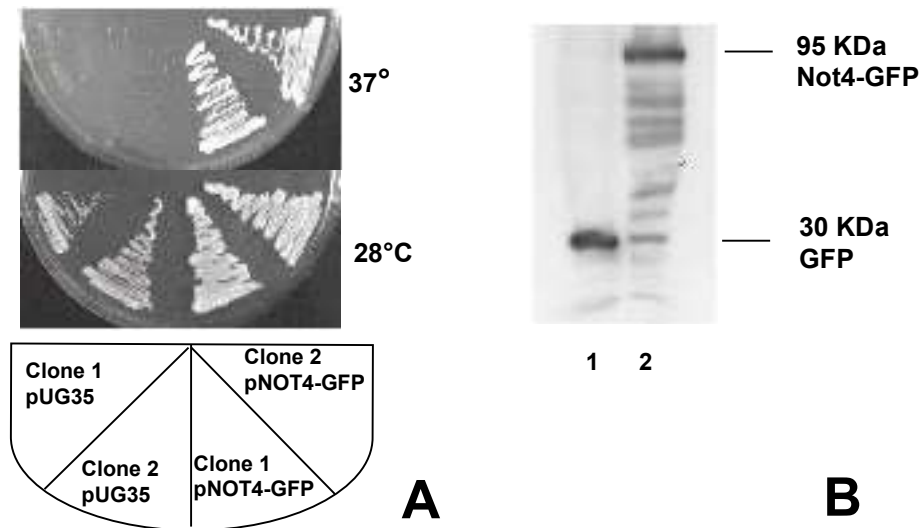
concentrazione finale di metionina di 0,01mg/ml, pari alla metà di quella utilizzata in condizioni normali. Questa quantità era sufficiente per il ceppo mutante *not4* per esprimere adeguatamente la proteina Not4-GFP. Per gli altri ceppi, *ccr4* e *dhh1*, dopo la crescita alla concentrazione di 0,01mg/ml, le cellule sono state trasferite in terreno fresco con una concentrazione di metionina pari a 0,0066mg/ml e sottoposte all'analisi sperimentale dopo 3-4 ore di incubazione alla temperatura di crescita.

Per valutare la funzionalità del costrutto è stato verificato che la proteina di fusione fosse in grado di sopprimere alcuni dei fenotipi del mutante come la termosensibilità (**Fig.37A**) e la crescita su etanolo (dati non mostrati). Inoltre è stata verificata la produzione della proteina tramite Western blot (**Fig.37B**).

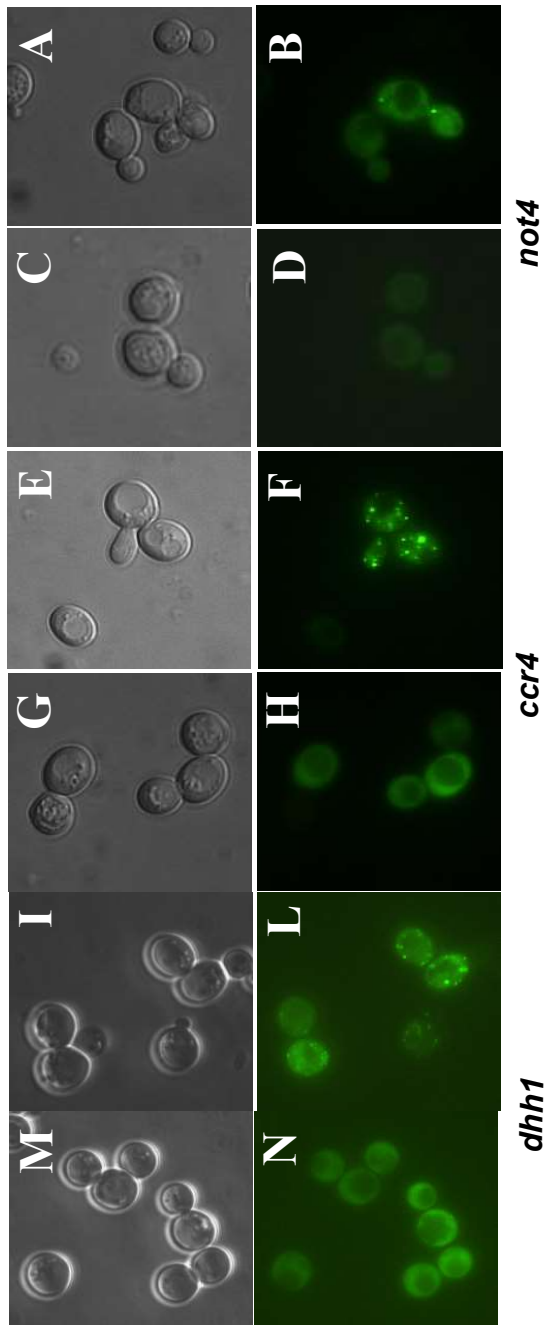
La localizzazione della proteina di fusione è stata osservata tramite microscopio a fluorescenza. Come si osserva in **figura 38B**, la proteina Not4p mostra una localizzazione cellulare diffusa in condizioni di crescita esponenziale. Dopo trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3mM per 20' (**Fig.38D**) la proteina si accumula in granuli di diverse dimensioni il cui numero varia da cellula a cellula.

La formazione di questi granuli non dipende dalla presenza degli altri due componenti del complesso Ccr4-Not, Ccr4p (**Fig.38H**) e Dhh1p (**Fig.38N**), e viene indotta anche in altre condizioni di stress: deplezione di metionina, in presenza di etanolo 6%, a 37°C e durante la senescenza (4-5gg di crescita).

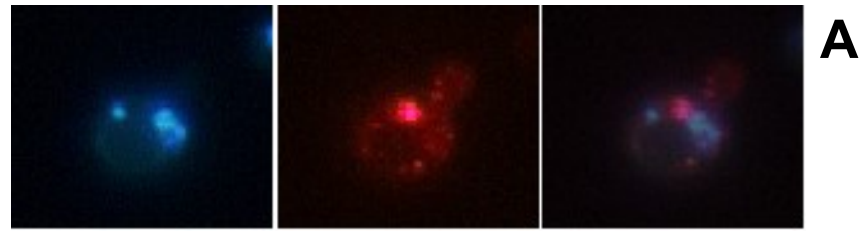
La natura di questi granuli è sconosciuta e non è noto se siano localizzati in specifiche strutture intracellulari. Quello che sembra certo dalle immagini è che questi granuli sono all'esterno del vacuolo. Uno stress prolungato e intenso (carenza di metionina e trattamento con perossido d'idrogeno) causa la formazione nelle cellule di un unico grande granulo delle dimensioni di un nucleo. La colorazione DAPI *in vivo* dei nuclei nelle cellule dei ceppi mutanti *dhh1* (**Fig.39A**) e *ccr4* (**Fig.39B**) ha rivelato che nessuno dei granuli coincide con il nucleo.



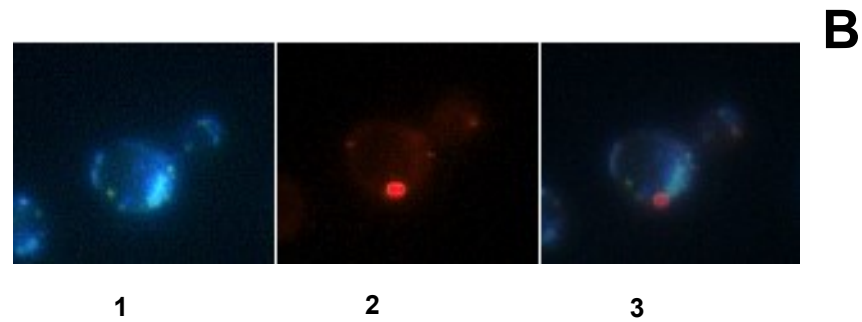
**Figura 37.** A) Verifica della soppressione della termosensibilità a 37°C da parte della proteina di fusione Not4-GFP. L'analisi è stata condotta su due cloni trasformanti del ceppo Y00207 (*not4*) con il costrutto pNOT4-GFP e come controllo sono stati utilizzati due cloni trasformanti con il plasmide vuoto, pUG35. B) Analisi Western della fusione NOT4-GFP, trasformata nel ceppo Y00207 (*not4*). Corsia 1= plasmide vuoto. Corsia 2:= pNOT4-GFP.



**Figura 38.** Localizzazione della proteina Not4-GFPp dopo trattamento con perossido d'idrogeno nei ceppi mutanti *not4*, *ccr4* e *dhh1*. L'osservazione delle cellule con il microscopio è stata eseguita dopo 20' di incubazione con 3mM dell'ossidane a 28°C. A,C,E,G,I,M= contrasti di fase. D, H, N = prima del trattamento. B, F, L =dopo il trattamento.



**Figura 39.** Colorazione DAPI *in vivo* e localizzazione Not4-GFPp nei ceppi YO3858 (*dhh1*) (A) e Y00387 (*ccr4*) (B) dopo stress ossidativo e in assenza di metionina. Corsia 1: colorazione DAPI *in vivo*. Corsia 2: fluorescenza GFP (convertita in rosso con gli strumenti informatici). Corsia 3: sovrapposizione delle due colorazioni.



## **6. DISCUSSIONE**

---

In questa tesi è riportato lo studio del gene *NOT4*, che codifica un componente del complesso trascrizionale CCR4-NOT, nei lieviti *K. lactis* e *S. cerevisiae*.

La sequenza aminoacidica mostra una discreta identità tra le proteine dei due lieviti in quanto entrambe conservano un dominio RING-finger e un dominio coiled-coil nella regione aminotermineale. L'identità diminuisce nella regione C-terminale dove è presente nella proteina di *K. lactis* un secondo dominio coiled-coil. L'inattivazione del gene *NOT4* in entrambi i lieviti genera una serie di fenotipi pleiotropici che vanno dai difetti nella biosintesi della parete cellulare ai difetti nel riparo al DNA, alla termosensibilità e all'incapacità di utilizzare fonti di carbonio respirabili. L'effetto pleiotropico delle mutazioni rispecchia il fatto che la proteina Not4p fa parte di un complesso che svolge nella cellula molteplici ruoli.

Nonostante molte funzioni siano conservate come evidenziato dagli esperimenti di cross-complementazione, i fenotipi osservati non hanno la stessa intensità nei due lieviti. Infatti in *K. lactis* il mutante nullo mostra una termosensibilità già a 28°C rispetto ai 37°C del mutante di *S. cerevisiae*.

## 6.1. Interazione genetica tra *NOT4* e *MPK1* in *S. cerevisiae* e in *K. lactis*

Mutanti nel gene *NOT4* sono stati isolati, in *S. cerevisiae*, come soppressori del fenotipo di termosensibilità a 35°C della mutazione *stel1-S626* (Cade and Errede, 1994) e del fenotipo di sterilità dovuto a mutazioni a carico del gene *STE4* (Irie *et al.*, 1994; Leberer *et al.*, 1994). L'analisi di questa soppressione ha attribuito a Not4p il ruolo di repressore della via del mating type in condizioni di non induzione (Cade and Errede, 1994; Irie *et al.*, 1994; Leberer *et al.*, 1994), infatti, nel mutante *not4* geni specifici del mating, quali *FUS1*, *FUS3* e *MSG5*, risultano costitutivamente indotti (Cade and Errede, 1994; Irie *et al.*, 1994) e le cellule in assenza di feromone mostrano delle protuberanze sulla superficie cellulare simili a shmoo (Leberer *et al.*, 1994). La formazione di questa protuberanza mette in relazione la via del mating type alla via della PKC/MPK1 (Zarzov *et al.*, 1996) e forse, a causa di questa relazione, anche quest'ultima è attiva costitutivamente nel mutante *not4* di *S. cerevisiae*. Strutture simili a shmoo sono presenti anche nel mutante *Klnot4Δ1* di *K. lactis* (Serafini, 2001), indicando che probabilmente anche in questo lievito la via del mating risulta controllata negativamente da Not4p.

Abbiamo dimostrato l'esistenza di un'interazione tra Not4p e la via della PKC/MPK1, sia in *K. lactis* che *S. cerevisiae*, sovraesprimendo il gene *MPK1* nei mutanti nulli *not4* di entrambi i lieviti. I risultati ottenuti sono stati diversi nei due casi. In *K. lactis*, si osserva un recupero dei difetti di parete cellulare che indicano un ruolo di Not4p a monte di Mpk1p. In *S. cerevisiae*, al contrario, si osserva un aggravamento dei difetti di parete. Questo difetto probabilmente non è dovuto alla sola iperespressione di *MPK1* nel mutante *not4* in quanto la sovraespressione di questo gene in un ceppo selvatico non comporta difetti di parete. Recentemente in *S. cerevisiae* è stata dimostrata la reciproca regolazione delle attività della fosfatasi Msg5p e della chinasi Mpk1p, che porta alla reciproca inattivazione delle due proteine (Flández *et al.*, 2004). La iperespressione di entrambi i geni *MSG5* (Cade and Errede, 1994) e *MPK1* nel mutante *not4* di *S. cerevisiae* suggerisce che Not4p potrebbe regolare il delicato equilibrio delle due attività a livello trascrizionale, ma non è da escludere anche a livello proteico. Probabilmente i fenotipi relativi alla parete sono il risultato di una complessa interazione tra NOT4, MPK1 e MSG5. E' da sottolineare inoltre che esistono altre vie del segnale che regolano l'integrità della parete in risposta a determinati stress, come l'"HOG pathway" per la risposta allo stress osmotico (per una review Hohmann, 2002) e che hanno intermedi in comune a quella del mating. Quindi, i fenotipi inerenti i difetti di parete potrebbero essere il risultato dell'alterazione di più vie

del segnale e sarà necessario tenere in considerazione questa ipotesi per mettere a punto la giusta strategia necessaria alla corretta comprensione dei nostri dati.

In ogni caso, i risultati ottenuti in *K. lactis* e *S. cerevisiae* mettono in risalto la differente regolazione dell'integrità della parete cellulare nei due lieviti.

## 6.2. Ruolo della regione C-terminale nelle proteine ScNot4p e KINot4p.

In *S. cerevisiae* versioni tronche del gene *NOT4* (MOT2-419 e *not4-1*, rispettivamente di 419 e circa 200 aminoacidi) mostrano fenotipi del tutto simili a quelli del mutante nullo (Cade and Errede, 1994, Irie *et al.*, 1994; Leberer *et al.*, 1994) e agiscono come dominanti negativi (Cade and Errede, 1994; Collart, 2003).

Peculiare di *K. lactis* è la presenza di un dominio coiled-coil ricco di glutamine (Q) nella regione C-terminale della proteina che potrebbe svolgere un ruolo di attivatore trascrizionale, è noto infatti che i domini di attivazione dei fattori di trascrizione sono spesso ricchi in glutamine (Triezeberg, 1995).

L'espressione della proteina tronca nel mutante nullo *Klnot4Δ1* permette un recupero completo dei difetti di parete cellulare, un quasi totale recupero della crescita in presenza di sostanze che danneggiano il DNA e non recupera la sopravvivenza a 37°C. In modo diverso l'espressione della stessa proteina nel mutante nullo di *S. cerevisiae* consente un parziale recupero della crescita in tutte le condizioni saggiate e, nel test di longevità cellulare, ritarda l'invecchiamento del mutante. Il differente effetto sul recupero dei fenotipi suggerisce due conclusioni:

i) La regione C-terminale della proteina di *K. lactis*, e probabilmente il dominio coiled-coil, è necessaria per la crescita alle alte temperature e per il riparo del danno al DNA, ma per il recupero degli altri fenotipi analizzati questa regione non è necessaria.

ii) In *S. cerevisiae* questa regione sembra importante per tutte le attività svolte da ScNot4p, e in particolare sembra essenziale nella regolazione dell'invecchiamento cronologico. L'importanza della regione C-terminale potrebbe dipendere da ragioni di tipo strutturale essenziali all'attività della proteina: l'alterazione conformazionale potrebbe risultare in una proteina difettosa. Oppure potrebbe essere sede di domini funzionali ancora sconosciuti.

Sarà interessante analizzare attraverso procedure di bioinformatica il ripiegamento strutturale di questa regione sia in ScNot4p che KINot4p e ricercare eventuali domini funzionali degenerati, ed infine verificare se sia sede di modificazioni post-traduzionali.

## 6.3. Not4p regola il metabolismo delle fonti di carbonio in modo diverso in *S.cerevisiae* e in *K.lactis*.

### 6.3.1 Fermentazione

Completamente nuova è l'osservazione che cellule di *K. lactis* prive di KINot4p sono incapaci di crescere su glucosio in presenza di antimicina A, un inibitore della respirazione mitocondriale. In questo lievito, il glucosio entra nella cellula attraverso il trasportatore a bassa affinità, RAG1, e induce l'espressione di geni glicolitici, oltre che respiratori. Nel mutante nullo *Klnot4Δ1* è significativamente ridotto il livello trascrizionale del gene *KIRAG1* e di altri geni glicolitici quali *KIRAG2*, *KIPDC*, *KIPGK* e *KIENO1* (fig. 41). Inizialmente la nostra idea era che la proteina KINot4p fosse coinvolta nella regolazione dell'espressione del gene *RAG1* e che il ridotto apporto di glucosio dovuto alla debole espressione del trasportatore fosse la causa della ridotta induzione degli altri geni

glicolitici. Recentemente è stato dimostrato che la enolasi di *K. lactis* (*KIENO1/RAG1*) regola positivamente l'espressione del gene *RAG1* e di geni glicolitici regolatori come *RAG4*, *SCK1*, *GCR1* e *GCR2* (Lemaire and Wesolovsky-Louvel, 2004). Il recente lavoro mette in luce l'esistenza di una complessa e reciproca regolazione dei geni glicolitici sia catalitici che regolatori in *K. lactis*. I nostri dati sembrano indicare che *KINOT4* si trovi a monte nella regolazione di tutti i geni glicolitici testati e abbia un ruolo positivo nella loro regolazione. Per chiarire la posizione di *KINOT4* sarà necessario verificare il livello d'espressione nel mutante *Klnot4Δ1* di geni regolatori quali *RAG4*, *SGC1/2*, verificare l'espressione del gene *KINOT4* nei mutanti dei geni glicolitici, nonché costruire doppi mutanti e studiare in questi i livelli d'espressione dei geni suddetti e la capacità fermentative.

La situazione è diversa nel mutante *not4* di *S. cerevisiae* dove il flusso del glucosio e la fermentazione sono normali, come anche confermato dalla capacità di crescere su glucosio in presenza di antimicina A. Questi risultati suggeriscono che la via fermentativa del glucosio è sotto il controllo del complesso CCR4-NOT in *K. lactis* ma non in *S. cerevisiae*.

### 6.3.2 Respirazione

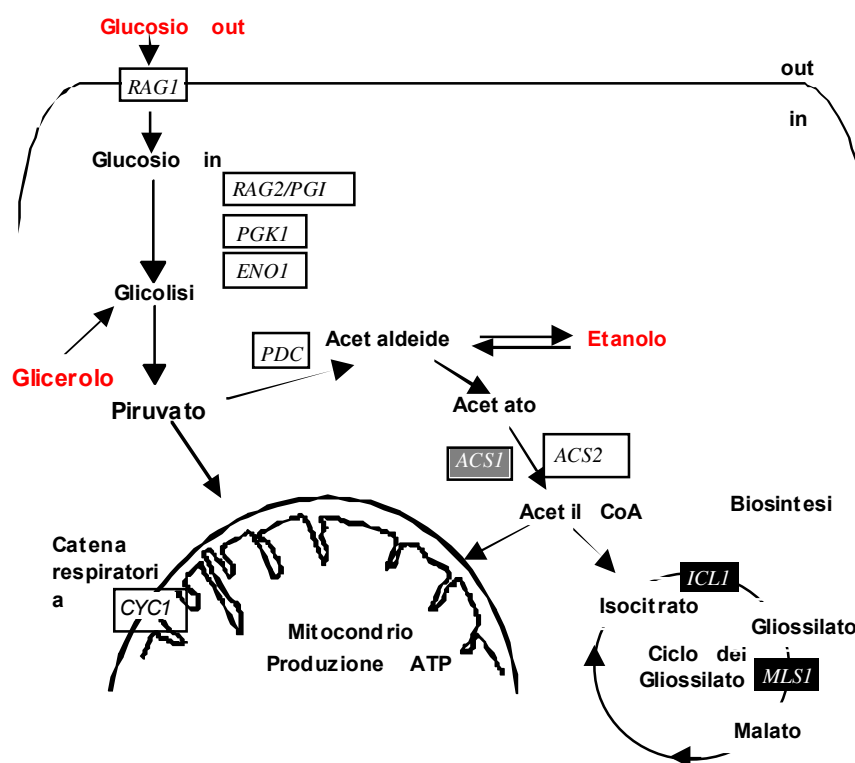
Importanti differenze sono state osservate confrontando l'utilizzo delle fonti di carbonio respirabili tra i due lieviti. Queste fonti richiedono per il loro consumo tre vie metaboliche: produzione di acetil-CoA (bypass della Pdh), reclutamento dell'ossalacetato attraverso il ciclo del gliossilato e la gluconeogenesi. In *S. cerevisiae*, *Cat8p* è richiesto per l'attivazione dei geni chiave di queste vie, quali *ACSI*, *ICL1*, *MLS1* e *FBP1*, mentre in *K. lactis* la regolazione della gluconeogenesi è indipendente da quella del ciclo del gliossilato e non dipendente da *Cat8p* (Georis *et al.*, 2000; Lodi *et al.*, 2001).

I mutanti *not4* di *S. cerevisiae* mostrano una crescita molto limitata in presenza di fonti di carbonio non fermentabili, mentre i mutanti di *K. lactis* sono ancora capaci di crescere su glicerolo e lattato, ma non su etanolo e acetato, indicando che in questo lievito il metabolismo delle fonti a 2C è sotto il controllo di *Not4p*.

Nelle **Figure 40** e **41** è riportato lo schema dei geni che operano sotto il controllo di *NOT4* e le vie metaboliche nelle quali intervengono in *K. lactis* e *S. cerevisiae*.

Nel mutante *Klnot4Δ1* la trascrizione di *KIACSI* non è alterata, mentre *KIACS2*, un bersaglio di *Cat8p*, è molto poco indotto su tutte e tre le fonti di carbonio analizzate. Dato che *KIICL1* e *KIMLS1*, due altri bersagli di *KICat8p*, sono altamente indotti nel mutante dopo shift su etanolo, si può concludere che l'induzione di *KIACS2* richiede una via addizionale che coinvolge *KINot4p* ed è indipendente da *KICat8p*. Questi risultati sembrano indicare che in presenza di etanolo, a causa della riduzione delle attività *Acs* e all'aumentata attività *Icl1* e *Mls1*, l'acetil-CoA è prodotto in piccole quantità e incanalato principalmente nel ciclo del gliossilato. Come conseguenza, l'acetil-CoA non è disponibile in modo sufficiente per le reazioni necessarie alla produzione di energia nel mitocondrio. Il ridotto tasso di respirazione su glucosio e la ridotta espressione del gene *CYCI* su tutte le fonti saggiate suggeriscono inoltre che nel mutante *Klnot4Δ1* di *K. lactis* anche la respirazione mitocondriale sia compromessa.

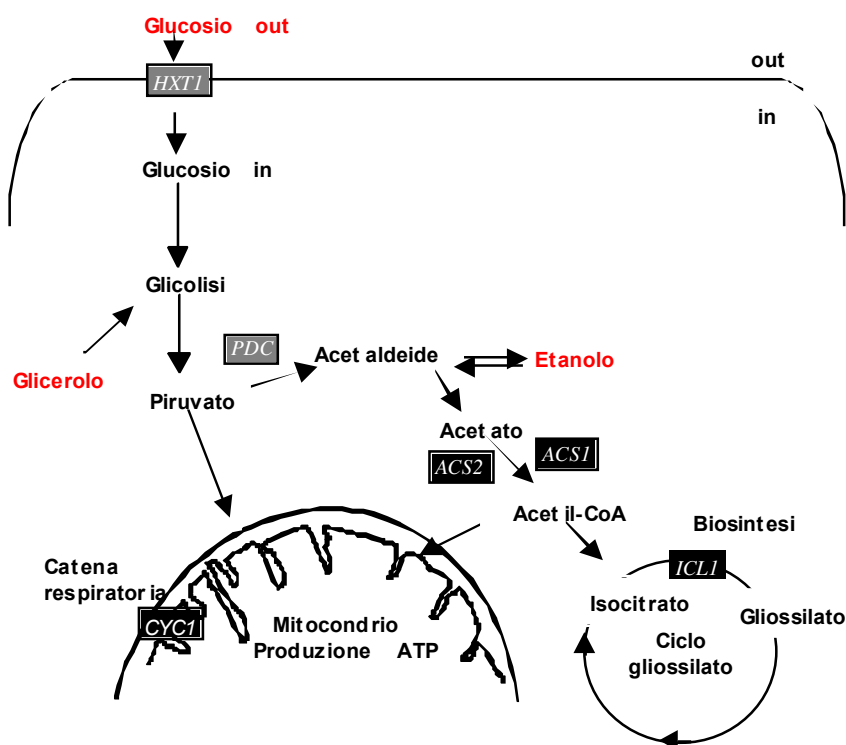




**Figura 40.** Geni metabolici controllati da KINOT4 in *K. lactis*. Le box a sfondo bianco indicano i geni regolati positivamente, quelle a sfondo nero i geni regolati negativamente, quelle grigie i geni non regolati. *RAG1*: trasportatore a bassa affinità per il glucosio. *RAG2/PGI*: fosfogluco-isomerasi. *PGK1*: 3-fosfoglicerato chinasi. *ENO1*: enolasi. *PDC*: piruvato decarbossilasi. *ACS*: acetil-CoA sintetasi. *ICL1*: isocitrato liasi. *MLS1*: malato sintasi. *CYC1*: citocromo c-isoforma 1.

Questo modello non può essere applicato a *S. cerevisiae* dove i geni *ACS1*, *ICL1* e *CYC1* sono prontamente indotti nei mutanti *not4* dopo rimozione del glucosio. Dato che Cat8p controlla l'espressione di *ICL1* e *ACS1*, quest'ultimo è anche sotto il controllo di Adr1p, mentre Hap2-5 sono richiesti per l'espressione di *CYC1*, possiamo concludere che Not4p agisce a monte degli specifici attivatori di questi geni. È noto che in *S. cerevisiae* enzimi chiave del metabolismo dei carboidrati sono regolati sia a livello trascrizionale che post-traduzionale, a differenza di *K. lactis* dove esiste una buona correlazione tra i livelli dei trascritti e delle corrispondenti attività (Lopez *et al.*, 2003). Nel nostro caso, ScNot4p potrebbe agire come controllore dell'espressione di questi geni in condizioni di induzione per evitare che sia prodotto troppo RNA dal momento che la regolazione dell'attività passa a livello di proteina. Non siamo comunque ancora in grado di formulare una ipotesi che correli questa precoce induzione dei geni respiratori con il mancato utilizzo di fonti a 2 e 3 atomi di carbonio.

Due altri aspetti interessanti messi in evidenza in questo lavoro è la perdita della morfologia tubulare dei mitocondri e il ridotto tasso respiratorio su glucosio nel mutante *Klnot4* $\square$ 1. Il significato di questa osservazione non è noto. Sono necessari ulteriori studi per comprendere se ci sia



**Figura 41.** Geni metabolici controllati da *ScNOT4* in presenza di etanolo in *S. cerevisiae*. Le box a sfondo nero i geni regolati negativamente, quelle grigie i geni non regolati. *HXT1*: trasportatore a bassa affinità per il glucosio. *PDC*: piruvato decarbossilasi. *ACS1,2*: acetil-CoA sintetasi. *ICL1*: isocitrato liasi. *CYC1*: citocromo c-isoforma 1.

effettivamente un legame tra il ridotto metabolismo respiratorio e i cambiamenti della morfologia mitocondriale.

#### 6.4. I mutanti *not4* e *ccr4* resistono all'invecchiamento cellulare e allo stress ossidativo in *S. cerevisiae*.

Recenti indagini hanno dimostrato che il complesso CCR4-NOT contribuisce al controllo della trascrizione Msn2-dipendente attraverso la via Ras/cAMP, che reprime i geni per la resistenza allo stress. I prodotti dei geni indotti da Msn2/4p sono sovraespressi nei mutanti del complesso CCR4-NOT e superindotti in condizioni di stress (shock termico e deplezione di glucosio). I mutanti *not3* e *not5* mostrano inoltre una maggiore resistenza allo shock termico e in essi Msn2p è diversamente modificata a livello post-traduzionale (Lenssen *et al.*, 2002).

L'inattivazione dei geni *NOT4* e *CCR4* determina un ritardo dell'invecchiamento cronologico e un aumento della resistenza al perossido di idrogeno, due fenotipi accompagnati da un minore accumulo di danno ossidativo nella cellula, probabilmente come conseguenza della attivazione costitutiva dei geni per la resistenza allo stress Msn-dipendenti. Infatti, in queste condizioni, i geni *SOD2* e *CTT1*, indotti da Msn2/4p, mostrano un maggiore livello di trascrizione nei mutanti *not4* e *ccr4*. L'analisi trascrizionale ha però suggerito che i fenotipi di resistenza allo stress non dipendono totalmente dai fattori di trascrizione Msn2/4p, in quanto nei mutanti l'espressione dei geni *ZWF1* e *GND1*, che non sono sotto il controllo di Msn2/4, risulta aumentata. L'aumento della resistenza al perossido di idrogeno nel triplo mutante *msn2msn4not4* rispetto al

doppio mutante *msn2msn4*, il quale risulta più sensibile al perossido di idrogeno e mostra un invecchiamento precoce rispetto al ceppo selvatico, conferma il risultato dell'analisi Northern. Possiamo quindi concludere che il complesso CCR4-NOT reprime altri fattori oltre a Msn2p e Msn4p. Un candidato è il fattore di trascrizione Yap1p, il quale regola l'attività del gene *ZWF1* (Juhnke *et al.*, 1996; Costa and Ferreira, 2001). Sarà interessante studiare la resistenza allo stress ossidativo nel doppio mutante *yap1not4* e soprattutto trasferire le mutazioni *msn* nel contesto BY4741, per avere il giusto riscontro fenotipico.

E' noto che la sovraespressione dei geni che codificano per le altre proteine Notp non permettono un recupero della termosensibilità del mutante *not4-1* (Collart and Struhl, 1994; Oberholzer and Collart, 1998) ma, viceversa, la sovraespressione del gene *NOT4* permette il recupero della termosensibilità negli altri mutanti *not* (Collart and Struhl, 1994). Questo suggerisce che la proteina Not4p potrebbe essere l'effettore finale della funzione globale del complesso. E la maggiore intensità dei fenotipi da noi descritti nel mutante *not4* rispetto al mutante *ccr4* sembrano confermarlo. Sarà interessante a questo proposito sovraesprimere i geni che codificano gli altri componenti del complesso nel mutante *not4* e viceversa, per verificare un recupero della sensibilità allo stress ossidativo.

## 6.5. La proteina Not4p localizza in granuli citoplasmatici di natura sconosciuta dopo stress ossidativo.

Non sono stati riportati in letteratura studi specifici sulla localizzazione del complesso CCR4-NOT. La sua multifunzionalità ne determina probabilmente una distribuzione ubiquitaria nella cellula.

In questa tesi sono riportati dati preliminari volti alla comprensione della localizzazione della proteina Not4p in condizioni normali e di stress. I risultati mettono in evidenza l'accumulo di Not4p in granuli citoplasmatici di natura sconosciuta dopo varie condizioni di stress (trattamento con perossido di idrogeno, alte temperature, etanolo 6%, carenza di nutrienti e in fase stazionaria). Recentemente è stata dimostrata la presenza nella cellula di lievito di corpi citoplasmatici, P-bodies, sede della degradazione 5'-3' esonucleolitica e del decapping degli mRNA (Sheth and Parker, 2003) e le cui dimensioni riflettono il flusso delle molecole di messaggero che stanno subendo il decapping. Dhh1p, uno dei componenti del complesso CCR4-NOT, sembra associata ai P-bodies. I granuli da noi osservati potrebbero essere P-bodies nei quali Not4p localizza solo dopo stress. Tuttavia, non è da dimenticare che questa proteina è anche una ubiquitina-ligasi e pertanto i granuli osservati potrebbero essere associati alla degradazione proteasomale. Un'altra ipotesi sulla natura di questi granuli è data dai granuli da stress (SG) identificati in cellule di mammifero (Kedersha and Anderson, 2002). Gli SG sono foci citoplasmatici nei quali gli mRNA sono dinamicamente selezionati in seguito a fosforilazione del fattore di inizio (eIF)2. All'interno di questi granuli è stata dimostrata la presenza, oltre che di mRNA, di fattori di traduzione nonché componenti del complesso di preinizio 48S e proteine che promuovono la stabilità e la destabilizzazione degli mRNA (Kimball *et al.*, 2003). La formazione di questi granuli si traduce in un arresto della traduzione degli mRNA forse per impedire la formazione di proteine con un folding scorretto. Il fattore pro-apoptotico AIF reprime la formazione di questi granuli, ma questo suo ruolo sembra scollegato a quello pro-apoptogenico (Candè *et al.*, 2004). La possibilità che i granuli da noi osservati possano essere dello stesso tipo nasce, oltre che dal fatto che sono specificamente indotti da stress, anche da una recentissima "genome-wide analysis" condotta sul mutante *ccr4* (Grigull *et al.*, 2004). In questa analisi è stato infatti dimostrato che Ccr4p contribuisce alla degradazione di trascritti che codificano proteine ribosomali e fattori per la sintesi di rRNA e per l'assemblaggio dei ribosomi e che l'abbondanza dei fattori per la biogenesi dei ribosomi è controllata a livello di stabilità degli mRNA. Se i granuli da noi osservati

fossero simili agli SG di mammifero, CCR4 potrebbe forse essere coinvolto nella loro formazione. Si può azzardare l'ipotesi che i granuli ai quali si associa Not4p siano: P-bodies che dopo stress accumulano fattori di inizio della traduzione e fattori proteasomali, tra i quali Not4p e il complesso CCR4-NOT. Per identificare la natura di questi siti di accumulo sarà necessario verificare la eventuale co-localizzazione di regolatori del decapping, di componenti del proteasoma e/o di fattori di inizio della traduzione con la proteina Not4p.

Non è da da escludere che i foci citoplasmatici derivino da attività di Not4p indipendenti dal complesso visto che la proteina può esistere nella cellula in forma libera e non associata.

## **7. CONCLUSIONI**

---

I risultati principali di questo lavoro hanno messo in evidenza nuovi e importanti ruoli di Not4p nel controllo del metabolismo delle fonti di carbonio in lievito con meccanismi i cui componenti sono ancora sconosciuti e hanno sottolineato ancora una volta la differente fisiologia dei due lieviti. Infatti Not4p controlla il metabolismo fermentativo in *K. lactis* ma non in *S. cerevisiae*, e controlla il metabolismo respiratorio in entrambi i lieviti ma in modo molto diverso.

Per quanto riguarda lo stress ossidativo i risultati hanno confermato il recente dato di letteratura (Lenssen *et al.*, 2002) che attribuisce al complesso CCR4-NOT il ruolo di repressore dei fattori di trascrizione Msn2p e Msn4p, i quali inducono l'espressione di geni per la risposta allo stress ossidativo. Allo stesso tempo, i risultati hanno messo in evidenza che il complesso reprime fattori che inducono i geni da stress diversi da Msn2/4p e che Not4p si accumula in granuli citoplasmatici in condizioni di stress ossidativo. La natura di questi granuli sarà oggetto delle prossime ricerche. Infine la scoperta dell'interazione tra NOT4 e MPK1 mette in luce che il complesso CCR4-NOT sia coinvolto non solo nella risposta allo stress ossidativo ma anche nello stress di parete cellulare: Mpk1 è infatti un componente di una via di trasduzione che protegge la parete dagli stress esterni, quali l'alta osmolarità.

Dal momento che *K. lactis* mostra un metabolismo prevalentemente respiratorio, questo organismo costituisce un sistema modello, complementare e spesso preferibile a *S. cerevisiae*, per lo studio dei complessi fenomeni cellulari che si verificano nelle cellule superiori. Sarà quindi interessante e utile studiare il ruolo di Not4p e del complesso CCR4-NOT nella regolazione della risposta cellulare allo stress ossidativo in questo lievito.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Albert, K.T., Lemaire, M., Nynke, L.B., Gentz, R., Collart, A.M. and Timmers, H.M.Th. (2000) Isolation and characterization of human orthologs of yeast CCR4/NOT complex subunits. *Nucleic Acids Research* 28:809-817
- Albert, K.T., Hanzawa, H., Legtenberg, Y.I.A., de Ruwe, M.J., van den Heuvel, F.A., Collart, A.M., Boelens, R. and Timmers, H.M.Th. (2002) Identification of an ubiquitin-protein ligase subunit within the CCR4-NOT transcription repressor complex. *EMBO j.* 21:355-364
- Badarinarayana, V., Chiang, Y. and Denis, C.L. (2000) Functional interaction of CCR4/NOT proteins with TATA-Binding Protein (TBP) and its associated factors of yeast. *Genetics* 155:1045-1054
- Bai, Y., Salvatore, C., Chiang, Y., Collart, A.M., Liu, H. and Denis, C. (1999) The CCR4 and CAF1 proteins of the CCR4/NOT complex are physically and functionally separated from NOT2 NOT4 and NOT5. *Molecular and Cellular Biology* 19:6642-6651
- Barnett, J.A. (1992) Some controls on oligosaccharide utilization by yeasts: the physiological basis of the Kluyver effect. *FEMS Microbiol Lett* 79:371-378
- Benson, J.D., Benson, M., Howley, P.M. and Struhl, K. (1998) Association of distinct yeast *NOT2* functional domains with components of GCN5 histone acetylase and CCR4 transcriptional regulatory complex. *EMBO Journal* 17:6714-6722
- Bereiter-Hahn, J., Seipel, K.H., Voth, M. and Ploem, J.S. (1983) Fluorimetry of mitochondria in cells vitally stained with DASPMI or rhodamine 6 GO. *Cell Biochem Funct* 1:147-155
- Betina, S., Goffrini, P., Ferrero, I. and Wesolowski-Louvel, M. (2001) *RAG4* gene encodes a glucose sensor in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* 158:541-8
- Betz, J.L., Chang, M., Washburn, T.M., Porter, S.E., Mueller, C.L. and Jaehning, J.A. (2002) Phenotypic analysis of Paf1/RNA polymerase II complex mutations reveals connections to cell cycle regulation, protein synthesis, and lipid and nucleic acid metabolism. *Mol Genet Genomics* 268:272-285
- Bianchi, M.M., Falcone, C., Chen, X.J., Wesolowsky, M., Frontali, L. and Fukuhara, H. (1987) Transformation of the yeast *Kluyveromyces lactis* by new vectors derived from the 1.6 $\mu$ m circular plasmid pKD1. *Current Genetics* 12:185-192
- Bianchi, M.M., Tizzani, L., Destruelle, M., Frontali, L. and Wesolowski-Louvel, M. (1995) The "petite-negative" yeast *Kluyveromyces lactis* has a single gene expressing pyruvate decarboxylase activity. *Molecular Microbiology* 19:27-36
- Billard, P., Menart S, Blaisonneau J, Bolotin-Fukuhara M, Fukuhara H, Wesolowski-Louvel M. (1996) Glucose uptake in *Kluyveromyces lactis*: role of the *HGT1* gene in glucose transport. *J Bacteriol* 178:5860-6
- Blaisonneau, S.J., Fukuhara, H. and Wesolowski-Louvel, M. (1997) The *Kluyveromyces lactis* equivalent of casein kinase I is required for the transcription of the gene encoding the low-affinity glucose permease. *Molecular and General Genetics* 253:469-477



- Bogdan, J.A., Adams-Burton, C., Pedicord, D.L., Sukovich, D.A., Benfield, P.A., Corjay, M.H., Stoltenborg, J.K. and Dicker, I.B. (1998) Human carbon catabolite repressor protein (CCR4)-associative factor 1: cloning, expression and characterization of its interaction with the B-cell translocation protein BTG1. *Biochem J.* 336:471-481
- Bonneaud, N., Ozier-Kalogeropoulos, O., Li, G., Labouesse, M., Minvielle-Sebastia, L. and Lacroute, F. (1991) A family of low and high copy replicative, integrative and single-stranded *S.cerevisiae/E.coli* shuttle vectors. *Yeast* 7:609-615
- Bougarel, D., Nguyen, C. and Bolotin-Fukuhara M. (1999) *HAP4*, the glucose-repressed regulated subunit of the HAP transcriptional complex involved in the fermentation-respiration shift, has a functional homologue in the respiratory yeast *Kluyveromyces lactis*. *Mol Microbiol* 31:1205-1216
- Boy-Marcotte, E., Perrot, M., Bussereau, F., Boucherie, H. and Jacquet, M. (1998) Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 180:1044-1052
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. and Boeke, J.D. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14:115-132
- Breunig, K.D., Bolotin-Fukuhara, M., Bianchi, M.M., Bourgarel, C., Falcone, C., Ferrero, I., Frontali, L., Goffrini, P., Krijer, J.J., Mazzoni, C., Milkowski, C., Steensma, H.Y., Wesolowski-Louvel, M. and Zeeman, A.M. (2000) Regulation of primary carbon metabolism in *K. lactis*. *Rev Enz and Microbiol* 26:771-780
- Brons, J.F., De Long, M., Valens M., Grivell, L.A., Bolotin-Fukuhara, M. and Blom J. (2002) Dissection of the promoter of the *HAP4* gene in *S.cerevisiae* unveils a complex regulatory framework of transcriptional regulation. *Yeast* 19:923-932
- Buckholz, R.G. and Gleeson, A. G. (1991) Yeast system for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnology* 9:1067-1072
- Buehrer, B.M. and Errede, B. (1997) Coordination of the mating and cell integrity mitogen-activated protein kinase pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 17:6517-6525
- Burkhard, P., Stetefeld, J. and S. V. Strelkov. (2001) Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* 11:82-88
- Cade, M.R. and Errede, B. (1994) *MOT2* encodes a negative regulator of gene expression that effect basal expression of pheromone-responsive genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 14:3139-3149
- Cai, J., Roberts, I.N. and Collins, M.D. (1996) Phylogenetic relationship among members of the ascomycetous yeast genera *Brettanomyces*, *Debariomyces*, *Dekkera* and *Kluyveromyces* deduced by small subunit *rRNA* gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:542-549

- Candé, C., Vahsen, N., Métivier, D., Tourrière, H., Chebli, K., Garrido, C., Tazi, J. and Kroemer, G. (2004) Regulation of cytoplasmic stress granules by apoptosis-inducing factor. *J Cell Sci* 117:4461-4468
- Chang, Y. D. and Dikson, R. C. (1988) Primary structure of the lactose permease gene from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Biological Chemistry* 263:16696-16703
- Chang, M., French-Cormay, D., Fan., H.-Y., Klein, H., Denis, C.L. and Jaehning, J. (1999) A complex containing RNA polymerase II, Paf1p, Cdc73p, Hpr1p, and Ccr4p plays a role in protein kinase C signaling. *Mol Cell Biol* 19:1056-1067
- Charbon G., Breunig K.D., Wattiez R., Vandenhautte J. and Noel-Georis I. (2004) Key role of Ser562/661 in Snf1-dependent regulation of Cat8p in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *Mol Cell Biol* 24:4083-4091
- Chen, X. J., Saliola, M., Falcone, M., Bianchi, M.M. and Fukuhara, H. (1986) Sequence organization of the circular plasmid pKD1 from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Nucleic Acids Research* 14:4471-4481
- Chen, X.J., Bianchi, M.M., Suda, K. and Fukuhara, H. (1989) The host range of the pKD1-derived plasmid in yeast. *Current Genetics* 16:95-98
- Chen, X.J., Wesolowski-Louvel, M., Fukuhara, H. (1992) Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. Transcriptional regulation of the glucose transporter gene *RAG1*. *Molecular and General Genetics* 233:97-105
- Chen, X. J. (1996) Low- and high-copy-number shuttle vectors for replication in the budding yeast *Kluyveromyces lactis*. *Gene* 172:131-136
- Chen, J., Chiang Y. C. and Denis, C.L. (2002) CCR4, a 3'-5' poly(A)RNA and ssDNA exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic deadenylase. *Embo J.* 21:1414-1426
- Cheng, S., Clancy, C.J., Checkley, M.A., Handfield, M., Hillman, J.D., Progulske-Fox, A., Lewin, A.S., Fidel, P.L. and Nguyen, M.H. (2003) Identification of *Candida albicans* genes induced during thrush offers insight into pathogenesis. *Mol Microbiol* 48:1275-1288
- Collart, A.M. and Struhl, K. (1993) CDC39, an essential nuclear protein that negatively regulates transcription and differentially affects the constitutive and inducible *HIS3* promoters. *EMBO Journal* 12:177-186
- Collart, A. M. and Struhl, K. (1994) *NOT1* (*CDC39*), *NOT2* (*CDC36*), *NOT3* and *NOT4* encode a global negative regulator of transcription that differentially affects TATA-element utilization. *Gene and Development* 8:525-537
- Collart, A.M. (1996) The *NOT SPT3* and *MOT1* genes functionally interact to regulate transcription at core promoters. *Molecular and Cellular Biology* 16:6668-6676
- Collart, M.A. (2003) Global control of gene expression in yeast by the Ccr4-Not complex. *Gene* 313:1-16

- Collart, M.A. and Timmers, H.T. (2004) The eukaryotic Ccr4-Not complex: a regulatory platform integrating mRNA metabolism with cellular signaling pathways? *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 77:289-322
- Coller, JM, Tucker M., Sheth U., Valencia-Sanchez M.A. and Parker R. (2001) The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. *RNA* 7:1717-27.
- Costa, V. and Moradas-Ferreira, P. (2001) Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol Aspects Med* 22:217-246
- Costanzo MC, Hogan JO, Cusick ME, Davis BP, Fancher AM, Hodes PE, Kondu P, Lengieza C, Lew-Smith JE, Lingner C, Roberg-Perez KJ, Tillberg M, Brooks JE and Garrels JL. (2000) "The yeast proteome database (YPD) and *C. elegans* proteome database (WormPD): comprehensive resources for the organization and comparison of model organism protein information". *Nucleic Acid Res* 28:73-76
- de Barros Lopes, M., Ho, J.-Y. and Reed, S.I. (1990) Mutations in cell division cycle genes *CDC36* and *CDC39* activate the *Saccharomyces cerevisiae* mating pheromone response pathway. *Mol Cell Biol* 10:2966-2972
- De Risi, J. L., Iyer, V. R. and Brown, P. O. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278:680-686
- De Virgilio, C., Burckert N., Barth G., Neuhaus J-M., Boller T., Wiemken A. (1992) Cloning and disruption of a gene required for growth on acetate but not on ethanol: the acetyl co-enzyme A synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 8:1043-1051
- Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M-B, Vinh, J. and Toledano, B.M. (2002) A thiol-peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111:471-481
- Deluen, C., James, N., Maillet, L., Molinete, M., Theiler, R., G., Lemaire, M., Paquet, N., Collart, M.A. (2002) The Ccr4Not complex and yTAF1 (yTaf(II)130p/yTAF(II)145p present physical and functional interactions. *Mol. Cell. Biol.* 22:6735-6749
- Denis, C.L. (1984) Identification of new genes involved in the regulation of yeast alcohol dehydrogenase II. *Genetics* 108:833-844
- Denis, C.L., Chiang, Y.C., Cui, Y. and Chen, J. (2001) Genetic evidence supports a role for the yeast CCR4-NOT complex in transcriptional elongation. *Genetics* 158:627-634
- Deshler, J. O., Larson, G. P. and Rossi, J. J. (1989) *Kluyveromyces lactis* maintains *Saccharomyces cerevisiae* intron-encoded splicing signals. *Mol. Cell. Biol* 9:2208-2213
- Destruelle, M., Menghini, R., Frontali, L. and Bianchi, M.M. (1999) Regulation of the expression of the *Kluyveromyces lactis* PDC1 gene carbon source-responsive elements and autoregulation. *Yeast* 15:361-370
- Dimmer, K.S.S., Fritz, S., Fuchs, M., Messerschmitt, M., Weinbach, N. et al. (2002)

Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol Biol Cell* 13:847-853

Ding, J.L., Lim, E.H., Li, H. F., Kumar, J.K., Lee, S.L. and Lam, T.J. (2004) Expression of Recombinant Vitellogenin in the Yeast *Pichia pastoris* *Biotechnology and Bioengineering* 85:330-339

Draper, M.P., Liu, H., Nelsbach, A.H., Mosley, P.S. and Denis, C.L. (1994) *CCR4* is a glucose-regulated transcription factor whose leucine-rich repeat binds several proteins important for placing *CCR4* in its proper promoter context. *Molecular and Cellular Biology* 14:4522-4531

Draper, D.E. (1999) Themes in RNA-protein recognition. *J. Mol. Biol* 293:255-270

Egilmez, N.K. and Jazwinski, S.M. (1989) Evidence for the involvement of a cytoplasmic factor in the aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 171:37-42

Elion, E.A. (1998) Routing MAP kinase cascades. *Science* 281:1625-1626

Estruch, F. and Carlson, M. (1993) Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 13:3872-3881

Estruch, F. (2000) Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:

Fabrizio, P., Pozza, F., Pletcher, S.D., Gendron, C.M. and Longo, V.D. (2001) Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science* 292:288-290

Fabrizio, P. and Longo, V.D. (2003) The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* 2:73-81

Fabrizio, P., Liou, L.L., Moy, N.V., Diaspro, A., Valentine, J.S., Gralla, E.B. and Longo, D.V. (2003) *SOD2* functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast. *Genetics* 163:35-46

Falcone, C., Saliola, M., Chen, X.J., Frontali, L., Fukuhara, H. (1986) Analysis of the 1,6□m circular plasmid from the yeast *Kluyveromyces drosophilarum*: structure and molecular dimorphism. *Plasmid* 15:248-252

Fidler, C, Wainscoat, J.S. and Boulwood, J. (1999) The human *POP2* gene: identification, sequencing and mapping to the critical region of the 5q-syndrome. *Genomics* 56:134-136

Fischer, N. and Weis, K. (2002) The DEAD box protein Dhh1 stimulates the decapping enzyme Dcp1. *EMBO J* 12:2788-2797

Flandez, M., Cosano, C.I., Nombela, C., Martin, H. and Molina, M. (2004) Reciprocal regulation between Slt2 MAPK and isoforms of Msg5 dual-specificity protein phosphatase modulates the yeast cell integrity pathway. *J Biol Chem* 279:11027-11034

Flores, C., Rodriguez, C., Petit, T. and Gancedo, C. (2000) Carbohydrate and energy-

- yelding metabolism in non-conventional yeast. *FEMS Microbiology* 24:507-529
- Frohlich, K.U. and Madeo, F. (2000) Apoptosis in yeast- a monocellular organism exhibits altruistic behaviour. *FEBS Lett.* 473:6-9
- Frohlich, K.U. and Madeo, F. (2001) Apoptosis in yeast: a new model for aging research. *Exp Gerontol* 37:27-31
- Gavin, A-C., Bosche, M., Krause, R. (2002) Functional organization of the yeast proteome by sytematic analysis of protein complexes. *Nature* 415:141-147
- Georis, I., Krijger J.J., Breunig K.D. and Vandenhoute J. (2000) Differences in regulation of yeast gluconeogenesis revealed by Cat8p-independent activation of *PKCI* and *FBPI* genes in *Kluyveromyces lactis*. *Mol Gen Genet* 264:193-203
- Goffrini, P., Wesolowski-Louvel, M., Ferrero, I. and Fukuhara-Bolotin, H. (1990) *RAG1* gene of the yeast *Kluyveromyces lactis* codes for a sugar transporter. *Nucleic Acids Research* 18:5294
- Goffrini, P., Ficarelli, A. and Ferrero, I. (1995) Hexokinase activity is affected in mutants of *K. lactis* resistant to glucose repression. *Microbiology* 141:441-447
- Goffrini, P., Ficarelli, A., Donnini, C., Lodi, T., Puglisi, P., P., and Ferrero, I. (1996) *FOG1* and *FOG2* genes, required for the transcriptional activation of glucose-repressible genes of *Kluyveromyces lactis*, are homologous to *GAL83* and *SNF1* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* 29:316-326
- Greenblatt, J. (1997) RNAPolimeraseII holoenzyme and transcriptional regulation. *Current Opinion in Cell Biology* 9:310-319
- Grigull, J., mnaimneh, S., Pootoolal, J., Robinson, M.D. and Hughes, R.T. (2004) Genome-Wide analysis of mRNA stability using transcription inhibitors and microarrays reveals posttranscriptional control of ribosome biogenesis factors. *Mol Cell Biol* 24:5534-47
- Guarente, L. and Kenyon, C. (2000) Genetic pathways that regulate aging in model organisms. *Nature* 408:255-62
- Guldener, U. and Hegemann, J.H. (2000) A second generation of GFP-vectors for subcellular localization studies in budding yeast. *DDBJ/EMBL/GenBank accession No. AF298787*
- Gustin, M.C., Albertyn, J., Alexander, M.R., and Davenport, K. (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 62:1264-1300
- Hampsey, M. (1997) A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13:1099-1133
- Hanzawa, H., de Ruwe, M.J., Albert, T.K., van Der Vliet, P.C., Timmers, H.T., Boelens, R. (2001) The structure of the C4C4 ring finger of human NOT4 reveals features distinct from those of C3HC4 RING fingers. *J Biol Chem* 276:10185-91010

- Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11:298-300
- Hasan, R., Leroy, C., Isnard, A.D., Labarre, J., Boy-Marcotte, E. and Toledano, M.B. (2002) The control of the yeast H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response by the Msn2/4 transcription factors. *Molecular Microbiology* 45:233-241
- Haurie, V., Perrot M., Mini T., Jenou P., Sagliocco F., Boucherie H. (2001) The transcriptional activator Cat8p provides a major contribution to the reprogramming of carbon metabolism during the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 276:76-85
- Hedges, D., Proft, M. and Entian, K-D (1995) CAT8, a new zinc cluster encoding gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 15:1915-1922
- Heinisch, J., Kirchrath, L., Liesen, T., Vogelsang, K. and Hollemberg, C.P. (1993) Molecular genetics of phosphofructokinase in the yeast *K. lactis*. *Molecular Microbiology* 8:570-599
- Heinisch, J. J., A. Lorberg, H. P. Schmitz and J. J. Jacoby. (1999) The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 32:671-680
- Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, A.K., Maldener, C., Frohlich, K-U., Wissing, S., Buttner, S., Fehr, M., Sigris, S. and Madeo, F. (2004) Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 164:501-507
- Hohmann, S. (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:300-372
- Irie, K., Kyoko, Y., Kawase, K. and Matsumoto, K. (1994) The yeast MOT2 gene encodes a putative zinc-finger protein that serves a global negative regulator affecting expression of several categories of genes, including mating-pheromone responsive genes. *Molecular and Cellular Biology* 14:3150-3157
- Jacoby, J.J., Kirchrath, L., Gengenbacher, U. and Heinesch, J.J. (1999) Characterization of KIBCK1, encoding a MAP kinase kinase kinase of *Kluyveromyces lactis*. *J Mol Biol* 288:337-352
- Jazwinski, S.M. (1999) Molecular mechanisms of yeast longevity. *Trends Microbiol* 7:247-252
- Joazeiro, C.A. and Weissman A.M. (2000) RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102:549-552
- Johnson, F.B., Sinclair, D.A. and Guarente, L. (1999) Molecular biology of aging *Cell* 96:291-302
- Juhnke, H., Krem, B., Kotter, P. and Entian, K-D. (1996) Mutants that show increased

sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress. *Mol Gen Genet* 252:456-464

Kaeberlein, M., McVey, M. and Guarente, L. (1999) The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* 13:2570-2580

Kedersha, N. and Anderson, P. (2002) Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochemical Society* 30:963-969

Khodursky A.B. and Bernstein J.A. (2003) Life after transcription--revisiting the fate of messenger RNA. *Trends Genet* 19:113-115

Kimball, R.S., Horetsky, L.R., Ron, D., Jefferson, L.S. and Harding, H.P. (2003) Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C273-C284

Kirchrath, L., Lorberg, A., Schmitz, H.P., Gengenbacher, U. and Heinisch, J.J. (2000) Comparative genetic and physiological studies of the MAP kinase Mpk1p from *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 300:743-758

Kratzer, S. and Schuller, H.J. (1997) Transcriptional control of the yeast acetyl-CoA synthetase gene, *ACSI*, by the positive regulators *CAT8* and *ADRI* and the pleiotropic repressor *UME6*. *Mo Microbiol* 26:631-641

Kreger-Van Rij, N.J.W. (1984) The yeast. A taxonomic study *E.Elsevier, eds*

Krueger, K.E., Ghosh A.K., Krom B.P. and Cihlar RL. (2004) Deletion of the NOT4 gene impairs hyphal development and pathogenicity in *Candida albicans*. *Microbiology* 150:229-40

Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (1998) The Yeasts. A taxonomic study *Elsevier Science, Amsterdam*

Kurtzmann, C.P. and Robnett, C.J. (1998) Identification and phylogeny of ascomycetes yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DAN partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:331-371

Leberer, E., Dignard, D., H Marcus, D., Whiteway, M. and Thomas, Y. D. (1994) Molecular characterization of *SIG1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in negative regulation of G-protein mediated signal transduction. *EMBO Journal* 13:3050-3064

Lee, T. I., Wyrick, J.J., Koh, S.S., Jennings, E.G., Gadbois, E.L. and Young, R.A. (1998) Interplay of positive and negative regulators in transcription initiation by RNA polymeraseII holoenzyme. *Molecular and Cellular Biology* 18:4455-4462

Lee, J., Godon, G., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Laberre, J. and Toledano, M.B. (1999) Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 274:16040-16046

Lemaire, M. and Collart, A.M. (2000) The TBP-associated factor yTafII19 functionally

interacts with components of the global transcriptional regulator CCR4/NOT complex and physically interacts with Not5 subunit. *Journal of Biological Chemistry* 275:1-10

Lemaire, M, Guyon A, Betina S, Wesolowski-Louvel M. (2002) Regulation of glycolysis by casein kinase I (Rag8p) in *Kluyveromyces lactis* involves a DNA-binding protein, Sck1p, a homologue of Sgc1p of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 40:355-364

Lemaire, M. and Wesolowski-Louvel M. (2004) Enolase and glycolytic flux play a role in the regulation of the glucose permease gene *RAG1* of *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* 168:723-731

Lenssen, E., Oberholzer, U., Labarre, J., de Virgilio, C. and Collart, M.A. (2002) *Saccharomyces cerevisiae* Ccr4-Not complex contributes to the control of Msn2p-dependent transcription by the Ras/cAMP pathway *Mol. Microbiol.* 43:1023-1037

Lesage, P., Yang, X. and Carlson, M. (1996) Yeast SNF1 protein kinase interacts with Sip4, a C6 zinc cluster transcriptional activator: a new role for SNF1 in the glucose response. *Mol Cell Biol* 16:1921-1928

Lin, S.J., Defossez, P.A. and Guarente, L. (2000) Requirement of NAD and *SIR2* for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289:2126-2128

Lin, S.J., Kaerberlein, M., Andalis, A.A., Sturtz, L.A., Defossez, P.A., Culotta, V.C., Fink, G.R. and Guarente, L. (2002) Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 418:344-348

Liu, H.-Y., Toyn, J.H., Chiang, Y.-C., Draper, M.P., Johnston, L.H. and Denis, C.L. (1997) DBF2, a cell cycle-regulated protein kinase, is physically and functionally associated with the CCR4 transcriptional regulatory complex. *EMBO J* 16:5289-5298

Liu, H., Badarinarayana, V., Audino, C.D., Rappsilber, J., Mann, M. and Denis, C. (1998) The NOT proteins are part of the CCR4 transcriptional complex and affect gene expression both positively and negatively. *EMBO Journal* 17:1096-1106

Liu, H., Chiang, Y., Pan, J., Chen, J., Salvatore, C., Audino, C.D., Badarinarayana, V., Palaniswamy, V., Anderson, B. and Denis, C.L. (2001) Characterization of CAF4 and CAF16 reveals a functional connection between the CCR4/NOT complex and a subset of SRB-protein of the RNAPolimeraseII holoenzyme. *Journal of Biological Chemistry* 276:7541-7548

Lodi, T., Saliola, M., Donnini, C. and Goffrini, P. (2001) Three target genes for the transcriptional activator Cat8p of *Kluyveromyces lactis*: acetyl coenzyme A synthetase genes *KLACS1* and *KLACS2* and lactate permease gene *KIJEN1*. *J Bacteriol* 183:5257-5261

Longo, V.D., Gralla, E.B. and Valentine, J.S. (1996) Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo *J Biol Chem* 271:12275-12280

Longo, V.D., Ellerby, L.M., Bredesen, D.E., Valentine, J.S. and Gralla, E.B. (1997) Human Bcl2 reverses survival defects in yeast lacking superoxide dismutase and delays death of wild-type yeast. *J Cell Biol* 137:1581-1588



- Longo, V.D., Liou, L.L., Valentine, J.S. and Gralla, E.B. (1999) Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase. *Arch Biochem Biophys* 365:131-142
- Longo, V.D. and Fabrizio, P. (2002) Regulation of longevity and stress resistance: a molecular strategy conserved from yeast to humans? *Cell. Mol Life Sci* 59:903-908
- Lopez, M.L., Redruello, B., Valdes, E., Moreno, F., Heinisch, J.J. and Rodicio, R. (2003) Isocitrate lyase of the yeast *Kluyveromyces lactis* is subject to glucose repression but not to catabolite inactivation. *Curr Gen* 294:453-459
- Madeo, F., Frolich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S. J., Wolf, D. H., and Frolich, K.-H. (1999) Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* 139:757-767
- Madeo, F., Herker, E., maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S. and Herlan, M. (2002) A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell* 9:911-917
- Maillet, L., Tu, C., Hong, Y.K., Shuster, E.O. and Collart, M.A. (2000) The essential function of NOT1 lies within the CCR4-NOT complex. *J Mol Biol* 303:131-143
- Maillet, L. and Collart, M. A. (2002) Interaction between Not1p, a component of the Ccr4-Not complex, a global regulator of transcription and Dhh1p, a putative RNA helicase. *J Biol Chem* 277:2835-2842
- Martinez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. and Estruch, F. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress element (STRE). *EMBO J* 15:2227-2235
- (a) Mazzoni, C., Mancini, P., Verdone, L., Madeo, F., Serafini, A., Herker, E. and Falcone, C. (2003) A truncated form of KILsm4p and the absence of factors involved in mRNA decapping trigger apoptosis in yeast. *Mol Cell Bol*
- (b) Mazzoni, C., Mancini, P., Madeo, F., Palermo, V. and Falcone, C. (2003) A *Kluyveromyces lactis* mutant in the gene *KILSM4* shows phenotypic markers of apoptosis. *FEMS Yeast Research* 4:29-35
- Mazzoni, C., Zarzov, P., Rambourg, A. and Mann, C. (1993) The *SLT2 (MPK1)* MAP Kinase homolog is involved in polarized cell growth in *S.cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* 123:1821-1833
- Mazzoni, C., and C. Falcone. (2001) Isolation and study of *KILSM4*, a *Kluyveromyces lactis* gene homologous to the essential gene *LSM4* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 18:1249-1256
- Melov, S., Schneider, J.A., Day, B.J., Hinerfeld, D., Coskun, P., Mirra S.S., Crapo, J.D. and Wallace, D.C. (1998) A novel neurological phenotype in mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nature Genet* 18:159-163
- Moriya, H., Shimizu-Yoshida, Y., Omori, A., Iwashita, S., Katoh, M. and Sakai, A. (2001) Yak1p, a DYRK famil kinase, traslocates to the nucleus and phosporylates yeast Pop2p in

response to a glucose signal. *Genes Dev* 15:1217-1228

Mulder, W., Scholten, I.H.J.M., De Boer, R.W. and Grivell L.A. (1994) Sequence of the HAP3 transcription factor of *Kluyveromyces lactis* predicts the presence of a novel 4-cysteine zinc-finger motif. *Mol Gen Genet* 245:96-106

Nguyen, C., Bolotin-Fukuhara M., Wesolowsky-Louvel, M. and Bolotin-Fukuhara, H. (1995) The respiratory system of *Kluyveromyces lactis* escapes from HAP2 control. *Gene* 152:113-115

Nurse, P. (2002) Cyclin dependent Kinases and Cell Cycle Control. (Nobel lecture) *ChemBioChem* 3:596-603

Oberholzer, U. and Collart, A.M. (1998) Characterization of *NOT5* that encodes a new component of the NOT protein complex. *Gene* 207:61-69

Ossig, R., Dascher, C., Trepte, H.H., Schmitt, H.D. and Gallwitz, D. (1991) The yeast SLY gene products, suppressors of defects in the essential GTP-binding Ypt1 protein, may act in endoplasmic reticulum-to-Golgi transport. *Mol Cell Biol* 11:2980-2993

Ozcan, S., Dover, J., Rosenwald, A. G., Wolf, S. and Johnston, M. (1996) Two glucose transporter in *S. cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93:12428-12432

Ozcan, S., Dover, J. and Johnston, M. (1998) Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *S. cerevisiae*. *EMBO Journal* 17:2566-2563

Pedruzzi, I., Bueckert, N., Egger, P., De Virgilio, C. (2000) *Saccharomyces cerevisiae* Ras/cAMP pathway controls post-diauxic shift element-dependent transcription through the zinc finger protein Gis1. *EMBO J.* 19:2569-2579

Plevani, P., Foiani, M. e Lucchini, G. (1997) Il lievito: un organismo modello. *Le Scienze* 351:84-92

Poch, O., L'Hote, H., Dallery, V., Debeaux, F., Flier, R. and Sodoier, R. (1992) Complete sequence of *Kluyveromyces lactis*  $\alpha$ -galactosidase gene and its deduced polypeptide. Aminoacid sequence comparison and secondary structure analysis. *Gene* 118:55-63

Prevot, D., Morel, A-P, Voeltzel, T., Rostan, M.-C., Rimokh, R., Magaud, J.-P. and Corbo, L. (2001) Relationships of the antiproliferative proteins Btg1 and Btg2 with CAF1, the human homolog of a component of the yeast CCR4-NOT transcription complex. *J. Biol. Chem* 276:9640-9648

Pringle, J.R. (1991) Staining of bud scars and other cell wall chitin with calcofluor. *Methods Enzymol* 194:732-735

Prior, C., Mamessier, P., Fukuhara, H., Chen, H.J. and Wesolowski-Louvel, M. (1993) The hexokinase gene is required for transcriptional regulation of the glucose transporter gene *RAG1* in *Kluyveromyces lactis*. *Molecular and Cellular Biology* 13:3882-3889

Prior, C., Tizzani, L., Fukuhara, H., Frontali, L. and Wesolowski-Louvel, M. (1996) The

petite-negative yeast *Kluyveromyces lactis* has a single gene expressing pyruvate decarboxylase activity. *Molecular Microbiology* 19:27-36

Rahner, A., Scholer, A., Martens E., Gollwitzer, B. and Schuller, H.J. (1996) Dual influence of the yeast Cat1p (Snf1p) protein kinase on carbon source-dependent transcriptional activation of gluconeogenic genes by the regulatory gene *CAT8*. *Nucleic Acids Res* 24: 2331-2337

Rahner, A., Hiesinger, M. and Schuller, H.J. (1999) Deregulation of gluconeogenic structural genes by variants of the transcriptional activator Cat8p of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 34:146-156

Raitt, D.C., Johnson, A.L., Erkin, A.M., Makino, K., Morgan, B., Gross, D.S. and Johnston, L.H. (2000) The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 *in vivo* and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol Biol Cell* 11:2335-2347

Rechsteiner, M., and Rogers, S. W. (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21:267-271.

Roberts, C.J, Nelson, B, Marton M.J, Stoughton, R., Meyer, M.R, Bennett, H.A., He, Y.D., Dai, H, Walker, W. L., Hughes, T.R., Tyers, M., Boone, C., and Friend, S.H. (2000) Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science* 287:873-880

Russell, P., Bemson, J.D. and Denis, C. L. (2002) Characterization of mutations in NOT2 indicates that it plays an important role in maintaining the integrity of the CCR4-NOT. *J Mol Biol* 322:27-39

Saliola, M. and Falcone, C. (1995) Two mitochondrial alcohol dehydrogenase activities of *Kluyveromyces lactis* are differently expressed during respiration and fermentation. *Mol Gen Genet* 249:665-672

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd edition

Sanders, S.L., Garbett, K.A. and Weil, P.A. (2002) Molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* TFIID. *Mol Cell Biol* 22:6000-6013.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467

Schaffrath, R. and Breunig, K.D. (2000) Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genetics and Biology* 30:173-190

Scheffler, I.E., Cruz B.J. de la and Prieto S. (1998) Control mRNA turnover as a mechanism of glucose repression in *S.cerevisiae*. *Int J Biochem Cell Biol* 30:1175-1193

Schjerling, P. and Holmberg, S. (1996) Comparative aminoacid sequence analysis of the C6 zinc cluster family of transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res* 24:4599-4607

- Schmidt, A. and Hall, M.N. (1998) Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14:305-38
- Schmitt, A.P. and McEntee, K. (1996) Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multi stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5777-5782
- Schnell, N., Krems, B. and Entian, K.D. (1992) The *PARI* (*YAP1/SNQ3*) gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a c-jun homologue, is involved in oxygen metabolism. *Curr Genet* 21:269-273
- Schuller, H.J. (2003) Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 43:139-160
- Serafini, A. (2001) Isolamento e caratterizzazione del gene *KINOT4* nel lievito *Kluyveromyces lactis*. *Tesi di laurea* Dip.to Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Anno Accademico 1999-2000
- Shermann, F. (1997) Yeasts genetics. *The Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine* 6 R. A. Meyers, eds (Weinheim, Germany: VCHPub):
- Sheth, U. and Parker, R. (2003) Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300:805-808
- Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122:19-27
- Sinclair, D.A., Mills, K. and Guarente, L. (1997) Accelerated aging and nucleolar fragmentation in yeast *sgs1* mutants. *Science* 277:1313-1316
- Sinclair, D., Mills, K. and Guarente, L. (1998) Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Microbiol* 52:533-560
- Stadtman, E.R. (2004) Role of oxidant species in aging. *Curr Med Chem* 11:1105-1112
- Steller, H. (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267:1445-1449
- Swanson, M.J., Qiu, H., Sumibcay, L., Krueger, A., Kim, S. J., Natarajan, K., Yoon, S. and Hinnebush, A.G. (2003) A multiplicity of coativators is required by Gcn4p at individual promoters *in vivo*. *Mol Cell Biol* 23:2800-2820
- Temme, C., Zaessinger, S., Meyer, S., Simonelig, M. and Wahle, E. (2004) A complex containing the CCR4 and CAF1 proteins is involved in mRNA deadenylation in *Drosophila*. *EMBO J* 23:2862-2871
- Triezenberg, J.S. (1995) Structure and function of transcriptional activation domains. *Current Opinion in Genetics and Development* 5:190-196
- Tucker, M., Valencia-Sanchez, M. A., Staples, R.R., Chen, J., and Denis, C.L. (2001) The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major

- cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 104:377-386
- Tucker, M., Staples, R. R., Valencia-Sanchez, M. A., Muhlrud, D. and Parker, R. (2002) Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 21:1427-1436
- Uhl, M.A., Biery, M., Craig, N., Johnson, A.D. (2003) Haploinsufficiency-based large-scale forward genetic analysis of filamentous growth in the diploid human fungal pathogen *C.albicans*. *EMBO J* 22:2668-78
- Ulman, A. (1985) Catabolite repression. *Biochimie* 67:29-34
- Van de Berg, J.A., Van der Laken, K.J., Van Ooyen, J.J., Renniërs, T.C., Rietveldk, H.M., Schaap, A., Brake, A.J., Bishop, R.J., Schulz, K., Moyer, D., Richman, M. and Shuster, J.R. (1990) *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Biotechnology* 8:135-139
- Van den Berg, M.A. and Steensma. H.Y. (1995) *ACS2*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding acetyl co-enzyme A synthetase, essential for growth on glucose. *Eur J Biochem* 231:704-713
- Van der Berg, M.A., de Jong-Gubbles, P., Kortland, C.J., Van Dijken, J.O., Pronk, J.T. and Steensma, H.Y. (1996) The two acetyl co-enzyme A synthetases of *Saccharomyces cerevisiae* differ with respect to kinetic properties and transcriptional regulation. *J Biol Chem* 271:28953-28959
- Veal, A.E., Ross, J.S., Malakasi, P., Peacock, E. and Morgan, A.B. (2003) Ybp1 is required for the hydrogen peroxide-induced oxidation of the Yap1 transcription factor. *J Biol Chem* 278:30896-30904
- Vincent, O. and Carlson, M. (1998) Sip4, a Snf1 dependent-kinase transcriptional activator, binds to the carbon source-responsive element of the gluconeogenic genes. *EMBO J* 17:7002-7008
- Vincent, O., Townley, R., Kuchin, S., and Carlson, M. (2001) Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific  $\alpha$  subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev* 15:1104-1114
- Viswanathan, P., Ohn, T., Chiang, Y.C., Chen, J. and Denis, C.L. (2004) Mouse CAF1 can function as a processive deadenylase/3'-5'-exonuclease in vitro but in yeast the deadenylase function of CAF1 is not required for mRNA poly(A) removal. *J Biol Chem* 279:23988-23995
- Vizeacoumar FJ, Torres-Guzman JC, Bouard D, Aitchison JD, Rachubinski RA. (2004) Pex30p, Pex31p, and Pex32p form a family of Peroxisomal Integral Membrane Proteins Regulating Peroxisome Size and Number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 15:665-677
- Wach, A., Brachat, A., Polhmann, R. and Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10:

- Werner-Washburne, M., Braun, E.L., Crawford, M.E. and Peck, V.M. (1996) Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 19:1159-1166
- Wesolowski-Louvel, M., Goffrini, P. and Ferrero, I. (1988) The *RAG2* gene of the yeast *Kluyveromyces lactis* codes for a putative phosphoglucose isomerase. *Nucleic Acids Research* 16:8714
- Wesolowski-Louvel, M.C., Prior, D., Bornecque, D. and F.H. (1992) *RAG*-mutations involved in glucose metabolism in yeast: isolation and genetic characterization. *Yeast* 8:711-719
- Wesolowski-Louvel, M., Breunig, K. D. and Fukuhara, H. (1996) Nonconventional yeasts in biotechnology. *Kluyveromyces lactis* In K. Wolf (ed.) 139-201
- Winkler, G.S., Albert, K.T., Dominguez, C., Legtenberg, A.I.Y., Boelens, R. and Timmers, H.Th.M. (2004) An altered-specificity ubiquitin-conjugating enzyme/ubiquitin-protein ligase pair. *J Mol Biol* 337:157-165
- Young, E. T., Dombek, K.M., Tachibana, C., Ideker, T. (2003) Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. *J.Biol.Chem.* 278:26146-26158
- Zarzov, P., Mazzoni, C. and Mann, C. (1996) The SLT2 (MPK1) MAPkinase is activated during periods of polarized cell growth in the yeast. *EMBO Journal* 15:83-91
- Zeeman, M.A. and Steensma, H.Y. (2003) The acetyl co-enzymes A synthetase genes of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 20:13-23
- Zhang, Y. and Hermann, B. (2001) Ageing and apoptosis. *Mechanisms of Ageing and Development* 123:240-260
- Zhao, X. J., Calderone, R.A., Krueger, K. E., Choi, G. and Cihlar, R.L. (2001) Isolation and characterization of the *Candida albicans* *MOT2* gene. *Med Mycol* 39:81-86
- Zwartjes, C.G.M., Jayne, S., van der Berg, D.L.C. and Timmers, H.T.M. (2004) Repression of promoter activity by CNOT2, a subunit of the transcription regulatory Ccr4-Not complex. *J Biol Chem* 279:10848-10854

