



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Prions i Agregons com a Inhibidors de Start: una Via a l'Envelliment Cel·lular

David Moreno Fortuño

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



Agència
de Gestió
d'Ajuts
Universitaris
i de Recerca
Generalitat de Catalunya
Departament d'Economia
i Coneixement



Institut de Biologia Molecular de Barcelona
Molecular Biology Institute of Barcelona CSIC

Universitat de Barcelona

Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació

Programa de doctorat en Biomedicina

Prions i Agregons com a Inhibidors de Start: una Via a l'Envelliment Cel·lular

Memòria presentada per David Moreno Fortuño per obtenir el títol de
doctor per la Universitat de Barcelona

Martí Aldea Malo (director)

David Moreno Fortuño (doctorand)

Albert Tauler Girona (tutor)

David Moreno Fortuño

2017

Agraïments

Primer de tot he d'agrair al Martí l'acollir-me al seu laboratori i guiar-me en el procés d'elaboració d'aquesta tesi doctoral, i d'altres projectes que hem provat de fer tirar endavant. Al començament vaig anar al seu laboratori perquè em va fer classe quan estudiava a Lleida i quan vaig anar a fer el màster a Barcelona sabia que llavors ell estava allà (o aquí, tant Avant amunt i avall ja no sé on sóc) i solament tenia tres hores de classe al dia i m'avorria pels matins i vaig anar a treure-hi el cap per entretenir-me una estona (i si de mentre apreníem alguna cosa, millor), i al cap d'un moment ja fa que sóc allà cinc anys.

Evidentment també he d'agrair a la resta de gent del laboratori que han estat per aquí al llarg d'aquests anys, com a mínim pel fet d'aguantar-me: la Carme, la Maya, la Neus, la Sara, l'Alba, l'altra Alba, la Eva, la Miren, el Pedro, la Lili, el Joan Marc, el Raul i especialment el Galal, que m'ha fet una mica de germà gran (i a vegades de petit), estava sempre al laboratori per fer-te alguna cosa que se t'havia oblidat i ho recordaves a mig camí de tornar cap a casa i a més el parlar amb ell de qualsevol cosa, des de futbol a ciència passant per religió (coses seues), m'ha servit per millorar un munt el parlar en anglès (perquè ni jo tenia ganes d'aprendre àrab ni ell d'aprendre català o castellà, i estar tanta estona asseguts a mig metre l'un de l'altre sense dir-nos ni ase ni bèstia hagués sigut estrany). I no m'oblido dels estudiants de pràctiques que han anat passant, amb menció especial per la Paula que em va ajudar a fer algun dels experiments que es mostren en aquesta tesi.

També he de donar les gràcies al Jaume i al Ricard per la seva assistència en els experiments de citometria, a la Marina per ajudar-me a construir les cambres de microfluídica a la sala blanca (així com al Dr. Charvin per subministrar-nos el motlle que hem fet servir per construir-les), i a l'Elena per els seus consells i ensenyances a l'hora de fer servir els microscopis.

Suposo que també hauria donar-li les gràcies al AGAUR i per extensió a la Generalitat de Catalunya per la beca que m'ha fet de sou durant bona part de l'elaboració d'aquesta tesi, però no tinc clar si pagar als llicenciats amb màster i amb els expedients acadèmics més alts (que som els únics amb opcions reals d'optar a una d'aquestes beques) menys d'un 60% del sou corresponent a un llicenciat treballant en les administracions públiques és digne d'agrair-ho o de denunciar-ho. Però bé, tampoc és un problema intrínsec de la Generalitat, ja que les beques que dona el Ministerio del país que tenim a l'oest són si fa o no fa... Dieu-me desagraït i maleducat si voleu, però els amos negrers deien el mateix als seus esclaus si gosaven queixar-se (evidentment salvant les distàncies). El meu ja

és un cas perdut, però esperem que quan per fi poguem deixar de pagar vies de AVE que vagin de Venta de Baños a Burgos i coses d'aquest estil la nova República gastí millor els nostres impostos per exemple ofertant beques de doctorat amb una retribució adequada al nivell de formació i al grau de sacrifici requerits per a fer aquesta feina. Per tant els del AGAUR, amb que els hi posa el seu logo a la primera pàgina van que xuten; de res! També vull agrair a la UB la seva censura a un petit *divertimento* sobre els límits de la llibertat d'expressió que hi havia en aquesta tesi, no fos cas que algun fiscal maligne vulgués buscar-me les pessigolles.

Pel que fa al plànol estricament científic, finalment també he d'adreçar un agraïment (i també una petita disculpa) al Enric i a la resta de gent del seu laboratori quan vaig estar-hi, ja que és on vaig fer-hi la mili pel que fa a aprendre a treballar a un laboratori, i tot i que després no m'hi quedés a fer la tesi, el que hi vaig aprendre m'ho podré quedar per sempre. A més amb els becaris i els tècnics hem intentat mantenir-hi el contacte, bàsicament fent calçotades esporàdiques, i amb el Jordi especialment hem continuat quedant sovint per anar amb bicicleta i a fer excursions per la muntanya, aprofitant per parlar una mica de tot (també de ciència!!).

Vull recordar-me dels companys de la carrera que també han acabat a Barcelona i hem continuat quedant, principalment amb l'excusa de veure partits del Barça: la Sandra, l'Eudald i l'Adrià; sempre està bé tenir gent coneguda al voltant quan marxés de casa. També dels primers companys de pis que vaig tenir a Barcelona: el Joan, el Tomàs i el Xavi, que em van ensenyar els conceptes bàsics per sobreviure fora de casa i lluny de Ponent en la jungla de ciment i fins i tot em van introduir a la seva penya de l'Aplec del Caragol (anar-hi de gorra una estona a fer un tomb està bé si coneixes gent a 3 o 4 penyes, però millor no haver de demanar favors per emplenar el got!!); per coses de la vida el pis es va desfer i m'he hagut de buscar la vida en un altre pis per on hi he tingut altres companys, que en general bé, però no és lo mateix que amb gent de Lleida. Per sort encara ens veiem de tant en tant, sigui per l'Aplec o per altres 'esdeveniments gastronòmics'.

Finalment vull donar les gràcies als meus pares (l'Amor inclosa) i a l'Àvia, per tantes carmanyoles plenes de menjar pels dilluns després de tornar de Lleida, i per tenir-los de xarxa de seguretat. A, i a mon pare també li he d'agrair per coses científiques directament relacionades amb l'elaboració d'aquesta tesi, ja que em va ajudar a dissenyar i muntar una peça per fer de divisor de flux d'una bomba de xeringa!!

I per acabar, simplement agrair a tothom més que no hi hagi pensat en citar-los, per si a cas.

Merci!!! a toots, i Visca el Barça!!

Resum

Saccharomyces cerevisiae és un model escaient per estudiar el procés d'envelliment a nivell cel·lular gràcies al seu mecanisme de divisió asimètrica. Fent una analogia amb l'envelliment en organismes superiors, on les cèl·lules somàtiques són pròpies de l'individu i envelleixen amb ell, mentre que les cèl·lules de la línia germinal són capaces de formar un nou individu i són virtualment immortals en la població, en *S. cerevisiae* podem diferenciar dos tipus de cèl·lules: les cèl·lules mare, que envelleixen i poden produir unes 20-30 cèl·lules filles, i les cèl·lules filles, que són capaces d'esdevenir mares i tornar a fer 20-30 cèl·lules filles més independentment de l'edat de la seva mare en el moment de néixer, excepte si la mare ja és molt vella. Per tant, en estudiar l'envelliment de les cèl·lules mare del llevat de gemmació podem aprendre molts dels mecanismes que condueixen l'envelliment cel·lular, especialment a nivell molecular.

Entre les característiques que adquireixen les cèl·lules mare de llevat durant el procés d'envelliment, l'acumulació de dipòsits proteics insolubles, proteïnes carbonilades i agregats proteotòxics sembla jugar un paper molt important. Donada la seva preponderància també en organismes superiors, juntament amb les afectacions mitocondrials, ens interessava entendre la relació entre la presència d'aquests dipòsits proteotòxics i la maquinària de cicle cel·lular, especialment durant G1 sobre la xarxa de Start. Sabem que les xaperones tenen un paper clau en Start per a executar l'entrada en el cicle cel·lular i, en ser segrestades per els agregats proteotòxics en cèl·lules envellides, podrien ser causa directa de senescència replicativa.

Per tal de comprovar aquesta hipòtesi, en primer lloc hem constatat que els agregats proteotòxics endarrereixen la progressió durant G1, aboleixen la coordinació entre velocitat de creixement i la mida crítica de Start, i redueixen fortament la longevitat de les cèl·lules del llevat. D'altra banda, mitjançant diferents aproximacions que permeten l'estudi de l'envelliment de les cèl·lules mare del llevat (algunes de les quals desenvolupades en aquest treball), hem observat que en els últims cicles de cèl·lules envellides es produeix un clar retard en la progressió durant G1, així com que la majoria de cèl·lules moren estant en aquesta fase del cicle cel·lular, quan en les cèl·lules mare joves aquesta fase és la més curta. Especialment rellevant en el nostre estudi, hem demostrat que el grau de disponibilitat de xaperones disminueix clarament en cèl·lules velles. Finalment, veiem que la superexpressió de l'activador del cicle cel·lular Cln3 allarga la longevitat de les cèl·lules, fins i tot si aquesta activació es fa sobre cèl·lules parcialment envellides prèviament com si ho fem sobre mutants d'algunes xaperones clau per a l'activació del cicle cel·lular. En resum, com a resultat de l'acumulació d'agregats proteotòxics en cèl·lules envellides, la pèrdua d'activitat xaperona arribaria a comprometre l'entrada en el cicle cel·lular i, així, podria explicar la pèrdua de capacitat proliferativa que té lloc durant el procés d'envelliment cel·lular.

Abstract

Saccharomyces cerevisiae is a suitable model to study the aging process at the cellular level thanks to its mechanism of asymmetric division. Analogous to aging in higher organisms, which contain somatic cells that age with the individual and germline cells that are able to form a new individual and are virtually immortal in the population, in *S. cerevisiae* we can distinguish two types of cells: mother cells, which age and can produce 20 to 30 daughter cells, and daughter cells which are capable of becoming mothers and produce about 20-30 more daughter cells regardless of the age of the mother at birth, unless the mother is already very old). Therefore, studying mother cell aging in budding yeast can uncover many of the mechanisms that drive cell aging, especially at the molecular level.

Among the features that mother cells acquire during aging, the accumulation of insoluble protein deposits, carbonylated proteins and proteotoxic aggregates is thought to play a very important role. As this seems to play a prominent role in higher organisms, along with mitochondrial affectations, we were interested in understanding the relationship between the presence of these proteotoxic deposits and the machinery of cell cycle, especially during G1 on the Start network. We know that chaperones play a key role at Start to trigger entry into the cell cycle and, by being hijacked by proteotoxic aggregates in aged cells, they could be a direct cause of replicative senescence.

To test this hypothesis, we first assessed that proteotoxic aggregates delay G1 progression, abolish the coordination between growth rate and critical size at Start, and strongly reduce the longevity of yeast cells. On the other hand, using different approaches that allow to study aged mother cells of yeast (some of which developed in this work), we have found that there is a clear delay in G1 progression in the last cycles of aged cells, most cells dying within this cell cycle phase, when in young mother cells this is the shortest phase of the cell cycle. Especially relevant to our work, we have shown that availability of chaperones is remarkably lower in aged mother cells. Finally, we have seen that overexpression of the cell cycle activator Cln3 is able to extend cell longevity, even if this overexpression is triggered in partially aged cells or in cells lacking some key chaperones for the activation of the cell cycle. In summary, as a consequence of the accumulation of proteotoxic aggregates in aged cells, loss of chaperone activity would eventually compromise cell cycle entry and, therefore, would explain why cells lose their proliferative capacity during the aging process.

I. Introducció	1
1. Estudi de l'envelliment cel·lular en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
1.1. <i>S. cerevisiae</i> com a model de divisió i envelliment asimètric	3
1.2. Factors d'envelliment acumulats en les cèl·lules mare durant el seu RLS	5
1.2.1. <i>Alteracions nuclears</i>	5
1.2.2. <i>Alteracions mitocondrials</i>	7
1.2.3. <i>Alteracions vacuolars</i>	8
1.2.4. <i>Alteracions en la proteostasi</i>	9
2. Patologies causades per agregats proteotòxics en organismes superiors	10
2.1. Malalties neurodegeneratives	10
2.1.1. <i>Malalties associades al prió PrP</i>	10
2.1.2. <i>Malaltia d'Alzheimer</i>	11
2.1.3. <i>Malaltia de Parkinson</i>	11
2.1.4. <i>Malaltia de Huntington</i>	12
2.1.5. <i>Esclerosi Lateral Amiotròfica (ALS, Amyotrophic Lateral Sclerosis)</i>	12
2.1.6. <i>Taupaties</i>	12
2.1.7. <i>Malaltia de Machado-Joseph</i>	13
2.2. Malalties associades a altres teixits	13
2.2.1. <i>Amiloïdosis</i>	13
2.2.2. <i>Càncer</i>	13
2.2.3. <i>Malaltia de von-Hippel-Lindau</i>	14
2.2.4. <i>Hipotricosis simple del cuir cabellut</i>	14
2.3. Exemples de repartiment asimètric d'agregats proteics en organismes model	14
3. Tipus d'agregats proteics acumulats durant processos d'estrès i d'envelliment cel·lular en llevat	15
3.1. Proteïnes endògenes del llevat amb tendència a formar agregats amiloides de naturalesa priònica	15
3.1.1. <i>Sup35 (prió [PSI⁺])</i>	15
3.1.2. <i>Altres proteïnes priòniques en llevat</i>	17
3.2. Dipòsits proteics reversibles en resposta a estrès (Q-bodies)	18
3.3. Grans dipòsits de proteïnes ubiquitinades propers al nucli (JUNQ/INQ)	18
3.4. Dipòsits de proteïnes insolubles (IPOD)	19
3.5. Dipòsits de proteïnes induïts per l'envelliment (AiPD)	19
3.6. Dominis priònics sintètics	21
3.7. Implicació de xaperones en el metabolisme de dipòsits reversibles i d'agregats proteotòxics	21
4. Visió general del cicle cel·lular de <i>S. cerevisiae</i>	22
4.1. Control en la progressió a través del cicle cel·lular per complexos CDK-Ciclina	23

4.2. Control transcripcional del cicle cel·lular	25
4.3. Mecanismes de degradació de proteïnes durant el cicle cel·lular.....	26
4.4. Punts de control al llarg de la progressió del cicle cel·lular	27
4.4.1. <i>Start</i>	27
4.4.2. <i>Checkpoint de dany al DNA</i>	28
4.4.3. <i>SAC (Spindle Assembly Checkpoint)</i>	28
5. Mecanismes de control de l'entrada en cicle cel·lular durant G1	29
5.1. Síntesi de Cln3 i retenció de complexos Cdc28-Cln3 per part de Whi3.....	30
5.2. Paper de les xaperones Ssa1/2 i Ydj1 en l'alliberament de Cln3 del reticle endoplasmàtic	31
5.3. Retenció de Cdc28 en el reticle endoplasmàtic per part de Whi7	32
5.4. Fosforilació de Whi5 i activació de les ciclines Cln1/2	32
5.5. Disponibilitat de xaperones com a connector entre la velocitat de creixement i l'activació del cicle cel·lular.....	33
5.6. Alteracions conegudes en el cicle cel·lular durant l'envelliment	34
6. Hipòtesi de treball: Agregats proteotòxics acumulats durant l'envelliment com a inhibidors de l'entrada en cicle cel·lular per segrest de l'activitat xaperona	35
II. Objectius	37
III. Metodologia	41
1. Condicions de cultiu i medis utilitzats.....	43
2. Manipulació genètica de llevats	43
2.1. PCR per a l'obtenció de cassets integratius	43
2.2. Transformació de <i>S. cerevisiae</i>	44
2.3. PCR de colònia de llevat.....	44
2.4. Extracció de DNA genòmic de llevat.....	45
3. Clonatge de gens i construcció de plasmidis	45
3.1. Digestió de DNA mitjançant enzims de restricció	45
3.2. Defosforilació del vector i lligació.....	46
3.3. Transformació de cèl·lules competents de <i>Escherichia coli</i>	46
3.4. Obtenció de DNA plasmídic des d' <i>E. coli</i>	46
3.4.1. <i>Miniprep</i>	46
3.4.2. <i>JetPrep</i>	47
3.5. Clonatge de diversos fragments de DNA mitjançant recombinació homòloga en llevat	47
3.6. Obtenció de DNA plasmídic a partir de llevat (<i>Zymoprep</i>)	48

4. Tècniques bioquímiques sobre proteïnes.....	49
4.1. Obtenció i preparació de mostres de proteïna de llevat	49
4.1.1. <i>Obtenció de les mostres</i>	49
4.1.2. <i>Preparació de mostres amb urea</i>	49
4.1.3. <i>Preparació de mostres amb NaOH</i>	49
4.1.4. <i>Preparació de mostres conservant els agregats amiloides</i>	50
4.2. Detecció de proteïnes específiques mitjançant Western Blot	50
4.2.1. <i>Electroforesi en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)</i>	50
4.2.2. <i>Electroforesi en gel d'agarosa semidesnaturalitzant (SDD-AGE)</i>	51
4.2.3. <i>Transferència de proteïnes a una membrana de PVDF</i>	51
4.2.4. <i>Immunodetecció utilitzant anticossos específics</i>	51
5. Estudi de cèl·lules de llevat envellides mitjançant la soca MEP	52
5.1. Pèrdua de viabilitat de cèl·lules mare en cultiu líquid	54
5.2. Anàlisi de la mida de la microcolònia formada per cèl·lules mare en medi sòlid	54
5.3. Marcatge amb biotina i detecció de cèl·lules envellides	56
6. Tècniques de microscòpia.....	57
6.1. Determinació del volum de gemmació de llevats en cultius exponencials.....	57
6.2. Determinació de la concentració i localització nuclear de proteïnes i caracterització d'agregats per mitjà de microscòpia fluorescent.....	58
6.3. Determinació de l'acidesa vacuolar mitjançant quinacrina	59
6.4. Microscòpia multiposició time-lapse	59
6.5. FLIP (Fluorescence Loss In Photobleaching).....	60
6.6. FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy)	62
6.7. RICS (Raster-scan Image Correlation Spectroscopy)	65
7. Separació i anàlisi de cèl·lules per citometria assistida per fluorescència (FACS)	69
8. Construcció i utilització de cambres de microfluídica fetes de PDMS per a l'estudi de l'envelliment de llevats sota el microscopi	70
8.1. Cambra YC-1 per al creixement de llevats en monocapa	71
8.2. Cambres per a la retenció de cèl·lules mare i estudi del RLS	72
IV. Resultats	75
1. Efectes de la presència d'agregats priònics sobre el control del cicle cel·lular i la dinàmica de xaperones	77
1.1. Disseny, construcció i caracterització de seqüències priòniques fusionades a GFP sota GALp en un vector per a llevat	77
1.2. Efectes dels agregats priònics en la fase G1 del cicle cel·lular en cultius exponencials	79

1.3. Disponibilitat de xaperones en presència d'agregats amiloides	80
1.4. Acidesa vacuolar en presència d'agregats amiloides	82
2. Efectes dels agregats prionics en el RLS i en el control del cicle cel·lular en llevats durant l'envelliment.....	83
2.1. Volum de gemmació i temps d'interdivisió en cèl·lules envellides expressant el pèptid prionic sintètic	83
2.2. Longitud de vida replicativa en cèl·lules expressant agregats amiloides	85
2.3. Superexpressió de xaperones en cèl·lules expressant el pèptid prionic sintètic.....	87
3. Efectes en la progressió del cicle cel·lular i en la dinàmica de xaperones en cèl·lules salvatges envellides	88
3.1. Cicle cel·lular en cèl·lules envellides	88
3.2. Nivells i dinàmica de xaperones en cèl·lules envellides.....	91
3.3. Allargament de la longevitat per superexpressió condicional d'activadors del cicle cel·lular	94
V. Discussió.....	97
1. Agregats prionics com a inhibidors de Start.....	99
2. Reducció del RLS per superexpressió de pèptids prionics	100
3. Alteracions en el cicle cel·lular de llevats envellits	101
4. Modificacions en el comportament de les xaperones de cèl·lules envellides.....	102
5. Relació entre mida cel·lular, longevitat i control del cicle cel·lular.....	103
VI. Conclusions	105
VII. Bibliografia	109
VIII. Annex.....	123
1. Llistat d'abreviacions.....	125
2. Índex de figures	126
3. Llistat de soques de llevat utilitzades en aquest treball.....	127
4. Llistat de plasmidis utilitzats en aquest treball	127
5. Llistat de dominis prionics utilitzats en aquest estudi	129
6. Llistat d'anticossos i altres marcatges específics utilitzats en aquest treball	130
7. Articles.....	130
7.1. Saarikangas J, Caudron F, Prasad R, Moreno DF, Bolognesi A, Aldea M and Barral Y. Compartmentalization of ER-bound chaperone confines protein deposit formation to the aging yeast cell. Current Biology 27(6):773-783 (20 Març 2017)	130
7.2. Moreno DF, Parisi E, Yahya G, Vaggi F, Csikász-Nagy A, Aldea M. Competition for chaperones as a mechanism to adjust cell size to growth rate. (enviat)	130

I. Introducció

1. Estudi de l'envelliment cel·lular en *Saccharomyces cerevisiae*

Com és sabut per tothom, l'envelliment és una conseqüència indestruïble del fet d'estar viu. No podem dir que envellir sigui una malaltia *per se*, però és evident que succeeixen un seguit d'alteracions biològiques que deteriorenen progressivament la nostra qualitat de vida. Tot i així, les bases moleculars d'aquest procés són poc conegudes. El que sabem és que en el nostre cos podem dividir les cèl·lules que tenim en dos tipus: les cèl·lules somàtiques, que en el millor dels casos (el d'unes quantes neurones) viuran tota la nostra vida; i les cèl·lules germinals, algunes de les quals, si tenim la sort (o la desgràcia) de tenir fills i els nostres fills tenen més fills i així successivament, d'alguna manera viuran eternament¹. Per tant ha d'existir algun mecanisme bé per preservar les cèl·lules de la línia germinal lliures de tots els factors que es van acumulant durant l'envelliment (o seleccionar només les que estiguin lliures d'ells)²⁻⁴, o rejuvenir la línia germinal immediatament anterior o posteriorment a la fecundació (fer-ho només després de la fecundació seria una opció més cost-efectiva)^{5,6}, o una combinació d'ambdós mecanismes (Figura 1)⁷. Sigui quin sigui el mecanisme, ja que hi ha una divisió en el treball entre les cèl·lules somàtiques i les cèl·lules germinals, la qüestió clau és si aquesta divisió del treball és exclusiva dels organismes pluricel·lulars superiors o si aquest tipus de mecanismes també han evolucionat en els microorganismes. L'evidència científica disponible afirma que és així, tant en bacteris amb divisió tant simètrica^{8,9} com asimètrica¹⁰, així com en microorganismes eucariotes com el llevat de gemmació, *Saccharomyces cerevisiae*^{11,12}.

1.1. *S. cerevisiae* com a model de divisió i envelliment asimètric

El llevat de gemmació, com els seu nom indica, es reproduïx per mitjà de l'aparició de petites gemmes en la paret cel·lular a la vegada que comença la replicació del material genètic durant la fase S del cicle cel·lular, que continua creixent durant la fase G2 i al final de mitosi es separa de la cèl·lula mare. Les dues cèl·lules resultants, tot i ser genèticament iguals, tenen força diferències a causa del repartiment asimètric de continguts intracel·lulars (com detallarem posteriorment) i per tant, contràriament al que s'entén que succeeix en els models de divisió simètrica, no podem dir que les dues cèl·lules mare i filla siguin idèntiques. Com a microorganisme que és, una població de *S. cerevisiae* creixent és pràcticament immortal

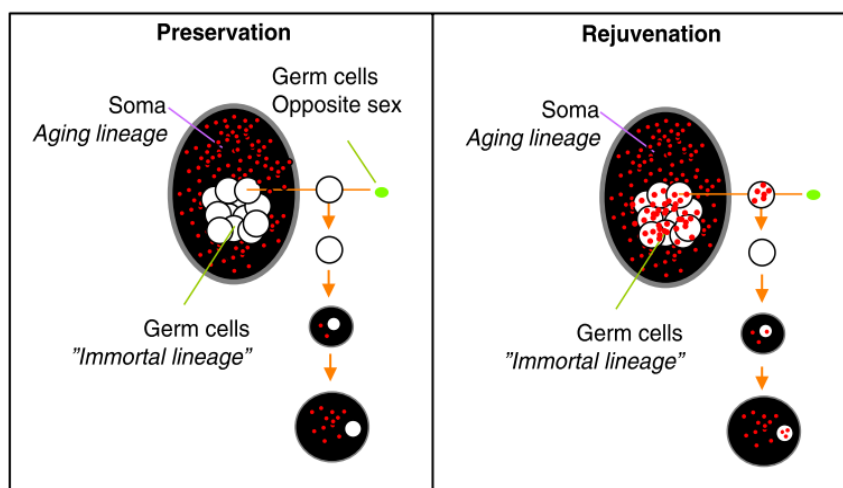


Figura 17:

Divisió soma-línia germinal existent en qualsevol organisme: mentre que el soma només ha de viure durant una generació i ésser un suport per a la línia germinal, aquesta ha de ser transmesa de generació en generació indefinidament, pel que han d'existir certs mecanismes per protegir del dany acumulat a aquestes cèl·lules, o bé mecanismes que els eliminin i rejuveneixin aquestes cèl·lules germinals; els puntets vermells representen els factors d'envelliment, independentment de la seva naturalesa.

sempre que tingui aliment suficient al seu entorn, però les cèl·lules individualment no ho són: una cèl·lula de llevat, un cop esdevé mare, pot arribar a produir unes 25-30 cèl·lules filles durant tota la seva vida replicativa (RLS, *Replicative LifeSpan*, definit com el nombre mitjà de cèl·lules produïdes quan el 50% de les cèl·lules inicials han mort), i finalment mor per lisi o roman en senescència replicativa^{13,14}, mentre que cadascuna de les cèl·lules filles té la capacitat de convertir-se en mare i tornar a fer 25-30 filles més (excepte les últimes 3-5 cèl·lules produïdes per una mare, que tenen un RLS sensiblement més curt¹⁵). Així, seguint l'esquema esmentat anteriorment, podem dir que les cèl·lules mare de llevat són el llinatge d'envelliment, mentre que les cèl·lules filles recent nascudes són el llinatge immortal (i representen en qualsevol moment el 50% de la població, per això dona la impressió de que una població de llevat pot créixer il·limitadament mentre els nutrients no siguin limitats) (Figura 2A).

En llevat, podem estudiar també un altre tipus d'envelliment diferent al replicatiu: bàsicament consisteix en deixar créixer un cultiu fins que s'esgotin els nutrients, i un cop s'acabin i els llevats deixin de dividir-se, comencem a comptar el temps i analitzem com es va perdent la viabilitat en aquestes condicions; aquest altre tipus d'envelliment el coneixem com a CLS (*Chronological LifeSpan*)¹⁶. En aquestes condicions les cèl·lules no es moren per manca de nutrients (ja que quan estan en la fase post-diàuxica acumulen reserves que els valdran per la fase estacionària) sinó que és com es troben la majoria del temps en la natura. Fent servir aquest tipus d'aproximacions podem fer servir el llevat com a model per a l'estudi de mecanismes moleculars en condicions de no proliferació.

Per tant, el fet de que existeixi un llinatge d'envelliment en *S. cerevisiae* és molt bona notícia per als que treballem amb aquest model, perquè podem aprofitar tots els avantatges que ofereix (bàsicament des del punt de vista tècnic: barat i fàcil de fer créixer, temps d'espera d'una setmana màxim per a l'estudi de tota

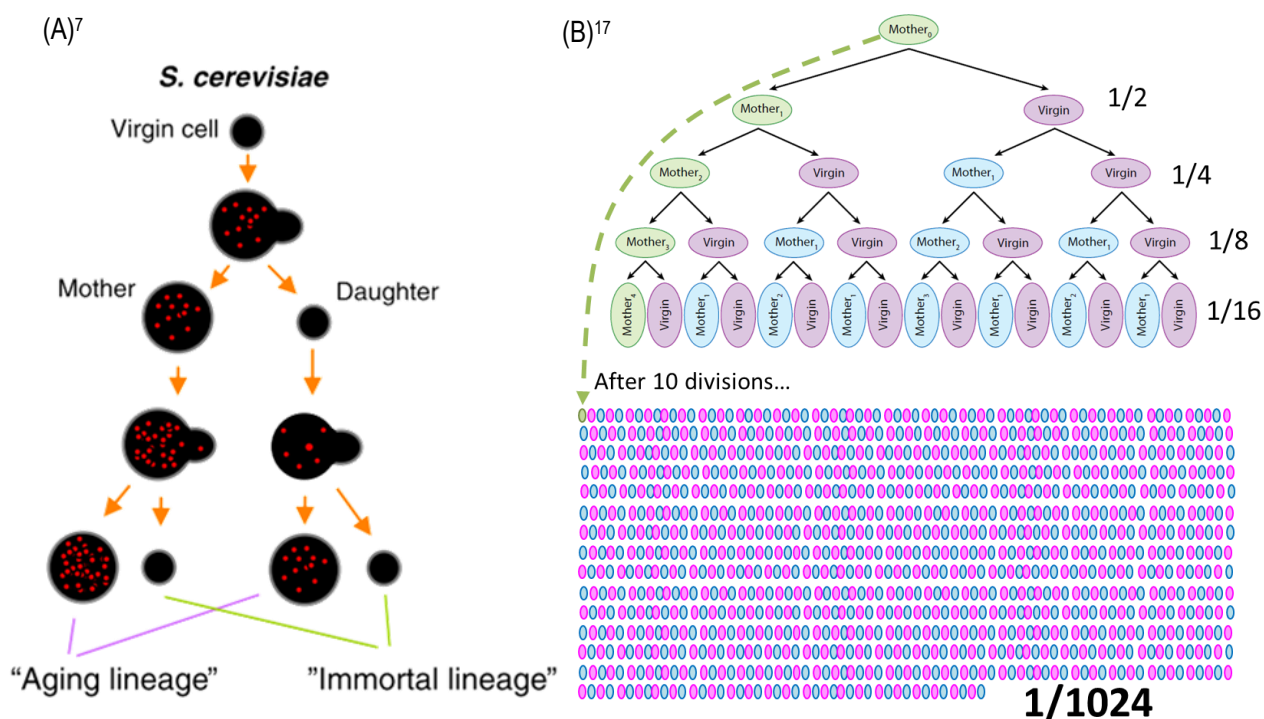


Figura 2:

(A) En el cas del llevat de gemmació, podem considerar que l'equivalent al soma són les cèl·lules mare (que envelleixen progressivament i acumulen factors d'envelliment), mentre que la línia germinal són les cèl·lules filles (que quan neixen tenen el seu rellotge vital posat a zero i no tenen factors d'envelliment, excepte si són filles de mares molt velles).

(B) El repte a l'hora d'estudiar les cèl·lules envellides és trobar-les eficientment, ja que degut al fet de que totes les cèl·lules filles esdevindran mares en les següents dues hores, la proporció de cèl·lules mare que hagin produït més de N generacions és ínfima.

la vida de molt individus, grans possibilitats des del punt de vista de la manipulació genètica per a la dissecció de vies moleculars i possibilitat de fer cribratges a gran escala) per estudiar els mecanismes moleculars de l'envelliment cel·lular. També existeixen contraprestacions, tant des del punt de vista conceptual com tècnic: evidentment no podem comparar l'envelliment cel·lular d'una cèl·lula de llevat directament amb l'envelliment d'un organisme pluricel·lular com un ratolí o un humà (tant per qüestions de distància evolutiva com de complexitat de l'organisme), però sí que podem aprendre respecte els mecanisme moleculars de l'envelliment en determinats llinatges cel·lulars si els analitzem de forma individualitzada (ja que les bases moleculars, tot i que hi ha petites variacions causades per l'evolució, es mantenen); d'altra banda, tal i com es pot deduir del creixement exponencial dels llevats i el seu cycle de vida, el nombre de cèl·lules velles en un cultiu qualsevol representen una fracció pràcticament insignificant de la població (Figura 2B¹⁷), i per tant això causa certes dificultats tècniques a l'hora de poder-les estudiar, tot i que com veurem en el capítol de Metodologia, tenim diverses eines per fer-ho.

1.2. Factors d'envelliment acumulats en les cèl·lules mare durant el seu RLS

Hem mencionat que les cèl·lules mare acumulen quelcom anomenat 'factores d'envelliment', però no hem definit que són des d'un punt de vista molecular. En llevat, aquests factors es poden agrupar en 4 famílies: alteracions nuclears, alteracions mitocondrials, alteracions vacuolars i alteracions en la proteòstasi (Figura 3¹⁸).

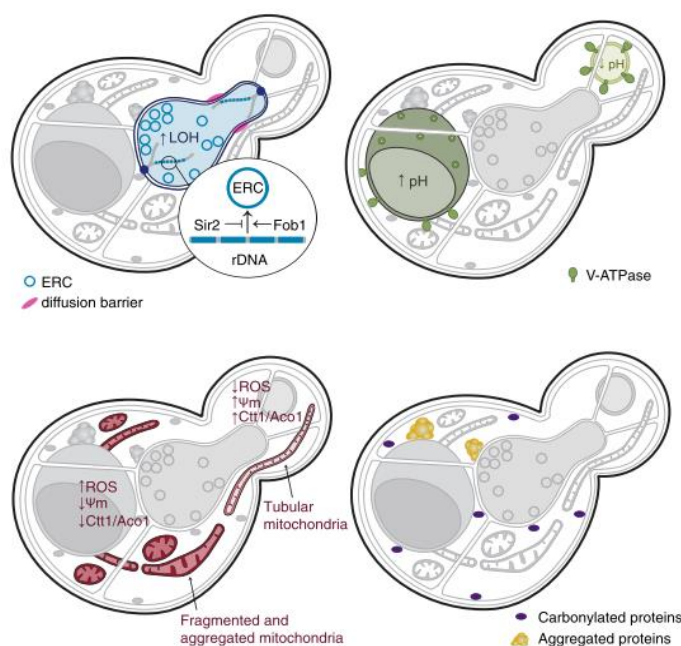


Figura 3¹⁸:

Resum gràfic del conjunt de factors que es segreguen asimètricament entre les cèl·lules mare i les filles, i per tant són potencials causes subjacents de l'envelliment cel·lular (tot i que algunes també podrien ser-ne solament conseqüències); podem agrupar-los en quatre grups: alteracions nuclears, mitocondrials, vacuolars i alteracions en la proteòstasi.

1.2.1. Alteracions nuclears

El rellotge molecular més conegut pel que fa a l'envelliment en organismes superiors és la longitud dels telòmers^{19,20}, tot i que no està pas clar que l'efecte de senescència replicativa que observem en cultius cel·lulars de mamífers pugui dir-se envelliment (ja que aquelles cèl·lules en el context natural no tenen que viure eternament, i algunes cèl·lules expressen telomerasa constitutivament), ni que la longitud dels telòmers sigui limitant en cèl·lules envellint normalment en el context del ratolí. Però en llevat la telomerasa funciona sempre²¹, i els mutants de telomerasa tampoc mostren un fenotip d'envelliment cel·lular, sinó que

el que succeeix és que les colònies ja no poden créixer indefinidament (senescència clonal^{22,23}). Les mutacions puntuals acumulades per si soles tampoc poden explicar un procés tan global com l'envelliment (i encara menys el rejuveniment de la línia germinal), tot i que si que s'han observat certs canvis epigenètics (com l'increment de l'acetilació de determinades histones²⁴)

En el llevat de gemmació, els gens per sintetitzar el rRNA (component majoritari dels ribosomes) estan organitzats en forma d'unes 100-200 repeticions en tàndem d'una seqüència de 9.1kb en una regió de 1-2Mb situada al cromosoma XII²⁵. A causa de l'altíssima activitat recombinasa que el llevat posseeix (essent una eina de reparació del seu DNA), és relativament comú que es produeixi un esdeveniment de recombinació homòloga intramolecular en aquesta zona (a causa d'un trencament de la doble cadena de DNA durant la replicació i la posterior reparació), alliberant en forma de cercle extracromosomal una o varies còpies del gens del rDNA (ERC, *Extrachromosomal rDNA Circle*); un cop fora del cromosoma, aquests ERCs disposen una regió ARS (*Autonomously Replicating Sequence*) i per tant el seu nombre augmentarà exponencialment en cada divisió. Al estudiar quines diferències havia entre cèl·lules velles i cèl·lules joves, es va observar que els ERCs es troben principalment en les cèl·lules mare²⁶, i com que és el primer factor d'envelliment que van trobar, s'ha creat una teoria sobre la causalitat dels ERCs sobre l'envelliment. Es coneixen alguns gens que d'alguna manera controlen l'aparició d'aquests cercles (per exemple: *FOB1* promovent-ho²⁷, i *SIR2* inhibint-ho²⁸), i els mutants per aquests gens responen al que un esperaria pel que fa al RLS que tenen: un mutant $\Delta fob1$ té un RLS més llarg del normal (no pot promoure l'aparició d'ERCs) mentre que un mutant $\Delta sir2$ el té més curt (perquè no pot inhibir-ne l'aparició). Així, aquest element compleix tots els requisits que demanàriem a un factor d'envelliment: acumulat i retinut específicament a les mares, la seva inducció artificial redueix el RLS i reduint la seva formació augmentem el RLS. Tot i així, no s'entén massa bé perquè aquests cercles són tòxics (existeixen varies teories) ni tampoc se sap com funciona el mecanisme de retenció en les cèl·lules mare (tot i que simulacions amb models matemàtics preveuen que hauria de ser superior al 99% per explicar el que observem

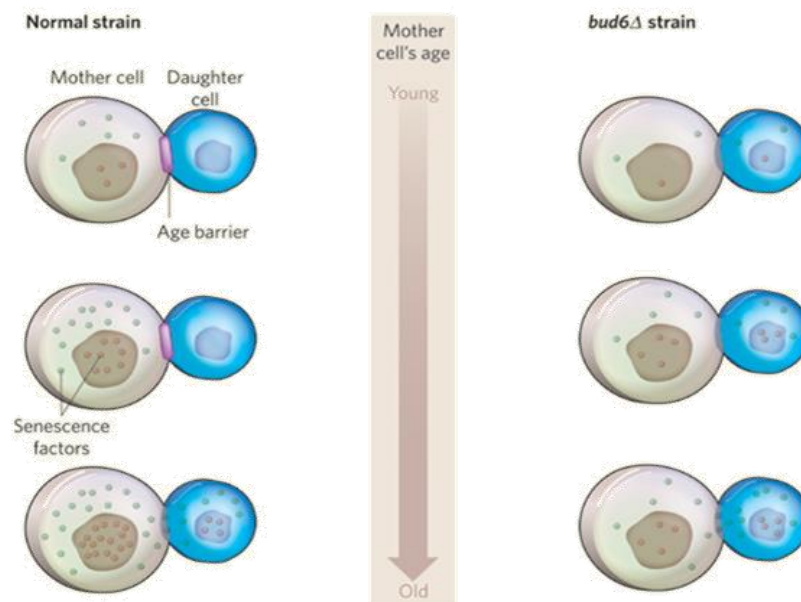


Figura 4³²:

Existeix una barrera de difusió entre cèl·lules mare i cèl·lules filles en la membrana nuclear externa, que evita la difusió de certs factors d'envelliment des de la cèl·lula mare cap a la filla (com a mínim, els ERCs). En soques mutants per a aquesta barrera ($\Delta bud6$), els factors d'envelliment difonen cap a les cèl·lules filles i aquestes t mostren un RLS més curt a mesura que la seva mare es va fent vella.

experimentalment²⁹), tot i que s'ha observat que mutants per a una barrera de difusió en la membrana nuclear externa (*Δbud6*) acumulen ERCs més lentament, les cèl·lules mares poden fer més generacions abans de morir, però les filles d'aquestes mares no posen el seu rellotge a zero en el moment de néixer^{30,31} (Figura 4³²). A més, la probabilitat d'aparició d'aquests ERCs incrementa amb l'edat de la cèl·lula³¹ (així com la pèrdua d'heterozigosi en llevats diploides³³), pel que ben bé podria ser una conseqüència més de l'envelliment enlloc d'una causa. I finalment, no se sap de cap altre organisme model on succeeixi aquest fenomen de l'acumulació durant l'envelliment d'elements extracromosomals, pel que no pot ésser la causa subjacent en el procés d'envelliment cel·lular a nivell molecular.

1.2.2. Alteracions mitocondrials

Existeix una relació entre l'augment de la probabilitat de pèrdua d'heterozigosi en filles de mares velles i el fet de que aquestes siguin *petite*ⁱ (també anomenades p^0)³⁴, tot i que la incidència d'aquest fenomen depèn de la soca de llevat amb que treballem (en algunes és d'un 95%, en d'altres del 35%³¹). La pèrdua d'heterozigosi es produeix a causa d'un defecte en la síntesi mitocondrial dels centres Fe-S en les cèl·lules p^0 (els centres Fe-S són cofactors de multitud de proteïnes, entre les quals molts enzims de síntesi i reparació de DNA^{35,36}), però no es coneix si és que les cèl·lules mare han perdut el mtDNA i per això no el poden passar a les filles o com es reparteix aquest mtDNA en cèl·lules velles. El que si es coneix és que quan els mitocondris són danyats, aquests es fragmenten i perden el seu potencial de membrana (Ψ_m) i s'acumulen a la cèl·lula mare, que ja no poden produir cèl·lules filles rejuvenides (les filles no solen arribar a fer més de 7 netes^{37,38}). En estudis seguint l'evolució de la morfologia mitocondrial al llarg de l'envelliment, s'ha vist que al voltant de la 8ena generació el mitocondri de les cèl·lules mare passa de tenir una morfologia tubular a fragmentar-se, i més endavant en l'envelliment (al voltant de la 17ena generació), els fragments de mitocondri s'agreguen, i romanen així fins al final de la vida del llevat. Aquesta fragmentació i posterior agregació són precedits per una progressiva pèrdua de potencial de membrana mitocondrial (les causes del qual no estan clares)³⁹, tot i que sembla que té quelcom a veure amb alteracions produïdes en la vacuola (Figura 5).

Un altra de les teories de l'envelliment més populars és la dels Radicals Lliures⁴⁰, i és cert que els mitocondris de les cèl·lules mare mostren major presència de ROS (*Reactive Oxygen Species*) que les seves filles⁴¹, així com en cèl·lules envellides⁴², però altres estudis indiquen que la presència de cert nivell ROS activa un mecanisme de resposta que és capaç d'allargar el RLS en determinades condicions⁴³, pel que aquesta teoria encara està sota debat. La explicació més probable és que nivells relativament baixos de ROS activin aquesta resposta retrògrada del mitocondri al nucli⁴⁴, fent expressar un conjunt de gens normalment silencis que permetin allargar la vida de la cèl·lula, mentre que nivells més alts siguin directament tòxics per a la cèl·lula i la maten. Els mecanismes de la resposta retrògrada també impliquen una major freqüència d'aparició d'ERCs⁴⁵, així que es produeix una situació paradoxal i que no entenem bé. Tampoc es coneix com s'ho fa la cèl·lula per saber quines porcions de mitocondria es troben en millors condicions per tal de passar aquestes a les cèl·lules filles, però probablement tingui a veure amb l'estat de fragmentació/agregació en que es trobin.

ⁱ La funció mitocondrial és essencial per a la viabilitat dels llevats (igual que pràcticament qualsevol cèl·lula), però la funció respiratòria (que és el que està codificat bàsicament en el DNA mitocondrial) no ho és, ja que el llevat és un microorganisme anaeròbic facultatiu i mentre disposi d'una font de carboni fermentable podrà créixer encara que no pugui obtenir energia per mitjà de la respiració (tot i que ho farà més lentament que si creix respirant). És per això que les cèl·lules (*i/o* soques) que han perdut el DNA mitocondrial (mtDNA) es denominen *petite*^{338,339} (del francès), perquè tant les cèl·lules en si com les colònies que formen són molt més petites que les que fa una soca que sí tingui mtDNA.

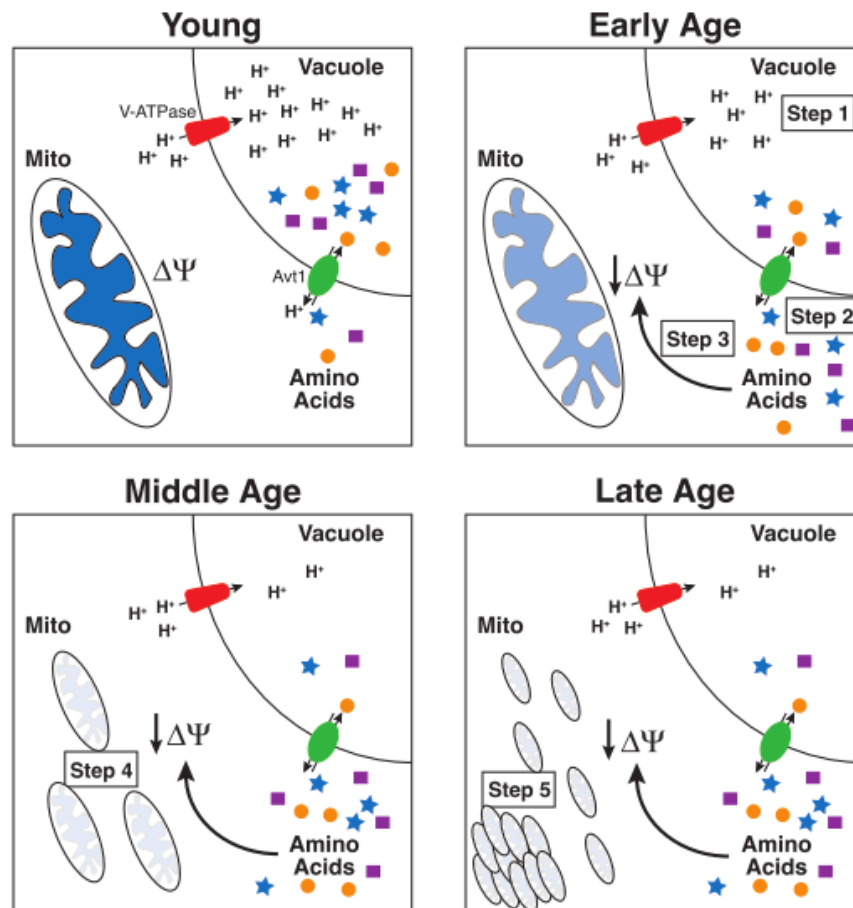


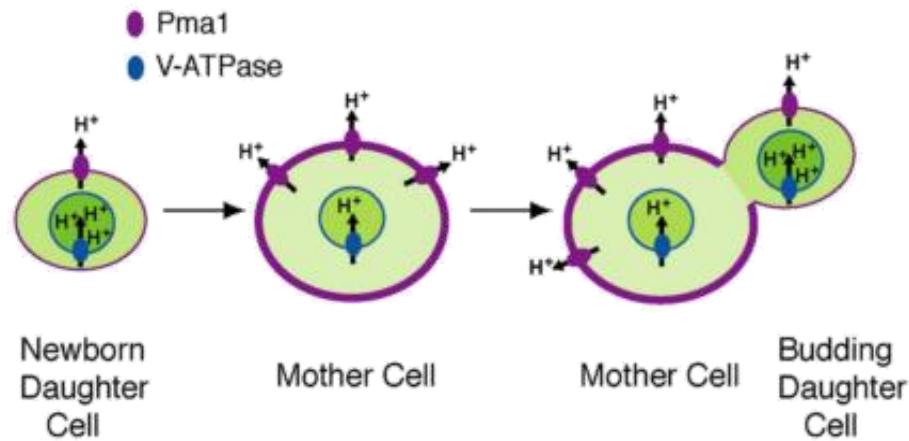
Figura 5³⁹:

Model de la relació entre la pèrdua de l'acidesa vacuolar i morfologia i funció mitocondrial, on quan l'acidesa vacuolar és alta es pot fer servir el gradient de protons per tal que Avt1 internalitzi aminoàcids dins la vacuola; al perdre's l'acidesa a causa del procés d'envelliment, no es poden internalitzar tant els aminoàcids i això, per mitjà d'un procés que desconeixem, fa disminuir el potencial de membrana mitocondrial i promou la seva fragmentació i agregació.

1.2.3. Alteracions vacuolars

La vacuola del llevat seria l'equivalent als lisosomes en cèl·lules superiors⁴⁶. En aquest orgànel s'hi acumulen ions, aminoàcids, i s'hi reciclen proteïnes i lípids. Aquest reciclat es comença mitjançant autofàgia, i s'ha vist que la supervivència cel·lular en determinades condicions depèn de la capacitat de la cèl·lula per l'autofàgia, així com que manipulacions que allarguen la longevitat dels organismes model *Caenorhabditis elegans* i *Drosophila melanogaster* venen acompanyades d'un augment de l'activitat autofagocítica⁴⁷. Tot i així, l'efecte en *S. cerevisiae* de l'autofàgia durant l'envelliment no és clar: sembla que en l'envelliment cronològic sí que hi té un paper important^{48,49}, però en el replicatiu els resultats són confusos.

Durant l'envelliment la vacuola creix molt^{50,51}, i mutants en gens per a fusió de vacuoles redueixen el RLS ($\Delta erg6$, $\Delta osh6$), mentre que la superexpressió de *OSH6* l'allarga^{50,52}. També s'ha determinat que durant l'envelliment l'acidesa vacuolar disminueix a partir de la 5ena divisió, i això condueix a canvis en la estructura mitocondrial i en el potencial de membrana³⁹ (Figura 5). Aquesta acidesa s'aconsegueix per acció de la V-ATPasa, i la superexpressió d'un dels seus components, *Vma1*, retarda la pèrdua d'acidesa i allarga el RLS. En canvi les cèl·lules filles neixen amb una vacuola àcida, encara que la de la seva mare ja no ho sigui. Aquest mecanisme de rejuveniment vacuolar s'explica per el repartiment asimètric de la bomba de protons del citoplasma al exterior *Pma1* entre mares i filles⁵³, de forma que com més *Pma1* hi

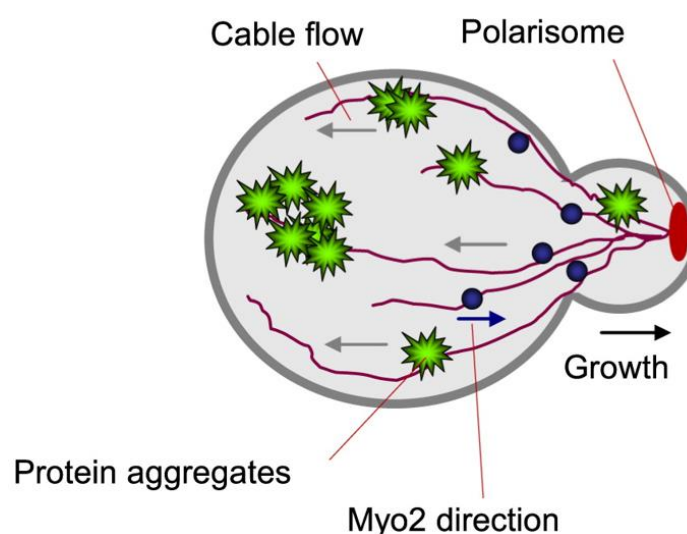
**Figura 6⁵³:**

Pma1 és una bomba de protons que s'acumula a la membrana cel·lular i que no es degrada durant tota la vida de la cèl·lula, pel que els seus nivells es van acumulant a mesura que envellaix; això porta a la cèl·lula a reduir la quantitat de protons disponibles al citoplasma per internalitzar-los a la vacuola i mantenir el seu pH àcid. En canvi, la cèl·lula filla quan neix té encara poca quantitat de Pma1, així que té protons disponibles al citoplasma per fer-los entrar a la vacuola, i d'aquesta manera rejuvenir en aquest sentit.

ha, menys protons hi ha disponibles al citoplasma per fer-los entrar a la vacuola per mitjà de la V-ATPase i mantenir l'acidesa vacuolar alta; en les filles hi ha menys Pma1 que a les mares, i és per aquest motiu que les cèl·lules filles poden regenerar l'acidesa de la seva vacuola (Figura 6). A més Pma1 és una proteïna amb una vida mitjana pràcticament tant llarga com la pròpia cel·lula⁵⁴ (LARP, *Long-lived Asymmetrically Retained Protein*), i això accentua la diferència en la quantitat de Pma1 entre una cèl·lula envellint i una recent nascuda, i per tant com d'àcida serà la vacuola en cada cas.

1.2.4. Alteracions en la proteostasi

Com s'ha dit, les cèl·lules envellides mostren una major quantitat de ROS que les joves, així que es va estudiar si existia segregació asimètrica de les proteïnes carbonilades (una forma de dany oxidatiu sobre les proteïnes) entre mares i filles, i així succeeix⁵⁵. El repartiment asimètric requereix del citoesquelet d'actina per funcionar correctament (cèl·lules tractades amb Latrunculina A, que desmunta el citoesquelet

**Figura 7⁵⁸:**

Existeix un mecanisme de transport retrògrad d'agregats proteics de la cèl·lula filla cap a la mare, per tal de deixar a la filla el més lliure d'agregats possible. En aquest mecanisme està implicat el polarisoma i el citoesquelet d'actina, amb motors de miosina fent tornar cap a la mare els agregats que hagin pogut passar a la filla.

d'actina, passen proteïnes carbonilades a les seves filles, i aquestes exhibeixen un RLS més curt⁵⁶). Aquestes proteïnes carbonilades interaccionen amb Hsp104 (una disgregasa que es localitza allà on hi ha problemes amb la proteostasi⁵⁷, i decora aquests llocs on la podem veure formant *foci*), i Sir2 té un efecte protector sobre Hsp104 evitant que es carbonili ella també (el mutant $\Delta sir2$ mostra un grau de carbonilació major d'Hsp104 i d'altres xaperones, mentre que la superexpressió d'Hsp104 en aquest mutant rescata parcialment la disminució de RLS)⁵⁶.

L'altra família d'elements proteics que s'acumulen en les cèl·lules mare són els agregats proteics, que poden arribar a esdevenir tòxics. Aquests també es decoren d'Hsp104, ja que aquesta xaperona hi va a intentar-los disgregar i reciclar o degradar, i també es segreguen asimètricament evitant que passin a les cèl·lules filles. Fins hi tot hi ha evidències d'un mecanisme de transport retrògrad que involucra el citoesquelet d'actina i el polarisoma⁵⁸ (Figura 7), i també a Sir2. Existeix una gran diversitat de tipus d'agregats en llevat, cadascun amb unes característiques pròpies i diferenciades, tal com detallarem més endavant.

2. Patologies causades per agregats proteotòxics en organismes superiors

La presència d'agregats proteics és un denominador comú en un gran ventall de malalties. En algunes ocasions, aquests agregats són una conseqüència més de la patologia, però en d'altres n'és la causa subjacent. Per tant, comprendre els processos que controlen la dinàmica de formació i disseminació d'aquests elements poden ser útils per a desenvolupar noves estratègies terapèutiques i millorar la qualitat de vida dels malalts que les pateixen. En aquests casos, la proteïna que forma els agregats sol ser una IDP (*Intrinsically Disordered Protein*), o almenys tenir un o diversos IDD (*Intrinsically Disordered Domain*)⁵⁹.

2.1. Malalties neurodegeneratives

Les primeres malalties que es van associar a la presència d'agregats proteotòxics afecten principalment el sistema nerviós central, i els símptomes normalment apareixen en individus d'edat avançada. En veurem uns quants exemples a continuació.

2.1.1. Malalties associades al prió PrP⁶⁰

Aquesta malaltia rep noms diferents segons a quina espècie afecta, si la malaltia s'adquireix per una mutació somàtica i en quin residu, s'hereta o es contrau per ingestió d'un agent infecciós i dels símptomes que els pacients mostren (*Scrapie*, Encefalopatia Espongiforme Bovina, *Kuru*, malaltia de Creutzfeld-Jacob, Insomni Familiar Fatal, etc), però totes elles tenen una causa comú, tot i que quan es van descriure originalment no es sabia (per això tenen noms diferents). Existeix un gen anomenat PRNP que codifica per la proteïna PrP (proteïna priònica)^{60–62}. Aquesta proteïna, que s'expressa bàsicament en el teixit cerebral (tot i que també està present en altres teixits com l'hematopoiètic), i pot existir en dues conformacions: una anomenada PrP^C, que és la forma cel·lular normal i que fa la funció fisiològica que ha de fer (alguna cosa fa perquè els ratolins que no tenen aquest gen mostren alguns fenotips, però tampoc tenim clar que passa, tot i que hi ha diverses teories), i una altra forma anomenada PrP^{Sc} (es diu així perquè es va identificar en ovelles que tenien una malaltia que els grangers li deien *Scrapie*, i en aquell moment no en sabien la etiologia)⁶⁰, que forma llargues fibres amiloides amb una estructura rica en làmina β i amb la capacitat de créixer més incorporant monòmers normals de PrP^C en la fibra amiloide. Així, es tracta d'un agent infecciós que, al contrari d'un virus, no conté DNA, i per això es va anomenar 'prió' (de

que es sap que s'uneix a estructures lipídiques com les membranes⁷⁴ i que interacciona amb tubulina⁷⁵, i també existeixen mutacions que provoquen una incidència major o a una edat més jove en determinades famílies⁷⁶⁻⁷⁹.

2.1.4. Malaltia de Huntington⁸⁰

Es tracta d'una malaltia hereditària que es desenvolupa lentament i els primers símptomes solen aparèixer en adults joves⁸¹. Els símptomes més característics de la malaltia desenvolupada són moviments exagerats de les extremitats i fer ganyotes sobtadament, però també concorre amb pèrdua de memòria, episodis depressius i afectacions en la parla⁸². La causa és una mutació en el gen *HTT*⁸³, on hi ha una zona amb diverses repeticions seguides d'un trinucleòtid (CAG), que codifica per glutamina⁸⁴. En els malalts el nombre de repeticions és molt més alt (el normal és entre 8 i 35 repeticions, i a partir de 35 comença a considerar-se patològic, tot i que la línia és difusa⁸⁵), i persones amb un nombre intermedi es considera que estan predisposades per a tenir descendència amb la malaltia⁸⁶ (les DNA polimerases tendeixen a amplificar repeticions de trinucleòtids per lliscament retrògrad de cadena). La proteïna resultant (Huntingtina) té un IDD format per aquesta cadena de glutamines (polyQ), que forma agregats amiloides⁸⁷. Aquesta proteïna s'expressa en gairebé tots els teixits⁸⁸ i en quantitats importants, té un paper fonamental durant el desenvolupament i s'associa a components del citoesquelet de tubulina i al fus mitòtic, i la falta d'aquesta proteïna causa que les cèl·lules no puguin orientar el fus mitòtic correctament⁸⁹. La zona del cervell més afectada conté el putamen i el nucli caudat⁹⁰, ambdues situades a la part interna del cervell; el còrtex pràcticament no s'afecta, ni tan sols en formes avançades de la malaltia.

2.1.5. Esclerosi Lateral Amiotròfica (ALS, Amyotrophic Lateral Sclerosis)^{91,92}

Malaltia degenerativa neuromuscular, on les motoneurons moren i el pacient es paralitza progressivament fins que mor. També es coneix com malaltia de Lou Gehrig (jugador estrella dels New York Yankees als anys 30 i considerat millor primera base de la història, que va contraure aquesta malaltia i el va fer retirar del beisbol i morir dos anys després), i el pacient viu més famós actualment possiblement sigui l'astrofísic Stephen Hawking. En el 90% dels casos es desconeix la causa subjacent de la malaltia (alguns casos poden ser a causa de traumatismes cranials), però hi ha un 10% de casos que tenen una història familiar⁹³ i en el 20% d'aquests casos (1-2% del total) la causa és una mutació al gen *SOD1*⁹⁴ (SuperÒxid Dismutasa, gen la proteïna del qual és l'encarregada de desfer-se de radicals superòxid que es formen durant la respiració mitocondrial) i que forma agregats de caràcter priònic^{95,96}. En altres casos d'ALS familiars s'ha trobat mutacions en altres gens, com *VEGF*⁹⁷, *ANG*⁹⁸ o *VAPB*⁹⁹. Els agregats formats per Sod1 interfereixen amb la funció mitocondrial¹⁰⁰⁻¹⁰² i causen la mort de la motoneurona, tot i que els mecanismes concrets no són coneguts. Com que les motoneurons afectades en els casos esporàdics d'ALS i en els casos familiars són les mateixes i la simptomatologia és pràcticament idèntica, s'espera que els coneixements que adquirim a partir dels models de malaltia causada per mutacions en *SOD1* també serveixin per ajudar a la resta de pacients.

2.1.6. Taupaties¹⁰³

La proteïna Tau és una proteïna associada a microtúbuls que es localitza als axons neuronals. Es troba en les plaques amiloides que tenen els pacients d'Alzheimer, però també hi ha altres malalties que es coneixen com taupaties, la causa de les quals són alteracions post-traduccionals, alteració d'altres isoformes o agregació de la proteïna Tau, entre les que s'inclouen: malaltia de Pick, demència frontotemporal lligada al cromosoma 17 (FTDP-17), degeneració corticobasal, demència pugilística, paràlisi supranuclear progressiva, síndrome de Guam, etc. La proteïna Tau es fosforila aberrantment en les manifestacions patològiques (segons la malaltia, els mecanismes per aquesta fosforilació varien^{104,105}),

i també pot formar agregats de naturalesa priònica (de manera semblant al que succeeix amb l'Alzheimer i A β ¹⁰⁶). Hi ha un efecte sinèrgic entre la fosforilació de Tau i l'agregació d'A β ¹⁰⁷. Tot i així, la relació entre expressió, estructura, fosforilació, agregació i toxicitat de Tau encara no està del tot caracteritzada.

2.1.7. Malaltia de Machado-Joseph^{108,109}

Pertany al grup de malalties que coneixem com a atàxies (un conjunt de malalties neurodegeneratives que causen debilitament de les extremitats i eventualment paràlisi entre altres símptomes, però no sol afectar les capacitats cognitives), i concretament a les atàxies espinocerebel·loses. En concret, el nom sistemàtic d'aquesta malaltia és atàxia espinocerebel·losa 3 (SCA3), on gen anomenat *ATXN3*¹¹⁰ pot tenir una mutació similar a la que succeeix en la malaltia de Huntington (diverses repeticions del tripètid CAG que forma una cadena de glutamines quan el gen es tradueix en proteïna¹¹¹). Com passa amb la Huntingtina, l'Ataxina-3 forma agregats amiloides a causa de la cadena de polyQ i això causa problemes. En la majoria dels casos l'origen de la mutació és hereditari. Curiosament, en un parell de pacients es va estudiar la distribució d'agregats d'Ataxina-3 en les criptes de l'epiteli intestinal, i van detectar que els agregats es trobaven en les cèl·lules Paneth (que ja estan diferenciades i la seva vida esperada és curta), mentre que les cèl·lules mare de la cripta estaven netes d'agregats, denotant un mecanisme de repartiment asimètric d'aquests agregats¹¹².

2.2. Malalties associades a altres teixits

L'acumulació patològica de proteïnes no es limita al sistema nerviós central, sinó que pot donar-se el qualsevol teixit del cos, per causes diverses i provocant malalties de diversa índole. A continuació en veurem unes quantes.

2.2.1. Amiloïdosis

Coneixem per amiloïdosis l'acumulació patològica de proteïnes insolubles i resistents a la proteòlisi en l'espai intercel·lular, anomenat 'substància amiloide'. Tant les causes de l'aparició d'aquests agregats com els teixits que afecten són molt variats, però les amiloïdosis més comuns són les següents: Amiloïdosis AA¹¹³ (agregació de SAA -*Serum Amyloid A*-, que es secreta durant les fases agudes de la inflamació i està implicada en l'aparició de malalties inflamatòries cròniques), Amiloïdosis AL¹¹⁴ (causada per una formació aberrant de les cadenes lleugeres dels anticossos, i en lloc de formar anticossos funcionals, agreguen; pot afectar un gran ventall de teixits, i en cadascun d'ells causa símptomes diferents), Amiloïdosis TTR¹¹⁵ (agregació de la transtiretina -proteïna que transporta tiroxina en el sèrum- que pot causar amiloïdosis a nivell sistèmic; la proteïna salvatge pot agregar, però hi ha mutacions que ho afavoreixen), Amiloïdosis Lect2¹¹⁶ (acumulació de la proteïna *Leukocyte cell-derived chemotaxin-2*, algunes mutacions de la qual estan associades a l'aparició d'artritis reumatoide), Amiloïdosis associada a la hemodiàlisi¹¹⁷ (per agregació de la proteïna β_2 microglobulina, que s'acumula al sèrum en pacients amb fallada renal que necessiten hemodiàlisi perquè aquesta proteïna no s'elimina durant aquest procediment) i Amiloïdosis associada a la diabetis¹¹⁸ (per acumulació de la proteïna IAPP -*Islet Amyloid PolyPeptide*, també anomenada amilina- en els illots de les cèl·lules β del pàncreas, especialment en els pacients de diabetis tipus II).

2.2.2. Càncer

Una de les moltes derivades del càncer és la inflamació que pot causar amiloïdosis en els teixits on es troba, però aquí volem parlar de l'agregació de la proteïna supressora de tumors p53^{119,120}, ja que s'ha vist que en alguns càncers causats per la pèrdua de funció del 'Guardià del Genoma' el que succeeix és que

p53 forma agregats¹²¹, tant en la variant salvatge com en mutants. Aquest fenomen s'ha constatat en neuroblastoma, retinoblastoma, càncer de pit i càncer de colon^{122,123}.

2.2.3. Malaltia de von-Hippel-Lindau^{124,125}

La malaltia de von-Hippel-Lindau (VHL) es troba darrere l'aparició de certs tipus de tumors, principalment hemangioblastomes, feocromocitomes i carcinomes renals¹²⁶, per una pèrdua d'heterozigosi en el gen supressor de tumors *VHL*¹²⁷ (els pacients ja solen tenir un dels al·lels mutats). La proteïna (pVHL) s'encarrega d'ubiquitinar i degradar el factor induïble per hipòxia (HIF, factor clau en el desenvolupament del càncer, que promou l'angiogènesi per irrigar el tumor creixent) i es troba constitutivament desplegada i inactiva a no ser que interaccioni amb les elongines B i C^{128,129}; les mutacions patogèniques solen causar una pèrdua d'interacció amb les elongines, fent que la proteïna es plegui malament, agregui i finalment es degradi per mitjà de la maquinària de control de qualitat de la cèl·lula¹³⁰.

2.2.4. Hipotricosis simple del cuir cabellut^{131,132}

Malaltia genètica rara causada per mutacions en el gen *CDSN*, que codifica per la corneodesmosina (una glicoproteïna d'adhesió expressada en l'epiteli escamós). Causa alopecía en edats molt primerenques, tot i que només afecta al pèl del cap. Les mutacions provoquen la oligomerització de la proteïna en cèl·lules del fol·licle pilós (fent-lo fallar) i els agregats migren cap a l'epiteli exterior, on són degradats per proteases epidèrmiques.

2.3. Exemples de repartiment asimètric d'agregats proteics en organismes model

A banda de malalties humanes, que no ens les acabariem, existeixen diverses observacions interessants en organismes model com *C. elegans*, *D. melanogaster* i línies cel·lulars de mamífers on s'ha observat un repartiment asimètric d'agregats proteics en cèl·lules en proliferació. Així, en el cuc s'ha vist que l'agresoma

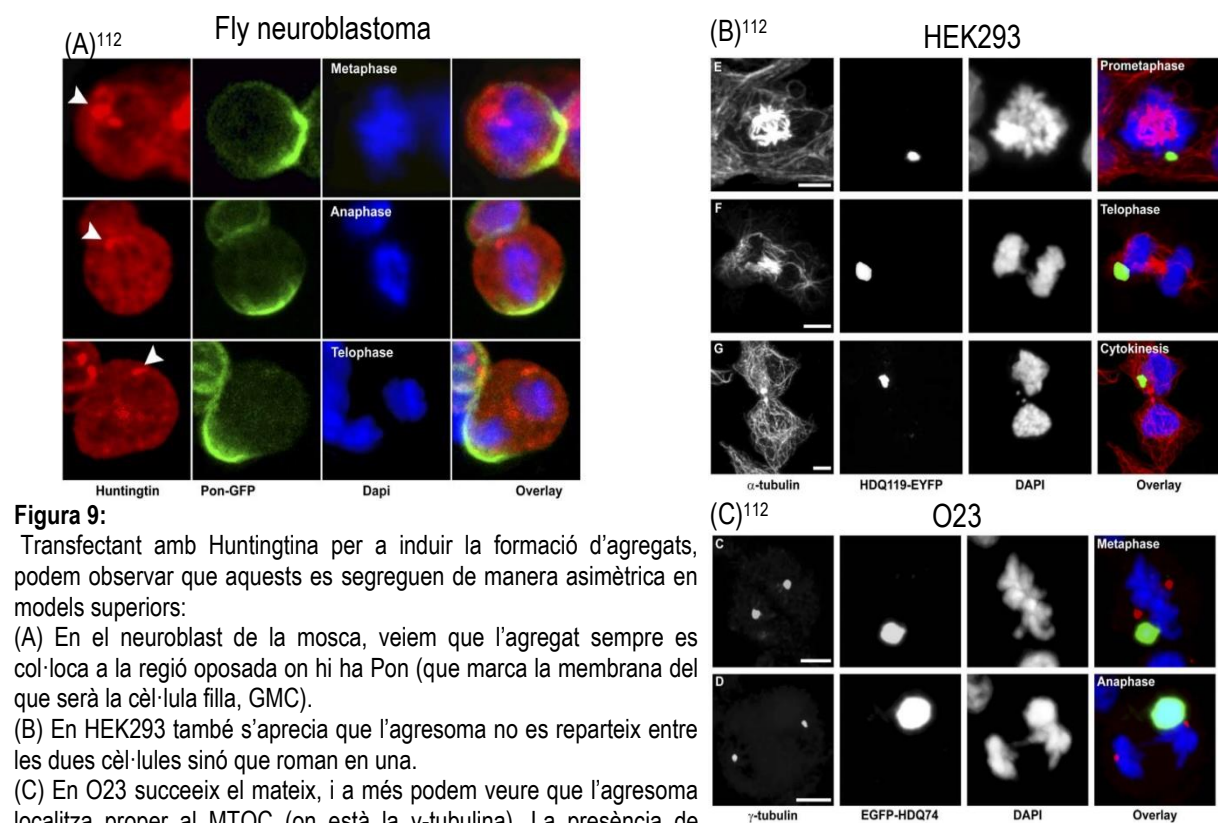


Figura 9:

Transfectant amb Huntingtina per a induir la formació d'agregats, podem observar que aquests es segreguen de manera asimètrica en models superiors:

(A) En el neuroblast de la mosca, veiem que l'agregat sempre es col·loca a la regió oposada on hi ha Pon (que marca la membrana del que serà la cèl·lula filla, GMC).

(B) En HEK293 també s'aprecia que l'agresoma no es reparteix entre les dues cèl·lules sinó que roman en una.

(C) En O23 succeeix el mateix, i a més podem veure que l'agresoma localitza proper al MTOC (on està la γ -tubulina). La presència de l'agresoma no afecta a la mitosi en aquests models cel·lulars de mamífer.

(compartiment on s'acumulen les proteïnes agregades en cèl·lules superiors) es segrega asimètricament cap a unes cèl·lules que eventualment han de fer apoptosi com a part del desenvolupament de l'animal (ho fan un 10% del total de les cèl·lules del cuc)¹³³; en la mosca s'ha vist que en la neurogènesi l'agresoma es queda en el neuroblast (que és la cèl·lula mare que fa un nombre limitat de filles -que finalment es convertiran en neurones- i després mor per apoptosi), mentre que les filles (GMC, per *Ganglion Mother Cell*) es dividiran un cop més i les dues cèl·lules resultants es diferencien a neurones (Figura 9A)¹¹²; i tant en línies cel·lulars d'HEK293 com d'O23 s'ha vist que la presència de l'agresoma també se segrega asimètricament, i que aquestes proteïnes agregades es transporten al centre organitzador de microtúbuls (MTOC) per tal de facilitar aquesta segregació asimètrica (Figura 9B-C)¹¹².

3. Tipus d'agregats proteics acumulats durant processos d'estrès i d'envelliment cel·lular en llevat

La investigació durant els últims anys ha descobert una gran varietat de dipòsits i agregats proteics, que apareixen de manera espontània o en resposta a estrès, així com durant l'envelliment d'una manera natural. A continuació en farem una breu relació.

3.1. Proteïnes endògenes del llevat amb tendència a formar agregats amiloides de naturalesa prionica

S'han trobat diversos elements heretables i transmissibles amb base proteica, i que finalment es va saber que el seu mecanisme de creixement i proliferació era en base a un comportament prionic. La xaperona que principalment interactua amb aquests agregats amiloides és Hsp104, que s'encarrega de dissociar-los^{134–136}. Tot i així, també contribueix a la seva propagació a nivell poblacional, ja que l'acció d'Hsp104 produeix agregats amiloides més petits i que és més fàcil que escapin a la retenció en la cèl·lula mare, facilitant l'aparició de nous agregats en la cèl·lula filla¹³⁷. Tenim reporters genètics que ens ajuden a determinar l'estat d'agregació d'aquestes proteïnes en diferents colònies. L'estat prionic d'un d'aquests elements en qüestió es pot 'curar' per superexpressió o deleció de determinades xaperones (entre elles Hsp104, i en aquest cas tant la superexpressió com la deleció pot curar), o fent créixer les cèl·lules en clorur de guanidini; inicialment es creia que era a causa de l'acció caotròpica d'aquest compost, i que d'alguna manera dissociava els agregats, però després es va descobrir que el GuHCl és un inhibidor directe d'Hsp104^{138,139}. Així, el que generalment entenem com a 'cura' d'un prió a nivell de colònia no és que els agregats no es formin, sinó que els agregats es fan molt més grans a les cèl·lules que els tenen, fent impossible la transmissió de petits elements de nucleació a la descendència i d'aquesta manera produint una progènie neta d'agregats (a costa del sacrifici d'unes poques cèl·lules, que a nivell poblacional són negligibles). No és clar si aquest estat agregat és patològic pel llevat¹⁴⁰: en general sembla que sí, però en algunes condicions d'estrès poden tenir un paper en positiu ja que sinó no s'entendria que la evolució no hagués minimitzat la presència d'aquestes seqüències en les proteïnes.

3.1.1. Sup35 (prió [PSI⁺])^{141,142}

Als anys 60 es va descobrir un factor hereditari amb una distribució no mendeliana en *S. cerevisiae*, que van anomenar [PSI⁺]¹⁴¹. Consistia en un fenotip de supressió d'una mutació sense sentit en un al·lel del gen *ADE1* (a·lel *ade1-14*, on hi ha un codó Stop en mig de la ORF), però les cèl·lules [PSI⁺] podien créixer en medi sense adenina. Gairebé 30 anys més tard es va descobrir que la causa d'aquest fenotip era l'agregació de la proteïna Sup35¹⁴² (un factor de terminació traduccional, que dissocia el complex

ribosoma-mRNA-pèptid aturat en codons Stop), que seguia un comportament semblant al del prió PrP (que havia estat descobert uns 10 anys abans). Així, la proteïna agregada dona un fenotip de pèrdua de funció, i en ocasions el ribosoma omet els codons Stop, i per això les cèl·lules *[PSI⁺]* amb un Stop intern al gen *ADE2* (al·lel *ade1-14*) són Ade⁺ en comptes de ser Ade⁻. D'altra banda, el comportament prionic (és a dir que a partir de nuclis d'agregació es pot convertir proteïnes en estat natiu a l'estat prionic) explica el patró d'herència no mendelià que s'havia constatat. Si analitzem la seqüència de la proteïna Sup35, veiem que en l'extrem N-terminal hi ha 123 residus que formen un IDD ric en glutamines i asparagines¹⁴³ (Q/N-rich), que no és essencial per a la funció de terminació traduccional i si eliminem aquest domini les cèl·lules són immunes a la infecció externa del prió¹⁴⁴. S'ha proposat que les proteïnes aberrants produïdes en les soques *[PSI⁺]* (quan fan proteïnes més llargues del compte al saltar-se l'Stop que hi ha al final de les ORFs) poden servir per generar més variabilitat genètica que permetin guanys de funció quan posem les cèl·lules en diversos estressos¹⁴⁵, així que al contrari del que succeeix en organismes superiors, sembla que els prions del llevat poden tenir una funció positiva per a la cèl·lula en algunes situacions (si més no a nivell poblacional, ja que de mateixa manera que la proteïna aberrant pot provocar un guany de funció, també en pot causar una pèrdua en una altra cèl·lula).

En les soques amb l'al·lel *ade1-14* és molt fàcil saber si les colònies són *[PSI⁺]* o *[psi⁻]*: en YPD les colònies *[PSI⁺]* seran blanques, mentre que les *[psi⁻]* seran roges (Figura 10A)¹⁴⁶. Això passa perquè quan les cèl·lules detecten que s'està acabant l'adenina disponible al medi, activen la via de síntesi, i al haver un Stop intern a l'ORF, aquesta via metabòlica queda bloquejada en un estat intermedi; el metabòlit produït fins aquest pas (anomenat AIR o P-ribosilamino imidazol) s'acumula i, en mostrar un color roig, fa que les colònies que l'acumulen també ho siguin. Segons l'estat d'agregació de Sup35, i en conseqüència al nivell de proteïna en estat lliure i amb capacitat de realitzar la seva funció de terminació traduccional, poden establir-se diferents nivells estables d'incidència del prió en una població, essent la penetrància major quan

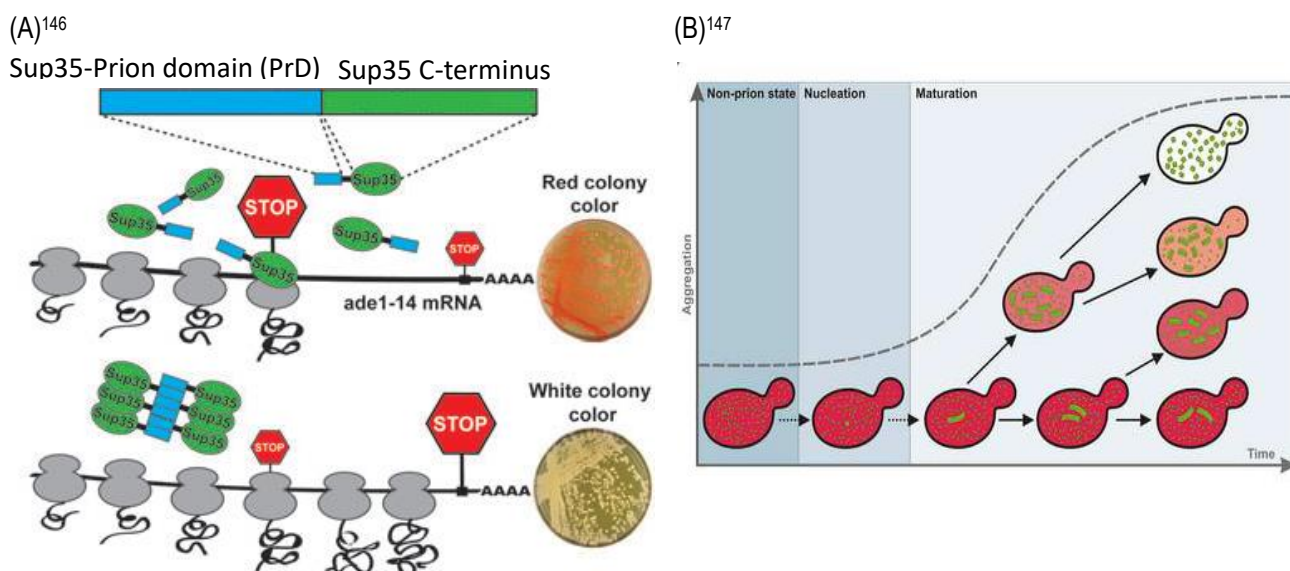


Figura 10:

(A) Sup35 té 2 dominis diferenciats, un amb funció en la terminació traduccional (C-terminal) i l'altre que pot formar agregats amiloides. Així, si Sup35 està en forma lliure pot realitzar la seva funció correctament i aturar la síntesi del polipèptid naixent quan es troba un codó Stop, mentre que si s'agrega, no pot entrar al ribosoma i ocasionalment els codons Stop es salten. En cèl·lules amb l'al·lel *ade1-14*, podem inferir l'estat d'agregació de Sup35 a partir de veure de quin color són les colònies.

(B) El punt clau en la propagació del prió és que petits agregats puguin passar de les cèl·lules mare a les filles fent de nuclis d'agregació (ja que si no, en les cèl·lules fills caldria un nou esdeveniment de conversió espontània per a que adquirissin el comportament prionic, i això és poc probable¹⁴⁵); així segons el tipus d'agregats que es formin, podem tenir diferents nivells de penetrància del prió en l'afectació: curiosament les soques més propenses a generar grans agregats donaran lloc a poblacions sense agregats, ja que aquests grans agregats són de difícil propagació.

hi ha molts agregats petits capaços de transmetre's a les cèl·lules filles que no pas si una cèl·lula té un agregat molt gran que no pot ser transmès (Figura 10B)¹⁴⁷.

3.1.2. Altres proteïnes prioniques en llevat

Apart de Sup35, en els darrers anys s'han descobert una gran quantitat de proteïnes de llevat que també es comporten seguint els mateixos patrons de formació d'agregats prionics. Les funcions de les proteïnes afectades són diverses, així com els efectes que l'agregació causa sobre les funcions cel·lulars. Així, a dia d'avui s'han descrit els següents prions en *S. cerevisiae*, la majoria amb IDD's rics en asparagina i glutamina i normalment causant fenotips de pèrdua de funció, a part del anteriorment descrit *[PSI]* (causat per agregats de Sup35): *[URE3]*¹⁴⁸ (agregats de la proteïna Ure2, involucrada en el metabolisme en condicions de limitació de nitrogen), *[PIN]*¹⁴⁹ (agregats de la proteïna Rnq1, proteïna de funció desconeguda, que en la forma agregada és imprescindible per a la formació d'agregats de Sup35), *[ISP]*¹⁵⁰ (agregats intranuclears de Sfp1, involucrada en l'activació de la transcripció de gens necessaris per a la síntesi de ribosomes, on l'agregació sembla provocar un guany de funció), *[SWI]*¹⁵¹ (agregats de Swi1, component remodelador de cromatina SWI/SNF, que s'activa en resposta a factors nutricionals), *[OCT]*¹⁵² (agregats de Cyc8, un co-repressor transcripcional global), *[MOT3]*¹⁵³ (agregats de Mot3, un altre repressor transcripcional amb multitud de dianes), *[GAR]*¹⁵⁴ (agregació de Pma1 i Std1, una bomba de protons i una proteïna senyalitzadora en resposta a glucosa respectivament; les cèl·lules amb aquest prió són resistents a la repressió associada a glucosa), *[β]*¹⁵⁵ (agregats de la proteasa vacuolar B, els quals són necessaris per a l'esporellació i avantatjosos en condicions d'inanició) i *[MOD5]*¹⁵⁶ (per agregació de Mod5, una tRNA-isopenteniltransferasa, sense dominis rics en Q/N i l'agregació de la qual confereix resistència a certs antifúngics), algunes de les quals es mostren en la Figura 11¹⁵⁷.

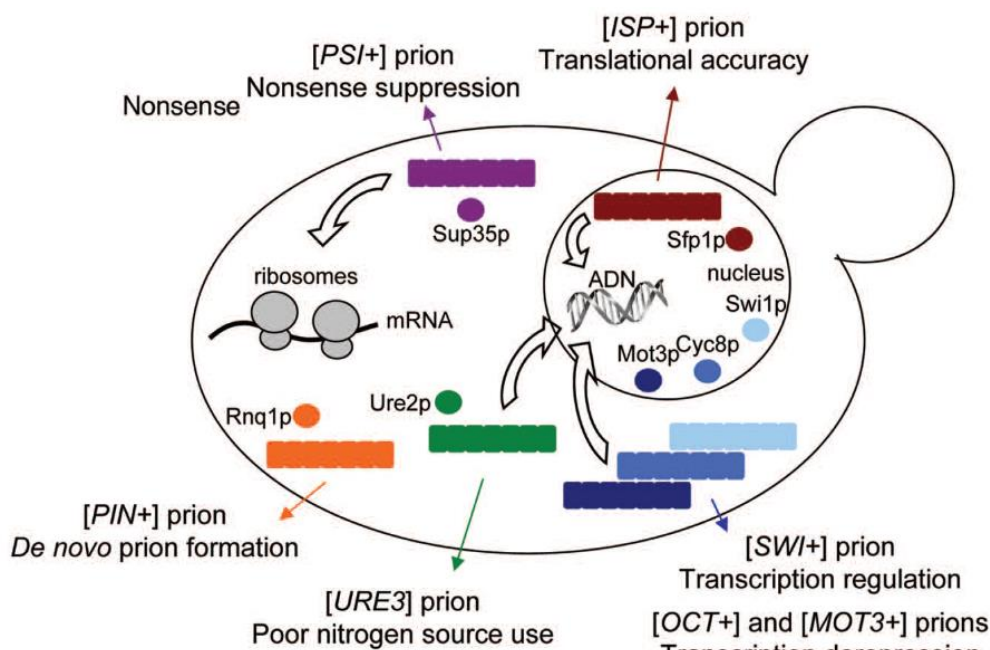


Figura 11¹⁵⁷:

Resum esquemàtic que representa la majoria dels prions que es coneixen en llevat a dia d'avui. Com s'aprecia, es distribueixen en localitzacions al llarg de tota la cèl·lula i les proteïnes natives participen en funcions molt variades, tot i que tenen en comú que tenen algun IDD que permet que puguin formar agregats amiloïdes.

3.2. Dipòsits proteics reversibles en resposta a estrès (Q-bodies¹⁵⁸)

S'ha detectat l'aparició de *puncta* associats al reticle endoplasmàtic en resposta a estrès, que es mouen i es fusionen entre ells, i posteriorment s'eliminen (un cop passa l'estrès). Es van descobrir fent ús d'un pèptid termolàbil reporter (Ubc9ts) unit a una proteïna fluorescent. Aquests *puncta* s'han anomenat Q-bodies¹⁵⁸ i contenen proteïnes mal plegades i desnaturades per l'estrès, però no contenen agregats amiloides. La eliminació d'aquests dipòsits requereix d'un reticle endoplasmàtic cortical intacte i una complexa xarxa de xaperones. El fet de formar aquests Q-bodies confereix una millor adaptabilitat a l'estrès, essent un control de qualitat primerenc que elimina del citoplasma aquestes proteïnes mal plegades amb una capacitat potencial de produir agregats proteotòxics. S'ha vist que entre les xaperones implicades en el reciclatge i degradació d'aquestes acumulacions s'hi troben les Hsp70 amb la col·laboració de Ydj1, que associa aquests agregats al reticle, les Hsp90 i Hsp104 (Figura 12). Aquests agregats s'hereten asimètricament per les cèl·lules mare gracies a la geometria del coll de la gemma¹⁵⁹, per l'ancoratge d'aquests a la xarxa mitocondrial¹⁶⁰ i per un transport retrògrad mediat per cables d'actina⁵⁸.

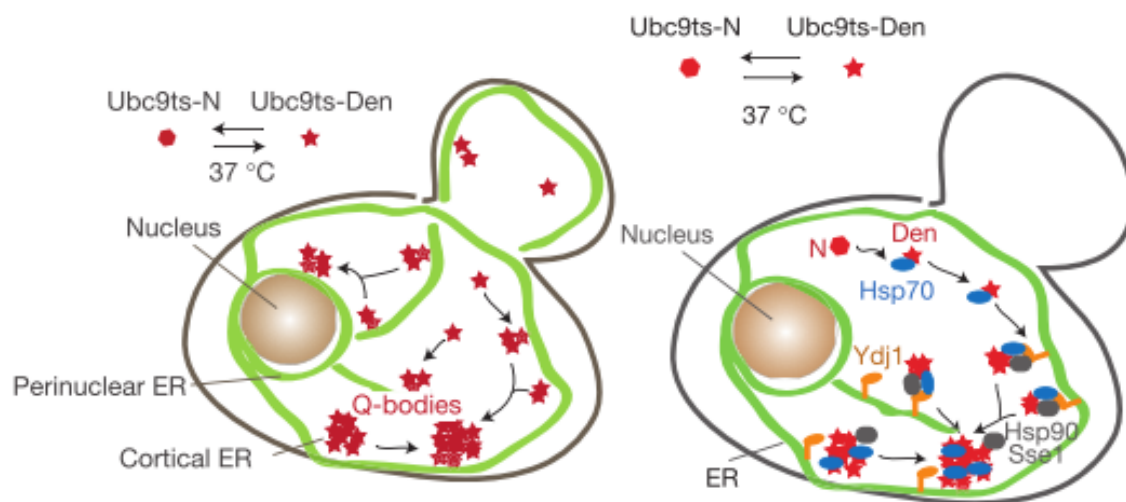


Figura 12¹⁵⁸:

Ubc9ts es desnaturalitza al posar les cèl·lules a 37°C, i es distribueix en petites acumulacions al llarg del reticle endoplasmàtic (en verd), que van ajuntant-se entre ells a la vegada que es van reciclant. Els Q-bodies que es puguin haver format en la cèl·lula filla es transporten cap a la mare. L'ancoratge del Q-body al reticle es fa a través de Ydj1, mentre que s'intenten replegar o sinó desplegar i enviar a degradar per les xaperones Hsp70, Hsp90 i Hsp104.

3.3. Grans dipòsits de proteïnes ubiquitinades propers al nucli (JUNQ¹⁶¹/INQ¹⁶²)

L'estrès prolongat que causa els Q-bodies, si es combina amb la inhibició del proteosoma, acaba formant un altre tipus de dipòsit ric en proteïnes ubiquitinades, i que inicialment es va localitzar en la regió juxtànuclear¹⁶¹, tot i que més tard es van detectar també dins el nucli¹⁶². Aquestes estructures estan regulades per la deubiquitinasa Upb3¹⁶³, per l'activitat proteosomal¹⁶⁴ i per gotes lipídiques¹⁶⁵, i la seva formació és depenent de l'agregasa Btn2¹⁶². Per trobar el JUNQ/INQ, a més de fer servir el reporter termolàbil anteriorment citat (Ubc9ts), també es fa servir la proteïna de Von Hippel Lindau (VHL), ja que en el llevat no hi ha les elongines que la mantenen ben plegada en les nostres cèl·lules, i és acumulada en aquest compartiment de reciclatge i degradació¹⁶¹. L'objectiu d'aquest compartiment és concentrar les proteïnes mal plegades en un lloc de la cèl·lula (per evitar que aquestes puguin passar a les cèl·lules filles) i degradar-les mitjançant el proteosoma (Figura 13)¹⁶¹. En aquest compartiment no hi ha agregats amiloides, sinó que aquests es localitzen en l'IPOD, compartiment que descriurem seguidament.

3.4. Dipòsits de proteïnes insolubles (IPOD¹⁶¹)

És el compartiment on s'envien les proteïnes que agreguen irreversiblement, així com els prions que hem enumerat anteriorment. De fet, el reporter utilitzat normalment per localitzar aquest dipòsit és una fusió a GFP de Rnq1, que és la proteïna responsable del prió *[PIN]*^{149,161}. Un dels punts claus que determinen el destí de les proteïnes mal plegades és si s'ubiquitinen o no: si ho fan poden anar a parar al JUNQ/INQ i poden intentar replegar-se; si no, acabaran formant agregats insolubles i localitzaran a l'IPOD¹⁶¹. Si més no, localitzar els agregats insolubles en un lloc determinat (en el cas de l'IPOD, es col·loca proper a la vacuola) serveix per a centralitzar-los i facilitar-ne el repartiment asimètric envers la cèl·lula mare, per evitar que la filla en rebí (Figura 13).

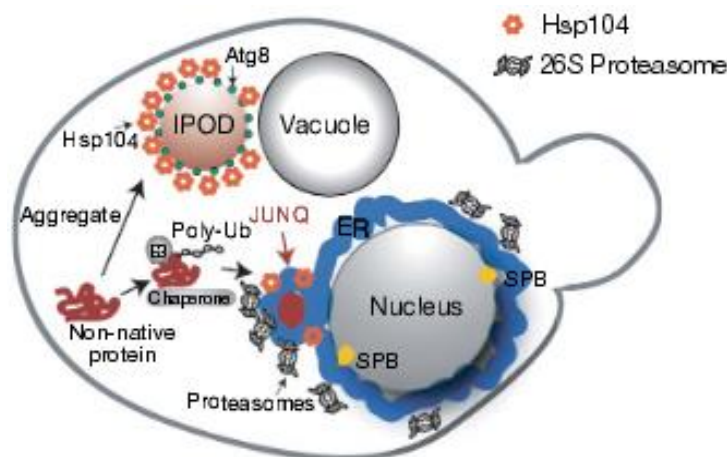


Figura 13¹⁶¹:

Les proteïnes mal plegades poden o bé ubiquitinar-se i ser dirigides al JUNQ/INQ, on seran reciclades pel proteosoma, o si agreguen formant dipòsits insolubles s'acumulen al IPOD, proper a la vacuola, on s'hi mantenen permanentment evitant la seva transferència a les cèl·lules filles. Hsp104 es troba en ambdós compartiments: mentre que en el JUNQ/INQ pot estar intentant desplegar proteïnes per a que tinguin la opció de replegar-se correctament, mentre que en el IPOD pot estar fragmentant les fibres d'agregats amiloides.

3.5. Dipòsits de proteïnes induïts per l'envelliment (AiPD^{56,166})

S'ha detectat que durant l'envelliment en una porció significativa de cèl·lules apareix un focus d'Hsp104 (al voltant de quan la cèl·lula mare ja ha fet 4-6 filles)⁵⁶, que es reté en la cèl·lula mare i que no està associat a estrès ni a cap problema en la proteòstasi. La formació d'aquest dipòsit és depenent d'Hsp42, una agregasa que reuneix diferents proteïnes (de manera no aleatòria, entre les que s'inclou el prió Sup35) i components de la maquinària de xaperones Hsp70 i Hsp104. La pèrdua d'Hsp42 causa un repartiment simètric d'aquests dipòsits, i allarga la longevitat de la cèl·lula mare (Figura 14)¹⁶⁶.

Els petits dipòsits invisibles que es formen durant l'envelliment, abans de ser reclutats en l'AiPD per Hsp42, es retenen a la cèl·lula mare per un ancoratge al reticle endoplasmàtic mitjançant per Ydj1 (i específicament per el lloc de farnesilació que té aquesta xaperona) i per una barrera de difusió existent entre les cèl·lules mare i les cèl·lules filla, que causa una discontinuïtat en la xarxa del reticle endoplasmàtic impedit que aquests elements passin a les cèl·lules filles¹⁶⁷. La ruptura de l'ancoratge (evitant la farnesilació de Ydj1) o de la barrera de difusió (eliminant el gen *SUR2*, que codifica per l'enzim que fabrica el lípid present en aquesta barrera de difusió) causa una aparició més primerenca d'aquests agregats visibles en les cèl·lules filles (ja que no s'evita el pas dels petits agregats invisibles, que poden servir de nuclis d'agregació en les cèl·lules joves). Això ho vam poder detectar gràcies a mesurar la difusió de Ydj1 en els parells de compartiments mare-filla encara connectades entre elles, assumint que una part de les

molècules de Ydj1 estan unides a aquests agregats que són massa petits per veure'ls, però que alenteixen la mobilitat de Ydj1; així vam detectar que mesurant cèl·lules amb una versió farnesilable de Ydj1-GFP existeix una asimetria en la mobilitat de les espècies de Ydj1 entre els dos compartiments, essent més lentes les que estan en el compartiment de la cèl·lula mare, i que si eliminem la possibilitat d'ancorar Ydj1 al reticle o la barrera de difusió entre els compartiments el comportament esdevé simètric (Figura 15)¹⁶⁷.

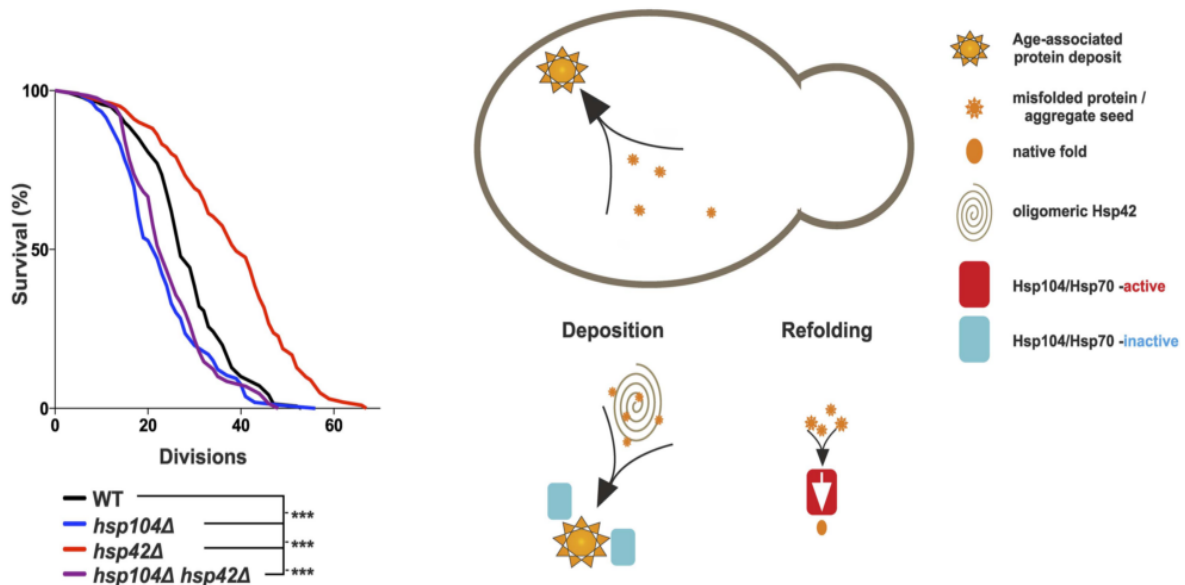


Figura 14¹⁶⁶:

Eliminar Hsp42 allarga la vida de les cèl·lules mare, i accelera l'aparició d'AiPD en les filles d'aquestes, però no rescata l'escurçament del RLS en els mutants $\Delta hsp104$. Així, Hsp42 s'encarrega de recol·lectar els petits agregats i proteïnes mal plegades per portar-los a l'AiPD, on depenen de si les xaperones Hsp104/Hsp70 estan més o menys actives, s'intentaran replegar o simplement es depositaran i formaran aquest dipòsit visible.

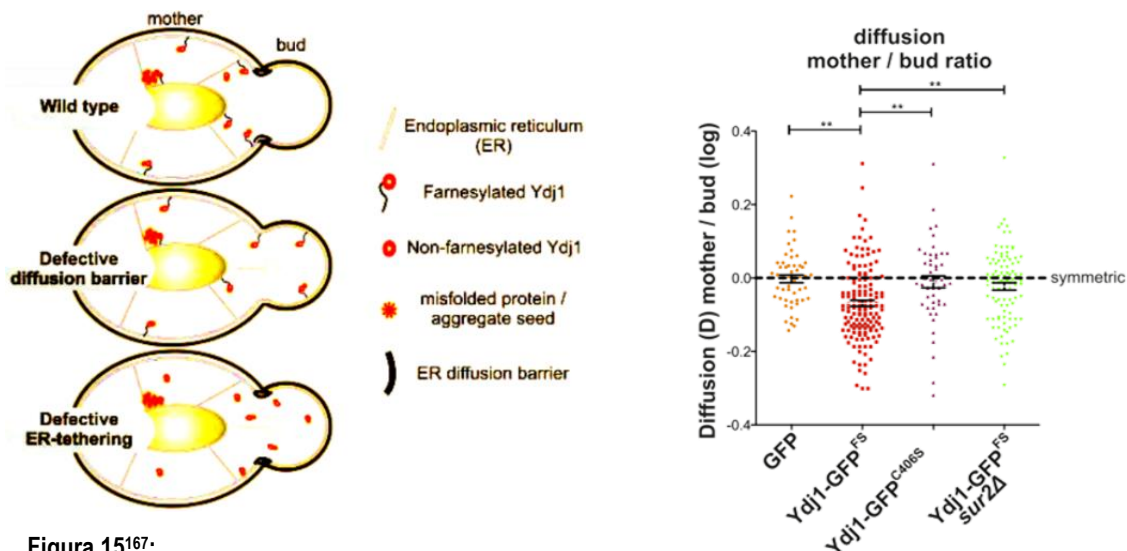


Figura 15¹⁶⁷:

Segons aquest model, el sistema mitjançant el qual la cèl·lula s'assegura de que els petits agregats i proteïnes mal plegades que han d'anar a parar al AiPD no s'escapen cap a les cèl·lules filles és mitjançant un ancoratge d'aquests al reticle endoplasmàtic (gràcies a la interacció amb Ydj1 i la seva farnesilació) i a la presència d'una barrera situada al coll de la gemma, que trenca el continu entre el reticle endoplasmàtic de la cèl·lula mare i de la filla. Gràcies a la mesura de la difusió de Ydj1 per mitjà de FCS, vam poder constatar la existència d'un desequilibri en la mobilitat d'aquesta xaperona entre els dos compartiments, que es desfà si es trenca un dels dos mecanismes de retenció.

3.6. Dominis prionics sintètics¹⁶⁸

A partir de que es van anar descobrint diferents proteïnes de llevat que tenien comportament prionic, es van començar a estudiar les seqüències d'aquestes proteïnes per intentar trobar-hi patrons que servissin per a escriure un algoritme que pogués predir la possibilitat de que altres proteïnes de llevat, o d'altres organismes, també tinguessin aquesta potencialitat. Amb aquest objectiu es va escriure el software PAPA^{168,169} (*Prion Agregation Prediction Algorithm*), que a partir de l'estructura primària de qualsevol proteïna, detecta quines regions tenen possibilitats de poder produir agregats prionics (a causa de la presència de regions *Q/N-rich* acompanyades de certs determinants), així com si hi ha IDD's (encara que aquests no tinguin propensió a formar agregats). I el següent pas consistia en demanar-li a l'algoritme que enlloc de predir si una proteïna existent a la natura té capacitat de formar prions, demanar-li que dissenyi, seguint les mateixes normes, una seqüència sintètica que tingui les mateixes propietats, i provar si funciona com a prió en un sistema biològic, tal i com van fer. Van anomenar a aquests pèptids sPFD (*synthetic Prion Forming Domain*), i a la vegada van dissenyar un altre grup de pèptids que, amb la mateixa composició d'aminoàcids Q/N que els sPFD, incomplissin les normes marcades per la natura i no formessin agregats, que van ser anomenats com cPFD (*control Prion Forming Domain*). En la Figura 16 es mostra l'*output* de l'algoritme PAPA al introduir-hi les seqüències d'un dels sPFD i del seu control.

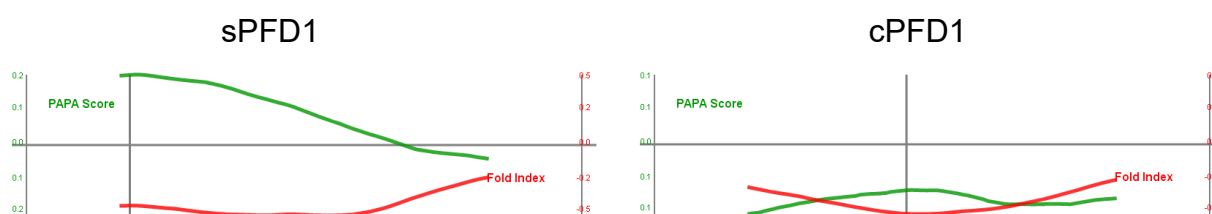


Figura 16:

L'*output* de l'algoritme PAPA dona dos tipus d'informació: d'una banda, en verd mostra la potencialitat de que una determinada seqüència tingui un comportament prionic (*PAPA Score*, en verd), i assenyalava amb una barra vertical el punt de la seqüència on aquesta probabilitat és màxima, i com més positiu sigui aquest *PAPA Score*, més probable és que aquesta seqüència d'aminoàcids tingui un comportament prionic (el *threshold* es sol fixar en 0.05); en roig s'indica l'índex de plegament, de forma que si és positiu la seqüència té un plegament definit mentre que si és negatiu indica que aquella seqüència és un IDD. Cal denotar que la composició d'aminoàcids de les dues seqüències comparades és idèntica (per tant són igualment riques en glutamines i asparagines), però l'ordre en que aquests residus s'organitzen també es clau per determinar si el pèptid tindrà comportament prionic o no.

3.7. Implicació de xaperones en el metabolisme de dipòsits reversibles i d'agregats proteotòxics

En els anteriors apartats ja s'ha parlat de que les diferents famílies de xaperones participen de la proteòstasi i en els mecanismes de control de qualitat del plegament de proteïnes, així com en el seu reciclatge, degradació i fragmentació d'agregats amiloides. Existeixen multitud d'evidències *in vitro* de la interacció de diverses xaperones amb proteïnes prioniques, així de quins són els seus efectes sobre la formació de fibres amiloides¹⁷⁰⁻¹⁷². També hi ha evidències *in vivo* de que la presència d'un tipus d'agregats amiloides interfereix amb el metabolisme d'uns altres a través de competir per les xaperones que interaccionen amb els dos tipus d'agregats¹⁷³. En els treballs on s'han descrit els dipòsits proteics anteriorment citats també es detalla la interacció d'aquests agregats amb diferents tipus de xaperones, tant per colocalització de proteïnes fusionades a proteïnes fluorescents com per aproximacions bioquímiques. Finalment, en la Figura 17¹⁷⁴ es resumeixen els efectes de l'excés i l'absència de diversos grups de xaperones sobre els prions del llevat, denotant-s'hi que no hi ha una tendència clara pel que fa al comportament dels prions quan es varia la composició dels equips de xaperones amb qui interaccionen.

Chaperone		Effect on [PSI ⁺]		Effect on other prions	
Family	Protein/subfamily	Excess	Depletion or inactivation	Excess	Depletion or inactivation
Hsp100	Hsp104 ^a	Cures	Cures	None	Cures all but [ISP ⁺]
Hsp70	Ssa(1–4) ^b	Destabilizes Protects from ↑ 104	Destabilizes	Cures [URE3] (Ssa1, not Ssa2)	Cures [URE3] (Ssa2)
	Ssb(1,2) ^c	Aids ↑ 104 Destabilizes	Protects from ↑ 104	ND	ND
Hsp40	Sis1 ^d	Aids ↑ 104	Antagonizes	ND ^e	Cures [PIN ⁺]
	Ydj1 ^f	ND	Does not cure	Cures [URE3] ^e	Cures [SWI ⁺]
	Apj1 ^g	ND	ND	Compensates for ydj1Δ ^e	ND
Hsp90	Hsp82 ^h	No effect	Protects from ↑ 104	ND	ND
NEF (for 70)	Sse1 ⁱ	ND	Cures	Cures [URE3]	Cures [SWI ⁺], [URE3]
	Fes1 ⁱ	ND	Cures	Cures [URE3]	ND
Co-70/90	Sti1 ^j	ND	Protects from ↑ 104	ND	ND
	Cpr7 ^j	ND	Protects from ↑ 104	ND	ND

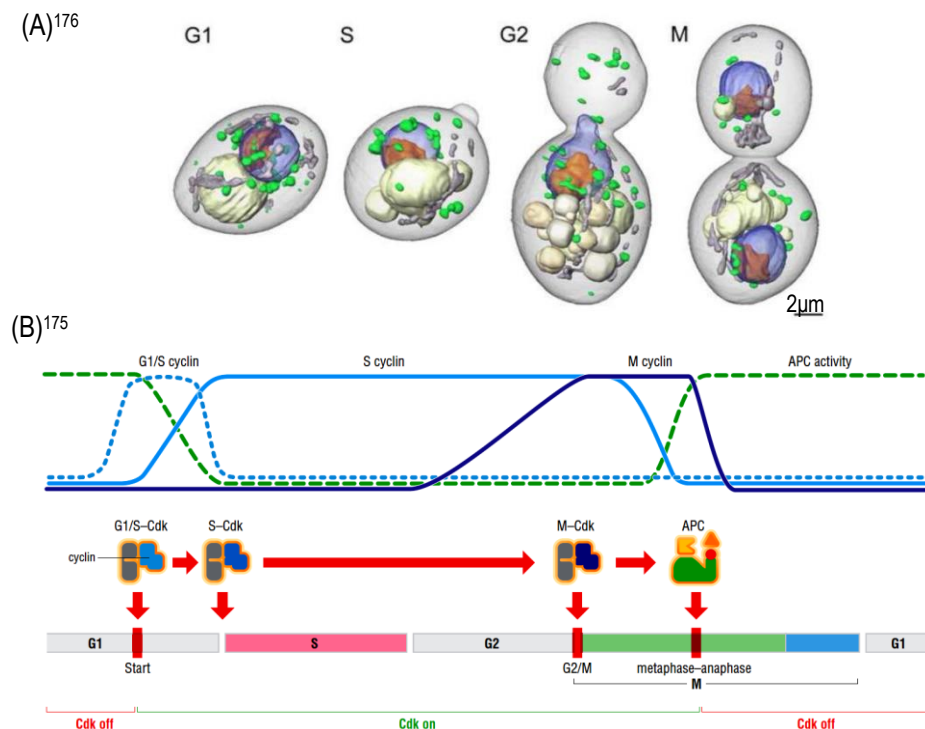
Figura 17¹⁷⁴:

Quadre resum amb les interaccions genètiques entre diferents tipus de xaperones i alguns dels prions descrits en el llevat. Denoti's que en alguns casos tant l'excés com la falta d'alguna xaperona té els mateixos fenotips finals, tot i que els camins per on s'hi arriben siguin diferents (com és el cas d'Hsp104).

4. Visió general del cycle cel·lular de *S. cerevisiae*

La reproducció cel·lular es produeix per una elaborada sèrie d'esdeveniments anomenat 'cycle cel·lular'; on la cèl·lula creix, duplica els cromosomes i altres elements i posteriorment els distribueix en dues cèl·lules resultants, tot controlat per una complexa xarxa de proteïnes reguladores¹⁷⁵. En el cas del llevat de gemmació, aquest procediment tarda entre hora i mitja i dos hores, mentre que en les nostres cèl·lules tarda unes 24h. El cycle cel·lular es divideix en quatre fases (a part de la fase G0, que és quan les cèl·lules no s'estan replicant): fase G1 (on la cèl·lula creix fins assolir una mida crítica), fase S (on la cèl·lula sintetitza una nova còpia del seu DNA), fase G2 (on la cèl·lula coordina replicació i segregació del DNA) i fase M (on es produeix el repartiment del material genètic entre les dues cèl·lules, així com la citocinesi). Com s'ha tractat anteriorment, en llevat la nova cèl·lula creix a partir d'una petita gemma, que va creixent fins que és prou gran, moment en el qual es disloca de la mare i comença la seva vida independent. En la Figura 18A¹⁷⁶ es mostra una reconstrucció d'un llevat en divisió en cadascuna de les fases del cycle cel·lular, feta a partir de tomografia amb raigs X.

Un dels molts avantatges del llevat com a model d'estudi del cycle cel·lular és que mirant les cèl·lules al microscopi podem saber aproximadament en quina fase del cycle es troben les cèl·lules; així si veiem una cèl·lula sense gemma sabem que està en G1 (o G0 si no està creixent), si té una gemma petita està al començament de fase S, si la gemma és més gran està en S/G2 i quan la mare i la gemma són de mida molt semblant està en fase M. Aquests esdeveniments a nivell molecular es poden definir en funció de quin tipus d'activitat CDK-ciclina hi ha en cada moment, cadascuna de les quals promou l'activació de la següent i indueix la seva pròpia degradació (Figura 18B); a continuació entrarem en més detalls sobre els factors que controlen la progressió del cycle cel·lular assegurant-se de que succeeixin ordenadament i en el moment adequat, molts dels quals s'han descobert gràcies a la recerca en *S. cerevisiae*.

**Figura 18:**

(A) Reconstrucció de l'estructura d'un llevat durant les fases del cicle cel·lular, feta a partir de tomografia amb raigs X.

(B) En cada fase del cicle hi ha l'activitat quinasa corresponent a la ciclina que predomina en cada moment; com més avança la cèl·lula en el cicle, més potent és l'activitat quinasa de l'enzim, i quan aquesta és màxima, activa APC que degrada les ciclines, tornant a final del cicle l'activitat quinasa a nivells basals.

4.1. Control en la progressió a través del cicle cel·lular per complexos CDK-Ciclina

El component central en la xarxa de control de cicle cel·lular és la CDK (*Cyclin Dependent Kinase*). En *S. cerevisiae* una única CDK anomenada Cdc28 condueix tot el cicle cel·lular, tot i que en organismes superiors existeixen CDKs específiques per cada fase del cicle cel·lular. Com el seu propi nom indica, les CDKs són quinases que fosforilen altres proteïnes, i aquesta fosforilació pot activar o inhibir la funció de la proteïna diana, canviar-ne la localització subcel·lular o senyalitzar-ne la degradació (la naturalesa de les proteïnes diana és variada: des de factors transcripcionals a repressors passant per proteïnes G); com el nom continua indicant, la seva activitat quinasa i la tria dels substrats a fosforilar és depenent d'unes altres proteïnes, anomenades ciclines. Per tant quin tipus de ciclina hi ha en cada moment és el que determina la fase del cicle cel·lular (Figura 19A)¹⁷⁷. Els complexos CDK-ciclina no són actius per si sols, sinó que un cop formats cal que siguin activats per una altra quinasa (CAK, *CDK Activating Kinase*¹⁷⁸) en un residu específic (una treonina adjacent al centre actiu de la quinasa), però l'activitat de CAK no està regulada així que es pot considerar una modificació post-traducciona més i qui regula l'activitat de la CDK continua essent la ciclina unida; també existeixen altres quinases (Swe¹⁷⁹, Mih¹⁸⁰) que poden inhibir els complexos CDK-ciclina fosforilant en altres residus (propers al lloc d'unió d'ATP) per si cal interrompre el cicle per algun motiu en algun dels punts de control que existeixen al llarg del cicle cel·lular. Els complexos CDK-ciclina es degraden quan arriba el moment prèvia ubiquitinació per part d'una de les dos E3 lligases que participen en el cicle cel·lular: SCF i APC; en el punt 4.3 entrarem en més detalls del funcionament d'aquests enzims.

Les ciclines de llevat les podem dividir en dos grups: ciclines de G1 (Clns) i ciclines de tipus B (Clbs), que controlen els esdeveniments durant les fases S i M. Les Clns són degradades per complexos SCF^{Grr1/Cdc4}, mentre que les Clbs són degradades per APC^{Cdc20/Cdh1} (tot i que s'ha vist que Clb6 pot ser degradada per acció de SCF^{Cdc4}). El cycle comença amb una activitat CDK pràcticament nul·la i APC associat a Cdh1, per tal de mantenir nivells mínims de ciclines Clb. La ciclina que acompanya a Cdc28 al començar el cycle cel·lular és Cln3¹⁸¹ (ciclina de G1), que s'expressa constitutivament a nivells molt baixos i produeix una proteïna molt inestable. Per tant, aquesta ciclina és l'excepció pel que fa al fort control transcripcional d'aquesta família de proteïnes; per contra, el fet de produir una proteïna tan inestable permet ser un sensor molt eficient dels senyals extracel·lulars (ja que si hi ha problemes, es degradarà prevenint l'entrada al cycle cel·lular en condicions ambientals adverses). Posteriorment entrarem en més detalls, però quan els nivells nuclears de Cdc28-Cln3 són suficientment alts, aquest complex és capaç d'iniciar l'activació d'una onada transcripcional que inclou els gens de les ciclines Cln1 i Cln2 (ciclines de G1/S) en un cycle de retroalimentació positiu¹⁸². Paral·lelament s'activa la transcripció de ciclines de fase S (Clb5/6), tot i que llurs complexos amb Cdc28 són inhibits per Sic1^{183,184}. Ara bé, quan l'augment de l'activitat quinasa Cdc28 associada a Cln1/2 és prou alta per multifosforilar i degradar a Sic1¹⁸⁵, el complexos Cdc28-Clb5,6 esdevenen actius i s'inicien els processos de fase S (bàsicament la replicació el DNA). D'altra banda, Cdc28-Clb5,6 fosforila Cdh1^{186,187} del complex APC^{Cdh1}, inactivar-lo, el que permet l'acumulació de les ciclines de M (primer Clb3,4 i després Clb1/2¹⁸⁸) que condueixen el cycle cel·lular fins a la transició metafase-anafase; llavors s'activa APC^{Cdc20} per fosforilació de Cdc20¹⁸⁹ (quan l'activitat CDK-ciclina M és màxima), moment en el que es degraden les ciclines de M i cau l'activitat quinasa^{190,191} (Figura 19B), es

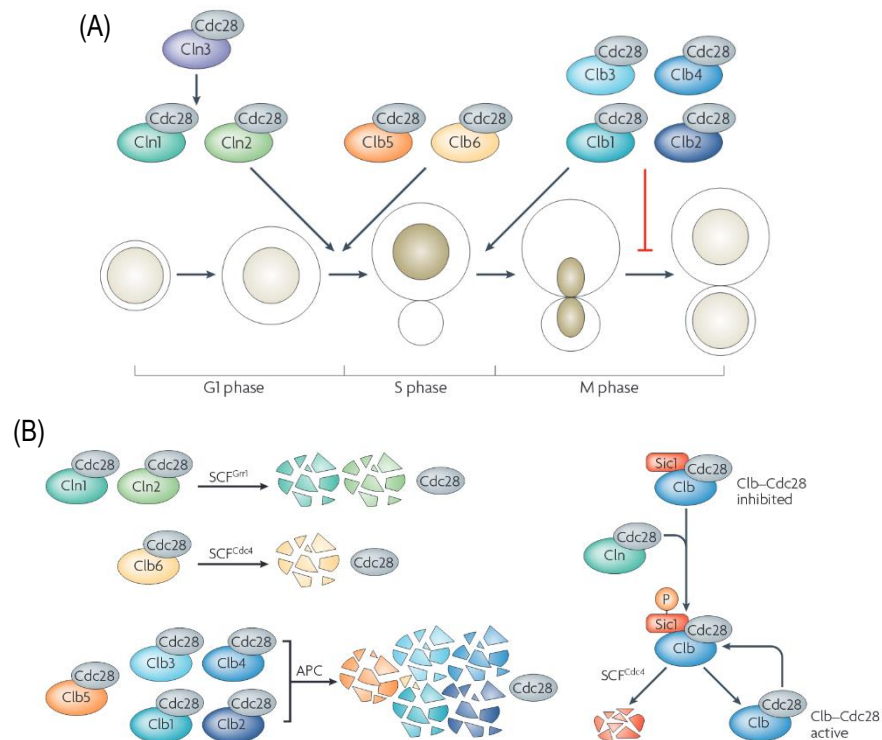


Figura 19¹⁷⁷:

(A) Cdc28 s'uneix a diferents ciclines depenent de la fase del cycle cel·lular: a començament de G1 només hi ha Cln3 (que no està regulada transcripcionalment), i aquesta activa la transcripció de Cln1/2 a final de G1; al seu torn aquestes fan que s'expressin Clb5,6, i així successivament fins que s'arriba a anafase amb Clb1/2.

(B) Un cop han fet la seva funció, les ciclines es degraden prèvia ubiquitinització per SCF (les Clns i Clb6) o APC (la resta de Clbs); Aquestes E3 lligases també s'encarreguen de degradar altres proteïnes que controlen el cycle, com per exemple l'inhibidor de Clbs Sic1 (que prèviament ha d'haver estat fosforilat per Clns).

reparteixen les cromàtides germanes entre les dues cèl·lules i es produeix la citocinesi. Al caure l'activitat quinasa, Cdc20 i Cdh1 es defosforilen i APC torna a associar-se amb Cdh1, tornant a la situació inicial donant per acabat el cicle cel·lular. Així, la direccionalitat i irreversibilitat del cicle cel·lular està basada en un principi simple: ha d'haver-hi la inactivació d'un inhibidor de la següent ciclina per part de la ciclina anterior, que és immune a l'inhibidor¹⁷⁷, i en la presència de bucles de retroalimentació positiva que assegurin la irreversibilitat del procés.

4.2. Control transcripcional del cicle cel·lular

Més d'un 10% del total dels gens de llevat estan controlats pels mecanismes de control del cicle cel·lular¹⁹². Aquests gens s'organitzen bàsicament en 3 blocs transcripcionals:

- **G1/S:** Aquests gens estan sota el control dels factors transcripcionals SBF (Swi4-Swi6)¹⁹³ i MBF (Mbp1-Swi6)¹⁹⁴, que estan reprimits per Whi5^{195,196}. Cdc28-Cln3 fosforila Whi5 (i Swi6), iniciant l'expressió de Cln1 i Cln2 (que estan sota promotors regulats per SBF), i aquestes al seu torn continuaran fosforilant Whi5, per activar la totalitat dels promotors regulats per SBF i MBF (uns 300 gens en total) i fer la transició irreversible (bucle de retroalimentació positiva)¹⁸². Entre els gens controlats per MBF es troben Clb5 i Clb6¹⁹⁷, així com els gens de les histones i de síntesi de DNA per a la fase S.
- **G2/M:** Aquests gens estan sota el control dels factors transcripcionals Mcm1, Fkh2 i Ndd1 (complex SFF)¹⁹⁸ i expressen Clb2 entre altres gens necessaris per la progressió en mitosi (120 en total); Cdc28-Clb2 fosforila Fkh2, fet que millora la seva interacció amb Ndd1 i augmenta la transcripció d'aquest bloc de gens (un altra bucle de retroalimentació positiva), així com reprimir els promotors

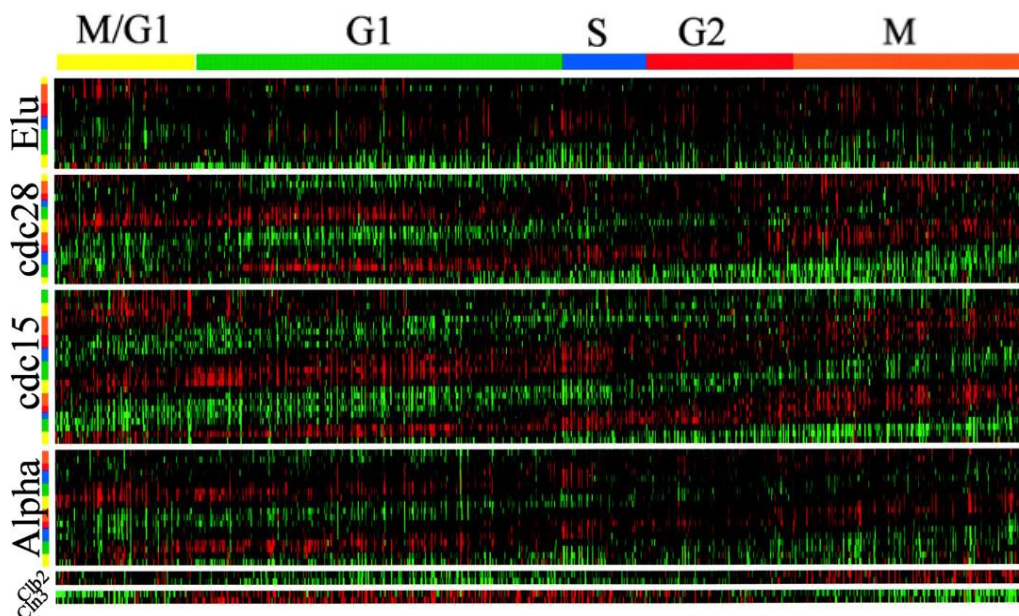


Figura 20¹⁹²:

Hitmap resum d'un dels treballs de transcriptòmica que es van fer sincronitzant les cèl·lules per diferents procediments: aturada en factor α (sincronització a final de G1), *cdc15* (sincronització en anafase), *cdc28* (sincronització abans de Start) i elutriació (sincronització a principi de G1, cèl·lules petites). Cada columna és un gen diferent, i estan ordenat segons el moment del cicle en que la seva expressió és màxima; el color roig vol dir que en aquell moment hi ha un pic d'expressió respecte al nivell de mRNA en un cultiu asincrònic, mentre que el color verd vol dir que els nivells són més baixos, i si és negre vol dir que els nivells no varien respecte del control asincrònic. En cada bloc, mirant de dalt cap a baix, hi ha dades d'aquell gen fent servir aquella sincronització a diferents temps (cada 15min) des de que s'alliberen les cèl·lules de la condició sincronitzadora. S'aprecia clarament que els nivells de mRNA oscil·len al llarg del temps, havent-hi representat en cada un dels bloc gairebé dos cicles cel·lulars complets.

SBF. Un dels altres gens sota el control d'aquests promotors és Cdc20¹⁹⁹, i la proteïna resultant, al fosforilar-se, s'unirà a APC i, un cop alineats tots els cromosomes replicats en metafase, destruirà la major part de l'activitat quinasa^{189,190}. També s'expressen Ace2²⁰⁰ i Swi5²⁰¹, que són els factors transcripcionals necessaris per activar el següent bloc de gens, així com Whi5^{202,203} (el principal inhibidor dels promotors SBF/MBF).

- **M/G1:** Com ja s'ha dit, aquests gens estan sota el control d'Ace2 i Swi5 (uns 110 gens). Aquests factors transcripcionals estan inhibits per fosforilació, així que no s'activen fins que APC^{Cdc20} destrueix les Clbs i Cdc14 desfosforila a Cdh1 i als mateixos factors transcripcionals per activar-los²⁰⁴. Entre els gens expressats en aquest bloc hi ha Sic1²⁰⁵ (que al seu torn fa un altre bucle de retroalimentació positiva sobre aquests promotors, ja que Sic1 inhibeix l'activitat CDK-Clb que hagi sobreviscut a la degradació d'APC). D'aquesta manera, es pot començar el següent G1 amb una activitat quinasa baixa, i només podrà començar a pujar gràcies a l'acció de les Clns (que són insensibles a Sic1²⁰⁶ i APC^{Cdh1}).

Existeixen diversos estudis de transcriptòmica on s'han quantificat els nivells de mRNA durant el cicle cel·lular^{192,207}, i en la Figura 20 s'hi mostra un exemple. També existeixen bases de dades que s'han fet a partir d'aquests resultats, on s'hi pot consultar el nivell de mRNA de qualsevol gen al llarg del cicle²⁰⁸.

4.3. Mecanismes de degradació de proteïnes durant el cicle cel·lular

Tant important com és transcriure en el moment adient els gens necessaris per a les següents fases del cicle cel·lular, ho és degradar allò que ja ha fet la seva funció, començant per les mateixes ciclines. Per això existeixen dos complexos proteics encarregats d'ubiquitinitzar específicament aquelles proteïnes que s'ha de degradar durant el cicle cel·lular: SCF i APC (Figura 21)¹⁷⁵.

SCF (Skp, Cullin, F-box)²⁰⁹ pertany a la família més nombrosa de ubiquitin-ligases i ubiquitenen un gran rang de substrats involucrats en cicle cel·lular. Consta de Skp1²¹⁰ que fa d'adaptador entre les altres subunitats, la cullina (Cdc53 en *S. cerevisiae*²¹¹) que recluta al enzim conjugat a ubiquitina Cdc34 (E2)²¹² per mitjà de la proteïna RING Hrt1²¹³, i una proteïna F-box que reconeix les proteïnes a ubiquitinar específicament i només quan els clients estan fosforilats (hi ha una gran varietat de proteïnes F-box). Per aquest mecanisme es degrada Cln3 (fent servir com a F-box a Grr1²¹⁴ i a Cdc4²¹⁵), Cln1 i Cln2 (amb Grr1 com a F-box²¹⁶) i Sic1 (amb Cdc4 com a F-box¹⁸⁵) sempre després de que aquestes proteïnes hagin estat fosforilades²¹⁷ (en el cas de les ciclines, per si mateixes), així com moltes altres proteïnes amb combinació amb les diferents F-box al llarg del cicle cel·lular (Far1²¹⁸, Swe1²¹⁹, Cdc6²²⁰, etc).

APC (*Anaphase-Promoting Complex*) regula la transició metafase/anafase i la sortida del cicle cel·lular degradant les ciclines tipus B i la securina^{190,191} (Pds1, que inhibeix la separasa -proteasa que trenca el complex cohesina prevenint la separació de les cromàtides germanes²²¹). APC és molt més gran que SCF (té 11-13 subunitats), però també té una cullina (en aquest cas Apc2) i una proteïna RING (Apc11)²²²; l'enzim conjugat a ubiquitina (E2) és Ubc4/5²²³. El punt clau en aquest enzim és la subunitat activadora, que pot ser Cdc20 o Cdh1²²⁴ (en meiosis n'hi ha una tercera, Ama1²²⁵, però es coneix poc). Cdc20 s'expressa a nivell de mRNA en el bloc de gens de G2/M, i només és actiu reconeixent clients si està fosforilat¹⁸⁹, així que no s'activa fins al moment d'anafase (quan l'activitat CDK-ciclina és màxima), i llavors es comencen a degradar ciclines B i la securina; ara bé, en degradar-se les ciclines i caure l'activitat quinasa, Cdc20 es desfosforila i desactiva, el que podria originar un sistema molt reversible i inestable. Per això hi ha Cdh1, que funciona precisament quan no està fosforilat de forma que pot continuar degradant

ciclins B i mantenir l'activitat quinasa baixa per a començar el següent cicle cel·lular¹⁸⁶. Durant G1, les Clns (que no són reconegudes com a clients per Cdh1) són les úniques ciclins que poden actuar i, en la transició G1/S, permetran Cdc28 de fosforilar a Cdh1 inactivant la funció d'APC i permetent l'acumulació de Clbs fins a la següent transició metafase/anafase. L'activació d'APC pot ésser inhibida si el fus mitòtic no està ben format o està mal orientat, activant-se el que coneixem com a SAC²²⁶ (*Spindle Assembly Checkpoint*) i inhibint la funció de Cdc20 fins que tots els cromosomes replicats estan correctament orientats en el fus mitòtic.; al següent punt entrarem en aquesta qüestió amb més detalls.

Els mecanismes de reconeixement de clients per part dels activadors d'APC no són totalment coneguts, però el que es sap és que les proteïnes diana han de tenir una D-box²²⁷ o una KEN-box²²⁸, és a dir una regió en la proteïna amb una estructura primària que correspongui a aquestes seqüències consensⁱⁱ.

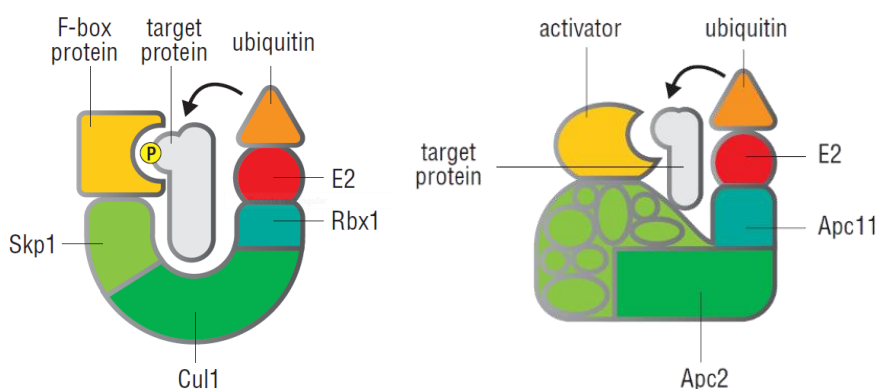


Figura 21¹⁷⁵:

Representació esquemàtica dels complexos E3 lligasa que controlen el cicle cel·lular. Ambdós comparteixen una base estructural (cullina, proteïna RING per unir la E2 i proteïnes adaptadores per a unir la proteïna que recluta als clients (F-box en SCF i proteïna activadora en APC), però es diferencien a nivell estructural en el nombre de proteïnes adaptadores entre cullina i proteïna reclutadora, així com en el fet que les F-box només reconeixen clients fosforilats. SCF funciona sempre i degrada un client o un altre en funció de la F-box que estigui carregada, mentre que APC només funciona des de anafase fins a començament de fase S en el següent cicle cel·lular (canviant de proteïna activadora un cop cau l'activitat quinasa després d'anafase).

4.4. Punts de control al llarg de la progressió del cicle cel·lular

Tal i com s'ha exposat fins ara, el cicle cel·lular és un procés complex amb relacions consecutives de causa-efecte que es van esdevenint des de l'inici fins el final del cicle. Però això no és ben bé així, i existeixen diversos punts de control on si el sistema detecta cap problema, el programa d'esdeveniments s'interromp fins donar-li solució. Els problemes poden venir de senyals extracel·lulars (falta de nutrients o presència de feromones sexuals) o intracel·lulars (problemes en el DNA, en el citoesquelet d'actina o en l'alineament dels cromosomes en metafase), i es controlen bàsicament en 3 punts de control (*checkpoints*) durant el cicle cel·lular (Figura 22)¹⁷⁵.

4.4.1. Start

En aquest *checkpoint* es decideix si s'expressa o no el conjunt de gens que donaran lloc a l'entrada al cicle cel·lular i a la replicació del DNA, i depèn tant de factors externs (en el cas del llevat, a que hi hagi disponibilitat de nutrients a l'entorn) com interns (l'assoliment d'una mida crítica). Els mecanismes

ⁱⁱ La seqüència consens per a la D-box (D per *Destruction*) és RXXLXXXXN, i la de la KEN-box és KENXXXN (el nom aquí ve dels 3 primers residus de la seqüència consens). Aquestes seqüències per si soles no són suficients per a induir la degradació per APC de les proteïnes que les contenen, però si que són necessàries ja que mutacions que alterin el consens eviten la degradació de la proteïna mutada.

moleculars que regulen el pas per Start en funció de factors interns es tractaran àmpliament en el següent apartat. Pel que fa als factors externs, tant l'absència de nutrients com la presència de feromones sexuals té com a resultat una inhibició de l'activitat Cdc28-Cln3, que impedirà la fosforilació de Whi5 i l'activació dels promotors sota SBF i MBF, pel que el cicle cel·lular restarà aturat fins que no hagi nutrients o es dilueixi la presència de feromona. La inhibició de l'activitat Cdc28-Cln3 per feromona és a través de Far1: la recepció de la feromona en la superfície cel·lular inicia una cascada de transducció de senyal que acaba fosforilant a Far1, el qual inhibeix directament a Cdc28; altres fosforilacions sobre Far1 fetes per la mateixa CDK promouen la degradació de Far1 per SCF, així que aquest esdevé un sistema biestable per un mecanisme de doble inhibició recíproca²²⁹; des del punt de vista biològic, és evident que si dues cèl·lules haploides s'han de fusionar per formar un zigot diploide, aquestes s'han d'assegurar que encara no han duplicat el seu material genètic (sinó, els zigots enloc de $2n$ podrien ser 3 o $4n$), i la manera de fer-ho és aturar el cicle en G1, abans que s'iniciï la duplicació del DNA. D'altra banda, la falta de nutrients (detectada per Tor i/o Ras-cAMP) provoca una aturada del cicle cel·lular en G1 a causa de la disminució dels nivells de Cln3, l'única ciclina que hi ha en aquesta fase, que té lloc per limitació de la seva síntesi així com per una desestabilització de la proteïna encara més ràpida del normal²³⁰. Altres mecanismes que ajuden a reprimir la activitat de Cln3 en resposta a factors externs inclouen el segrest del seu mRNA en grànuls d'estrès, mitjançant la proteïna YGR250c (resultats no publicats, i recollits en la tesi doctoral del Galal Yahya²³¹).

4.4.2. Checkpoint de dany al DNA

Durant fase S pot ser que s'hagin produït trencaments en el DNA o hagi forquetes de replicació bloquejades; qualsevol d'aquests fets produirà greus problemes d'inestabilitat genòmica a no ser que siguin reparats. Per això, si es detecta algun tipus de dany al DNA s'interromp el cicle cel·lular per a que els enzims implicats tinguin el temps necessari per a reparar i replicar el DNA. Els primers sensors d'aquest dany són les quinases Tel1^{232,233} i Mec1^{234,235}, que s'uneixen al complex que es forma al voltant de la zona del DNA on hi ha dany. Aquestes fosforilen a les quinases transductores Chk1 i Rad53²³⁶, que inhibeixen l'inici de la replicació dels orígens tardans, mantenen la integritat de les forquetes de replicació (impedint que es formin DSB - *Double Strand Breaks*) i indueixen la producció de grans quantitats de dNTPs (activant l'enzim RNR, *Ribonucleotide Reductase*, per mitjà de la fosforilació de Dun1^{237,238}), que són necessaris per a la reparació del DNA i suprimeixen la elongació del fus mitòtic²³⁹.

4.4.3. SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*)

Un cop duplicat i empaquetat, el DNA s'ha de repartir entre la cèl·lula mare i la cèl·lula filla; per assegurar que el repartiment es faci correctament, existeix aquest punt de control, on es comprova que tots els cromosomes estan units al fus mitòtic per mitjà de microtúbuls i els cinetocors de cada cromosoma, i que el propi fus mitòtic està ben orientat cap on està la gemma. Si algun cinetocor no està unit a microtúbuls s'activa el SAC on el principal efector és Mad2²²⁶, que pot estar en dues conformacions (oberta o tancada²⁴⁰); si hi ha algun cinetocor no unit a microtúbuls Mad2 és activat passant de la forma oberta a la tancada, la qual s'uneix a Cdc20 i l'inhibeix²⁴¹. Tant Mad2 unit al cinetocor (via Mad1) com unit a Cdc20 pot activar més Mad2 obert lliure, creant així un bucle positiu pel qual un sol cinetocor no unit a microtúbuls pot inactivar tot el Cdc20 de la cèl·lula²⁴². Al no haver-hi Cdc20 lliure, APC no pot destruir les ciclins mitòtiques i la securina, i l'anafase no es produeix. Aquesta resposta s'inactiva un cop que tots els cinetocors estan units a microtúbuls, ja que llavors la fisonomia dels cinetocors canvia i ja no s'hi uneix Mad1-Mad2 i no es produeix més Mad2 actiu. No es coneix bé el mecanisme, però ja que la caiguda és tan ràpida, la explicació més senzilla és que les formes de Mad2 unides a Cdc20 siguin molt inestables, i

un cop se'n atura la producció als cinetocors, ja no poden inhibir a Cdc20 i APC degrada les ciclines i la securina, permetent l'entrada en anafase i el final del cycle cel·lular.

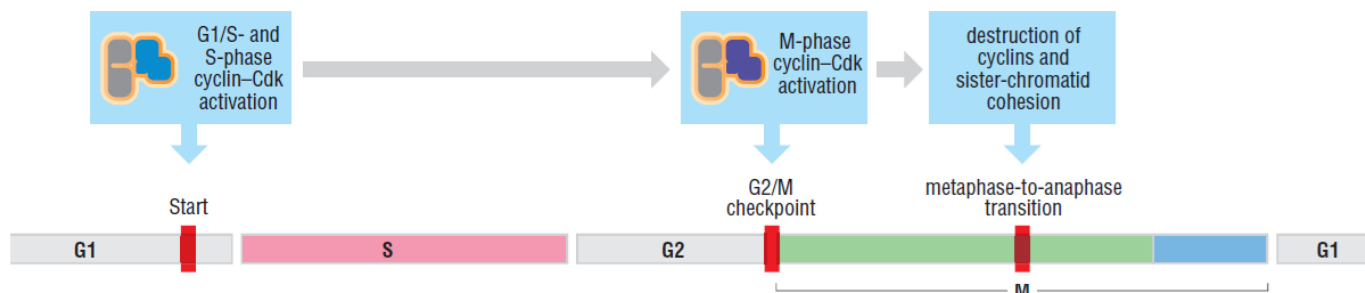


Figura 22¹⁷⁵:

Esquema del cycle cel·lular on s'hi marca amb roig els 3 punts de control del cycle cel·lular, així com la conseqüència de passar-los. Es troben abans de replicar el DNA (Start), durant/després de la replicació del DNA (*checkpoint* de dany al DNA) i en la transició entre metafase i anafase.

5. Mecanismes de control de l'entrada en cycle cel·lular durant G1

Durant G1, les cèl·lules han de créixer prou per a poder-se dividir, arribant al que coneixem com a mida crítica^{243,244}. Per donar temps a que això succeeixi, existeixen un seguit de mecanismes de retenció del complex CDK-ciclina que funciona durant G1 (Cdc28-Cln3), així com dos bucles de retroalimentació positiva que fan que el sistema sigui irreversible (Figura 23A). D'altra banda, com s'ha dit en l'apartat 4.4.1, la cèl·lula també s'assegura de que les condicions de l'ambient són adequades per a duplicar el DNA i dividir-se (abundància de nutrients i absència de feromones sexuals). Cada cèl·lula coordina la velocitat de creixement amb la mida crítica per assolir una millor adaptació i homeòstasi: així com més pobra és la font de carboni, les cèl·lules creixen més a poc a poc i la seva mida crítica és més petita (Figura 23B)²⁴⁵.

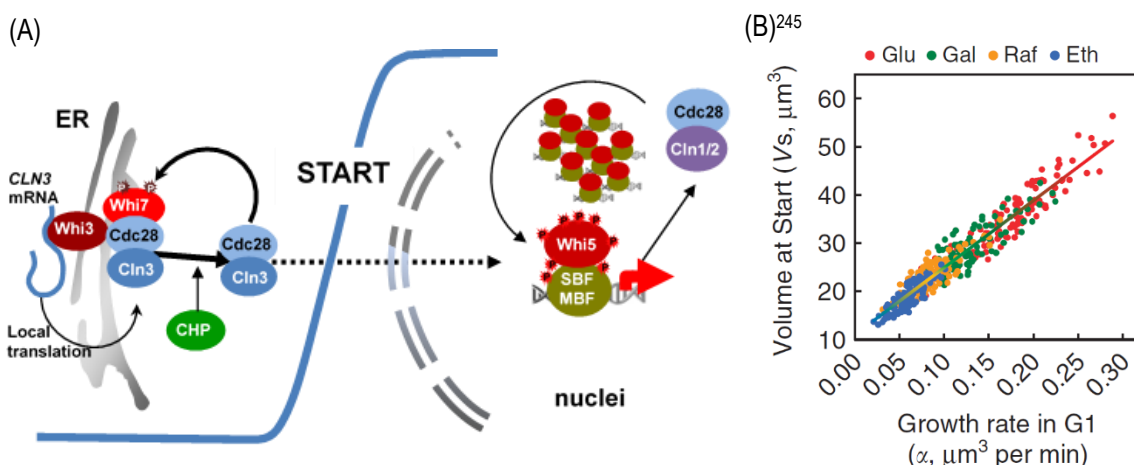


Figura 23:

(A) Esquema general de tots els mecanismes de retenció i d'activació coneguts durant G1, que funcionant coordinadament permeten a la cèl·lula posposar la replicació del DNA fins que no es compleixin un seguit de requeriments, i que un cop es compleixin, la transició sigui ràpida, robusta i irreversible.

(B) La cèl·lula coordina la seva velocitat de creixement intrínseca amb la determinació de la mida crítica (quan decideix que ja pot començar a reproduir-se) en funció de les condicions de creixement; per exemple, amb fonts d'energia pobres com l'etanol, la cèl·lula creix més lentament i la seva mida crítica és més petita, mentre que amb una font d'energia rica com la glucosa, creix molt més de pressa i la seva mida de Start augmenta en proporció al que ho fa la velocitat de creixement en aquest medi.

5.1. Síntesi de Cln3 i retenció de complexos Cdc28-Cln3 per part de Whi3

En la seqüència primària de Cln3 hi trobem un NLS (*Nuclear Localization Signal*) en la part C-terminal²⁴⁶, i s'assumeix que Start succeeix tan bon punt s'assoleix cert nivell de Cdc28-Cln3 dins el nucli capaç de fosforilar Whi5 i activar els gens sota el control de MBF i SBF. El gen *WHI3* es va identificar pel seu efecte negatiu sobre la funció de Cln3²⁴⁷, i es va descobrir que realment aquest efecte es feia mitjançant dos mecanismes: d'una banda, Whi3 s'uneix al mRNA de *CLN3*²⁴⁸, i d'altra banda interacciona físicament (tot i que de manera indirecta) amb la quinasa Cdc28²⁴⁹. Així, Whi3 evita que els complexos Cdc28-Cln3 s'acumulin en excés al nucli, probablement en compartimentar la síntesi de Cln3 en un entorn molecular concret i retenir el complexos formats amb Cdc28 (Figura 24A). Posteriorment, quan la cèl·lula ja és prou gran, aquests complexos s'han d'alliberar per a ser importats al nucli, però això ho veurem després. Els mutants *whi3* no tenen aquest mecanisme de retenció del complex CDK-ciclina, i per tant les cèl·lules passen per Start abans d'hora i amb una mida més petita de la que els pertocaria per la seva velocitat de creixement (que no es veu afectada per la mutació), tal i com s'aprecia en la Figura 24B, encara que es conserva cert grau de coordinació entre ambdós fenòmens²⁴⁵.

Whi3 és una proteïna que conte diversos IDD, i s'ha vist que la seva agregació i segregació asimètrica envers la cèl·lula mare pot ser un mecanisme de memòria a nivell molecular en resposta a la exposició a la feromona sexual sense que finalment hi hagi aparellament; d'aquesta manera després d'aquesta primera exposició 'fallida' a feromona, les cèl·lules que contenen aquest agregat de Whi3 són insensibles a una segona exposició a feromona a causa d'una pèrdua de funció de l'inhibidor de Cln3 tal que aquestes cèl·lules escapen a l'aturada en G1 que normalment causa la exposició a feromona; aquest tipus de comportament podria ser extensiu a altres proteïnes amb aquesta propietat d'agregar i retenir memòria molecular en resposta a un estímul extern, que han estat anomenats "mnemons"²⁵⁰.

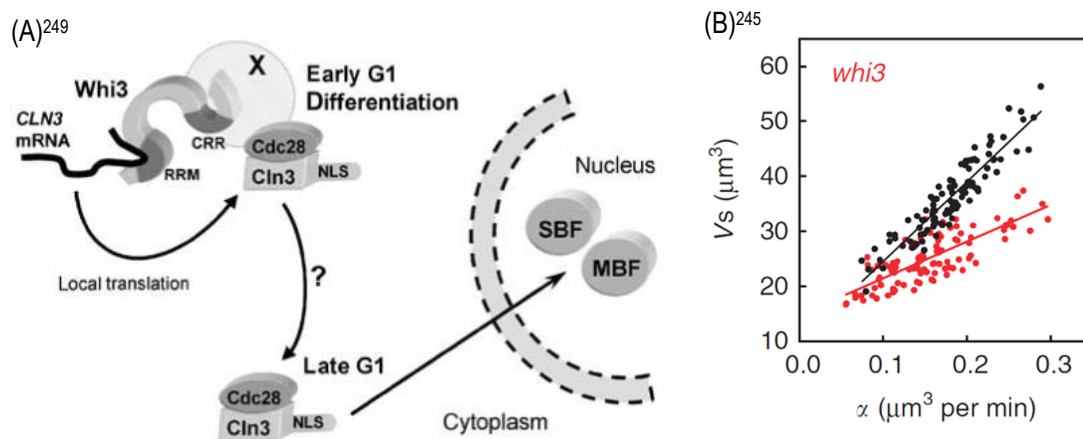


Figura 24:

(A) Mecanisme de compartimentació en la síntesi dels complexos Cdc-28-Cln3, on Whi3 interacciona amb el mRNA de *CLN3* mitjançant el domini RRM, mentre que alhora interacciona indirectament amb Cdc28, retenint el complex de que se'n vagi al nucli al començament de G1, i permetent la formació dels complexos en l'entorn adequat.

(B) Si no existeix el mecanisme de retenció esmentat, els complexos van cap al nucli abans d'hora i activen Start quan les cèl·lules encara no són prou grans per a fer-ho tenint en compte la seva velocitat de creixement intrínseca.

5.2. Paper de les xaperones Ssa1/2 i Ydj1 en l'alliberament de Cln3 del reticle endoplasmàtic

Més endavant es va descobrir que l'entorn concret on es retenien tant la quinasa Cdc28 com l'mRNA de Cln3 durant G1 era al reticle endoplasmàtic²⁵¹. També es va descobrir que la seqüència de Cln3 conté un domini J inhibidorⁱⁱⁱ, que bloqueja el cycle conformacional de les Hsp70 (Ssa1/2) mantenint-se juntament amb Cdc28 unides al reticle durant G1²⁵². Així, Ydj1 competiria amb Cln3 pel lloc d'interacció de Ssa1/2 amb el domini J (que en el cas de Ydj1 és un domini activador clàssic), tornant a activar el cycle conformacional de les Hsp70 per tal de permetre l'alliberament del complex Cdc28-Cln3 del reticle i la seva acumulació nuclear (Figura 25A). Els mutants per aquesta xaperona, a més d'assolir la mida crítica a volums molt més grans que les cèl·lules salvatges, perden totalment la coordinació entre la seva velocitat de creixement i la determinació d'aquesta mida crítica (Figura 25B); això ens indica que aquesta xaperona pot ser un actor clau en la coordinació entre proliferació i creixement²⁴⁵.

Els mutants de Cln3 que no poden unir-se a Cdc28 (*CBΔh5*, mutant en la caixa ciclina) o que han perdut el domini J; mostren una acumulació anormal al nucli, suggerint que la retenció al reticle s'exerceix mitjançant la CDK i necessita el bloqueig del cycle conformacional de la Hsp70²⁵¹. També es va observar que els nivells de Ydj1 eren limitants en aquest procés, ja que superexpressant aquesta xaperona (juntament amb Ssa1), s'incrementen els nivells de Cln3 al nucli i en conseqüència s'avança Start en un primer cycle.

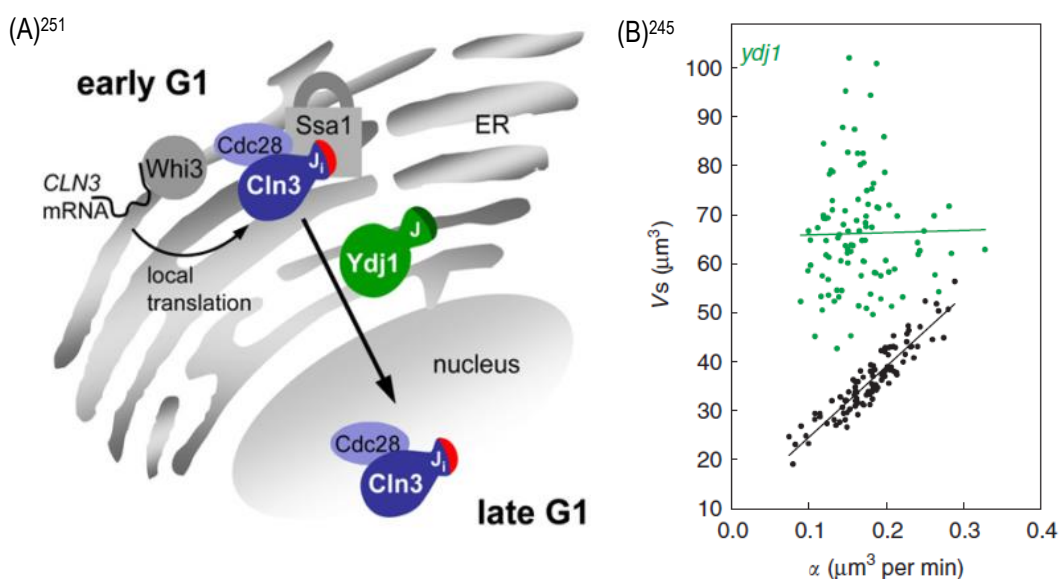


Figura 25:

(A) Al principi de G1, el domini J_i de Cln3 inhibeix la hidròlisi d'ATP per part de les Hsp70, mantenint el complex bloquejat en el reticle endoplasmàtic. Cap al final de G1, Ydj1 (que és limitant) pot interaccionar amb les Hsp70 amb el seu domini J enlloc de Cln3, activant-les i permetent l'alliberament dels complexos Cdc28-Cln3 del reticle, i anar al nucli gràcies al NLS que té Cln3.

(B) En el mutant per aquesta xaperona Ydj1, es perd totalment la coordinació entre velocitat de creixement i determinació de la mida crítica, indicant que aquesta proteïna té un paper clau en l'esmentada coordinació.

ⁱⁱⁱ Els dominis J normalment es troben en les xaperones Hsp40; consten d'un 70 aminoàcids i interaccionen amb Hsp70, estímulant la seva activitat ATPasa³⁴⁰; en el cas de Cln3, el domini que té és un J_i, és a dir que mentre està unit inhibeix l'activitat ATPasa de Hsp70.

5.3. Retenció de Cdc28 en el reticle endoplasmàtic per part de Whi7²⁵³

Tot i el paper inhibitor de Whi3 en el mecanisme de retenció del complex Cdc28-Cln3 en el reticle endoplasmàtic durant G1, els mutants *whi3* encara tenen clarament una fase G1 (tot i que més curta del normal), així que hi ha d'haver altres components del mecanisme de retenció del complex CDK-ciclina durant G1. Per això es va generar una col·lecció de mutants de Cdc28 i es varen seleccionar aquells que fossin propensos a escapar a aquesta retenció (els mutants aïllats tenien una mida crítica més petita). Així es van identificar 5 mutacions en el lòbul C-terminal de Cdc28, en residus bàsics exposats a la superfície que podrien ser llocs d'interacció amb altres proteïnes del mecanisme de retenció de Cdc28. L'anàlisi de l'interactoma de Cdc28 comparant-lo amb una variant que contenia les 5 mutacions identificades va permetre la identificació de Srl3 (una proteïna fins llavors amb funció desconeguda i que s'havia aïllat com a un supressor de la letalitat en mutants *rad53*), que es va rebatejar com Whi7 (ja que el mutant per aquest gen mostra un fenotip de mida petita); analitzant la seqüència es va concloure que Whi7 és un paràleg de Whi5, amb dianes de fosforilació conservades per a complexos CDK-ciclina, però sense NLS. Es va observar que la fosforilació de Whi7 facilita l'alliberament de complexos Cdc28-Cln3 del reticle, i que aquest alliberament permet la fosforilació de més molècules de Whi7, generant un bucle de retroalimentació positiu en el citoplasma que fa que aquesta transició sigui robusta quan arribi el moment, i Cln3 pugui acumular-se al nucli per fosforilar Whi5 i activar Start (Figura 26).

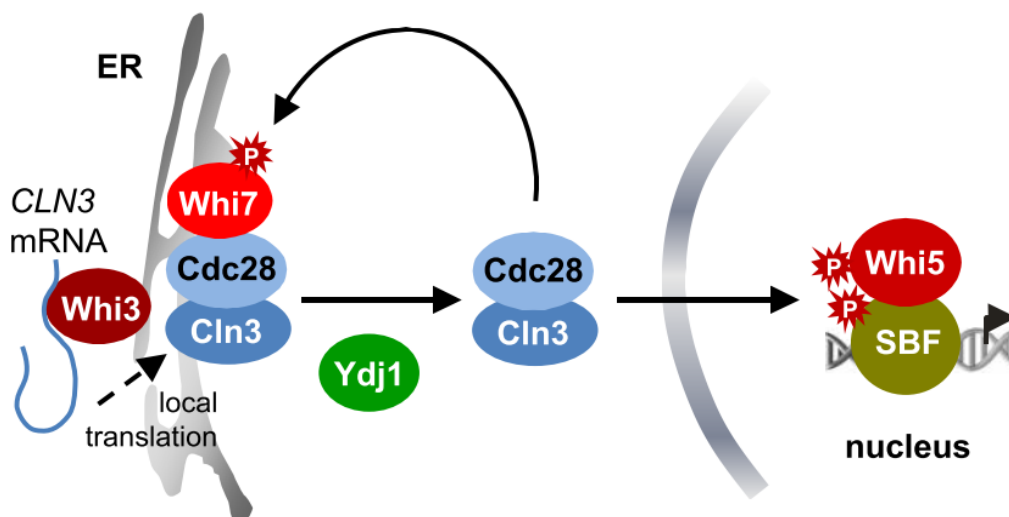


Figura 26²⁵³:

Cln3 actua en un bucle de retroalimentació positiu sobre el seu propi alliberament del reticle endoplasmàtic. Aquest depèn de l'activitat quinasa de Cdc28, i no es produeixen la variant no fosforilable de Whi7, el que indica que per a l'establiment d'aquest bucle calen tots 3 elements.

5.4. Fosforilació de Whi5 i activació de les ciclines Cln1/2

Un cop el complex Cdc28-Cln3 entra al nucli, es fosforila Whi5 inactivant-ne la seva funció com a inhibidor dels factors transcripcionals SBF i MBF; Cdc28-Cln3 principalment fosforila Whi5 sobre els promotors SBF, induint ràpidament l'expressió de les ciclines Cln1 i Cln2 en un segon bucle de retroalimentació positiva¹⁸², ara al nucli. A més d'activar completament els promotors SBF i MBF per fosforilació de Whi5, Cln2 també fosforila substrats que indueixen la formació de la gemma²⁵⁴ i l'inici del creixement polaritzat per tal que aquesta creixi (Figura 27A²⁵⁵). Al ésser fosforilat, Whi5 s'exporta des del nucli cap al citoplasma, alliberant els factors transcripcionals als que normalment està unit. Aprofitant aquest fet, fent servir un al·lel de Whi5 fusionat a GFP podem determinar en quin compartiment cel·lular es troba. Definim com a Start el moment

en que s'exporta Whi5 del nucli, i l'inici del següent període G1 es produeix quan Whi5 torna a entrar-hi (Figura 27B²⁵⁶). Whi5 es produeix durant G2/M en l'anterior cicle cel·lular, i un cop neix la nova cèl·lula i entra al nucli, es dilueix progressivament a mesura que la cèl·lula creix²⁰². D'aquesta manera, en funció de quant Whi5 s'ha pogut produir en el cicle anterior, a la cèl·lula li caldrà créixer més o menys per diluir Whi5 i inactivar la seva funció, juntament amb la integració de la senyal de fosforilació per part de Cdc28-Cln3 que es va produint durant G1²⁵⁷.

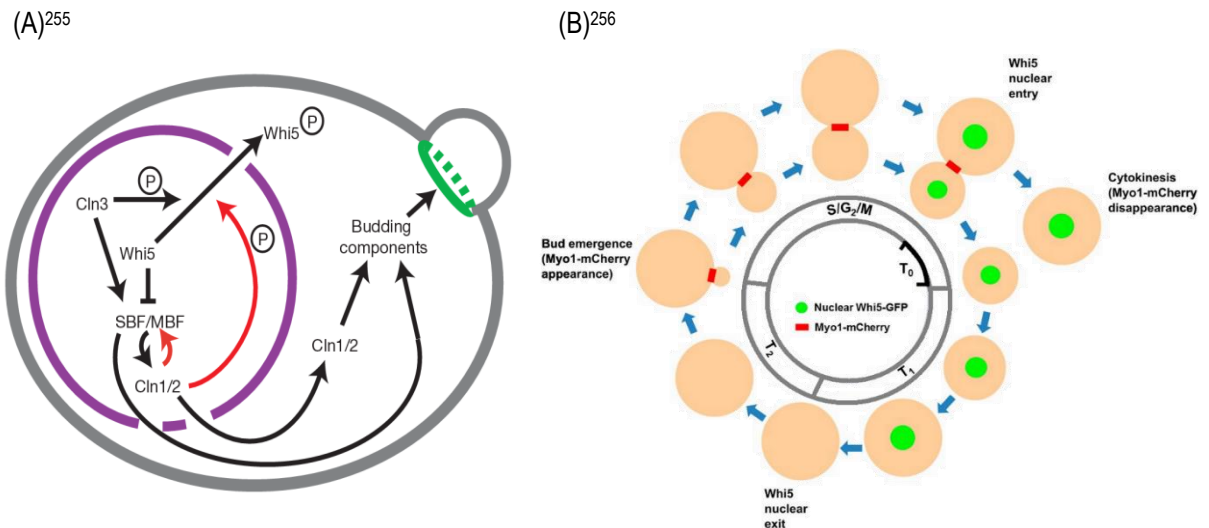


Figura 27:

(A) Cln3 fosforila parcialment a Whi5, activant promotors sota SBF i MBF i produint Cln1/2, que continuaran fosforilant Whi5 (i fent que s'exporti al citoplasma) i activant totalment el reguló de G1/S, així com fosforilant altres substrats al citoplasma que propiciaran la formació de la gemma.

(B) Per mitjà de fusions a GFP de Whi5 podem saber si una cèl·lula està en G1 o en una altra fase del cicle cel·lular, així com per mitjà de Myo1 podem veure l'anell contràctil d'actina que es forma al voltant del coll de la gemma; quan Whi5 torna a entrar al nucli podem dir que les dues cèl·lules ja tornen a estar molecularment en G1, tot i que fins que Myo1 no desapareix, encara no s'ha produït la citocinesi i les cèl·lules encara estan unides.

5.5. Disponibilitat de xaperones com a connector entre la velocitat de creixement i l'activació del cicle cel·lular

Anteriorment s'ha esmentat que per alliberar el complex Cdc28-Cln3 del reticle cal Ydj1 per activar les Hsp70 (que estan inhibides pel domini J_i de Cln3), i també que aquesta xaperona és limitant en aquest procés. Si fem una ullada als nivells totals d'aquestes proteïnes veiem que l'abundància de Cln3 és 4 ordres de magnitud menor que la de Ydj1^{258–260}, pel que sembla contraintuïtiu que Ydj1 sigui limitant; ara bé, Ydj1 està involucrada en multitud de processos de plegament de proteïnes en tota la cèl·lula, i la competició per les xaperones entre totes les demés proteïnes client i Cln3 podria ser un mecanisme per a subordinar l'entrada de la cèl·lula en cicle a la seva velocitat de biosíntesi, explicant així la coordinació entre velocitat de creixement i la determinació de la mida crítica per a la cèl·lula.

Seguint aquest model (esquematzat en la Figura 28A) i traduint-lo a equacions diferencials, trobem que quan la cèl·lula és prou gran es produeix un excés de xaperona Ydj1 lliure que pot llavors anar a plegar i alliberar els complexos Cdc28-Cln3 (que aniran al nucli a fosforilar Whi5 i activar el reguló de G1/S); això juntament amb la observació experimental de que la disponibilitat de xaperones és inversament proporcional a la velocitat de creixement (dades encara no publicades²⁶¹), porta al model a predir que si la velocitat de creixement és menor, la concentració de Cln3 plegada i activa serà major que si la cèl·lula

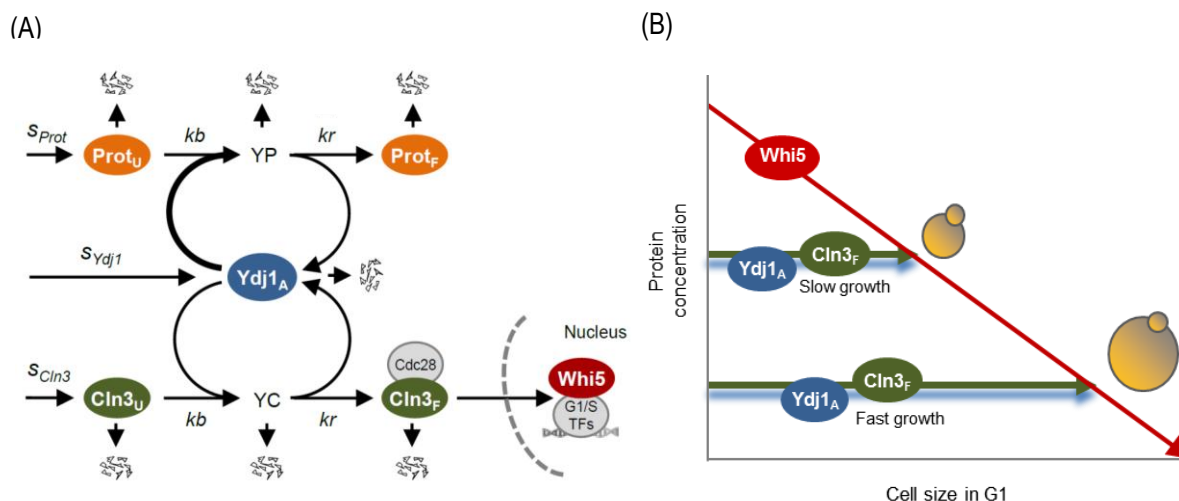


Figura 28²⁶¹:

(A) En el model de competició molecular, hem de tenir en compte les velocitats de síntesi de cada element (s_x) i les constants d'unió (kb) i alliberament (kr) de Ydj1 amb els seus clients (les formes unides es representen per YP i YC per a les proteïnes en general i per a Cln3, respectivament); l'element clau en aquesta xarxa és la quantitat de Ydj1 disponible (Ydj1_A), que quan és prou gran provoca la pujada de Cdc20-Cln3_F per activar Start.

(B) Cèl·lules que creixen poc a poc tenen un nivell de xaperones disponibles és més alt, així com els complexos Cdc28-Cln3 actius, i no cal que Whi5 es dilueixi tant per a que la cèl·lula passi Start; en canvi cèl·lules que creixen més de pressa tenen uns requeriments de xaperones majors i n'hi ha menys de disponible, pel que la cèl·lula ha de créixer més per diluir prou Whi5 per passar Start.

creix més de pressa. Així, la determinació de la mida crítica vindria donada pel creuament de la dilució de l'inhibidor Whi5²⁰² amb la concentració de l'activador Cln3, i d'aquesta manera expliquem la observació experimental de que les cèl·lules que creixen més de pressa assoleixen la mida crítica a un volum major que les que creixen més lentament (Figura 28B). Per tant, mentre Whi5 actuaria com un "mesurador" de la mida cel·lular²⁰², les xaperones transmetrien dinàmicament informacions intrínseques i extrínseques per modular l'activació de Cdc28-Cln3 i ajustar la mida crítica en funció de la velocitat de creixement a nivell de cèl·lula única.

5.6. Alteracions conegudes en el cicle cel·lular durant l'envelliment

Mitjançant cambres de microfluídica s'ha pogut seguir sota el microscopi el procés d'envelliment complet de les cèl·lules mare del llevat de gemmació, així com caracteritzar-ne alguns aspectes relacionats amb el cicle cel·lular; el més destacat és que s'ha observat que el temps d'interdivisió, que es manté constant durant gairebé tota la vida de la cèl·lula, augmenta sobtadament en les darreres divisions (Figura 29A). El moment en que aquest augment sobtat es produeix es coneix com a SEP (*Senescence Entry Point*), i pel que es sap aquest canvi de comportament no té res a veure amb la pèrdua de potencial mitocondrial²⁶², pel que encara no està clar què ho causa. Jugant amb soques mutants per a proteïnes que controlen el cicle cel·lular i mesurant el RLS de les cèl·lules mare per dissecció manual de les cèl·lules filles en una placa, s'ha vist que mutants en proteïnes activadores del cicle (ciclins), la mida crítica de les quals és major, tenen un RLS més curt; d'altra banda mutants en proteïnes inhibidores del cicle (Whi5 per exemple), la mida crítica de les quals és menor, tenen un RLS més llarg²⁶³. També es va observar que les cèl·lules salvatges que creixien més ràpidament tenien un RLS més curt, i mutants en proteïnes ribosomals que fan que la velocitat de creixement disminueixi, tenen un RLS major (Figura 29B). Aquest conjunt d'observacions van conduir als autors d'aquell treball a proposar un model d'envelliment on la cèl·lula mor quan arriba a un volum determinat (que podríem dir "volum crític de mort") així que una cèl·lula que és més

petita i/o creix més lentament podrà fer un nombre de divisions major que una que és més gran i/o creix més de pressa abans de que arribi al volum de mort (Figura 29C).

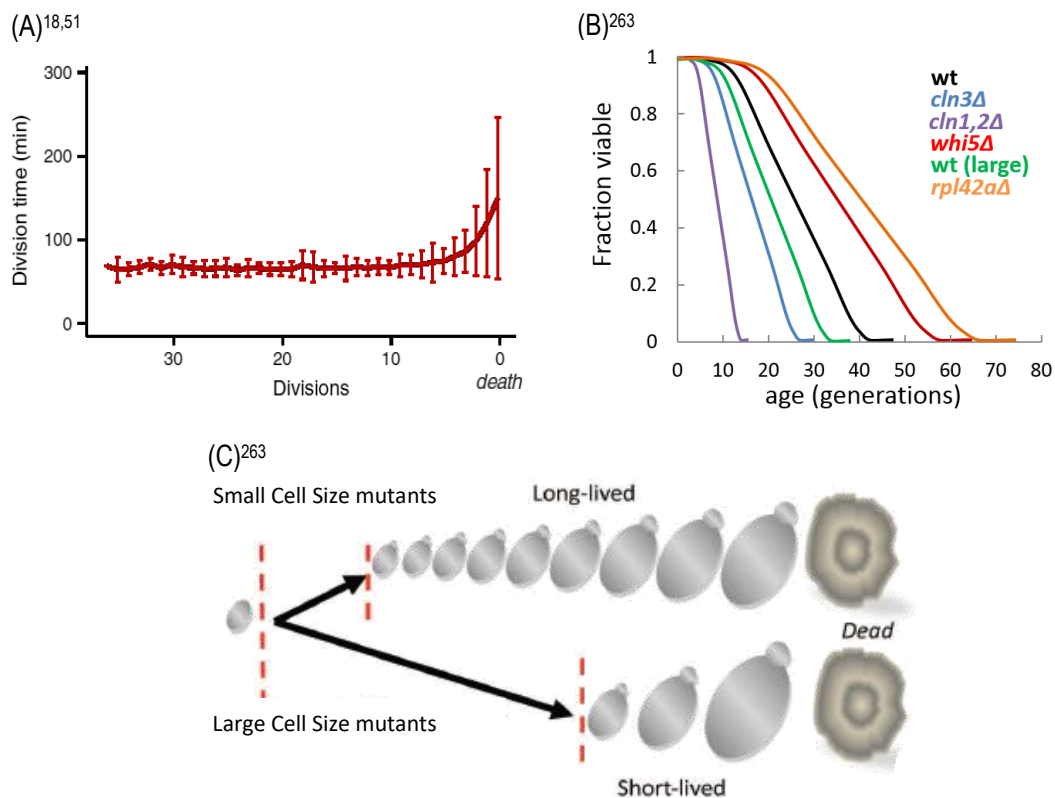


Figura 29:

(A) El temps d'interdivisió augmenta cap al final de la vida, però ja que cada cèl·lula fa un nombre diferent de divisions, això només ho veiem si les alineem totes en el moment de la mort.

(B) Soques amb mida de cèl·lula petita tenen un RLS més llarg, mentre que soques amb mida de cèl·lula gran tenen un RLS més curt, tant si la diferència de mida ve donada per la velocitat de creixement com per afectar elements que controlen el pas per Start de les cèl·lules.

(C) A partir d'aquests resultats es proposa com a model que hi ha una 'mida de mort', i com més gran s'és o més ràpid es creix abans s'hi arriba, i viceversa.

6. Hipòtesi de treball: Agregats proteotòxics acumulats durant l'envelliment com a inhibidors de l'entrada en cicle cel·lular per segrest de l'activitat xaperona

D'una banda sabem que les cèl·lules mare de llevat, durant el seu envelliment, acumulen dipòsits de proteïnes mal plegades i eviten que aquests passin a les filles per diversos mecanismes de repartiment asimètric, i que en aquests dipòsits s'hi localitzen xaperones; d'altra banda hem explicat la importància de les xaperones per a l'execució de Start, que són un factor limitant en aquest procés i que la seva disponibilitat depèn de la velocitat de creixement de la cèl·lula; finalment també hem vist que les cèl·lules comencen a tenir problemes en mantenir el temps d'interdivisió en els darrers cicles cel·lulars de la cèl·lula, i que mutants sense l'inhibidor de cicle Whi5 poden produir més cèl·lules filles que una cèl·lula salvatge, i que també ho fan cèl·lules que creixen més lentament (i que per tant tindran una disponibilitat de xaperones major).

Així, com a hipòtesi de treball, vàrem proposar que les cèl·lules aturarien llur proliferació a través d'un mecanisme on els agregats proteotòxics acumulats al llarg de l'envelliment segrestarien tota l'activitat xaperona que la cèl·lula posseeix, actuant així com un mecanisme inhibidor per a l'entrada en cicle cel·lular, causant la senescència i la mort replicativa de la cèl·lula (Figura 30). Durant l'elaboració d'aquesta

tesi doctoral, hem observat que l'expressió d'un domini prònic sintètic causa un retard en l'execució de Start en cèl·lules joves, així com una disminució en el RLS quan aquestes envelleixen; també hem vist que la disponibilitat de xaperones disminueix tant en cèl·lules joves expressant el domini prònic com en cèl·lules sota el procés d'envelliment normal, i que les cèl·lules en les seves últimes generacions mostren un retard notable en la fase G1, que és la fase del cicle on preferentment moren (tot i que en termes de temps, és la fase més curta en el cicle de les cèl·lules mare durant la major part de la seva vida²⁶⁴). Totes aquestes evidències donen suport a la nostra hipòtesi, i constitueixen una important contribució als mecanismes moleculars que condueixen a l'envelliment cel·lular.

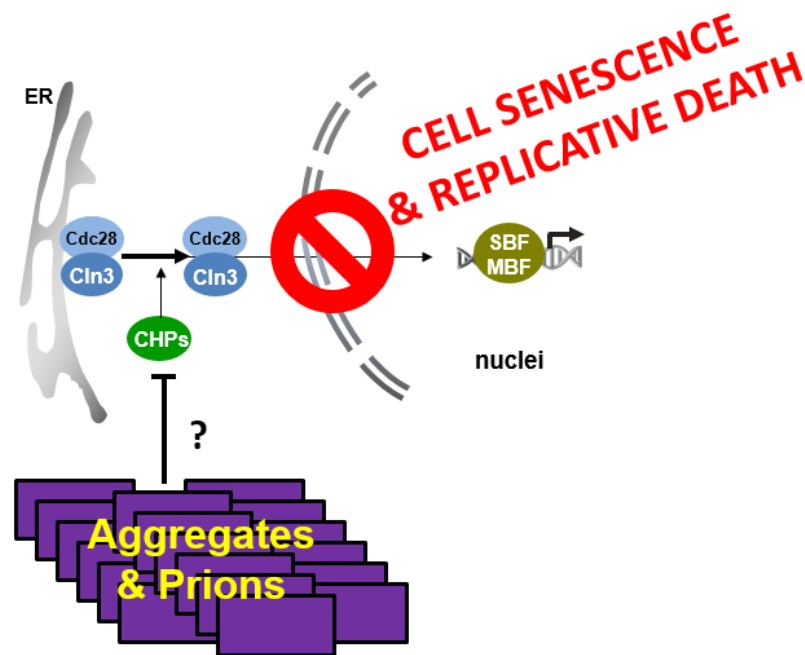


Figura 30:

Model simplificat de la xarxa de pas per Start on s'hi indica que les xaperones podrien ser la connexió entre l'acumulació de dipòsits proteics i prions durant l'envelliment i la senescència i mort replicativa de la cèl·lula, actuant els agregats proteotòxics com un inhibidor competitiu per les xaperones en contra de l'alliberament de complexos Cdc28-Cln3 del reticle cap al nucli per passar Start.

II. Objectius

Aquesta tesi se centra en l'estudi de les alteracions de la progressió del cicle cel·lular causades per dipòsits proteotòxics -especialment per prions que formen agregats amiloides- que s'acumulen majoritàriament en les cèl·lules mare durant l'envelliment, així com els efectes que causa l'acumulació d'aquests dipòsits sobre la dinàmica de xaperones en cèl·lules envellides i en la durada de vida replicativa en el llevat de gemmació *S. cerevisiae*. Més específicament, els objectius consisteixen en:

- Caracteritzar els efectes d'agregats prionics en l'entrada al cicle cel·lular i el seu efecte sobre xaperones clau de l'execució de Start en cèl·lules mare joves.
- Estudiar l'efecte dels agregats en el RLS dels llevats i en la progressió del cicle cel·lular en cèl·lules mare envellides.
- Analitzar les alteracions de l'activitat xaperona i l'entrada en el cicle cel·lular durant el procés d'envelliment.
- Testar l'efecte de la superexpressió de xaperones i d'activadors del cicle cel·lular sobre la llargada del RLS.
- Demostrar que l'acumulació d'agregats proteotòxics causa afectacions importants en l'entrada del cicle cel·lular a través de la reducció de disponibilitat de xaperones, conduint la cèl·lula a la senescència replicativa.

III. Metodologia

1. Condicions de cultiu i medis utilitzats

Per norma general, els llevats s'han crescut en incubadors a 30°C, amb una agitació de 180-200rpm en el cas dels cultius líquids. En el cas dels bacteris, normalment s'han crescut a 37°C, tot i que si es creixen a 30°C per segons què no passa res. Els medis de cultiu s'han preparat segons l'indicat en els manuals²⁶⁵ a partir dels components en forma seca:

YP: Medi ric per al creixement rutinari de llevats per metabolisme fermentatiu. Conté un 2% de peptona (Pronadisa) i un 1% d'extracte de llevat (Pronadisa). Podem triar com a de font de carboni glucosa (Sigma), rafinosa (Sigma) o galactosa (Sigma), al 2%, essent llavors YPD, YPRaf o YPGal. Pot portar G418 (Duchefa), clonNAT (Werner BioAgents) o HigromicinaB (Sigma) com a agents seleccionadors a una concentració de 200µg/ml (300µg/ml en el cas de la HigromicinaB).

SC: Medi complet i sintètic per al creixement selectiu de llevats. Conté un 0.67% de *Yeast Nitrogen Base* amb sulfat d'amoni i sense aminoàcids (YNB, Difco) i un 0.06% d'una mescla de bases nitrogenades i aminoàcids excepte aquells pels quals haguem de seleccionar (CSM, MP Biomedicals). Podem triar com a de font de carboni glucosa (Sigma), rafinosa (Sigma) o galactosa (Sigma), al 2%, essent llavors SCD, SCRAf o SCGal.

LB: Medi per al creixement de bacteris. Conté un 1% de triptona (Pronadisa), 1% de NaCl (Sigma) i 0.5% d'extracte de llevat (Pronadisa), ajustat amb NaOH a pH 7.5. L'ampicil·lina (Sigma) per seleccionar soques portadores de plasmidi està a una concentració de 25µg/ml.

Els components es pesen, s'afegeix l'aigua miliQ que correspongui i s'esterilitzen per autoclau a 121°C durant 15min. Per activar el programa genètic MEP, s'afegeix β -Estradiol (Sigma) a 2µM. Els medis sòlids contenen a més un 2% d'agar (Pronadisa), i quan encara és calent i líquid s'aboca uns 20ml en plaques bacteriològiques de 100mm (per l'anàlisi de microcolònies amb soques MEP, ho fem en plaques de 35mm, plenes amb uns 6ml de medi). Alguns components sensibles, com els antibiòtics i l'estradiol, s'afegeixen després de l'esterilització quan els medis estan a uns 60°C.

2. Manipulació genètica de llevats

2.1. PCR per a l'obtenció de cassets integratius

Per tal d'afegir un epítip, canviar el promotor o delecionar gens de llevat, existeixen una sèrie de plasmidis dissenyats de tal forma que mitjançant una PCR (*Polymerase Chain Reaction*)²⁶⁶ amb uns encebadors d'oligonucleòtids amb una part comuna i una part variable permeten produir grans quantitats d'uns fragments de DNA que contenen un gen de selecció (i el promotor i/o epítip si s'escau) i dirigir-lo a la zona del genoma del llevat que vulguem (segons la seqüència de la part variable dels encebadors), tal i com està descrit²⁶⁷. Aquestes PCRs s'han fet en un termociclador MyCycler (BioRad), fent servir la DNA polimerasa Phusion HF (Thermo Scientific), normalment en un volum de reacció de 50 o 100µl amb 1µM de cada encebador, 0.2mM d'una mescla de dNTPs, 50ng de DNA i el tampó subministrat pel fabricant. Per norma general, el programa de PCR consisteix en una primera desnaturalització a 98°C durant 30 segons, seguida de 30 cicles de 15s a 98°C, 20s a 60°C (anellament) i 1-2min (segons mida del producte esperat) a 72°C (elongació), per fer posteriorment una elongació final de 10min a 72°C. Posteriorment es comprova si la PCR ha funcionat i el seu rendiment corrent en

un gel d'agarosa (Lonza) al 0.8% amb tampó TAE 1X (40mM Tris, 20mM àcid acètic i 1mM EDTA) uns 3-5µl de la reacció, a 100-150V fins que el front avanci prou. Després de la cursa tenyim el gel amb bromur d'etidi 0.5µg/ml dissolt en TAE1X durant uns 20min, i es llegeix el resultat excitant el gel amb llum UV i capturant la fluorescència en el rang dels 600nm amb un equip de documentació de gels (GeneGenius). Si el resultat és l'esperat, es neteja el producte de reacció mitjançant un kit de *clean up* (Macherey-Nagel) seguint el protocol del fabricant, per eliminar les sals i els oligonucleòtids de la reacció de PCR; en resum consisteix a mesclar el producte de PCR amb un agent caotrópic, i passar la mescla per una columna on s'hi uneix el DNA, on s'hi fan rentats amb un tampó que conté etanol i finalment s'elueix en TE 1X (10mM Tris-HCl pH8 i 1mM EDTA).

2.2. Transformació de *S. cerevisiae*²⁶⁸

Consisteix en introduir DNA en forma de plasmidi, de cassat integratiu o de diversos fragments lineals que hauran de recombinar homòlogament per fer un nou plasmidi circular en la soca de *S. cerevisiae* desitjada. Per a una transformació necessitem unes 5 ODs^{iv}, que estiguin creixen exponencialment a una concentració d'entre 0.4-1ODs/ml. Les cèl·lules es renten del medi amb aigua i es permeabilitzen mitjançant el tampó TE/LiAc (Tris10mM, EDTA 1mM, acetat de liti 0.1M, en aigua), i es protegeixen en la mescla de transformació (un volum de 50µl) afegint 300µl del tampó PEG (Tris 10mM, EDTA 1mM, acetat de liti 0.1M i polietilenglicol al 40%). Per millorar l'eficiència d'entrada de DNA es cotransforma amb 5µl de ssDNA (DNA de cadena simple provinent d'esperma de salmó), juntament amb un volum adequat dels DNAs a introduir (uns 50ng per plasmidis, 600-800ng per cassats i uns 200ng de cada fragment lineal quan es vol construir un nou plasmidi per recombinació homòloga). La mescla de DNA+cèl·lules+tampó TE/LiAc/PEG s'incuba 30min a 30°C, i posteriorment es fa un xoc tèrmic a 42° durant 15min. Després es centrifuguen les cèl·lules i es resuspenen en 50µl d'aigua per plaquejar-les en medi selectiu. Aquest plaqueig es realitza immediatament si la selecció és per auxotrofia, o després de 4 hores de recuperació en YPD si la selecció és mitjançant antibiòtic, per tal de donar temps a què els gens de resistència s'expressin.

2.3. PCR de colònia de llevat

Per comprovar si les colònies que apareixen en la placa després de la transformació han adquirit correctament el DNA que hi hem introduït, podem fer una PCR comprovativa directament des de la colònia. El procediment és simple: es pica la colònia en qüestió amb una punta, la punta s'introdueix en un tub de PCR per tal de deixar-hi algunes cèl·lules i posteriorment es ratlla una placa selectiva amb la punta per tal d'obtenir més quantitat de colònies d'aquell clon (per si finalment fos bo). Després preparem la mescla de reacció: per cada tub, amb un volum final de 20µl, mesclem 2µl de tampó 10X, 2µl de dNTPs, 0.2µl de cada encebador i 0.2µl de Suprathem Taq DNA polimerasa (GeneCraft), arribant a 20µl amb aigua. Els tubs amb les cèl·lules dins es posen 2min al microones per tal de fer-les explotar i que alliberin el DNA, i immediatament després s'afegeixen els 20µl de mescla i es posa al

^{iv} El terme 'OD', que prové de les sigles en anglès de densitat òptica, el fem servir tant per parlar de la concentració d'un cultiu líquid amb les cèl·lules en suspensió com per referir-nos a nombre total de cèl·lules; per exemple, si diem que el cultiu està a 0.5 ODs/ml ens referim a concentració, mentre que si diem que hem de recollir 5ODs per fer quelcom ens referim a nombre de cèl·lules. De manera rutinària fem servir com a mesura aquesta densitat òptica perquè la podem mesurar molt fàcilment amb un espectrofotòmetre a una longitud d'ona de 600nm (així que el que mesurem realment és la OD₆₀₀ del cultiu), mentre que comptar nombre de cèl·lules és més lent i complicat. Per a cèl·lules de llevat estàndard, la relació entre nombre de cèl·lules i OD₆₀₀ és 1OD=2·10⁷ cèl·lules. És a dir, que un cultiu amb una concentració de llevats de 2·10⁷cfu/ml ens donarà una densitat òptica d'1 a una longitud d'ona de 600nm.

termociclador. El programa de PCR, per norma general, consisteix en 2min a 94°C, 35 cicles de 15s a 94°, 30s a 55°C (anellament, segons la seqüència dels encebador pot canviar) i de 30s a 2min (segons mida del producte esperat) a 72°C (elongació), amb 5min d'elongació final a 72°C. Posteriorment es carreguen 10µl de reacció en un gel d'agarosa del 0.8-2% (segons la mida del producte esperat) per comprovar si apareix la banda esperada. És molt recomanable incloure controls negatius i si es pot, també controls positius (ja que a vegades la PCR no funciona i si no, no sabrem si és perquè les colònies són totes negatives o simplement perquè el procediment no ha sortit bé). Quan estem integrant cassets en el genoma, disposem d'un encebador universal revers dins el casset en l'extrem 5', així que només ens cal dissenyar-ne un altre de directe uns 300-600 parells de bases abans del lloc teòric d'inserció. Si la PCR és positiva i dona la mida esperada, és que el casset és on hauria de ser. Si no és així, els encebadors estaran massa lluny l'un de l'altre (o fins i tot poden estar en cromosomes diferents) i la PCR serà negativa.

2.4. Extracció de DNA genòmic de llevat

Si ens cal amplificar un fragment gran de DNA per PCR, l'aproximació de PCR des de colònia no donarà un rendiment adequat, pel que s'ha de purificar DNA amb millor qualitat. Per tal d'obtenir DNA genòmic de bona qualitat, es parteix d'un cultiu estacionari de la soca de llevat de la qual es vol extreure DNA genòmic. Es centrifuguen les cèl·lules i es trenquen amb boles de vidre (Sigma) amb 200µl del tampó TNEST (Tris-HCl pH8 10mM, NaCl 0.1M, EDTA 1mM, SDS 1% i Tritó X-100 2%) en la FastPrep (MP Biomedicals) fent 3 cicles de 30s a 5m/s o 10min al vòrtex (si volem obtenir genòmic amb els cromosomes pràcticament integres). S'afegeix 200µl de fenol-cloroform i 200µl de TE, es mescla tot amb el vòrtex i es centrifuga 5min a màxima velocitat. Es recupera la fracció aquosa (uns 400µl) i es precipita el DNA afegint-ho a un tub amb 1ml d'etanol 100% (PanReac). Es centrifuga la mescla, s'elimina l'etanol i es resuspén el pellet (que conté el DNA) amb 400µl de TE, on s'afegeix 13.3µl de NaOAc 3M (Sigma). Es mescla i es torna a fer precipitar afegint 1ml d'etanol 100%. Es centrifuga 2min a màxima velocitat, s'elimina l'etanol, es renta el pellet amb 1ml d'etanol 70%, es torna a centrifugar i eliminar l'etanol, i finalment s'assequen les últimes restes d'etanol amb un concentrador de buit (Eppendorf) i es resuspén el DNA amb 100µl de TE. Si volem eliminar l'RNA, afegim 1µl de RNasaA 10mg/ml (Sigma) i ho incubem 5min a 37°C.

3. Clonatge de gens i construcció de plasmidis

3.1. Digestió de DNA mitjançant enzims de restricció

Per tal de clonar un gen (o qualsevol tipus de seqüència de DNA, insert d'ara en endavant) en un vector a l'estil clàssic, d'una banda cal obtenir l'insert des de DNA genòmic o un altre vector (PCR + restricció de les dianes afegides als encebadors, o restricció directa si el fragment ve d'un altre vector i els llocs de restricció són compatibles amb els del vector receptor) i de l'altra cal obrir el vector receptor amb enzims de restricció. Les restriccions simples es fan mesclant el DNA (per regla general, 1µg) amb el tampó propi de l'enzim en qüestió i 1U d'enzim, en un volum final on no diluïm massa el DNA però que la concentració de glicerol que porta l'enzim no passi del 10%. La mescla s'incuba 1h a 37°C (excepte si el fabricant indica el contrari pel que fa a algun dels enzims), i després es comprova la digestió en un gel d'agarosa i es neteja el DNA amb un *clean up*. Pel que fa a les digestions dobles, s'utilitza el tampó que segons les indicacions del fabricant és més òptim. En cas que cap tampó sigui

prou bo per fer la digestió simultàniament, es fan dues digestions en sèrie, amb un pas de *clean up* entre mig per eliminar el primer tampó de reacció abans de posar el segon. Si és així, es recomana començar amb més quantitat de DNA, ja que en els successius passos de neteja se'n va perdent. Si l'insert s'obté per PCR des d'un plasmidi que tingui el mateix tipus de gen de resistència que el vector receptor, és important eliminar el DNA motlle de la PCR digerint el producte de reacció amb l'enzim *DpnI*, que talla només si el DNA està metilat. La metilació ocorre dins del bacteri hoste, així que només es digerirà el DNA plasmídic que provingui de *Escherichia coli* (el motlle) mentre que el que hem sintetitzat per PCR quedarà intacte. Això evitarà que tinguem molts falsos positius en passos posteriors del clonatge.

3.2. Defosforilació del vector i lligació

Després de tallar amb enzims de restricció, l'últim nucleòtid del fragment de DNA queda fosforilat, pel que si el vector està tallat amb un sol enzim (o dos enzims amb extrems compatibles) però no el defosforilem, és molt fàcil que la lligasa torni a tancar el vector sense incloure-hi l'insert, fet que coneixem com a relligació i no ens interessa que passi perquè al reintroduir el producte de lligació dins *E. coli* tindrem un munt de colònies que no tindran insert. Per això tractem el vector amb fosfatasa alcalina (Sigma) durant 30min a 37°C, seguits de la inactivació de l'enzim incubant 2min a 75°C. Després fem la mescla de lligació, normalment amb una proporció en massa d'insert:vector de 3:1, el tampó de lligació i entre 2 i 5U de lligasa T4 en un volum final de 20µl, i ho deixem incubant tota la nit a 4°C. També posem un tub amb només insert per tal de comprovar el grau de relligació que tindrem (la fosfatasa a vegades no funciona al 100%). Al dia següent, la lligació està llesta per ser clonada en *E. coli*.

3.3. Transformació de cèl·lules competents de *Escherichia coli*

Un cop feta la lligació, l'hem de transformar en *E. coli*. Tenim alíquotes de cèl·lules competents de la soca DH5α comercials (Invitrogen), que tenim guardades al congelador de -80°C. Agafem i posem en gel tantes alíquotes com transformacions haguem de fer, i posem 5µl de la reacció de lligació en el tub amb les cèl·lules, ho mesclem amb cura i ho deixem 30min reposant dins el gel, deixant que el DNA es posi sobre les cèl·lules. Posteriorment fem un xoc tèrmic d'un minut a 42°C, per forçar l'entrada del DNA dins les cèl·lules; després s'afegeix 1ml de LB sense antibiòtic dins el tub, i es deixa incubant 1h a 37°C, de tal manera que si alguna cèl·lula ha adquirit DNA, tingui temps a expressar el gen de resistència a ampicil·lina que inclouïa la construcció. Passada l'hora d'incubació, es centrifuga el tub 2min a 3000rpm, s'elimina la majoria del volum de LB i amb el que queda es resuspén el pellet de cèl·lules i es plaqueja en una placa de LB-Amp. Es posa a l'incubador de 37°C i al dia següent han d'aparèixer colònies que portin el nou plasmidi que hem construït.

3.4. Obtenció de DNA plasmídic des d'*E. coli*

3.4.1. Miniprep

Es parteix des d'un cultiu crescut tota la nit a 37°C en 2-3ml de LB líquid amb ampicil·lina o d'una placa de LB fresca amb colònies confluents, també amb ampicil·lina. Es passen les cèl·lules en un eppendorf i a partir d'aquí es segueix el protocol indicat en el kit de *miniprep* (Macherey-Nagel). En resum es fa una lisi alcalina en presència de SDS dels bacteris, seguida d'una neutralització, i el sobrenedant es passa per una columna on s'uneix el DNA, i allà es pot rentar d'impureses amb tampons que contenen etanol i finalment eluir-lo en TE 1X. Alguns plasmidis fan mal als bacteris quan aquests

creixen molt de pressa, i en aquest cas els fem créixer a 30°C o a temperatura ambient. Costa més de créixer-los que a 37°C una soca normal, però almenys així creixen i en podem tenir prou que portin plasmidi per fer-ne una *miniprep*.

3.4.2. JetPrep

Es preparen cultius de 0.5ml de LB-Amp en eppendorfs inoculant les colònies provinents d'una transformació i es deixen créixer tota la nit a 37°C (o unes 6-7h si es vol fer el mateix dia). Les cèl·lules es centrifuguen, es resuspenen en 50µl de BT (Tritó X-100 2% a pH12.4) i s'afegeix 50µl de fenol-cloroform. Es lisen per agitació manual, es centrifuga per separar la fase aquosa del fenol i es carrega en un gel d'agarosa 0.8% una alíquota de la fase aquosa, que conte el DNA plasmídic. És una manera ràpida i barata per comprovar la presència i mida de plasmidi de molts clons simultàniament. A partir de la fase aquosa també es pot fer una purificació del DNA amb etanol semblant a la descrita en el punt 2.4 (però a menor escala) per poder fer finalment una restricció sobre aquest DNA, si únicament amb la mida del plasmidi no en tenim prou per decidir si una colònia és bona o no.

3.5. Clonatge de diversos fragments de DNA mitjançant recombinació homòloga en llevat

Mitjançant el mètode conegut com *Gap Repair*²⁶⁹, podem unir diversos fragments de DNA dins el llevat per tal de construir un nou vector. Per fer-ho, hem de tenir en compte els següents factors:

- Els fragments a connectar han de tenir entre 20 i 50 parells de bases amb homologia de seqüència en l'extrem per on s'han d'unir (Figura 31), ja que al llevat no li agrada tenir fragments de DNA lineal i si troba dues seqüències homòlogues el seu sistema de recombinases els unirà per eliminar l'extrem (aprofitem un mecanisme endogen de reparació de lesions en el DNA endogen basat en la recombinació homòloga).
- El vector resultant tingui un origen de replicació i distribució autònom en llevat (2µm o ARS-CEN) i un o dos gens que rescatin una auxotròfia del llevat hoste per poder-los seleccionar. Si després hem de passar la construcció a *E. coli*, també ha d'incloure un gen de resistència a antibiòtic bacterià (ampicil·lina o kanamicina, normalment) i un origen de replicació per a *E. coli* (pBR322_ori).
- Si tant l'origen de replicació en llevat com el gen de resistència estan en el mateix fragment de DNA, i aquest ha estat obtingut per restricció simple d'un vector que deixi extrems cohesius (o per restricció doble amb enzims que donen extrems compatibles), el llevat ho té molt fàcil per tancar aquest tall directament, sense incloure els altres fragments de DNA. Per evitar això i millorar la eficiència del clonatge, podem incubar el DNA digerit amb una mescla de nucleòtids (varia depenent del enzim de restricció) i 1U de Suprathem Taq DNA polimerasa (GeneCraft) a 72°C durant 20min, per tal que s'incorporin alguns nucleòtids en els extrems cohesius i així deixin de ser-ho, tal i com està descrit²⁷⁰.
- Si algun dels fragments s'obtenen a partir de plasmidis que continguin un gen de selecció igual al que finalment farem servir per seleccionar els transformants, de manera anàloga al descrit en el punt 3.1, hem de digerir la reacció de PCR amb l'enzim *DpnI*, per reduir el nombre de clons que siguin falsos positius.

Amb tots aquests considerants pel que fa al disseny del clonatge, després d'obtenir els diferents fragments per restricció o PCR es mesclen en proporció aproximadament equimolar arribant a una

quantitat màxima d'entre 1 i 1.5µg de DNA entre tots els fragments, i es procedeix a fer una transformació de llevat seguint el protocol clàssic indicat en el punt 2.2.

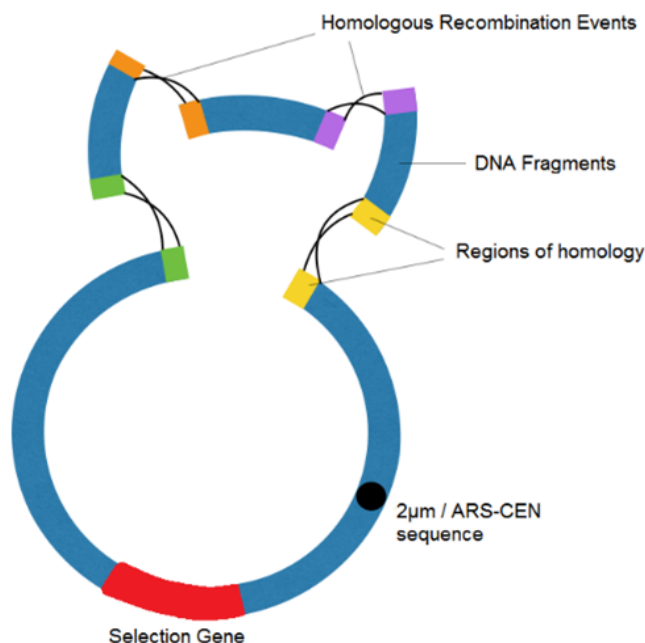


Figura 31:

Esquema on es mostren els elements requerits per unir diversos fragments amb el mètode *Gap Repair* en llevat. Les petites regions als extrems dels fragment amb el mateix color indiquen que en aquelles zones la seqüència és homòloga, i és on hi tenen lloc els esdeveniments de recombinació que permeten unir tots els fragments en una sola peça. Adaptat de Nivin Nasri.

3.6. Obtenció de DNA plasmídic a partir de llevat (Zymoprep)

Un cop obtingudes les colònies d'una transformació (i si és possible, després de comprovar que contenen la construcció desitjada per una tècnica ràpida com microscòpia de fluorescència o PCR de colònia), podem extraure el DNA plasmídic del llevat i passar-lo a *E. coli*, per després poder-ne obtenir en grans quantitats fent una *miniprep* normal. Per tal de fer-ho, creixem durant una nit els llevats en medi selectiu pel vector en qüestió a 30°C (cultius de 2ml si ho fem en líquid, o ho podem fer directament des de colònia si deixem que aquesta es faci prou grossa), passem les cèl·lules a un eppendorf i les separem per centrifugació; a partir d'aquí seguim el protocol del kit de Zymoprep (Zymo Research). Resumint, es resuspenen les cèl·lules en un tampó que conté zimoliasa (una mescla de proteases que elimina la paret cel·lular dels llevats) i s'incuba la mescla 1h a 37°C. Després es fa una lisi alcalina amb SDS, neutralització i unió a columna (semblant a la *miniprep*), on es renta el DNA i finalment s'elueix amb 10µl d'aigua. La totalitat de l'eluat es transforma directament en *E. coli* DH5α per obtenir clons de bacteri que portin el plasmíde.

4. Tècniques bioquímiques sobre proteïnes

4.1. Obtenció i preparació de mostres de proteïna de llevat

4.1.1. Obtenció de les mostres

Segons l'abundància de la proteïna que vulguem detectar i del procés d'extracció que haguem de seguir, la quantitat de cèl·lules que hem de recollir pot variar, però per fer un Western Blot d'una proteïna normal i corrent és suficient amb 5ODs. Les cèl·lules es creixen en el medi adient (normalment YPD, o YPGal si s'està induint algun gen sota el control de *GALp*) i es recullen mentre estan en fase exponencial de creixement (a una concentració de 0.5-1ODs/ml). Si hem de processar un volum petit (fins a 50ml) podem recollir les cèl·lules per centrifugació en fred (2min a 3500rpm); si hem de tractar volums més grans o proteïnes molt inestables, és millor filtrar el medi en fred i retenir les cèl·lules en una membrana. Fem un o dos rentats amb aigua freda per eliminar les restes de medi, recuperant les cèl·lules per centrifugació, i les passem a tubs eppendorf, on fem una última centrifugació i eliminem tot el sobrenedant. Segons que haguem de fer podem procedir directament des d'aquest pas, però si hem de guardar els pellets congelats o per segons quins tipus d'extracció de proteïnes, hem de congelar els pellets en nitrogen líquid i guardar-los a -20°C o -80°C, segons el que en vulguem fer posteriorment.

4.1.2. Preparació de mostres amb urea

Obtenim extrems totals de proteïna afegint urea com a agent caotrópic al pellet de cèl·lules i posteriorment SDS per solubilitzar les proteïnes de membrana, com està descrit²³⁰. Començant amb 5ODs, el procediment consisteix en afegir 15µl d'urea 5M (Sigma) al pellet, resuspendre'l en aquest volum petit, incubar-ho-ho 2min a 95°C i afegir una culleradeta (uns 50µl) de boles de vidre (Sigma); les cèl·lules es trenquen amb la FastPrep (MP BioMedicals) a 5m/s durant 30s i després s'afegeix 50µl del tampó SR 1X (2% SDS en 125mM Tris-HCl pH 6.8), es mescla tot amb un cop de vòrtex i s'incuba a 95°C durant 3min; després es centrifuga el tub a màxima velocitat durant 5min per separar les boles de vidre i les restes cel·lulars del sobrenedant (se'n recuperen uns 50µl), que s'afegeixen a un volum de 2xSSR (4% SDS, 250mM Tris-HCl pH6.8, 10% sucrosa, 0.025% blau de bromofenol, 2%β-mercaptoetanol), i s'incuba un altre cop 3min a 95°C; així ja tenim la mostra preparada per carregar al gel d'acrilamida. Si seguim aquestes proporcions, l'extret queda a una concentració de 0.05ODs/µl, i normalment carreguem mitja OD/carril en el SDS-PAGE, és a dir 10µl. Si volem tenir l'extret més concentrat (per exemple perquè la proteïna d'interès és molt poc abundant) podem començar amb més ODs però trencant i solubilitzant amb els volums aquí indicats, tot i que si ens passem podem tenir problemes de solubilització i si després al SDS-PAGE carreguem massa proteïna el gel no corre bé, així que hem de vigilar.

4.1.3. Preparació de mostres amb NaOH

Obtenim extrems totals de proteïna afegint sosa per trencar les cèl·lules i desnaturalitzar les proteïnes i posteriorment SDS per solubilitzar les proteïnes de membrana, tal com està descrit²⁷¹. Començant amb 5ODs, es resuspèn el pellet amb 100µl d'aigua freda i s'afegeix 100µl de NaOH 0.2M i s'incuba 5min a temperatura ambient; després es centrifuga 45s a 5000rpm i es descarta el sobrenedant; el pellet es resuspèn en 50µl de 2xSSR i s'incuba 3min a 95°C i es centrifuga 45s a 5000rpm abans de carregar la mostra al gel. Normalment es carreguen entre 5 i 10µl per carril.

4.1.4.Preparació de mostres conservant els agregats amiloides

Obtenim extractes natus per conservar els agregats amiloides que hi pugui haver, tal com s'ha descrit²⁷². Comencem amb pellets de 200Ds i es resuspenen en 100µl de tampó de lisi (50mM Tris-HCl pH7.5, 50mM KCl, 10mM MgCl₂ i còctel d'inhibidors de proteases 1X), afegint 3 cullerades de boles de vidre (Sigma); trenquem les cèl·lules amb el vòrtex a màxima potència durant 10min, posant les cèl·lules en gel durant 30s cada 2min, i després es centrifuga la mescla durant 1min a 600g a 4°C, quedant-nos amb un sobrenedant tèrbol que podem guardar a -80°C durant 1-2 setmanes. La concentració de proteïna en l'extret hauria de ser d'entre 3-10µg/µl. Es pot determinar la concentració amb un assaig colorimètric (DC Protein Assay, BioRad) fent una recta patró amb BSA (Sigma). A l'hora de carregar el gel de SDD-AGE, es posen 12µg/carril. Abans de carregar, s'ha de mesclar el volum adient d'extret amb 1 volum del tampó de carrega (2xSSR sense β-mercaptoetanol), i deixar-ho incubar 7min a temperatura ambient.

4.2. Detecció de proteïnes específiques mitjançant Western Blot

4.2.1.Electroforesi en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

El gel de poliactilamida consta realment de dos gels, una empaquetador i un altre separador. Es preparen entre dos vidres, separats 1mm l'un de l'altre. El gel separador, que ocupa 4/5 parts de l'espai, es pot preparar amb diferent concentració d'actilamida en funció de la mida de la proteïna que vulguem detectar. Per a les proteïnes grans fem gels amb el 7.5% d'actilamida, i per a proteïnes més petites podem fer gels d'un 10-12-15% d'actilamida; la mescla d'actilamida/bis-actilamida la comprem feta al 40% en una proporció de 37.5:1 (Fischer Scientific). El gel està tamponat amb 375mM Tris-HCl pH8.8, i porta un 0.1% de SDS. L'actilamida es fa polimeritzar mitjançant una reacció química entre els monòmers de la mescla d'actilamida/bis-actilamida catalitzada per 0.08% de persulfat d'amoni (AP, Fischer Scientific) i 0.1% de TEMED (Fisher Chemical); la reacció tarda uns 20min, i el gel es cobreix amb isopropanol (Fischer Chemical) per eliminar bombolles i evitar que el gel s'assequi. El gel empaquetador es fa amb una concentració del 5% d'actilamida i es tampona amb 125mM Tris-HCl pH6.8, amb 0.1% SDS, i la mescla d'actilamida/bis-actilamida es polimeritza de amb AP i TEMED, igual que el gel separador, un cop posada la pinta que donarà forma als pous on es carreguen els extrems proteics. Un cop el gel està polimeritzat, es munta en la cubeta d'electroforesi, que es plena amb el tampó de cursa TGS 1X (Tris 25mM, glicina 192mM, SDS 0.1%) i després de carregar les mostres (cabem uns 20µl de mostra com a molt) s'apliquen 20mA per gel fins que el front de blau de bromfenol surti del gel (90-120min aproximadament). En un dels pous es carreguen 5-10µl de LMW Protein Marker (Amersham) per tenir una referència de la mida de les bandes (la proteïna més gran de l'estàndard fa 97kDa i la més petita 14.4kDa).

4.2.2. Electroforesi en gel d'agarosa semidesnaturalitzant (SDD-AGE)²⁷²

Es prepara un gel d'agarosa (Lonza) al 1.5% com els de DNA, amb la diferència de que el gel es prepara amb tampó TGS 1X (el SDS s'afegeix després de bullir i desfer l'agarosa des d'una solució al 10%, i es remena bé intentant no fer bombolles) i també es corre l'electroforesi amb el mateix tampó, a 100V fins que el front de blau de bromfenol arribi al límit del gel. Aquí l'objectiu es separar agregats de gran pes molecular i per això fem servir agarosa, que dona una mida de porus major que l'acrilamida al polimeritzar. Tot i així, si no deixem sortir el blau de bromfenol també podem detectar les formes monomèriques. No es disposa de marcadors de pes molecular comercials per aquest tipus de gels, tot i que es pot fer servir un extracte de pit de pollastre com a tal, ja que consta de diverses proteïnes majoritàries tenen uns pesos moleculars bastant elevats (fins a 3000kDa). En el nostre cas, no hem fet servir cap marcador de pes molecular.

4.2.3. Transferència de proteïnes a una membrana de PVDF

Després de separar les proteïnes en el gel i eliminar la regió on hi ha els pous, les proteïnes s'han de transferir a una membrana de PVDF. Generalment amb els gels de poliacrilamida ho fem amb un mètode semisec, on impregnem de tampó de transferència (Tris 25mM, glicina 192mM, SDS 0.1%, metanol 10-15-20%) dos papers de filtre, entre els quals posem el gel i la membrana (que prèviament s'ha d'activar amb metanol 100% i incubar 5min amb tampó de transferència); aquest sandvitx es posa entre els dos elèctrodes plans del sistema de transferència Trans-Blot SD (Biorad) amb la membrana sota el gel, ja que l'elèctrode positiu és a baix. S'apliquen 25mA per gel (al sistema en caben fins a 4), limitant el voltatge a 15V per a que el sistema no s'escalfi massa, durant 1h. Si la nostra proteïna d'interès és grossa (més de 70kDa), fem servir el tampó de transferència amb metanol al 10%; en cas contrari fem servir el tampó amb el 20% de metanol. I si en tenim una grossa i una petita, fem servir el del 10%, ja que les petites es transfereixen pràcticament igual de bé.

En el cas dels gels d'agarosa semidesnaturalitzants, ho fem amb el sistema humit, ja que el gel és més gruixut i més sensible a augments de temperatura pel fet de ser d'agarosa. S'ha d'activar la membrana igual i incubar-la amb tampó de transferència (en aquest cas, al 15% de metanol), així com els papers de filtre, i es fa un sandvitx de la mateixa manera, amb dues esponges per a que el sandvitx no es mogui entre els dos plàstics foradats que encaixen en la cubeta de transferència, que es plena amb 1L de tampó de transferència. S'ha de posar la membrana en el cantó més proper de l'elèctrode positiu, ja que les proteïnes migraran en aquesta direcció des del gel. La transferència es fa a 100V durant 1h30min dins la cambra freda a 4°C i mesclant l'interior de la cubeta amb un agitador magnètic.

4.2.4. Immunodetecció utilitzant anticossos específics

Després de transferir podem assecar la membrana i guardar-la en aquest estat durant força temps en un calaix protegida entre paper de filtre; quan vulguem continuar amb la immunodetecció hem de tornar a activar la membrana amb metanol 100%. Després hem de bloquejar la membrana amb una solució de llet en pols desnatada al 5% en PBS-T (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄ i Tween20 0.1%) durant 1h amb agitació suau, i passat el bloqueig es fan 3 rentats amb PBS-T (un de 15min i dos de 5min) amb agitació forta i després s'incuba durant 1h amb l'anticòs primari en 1ml d'una solució de llet en pols desnatada al 0.25% (la concentració d'anticòs depèn de cada cas, però en general el diluïm 1000 vegades respecte la suspensió original) sense agitació; es renta dues vegades amb PBS-T (15 i 5min) i una altra amb la solució de llet en pols desnatada al 0.25% (10min); després incubem durant 30-40min amb anticòs secundari (unit a peroxidasa HRP o a un fluorocrom de l'espectre infraroig) en aquesta solució de llet en pols desnatada al 0.25% (en el cas que utilitzem un anticòs unit

a fluorocrom, també afegim SDS al 0.02% per evitar la unió inespecífica del fluorocrom a la membrana); després es fan 5 rentats (un de 15min, un de 10min i 3 de 5min) i podem procedir a revelar la membrana. Si hem fet servir un anticòs secundari unit a fluorocrom, podem anar directament al sistema de documentació Odyssey (Li-Cor) per obtenir el resultat directament en una imatge digital. Si hem fet anar el secundari unit a HRP, hem d'incubar la membrana durant 5min amb el substrat Clarity Western ECL (BioRad) i exposar un film de radiografia (AGFA) un temps determinat i després revelar-lo amb una màquina de fixació de films automatitzada (Hyperprocessor, Amersham Pharmacia Biotech). Després es digitalitza el film amb un escàner d'oficina.

5. Estudi de cèl·lules de llevat envellides mitjançant la soca MEP

S. cerevisiae és un microorganisme que es reproduïx per divisió asimètrica a partir de gemmes que van sorgint d'una cèl·lula mare. Com que cada gemma al seu torn es convertirà en mare al cap d'unes dues hores, el creixement poblacional és exponencial i això dilueix moltíssim les cèl·lules mare que ja han fet molts cicles de gemmació i estan al final de la seva vida replicativa, complicant-ne el seu estudi perquè en condicions normals costaria de trobar-les (per tenir-ne una idea, la fracció de cèl·lules que hagin fet més de N gemmes és $1/2^N$, és a dir que cèl·lules que hagin fet 20 generacions són menys d'1 entre 1.000.000 aproximadament). La forma clàssica d'estudiar el RLS dels llevats és per dissecció manual de les gemmes en una placa mitjançant un micromanipulador¹⁴, però és un procediment *low-throughput* molt laboriós i l'únic que permet fer és comptar el nombre de generacions que pot fer una cèl·lula abans de morir. Altres aproximacions consisteixen en marcar la paret cel·lular d'un grup de cèl·lules de llevat amb algun grup químic. En aquest cas la marca química utilitzada és una biotina unida a un *linker* i un grup reactiu (Sulfo-NHS-LC-Biotina, Thermo Fisher Scientific); després del marcatge, s'han de posar a créixer les cèl·lules en tancs gegants de medi o en un quimiòstat per a que

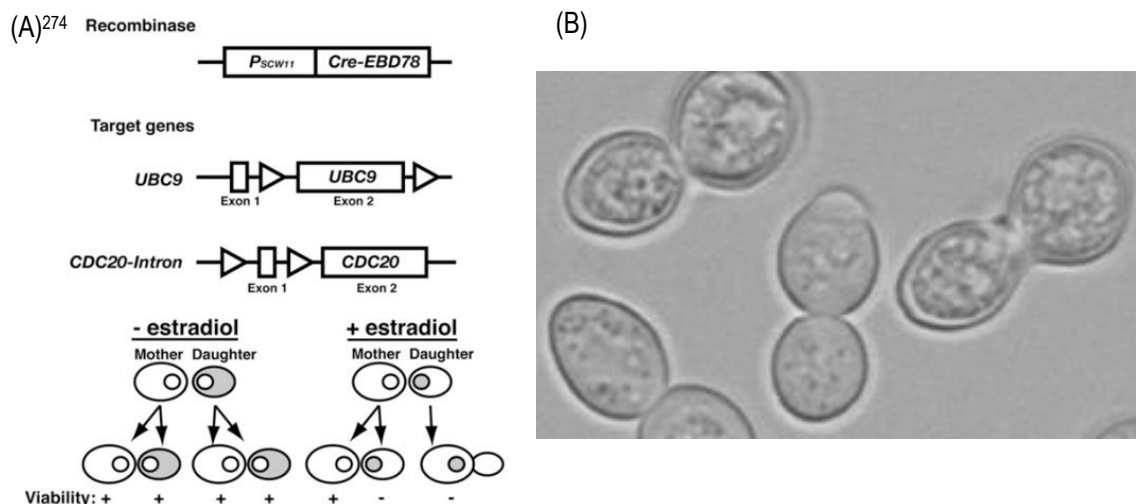


Figura 32:

(A) Els elements bàsics del sistema MEP són la Cre-Recombinasa unida al receptor d'estradiol sota un promotor només actiu a les cèl·lules recent nascudes, i un parell de gens essencials per executar mitosi on s'hi ha introduït seqüències *loxP* flanquejant un exó (no molts gens de *S. cerevisiae* tenen introns, però *UBC9* és un d'ells; pel que fa a *CDC20* es va introduir un exó extra molt petit, pertanyent al gen de l'actina per poder clavar-hi una seqüència *loxP* en mig del intró que el segueix, per continuar després amb la resta de la ORF de *CDC20*); així, en funció de la presència d'estradiol, la Cre-recombinasa expressada en les cèl·lules recent nascudes va o no al nucli, tallant així les seqüències diana i condemnant a mort aquella cèl·lula, mentre que la mare continua essent perfectament viable.

(B) Es mostra una microscòpia de camp clar d'un cultiu d'aquesta soca tractat amb estradiol durant una nit, on s'hi veuen cèl·lules aturades en mitosi (concretament en la transició entre metafase i anafase) fins que eventualment exploten i moren.

no se'ls acabi en menjar ni a elles ni a tota la seva descendència durant els següents 2 o 3 dies i finalment purificar les cèl·lules marcades (les velles, ja que la marca química no difon a la paret de les cèl·lules filles, sinó que quan una gemma neix, es crea paret nova) fent servir *beads* magnètiques associades a avidina o un dels seus anàlegs, podent-ne obtenir mostres fins i tot per fer estudis de transcriptòmica o proteòmica²⁷³. Aquest mètode és útil per a obtenir cèl·lules amb poques generacions, però pràcticament inaplicable a cèl·lules de més de 20 generacions ja que, com hem dit, la seva freqüència en el cultiu és menor d'una en un milió. Per tal de resoldre aquest problema es van desenvolupar les soques de la sèrie MEP²⁷⁴ (*Mother Enrichment Program*): el que van fer va ser introduir al llevat un transgen que és fusió d'una Cre-Recombinasa²⁷⁵ amb domini d'unió a estradiol²⁷⁶ (EBD78, per *Estradiol Binding Domain*) del receptor murí d'estradiol (introduint-hi algunes mutacions per a que fos més estricte i no entrés gens al nucli en absència d'estradiol) sota el control d'un promotor que només és actiu durant el primer G1 d'una cèl·lula recent nascuda ($P_{SCW11}^{277,278}$), i també flanquejant amb seqüències *loxP*²⁷⁵ un parell de gens essencials per a executar mitosi (*CDC20*¹⁹⁹ i *UBC9*²⁷⁹). D'aquesta manera, en absència d'estradiol, les cèl·lules recent nascudes expressen la recombinasa però aquesta roman retinguda al citoplasma i la soca creix exponencialment com qualsevol altra, mentre que en presència d'1-2 μ M de β -estradiol, la recombinasa pot entrar al nucli i delecionar els segments gènics flanquejats per seqüències *loxP*, fent que quan aquestes cèl·lules iniciïn el seu primer cicle com a mares, no puguin avançar més enllà de mitosi i quedin atrapades en aquest estat fins la seva mort per lisi (Figura 32A-B); continuen sent metabòlicament actives i creixent durant unes 24h, però ja no es divideixen més. D'aquesta manera l'efecte de dilució de cèl·lules mare en el cultiu passa de ser exponencial a ser lineal, i tornant a l'exemple de cèl·lules amb 20 generacions, la proporció teòrica serà d'una cèl·lula envellida entre 20 filles aturades en mitosi, encara que la proporció real és una mica menor, probablement a causa de la mort d'algunes cel·les mare. Amb aquesta soca també es pot marcar la paret de les cèl·lules mare amb biotina, però reduint moltíssim el volum de medi necessari per alimentar el sistema durant l'experiment, així com facilitar-ne la purificació, ja que les cèl·lules d'interès ara representen una proporció significativa de la població.

Evidentment aquesta aproximació també té inconvenients: el menys greu és que la introducció de totes aquestes alteracions en el genoma del llevat ocupa bona part de l'espectre de marcadors de selecció de que disposem normalment, però el problema realment important és que el sistema no és totalment estable ja que una mutació en el gen de la Cre-Recombinasa-EBD78 que o bé la faci insensible a la presència d'estradiol o que n'inactivi l'activitat permetrà la cèl·lula de créixer exponencialment i la seva descendència esgoti els nutrients del medi i/o dilueixi les cèl·lules d'interès com si es tractés d'una soca normal (a aquest fenomen l'anomenem escapament). Segons els autors d'aquesta soca, en la variant haploide això succeeix amb una probabilitat d' $1.4 \cdot 10^{-6}$ per cèl·lula en cada generació, mentre en la diploide (que també té dos còpies del transgen) succeeix amb una probabilitat d' $1.4 \cdot 10^{-8}$. Com a solució de compromís per a evitar la doble manipulació en diploides, hem construït una soca haploide que duu dues còpies del transgen, la qual mostra una probabilitat d'escapament d'aproximadament $1 \cdot 10^{-7}$, encara que a costa de perdre un altre marcador de selecció. Per als tipus d'anàlisis més freqüents, microscòpia o plaqueig per comptar viables, la soca haploide amb dues còpies del gen Cre-EBD va ser suficientment estable per a començar amb 0.005 ODs -o 10^5 cèl·lules- en un cultiu de 0.5-1ml, podent arribar a un total de l'ordre de 10^6 cèl·lules en 10 o 20 cultius en paral·lel, per tal de descartar els tubs amb possibles esdeveniments d'escapament. Amb aquesta soca i els seus derivats hem pogut determinar el RLS en diferents condicions tal i com descriurem a continuació, sense

haver de recórrer a la tediosa tècnica de separar les cèl·lules filles manualment amb el micromanipulador.

5.1. Pèrdua de viabilitat de cèl·lules mare en cultiu líquid

Bàsicament consisteix en mesurar la capacitat de formar colònies en condicions permissives per a la proliferació de cèl·lules filles d'un cultiu que ha estat creixent en condicions restrictives durant cert període de temps. Així, comencem amb cèl·lules creixent exponencialment en el medi adequat i en transferim $3 \cdot 10^4$ a medi amb $2 \mu\text{M}$ d'estradiol. Incubem durant 2h a 30°C per a que les cèl·lules que encara no eren mares es comencin a aturar-se irreversiblement en mitosi, i seguidament es plaqueja un volum determinat (unes 300-500 cèl·lules) en una placa en condicions permissives, per tenir la mesura inicial de cèl·lules mare en el cultiu. Després es continuen plaquejant volums d'aquella suspensió a diferents temps des que s'afegeix l'estradiol, fins a 2 o 3 dies, i cada cop es plaqueja més volum per a compensar la pèrdua de viabilitat de les cèl·lules mare inicials. Les plaques s'incuben a 30°C durant 2-3 dies, fins que les colònies siguin visibles per al seu recompte, que es corregeix pel volum plaquejat i es fa relatiu a la quantitat de mares inicials per a obtenir una corba de disminució de viabilitat al llarg del temps.

5.2. Anàlisi de la mida de la microcolònia formada per cèl·lules mare en medi sòlid

Un cop activat el programa genètic per addició d'estradiol les cèl·lules filles aturades en mitosi s'acumulen al voltant la cèl·lula mare que les ha produït formant una microcolònia, si estan creixent en medi sòlid (Figura 33A,C), i l'àrea de la qual serà quasi proporcional al nombre de filles que la mare ha produït en aquell temps, segons l'equació en la Figura 33B. Tot i la superposició d'algunes cèl·lules filles, l'àrea de la microcolònia és una bona aproximació per a poder-ne deduir el nombre de filles produïdes, i té l'avantatge primordial del alt nombre de microcolònies individuals que es poden analitzar (400-500) per a donar robustesa estadística a les dades a l'hora de comparar entre diverses condicions experimentals.

Aquests experiments s'han fet amb plaques bacteriològiques de 35mm amb el medi requerit incloent $2 \mu\text{M}$ de β -estradiol i els antibiòtics adients per evitar contaminacions. Les emplenem al màxim per reduir la distància entre la superfície i l'objectiu del microscopi, i evitar al màxim que la placa tingui una superfície còncaua i que calgui corregir el focus a cada camp. La quantitat de cèl·lules que plaquejem per placa és de 0.005ODs, que equival a unes $3 \cdot 10^4 \text{cfu/cm}^2$. Després es deixen créixer a 30°C durant 4 o 5 dies per assegurar-nos que les microcolònies ja no creixeran més i procedim a adquirir les imatges de les microcolònies. Ho fem amb l'equip AF6500 amb un objectiu de 20X/0.5NA, un *binning* de 2x2 (no necessitem gaire resolució i així els arxius ocupen menys espai) i ajustant la il·luminació per a que el fons estigui saturat de senyal (Figura 33D, panell esquerra). D'aquesta manera facilitem el posterior anàlisi fet amb les funcions internes d'ImageJ²⁸⁰: el primer pas és fixar un *threshold* que marqui les zones de la imatge on hi ha microcolònies (Figura 33D, panell central) retocant amb l'eina del pinzell petits detalls (com colònies que estan tocant tangencialment el límit del camp, dues colònies que es toquen entre si per separar-les, etc), i amb la funció '*Analyze Particles...*' calculem l'àrea de les zones seleccionades; fixem un límit inferior de mida (per no tenir en compte cèl·lules individuals o microcolònies amb només 1 o 2 filles produïdes, petites marques a l'agar i altres irregularitats), excloem elements que estiguin tocant el límit del camp (per això podem retocar la imatge si tot just toquen una mica) i incloem els forats per a que es conti tota l'àrea dins el perímetre de la microcolònia). També observem els *Outlines* (Figura 33D, panell dret), per comprovar els elements detectats, i recollim totes

les mesures en un full de càlcul. Convertim les àrees en cèl·lules filles produïdes segons la fórmula prèviament indicada (Figura 33 B, assumint que un cos cel·lular individual té un àrea de $100\mu\text{m}^2$) i després podem representar les dades segons la freqüència acumulada de microcolònies de diferents mides, començant a comptar des de les més grans. D'aquesta manera obtenim una representació (Figura 33E) semblant a la que s'obté quan es representa el percentatge de supervivents al llarg de les generacions (com els que s'obtenen amb el mètode clàssic de la dissecció manual), o podem representar les mitjanes poblacionals de cada condició experimental fent-ho tot relatiu a la condició control. Per tal de tenir una prova de concepte de que la tècnica és fiable per a mesurar RLS, el que vam fer és mesurar la mida mitjana de colònia d'un cultiu líquid on s'hi va afegir estradiol (semblant al

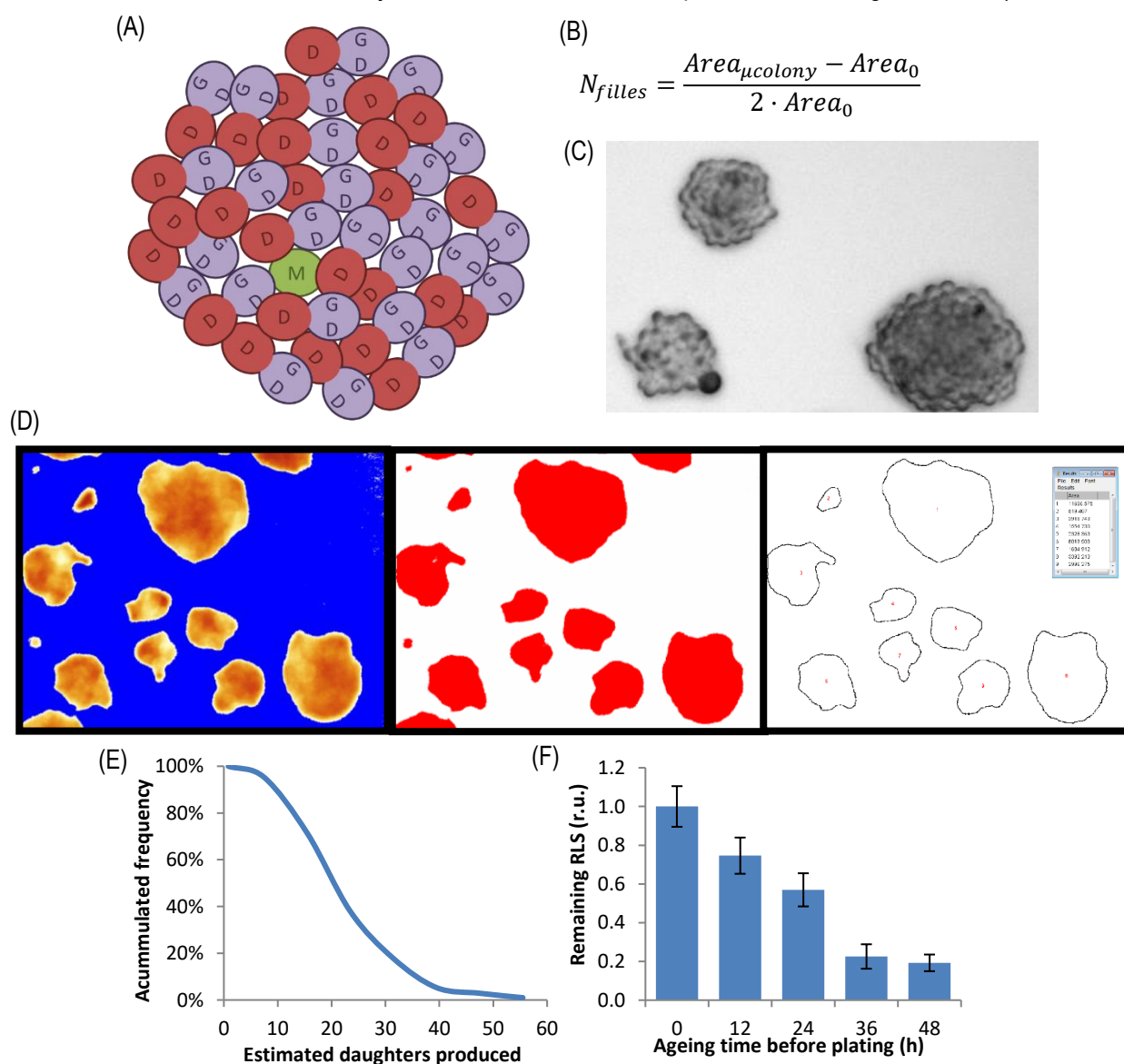


Figura 33:

(A) Esquema teòric d'una microcolònia: la cèl·lula verda és la mare, i les roges són les filles aturades en la mitosi que les hauria de separar de les netes de color lila.

(B) Fórmula per deduir el nombre de filles que s'han produït en una microcolònia.

(C) Exemple de microcolònies reals, on algunes cèl·lules se superposen a altres.

(D) Esquema de treball per tractar les imatges, segmentant les microcolònies i calculant-ne l'àrea.

(E) Corba de viabilitat al llarg de les generacions estimades, calcular a partir de la freqüència acumulada des de la dreta de la mida de les microcolònies.

(F) Disminució en la mida de microcolònies formades a partir de cèl·lules mare que ja han experimentat els temps d'envelliments indicats; les columnes indiquen la mitjana de cada població (relativa al temps inicial), mentre que les barres d'error indiquen l'interval de confiança de la mitjana ($\alpha=0.05$).

fet en l'apartat anterior), i plaquejar a diferents temps després de l'addició del estradiol en plaques que també continguin estradiol. Així, a mesura que passi el temps i les cèl·lules mare vagin produint filles en el cultiu líquid, cada cop en podran fer menys en el medi sòlid i la mida de microcolònia anirà disminuint paulatinament, el qual es pot observar en la Figura 33F.

5.3. Marcatge amb biotina i detecció de cèl·lules envellides

La paret dels llevats se sintetitza bàsicament *de novo* durant el creixement des de la gemmació fins la citocinesi. Atès que els materials de la paret de la cèl·lula mare no difonen a la filla, en marcar químicament la paret cel·lular amb biotina aquesta marca romandrà en les cèl·lules mares al llarg de generacions i permetrà diferenciar-les de la resta del cultiu sota el microscopi després d'una tinció amb avidina o streptavidina unida a un fluorocrom, o purificar-les amb *beads* unides a avidina. El següent procediment està posat a punt amb el sistema genètic MEP per a fer microscòpia amb cèl·lules envellides fins a 2 dies amb les precaucions esmentades abans per descartar possibles esdeveniments d'escapament. A més de 2 dies d'envelliment, el nombre de cèl·lules que encara estan vives és massa baix i, com ja hem dit, el nombre de cèl·lules inicial ja està al límit per tal de limitar al màxim la probabilitat d'escapament.

Comencem recollint 2-3 ODs de cèl·lules creixent exponencialment en el medi adient, les rentem 2 cops amb PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄), i les resuspenem en 100µl del mateix PBS. Pesem en un altre tub 3mg de Sulfo-NHS-LC-Biotina i els dissolem amb 400µl de PBS, i posteriorment transferim els 100µl del tub amb les cèl·lules al tub amb la biotina. Incubem la mescla 2h a 4°C protegit de la llum, i després rentem les cèl·lules dues vegades amb medi, resuspenent-ho tot finalment en 500µl de medi. Mesurem la OD de la suspensió fent una dilució 1:10, i es preparen diversos cultius de 500µl de medi amb 2µM de β-estradiol i 0.01ODs de cèl·lules marcades. Els diferents tubs es mantenen en nevera i es col·loquen a 30°C progressivament per a obtenir cèl·lules amb diferents graus d'envelliment. Per tenir un control de cèl·lules sense envellir, preparem un tub (sense estradiol) amb 0.25ODs de cèl·lules marcades, que es manté en nevera fins acabar les incubacions dels demés tubs, moment en que s'incuba a 30°C per 3-4h abans de continuar amb la resta de passos. Les cèl·lules es recuperen fent servir un filtre de 0.2µm de diàmetre de porus en

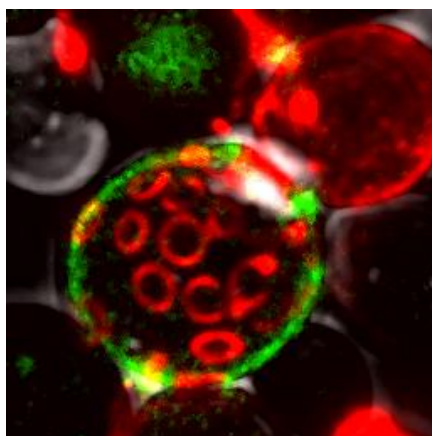


Figura 34:

Microscòpia d'una cèl·lula envellida durant dos dies, marcada amb biotina a l'inici de l'envelliment i després tenyida amb Avidina-FITC (verd) i WGA-AlexaFluor674 (roig llunyà). Es pot apreciar la paret marcada (en pla d'enfoc) a diferència de les cèl·lules del voltant, i el gran nombre de *bud scars* (en projecció màxima) en la cèl·lula envellida. La imatge ha estat obtinguda amb un microscopi confocal d'escaneig LSM780 (Zeiss), amb un objectiu de 63x/1.3NA d'immersió en aigua i excitant amb els làsers 488 i 633, amb un *pinhole* de 42µm i imatges cada 0.5µm en l'eix vertical.

columna (VWR), centrifugant 2min a 3000rpm durant els posteriors rentats. Rentem dins la columna 2 vegades amb PBS per eliminar el medi, i després incubem les cèl·lules durant 30min a 4°C en 500µl de PBS amb 2µg/ml Estreptavidina-APC o 25µg/ml Avidina-FITC (Life Technologies)-segons compatibilitat amb altres canals de fluorescència que haguem de fer servir. També podem tenyir amb 20µg/ml WGA unit a un fluorocrom si volem contar el nombre de *bud scars* en les cèl·lules envellides²⁸¹. Després tornem a rentar les cèl·lules 2 vegades amb medi en un filtre de columna, les resuspenem amb 100µl de medi, i les transferim a una cambra de 35mm amb fons de vidre prèviament tractada amb Concanavalina A, deixant-les adherir durant 5min. Després retirem les cèl·lules no adherides i cobrim la cambra amb 400µl de medi amb estradiol. Les cèl·lules mare es detecten per la marca fluorescent en la paret cel·lular, que correlaciona amb el nombre elevat de *bud scars* (Figura 34).

6. Tècniques de microscòpia

6.1. Determinació del volum de gemmació de llevats en cultius exponencials

Una forma eficient per determinar si s'afecta l'entrada al cicle cel·lular, sempre que no hagi problemes greus de creixement, és determinar la mida de gemmació a través d'imatges fixes en camp clar de cultius creixent exponencialment. Aquesta és una bona aproximació a la determinació de la mida crítica de Start, que es defineix per el moment en que Whi5-GFP es exportat fora del nucli, i que s'ha de determinar per microscòpia de fluorescència i *time-lapse*²⁴⁵. Per contra, l'aparició de la gemma es pot veure directament en camp clar, succeeix immediatament després de la sortida de Whi5 del nucli i un cop la gemma apareix, la mida de la cèl·lula mare no s'altera significativament fins al següent cicle (Figura 35)²⁴⁵. Així, el volum de les cèl·lules gemades en qualsevol moment entre gemmació i citocinesi és el reflex del volum que tenien just en el moment que havien gemmat. Esdeveniments que faciliten l'entrada en cicle (com la deleció d'inhibidors o la superexpressió d'activadors del cicle cel·lular) provoquen que el volum de gemmació disminueixi respecte del normal, mentre que els que en dificulten i retarden l'entrada (deleció d'activadors o superexpressió d'inhibidors, per exemple) fan que el volum de gemmació augmenti.

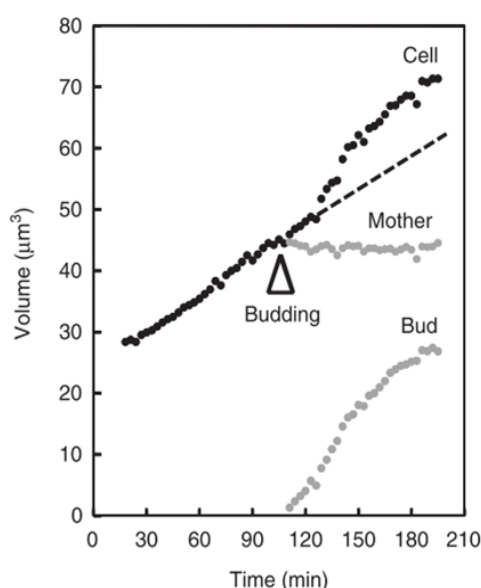


Figura 35²⁴⁵:

La cèl·lula mare creix durant G1 fins que gemma, moment en el qual tot el creixement produït es dirigeix a fer créixer la cèl·lula filla.

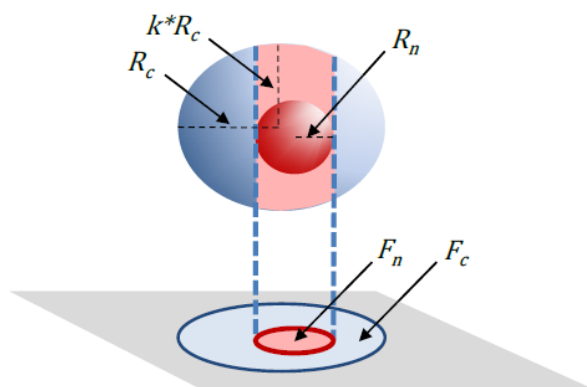
Per unir les cèl·lules al cobreobjectes, hem de recobrir el vidre amb Concanavalina A 0.2mg/ml (Sigma) durant 20min i després rentar el vidre amb aigua i medi; la Concanavalina A s'uneix a polisacàrids de la paret cel·lular del llevat i evita que les cèl·lules es moguin durant l'adquisició d'imatges. Les cèl·lules es deixen reposar sobre el vidre durant 3-5min, es retiren les sobrants i es munta el cobreobjectes en el portaobjectes. L'adquisició s'ha fet preferentment en un microscopi de camp ample motoritzat, automatitzat i invertit (Leica AF6500) amb un objectiu de 63x/1.3NA i immersió en oli i una càmera CCD ORCA-R2 (Hamamatsu), o en un microscopi de camp ample més senzill (Nikon E600) amb un objectiu de 60x/1.4NA i immersió en oli i una càmera DP72 (Olympus). Les imatges s'han processat amb el *plugin* per a ImageJ anomenat BudJ²⁴⁵, que determina el límit òptic de les cèl·lules a partir de la imatge en camp clar (hi ha un fort canvi de grisos en el límit de la cèl·lula), calcula el centre de l'el·lipsoide i els seus radis major i menor, i a partir d'això en calcula el volum segons l'equació $V=4/3 \cdot \pi \cdot R \cdot r^2$ corresponent a un prolat, que és el cos geomètric més semblant als llevats (com una pilota de rugbi).

6.2. Determinació de la concentració i localització nuclear de proteïnes i caracterització d'agregats per mitjà de microscòpia fluorescent

Quan volem estudiar una proteïna determinada a nivell de cèl·lula individual sota el microscopi ho fem en forma de fusió a una proteïna fluorescent (GFP²⁸² o mCherry²⁸³), així que podem seguir el seu estat dins la cèl·lula per microscòpia de fluorescència. Les cèl·lules es munten al cobreobjectes com s'ha indicat en l'apartat anterior i l'adquisició es fa preferentment amb l'equip AF6500 (Leica), objectiu 63x/1.3NA d'immersió en oli i amb el joc de filtres i dicroics adient, capturant les imatges amb una profunditat de píxel de 16bits. Un cop tenim les imatges, fem servir una extensió del *plugin* BudJ, que després de determinar els límits de la cèl·lula amb el canal de camp clar, busca en el canal de fluorescència dins aquell el·lipsoide. Així, com que un microscopi de camp ample capta tota la fluorescència que emet el llevat, podem determinar la concentració citoplasmàtica de qualsevol proteïna dividint el valor mitjà de fluorescència dins la cèl·lula (restant-hi la fluorescència emesa pel fons, calculada com la moda de tot el camp) pel radi menor²⁸⁴.

Per determinar la concentració nuclear, com que el valor de píxel en la zona del nucli pot ser influïda per el citoplasma situat sobre i sota el nucli, els càlculs són més complicats (Figura 36): el centre de gravetat dels píxels més brillants en la cèl·lula s'ha utilitzat com a centre d'un cercle projectat amb una àrea igual a l'esperada per al nucli (17% de l'àrea projectada de la cèl·lula)²⁸⁵, i la fluorescència mitjana dins aquest cercle és el que anomenem F_n ; després segons la fórmula descrita en la Figura 36, podem treure'n el rati de concentració entre nucli i citoplasma²⁶¹.

Per detectar la presència, mida i intensitat dels agregats, busquem agrupacions de píxels a partir d'una mida arbitrària i amb una intensitat de píxel que sigui un determinat percentatge superior al de la mediana de tota la cèl·lula; aquests paràmetres s'han de fixar empíricament segons el tipus d'agregat que vulguem buscar.



$$N/C = 1 + (F_r - \frac{3}{2}k) / (R_r - F_r \cdot R_r^3)$$

$$R_r = R_n / R_c$$

$$F_r = F_n / F_c$$

N/C – Nuclear to cytoplasmic concentration ratio

F_n – Average fluorescence in nucleus projected area

F_c – Average fluorescence in cell projected area

R_n – Nuclear radius

R_c – Cell radius

k – Correction factor in z axis

Figura 36²⁶¹:

A partir de les dimensions de la cèl·lula i les intensitats de fluorescència totals i nuclears que troba directament BudJ, determinem el rati de concentracions N/C corregint la fluorescència dins F_n que no correspon al nucli seguint la formula indicada. El factor k corregeix el radi cel·lular en l'eix vertical, i va ser determinat expressant GFP en cèl·lules salvatges.

6.3. Determinació de l'acidesa vacuolar mitjançant quinacrina

La quinacrina és una molècula lleugerament bàsica que s'acumula en entorns àcids de la cèl·lula i es torna fluorescent en el rang del verd, i que s'utilitza per determinar l'acidesa vacuolar en cèl·lules de llevat²⁸⁶. El procediment consisteix en recollir 1-2 ODs de cèl·lules creixent exponencialment en el medi adient, rentar-les en medi SC i tamponat amb 100mM HEPES pH7.6, incubar-les en el mateix medi tamponat amb HEPES i 200µM de quinacrina (Sigma) durant 10min a 30°C i, després de deixar-les 5min en gel; seguidament rentem 2 vegades amb 100mM HEPES pH7.6 + 2% de la font de carboni utilitzada i es posen en un cobreobjectes pretractat amb Concanavalina A per anar al microscopi (preferentment l'equip AF6500, objectiu 63x/1.3NA d'immersió en oli), i obtenir imatges durant els següents 30min com a màxim.

6.4. Microscòpia multiposició *time-lapse*

Per fer microscòpia *time-lapse* durant unes hores, les cèl·lules es planten en cambres de 35mm amb fons de vidre (GWST-3522, WillCo), prèviament tractades amb Concanavalina A (Sigma) i després omplertes amb 400µl de medi basat en SC, adquirint les imatges en el microscopi AF6500 (objectiu 63x/1.3NA d'immersió en oli) cada 2-5min (en funció de la resolució temporal que requereixi la mesura i/o del temps d'adquisició) i incubant a 30°C durant tot l'experiment. En cada camp i en cada fotograma s'autoenfoca segons un algoritme integrat en el software que controla el microscopi, que cal ajustar adequadament. Quan volem filmar les cèl·lules durant tot el procés d'envelliment fem servir unes cambres microfluídiques especials (com veurem en el punt 0), però pel que fa a la microscòpia tot es fa igual, excepte que les imatges les adquirim cada 10min ja que no necessitem tanta resolució temporal (la pel·lícula sencera dura 4-5 dies).

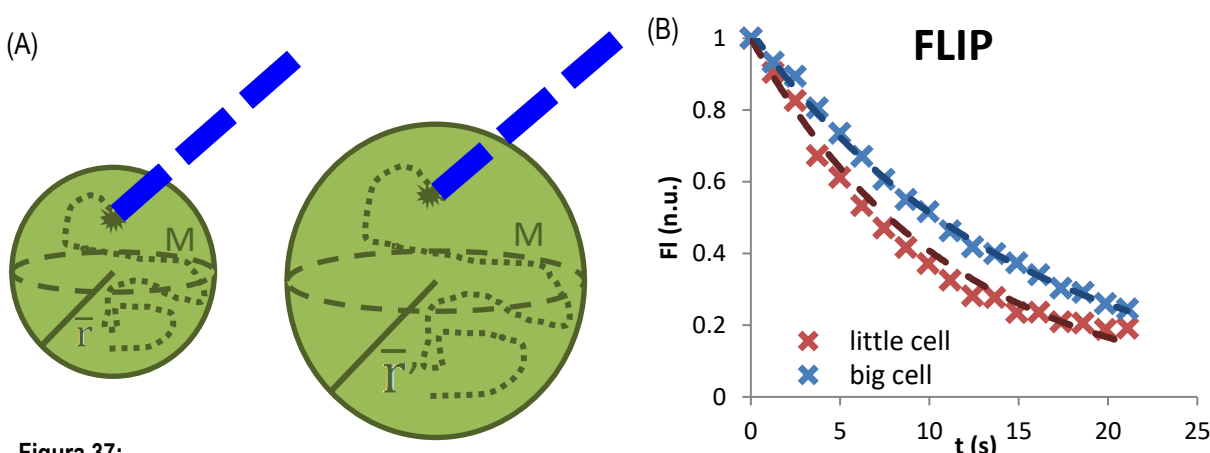
6.5. FLIP (*Fluorescence Loss In Photobleaching*)²⁸⁷⁻²⁸⁹

Una de les tècniques existents per mesurar la mobilitat de proteïnes dins la cèl·lula és la pèrdua de fluorescència per fotodesactivació (*Fluorescence Loss In Photobleaching*, FLIP). En altres paraules, s'utilitza una proteïna fusionada a una proteïna fluorescent, i a mesura que irradiem una petita zona de la cèl·lula amb el làser que excita la proteïna fluorescent a alta intensitat i repetidament, mesurem com evoluciona la intensitat de fluorescència a tota la cèl·lula. Aquesta irradiació a alta intensitat desactiva la fluorescència dels fluorocroms²⁹⁰ (fenomen que anomenem fotodesactivació), i com més mòbils siguin les proteïnes, més ràpidament passaran per la zona de fotodesactivació i més ràpida serà la caiguda de fluorescència.

Les imatges s'han obtingut amb un microscopi confocal d'escaneig LSM780 (Zeiss), amb l'objectiu de 40x/1.2NA, *pinhole* de 35µm i fent 10 irradiacions a una potència del 50% del làser 488 en cada cicle durant 30 cicles (interval·ls de 1.2s) en una àrea circular d'1µm de diàmetre; les imatges entre cicles de fotodesactivació s'han obtingut a una potència de làser baixa (0.5-2%) per tal de minimitzar la fotodesactivació extra durant l'adquisició, que es fa el més ràpid possible. La evolució de la intensitat de fluorescència al llarg del temps s'obté a partir de les imatges amb el *plugin* BudJ, com s'ha indicat en el punt 6.2.

Apart de la mobilitat pròpia de les molècules, un altre dels factors que poden afectar a la caiguda de fluorescència a nivell de tota la cèl·lula és la quantitat inicial de proteïna fluorescent (però això es pot corregir mesurant cèl·lules amb quantitats inicials de fluorescència similars, i després normalitzant les dades) i la mida de la cèl·lula, ja que si la zona de fotodesactivació la mantenim constant però la mida de la cèl·lula varia i la mobilitat és igual, en la cèl·lula més gran la caiguda de fluorescència serà més lenta (ja que les molècules de mitjana hauran de desplaçar-se una distància major per arribar a la zona de fotodesactivació)(Figura 37A-B).

Així, si la diferència de mides de les cèl·lules a comparar és significativa (com quan comparem cèl·lules joves amb cèl·lules envellides), aquest factor podria influir. Per tal de corregir-ho, vam fer servir la soca BF305 $\Delta cIns$ ²⁹¹ expressant GFP. Aquesta soca prolifera exponencialment en presència de



galactosa, però en presència de glucosa queda aturada en G1 i les cèl·lules creixen en mida indefinidament, sense proliferar. Així vàrem generar una població de cèl·lules amb mides cel·lulars en un rang molt ample (Figura 38A), per a analitzar l'efecte de la mida cel·lular en els resultats del FLIP. Assumim que la mobilitat de GFP hauria de ser independent de la mida de la cèl·lula. Després de normalitzar les dades per a que la fluorescència inicial sigui 1 en totes les cèl·lules, vàrem ajustar les dades d'intensitat de fluorescència en funció del temps a una equació de decaïment exponencial de la forma $F = F_0 \cdot e^{-k \cdot t}$, obtenint el paràmetre k per regressió exponencial i, d'altra banda, vàrem mesurar les dimensions de la cèl·lula. El paràmetre k és el que determina la velocitat de la caiguda de fluorescència, i és el que hem de corregir en funció de la mida de la cèl·lula, ja que en mostra una dependència clara (Figura 38B). Així, $k \propto M/r^n$, essent M la mobilitat real de la molècula, r el radi de la cèl·lula i n un paràmetre que connecta la mobilitat real M amb la observada k a través del radi. Per tant, fent logaritmes i reordenant termes tenim que $\ln k \propto \ln M - n \cdot \ln r$. Per regressió lineal de les dades de la soca BF305 vàrem obtenir que $n \approx 1$, indicant que per tal d'obtenir la mobilitat real hem de multiplicar la mobilitat observada pel radi (Figura 38C). D'aquesta manera, després de corregir, M ja no depèn de la mida de la cèl·lula (Figura 38D).

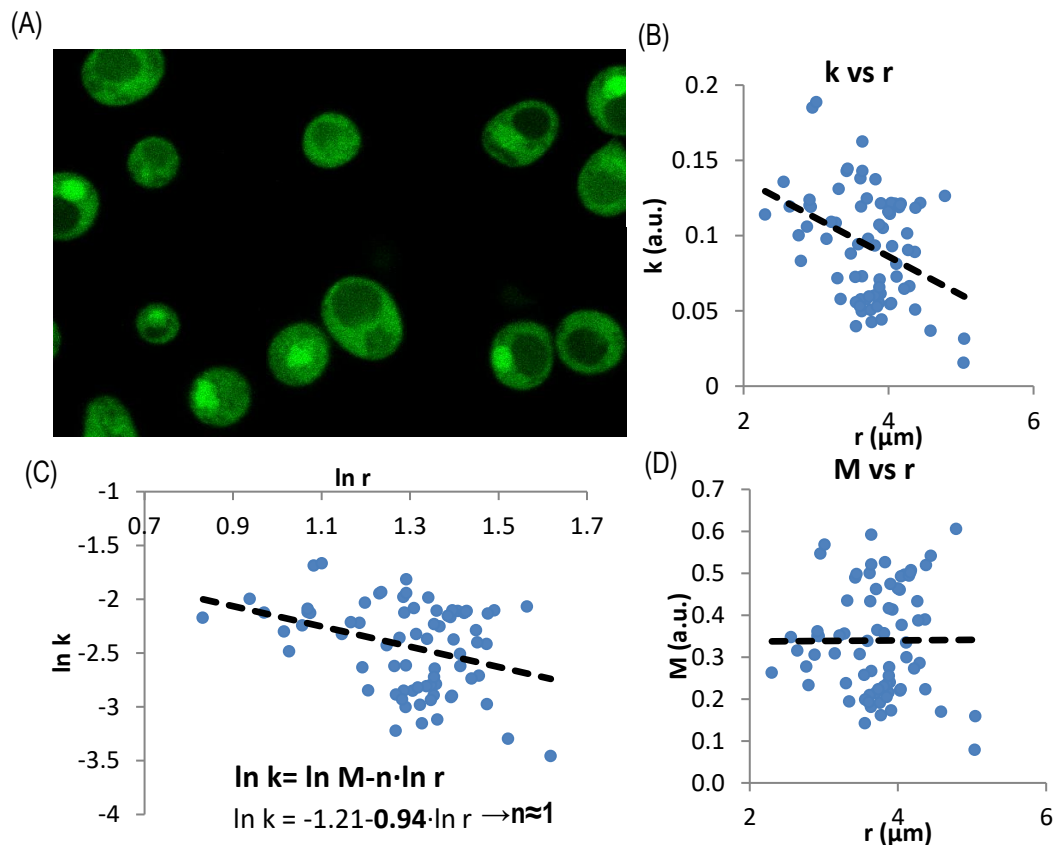


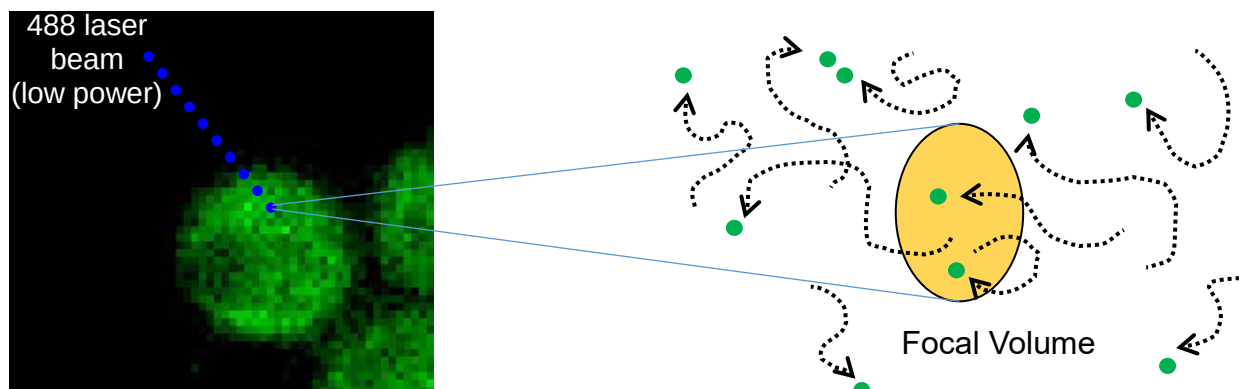
Figura 38:

- (A) Cèl·lules de la soca BF305 Δcns crescudes diferents temps en glucosa, obtenint un rang molt ample de mides
- (B) Gràfic de dispersió entre el factor de decaïment exponencial k obtingut a partir de l'ajust de les dades experimentals amb el radi de la cèl·lula, mostrant una clara dependència.
- (C) Gràfic de dispersió entre $\ln(k)$ i $\ln(r)$, d'on podem extraure que la relació entre el paràmetre estimat k i l'índex de mobilitat real M és de primer ordre en funció del radi.
- (D) Gràfic de dispersió entre l'índex de mobilitat M amb el radi de la cèl·lula, mostrant que després de fer la correcció, ja no existeix cap dependència de la mobilitat respecte al radi.

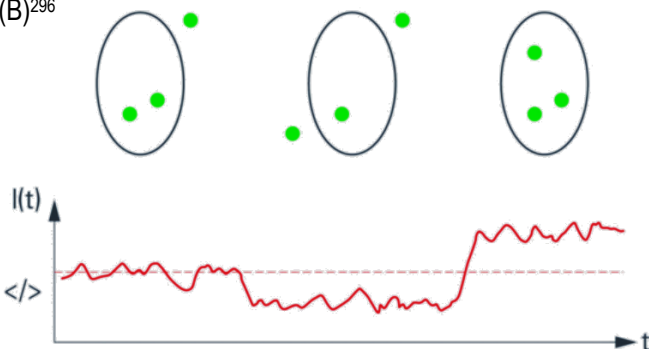
6.6. FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy)²⁹²⁻²⁹⁵

Una altra tècnica per mesurar la mobilitat de molècules fluorescents *in vivo* és l'espectroscòpia de correlació de fluorescència (*Fluorescence Correlation Spectroscopy*, FCS). En termes senzills, consisteix en comptar el nombre de molècules fluorescents que passen per un volum focal molt petit al llarg del temps excitant el fluorocrom amb el làser a baixa intensitat (per minimitzar la fotodesactivació durant l'adquisició, a més que no cal tenir moltíssima senyal per fer aquesta tècnica sinó més aviat al contrari), i a partir de les fluctuacions en la fluorescència que es produeixen en aquest volum focal podem deduir, entre d'altres factors, la mobilitat de les molècules (Figura 39A).

(A)



(B)²⁹⁶



(C)

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \cdot \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}$$

$G(\tau)$ – Autocorrelation function

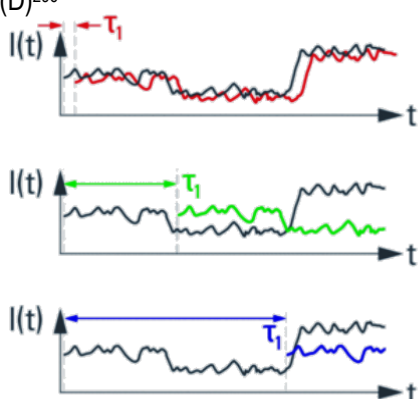
τ – Lag time interval

$I(t)$ – Counts at time t

$\delta I(t)$ – Count deviation from average at time t

$\delta I(t + \tau)$ – Count deviation from average at time $t + \tau$

(D)²⁹⁶



(E)²⁹⁶

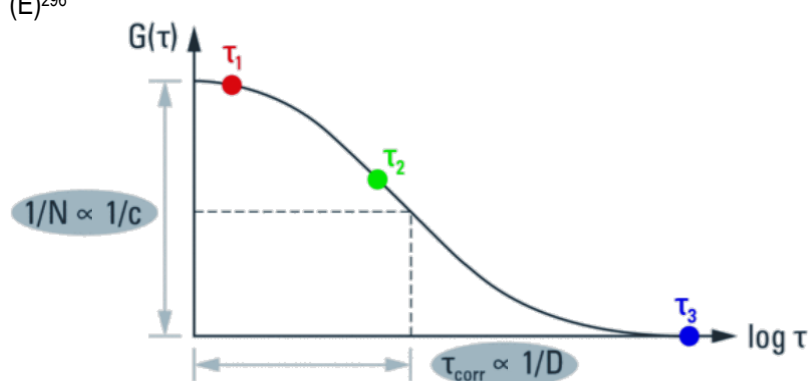


Figura 39:

(A-B) L'adquisició de l'espectre per a FCS s'obté amb el làser a baixa potència prenent dades d'un volum molt petit de la cèl·lula (volum focal), dins del qual es determina el nombre de fotons que s'hi emeten en cada moment.

(C) Fórmula per a calcular la funció d'autocorrelació a partir de l'espectre obtingut.

(D) Representació gràfica del càlcul de la funció d'autocorrelació movent l'espectre respecte ell mateix un determinat temps τ

(E) Valor d'autocorrelació de l'espectre calcular per a cada τ , com major és τ , menys autocorrelaciona l'espectre.

El detector ha de ser capaç de comptar fotons individuals i ha de fer-ho a una velocitat molt alta (de l'ordre de microsegons), i una concentració de fluorocrom massa alta pot fàcilment saturar-lo. Per solucionar aquest problema podem fer una prefotodesactivació per disminuir la concentració de fluorocrom, ja que això no afecta a la seva mobilitat. D'altra banda, les fluctuacions en la fluorescència a llarg termini (en el rang dels segons) a causa de moviment d'òrgànuls intracel·lulars o la pròpia fotodesactivació que es pot produir durant d'adquisició ha de ser corregida abans d'obtenir la funció d'autocorrelació. A partir de l'espectre que s'obté (simplificat en la Figura 39B, on es mostra un soroll associat al detector però on es poden diferenciar clarament 3 nivells en funció de quantes molècules hi ha dins del volum focal), i després de corregir-lo per fluctuacions a llarg termini, s'obté la funció d'autocorrelació (Figura 39C), és a dir es calcula la correlació entre l'espectre i ell mateix un cop traslladat un temps τ , i per a tots els τ possibles; així obtenim la funció $G(\tau)$: per a τ petits, els dos espectres encara s'assemblen molt i per tant la correlació és alta, mentre que a mesura que τ augmenta, la correlació cau (Figura 39D-E)²⁹⁶.

Evidentment els espectres reals són molt més complexos que els de la Figura 39B, i en podem veure un exemple en la Figura 40A. Les fluctuacions a llarg termini es corregeixen amb la tècnica del *boxcar*²⁹⁷. Breument, consisteix en agafar un grup de punts de l'espectre que abasti mig segon -un 10% del total de l'espectre- i calcular la mitjana d'intensitat, corregint els valors individuals per a que posteriorment la mitjana sigui 0; seguidament s'agafa un altre grup de punts que abasti el mateix temps però una mica més endavant en l'espectre i es repeteix la operació, i així fins que s'arriba al final de l'espectre; finalment es tornen a corregir tots els valors per a que la intensitat mitjana de l'espectre sigui

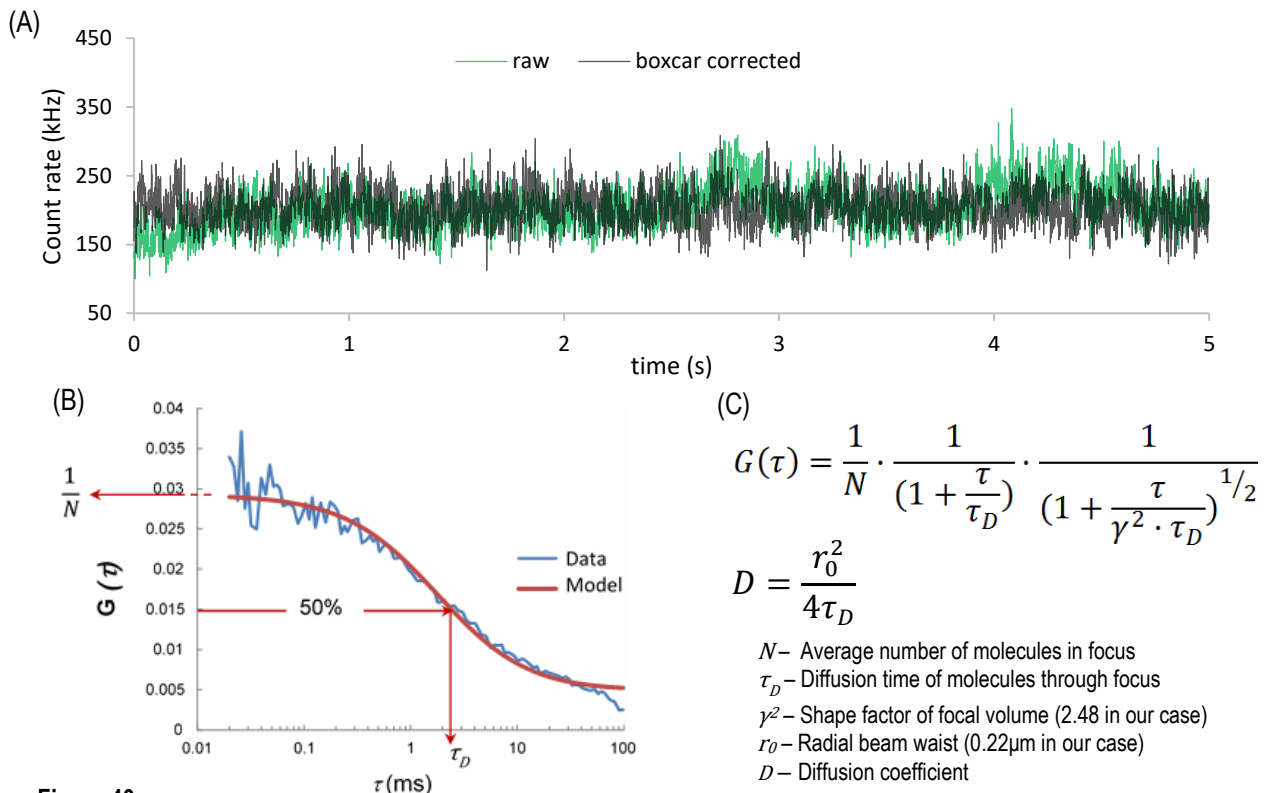


Figura 40:

(A) Espectre real obtingut a partir d'una cèl·lula de llevat expressant GFP: les dades crues es mostren en verd, mentre que les corregides amb la tècnica de *boxcar* es mostren en negre; s'aprecia que l'espectre corregit es manté més constant al voltant de la mitjana que el cru, cosa que ajudarà a l'hora d'ajustar les dades al model (sobretot en els τ més grans).

(B) Després de calcular la funció d'autocorrelació en funció de τ , ajustem el model de difusió simple a les dades, obtenint els paràmetres $1/N$ i τ_D .

(C) Formula del model de difusió simple al que ajustem les dades experimentals; a partir del τ_D obtingut (juntament amb alguns paràmetres estructurals del microscopi) es pot obtenir el coeficient de difusió D , en unitats de $\mu\text{m}^2/\text{s}$.

igual a la inicial i si la correcció que s'ha hagut d'aplicar és major a un percentatge que es fixa arbitràriament, descartem aquell espectre. La funció d'autocorrelació obtinguda com s'ha indicat anteriorment (Figura 40B) s'ajusta a un model matemàtic, el més senzill dels quals és l'indicat en la Figura 40C on s'assumeix difusió lliure. A partir de les dades de $G(\tau)$ per a cada τ podem trobar els paràmetres $1/N$ (G_0 : correlació quan $\tau=0$, ordenada a l'origen de la funció) i τ_D (τ quan $G=0.5G_0$). $1/N$ és l'invers del nombre de partícules fluorescents mitjà en el volum focal, i ens dona una idea de la concentració del fluorocrom; com major és la concentració, menor és la correlació inicial: és per això que no es pot aplicar FCS si la concentració de fluorocrom és massa alta. A partir de τ_D podem calcular directament el coeficient de difusió, si coneixem certs paràmetres estructurals del microscopi, com també s'indica en la Figura 40C. Evidentment, una cèl·lula viva no és tan simple com un tub d'assaig on hi tenim un fluorocrom en solució, que és la situació on assumir el model de la Figura 40C seria correcte, pel que existeixen altres models que assumeixen situacions més complexes (models de difusió anòmala, models de *binding* entre molècules, models de dos components, etc), que no tractarem aquí.

Els avantatges del FCS respecte altres tècniques com el FLIP és que és una tècnica menys invasiva, i per tant podem repetir mesures en la mateixa cèl·lula durant força temps (mentre que al FLIP caldria esperar a la síntesi de nou de la proteïna fluorescent per tornar-la a mesurar) i que és una tècnica que es pot fer a nivell molt local (ja que el volum focal és de l'ordre d'un femtolitre, i una cèl·lula de llevat haploide normal té uns 50fl de volum) i per tant no ens hem de preocupar de que la mida de la cèl·lula influeixi en el resultat (com en el FLIP). Això en part també és un inconvenient, ja que l'abast espacial d'aquesta tècnica és mínim (perquè requereix d'una resolució temporal altíssima) i si ens interessa saber que succeeix en diverses localitzacions d'una cèl·lula o en la cèl·lula a nivell global haurem de fer varies mesures, o passar a altres tècniques amb més resolució espacial com ara el RICS, que veurem en la següent secció. A més és una tècnica que requereix un microscopi amb components molt complexos i específics i també requereix d'un tractament matemàtic de les dades relativament complex.

Els espectres s'han obtingut amb un microscopi confocal d'escaneig LSM780 (Zeiss) que consta d'un arranjament de 32 fotomultiplicadors GaAsP capaços de comptar fotons únics i amb l'objectiu de 40x/1.2NA d'immersió en aigua, que està ajustat especialment per a l'obtenció d'espectres per a FCS. Abans de l'adquisició es fa una prefotodesactivació d'un segon de durada amb el làser 488 al 50% de potència, i l'adquisició es fa durant 5s amb el làser 488 al 0.5-1% de potència; el *pinhole* es fixa a 32 μ m. Abans de començar cada sessió, es centra el *pinhole* per maximitzar l'arribada de fotons al detector. A l'hora d'ajustar el model de difusió a la funció d'autocorrelació obtinguda a partir de l'espectre, fixem els límits de τ entre 0.01ms i 0.1s, que és el rang de temps on succeeixen els fenòmens de difusió molecular (en temps més curts afecten als estats quàntics dels electrons dels fluorocroms, i en temps més llargs poden afectar moviments de vesícules i altres orgànuls intracel·lulars o la pròpia fotodesactivació d'adquisició, encara que l'haguem corregit). Tot el procés de correcció de fluctuacions a llarg termini, càlcul de la funció d'autocorrelació i ajust del model de difusió simple a les dades s'ha fet amb els *plugins* per a ImageJ desenvolupats per Jay Unruh²⁹⁷. Un cop obtingut el paràmetre τ_D s'ha calculat D per a cada cèl·lula mesurada (descartant aquells valors on l'ajustament al model va ser molt deficient o que el valor de calculat D s'apartava respecte la seva mitjana més enllà del 95% de la població; a causa de la fotodesactivació prèvia a l'adquisició la dada provinent del paràmetre $1/N$ no és la fisiològica i no l'hem tinguda en compte.

6.7. RICS (*Raster-scan Image Correlation Spectroscopy*)^{298–300}

Com s'ha dit anteriorment, els inconvenients i/o limitacions del FCS són el pràcticament nul abast espacial (compensat per una altíssima resolució temporal i la possibilitat d'estudiar efectes a nivell molt local) i la necessitat d'un equip de microscòpia altament especialitzat. Per obtenir dades de mobilitat i estat d'agregació amb més abast espacial, existeixen tècniques com l'ICS³⁰¹ (*Image Correlation Spectroscopy*) o el N&B³⁰² (*Number and molecular Brightness*) que analitzen la fluctuació entre els píxels de piles d'imatges, però tenen el problema de no tenir prou resolució temporal com per seguir processos moleculars (depenent de la velocitat del microscopi, però com a poc és de l'ordre dels segons), així que només són vàlids per a l'estudi del moviment de compartiments cel·lulars o de complexes supramoleculars; per a aquest tipus d'anàlisis no és requereix d'equipament tan complex com per l'FCS: amb un microscopi confocal d'escaneig és suficient (tot i que és millor si també compta amb un detector capaç de comptar fotons; si no és així, el tractament matemàtic és més complex però es pot fer igualment).

Per combinar el millor de l'FCS (resolució temporal) i de l'ICS (resolució espacial), es va idear el RICS^{298,299}. Aprofita el fet que l'adquisició de les imatges en un microscopi d'escaneig es fa píxel a píxel i línia a línia, i que entre cada parell de píxels podem determinar una distància -i per tant un temps (Figura 41A³⁰³), i que és possible que si una molècula difon, la podem detectar més d'una vegada durant l'adquisició de la imatge (Figura 41B³⁰⁴), originant per tant una correlació entre píxels. Per tal d'analitzar aquesta possibilitat es calcula la funció d'autocorrelació de la imatge amb si mateixa desplaçant-la en

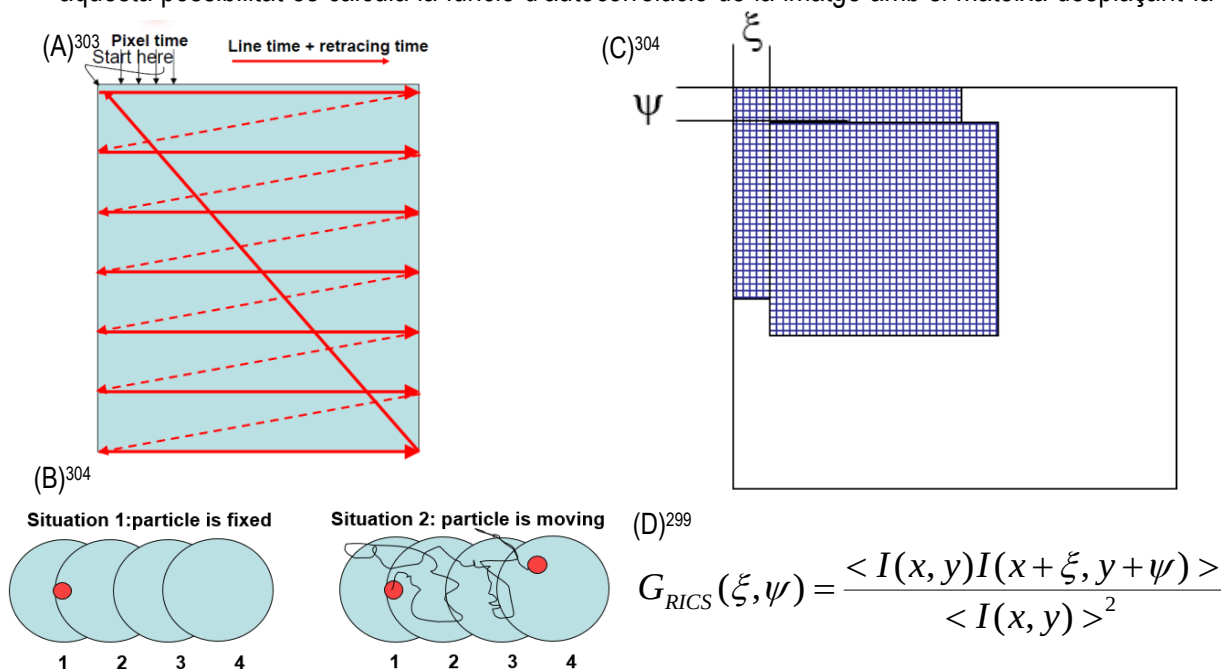


Figura 41:

(A) En un microscopi confocal d'escaneig, les imatges s'obtenen píxel a píxel i línia a línia a mesura que el làser recorre la mostra.

(B) Atès que l'adquisició no és instantània ni simultània en tots els píxels, és possible que la llum provinent d'una molècula en moviment en un píxel es torni a captar uns píxels més enllà, i per tant podem aprofitar la fluctuació en el valor de píxel al llarg de l'espai (i per tant també el temps) per extreure informació sobre la mobilitat de la molècula.

(C) Per tal de fer-ho, hem de calcular l'autocorrelació de la imatge amb si mateixa movent-la en les dues direccions espacials x i y diferents intervals ξ i ψ , anàlogament a el que es fa en FCS en una dimensió movent l'espectre en la direcció t diferents intervals τ .

(D) Equació per calcular la funció d'autocorrelació (ACF), que és anàloga a la de FCS però en dues dimensions; l'algoritme abans canvia la imatge en l'espectre de freqüències mitjançant la transformada ràpida de Fourier (FFT) per tal d'accelerar i simplificar els càlculs.

les dues direccions de l'espai (x i y) diferents intervals (ξ i ψ), anàlogament al que fem en l'FCS desplaçant l'espectre al llarg de l'eix temporal diferents intervals τ (Figura 41C³⁰⁴). La funció d'autocorrelació es calcula tal com s'indica en la Figura 41D. Pot calcular-se directament des de la imatge obtinguda, tot i que computacionalment és un procediment força lent; per contra, si s'aplica la transformada ràpida de Fourier (FFT, sigles angleses de *Fast Fourier Transform*) sobre la imatge per obtenir-ne l'espectre de freqüències el càlcul és molt més ràpid.

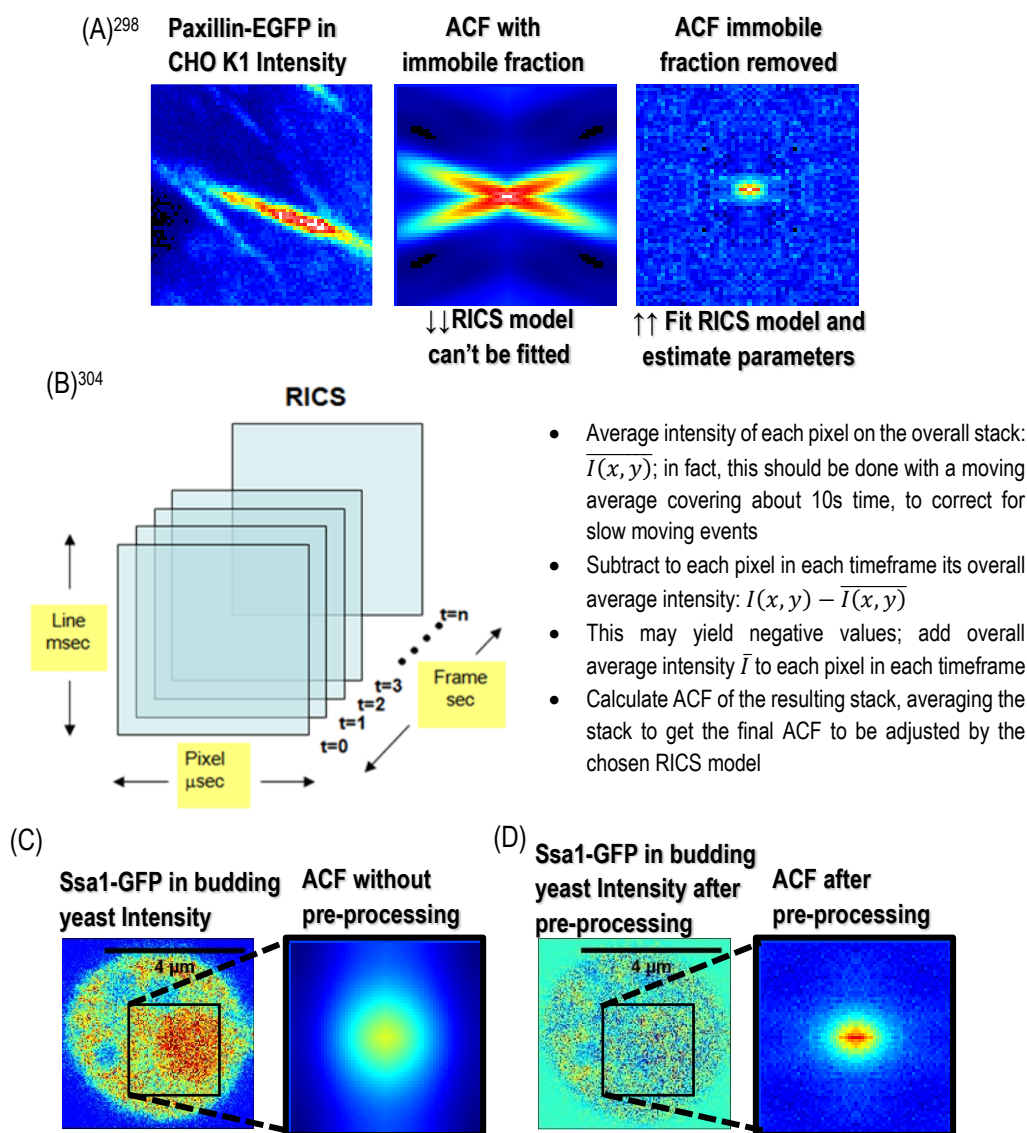


Figura 42:

(A) Abans de calcular la funció d'autocorrelació sobre la imatge, aquesta s'ha de preprocessar per tal d'eliminar la fluorescència que prové de la fracció immòbil de molècules marcades (o aquelles estructures cel·lulars que es mouen molt més lentament que les molècules en difusió, en el cas d'aquesta imatge una adhesió focal de paxilina).

(B) Aquest preprocessament es fa a partir d'una pila d'imatges (entre 50 i 100): obtenim mitjanes de cada píxel en el conjunt de fotogrames i restant aquesta mitjana al valor del píxel en qüestió per cada fotograma i sumant-hi la mitjana d'intensitat de tots els píxels de la pila d'imatges (per evitar valors de píxel negatius) obtenim una nova imatge llesta per a calcular-hi la ACF.

(C-D) Exemple en llevat de l'aparença d'una imatge abans i després de ser preprocessada, així com la ACF obtinguda a partir de cada una d'elles.

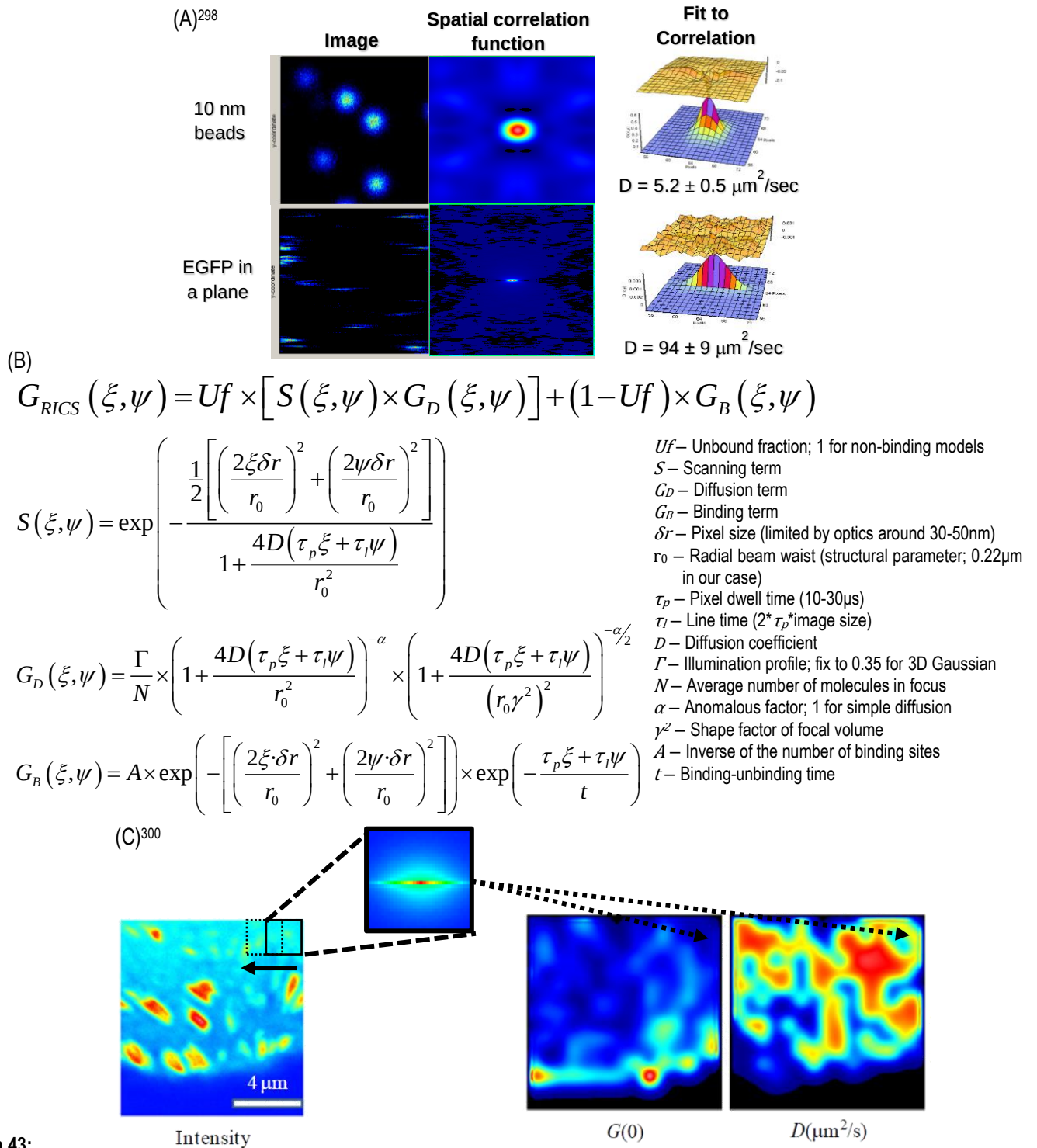


Figura 43:

(A) En simulacions amb condicions controlades, com ara *beads* fluorescents o GFP en un pla, és on és més fàcil modelar una equació que pugui relacionar les dades provinents de la ACF amb paràmetres de mobilitat d'aquests elements. De manera intuïtiva, com més aixafada apareix l'estructura central en la ACF (on l'autocorrelació és màxima), més de pressa es mou la molècula: la explicació intuïtiva és que com més ràpid es mou una molècula més improbable és trobar-la un altre cop en el píxel immediatament inferior respecte a trobar-la en el píxel immediatament a la dreta, ja que el temps entre píxels la direcció x és dos ordres de magnitud més curt que el temps entre píxels en la direcció y .

(B) Equació general del model de difusió i *binding* per a RICS: si no volem considerar situacions de *binding*, fixem $Uf=1$ i la equació es 'simplifica' al producte de S i G_D (el primer reflexa la probabilitat associada a captar la fluorescència de la mateixa molècula durant l'escaneig, si assumim que aquesta segueix una distribució de Poisson; el segon és anàleg al model de difusió utilitzat en FCS però adaptat a funcionar en dues dimensions, i l'exponent α serveix per a dotar el model d'un comportament anòmal excepte si el fixem a 1, on llavors assumim difusió simple).

(C) A partir d'una imatge adquirida (i convenientment preprocessada), podem prendre regions quadrades de dimensions $2^n \times 2^n$ píxels i calcular-ne l'ACF i els paràmetres de mobilitat i concentració, representant gràficament aquests paràmetres en les mateixes regions en uns mapes de D i G_0 (o $1/N$) i obtenir informació sobre la distribució espacial d'aquests paràmetres.

Quan estem treballant amb cèl·lules, de fet no és cert que puguem calcular la funció d'autocorrelació directament amb la imatge que obtenim al microscopi: en la cèl·lula poden haver-hi estructures immòbils o de moviment lent (com orgànuls o vesícules intracel·lulars, Figura 42A primer panell) la senyal dels quals produeix una funció d'autocorrelació aberrant i impossible d'ajustar a cap model de difusió molecular disponible (Figura 42A segon panell). Per tant cal corregir les imatges inicials per poder obtenir una ACF adequada per a ajustar-hi un model (Figura 42A tercer panell). Per fer això, cal obtenir una pila d'imatges (entre 50 i 100) de la mostra biològica que vulguem analitzar, que es fa servir per detectar patrons de moviment lent o nul i eliminar-los de les dades originals (Figura 42B-D). Un cop tenim la funció d'autocorrelació calculada, és el moment d'ajustar-hi un model de difusió per tal d'obtenir els paràmetres de mobilitat (Figura 43A²⁹⁸). Es recomana començar pel model més senzill possible (Uf i $\alpha=1$) i si el model no s'ajusta prou bé a les dades experimentals podem començar a introduir nous paràmetres en el model per millorar-lo, sempre i quan hi hagi una fonamentació plausible des del punt de vista biològic, com ara els models amb difusió anòmala, amb un component associat al *binding* o amb ambdós fenòmens (Figura 43B³⁰⁴).

Si les estimacions dels paràmetres de mobilitat són prou robustes i la nostra imatge té prou nombre de píxels, podem fins i tot obtenir un mapa de G_0 i D prenent petites porcions quadrades de la imatge (per facilitar els càlculs, amb un nombre de píxels per costat que sigui una potència de 2 (mínim 16, com més gran més fiables seran les dades estimades però menys resolució espacial tindrem). D'aquesta manera, obtenim informació sobre la distribució en l'espai dels diferents paràmetres de mobilitat, fet que ens pot revelar en quins llocs de la cèl·lula està succeint quelcom, mentre que amb la imatge original hagués estat impossible de deduir (Figura 43C). Però l'obtenció d'un mapa de D només tindria interès si esperéssim comportaments locals mantinguts en el temps total d'adquisició, i no és el nostre cas. Tot i així podem calcular una ACF a partir d'una àrea que cobreixi bona part de la cèl·lula i que ens doni informació sobre els paràmetres de mobilitat a nivell global, i comparar-los entre les diverses condicions experimentals que tinguem.

Les piles d'imatges per a mesurar paràmetres de mobilitat mitjançant RICS s'han obtingut amb un microscopi confocal d'escaneig LSM780 (Zeiss) que consta d'un arranament de 32 fotomultiplicadors GaAsP capaços de comptar fotons únics i amb l'objectiu de 63x/1.3NA d'immersió en aigua. Les imatges fan 256x256px, amb una mida de píxel de 35nm, una profunditat de píxel de 8bits i un *dwell time* (equivalent a τ_p) de 12.61µs. La intensitat del làser es va fixar pràcticament al mínim (0.05% de potència, la proteïna analitzada és molt abundant i el detector se satura molt fàcilment), amb un *pinhole* de 35µm. Per cada cèl·lula a analitzar es van prendre 100 fotogrames, un cada 2 segons. Per fer el preprocessament i eliminació de la fracció immòbil primer de tot cal passar les imatges a 32bits; es va fer amb un *moving average* cada 5 fotogrames (10s), mantenint la mitjana espacial.

Seguidament es va seleccionar una regió en la pila d'imatges processades de 64x64px, íntegrament dins la cèl·lula, i es va calcular l'ACF mitjançant FFT. Després es va procedir a obtenir el perfil de l'ACF per a $\psi=0$ ($G_{RICS}(\xi, 0)$); aquesta corba és més senzilla d'ajustar al model que no pas ajustant la funció bidimensional sobre el conjunt de l'ACF, ja que l'algoritme per aquest ajust complex és molt inestable (almenys sobre les dades). El preprocessament i la obtenció de l'ACF i els perfils per a $\xi=0$ s'han obtingut mitjançant els *plugins* per a ImageJ escrits per Jay Unruh²⁹⁷. Finalment, s'han agrupat els perfils de totes les cèl·lules de cada grup d'estudi i se n'ha obtingut la mitjana, i aquesta mitjana és la que s'ha ajustat als diferents models de difusió disponibles per a RICS fent servir el Solver integrat en Microsoft Excel, iterant les dades predites pel model fins que es minimitza el sumatori de la diferència

de quadrats entre els valors predits pel model i les dades experimentals³⁰⁵; ajustant els valors dels paràmetres D i N (també α i U_f si estem ajustant models de difusió anòmla i/o *binding*). Per tal d'estimar la incertesa dels paràmetres obtinguts per regressió no lineal, es va fer mitjançant un mètode tipus Monte Carlo: a partir del valor de G_{RICS} obtingut per una determinada combinació de D i N es generen 1000 simulacions que es distribueixen normalment al seu voltant, i amb aquest grup de 1000 simulacions es tornen a ajustar els valors de D i N per a que es minimitzi el sumatori de les seves respectives diferències de quadrats³⁰⁶. El percentil 2.5% i 97.5% dels valors obtinguts conformen l'interval de confiança per als paràmetres obtinguts inicialment.

7. Separació i anàlisi de cèl·lules per citometria assistida per fluorescència (FACS)

Gràcies als citòmetres separadors podem separar poblacions de cèl·lules en funció de diversos marcatges fluorescents a la vegada gràcies als làsers i el sistema fluídric i de portes magnètiques que tenen els citòmetres, o podem simplement analitzar la complexitat d'una mostra a partir dels paràmetres que ens proporcionen els citòmetres analitzadors:

- Hem fet servir ConcanavalinaA-AlexaFluor647 (Life Technologies) a 200µg/ml en tampó P (PBS 1X + 2% font de carboni) per tenyir la paret de les cèl·lules durant 30min a temperatura ambient i en foscor, després rentant la tinció amb tampó P dos cops i deixant-les créixer en medi fresc durant dues hores per esperar que neixin les cèl·lules filles, que no estaran marcades (com s'ha dit, la paret no difon a la filla sinó que es sintetitza nova). Hem fet servir això per separar de la població les cèl·lules filles conjuntament amb la fusió a GFP de pèptids priònics, seleccionant les cèl·lules negatives pel canal 647nm (que hem definit com el 10% de les cèl·lules amb menys senyal) que mostraven més senyal de GFP (el 10% de cèl·lules amb més senyal en el canal 488nm, que són majoritàriament les que tenen agregats priònics formats dins), amb el citòmetre separador Aria SORP (Becton Dickinson). Després vam mesurar la velocitat de creixement en G1 d'aquestes cèl·lules sota el microscopi mitjançant microscòpia *time-lapse*, així com el seu volum de gemmació.
- Hem fet servir Estreptavidina-AlexaFluor405 (Life Technologies) a 7.5µg/ml juntament amb iodur de propidi (PI, Sigma) a 1µg/ml durant 30min a 4°C en la foscor en PBS 1X (el PI es posa només durant els últims 5min) per seleccionar les cèl·lules envellides de la soca MEP marcades amb biotina abans de començar l'envelliment i que encara són viables després de 12h d'envelliment (les cèl·lules viables expulsen el iodur de propidi de dins seu i no estan tenyides) i que expressaven agregats priònics fusionats a GFP (per tant positives al canal de 405nm i 488nm i negatives al de 561nm) amb el citòmetre Aria FUSION (Becton Dickinson), que disposa del làser 405nm (el SORP no); Després vam mesurar el volum de gemmació d'aquestes cèl·lules.
- Per mesurar la proporció de cèl·lules en cada fase del cicle cel·lular mitjançant citometria i tinció de DNA amb iodur de propidi en cèl·lules envellides s'ha fet bàsicament tal i com està descrit^{307,308} (fixació amb etanol, resuspendre amb tampó 1xSSC -150mM de clorur sòdic i 15mM de citrat sòdic a pH 7- i tractar amb RNAsa 0.2mg/ml una hora a 50°C i després amb proteïnasa K 0.1mg/ml també una hora a 50°C, sonicar i tenyir amb PI) amb la modificació de que abans de posar a envellir les cèl·lules, aquestes s'han marcat amb biotina i que després, durant la tinció amb PI (a 5µg/ml durant 30min a temperatura ambient en la foscor) també s'afegeix Estreptavidina-AlexaFluor405 a 10µg/ml. Afortunadament, el tractament amb proteïnasa K no destrueix completament la paret cel·lular i

encara tenim una senyal prou bona provinent de la marca amb biotina unida a estreptavidina. Els llevats derivat de les soques MEP s'han envellit durant 24 o 30h abans de la fixació. Les suspensions de cèl·lules s'han analitzat amb un citòmetre analitzador Gallios (Beckman Coulter), i s'han obtingut els perfils de quantitat de DNA en el canal de 561nm, mentre que amb el de 405nm hem pogut distingir quines eren les cèl·lules que havien estat envellit de la resta de la població.

8. Construcció i utilització de cambres de microfluídica fetes de PDMS per a l'estudi de l'envelliment de llevats sota el microscopi

Deixant de banda el MEP, existeixen altres aproximacions que no requereixen de la modificació genètica d'alguna soca de llevat, sinó que estan basades en la retenció de les cèl·lules mare en microestructures de PDMS (polidimetil siloxà, Dow Corning), un polímer transparent i inert que permet la fabricació de cambres de microfluídica on s'hi poden introduir cèl·lules i després filmar-les sota el microscopi per *time-lapse*. Aquestes cambres tenen estructures més o menys complexes segons el propòsit per a que s'han enginyat, podent consistir des d'un canal simple per alimentar les cèl·lules que hi creixen a sota, fins a dissenys molt més complexos amb diversos canals en paral·lel amb microestructures per atrapar les cèl·lules.

La fabricació d'aquestes cambres comença amb la fabricació capa a capa d'un motlle fet d'un material fotoresistent anomenat SU8 (MicroChem) amb una tècnica anomenada fotolitografia: el SU8 es reparteix gràcies a un *Spin coater* (com més de pressa es faci girar, més fina queda la capa de SU8) sobre una superfície de vidre i posteriorment es posa una màscara a sobre la capa de SU8 i s'irradia amb llum UV: en les zones on la màscara deixa passar la llum, el SU8 s'endureix i la resta del material es renta; després es pot posar una altra capa de SU8 del gruix que pertoqui i es repeteix la fixació del material fotoresistent amb una altra màscara i la llum UV (per tal de que totes les mascarees de cada capa quedin alineades, es fa servir un *Mask-aligner*; les mascarees poden ser d'acetat o de crom: les de crom donen una major resolució a l'hora de fabricar estructures molt petites, però són més cares i lentes de fabricar), i així successivament fins que acabem de fabricar el nostre motlle. Després aquest es silanitza per a que sigui més resistent (tot i que aquest motlle és molt fràgil i no es pot fer servir gaires vegades abans que es faci malbé), i es cobreix amb PDMS (mesclat amb agent curant SYLGARD 184, Dow Corning, en una proporció 10:1 i posteriorment desgasificat), incubant-ho durant 90min a 80°C en un forn. El PDMS sobrant s'elimina i s'enretira amb molta cura el bloc final de PDMS del motlle de SU8³⁰⁹. Per tal de fer un motlle més resistent, podem col·locar la peça de PDMS dins un recipient amb resina epòxid per a transferir el relleu que hi ha en el PDMS en negatiu a la resina; un cop endurida la resina (2h a temperatura ambient), s'obté un motlle equivalent al fabricat amb SU8 però molt més resistent i que no cal silanitzar³¹⁰. Un cop obtinguda la peça de PDMS, es fan els orificis per a als tubs per on fluïrà el medi i s'uneix el PDMS a un cobreobjectes sonicat en un bany químic amb acetona primer i isopropanol després -15min cada tractament, i assecat després amb gas nitrogen a pressió; la superfície de PDMS a unir al cobreobjectes també es neteja amb etanol i s'asseca amb nitrogen a pressió. La unió del PDMS al cobreobjectes es fa mitjançant activació de les superfícies amb un *Plasma Cleaner* i fent pressió suau en tota la superfície de contacte.

8.1. Cambra YC-1 per al creixement de llevats en monocapa^{311,312}

Aquesta cambra està pensada per a fer créixer en monocapa cèl·lules de llevat havent-hi intercanvi de medi per mitjà d'un canal central per on passa medi de cultiu continuament; el concepte és força semblant a les cambres de fons de vidre de 35mm, amb l'avantatge de que aquí les cèl·lules no poden créixer en totes les direccions de l'espai (fet que en facilita el manteniment del focus durant seguiment sota el microscopi) i que les podem fer créixer durant més temps (ja que el medi sempre és fresc) i fins i tot podem canviar-lo durant l'experiment. Aquesta cambra es va idear en el laboratori del Dr. Frederik Cross (Rockefeller University)³¹¹, i posteriorment va ser comercialitzada per Warner Instruments³¹². Consisteix en un suport per adaptar la cambra a la platina del microscopi, un cobreobjectes recobert d'una capa molt fina de PDMS, una membrana de diàlisi de cel·lulosa, el bloc de PDMS que té el canal per on passa el medi i una tapa de metacrilat que es cargola a la base per a mantenir tot el conjunt unit hermèticament (Figura 44A). Les cèl·lules es planten sobre el cobreobjectes recobert de PDMS i tractat amb Concanavalina A com s'ha descrit abans, i al damunt s'hi posa la membrana de cel·lulosa, tal que les cèl·lules queden entre PDMS i cel·lulosa, però el medi pot difondre-hi perfectament des del canal que s'hi col·loca al damunt. El medi (prèviament filtrat i amb antibiòtics) s'introdueix en la cambra des d'una xeringa connectada a una agulla de 18G i a través d'un tub de polietilè (1.57mm de diàmetre extern i 1.14mm de diàmetre intern, proporcionat pel fabricant) que entra al canal de PDMS per un connector metàl·lic, fent servir una bomba per a xeringues (PumpSystems Inc.) a un cabdal de 10µl/min. Pel que fa a la microscòpia, es fa tal com s'ha descrit en el punt 6.4. En la Figura 44B es mostra un esquema de la secció longitudinal de la cambra, amb un detall d'on es troben les cèl·lules.

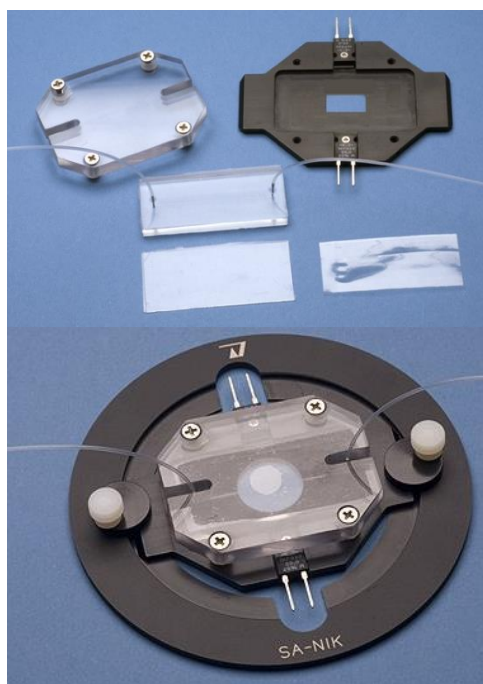
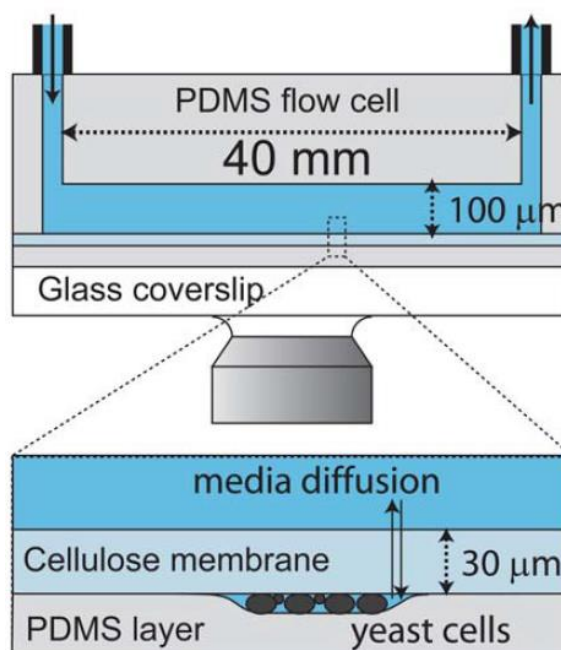
(A)³¹²(B)³¹¹

Figura 44:

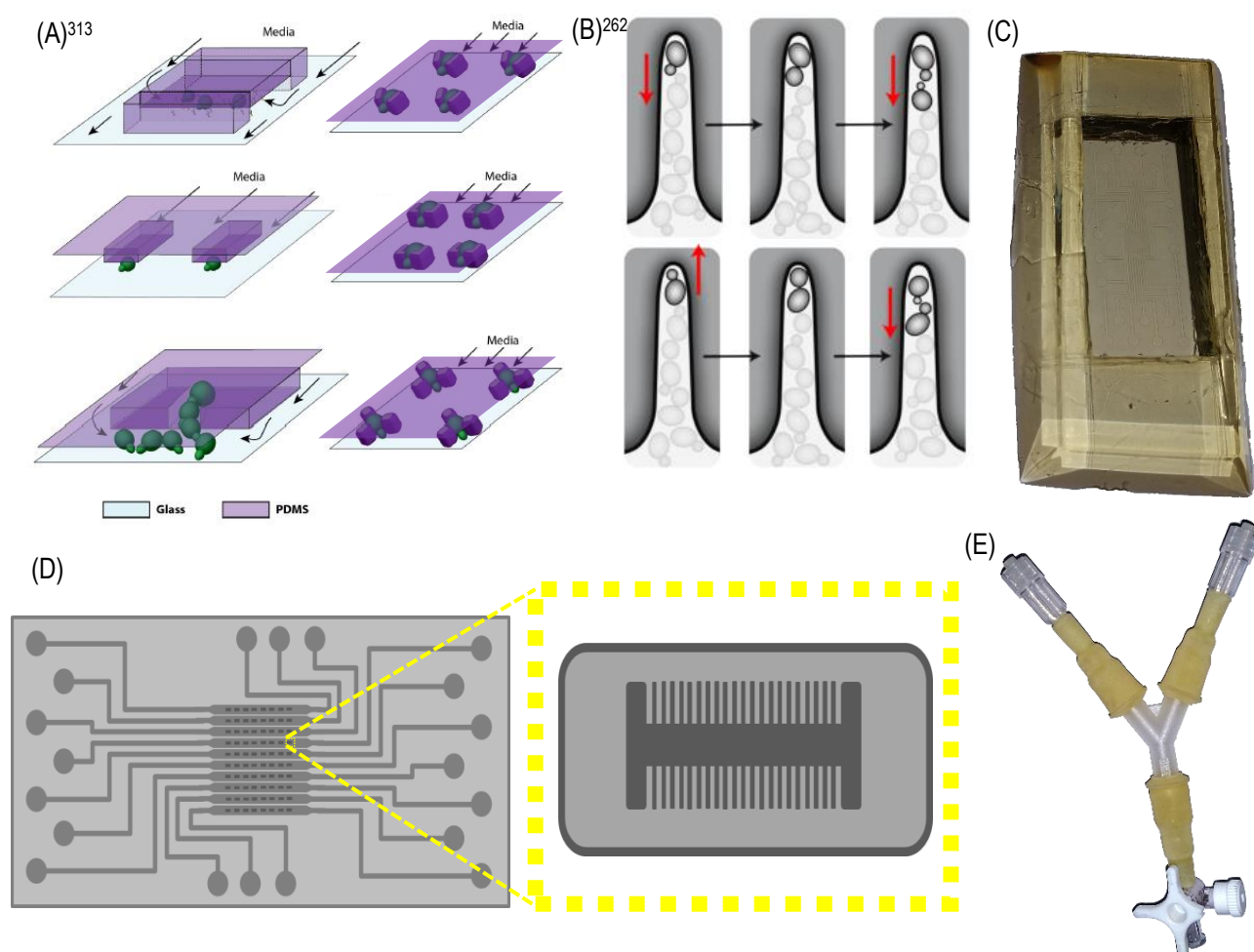
(A) La cambra YC-1 està formada per diverses peces: un cobreobjectes recobert amb PDMS, una membrana de cel·lulosa, una peça de PDMS on hi ha el canal, i una base i una tapa per mantenir-ho tot junt mitjançant 4 cargols. (B) Les cèl·lules es planten sobre el PDMS del cobreobjectes (previ tractament amb Concanavalina A), i es separen del canal per on passa el medi de cultiu amb una membrana de cel·lulosa, que permet la difusió del medi però les cèl·lules estan aïllades del flux directe.

Els avantatges d'aquesta cambra són que la peça amb el canal de PDMS es pot netejar i reutilitzar, però, donat que el sistema és estanc per a les cèl·lules, només és adient per a cultius d'un dia com a màxim o amb el sistema MEP. Cal aplicar-hi certa pressió per garantir la estanqueïtat del sistema però una excessiva pressió impedeix el flux de medi i pot originar estrès mecànic sobre els cèl·lules.

8.2. Cambres per a la retenció de cèl·lules mare i estudi del RLS

En els darrers anys han aparegut cambres per a retenir cèl·lules mare de llevat i cultivar-les durant la seva vida replicativa amb dissenys força diferents (Figura 45A³¹³): des d'un molt simple basat en una zona d'alçada limitada i una superfície funcionalitzada amb BSA-biotina i avidina, que reté preferent cèl·lules mare prèviament marcades amb biotina⁴², fins a d'altres consistents en petites estructures dissenyades per a retenir una única cèl·lula mare^{314–316}, passant per un parell de dissenys molt semblants (van ser publicats els dos pràcticament a la vegada independentment) consistents en un seguit de *micropads* que creen zones on el sostre del canal d'alimentació és just una mica menys que la mida d'una cèl·lula, i quan entra a pressió es deforma una mica el PDMS, la cèl·lula entra sota el *micropad* i queda atrapada^{51,317,318}. Després de varies proves, finalment vàrem optar per un sistema que consisteix en unes cavitats d'amplada limitada on, ja que els llevats mostren un patró de gemmació axial, la cèl·lula mare queda atrapada al seu extrem tancat²⁶². En col·laboració amb el Dr. Gilles Charvin (*Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire*, Estrasburg) hem pogut establir una versió més eficaç d'aquest sistema, anomenat CLiC (*Cell Loaded into a Cavity*²⁶², Figura 45B,C). Aquest disseny disposa de 10 canals independents, cadascun dels quals disposa de 8 zones de retenció de cèl·lules, i en cadascuna d'aquestes zones hi ha un total de 40 cavitats (Figura 45D). Idealment aquest disseny permet estudiar l'envelliment en 10 condicions en paral·lel (medis i/o soques diferents). Per tal de comparar dues condicions en paral·lel, el cabdal proporcionat per una xeringa acoblada a una bomba de flux es divideix en dos per mitjà d'un adaptador en forma de Y fet amb claus de 3 vies i peces soltes d'equips d'administració de sèrum (cortesia de Fernando Moreno, Hospital Santa Maria – Lleida, Figura 45E).

En aquest sistema la connexió dels tubs d'alimentació és directa al PDMS, fent servir tubs Tygon® ND 100-80 (1.52mm de diàmetre extern i 0.51mm de diàmetre intern, VWR), que per l'altra banda es poden connectar amb agulles de 23G. Les cèl·lules es carreguen per el que posteriorment serà la sortida de medi, passant-les a una xeringa d'un mil·lilitre i introduint-les prement l'èmbol manualment amb cura. El cabdal es fixa a 17.5µl/min per canal, i el medi amb antibiòtics es filtra abans d'injectar-lo dins la cambra, per evitar que petites impureses obturin els canals. La cambra microfluídica es fixa a la platina del microscopi amb massilla adhesiva. Les imatges s'adquireixen durant uns 4 dies prenent imatges de tots els camps cada 10min. Aquesta cambra té un parell de limitacions: una és que la impossibilitat d'emprar cèl·lules diploides perquè tenen un patró de gemmació bipolar, ni tampoc certes soques de la família W303, ja que algunes tenen mutat el gen *BUD4*, fet que els fa perdre el patró de gemmació axial³¹⁹. Tot i el patró de gemmació axial, amb certa freqüència la cèl·lula mare es desplaçada per la filla, el que fa necessari partir de 320 cavitats per a poder obtenir dades de 50-100 cèl·lules mares fins la seva mort replicativa.

**Figura 45:**

(A) Aproximacions existents per a retenir cèl·lules mare de llevat desenvolupades en els darrers 5 anys.

(B) La que hem fet servir és la basada en les cavitats on les cèl·lules mare són espenyades al fons per les seues filles, aprofitant el patró de gemmació axial de les cèl·lules haploides²⁶²: CLiC.

(C) Mòtle, en forma de resina epòxid, d'un model millorat d'aquesta aproximació.

(D) Esquema de la cambra de microfluídica utilitzada: té canals individuals per fins a 10 condicions experimentals diferents i té les cavitats ordenades de manera que totes quedin el més a prop possible. D'aquesta manera, prenent imatges en 16 camps i si totes les cavitats es comporten com s'esperaria i retenen una cèl·lula mare relativament aviat, podríem filmar unes 320 cèl·lules per canal. Realment estem al voltant de a un 30% d'eficiència, però les imatges que en surten són força bones i pel que volem analitzar tenim prou dades.

(E) Per alimentar cèl·lules en dos canals simultàniament amb una sola xeringa fem servir un divisor de flux en forma d'Y.

IV. Resultats

1. Efectes de la presència d'agregats prionics sobre el control del cicle cel·lular i la dinàmica de xaperones

1.1. Disseny, construcció i caracterització de seqüències prioniques fusionades a GFP sota *GALp* en un vector per a llevat

Per induir l'estat prionic d'una proteïna amb potencialitat de formar agregats amiloides, una de les maneres és superexpressar el pèptid prionic en qüestió. Per això vam clonar el domini prionic de Sup35 (aminoàcids 1-123¹⁴³, Sup35^N) en el vector YCpGAL-GFP³²⁰ (vector centromèric per a llevat amb GFP sota el promotor condicional *GALp*), fusionant-hi el domini prionic en l'extrem N-terminal de GFP. A partir de la seqüència salvatge del domini prionic de Sup35 (ric en Q i N), es van dissenyar 3 noves variants per a que perdessin la capacitat de forma prions, (que vam anomenar Sup35^{Nm1}, Sup35^{Nm2} i Sup35^{Nm3}), substituint per residus carregats (D/K) algunes glicines (G) i tirosines (Y) (Figura 46A). A la vegada també es van clonar en el mateix vector les seqüències dissenyades *in silico* sPFD1 i cPFD1¹⁶⁸. Al introduir aquests vectors en llevats de la soca W303-1A i induir la expressió dels pèptids prionics, es va quantificar a partir de microscòpia el nombre de cèl·lules que mostraven agregats segons quina seqüència prionica expressaven (Figura 46B). Tant la variant salvatge de Sup35 com el prió sintètic fa que més de la meitat de cèl·lules mostrin agregats visibles, i a les variants del prió Sup35 el nombre d'agregats disminueix fortament, tot i que en Sup35^{Nm1} i Sup35^{Nm2} encara es pot trobar alguna cèl·lula que mostri agregats clars; en la variant amb més mutacions (Sup35^{Nm3}) cap de les cèl·lules analitzades conté agregats visibles. Ja

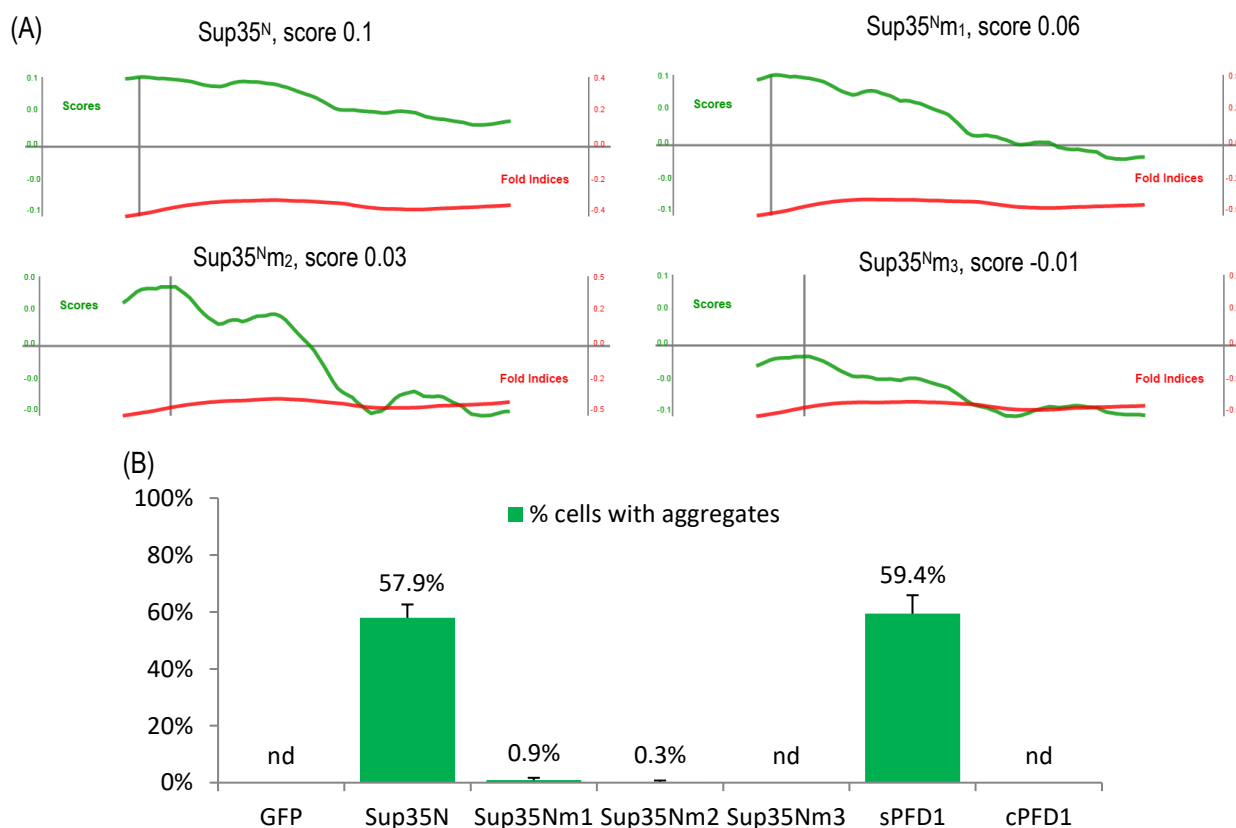


Figura 46:

(A) Predicció del software PAPA de l'índex de plegament (roig) i la puntuació de predisposició prionica (verd) de Sup35N i els mutants que hem dissenyat; el punt de tall en la puntuació per predir si un pèptid serà prionic o no es situa al voltant de 0.05; les seqüències d'aminoàcids completes es troben en l'annex.

(B) Quantificació del percentatge de cèl·lules que presenten agregats visibles amb la seva fusió a GFP; es van analitzar unes 300-400 cèl·lules per condició. Les barres d'error indiquen l'interval de confiança del percentatge ($\alpha=0.05$).

que volíem obtenir un control intern per al prió Sup35^N, vam decidir -nos per la variant Sup35^{Nm3} per a continuar amb els següents experiments.

Posteriorment es va analitzar la presència d'agregats formats per les nostres construccions per SDD-AGE, immunodetectant les proteïnes en la membrana amb l'anticòs α -GFP (Roche) (Figura 47A). Observem la existència de formes de alta mida molecular en els carrils de Sup35^N i sPFD1, que són les formes amiloides, mentre que en els carrils de cPFD1 i Sup35^{Nm3} només s'hi detecten formes d'alta mobilitat (en el cas de Sup35^{Nm3} pot ser que formi petits oligòmers, però no fibres amiloides). El percentatge de cèl·lules que mostren agregats visibles (Figura 46B) és proper al 50%, tot i que en el SDD-AGE no s'hi veuen espècies monomèriques o oligomèriques. És a dir que en les cèl·lules on no hi veiem agregats ja hi ha petites fibres amiloides no prou grans per veure-les al microscopi. La mobilitat d'aquestes espècies dins la cèl·lula mitjançant FLIP (Figura 47B), és molt menor en les cèl·lules que mostren agregats visibles de Sup35^N o sPFD1; en les cèl·lules amb el pèptid prionic però que no mostren agregats visibles, la mobilitat es veu poc afectada si ho comparem amb el control (tot i que en el sPFD1 la reducció de la mobilitat és més significativa), mentre que en els pèptids control la mobilitat és semblant a la de GFP (que és totalment soluble).

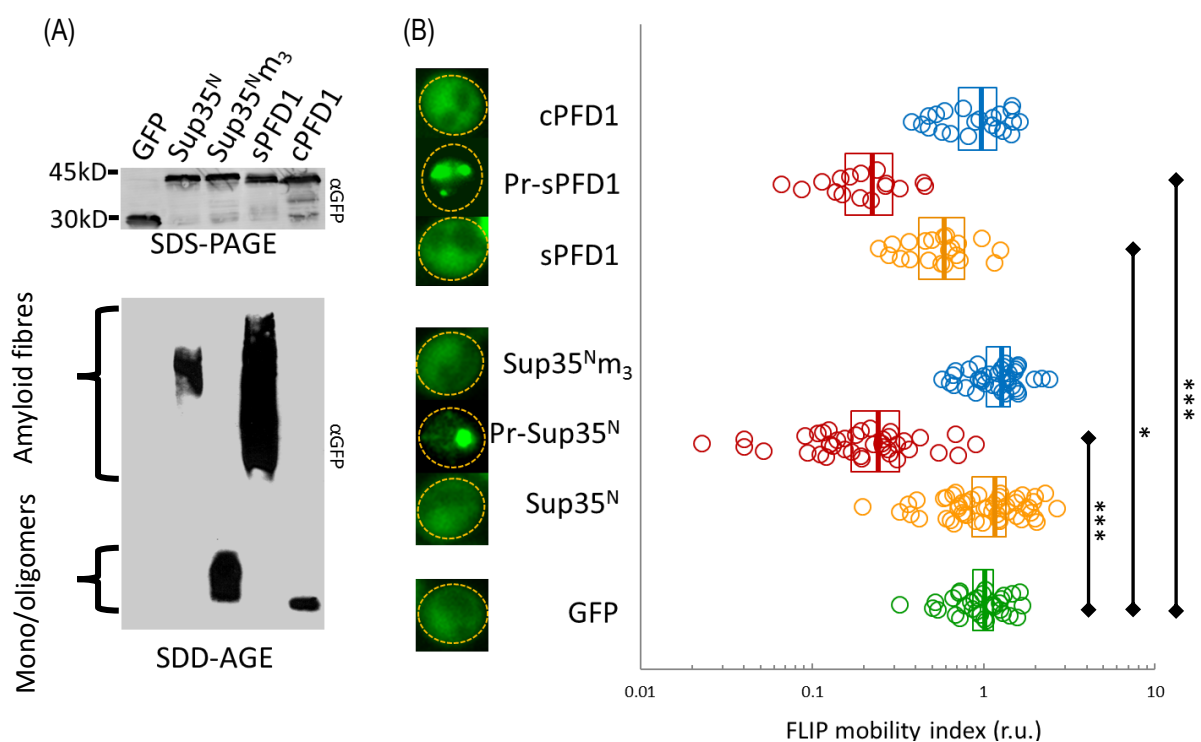


Figura 47:

(A) Western blot contra GFP; en el panell superior les mostres es van desnaturalitzar i córrer en un SDS-PAGE, per veure els nivells d'expressió dels constructes; en el panell inferior les mostres es van mantenir en forma nativa i córrer en un SDD-AGE, per poder resoldre les fibres amiloides dels monòmers i oligòmers.

(B) Índex de mobilitat per FLIP dels diferents pèptids prionics (fusionats a GFP) dins la cèl·lula; en les cèl·lules amb agregats, a l'hora de fer fotodesactivació el làser es va col·locar on no hi havia l'agregat; els cercles indiquen l'índex calculat per cèl·lules individuals, mentre que la línia gruixuda és la mitjana de cada grup, i la caixa indica els intervals de confiança ($\alpha=0.05$); tots els índex individuals han estat relativitzats per la mitjana de mobilitat de GFP; eix d'abscisses en escala logarítmica. *: T-test_{p-value}<0.05; **: T-test_{p-value}<10⁻³; ***: T-test_{p-value}<10⁻⁵

També hem comprovat quin és l'efecte de superexpressar xaperones a la vegada que expressem els dos pèptids prionics (el natural o el sintètic). Per això disposem d'un vector centromèric on hi tenim clonats Ydj1 i Ssa1 sota el promotor bidireccional *GALp*; al cap de 24h de coexpressió del pèptid prionic amb les dues xaperones es va quantificar el percentatge de cèl·lules amb agregats visibles en cada condició. Veiem una reducció clara en la formació d'agregats si superexpressem xaperones a la vegada que els prions (Figura 48A), però les cèl·lules que superexpressen prions durant tant de temps tenen formes estranyes: gemmes allargades i cèl·lules amb molta vacuola (Figura 48B). Així, tot i que aquesta superexpressió de xaperones redueix parcialment la formació d'agregats, alguns altres mecanismes cel·lulars es deuen desregular, i per això tenim aquests fenotips de formes cel·lulars aberrants.

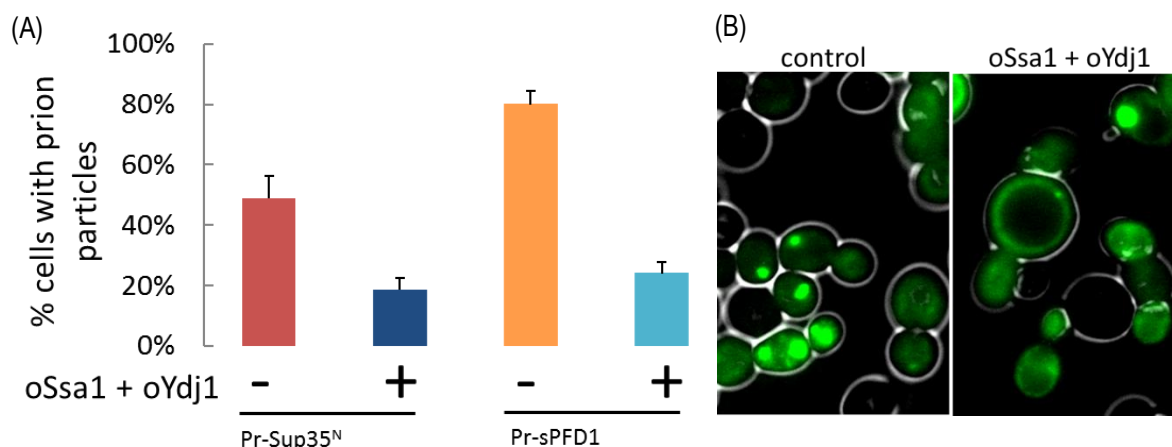


Figura 48:

(A) Quantificació del nombre de cèl·lules que tenen agregats prionics visibles després de 24h d'expressió del pèptid prionic, coexpressant a la vegada Ydj1 i Ssa1 sota el *GALp* (+) o amb un vector buit (-); les barres d'error indiquen l'interval de confiança del percentatge; en cada condició es van analitzar unes 200-300 cèl·lules.

(B) Mostra representativa de cèl·lules expressant sPFD1-GFP després de 24h de coexpressió de les xaperones (o no).

1.2. Efectes dels agregats prionics en la fase G1 del cicle cel·lular en cultius exponencials

Hem mesurat el volum de gemmació en cultius exponencials de cèl·lules de la soca W303-1A transformades amb els vectors que expressen condicionalment les fusions dels pèptids prionics amb GFP (Figura 49A), i hem observat que les cèl·lules que tenen agregats amiloides visibles gemmen amb un volum un 20-30% superior que els controls (tant les que expressen GFP com les que expressen cPFD1 o Sup35^{Nm3}); en les cèl·lules que porten els pèptids prionics però no tenen agregats visibles l'increment és molt petit i poc significatiu; aquest increment en el volum de gemmació ens indica que hi ha un retard en l'execució de Start. Els dos models prionics han produït uns efectes molt similars i, ja que el prió de Sup35 pot afectar a la terminació traduccional, vam decidir seguir el nostre treball amb el model del prió sintètic, que és totalment heteròleg i no té per què afectar específica i directament la funció de cap proteïna del llevat.

Per estudiar detingudament l'efecte durant l'entrada d'un primer cicle en presència o absència d'agregats, hem aïllat cèl·lules filles amb agregats. Com s'ha dit, hi ha molts mecanismes que eviten que els agregats passin de les cèl·lules mare a les filles, i per tant hi ha poques filles que en tinguin. Per aconseguir-ho, hem marcat amb ConcanavalinaA-AlexaFluor647 la paret de les cèl·lules d'un cultiu exponencial expressant el prió, i després de deixar-ho créixer i que neixin noves cèl·lules (que no estaran marcades amb

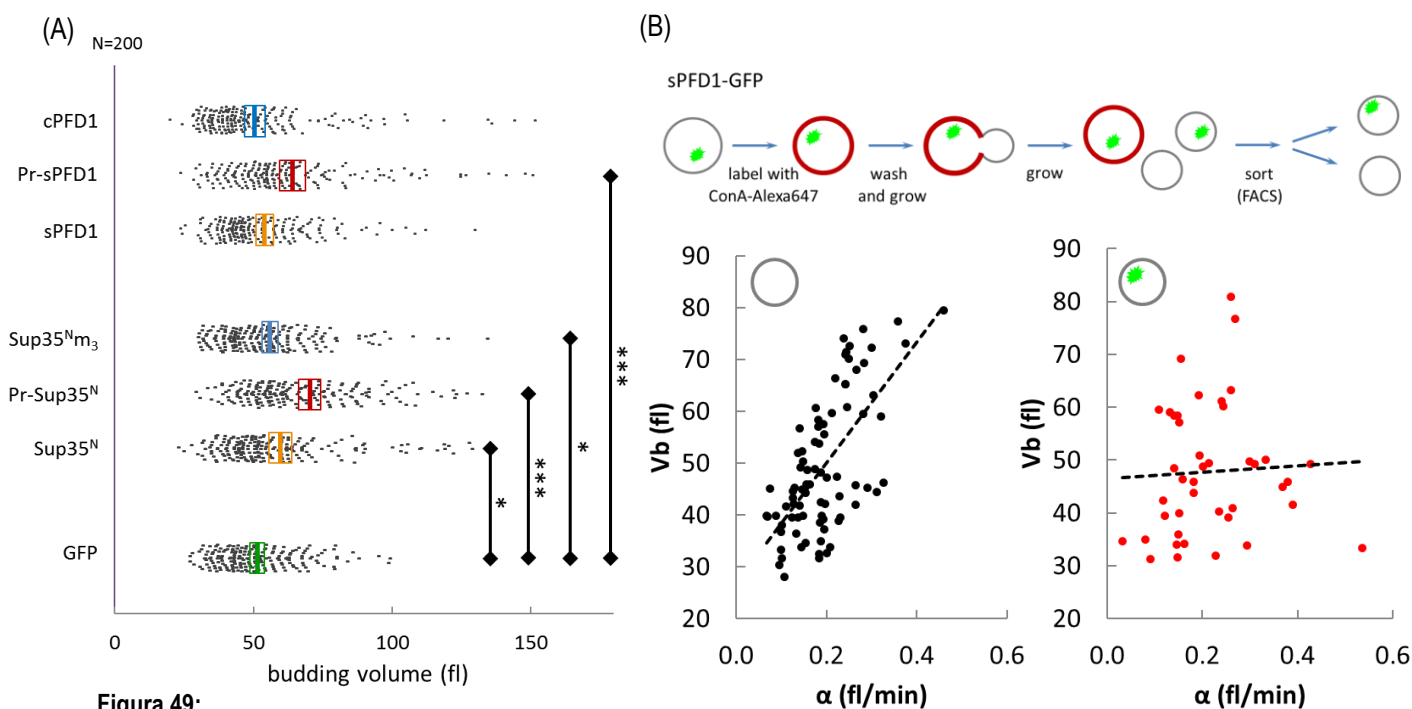


Figura 49:

(A) Volum de gemmació en cultius exponencials de cèl·lules que han estat expressant durant ~15h els diferents pèptids fusionats a GFP; els punts indiquen el volum de gemmació de cèl·lules individuals, mentre que la línia gruixuda marca la mitjana de la població, i la caixa marca els intervals de confiança ($\alpha=0.05$). *: T-test_{p-value}<0.05; **: T-test_{p-value}<10⁻³; ***: T-test_{p-value}<10⁻⁵.
(B) Esquema de l'aproximació experimental per aïllar cèl·lules recent nascudes amb o sense agregats de sPFD1-GFP, i correlació entre volum de gemmació i velocitat de creixement durant G1 (α) en cèl·lules amb agregats (dreta) o sense (esquerra).

ConcanavalinaA-AlexaFluor647), hem seleccionat per FACS les cèl·lules negatives per AlexaFluor647 (les noves filles), i dins d'aquestes hem separat el 10% de cèl·lules amb més senyal de GFP d'una banda (que molt probablement tenen un agregat format) de la resta. Després hem mesclat les dues poblacions per a que al final hagin el 50% de cèl·lules de cada grup en la mescla final, i aquestes cèl·lules s'han seguit sota el microscopi per microscòpia *time-lapse*, mesurant a partir de les imatges la seva velocitat de creixement durant G1 i el volum de gemmació, i classificant-les segons es detecti l'agregat o no per microscòpia (en el FACS no hi ha prou resolució per dir si la senyal de GFP ve d'un agregat o de tota la cèl·lula). Veiem que en les cèl·lules sense agregat, hi ha una correlació clara entre velocitat de creixement i volum de gemmació, però en les cèl·lules que tenen un agregat, no hi ha cap tipus de correlació (Figura 49B). Això indica que la presència d'agregats està afectant al mecanisme que coordina el creixement de la cèl·lula amb l'execució de Start, de manera similar al que succeeix amb cèl·lules sense Ydj1²⁴⁵.

1.3. Disponibilitat de xaperones en presència d'agregats amiloides

Tenint en compte la funció de les xaperones, consistent a unir-se a proteïnes desplegadas o mal plegades i ajudar-les a plegar-se bé i sovint associades a estructures macromol·leculars com el translocó, la mobilitat de les xaperones dins la cèl·lula podria ser un indicador inversament proporcional a la seva disponibilitat^{261,321}, ja que quan estan ocupades i unides a clients i/o complexes macromol·leculars, la seva difusió ha de ser necessàriament més lenta segons la llei del moviment brownià³²². Per comprovar si la mesura de la mobilitat respon a la disponibilitat de xaperones, vam tractar les cèl·lules amb AZC³²³, un anàleg de la prolina que s'incorpora a les proteïnes i causa problemes de plegament ja que l'angle de gir que l'AZC atorga al pèptid és diferent al de la prolina). En mesurar per FLIP la mobilitat de Ssa1 i Ydj1 fusionades a GFP abans i després del tractament, vàrem detectar una caiguda clara en la mobilitat de les xaperones en les cèl·lules tractades amb AZC, indicant-nos que les xaperones es mouen més lentament

quan estan més ocupades, i que per tant la mesura de la mobilitat és un bon indicador de la seva disponibilitat (Figura 50).

A continuació vam procedir a l'anàlisi de la mobilitat de Ydj1 i Ssa1 sota expressió dels pèptids prionics (aquest cop fusionats a mCherry, ja que les xaperones les tenim fusionades a GFP). Primer vam mesurar-ho per FLIP (Figura 51A), per a determinar la mobilitat de la proteïna a nivell global de la cèl·lula. En primer lloc, vàrem observar que la mobilitat de la GFP és molt més elevada que les xaperones, diferència que hauria de ser molt menor si només fos deguda al pes molecular, i és indiferent a que hi hagi o no agregats; en el cas de Ydj1-GFP hi ha una reducció de la mobilitat en les cèl·lules amb l'agregat prionic, tot i que la diferència és tot just significativa (t-test $p_{\text{value}}=0.023$); en el cas de Ssa1, veiem una reducció clara en la mobilitat en cèl·lules amb agregats. D'altra banda, aquesta xaperona s'acumula especialment allà on hi ha els agregats prionics (Figura 51B), i on la seva mobilitat és encara menor (Figura 51A Ssa1-GFP cyt vs Ssa1-GFP agg). En el cas de Ydj1 no veiem una acumulació clara de la xaperona sobre els agregats en les imatges, indicant que si existeix una interacció entre Ydj1 i agregat, aquesta és molt més dinàmica que amb Ssa1. Ara bé, en analitzar la mobilitat a nivell local fent servir FCS, observem que en l'agregat hi ha una caiguda clara en el coeficient de difusió de Ydj1 respecte a cèl·lules sense agregats o en cèl·lules amb agregats però mesurant localment una regió lliure d'agregats (Figura 51C), mentre que el coeficient de difusió de GFP no es veu afectat en cap dels casos.

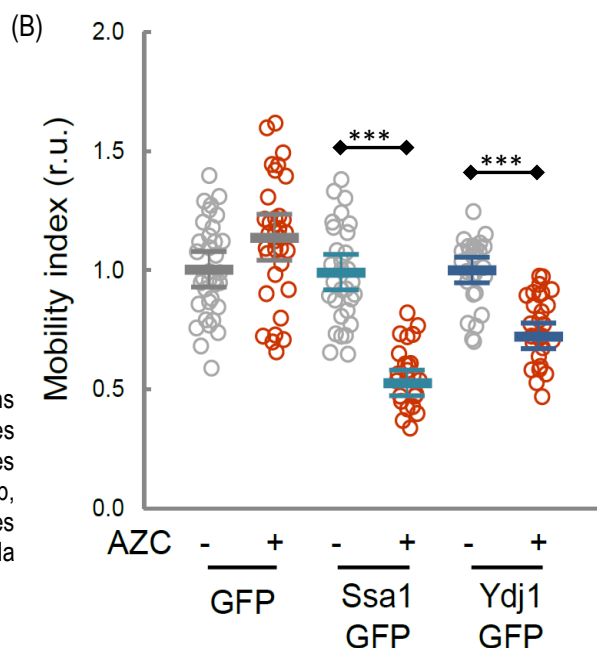
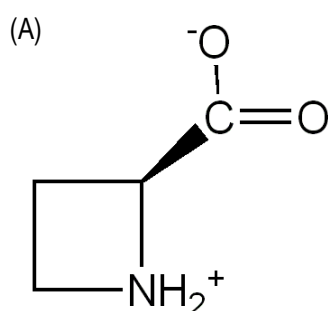


Figura 50:

(A) Estructura química de l'AZC (Azetidine-2-carboxylic acid)
 (B) Índex de mobilitat de les diferents proteïnes analitzades abans (-) i després (+) de tractar-les amb AZC (10mM, 30min després d'afegir-lo). Els cercles indiquen l'índex calculat per cèl·lules individuals, mentre que la línia gruixuda és la mitjana de cada grup, i les barres d'error són l'interval de confiança ($\alpha=0.05$); les dades de mobilitat de cada proteïna s'han relativitzat per la mitjana de la mobilitat d'aquella proteïna sense tractament amb AZC.

*: T-test $p_{\text{value}} < 0.05$; **: T-test $p_{\text{value}} < 10^{-3}$; ***: T-test $p_{\text{value}} < 10^{-5}$

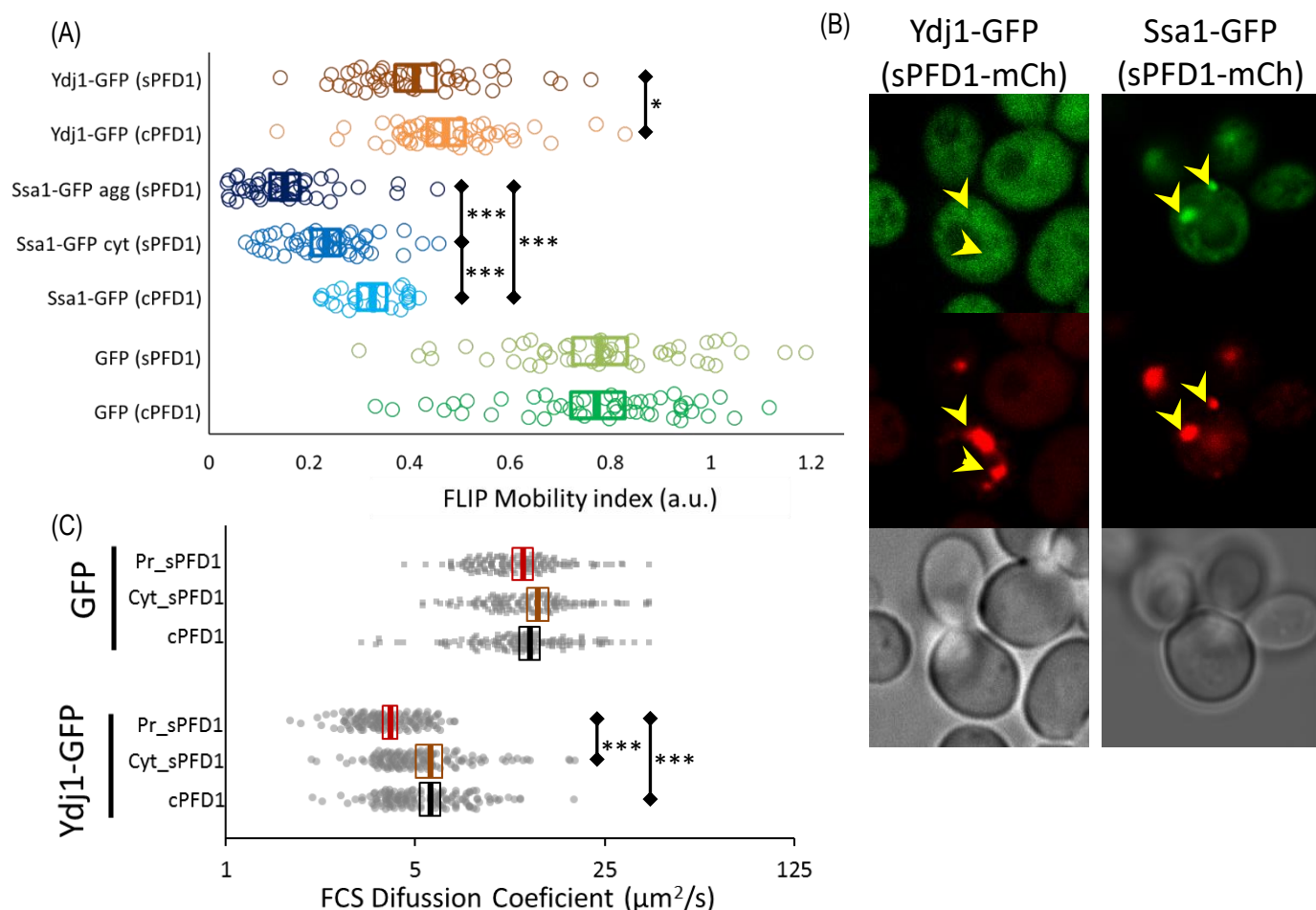


Figura 51:

(A) Índex de mobilitat per FLIP de les diferents xaperones (fusionades a GFP) dins de cèl·lules expressant cPFD1 o sPFD1 fusionades a mCherry; en les cèl·lules amb agregats de sPFD1-mCherry, a l'hora de fer fotodesactivació el làser es va col·locar on no hi havia l'agregat; els cercles indiquen l'índex calculat per cèl·lules individuals, mentre que la línia gruixuda és la mitjana de cada grup, i la caixa indica els intervals de confiança ($\alpha=0.05$).

(B) Microscòpia confocal de cèl·lules amb Ydj1 o Ssa1 fusionades a GFP (verd) i expressant agregats de sPFD1-mCherry (roig).

(C) Coeficients de difusió calculats per FCS de GFP o Ydj1-GFP en cèl·lules expressant agregats de sPFD1-mCherry, mesurant la mobilitat tant dins de l'agregat (Pr_sPFD1) com en una altra regió del citoplasma (Cyt_sPFD1), o en cèl·lules expressant cPFD1-mCherry; els punts indiquen el coeficient de difusió calculat en cada cèl·lula individual mentre que la línia gruixuda és la mitjana de cada grup, i la caixa indica els intervals de confiança ($\alpha=0.05$); eix d'abisses en escala logarítmica.

*: T-test_{p-value}<0.05; **: T-test_{p-value}<10⁻³; ***: T-test_{p-value}<10⁻⁵

1.4. Acidesa vacuolar en presència d'agregats amiloides

Com s'ha introduït, tant l'acumulació de dipòsits proteics com la pèrdua d'acidesa vacuolar són dos dels fenotips associats a les cèl·lules envellides; per això vàrem analitzar l'acidesa vacuolar en cèl·lules joves on hem induït l'aparició d'agregats, emprant la fluorescència verda de la quinacrina com a indicador de l'acidesa vacuolar en cèl·lules expressant cPFD1 o sPFD1 fusionats a mCherry (Figura 52A-B). En les cèl·lules amb agregats hi ha una reducció clara de la fluorescència de quinacrina, indicant que les vacuoles d'aquestes cèl·lules són menys àcides del que els correspon per l'edat, tot i que la pèrdua no és tan clara com la que s'observa en cèl·lules envellides més de 15 generacions³⁹.

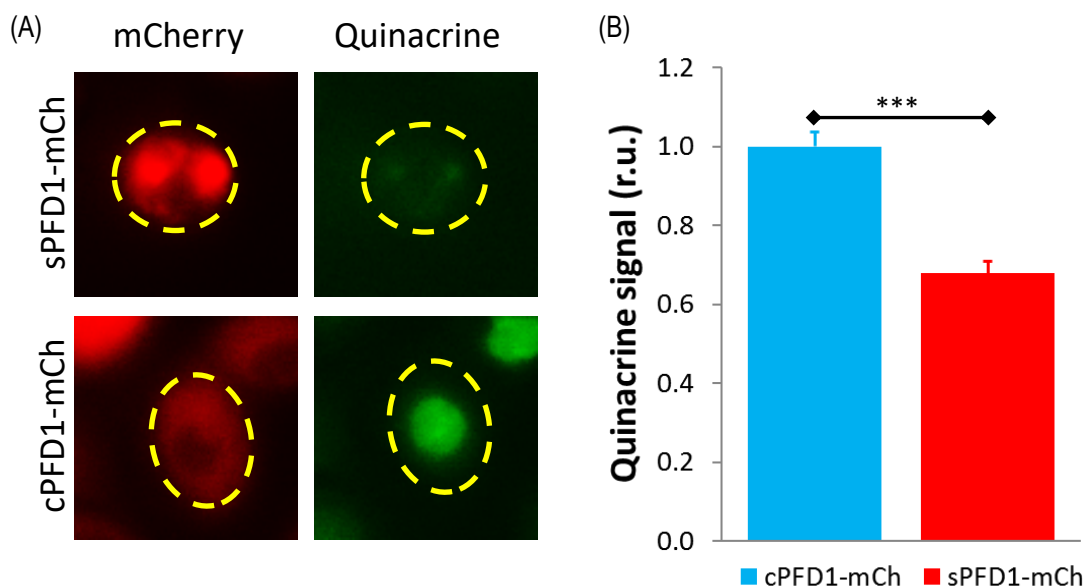


Figura 52:

(A) Mostra de cèl·lules expressant sPFD1-mCherry o cPFD1-mCherry amb la senyal vacuolar de la quinacrina en funció de l'acidesa d'aquesta.

(B) Mitjana de la fluorescència de quinacrina en els dos tipus de cèl·lules; les barres d'error indiquen l'interval de confiança ($\alpha=0.05$); els valors de fluorescència s'han fet relatius a la mitjana de la condició control (cPFD1-mCherry).

*: T-test_{p-value}<0.05; **: T-test_{p-value}<10⁻³; ***: T-test_{p-value}<10⁻⁵

2. Efectes dels agregats prionics en el RLS i en el control del cycle cel·lular en llevats durant l'envelliment

2.1. Volum de gemmació i temps d'interdivisió en cèl·lules envellides expressant el pèptid prionic sintètic

En els experiments descrits anteriorment treballàvem amb cultius exponencials de llevat on s'hi havia induït la expressió dels pèptids prionics durant una nit (5-6 generacions), però la fracció de cèl·lules d'aquesta edat en el cultiu és molt petita (menys del 5%) mentre que un 75% de cèl·lules han fet una o ninguna generació. Per tal de veure que succeeix en cèl·lules envellides, doncs, hem de fer servir altres aproximacions. El primer fenotip que vam observar en cèl·lules joves quan expressàvem el pèptid prionic era que augmentava el seu volum de gemmació, indicant un retard en l'execució de Start. Per poder mesurar aquest mateix fenotip en cèl·lules parcialment envellides, hem marcat amb biotina la paret cel·lular de llevats haploides de la soca MEP²⁷⁴ transformades amb el vector que expressa el pèptid prionic (o un plasmidi buit), i les hem fet envellir activant el programa genètic de mort de filles durant 12h. Per separar les cèl·lules mare envellides vives de les mortes i de les filles aturades en fase M (tant si encara eren metabòlicament actives com si eren mortes), hem tenyit les cèl·lules amb Streptavidina-AlexaFluor405 i iodur de propidi i les hem separat per citometria. Així, les cèl·lules mare vives són les positives per AlexaFluor405 i negatives per PI; en la soca expressant el prió (fusionat a GFP), ens hem quedat amb les cèl·lules que són més verdes, ja que són les que estan expressant més el prió (Figura 53A). Per saber aproximadament quantes filles havien produït aquelles cèl·lules mare fins al moment de la mesura, una part de les cèl·lules purificades s'han tenyit amb WGA-AlexaFluor647 per tal de marcar les *budscars* i poder-les contar (Figura 53C), tenint unes 6-8 marques per cèl·lula. Hem observat que les cèl·lules parcialment envellides tenen un volum de gemmació significativament major quan estan expressant el prió sPFD1 (Figura 53B).

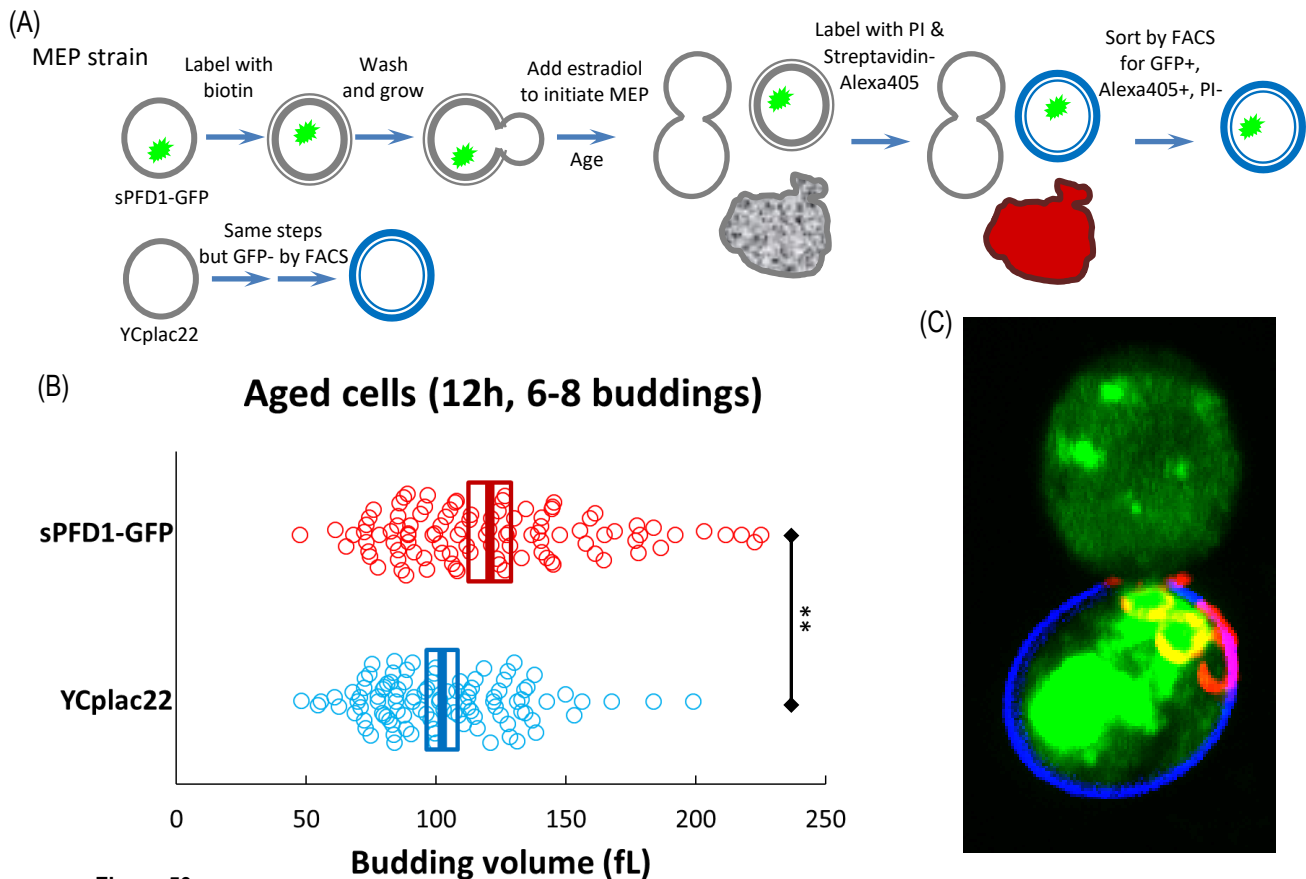


Figura 53:

(A) Esquema de l'aproximació experimental per tal d'aïllar cèl·lules mare de la soca MEP parcialment envellides per FACS, per a poder analitzar-les sota el microscopi posteriorment.

(B) Quantificació del volum de gemmació de les cèl·lules mare parcialment envellides, expressant el prió sintètic (roig) o amb un vector buit (blau); els cercles són el volum de gemmació de cèl·lules individuals, mentre que la línia gruixuda és la mitjana de cada grup, i la caixa indica els intervals de confiança ($\alpha=0.05$). *: T-test_{p-value}<0.05; **: T-test_{p-value}<10⁻³; ***: T-test_{p-value}<10⁻⁵.

(C) Microscòpia confocal d'una cèl·lula parcialment envellida i marcada amb biotina, expressant el prió sSPFD1-GFP (verd), i amb marcatge de la paret amb Streptavidina-AlexaFluor405 (blau) i de les budscars amb WGA-AlexaFluor647 (roig).

Per tal d'analitzar els efectes de l'expressió priònica durant la vida replicativa de cèl·lules mare hem utilitzat el sistema MEP en la cambra microfluídica de creixement en monocapa (descrita en l'apartat 8.1 en el capítol de Metodologia). Ja que les cèl·lules filles produïdes esdevenen inviables, el nombre de cèl·lules totals per camp augmenta linealment (no exponencialment) i es pot fer un *time-lapse* de 3 dies per seguir les cèl·lules mare fins la mort replicativa. Per tal de poder seguir-les en el mateix experiment, la soca control expressa constitutivament mCherry, mentre que la soca problema expressa condicionalment una fusió a GFP del prió sintètic sSPFD1. Hem mesurat el temps d'interdivisió de les dues soques al llarg de la seva vida replicativa determinant manualment quan apareix una nova gemma en la cèl·lula mare (Figura 54), i hem observat que el temps d'interdivisió de les cèl·lules amb el prió és lleugerament superior (tot i que la diferència no és significativa), i que aquest temps augmenta en les últimes generacions tant en el control (com ja s'havia descrit prèviament^{18,317}) com la soca amb el prió. Endemés, durant el *time-lapse* hem vist la mort de moltes més cèl·lules en la soca amb prió que en la soca control, suggerint que tot i que la presència del prió no afectaria la manera en com moren les cèl·lules, si que podria afectar al moment en que ho fan, és a dir, sobre el seu RLS.

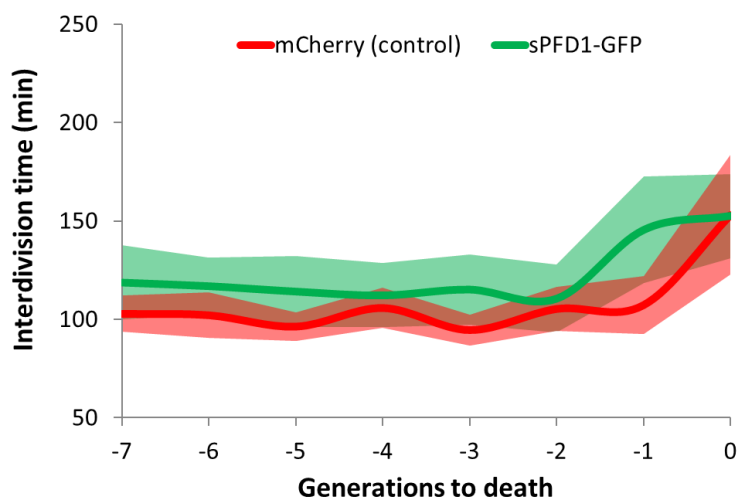


Figura 54:

Temps d'interdivisió en les últimes 7 generacions del RLS de cèl·lules que han envellit expressant sPFD1-GFP o un reporter fluorescent control; les bandes d'error indiquen l'interval de confiança de la mitjana en cada punt ($\alpha=0.05$).

2.2. Longitud de vida replicativa en cèl·lules expressant agregats amiloides.

Per tal d'analitzar els efectes de l'expressió prònica sobre el RLS del llevat hem fet servir una aproximació simple mitjançant comptatge d'unitats formadores de colònies al llarg del temps. Ja que només volem tenir en compte el que succeeix a les cèl·lules mares en el moment inicial, hem emprat la soca MEP transformada amb sPFD1-GFP o el pèptid control, induint l'expressió d'aquests pèptids en medi líquid amb galactosa per a posteriorment iniciar el programa de mort de les cèl·lules filles afegint estradiol i plaquejar

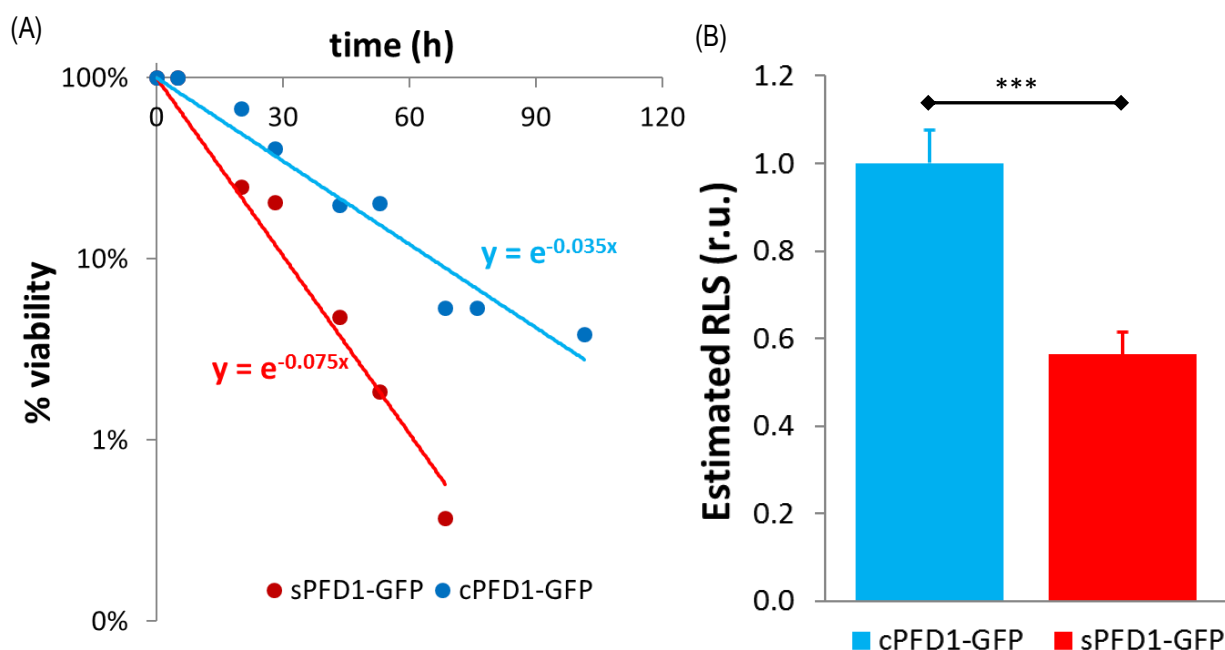


Figura 55:

(A) Pèrdua de viabilitat de cèl·lules de la soca MEP envellint expressant el prò sintètic o el control a diferents temps des de l'addició d'estradiol; les dades s'han ajustat a un model de caiguda exponencial per obtenir un índex de pèrdua de viabilitat respecte el temps; eix d'ordenades en escala logarítmica.

(B) Mitjana de l'estimació de RLS a partir de la mida de microcolònies de cèl·lules expressant el prò sintètic o el control (fet relatiu a la condició control); les barres d'error indiquen l'interval de confiança ($\alpha=0.05$).

*: T-test_{p-value}<0.05; **: T-test_{p-value}<10⁻³; ***: T-test_{p-value}<10⁻⁵

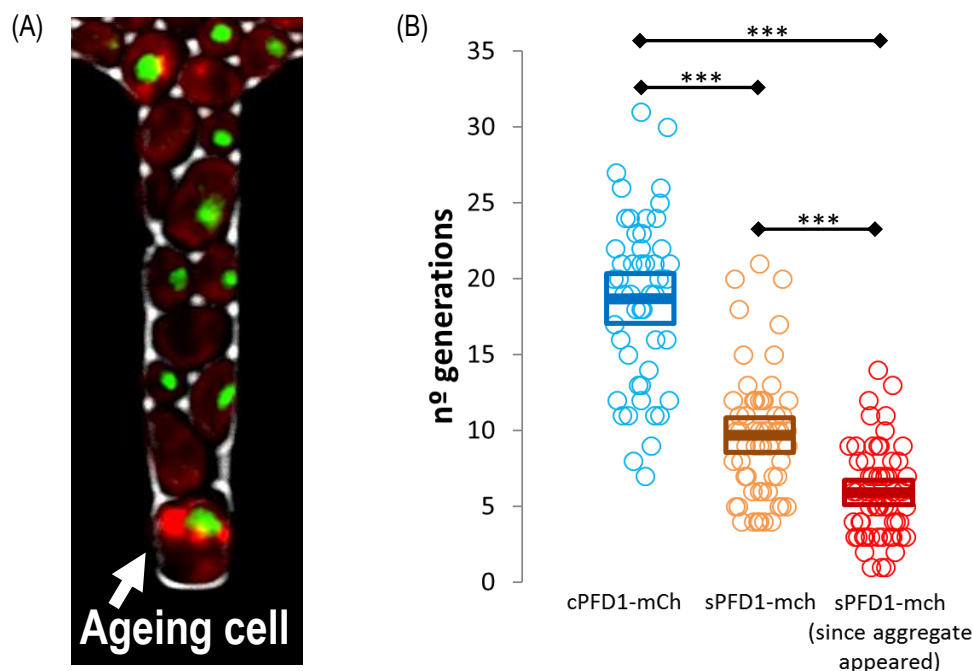


Figura 56:

(A) Fotografia d'una cèl·lula envellida dins la cambra CLiC expressant el pèptid sPFD1-mCherry, així com Whi5-GFP.

(B) Nombre de generacions fetes per cèl·lules envellint en la cambra CLiC i expressant el pèptid sPFD1 (taronja) o el pèptid control (blau); també s'indica el nombre de generacions des de que les cèl·lules expressant sPFD1 formen un agregat visible fins que la cèl·lula mor (roig). Els cercles són el nombre de generacions de cèl·lules individuals, mentre que la línia gruixuda és la mitjana de cada grup, i la caixa indica els intervals de confiança ($\alpha=0.05$). *: T-test_{p-value}<0.05; **: T-test_{p-value}<10⁻³; ***: T-test_{p-value}<10⁻⁵.

en YPD a diferents temps (Figura 55A). Si ajustem les dades a un model exponencial negatiu, veiem que el factor de decaïment de cèl·lules expressant el pèptid prònic és del doble que el de la condició control, indicant que el RLS d'aquestes cèl·lules està disminuït. Aquest mètode és molt poc eficient, molt laboriós i no permet descartar els esdeveniments d'escapament del MEP. Per això vam desenvolupar el mètode d'estimació de RLS a partir de la mida de les microcolònies produïdes per cèl·lules creixent exponencialment en les condicions inicials (descriu en l'apartat 5.2 del capítol de Metodologia). Mesurant el RLS amb aquest mètode de les soques expressant el pèptid prònic o el control, hem observat que la presència del prò reduceix el RLS de les cèl·lules que l'expressen en un 50% (Figura 55B). Aquest resultat va en la mateixa direcció que l'obtingut mesurant la pèrdua de viabilitat al llarg del temps, i és molt més senzill de fer i ràpid d'analitzar. Endemés, ja que podem mesurar la mida de moltes microcolònies, la robustesa estadística de les dades obtingudes és molt millor. Tot i així, els dos mètodes anteriorment citats involucren utilitzar soques amb el sistema genètic MEP, i també volem veure quin és l'efecte dels agregats en cèl·lules envellint normalment.

Per estudiar mitjançant microscòpia l'envelliment, ho podem fer com s'ha descrit prèviament amb el sistema MEP, però amb aquesta aproximació l'acumulació de cèl·lules filles aturades en mitosi al voltant de la cèl·lula mare fa difícil el seu seguiment, i a més estem limitats a fer-ho amb la soca MEP. Per aquesta raó i per a poder seguir cèl·lules salvatges hem fet servir la cambra de microfluidica anomenada CLiC²⁶² (Figura 56A). Comptant el nombre de gemmes que fan al llarg de tota la seva vida, hem observat que de mitjana les cèl·lules que expressen agregats prònics tenen un RLS un 50% menor que les cèl·lules control (Figura 56B); a més un cop es forma un agregat visible les cèl·lules moren al cap d'unes 5 generacions després. Tot això ens serveix per confirmar tot el que havíem vist anteriorment i valida alhora el mètode de les microcolònies per analitzar el RLS d'una manera ràpida i eficient. Endemés, fent servir Whi5-GFP

com a reporter de Start, hem quantificat en quina fase del cycle cel·lular es troben les cèl·lules en el moment de la mort (definida per la lisi de la cèl·lula o per l'aturada de creixement). La majoria de cèl·lules (al voltant del 70%) varen morir en la fase G1 del cycle fent servir qualsevol de les aproximacions, mentre que donada la llargària del G1 i del cycle cel·lular en cèl·lules mare joves, el percentatge de cèl·lules mare en G1 en qualsevol moment no arriba al 20% (Figura 57); així que la mort replicativa té lloc preferentment en la fase G1 del cycle cel·lular.

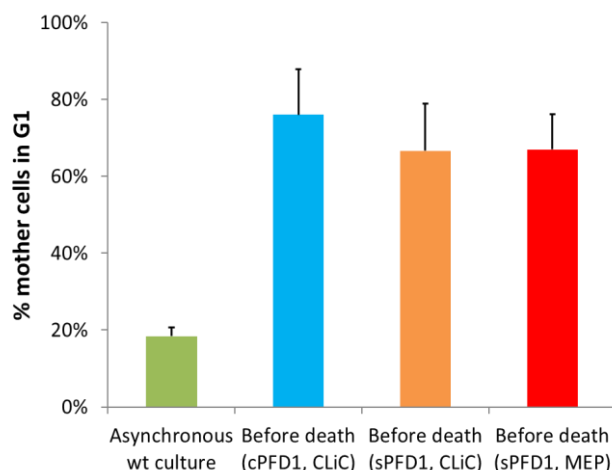


Figura 57:

Fracció de cèl·lules mare en G1 en el moment de la mort expressant sPFD1-mCherry o el pèptid control, determinat per la localització nuclear de Whi5-GFP; la dada de les cèl·lules mare en un cultiu asincrònic s'ha obtingut a partir de resultats prèviament publicats²⁶⁴.

2.3. Superexpressió de xaperones en cèl·lules expressant el pèptid prònic sintètic.

Vist el resultat mostrat en l'apartat 1.1 (Figura 48), prevèiem que la superexpressió de diverses xaperones mitigués la reducció del RLS en cèl·lules expressant el pèptid prònic, ja que havíem vist que la superexpressió de Ssa1 i Ydj1 disminuïa la incidència de l'aparició d'agregats amiloides visibles. Per això hem provat dues aproximacions diferents per a superexpressar xaperones, ja sigui duplicant la dosi gènica de diverses famílies de xaperones i els seus cofactors (Hsp104, que actua formant oligòmers; Ssa1 - Hsp70- i Ydj1 -Hsp40, que treballen conjuntament; Hsc82 -Hsp90- i el seu cofactor Cdc37; i Cdc48, que tracta clients ubiquitinats amb els seus cofactors Npl4 i Ufd1) en un minicromosoma que conte una còpia de cadascun d'aquests gens, o simplement superexpressant sota *GALp* les xaperones Ssa1 i Ydj1. En les dues aproximacions hem vist que la superexpressió de xaperones causa un lleuger rescat en el RLS (tot i que significatiu) de les soques expressant sPFD1 (Figura 58A-B); ara bé, els efectes de la superexpressió de xaperones en cèl·lules normals són en el sentit oposat. És possible que, en superexpressar només determinades xaperones, es desajustin processos que necessiten la seva participació de forma molt ben coordinada; en aquest sentit, hem observat que una superexpressió prolongada de xaperones causa un fenotip de formes aberrants en cèl·lules joves (Figura 48).

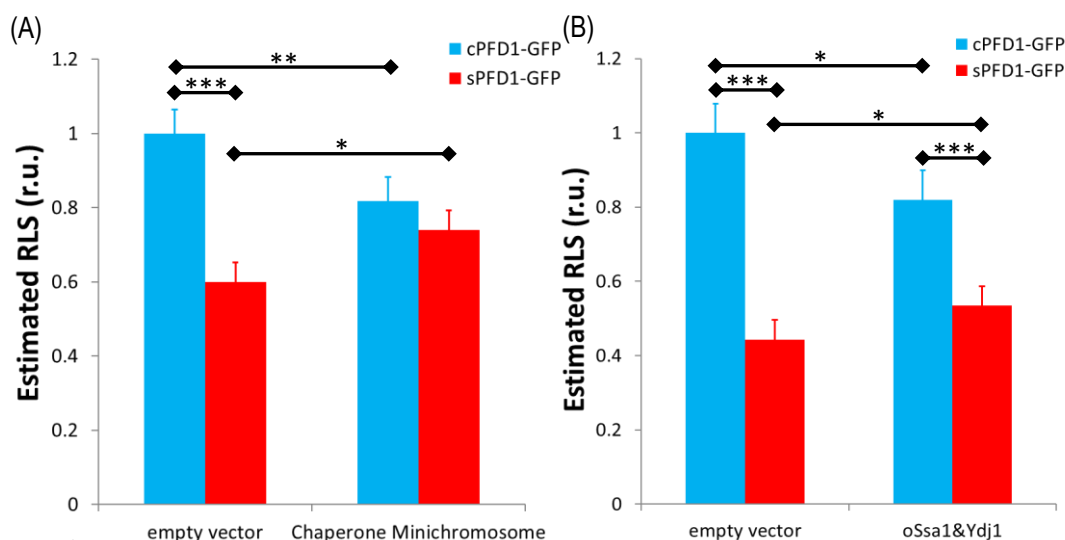


Figura 58:

(A) Mitjana de l'estimació de RLS a partir de la mida de microcolònies de cèl·lules expressant el prió sintètic o el control i a més contenint (o no) un minicromosoma circular contenint les xaperones Hsp104, Ssa1, Ydj1, Hsc82, Cdc37, Cdc48, Ufd1 i Npl4 (fet relatiu a la condició control); les barres d'error indiquen l'interval de confiança ($\alpha=0.05$). (B) Mitjana de l'estimació de RLS a partir de la mida de microcolònies de cèl·lules expressant el prió sintètic o el control i a més contenint (o no) un vector centromèric que pot superexpressar condicionalment les xaperones Ssa1 i Ydj1 (fet relatiu a la condició control); les barres d'error indiquen l'interval de confiança ($\alpha=0.05$).

*: T-test p -value < 0.05 ; **: T-test p -value $< 10^{-3}$; ***: T-test p -value $< 10^{-5}$

3. Efectes en la progressió del cicle cel·lular i en la dinàmica de xaperones en cèl·lules salvatges envellides

3.1. Cicle cel·lular en cèl·lules envellides

Les dades obtingudes en els models expressant agregats amiloides indiquen que els llevats allargen la fase G1 del cicle en els últims estadis de l'envelliment, però la pregunta important és que succeeix en cèl·lules normals; per això volem analitzar el cicle cel·lular per citometria en cèl·lules envellides. Amb aquest objectiu hem fet servir el sistema MEP marcant les cèl·lules amb biotina abans d'iniciar l'envelliment. Després d'envellir-les diferents temps s'ha seguit el protocol de preparació de mostres per a fer l'anàlisi de cicle per citometria; el tractament amb proteïnasa K no ha afectat excessivament el marcatge de la paret cel·lular amb biotina el que ha permès distingir les cèl·lules velles amb estreptavidina-AlexaFluor405 (Figura 59A). Al passar les cèl·lules tenyides amb iodur de propidi pel citòmetre, hem pogut detectar la població de cèl·lules mare gràcies al diagrama del canal 405 contra el FS (*forward scatter*, que és proporcional a la mida de les partícules), i hem vist que apareix un conjunt de punts en una zona concreta amb senyal positiu per a 405 i una mida cel·lular intermèdia (Figura 59B), només en les cèl·lules que hem marcat amb biotina abans de començar-les a envellir. Veiem que la població és complexa, amb un grup de cèl·lules petites i sense senyal del canal 405 (que són les cèl·lules filles que es van produint), i un altre grup on el FS és més gran i el senyal fluorescent també (que són les cèl·lules filles que ja han quedat aturades en M i han adquirit autofluorescència, sobretot un cop lisen), però que ens permet diferenciar les mares envellides vives de la resta. Analitzant l'histograma del senyal de iodur de propidi (Figura 59C), veiem que mentre en les cèl·lules parcialment envellides la proporció de cèl·lules que són $1n$ és molt petita i pràcticament totes les cèl·lules són $2n$, en cèl·lules en un estat d'envelliment més avançat la proporció de cèl·lules $1n$ augmenta. El fet que els pics $1n$ i $2n$ no mostrin una relació exacta del doble en la seva fluorescència pot ser degut a diferents eficiències de marcatge en unes cèl·lules i altres, el que també succeeix en altres situacions d'envelliment per limitació nutricional.

Per tal de confirmar aquesta dada, hem fet servir la cambra microfluídica CLiC en soques salvatges seguint la localització subcel·lular de Whi5-GFP al llarg del cicle i de l'envelliment replicatiu de les cèl·lules mare. En primer lloc, els resultats confirmen el que ja havíem vist en el model de superexpressió d'amiloïdes sobre la preferència de les cèl·lules de morir en la fase G1 del cicle (Figura 60A). A més, també hem observat que la fase G1 esdevé significativament més llarga en les últimes 3-4 generacions de la vida de la cèl·lula respecte la durada normal d'un G1 en una cèl·lula mare (que sol ésser d'uns 20min). Fixant-nos a la vegada amb la localització de Whi5 i si la cèl·lula ha gemmat o no, podem determinar la durada en els darrers cicles de la cèl·lula envellint del que anomenem T1 (el G1 pròpiament parlant fins Start, amb Whi5 dins del nucli) i T2 (el període entre Start i la transició G1/S, quan Whi5 ja és fora del nucli però la

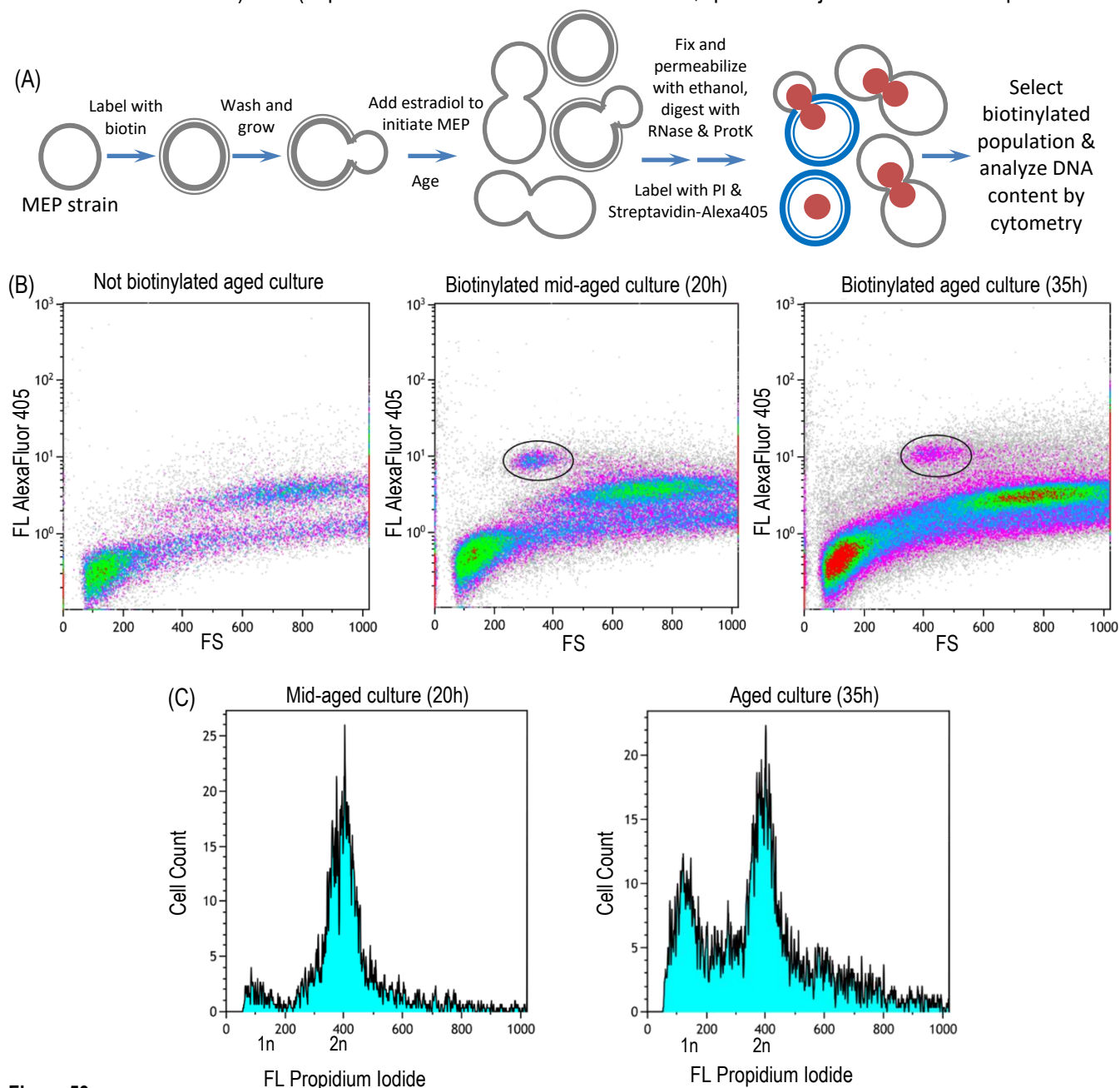


Figura 59:

- (A) Esquema de l'aproximació experimental per a analitzar el cicle cel·lular per citometria en cèl·lules envellides.
- (B) Gràfics de dispersió de la senyal produïda per AlexaFluor405 (ordenades, en escala logarítmica) contra el FS (abscisses, és proporcional a la mida de les cèl·lules) de cultius envellits diferents temps; cada punt és una cèl·lula del cultiu, i el color indica la densitat de punts en cada regió; els punts encerclats són les cèl·lules envellides que ens interessen per analitzar-ne el contingut de DNA.
- (C) Histogrames de la senyal produïda pel iodur de propidi (proporcional al contingut de DNA) de les cèl·lules seleccionades.

cèl·lula encara no ha gemmat), així com determinar el temps d'interdivisió en funció entre l'aparició d'una gemma i la següent; la resta de les fases del cicle cel·lular (S/G2/M), per les quals no disposàvem de cap reporter per determinar-les, els assignàvem una durada igual a la diferència entre el total del temps d'interdivisió menys T1 i T2. Si representem les durades d'aquests períodes en termes relatius respecte la durada que tenen en cèl·lules mare joves (Figura 60B), veiem que l'allargament del temps d'interdivisió en les últimes generacions és bàsicament causat pel augment progressiu de T1, que arriba a durar més enllà de les 3h abans de produir la darrera filla d'una cèl·lula mare envellida. El fet que la majoria de les cèl·lules morin en fase G1 (és a dir amb Whi5 dins el nucli), fan que si representem la mitjana de la concentració nuclear de Whi5 alineant les cèl·lules en el moment de l'última gemmació, es mantingui un nivell alt de

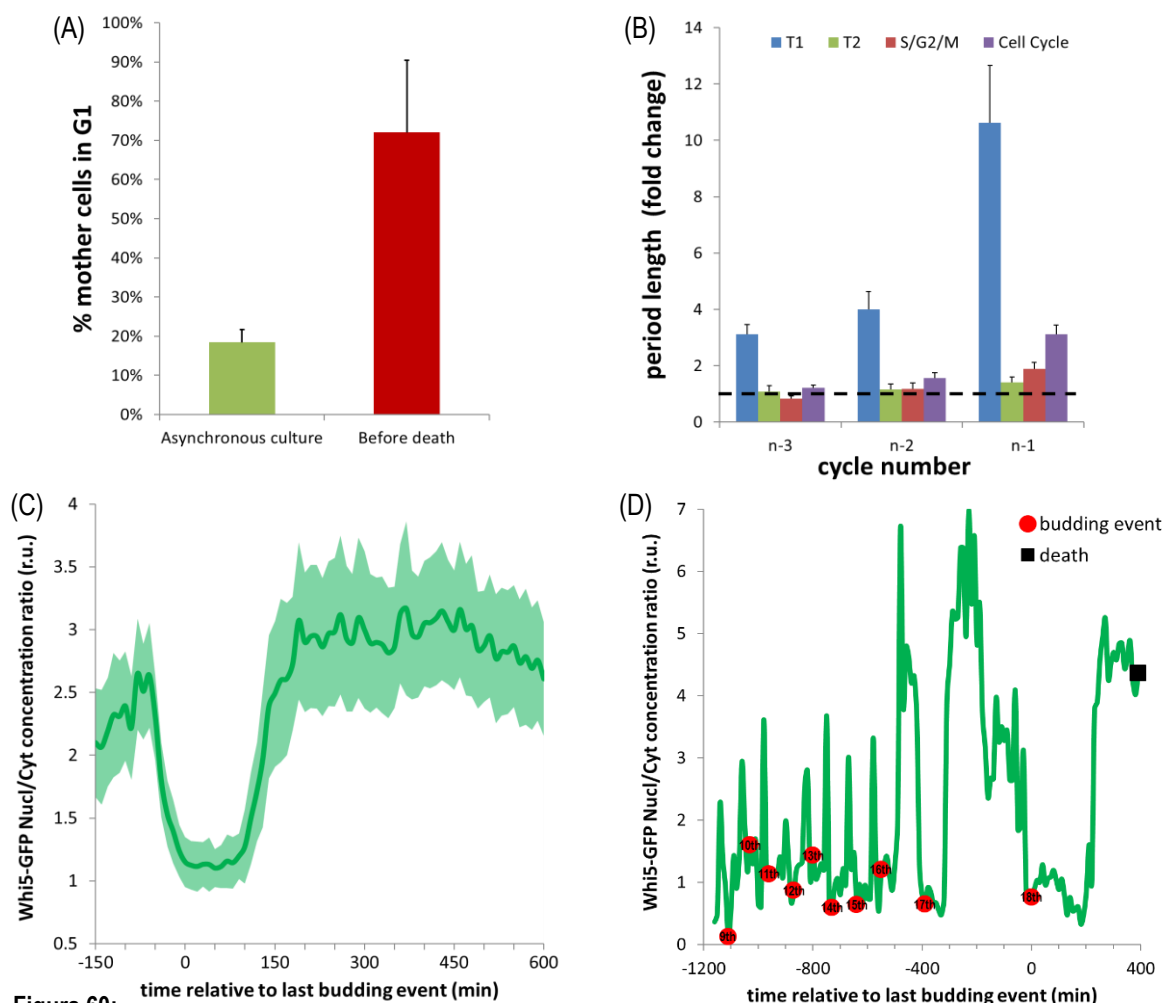


Figura 60:

A) Fracció de cèl·lules mare en G1 en el moment de la mort determinat per la localització nuclear de Whi5-GFP en cèl·lules salvatges envellint en la cambra CLiC; la dada de les cèl·lules mare en un cultiu asincrònic s'ha obtingut a partir de resultats prèviament publicats²⁶⁴.

(B) Factor de canvi en la llargada dels diferents períodes del cicle cel·lular a partir de la localització de Whi5-GFP (**T1**: Whi5 nuclear, G1; **T2**: Whi5 citoplasmàtic en cèl·lules no gemades, transició G1/S; **S/G2/M**: resta del cicle cel·lular, on Whi5 també és al citoplasma) en els 3 últims cicles cel·lulars de cèl·lules envellint en la cambra CLiC respecte a cèl·lules mare joves (línia discontinua); les barres d'error indiquen l'interval de confiança ($\alpha=0.05$), i les dades de les mares joves s'han obtingut a partir de dades publicades prèviament²⁴⁵.

(C) Mitjana de la concentració nuclear de Whi5 (fet relatiu a la concentració citoplasmàtica) en cèl·lules que han envellit en la cambra CLiC des de 2h30min abans de fer la última gemmació fins a 10h després; les bandes d'error indiquen l'interval de confiança de la mitjana en cada punt ($\alpha=0.05$); no es mostren dades més anteriors perquè es perd la sincronia i no es veurien pujades i baixades de Whi5 si mantenim el temps com a eix d'abscisses (ho veuríem si les abscisses fossin les generacions).

(D) Exemple de l'evolució de la concentració nuclear de Whi5 (fet relatiu a la concentració citoplasmàtica) d'una cèl·lula durant la segona meitat de la seva vida. Els cercles rojos marquen els esdeveniments de gemmació i el quadrat negre indica el moment en que la cèl·lula mor.

Whi5 nuclear fins al final (Figura 60C). La darrera gemmació es produeix en el temps marcat com a 0 (just quan comença la zona de 'vall' pel que fa a la concentració nuclear de Whi5-GFP), i l'últim cycle cel·lular productiu dura el temps de l'amplada d'aquesta 'vall'; després Whi5 torna a importar-se al nucli, i la cèl·lula mor replicativament en G1. En aquesta figura no mostrem els valors mitjans del que succeeix abans perquè la sincronia entre cèl·lules no es manté (els períodes on hi ha pic o vall són diferents per cada cèl·lula). Les dades de la durada d'aquests períodes relatius als 3 cycles productius abans de la mort de la cèl·lula estan resumits en la Figura 60B, i si ens referim al perfil de Whi5-GFP en una cèl·lula representativa (Figura 60D), s'observa una sèrie de pics durant la major part de la vida de la cèl·lula, en que cada pic indica un període G1 i una execució de Start, mentre que a partir de les darreres generacions l'amplada d'aquest pic augmenta progressivament, fins que al final esdevé un *plateau* i la cèl·lula entra en senescència replicativa i/o mor.

3.2. Nivells i dinàmica de xaperones en cèl·lules envellides

Fent us de la cambra CLiC també hem seguit els nivells de diverses xaperones en els últims estadis de l'envelliment del llevat; Hsp104 s'uneix a la majoria de dipòsits proteics que s'acumulen asimètricament en les cèl·lules mare i en moltes cèl·lules hem detectat l'aparició de focus d'Hsp104, probablement marcant l'AiPD¹⁶⁶, però el més remarcable és que després de l'última gemmació, en el mateix moment que hem vist que els nivells nuclears de Whi5 arriben a un estat de *plateau*, hi ha un augment sostingut en els nivells de Hsp104, a un ritme més ràpid del que la concentració augmentava abans d'aquest moment, fent que finalment es perdi el contrast en la imatge entre els focus preexistents d'Hsp104 i el senyal citoplasmàtic (Figura 61A). Això recorda a la resposta a estrès, per exemple tèrmic, que desenvolupa la cèl·lula induint la producció de xaperones. Per això hem volgut comprovar que succeeix amb els nivells de Ssa4, que és una Hsp70 que normalment s'expressa en resposta a estrès: sorprenentment els seus nivells no han evolucionat d'igual manera que els d'Hsp104 i de fet, durant l'envelliment han disminuït encara més (Figura 61B). D'altra banda hem comprovat també els nivells de les xaperones amb implicació directa en el control del cycle cel·lular (Ssa1 i Ydj1), i els seus nivells romanen pràcticament constants durant tot el temps (Figura 61B).

Tot i que els nivells de Ssa1 i Ydj1 no varien, l'allargament de la fase G1 del cycle i el que coneixem sobre el caràcter limitant d'aquestes xaperones (així com el que hem après en el model de superexpressió d'amiloides en cèl·lules joves) suggereix possibles alteracions en la activitat i/o disponibilitat d'aquestes xaperones durant l'envelliment. Per tant hem fet servir la soca MEP amb aquestes xaperones fusionades a GFP, fent-les envellir un o dos dies i hem mesurat la mobilitat de Ssa1 i de Ydj1 per FLIP (Figura 62A), i fent servir cèl·lules envellides expressant GFP com a control. En aquestes condicions veiem que la mobilitat relativa de GFP és menor tant en cèl·lules parcialment envellides durant un dia com les envellides dos dies, indicant alteracions generals en la mobilitat de proteïnes en les cèl·lules al envellir. Ara bé, el canvi relatiu observat per a Ydj1 i sobre tot per a Ssa1 en cèl·lules envellides per dos dies és molt major que per al control amb GFP, indicant alteracions importants i específiques en la mobilitat d'aquestes xaperones durant l'envelliment. Endemés, en moltes cèl·lules analitzades s'hi detecten clars *foci* de Ssa1-GFP (Figura 62B) on la mobilitat és encara més reduïda, tot i que hi ha intercanvi de molècules entre la zona del focus i el citoplasma.

Resultats

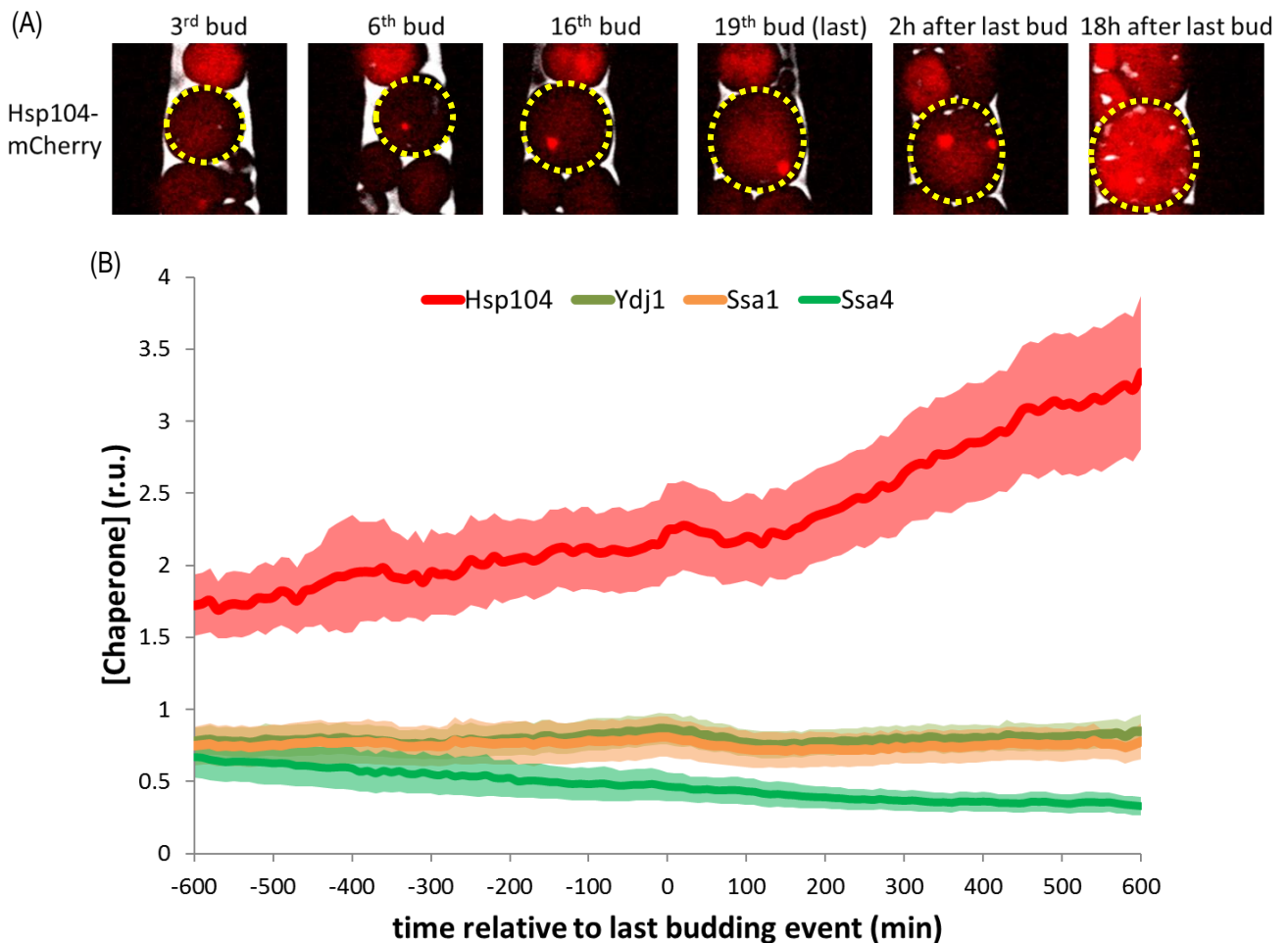


Figura 61:

(A) Cèl·lula envellint en la cambra CLiC expressant Hsp104-mCherry, en diverses etapes de la seva vida

(B) Nivells de diferents xaperones les 10h abans i després de la última gemació de cèl·lules envellides en la cambra CLiC; els nivells són relatius a la concentració d'aquestes mateixes xaperones en una població de cèl·lules joves i les bandes d'error indiquen l'interval de confiança de la mitjana en cada punt ($\alpha=0.05$).

Per tal de confirmar aquest resultat mitjançant una altra aproximació experimental en un primer moment vam pensar en l'FCS, però en veure la complexitat i la heterogeneïtat en la distribució d'Ssa1 dins una cèl·lula en la població envellida vam decidir-nos per una altra tècnica de correlació de senyal que recull informació de tota la cèl·lula. L'espectroscòpia de correlació d'imatge rasteritzada (*Raster Image Correlation Spectroscopy*, RICS) es basa en l'autocorrelació entre els píxels veïns d'una imatge per a extreure informació de la mobilitat de la proteïna en qüestió. A partir de les dades d'autocorrelació directament podem veure que el nombre de partícules mòbils és major en les cèl·lules envellides, ja que aquesta dada es treu directament de l'ordenada a l'origen de la funció d'autocorrelació (que equival a $1/N$) i la ordenada és menor en les cèl·lules velles (Figura 63A). Per a determinar el coeficient de difusió cal ajustar les dades experimentals a diferents models de difusió descrits, i mitjançant regressió no lineal de les dades experimentals al model podem estimar-ne els paràmetres. Els valors obtinguts de cèl·lules individuals (Figura 63B) mostren una gran dispersió, però suggereixen que el coeficient de difusió en cèl·lules joves és molt major que en cèl·lules velles. Per obtenir dades més robustes ens ha calgut reunir les dades de diferents cèl·lules en una única funció d'autocorrelació, i així ajustar models més complexos, com models de difusió anòmla, models de *binding*, o combinacions de tots dos. Encara que la seva determinació per regressió no és gaire precisa, el coeficient de difusió obtingut és sempre major en les cèl·lules joves (Figura 63C). D'altra banda, en canvi, la determinació del paràmetre N és molt més precisa (Figura 63D) en general, tot i que en els models on es consideren possibles efectes de *binding* la seva

determinació sigui més imprecisa (Figura 63E), especialment en cèl·lules velles. Pel que fa als paràmetres α i Uf , tot i que a causa de la incertesa a l'hora de determinar-los no podem dir que siguin significativament diferents entre les dues poblacions, els resultats semblen indicar que un model de difusió anòmala ajuda a determinar millor el coeficient de difusió (especialment en les cèl·lules joves), mentre que la existència d'una fracció de la població que està experimentant processos de *binding* ajuda a determinar amb més precisió el coeficient de difusió en les cèl·lules velles. En resum, aquests experiments confirmen, si més no qualitativament, el que havíem detectat per FLIP, és a dir que les xaperones (especialment Ssa1) tenen una mobilitat més reduïda en cèl·lules velles i, per tant, que la seva disponibilitat disminueix amb el procés d'envelliment.

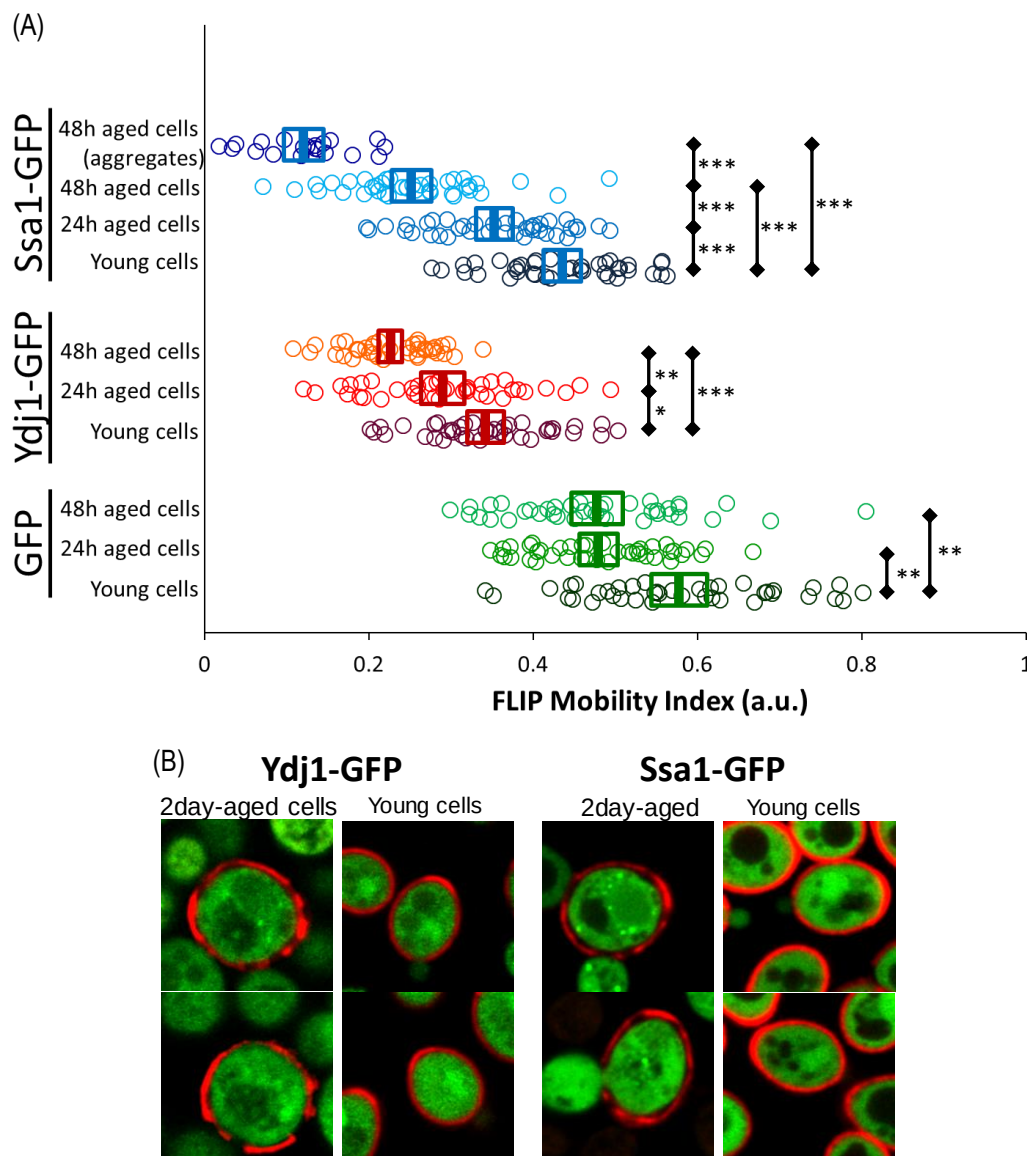


Figura 62:

(A) Índex de mobilitat per FLIP de les diferents xaperones (fusionades a GFP) dins de cèl·lules de la soca MEP envellides diferents temps; els cercles indiquen l'índex calculat per cèl·lules individuals, mentre que la línia gruixuda és la mitjana de cada grup, i la caixa indica els intervals de confiança ($\alpha=0.05$).*: T-test_{p-value}<0.05; **: T-test_{p-value}<10⁻³; ***: T-test_{p-value}<10⁻⁵

(B) Microscòpia de cèl·lules envellides 2 dies i cèl·lules joves expressant les xaperones Ydj1 i Ssa1 fusionades a GFP; la senyal roja correspon a streptavidina-APC, que tenyeix les cèl·lules amb la paret biotinilada.

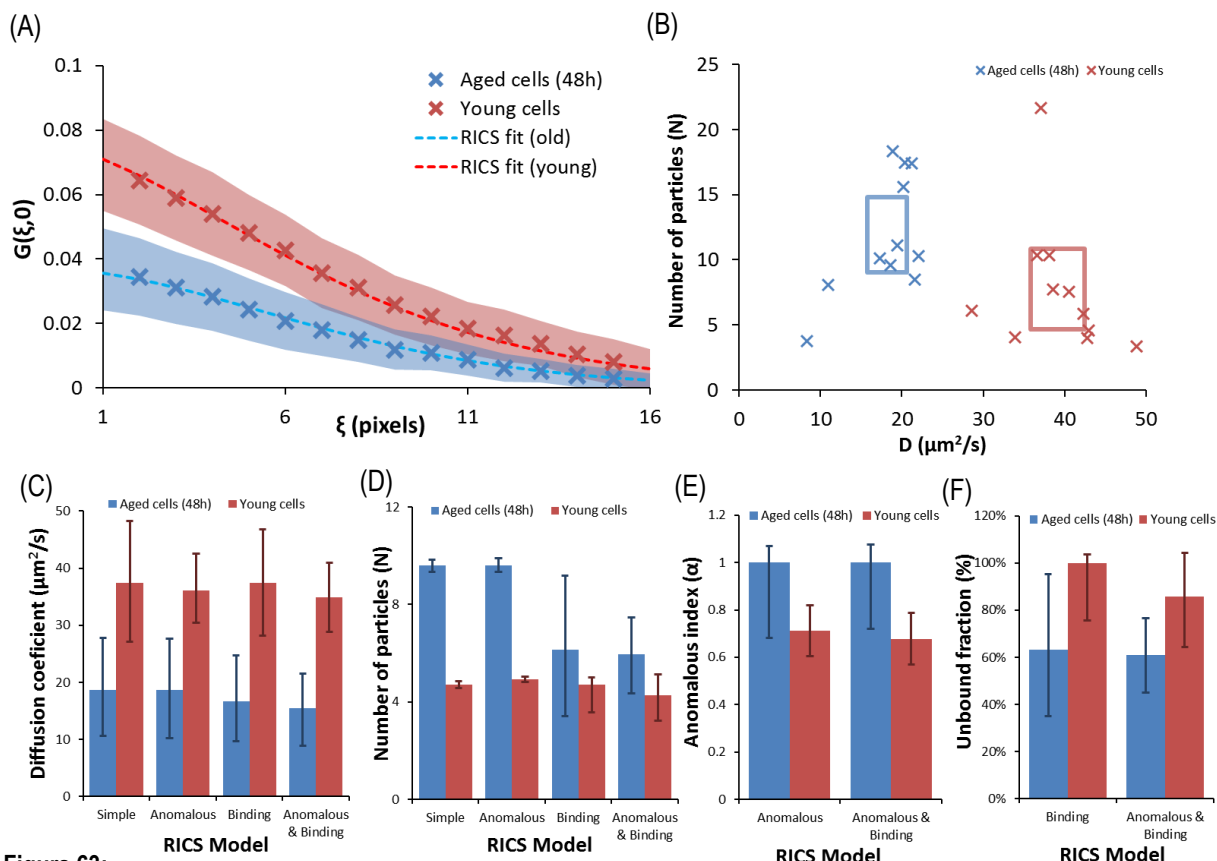


Figura 63:

(A) RICS de cèl·lules velles o joves expressant Ssa1-GFP; les creus indiquen la mitjana dels valors de l'ACF en els primers 16 píxels (contant des del centre) obtinguts a partir de autocorrelacionar les piles d'imatges; les bandes d'error indiquen interval de confiança de la mitjana ($\alpha=0.05$) de les dades experimentals, mentre que la línia discontinua és l'ajust del model de difusió simple en RICS a la mitjana de les dades experimentals.

(B) Parametres N i D estimats per a cèl·lules individuals segon el model de difusió simple en RICS; les creus indiquen cèl·lules individuals, amb el parell de dades de N i D que li corresponen, i la caixa indica la mitjana i els intervals de confiança de cada població ($\alpha=0.05$) tant pel que fa a N com a D .

(C-F) Paràmetres estimats per a D i N (així com Uf i α si s'escau) per als diferents models de difusió en RICS a partir de la mitjana de totes les ACFs de les cèl·lules de cada població (les creus en el panell A); les barres d'error indiquen la incertesa en la determinació del paràmetre en qüestió ($\alpha=0.05$) associat al ajust de paràmetres en equacions no lineals.

3.3. Allargament de la longevitat per superexpressió condicional d'activadors del cicle cel·lular

Ja hem vist que quan la cèl·lula envellix té més dificultats per executar Start i entrar en el cicle cel·lular, així com que la disponibilitat de xaperones en cèl·lules envellides es veu fortament compromesa. Les nostres dades suggereixen per tant que la hiperactivació del maquinari de Start hauria de tenir efectes directes en el RLS del llevat de gemmació. També hem vist que superexpressant xaperones (almenys les que hem superexpressat nosaltres i de la manera que ho hem fet) no ajuda pas a que la cèl·lula pugui allargar el seu RLS. Les dades publicades relatives a la modificació del RLS a causa de mutacions en gens que formen part de la xarxa de Start²⁶³ així ho confirmen. Les cèl·lules deficientes en Whi5 com a repressor de Start tenen un RLS més llarg, mentre la deficiència en Cln3 com a activador causa un RLS més curt. Ara bé, ja que aquestes mutacions tenen un efecte immediat sobre la mida de les cèl·lules, els autors d'aquest treball varen concloure que el llevat creix i prolifera fins arribar a una 'mida crítica de mort'. Nosaltres per contra ho interpretem diferent (com posteriorment discutirem). Per tal de distingir entre aquestes hipòtesis antagòniques, hem decidit superexpressar Cln3 com a activador de Start de manera controlada. En primer lloc hem observat que la superexpressió de Cln3 allarga el RLS, de manera anàloga a l'increment en el RLS que s'ha descrit en un mutant *whi5*. D'altra banda, mentre que un mutant *ydj1* té

un RLS més curt³²⁴, aquest fenotip és parcialment rescatat per superexpressió de Cln3 (Figura 64A). En aquestes condicions, una soca superexpressant Cln3 té una mida cel·lular més petita que una salvatge, mentre que un mutant *Δyjd1* té una mida més gran, i la superexpressió de Cln3 retorna la cèl·lula a una mida més petita que la normal²⁵¹. Així, aquestes dades no permeten discernir entre el model 'mida crítica de mort' i la nostra hipòtesi basada en la caiguda de la proteòstasi i la disminució de xaperones disponibles. Per a resoldre aquesta qüestió varem activar Cln3 en un moment del cicle vital de la cèl·lula en que aquesta superexpressió no pot causar una disminució en la mida, tot essent capaç d'activar més eficientment Start. La mida cel·lular es determina principalment durant el primer G1 de la cèl·lula filla²⁴⁵ i, per tant, si activem

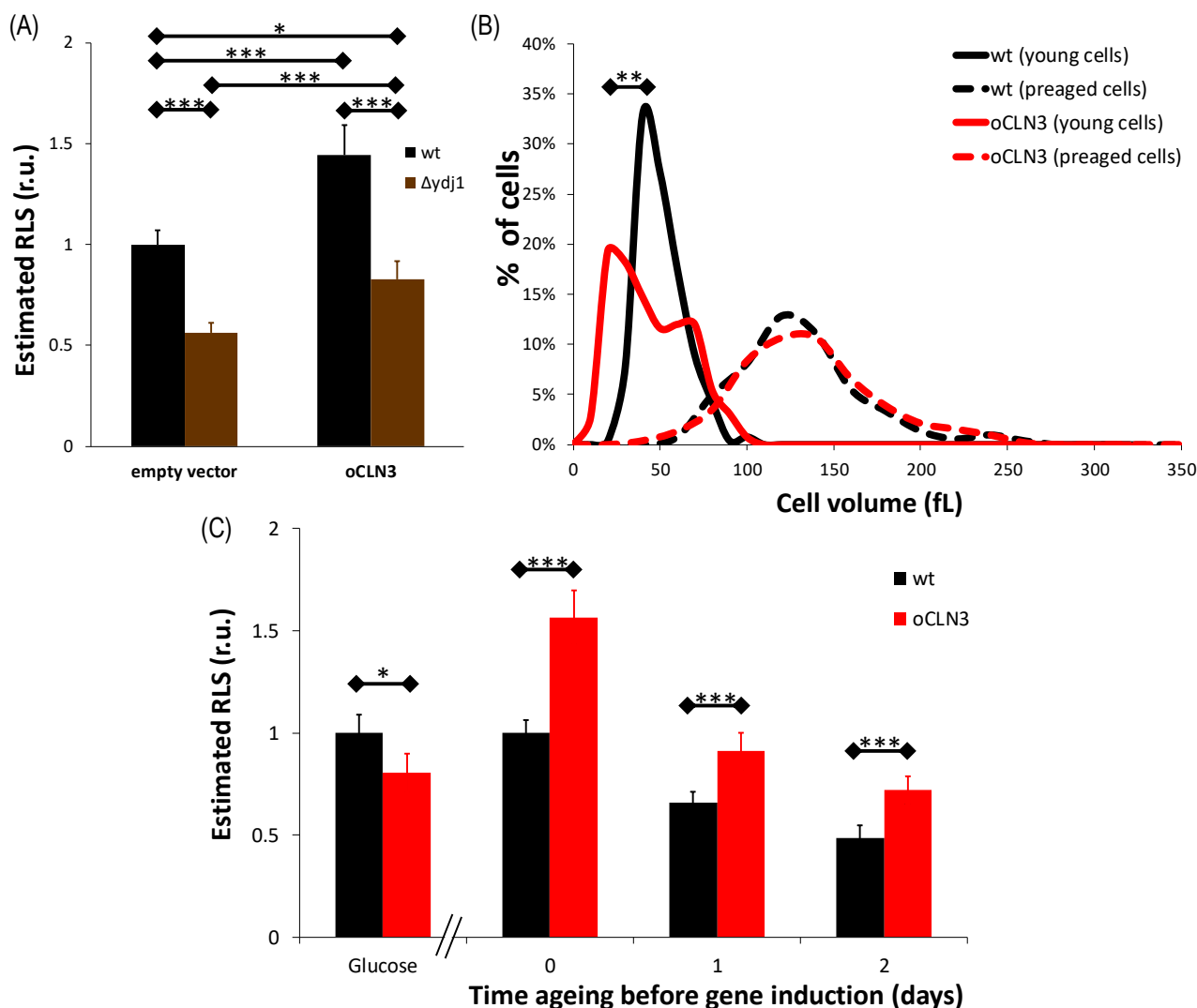


Figura 64:

(A) Mitjana de l'estimació de RLS a partir de la mida de microcolònies de cèl·lules salvatges o mutants *Δyjd1* contenint (o no) un vector centromèric que pot superexpressar condicionalment Cln3 (fet relatiu a la condició control); les barres d'error indiquen l'interval de confiança ($\alpha=0.05$).

(B) Distribució de mides de cèl·lules creixent en galactosa durant les 6h prèvies a la mesura, en cèl·lules creixent exponencialment (young) o després d'un envelliment previ de 16h en glucosa (preaged).

(C) Mitjana de l'estimació de RLS a partir de la mida de microcolònies de cèl·lules salvatges contenint (o no) un vector centromèric que pot superexpressar condicionalment Cln3 (fet relatiu a la condició control), on l'activació de la superexpressió de Cln3 es fa des del començament de l'envelliment (0) o quan les cèl·lules ja han envellit 1 o 2 dies abans de començar a superexpressar Cln3 per inducció del *GALp* (en glucosa no hi ha superexpressió de Cln3); les barres d'error indiquen l'interval de confiança ($\alpha=0.05$).

*: T-test_{p-value}<0.05; **: T-test_{p-value}<10⁻³; ***: T-test_{p-value}<10⁻⁵

Cln3 quan la cèl·lula ja ha produït varies cèl·lules filles, la mida cel·lular no es veu afectada (Figura 64B). Per aconseguir-ho vàrem preenvellir les cèl·lules en medi amb glucosa (on la superexpressió de Cln3 està inhibida), per després activar aquesta superexpressió passant-les a galactosa en diferents moments de l'envelliment i mesurar el RLS restant. Els resultats són clars: mentre que la diferencia en RLS entre les dos soques en glucosa és tot just significativa (i en tot cas, la soca salvatge té un RLS lleugerament superior), en activar la superexpressió de Cln3 tant des de l'inici com després d'un o dos dies de preenvelliment en glucosa, el RLS incrementa clarament, arribant a incrementar en més d'un 50% el nombre de cicles produïts per una cèl·lula mare durant el seu cicle vital (Figura 64C).

V. Discussió

1. Agregats priònics com a inhibidors de Start

Sembla clar que petites modificacions en la seqüència d'aminoàcids dins el domini priònic són suficients per a fer-li perdre significativament la potencialitat d'esdevenir agregats amiloides, fins i tot si no modifiquem ni la composició ni la distribució dels residus Q i N, que són els principals responsables del comportament amiloide en aquests pèptids¹⁷¹. Així que tenir una seqüència rica en Q/N és important però no suficient per a que un determinat pèptid esdevingui potencialment un amiloide. També hem comprovat que la superexpressió de xaperones en cèl·lules expressant el pèptid priònic disminueix el nombre de cèl·lules que mostren agregats totalment formats i visibles, de manera semblant al que ja s'havia vist tant *in vitro*^{134,172,325} com *in vivo*¹⁷³ (on van veure que diferents pèptids amiloides podien competir entre si per les xaperones disponibles en la cèl·lula), tot i que en la nostra aproximació les cèl·lules superexpressant xaperones adquireixen una morfologia anormal, probablement per desajustos en altres processos importants per a la cèl·lula.

En els experiments on superexpressem els pèptids priònics fusionats a GFP, fent servir cultius exponencials de llevat, principalment estem veient els efectes d'aquests agregats en cèl·lules joves, ja que són les majoritàries en aquesta població. La proporció de cèl·lules expressant els pèptids amb potencialitat priònica que tenen agregats visibles és al voltant del 50-60%. Això s'explica perquè existeixen mecanismes de retenció dels agregats prèviament formats en les cèl·lules mare, i perquè en un cultiu exponencial la meitat de les cèl·lules són filles i han de formar un nou agregat *de novo* a partir de monòmers o oligòmers amb potencialitat priònica; a més, una part de la població de mares pot ser més resistent a la formació d'agregats que altres, ja que en general la variabilitat intercel·lular en l'expressió d'un gen concret és elevada tot i que totes les cèl·lules siguin isogèniques^{326,327}. Així, hem observat un augment en el volum de gemmació en les cèl·lules que tenen agregats priònics ben formats i visibles, tant fent servir un prió natural del llevat [*PSI*⁺] (format per Sup35) com un prió sintètic (sPFD1); també vam obtenir resultats similars fent servir un altre tipus de prió natural del llevat ([*URE2*⁺] format per l'agregació de la proteïna Ure3 (resultats no mostrats), indicant que aquest fenotip és independent dels efectes específics d'un prió en particular sinó que és més general i relacionat amb la presència d'aquests agregats. També vam detectar un fenotip similar pel que fa a la reducció en el percentatge de cèl·lules que mostren agregats visibles al superexpressar les xaperones Ssa1 i Ydj1, tant amb el prió natural Sup35^N com pel sintètic sPFD1. En la resta d'experiments hem fet servir únicament el pèptid priònic sintètic, evitant així qualsevol efecte secundari que pogués estar associat a la funció endògena de les proteïnes priòniques naturals del llevat com Sup35. Així, també hem comprovat que la presència d'agregats priònics en cèl·lules de primer cicle causa una pèrdua de coordinació entre la velocitat de creixement i la determinació del volum de gemmació, de manera similar al que succeeix en cèl·lules deficientes en la xaperona Ydj1²⁴⁵. Això podria estar indicant que els agregats priònics limiten el nivell de xaperones lliures, les quals són essencials per a coordinar la velocitat de creixement amb la progressió cap a la transició G1/S^{261,328}.

Tot i que existeixen assajos bioquímics basats en la velocitat de replegament de la luciferasa per a mesurar l'activitat xaperona³²⁹, els nostres objectius demandaven un mètode a nivell de cèl·lula única, així que hem optat per analitzar la seva mobilitat intracel·lular com a mesura indirecta de seva disponibilitat. Aquesta aproximació ja s'ha fet servir per a xaperona del reticle endoplasmàtic (Kar2³²¹), i nosaltres hem comprovat que també és vàlida per a xaperones citoplasmàtiques com Ydj1 i Ssa1²⁶¹. Quan hem determinat la mobilitat d'aquestes xaperones en cèl·lules expressant pèptids priònics, mentre que la presència dels agregats sempre alenteix la seva mobilitat, els efectes són diferents en Ydj1 que en Ssa1: mentre en Ydj1 només s'aprecia una reducció clara localment dins dels agregats priònics (mesurant-ho

per mitjà d'FCS), en el cas de Ssa1 es veuen acumulacions d'aquesta proteïna directament sobre els llocs on hi ha agregats priònics. Tenint en compte que la xaperona que està hidrolitzant ATP i provocant canvis conformationals sobre les proteïnes clientes és Ssa1 (la Hsp70), mentre que Ydj1 (la Hsp40) s'encarrega d'ajudar a la Hsp70 a hidrolitzar l'ATP a través del seu domini J, és esperable que Ssa1 estigui més retinguda en les regions de la cèl·lula on hi ha aquests agregats. Sigui com sigui, confirmem que hi ha una reducció en la disponibilitat de xaperones en cèl·lules amb agregats formats, i això concorda amb la interpretació que fem de les dades de volum de gemmació i pèrdua de coordinació de la seva determinació amb la velocitat de creixement.

Finalment, i sospitant que les cèl·lules joves que expressen agregats amiloides podrien estar simulant el fenotip de les cèl·lules envellides (que com ja es sabia, acumulen prions naturals com Sup35 en dipòsits proteics¹⁶⁶), hem volgut comprovar si les cèl·lules que expressen agregats també comparteixen algun altre fenotip amb les cèl·lules envellides. D'entre els que es coneixen, el més senzill d'analitzar és l'acidesa vacuolar (que cau dràsticament en les cèl·lules envellides³⁹), i efectivament així succeeix, si més no parcialment. També hem volgut comprovar altres fenotips associats a les cèl·lules envellides, sense obtenir respostes clares: pel que fa a la pèrdua de potencial mitocondrial, ja que no hem aconseguit reproduir els procediments publicats^{330,331} en el nostre sistema. Pel que fa a comprovar la presència d'ERCs no existeixen protocols per detectar-los a nivell de cèl·lula única (únicament per mitjà d'electroforesi bidimensional²⁶). Tot i així, la evidència disponible sembla apuntar a que les cèl·lules que expressen agregats amiloides es troben en un estat que mimetitza a les cèl·lules salvatges quan es troben en un estat d'envelliment avançat.

2. Reducció del RLS per superexpressió de pèptids priònics

Hem comprovat mitjançant aproximacions diverses que la superexpressió del pèptid priònic sintètic causa una reducció dràstica de la longevitat dels llevats que l'expressen. Tot i això, la seqüència d'esdeveniments previs a la mort cel·lular no semblen diferents als de les cèl·lules que expressen el pèptid sintètic control; simplement succeeixen abans quan s'expressi el prió. Amb els experiments de pèrdua de viabilitat i anàlisi de mida de microcolònia veiem que el RLS en aquestes cèl·lules queda reduït a la meitat del que tenen les cèl·lules control, resultats que hem pogut confirmar mitjançant la cambra CLiC, ja que en aquest sistema podem comptar amb relativa facilitat i amb exactitud quantes cèl·lules filles pot produir cada cèl·lula mare.

També hem detectat que l'aparició d'agregats visibles determina el destí de la cèl·lula, començant a mostrar un retard en la progressió del cicle cel·lular i morint de mitjana unes 5 generacions després de l'aparició dels primers agregats visibles. Però també detectem aquests esdeveniments en les cèl·lules control (més tard), així que sembla que l'efecte essencial de la superexpressió d'agregats priònics és avançar el que succeiria igualment més endavant a causa de la progressiva acumulació d'agregats proteotòxics que es produeix en les cèl·lules mares per tal de preservar el potencial replicatiu de les seves filles. Entrarem més en detall en el següent apartat amb el que succeeix en les cèl·lules mare salvatges, ja que la utilització d'aquests agregats priònics sintètics no ha estat més que una eina per manipular i reproduir el que pugui estar esdevenint en les cèl·lules envellides en cèl·lules més joves, però en un context diferent que deixi al marge altres fenotips també propis de les cèl·lules velles.

La superexpressió de xaperones és capaç de contrarestar parcialment l'escurçament en el RLS que experimenten les cèl·lules que expressen el pèptid prionic, però no l'augmenta en cèl·lules normals. Aquest resultat sembla una mica contradictori, ja que tenir nivells addicionals de xaperones hauria de fer que esdevinguessin menys limitants fins i tot si s'acumulen dipòsits proteotòxics durant l'envelliment. El que és clar és que la superexpressió exerceix una millora sobre les cèl·lules que expressen el pèptid prionic, però molt probablement prevenint la formació d'agregats i retardar-ne l'aparició (com hem vist que succeeix en cultius exponencials); d'altra banda també sabem que quan se superexpressen xaperones constitutivament, les cèl·lules adquireixen morfologies aberrants i això pot ser indicatiu de disfuncions en altres processos que comportin una pèrdua d'aptitud de les cèl·lules per competir i sobreviure en el medi. En qualsevol cas, és clar que la senescència replicativa no es pot contrarestar incrementant la dosi d'algunes xaperones, encara que hi estiguin directament implicades.

3. Alteracions en el cicle cel·lular de llevats envellits

Les cèl·lules envellides acumulen dipòsits proteics i aquests modifiquen el comportament de les xaperones cel·lulars. Aleshores, segons la nostra hipòtesi de treball, la limitació de la funció xaperona podria comprometre l'entrada en el cicle cel·lular, i ser causa directa de senescència replicativa. Estudis previs demostren que el temps d'interdivisió s'allarga en les últimes generacions de la cèl·lula envellint^{18,51,262}, i nosaltres hem vist que aquest allargament es produeix principalment durant la fase G1 del cicle. És curiós perquè aquesta és la fase més curta del cicle cel·lular de les cèl·lules mare²⁶⁴ en condicions normals (ja que en el primer cicle ja han assolit la mida crítica de Start i tot just es perllonga un temps curt fins iniciar la següent gemmació). En qualsevol cas, és clar que la proporció de cèl·lules en G1 augmenta en etapes avançades de l'envelliment i també que és la fase del cicle 'preferida' per les cèl·lules a l'hora de morir.

També hem après en els experiments amb la superexpressió del pèptid prionic que, des del moment que es forma un agregat clarament visible, la cèl·lula mor després de fer unes poques filles més, de manera semblant al que van observar en un altre treball quan les cèl·lules passaven pel SEP. Així, podria ser que la causa del SEP fos que les cèl·lules tinguessin un nivell d'agregats capaç d'inhibir prou les xaperones i causar un clar retard en G1. Com s'ha dit prèviament no disposem d'un reporter directe a nivell de cèl·lula única de la disponibilitat de xaperones, per poder-ho monitoritzar al llarg de l'envelliment de manera similar al que s'ha fet amb el potencial de membrana mitocondrial²⁶² i que ha permès descartar aquest fet com a causa del SEP. En qualsevol cas, i com veurem a continuació, sí que hem pogut aportar alguna evidència a favor del model on el que determina l'entrada en el SEP seria una caiguda en la disponibilitat de xaperones com a conseqüència de la progressiva acumulació de dipòsits proteotòxics en les cèl·lules envellides.

4. Modificacions en el comportament de les xaperones de cèl·lules envellides

Hem observat que Hsp104 forma aviat un focus (AiPD) en les cèl·lules envellint en la cambra CLiC i, en general, té una tendència a augmentar de nivell a mesura que la cèl·lula va envellint; no sabem a què respon la pujada posterior de Hsp104 un cop la cèl·lula no pot dividir-se més, però clarament no és en resposta a un estrès clàssic perquè els nivells de Ssa4 no augmenten en aquestes condicions. D'altra banda, els nivells de Ssa1 i Ydj1 són molt constants al llarg de tota la vida replicativa de la cèl·lula. En general aquests resultats són consistents amb els resultats obtinguts per transcriptòmica disponibles en la literatura²⁷³, i reproduïen els resultats relatius a la existència del AiPD¹⁶⁶.

En canvi, sí que hem detectat un canvi en el comportament d'aquestes xaperones en comparar cèl·lules joves i velles. En primer lloc, veiem una disminució en la mobilitat de GFP entre cèl·lules joves o envellides, suggerint que el citoplasma es torni menys dinàmic quan la cèl·lula envella. Però en les cèl·lules que expressen fusions de GFP a les xaperones Ssa1 i Ydj1, la caiguda de mobilitat és molt més important i sobretot la detectem en les cèl·lules envellides dos dies, mentre que la mobilitat de GFP no varia entre cèl·lules envellides un dia o dos. A més, en les cèl·lules envellides trobem zones de la cèl·lula on Ssa1 (i en menor mesura, també Ydj1) s'acumula en forma de *foci* indicant que, si més no en aquestes regions de la cèl·lula, les xaperones hi estan especialment retinudes.

Per confirmar el que havíem detectat per FLIP hem recorregut a un altre mètode de dinàmica molecular de Ssa1 sota el microscopi, el RICS, on hem comprovat que el coeficient de difusió estimat per a les cèl·lules velles és de l'ordre d'un 50% menor que el de les cèl·lules joves, el que confirma els resultats obtinguts per FLIP. El principal problema d'aquest mètode a l'hora de determinar un coeficient de difusió és que s'ha d'assumir un model de difusió que, en qualsevol cas, no pot reproduir el que succeeix dins la cèl·lula. Els models no deixen de ser aproximacions teòriques que intenten reproduir aspectes parcials de les dinàmiques de les proteïnes a analitzar, així que els valors absoluts que hem obtingut per cadascun dels paràmetres s'han de prendre amb cautela, per bé es poden acceptar les diferències relatives entre condicions experimentals. A més, per poder estimar amb prou precisió el coeficient de difusió cal un gran nombre de dades, i la diferència en l'ACF entre la obtinguda per una molècula que es mou ràpidament o per una que es mou lentament és petita. En canvi, la precisió amb que podem estimar el valor d'autocorrelació màxim G_0 , inversament proporcional al nombre de partícules que s'estan movent, és molt millor. Però mentre que el paràmetre D és fàcil d'interpretar (les molècules que observem es mouen més o menys ràpidament dins la cèl·lula), el significat de la N no és tan trivial: en teoria indica el nombre de partícules que s'estan movent, i si dividim la intensitat de fluorescència per el nombre de partícules, podem inferir quantes molècules fluorescentes hi ha per partícula. Això podria indicar-nos el nivell d'oligomerització de la molècula que estem detectant, i això podria dir-nos quelcom pel que fa a la seva funció biològica. De totes maneres, pel que fa a les cèl·lules analitzades, aquesta variable es manté gairebé constant entre cèl·lules joves i velles.

5. Relació entre mida cel·lular, longevitat i control del cicle cel·lular

El model actual que relaciona mida cel·lular i longevitat ens diu que les cèl·lules més petites (siguin més petites perquè creixen lentament o perquè tenen el cicle cel·lular accelerat) són capaces de fer més generacions que les cèl·lules més grans²⁶³; un estudi més recent diu que cèl·lules que tenen menys ribosomes i/o tenen una progressió més ràpida a través del cicle cel·lular també viuen més³³²; d'altra banda, els nostres resultats indiquen que si facilitem la progressió a través de G1 en cèl·lules envellides superexpressant Cln3 sense afectar la seva mida, es pot allargar el RLS d'aquestes cèl·lules. Aquest darrer resultat implica que haguem de reinterpretar les dades publicades prèviament, on bàsicament s'utilitzen llevats mutants per activadors o inhibidors del cicle cel·lular (així com cèl·lules que creixen més o menys de pressa): efectivament si la superexpressió de Cln3 s'indueix en un cultiu exponencial es produeix una reducció de mida cel·lular i un allargament del RLS (tal i com passaria en un mutant $\Delta whi5$, ja que es produeix el mateix efecte si es superexpressa un activador com si s'elimina un inhibidor). Tanmateix, succeeix el mateix si aquesta superexpressió s'indueix un cop la mida cel·lular ja no varia; vist això, aquest model el reformulem tal que el que limita el RLS no és la mida cel·lular en sí mateixa sinó la progressió en G1 en funció de la disponibilitat de xaperones, el que al seu torn depèn de la velocitat de creixement i de la presència o absència de dipòsits proteotòxics. Així, cèl·lules que creixen més lentament tenen un requeriment de xaperones inferior i més facilitat per progressar a través del cicle cel·lular, i per això el seu RLS seria més llarg que el de les cèl·lules que creixen més ràpidament i, per tant, tenen un requeriment major de xaperones per créixer. En altres paraules, les cèl·lules que creixen més lentament tindran més nivells lliures de xaperones per a contrarestar els agregats proteics acumulats durant l'envelliment, podent allargar el seu RLS respecte a cèl·lules que creixen més de pressa, que pel fet d'implicar més xaperones en les tasques pròpies del creixement, tindran menys disponibilitat de xaperones per a neutralitzar els agregats proteotòxics.

La superexpressió de Cln3 és capaç de revertir els fenotips relatius al control del cicle cel·lular en un mutant $\Delta ydj1^{251}$, i en aquest treball hem observat que nivells més alts de Cln3 reverteixen gairebé completament la pèrdua de RLS que experimenta aquest mutant. Això ens indica que, fins i tot en condicions d'absoluta falta d'aquesta xaperona, el facilitar l'entrada en el cicle cel·lular proporciona un RLS relativament normal. Aquests resultats posen de manifest el caràcter limitant de l'activitat xaperona i el paper clau de la capacitat d'entrar en cicle en fixar la vida replicativa del llevat de gemmació.

VI. Conclusions

- La superexpressió i agregació de pèptids priònics, tant el prió natural Sup35^N com el prió sintètic sPFD1, causa un retard en l'execució de Start en cèl·lules joves, explicitant-se en forma d'un augment en el volum de gemmació i en la pèrdua de coordinació entre la velocitat de creixement i la determinació de la mida crítica de Start.
- La mobilitat i, per tant, la disponibilitat de les xaperones Ssa1 i Ydj1 es troba disminuïda en cèl·lules joves que superexpressen el prió sintètic sPFD1.
- L'acumulació d'agregats priònics redueix en ca. 50% el RLS de les cèl·lules de llevat.
- La superexpressió de xaperones Ssa1 i Ydj1 redueix la proporció de cèl·lules que formen agregats amiloides visibles, i també rescata parcialment la disminució del RLS produït pels agregats priònics; per contra, la mateixa superexpressió de xaperones no incrementa el RLS de cèl·lules normals.
- Les cèl·lules joves que expressen el pèptid priònic tenen vacuoles menys àcides del normal per la seva edat, similar al fenotip mostrat per cèl·lules envellides.
- Durant l'envelliment la majoria de les cèl·lules moren quan es troben en la fase G1 del cicle cel·lular.
- El G1 de les cèl·lules envellides s'allarga significativament en les darreres generacions, essent aquest fet el principal contribuïdor a l'allargament del cicle cel·lular abans de la mort replicativa.
- Els nivells de la xaperona Hsp104 s'incrementen durant l'última gemmació productiva per mecanismes independents de la resposta general a estrès, mentre que els nivells d'altres xaperones com Ssa1 i Ydj1 romanen invariables.
- La mobilitat i, per tant, la disponibilitat de les xaperones Ssa1 i Ydj1 es troba disminuïda en cèl·lules envellides.
- La superexpressió de Cln3 és capaç de rescatar la pèrdua de RLS de les cèl·lules deficientes en la xaperona Ydj1, així com d'allargar el RLS en cèl·lules normals independentment del moment durant l'envelliment i de la mida cel·lular en que s'iniciï aquesta superexpressió.

VII. Bibliografia

1. Weismann, A. *Essays upon Heredity and Kindered Biological Problems*. (Clarendon Press, 1891).
2. Sheldrake, A. R. The ageing, growth and death of cells. *Nature* **250**, 381–385 (1974).
3. Holliday, R. Growth and death of diploid and transformed human fibroblasts. *Fed. Proc.* **34**, 1975 (1975).
4. Medvedev, Z. A. On the immortality of the germ line: genetic and biochemical mechanism. A review. *Mech. Ageing Dev.* **17**, 331–59 (1981).
5. Hernebring, M., Brolén, G., Aguilaniu, H., Semb, H. & Nyström, T. Elimination of damaged proteins during differentiation of embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 7700–7705 (2006).
6. Hernebring, M. *et al.* Removal of damaged proteins during ES cell fate specification requires the proteasome activator PA28. *Sci. Rep.* **3**, 1381 (2013).
7. Nyström, T. & Liu, B. Protein quality control in time and space - links to cellular aging. *FEMS Yeast Res.* **14**, 40–48 (2014).
8. Stewart, E. & Taddei, F. Aging in *Escherichia coli*: signals in the noise. *Bioessays* **27**, 983 (2005).
9. Stewart, E. J., Madden, R., Paul, G. & Taddei, F. Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division. *PLoS Biol.* **3**, 0295–0300 (2005).
10. Ackermann, M., Stearns, S. C. & Jenal, U. Senescence in a bacterium with asymmetric division. *Science* **300**, 1920 (2003).
11. Jazwinski, S. M. The genetics of aging in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetica* **91**, 35–51 (1993).
12. Jazwinski, S. M., Kim, S., Lai, C.-Y. & Benguria, A. Epigenetic stratification: the role of individual change in the biological aging process. *Exp. Gerontol.* **33**, 571–580 (1998).
13. Barton, A. A. Some Aspects of Cell Division in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **4**, 84–86 (1950).
14. Mortimer, R. K. & Johnston, J. R. Life span of individual yeast cells. *Nature* **183**, 1751–1752 (1959).
15. Kennedy, B. K., Austriaco, N. R. & Guarente, L. Daughter cells of *Saccharomyces cerevisiae* from old mothers display a reduced life span. *J. Cell Biol.* **127**, 1985–1993 (1994).
16. Fabrizio, P., Pozza, F., Pletcher, S. D., Gendron, C. M. & Longo, V. D. Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science* **292**, 288–290 (2001).
17. Steinkraus, K. a, Kaeberlein, M. & Kennedy, B. K. Replicative aging in yeast: the means to the end. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **24**, 29–54 (2008).
18. Denoth Lippuner, A., Julou, T. & Barral, Y. Budding yeast as a model organism to study the effects of age. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 300–25 (2014).
19. Greider, C. W. & Blackburn, E. H. The telomere terminal transferase of tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* **51**, 887–898 (1987).
20. Wright, W. E. & Shay, J. W. Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: The essential role of counting. *Current Opinion in Genetics and Development* **11**, 98–103 (2001).
21. D'Mello, N. P. & Jazwinski, S. M. Telomere length constancy during aging of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **173**, 6709–6713 (1991).
22. Lundblad, V. & Szostak, J. W. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* **57**, 633–643 (1989).
23. Singer, M. S. & Gottschling, D. E. TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* **266**, 404–9 (1994).
24. Dang, W. *et al.* Histone H4 lysine 16 acetylation regulates cellular lifespan. *Nature* **459**, 802–7 (2009).
25. Venema, J. & Tollervey, D. Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* **33**, 261–311 (1999).
26. Sinclair, D. A. & Guarente, L. Extrachromosomal rDNA circles - A cause of aging in yeast. *Cell* **91**, 1033–1042 (1997).
27. Defossez, P. A. *et al.* Elimination of replication block protein Fob1 extends the life span of yeast mother cells. *Mol. Cell* **3**, 447–455 (1999).
28. Gottlieb, S. & Esposito, R. E. A new role for a yeast transcriptional silencer gene, SIR2, in regulation of recombination in ribosomal DNA. *Cell* **56**, 771–776 (1989).
29. Gillespie, C. S. *et al.* A mathematical model of ageing in yeast. *J. Theor. Biol.* **229**, 189–196 (2004).
30. Shcheprova, Z., Baldi, S., Frei, S. B., Gonnet, G. & Barral, Y. A mechanism for asymmetric segregation of age during yeast budding. *Nature* **454**, 1–8 (2008).
31. Lindstrom, D. L., Leverich, C. K., Henderson, K. A. & Gottschling, D. E. Replicative age induces mitotic recombination in the ribosomal RNA gene cluster of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* **7**, (2011).
32. Kaeberlein, M. A molecular age barrier. *Nature* **24**, 29–54 (2008).
33. McMurray, M. a & Gottschling, D. E. An age-induced switch to a hyper-recombinational state. *Science* **301**, 1908–11 (2003).
34. Veatch, J. R., McMurray, M. A., Nelson, Z. W. & Gottschling, D. E. Mitochondrial Dysfunction Leads to Nuclear Genome Instability via an Iron-Sulfur Cluster Defect. *Cell* **137**, 1247–1258 (2009).
35. White, M. F. & Dillingham, M. S. Iron-sulphur clusters in nucleic acid processing enzymes. *Current Opinion in Structural Biology*

- 22, 94–100 (2012).
36. Pijuan, J., Maria, C., Herrero, E. & Belli, G. Impaired mitochondrial Fe-S cluster biogenesis activates the DNA damage response through different signaling mediators. *J. Cell Sci.* **128**, 4653–65 (2015).
37. Lai, C. Y., Jaruga, E., Borghouts, C. & Michal Jazwinski, S. A mutation in the ATP2 gene abrogates the age asymmetry between mother and daughter cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **162**, 73–87 (2002).
38. Jazwinski, S. M. Yeast replicative life span - The mitochondrial connection. *FEMS Yeast Research* **5**, 119–125 (2004).
39. Hughes, A. L. & Gottschling, D. E. An early age increase in vacuolar pH limits mitochondrial function and lifespan in yeast. *Nature* **492**, 261–5 (2012).
40. Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**, 298–300 (1956).
41. McFaline-Figueroa, J. R. *et al.* Mitochondrial quality control during inheritance is associated with lifespan and mother-daughter age asymmetry in budding yeast. *Aging Cell* **10**, 885–895 (2011).
42. Xie, Z. *et al.* Molecular phenotyping of aging in single yeast cells using a novel microfluidic device. *Aging Cell* **11**, 599–606 (2012).
43. Ristow, M. & Zarse, K. How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Experimental Gerontology* **45**, 410–418 (2010).
44. Parikh, V. S., Morgan, M. M., Scott, R., Clements, L. S. & Butow, R. a. The mitochondrial genotype can influence nuclear gene expression in yeast. *Science*. **235**, 576–80 (1987).
45. Borghouts, C., Benguria, A., Wawryn, J. & Jazwinski, S. M. Rtg2 Protein Links Metabolism and Genome Stability in Yeast Longevity. *Genetics* **166**, 765–777 (2004).
46. Armstrong, J. Yeast vacuoles: More than a model lysosome. *Trends in Cell Biology* **20**, 580–585 (2010).
47. Rubinsztein, D. C., Mariño, G. & Kroemer, G. Autophagy and aging. *Cell* **146**, 682–695 (2011).
48. Fabrizio, P. *et al.* Genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* identifies vacuolar protein sorting, autophagy, biosynthetic, and tRNA methylation genes involved in life span regulation. *PLoS Genet.* **6**, 1–14 (2010).
49. Matecic, M. *et al.* A microarray-based genetic screen for yeast chronological aging factors. *PLoS Genet.* **6**, (2010).
50. Tang, F. *et al.* A life-span extending form of autophagy employs the vacuole-vacuole fusion machinery. *Autophagy* **4**, 874–886 (2008).
51. Lee, S. S., Vizcarra, I. A., Huberts, D. H. E. W., Lee, L. P. & Heinemann, M. Whole lifespan microscopic observation of budding yeast aging through a micro fluidic dissection platform. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 4916–4920 (2012).
52. Gebre, S. *et al.* Osh6 overexpression extends the lifespan of yeast by increasing vacuole fusion. *Cell Cycle* **11**, 2176–2188 (2012).
53. Henderson, K. a, Hughes, A. L. & Gottschling, D. E. Mother-daughter asymmetry of pH underlies aging and rejuvenation in yeast. *Elife* **3**, 1–13 (2014).
54. Thayer, N. H. *et al.* Identification of long-lived proteins retained in cells undergoing repeated asymmetric divisions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 14019–14026 (2014).
55. Aguilaniu, H., Gustafsson, L., Rigoulet, M. & Nyström, T. Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science*. **299**, 1751–1753 (2003).
56. Erjavec, N., Larsson, L., Grantham, J. & Nyström, T. Accelerated aging and failure to segregate damaged proteins in Sir2 mutants can be suppressed by overproducing the protein aggregation-remodeling factor Hsp104p. *Genes Dev.* **21**, 2410–2421 (2007).
57. Grimminger-Marquardt, V. & Lashuel, H. A. Structure and function of the molecular chaperone Hsp104 from yeast. *Biopolymers* **93**, 252–276 (2010).
58. Liu, B. *et al.* The Polarisome Is Required for Segregation and Retrograde Transport of Protein Aggregates. *Cell* **140**, 257–267 (2010).
59. Uversky, V. N. *et al.* Pathological unfoldomics of uncontrolled chaos: Intrinsically disordered proteins and human diseases. *Chem. Rev.* **114**, 6844–6879 (2014).
60. Prusiner, S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**, 136–44 (1982).
61. Prusiner, S. B. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 13363–13383 (1998).
62. Linden, R. *et al.* Physiology of the prion protein. *Physiol. Rev.* **88**, 673–728 (2008).
63. Shorter, J. & Lindquist, S. Prions as adaptive conduits of memory and inheritance. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 435–450 (2005).
64. Alzheimer, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Zeits Psychiatrie Psych. Y Gerichtl. Med* **64**, 146–8 (1907).
65. Wisniewski, K. E., Wisniewski, H. M. & Wen, G. Y. Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann. Neurol.* **17**, 278–282 (1985).
66. Shankar, G. M. *et al.* Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* **14**, 837–42 (2008).

67. Vassar, R. *et al.* β -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*. **286**, 735–741 (1999).
68. Wu, W.-L. & Zhang, L. γ -secretase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Drug Dev. Res.* **70**, 94–100 (2009).
69. Campion, D. *et al.* Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 664–70 (1999).
70. Kempster, P. A., Hurwitz, B. & Lees, A. J. A new look at James Parkinson's Essay on the Shaking Palsy. *Neurology* **69**, 482–485 (2007).
71. Parkinson, J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **14**, 223–36; discussion 222 (2002).
72. Spillantini, M. G. *et al.* Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839–840 (1997).
73. Uéda, K. *et al.* Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 11282–11286 (1993).
74. Jao, C. C., Hegde, B. G., Chen, J., Haworth, I. S. & R., L. Structure of membrane-bound α -synuclein from site-directed spin labeling and computational refinement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 19666–19671 (2008).
75. Alim, M. A. *et al.* Tubulin seeds alpha-synuclein fibril formation. *J. Biol. Chem.* **277**, 2112–7 (2002).
76. Krüger, R. *et al.* Ala30Pro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* **18**, 106–108 (1998).
77. Zarranz, J. J. *et al.* The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* **55**, 164–73 (2004).
78. Appel-Cresswell, S. *et al.* Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **28**, 811–813 (2013).
79. Lesage, S. *et al.* G51D α -synuclein mutation causes a novel Parkinsonian-pyramidal syndrome. *Ann. Neurol.* **73**, 459–471 (2013).
80. Huntington, G. On chorea. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **15**, 109–112 (2003).
81. Dayalu, P. & Albin, R. L. Huntington Disease: Pathogenesis and Treatment. *Neurol. Clin.* **33**, 101–114 (2015).
82. Feigin, A. *et al.* Functional decline in Huntington's disease. *Mov. Disord.* **10**, 211–214 (1995).
83. Gusella, J. F. *et al.* A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* **306**, 234–238 (1983).
84. MacDonald, M. E. *et al.* A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* **72**, 971–983 (1993).
85. Kremer, B. *et al.* A Worldwide Study of the Huntington's Disease Mutation: The Sensitivity and Specificity of Measuring CAG Repeats. *N. Engl. J. Med.* **330**, 1401–1406 (1994).
86. Falush, D., Almquist, E. W., Brinkmann, R. R., Iwasa, Y. & Hayden, M. R. Measurement of mutational flow implies both a high new-mutation rate for Huntington disease and substantial underascertainment of late-onset cases. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 373–85 (2001).
87. Nagai, Y. *et al.* A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 332–340 (2007).
88. Raymond, L. A. *et al.* Pathophysiology of Huntington's disease: Time-dependent alterations in synaptic and receptor function. *Neuroscience* **198**, 252–273 (2011).
89. Godin, J. D. & Humbert, S. Mitotic spindle: Focus on the function of huntingtin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 852–856 (2011).
90. Dreese, M. & Netsky, M. Degenerative disorders of the basal ganglia. *Pathol. Nerv. Syst.* **1**, 1185–1193 (1968).
91. Charcot, J.-M. & Joffroy, A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et des faisceaux antéro-latéraux de la moelle épinière. *Arch. Physiol. Norm. Pathol.* **2**, 744–760 (1869).
92. Rowland, L. & Shneider, N. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1688–1700 (2001).
93. Boillée, S., Vande Velde, C. & Cleveland, D. W. ALS: A Disease of Motor Neurons and Their Nonneuronal Neighbors. *Neuron* **52**, 39–59 (2006).
94. Rosen, D. R. *et al.* Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59–62 (1993).
95. Bruijn, L. I. *et al.* ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* **18**, 327–338 (1997).
96. Bruijn, L. I. *et al.* Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science*. **281**, 1851–1854 (1998).
97. Oosthuysen, B. *et al.* Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat. Genet.* **28**, 131–138 (2001).
98. Greenway, M. J. *et al.* ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.* **38**, 411–3 (2006).
99. Nishimura, A. L. *et al.* A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 822–31 (2004).

100. Afifi, A., Aleu, F., Goodgold, J. & MacKay, B. Ultrastructure of atrophic muscle in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **16**, 475–81 (1966).
101. Hirano, A., Donnenfeld, H., Sasaki, S. & Nakano, I. Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **43**, 461–70 (1984).
102. Hirano, A. *et al.* Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **43**, 471–80 (1984).
103. Hernández, F. & Avila, J. Tauopathies. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64**, 2219–2233 (2007).
104. Hutton, M. *et al.* Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* **393**, 702–5 (1998).
105. Goedert, M. *et al.* Reduced binding of protein phosphatase 2A to tau protein with frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 mutations. *J. Neurochem.* **75**, 2155–2162 (2000).
106. Montejo de Garcini, E., Serrano, L. & Avila, J. Self assembly of microtubule associated protein tau into filaments resembling those found in alzheimer disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141**, 790–796 (1986).
107. Busciglio, J., Lorenzo, A., Yeh, J. & Yankner, B. A. Beta-Amyloid Fibrils Induce Tau-Phosphorylation and Loss of Microtubule-Binding. *Neuron* **14**, 879–888 (1995).
108. Nakano, K., Dawson, D. & Spence, A. Machado disease. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology* **22**, 49–55 (1972).
109. Bettencourt, C. & Lima, M. Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives. *Orphanet J. Rare Dis.* **6**, 35 (2011).
110. Kawaguchi, Y. *et al.* CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat. Genet.* **8**, 221–228 (1994).
111. Maciel, P. *et al.* Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am. J. Hum. Genet.* **57**, 54–61 (1995).
112. Rujano, M. A. *et al.* Polarised asymmetric inheritance of accumulated protein damage in higher eukaryotes. *PLoS Biol.* **4**, 2325–2335 (2006).
113. Uhlar, C. M. & Whitehead, A. S. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *European Journal of Biochemistry* **265**, 501–523 (1999).
114. Sanchorawala, V. Light-chain (AL) amyloidosis: diagnosis and treatment. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN* **1**, 1331–1341 (2006).
115. Colon, W. & Kelly, J. W. Partial Denaturation of Transthyretin Is Sufficient for Amyloid Fibril Formation in Vitro. *Biochemistry* **31**, 8654–8660 (1992).
116. Benson, M. D., James, S., Scott, K., Liepnieks, J. J. & Kluve-Beckerman, B. Leukocyte chemotactic factor 2: A novel renal amyloid protein. *Kidney Int.* **74**, 218–222 (2008).
117. Miyata, T. *et al.* β 2-Microglobulin modified with advanced glycation end products is a major component of hemodialysis-associated amyloidosis. *J. Clin. Invest.* **92**, 1243–1252 (1993).
118. Paulsson, J. F. & Westermark, G. T. Aberrant processing of human proislet amyloid polypeptide results in increased amyloid formation. *Diabetes* **54**, 2117–2125 (2005).
119. Matlashewski, G. *et al.* Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO J.* **3**, (1984).
120. Isobe, M., Emanuel, B. S., Givol, D., Oren, M. & Croce, C. M. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* **320**, 84–5 (1986).
121. Ano Bom, A. P. D. *et al.* Mutant p53 aggregates into prion-like amyloid oligomers and fibrils: Implications for cancer. *J. Biol. Chem.* **287**, 28152–28162 (2012).
122. Bullock, A. N. & Fersht, A. R. Rescuing the function of mutant p53. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 68–76 (2001).
123. Rudiger, S., Freund, S. M. V., Veprintsev, D. B. & Fersht, A. R. CRINEPT-TROSY NMR reveals p53 core domain bound in an unfolded form to the chaperone Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 11085–90 (2002).
124. von Hippel, E. Über eine sehr seltene Erkrankung der Netzhaut. *Arh. für Ophthalmol.* **59**, 83–106 (1904).
125. Gossage, L., Eisen, T. & Maher, E. R. VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nat Rev Cancer* **15**, 55–64 (2015).
126. Neumann, H. P. & Wiestler, O. D. Clustering of features of von Hippel-Lindau syndrome: evidence for a complex genetic locus. *Lancet* **337**, 1052–4 (1991).
127. Latif, F. *et al.* Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science*. **260**, 1317–20 (1993).
128. Kibel, A., Iliopoulos, O., DeCaprio, J. A. & Kaelin, W. G. Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to Elongin B and C. *Science* **269**, 1444–6 (1995).
129. Lonergan, K. M. *et al.* Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires

- binding to complexes containing elongins B/C and Cul2. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 732–741 (1998).
130. McClellan, A. J., Scott, M. D. & Frydman, J. Folding and quality control of the VHL tumor suppressor proceed through distinct chaperone pathways. *Cell* **121**, 739–748 (2005).
 131. Jonca, N. *et al.* Corneodesmosin, a component of epidermal corneocyte desmosomes, displays homophilic adhesive properties. *J. Biol. Chem.* **277**, 5024–5029 (2002).
 132. Levy-Nissenbaum, E. *et al.* Hypotrichosis simplex of the scalp is associated with nonsense mutations in CDSN encoding corneodesmosin. *Nat. Genet.* **34**, 151–153 (2003).
 133. Singhvi, A. & Garriga, G. Asymmetric divisions, aggresomes and apoptosis. *Trends Cell Biol.* **19**, 1–7 (2009).
 134. Shorter, J. & Lindquist, S. Hsp104, Hsp70 and Hsp40 interplay regulates formation, growth and elimination of Sup35 prions. *EMBO J.* **27**, 2712–24 (2008).
 135. Kawai-Noma, S., Pack, C.-G., Tsuji, T., Kinjo, M. & Taguchi, H. Single mother-daughter pair analysis to clarify the diffusion properties of yeast prion Sup35 in guanidine-HCl-treated [PSI] cells. *Genes Cells* **14**, 1045–54 (2009).
 136. Winkler, J., Tyedmers, J., Bukau, B. & Mogk, A. Hsp70 targets Hsp100 chaperones to substrates for protein disaggregation and prion fragmentation. *The Journal of Cell Biology* **198**, 387–404 (2012).
 137. Chernoff, Y. O., Lindquist, S. L., Ono, B., Inge-Vechtomov, S. G. & Liebman, S. W. Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi⁺]. *Science*. **268**, 880–884 (1995).
 138. Eaglestone, S. S., Ruddock, L. W., Cox, B. S. & Tuite, M. F. Guanidine hydrochloride blocks a critical step in the propagation of the prion-like determinant [PSI(+)] of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 240–4 (2000).
 139. Ness, F., Ferreira, P., Cox, B. S. & Tuite, M. F. Guanidine hydrochloride inhibits the generation of prion 'seeds' but not prion protein aggregation in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 5593–605 (2002).
 140. Wickner, R. B., Edskes, H. K., Bateman, D., Kelly, A. C. & Gorkovskiy, A. The yeast prions [PSI⁺] and [URE3] are molecular degenerative diseases. *Prion* **5**, 258–262 (2011).
 141. Cox, B. S. Ψ, A cytoplasmic suppressor of super-suppressor in yeast. *Heredity (Edinb)*. **20**, 505–521 (1965).
 142. Chernoff, Y. O., Derkach, I. L. & Inge-Vechtomov, S. G. Multicopy SUP35 gene induces de-novo appearance of psi-like factors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **24**, 268–270 (1993).
 143. Derkach, I. L., Chernoff, Y. O., Kushnirov, V. V., Inge-Vechtomov, S. G. & Liebman, S. W. Genesis and variability of [PSI] prion factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **144**, 1375–1386 (1996).
 144. Ter-Avanesyan, M. D. *et al.* Deletion analysis of the SUP35 gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals two non-overlapping functional regions in the encoded protein. *Mol. Microbiol.* **7**, 683–692 (1993).
 145. Tyedmers, J., Madariaga, M. L. & Lindquist, S. Prion switching in response to environmental stress. *PLoS Biol.* **6**, e294 (2008).
 146. Tenreiro, S., Munder, M. C., Alberti, S. & Outeiro, T. F. Harnessing the power of yeast to unravel the molecular basis of neurodegeneration. *J. Neurochem.* **127**, 438–52 (2013).
 147. Halfmann, R., Alberti, S. & Lindquist, S. Prions, protein homeostasis, and phenotypic diversity. *Trends Cell Biol* **20**, 125–133 (2010).
 148. Wickner, R. B. [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. **264**, 566–9 (1994).
 149. Derkach, I. L., Bradley, M. E., Hong, J. Y. & Liebman, S. W. Prions affect the appearance of other prions: The story of [PIN⁺]. *Cell* **106**, 171–182 (2001).
 150. Rogoza, T. *et al.* Non-Mendelian determinant [ISP⁺] in yeast is a nuclear-residing prion form of the global transcriptional regulator Sfp1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 10573–7 (2010).
 151. Crow, E., Du, Z. & Li, L. New insights into prion biology from the novel [SWI⁺] system. *Prion* **2**, 141–144 (2008).
 152. Patel, B. K., Gavin-Smyth, J. & Liebman, S. W. The yeast global transcriptional co-repressor protein Cyc8 can propagate as a prion. *Nat. Cell Biol.* **11**, 344–349 (2009).
 153. Alberti, S., Halfmann, R., King, O., Kapila, A. & Lindquist, S. A Systematic Survey Identifies Prions and Illuminates Sequence Features of Prionogenic Proteins. *Cell* **137**, 146–158 (2009).
 154. Brown, J. C. S. & Lindquist, S. A heritable switch in carbon source utilization driven by an unusual yeast prion. *Genes Dev.* **23**, 2320–2332 (2009).
 155. Roberts, B. T. & Wickner, R. B. Heritable activity: A prion that propagates by covalent autoactivation. *Genes Dev.* **17**, 2083–2087 (2003).
 156. Suzuki, G., Shimazu, N. & Tanaka, M. A yeast prion, Mod5, promotes acquired drug resistance and cell survival under environmental stress. *Science*. **336**, 355–359 (2012).
 157. Baudin-Baillieu, A., Fabret, C. & Namy, O. Are prions part of the dark matter of the cell? *Prion* **5**, 299–304 (2011).
 158. Escusa-Toret, S., Vonk, W. I. & Frydman, J. Spatial sequestration of misfolded proteins by a dynamic chaperone pathway enhances cellular fitness during stress. *Nat Cell Biol* **15**, 1231–1243 (2013).

159. Zhou, C. *et al.* Motility and segregation of Hsp104-associated protein aggregates in budding yeast. *Cell* **147**, 1186–1196 (2011).
160. Zhou, C. *et al.* Organelle-Based Aggregation and Retention of Damaged Proteins in Asymmetrically Dividing Cells. *Cell* 1–13 (2014). doi:10.1016/j.cell.2014.09.026
161. Kaganovich, D., Kopito, R. & Frydman, J. Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* **454**, 1088–1095 (2008).
162. Miller, S. B. M. *et al.* Compartment-specific aggregases direct distinct nuclear and cytoplasmic aggregate deposition. *EMBO J.* **34**, 778–97 (2015).
163. Öling, D., Eisele, F., Kvint, K. & Nyström, T. Opposing roles of Ubp3-dependent deubiquitination regulate replicative life span and heat resistance. *EMBO J.* **33**, 747–761 (2014).
164. Andersson, V., Hanzén, S., Liu, B., Molin, M. & Nyström, T. Enhancing protein disaggregation restores proteasome activity in aged cells. *Aging (Albany, NY)*. **5**, 802–812 (2013).
165. Moldavski, O. *et al.* Lipid Droplets Are Essential for Efficient Clearance of Cytosolic Inclusion Bodies. *Dev. Cell* **33**, 603–610 (2015).
166. Saarikangas, J. & Barral, Y. Protein aggregates are associated with replicative aging without compromising protein quality control. *Elife* **4**, 1–24 (2015).
167. Saarikangas, J. *et al.* Compartmentalization of ER-Bound Chaperone Confines Protein Deposit Formation to the Aging Yeast Cell. *Curr. Biol.* 1–11 (2017). doi:10.1016/j.cub.2017.01.069
168. Toombs, J. A. *et al.* De novo design of synthetic prion domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 6519–24 (2012).
169. Anderson, C. PAPA - a method for predicting prion forming propensity.
Available at: <http://combi.cs.colostate.edu/supplements/papa/>.
170. Savistchenko, J., Krzewska, J., Fay, N. & Melki, R. Molecular chaperones and the assembly of the prion Ure2p in vitro. *J. Biol. Chem.* **283**, 15732–9 (2008).
171. Derkatch, I. L. *et al.* Effects of Q/N-rich, polyQ, and non-polyQ amyloids on the de novo formation of the [PSI⁺] prion in yeast and aggregation of Sup35 in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 12934–9 (2004).
172. Lian, H.-Y. *et al.* Hsp40 interacts directly with the native state of the yeast prion protein Ure2 and inhibits formation of amyloid-like fibrils. *J. Biol. Chem.* **282**, 11931–40 (2007).
173. Yang, Z., Hong, J. Y., Derkatch, I. L. & Liebman, S. W. Heterologous gln/asn-rich proteins impede the propagation of yeast prions by altering chaperone availability. *PLoS Genet.* **9**, e1003236 (2013).
174. Liebman, S. W. & Chernoff, Y. O. Prions in Yeast. *Genetics* **191**, 1041–1072 (2012).
175. Morgan, D. O. *The Cell Cycle: Principles of Control*. (New Science Press, 2007).
176. Larabell, C. A. & Nugent, K. A. Imaging cellular architecture with X-rays. *Current Opinion in Structural Biology* **20**, 623–631 (2010).
177. Bloom, J. & Cross, F. R. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 149–160 (2007).
178. Espinoza, F. H., Farrell, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Morgan, D. O. A cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) in budding yeast unrelated to vertebrate CAK. *Science*. **273**, 1714–7 (1996).
179. Booher, R. N., Deshaies, R. J. & Kirschner, M. W. Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. *EMBO J.* **12**, 3417–3426 (1993).
180. Russell, P., Moreno, S. & Reed, S. I. Conservation of mitotic controls in fission and budding yeasts. *Cell* **57**, 295–303 (1989).
181. Cross, F. R. & Blake, C. M. The yeast Cln3 protein is an unstable activator of Cdc28. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 3266–3271 (1993).
182. Cross, F. R. & Tinkelenberg, A. H. A potential positive feedback loop controlling CLN1 and CLN2 gene expression at the start of the yeast cell cycle. *Cell* **65**, 875–883 (1991).
183. Mendenhall, M. D. An inhibitor of p34CDC28 protein kinase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. **259**, 216–9 (1993).
184. Schwob, E., Böhm, T., Mendenhall, M. D. & Nasmyth, K. The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* **79**, 233–244 (1994).
185. Verma, R. *et al.* Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase. *Science*. **278**, 455–460 (1997).
186. Zachariae, W., Schwab, M., Nasmyth, K. & Seufert, W. Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science*. **282**, 1721–1724 (1998).
187. Jaspersen, S. L., Charles, J. F. & Morgan, D. O. Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr. Biol.* **9**, 227–236 (1999).
188. Fitch, I. *et al.* Characterization of four B-type cyclin genes of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **3**, 805–818 (1992).

189. Rudner, A. D. & Murray, A. W. Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *J. Cell Biol.* **149**, 1377–1390 (2000).
190. Shirayama, M., Tóth, A., Gálová, M. & Nasmyth, K. A. APC(Cdc20) promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5. *Nature* **402**, 203–207 (1999).
191. Wäsch, R. & Cross, F. R. APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit. *Nature* **418**, 556–562 (2002).
192. Spellman, P. T. *et al.* Comprehensive identification of cell cycle – regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol. Biol. Cell* **9**, 3273–3297 (1998).
193. Sidorova, J. & Breeden, L. Analysis of the SWI4/SWI6 protein complex, which directs G1/S-specific transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 1069–77 (1993).
194. Koch, C., Moll, T., Neuberg, M., Ahorn, H. & Nasmyth, K. A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G1 to S phase. *Science*. **261**, 1551–1557 (1993).
195. De Bruin, R. A. M., McDonald, W. H., Kalashnikova, T. I., Yates, J. & Wittenberg, C. Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5. *Cell* **117**, 887–898 (2004).
196. Costanzo, M. *et al.* CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast. *Cell* **117**, 899–913 (2004).
197. Schwob, E. & Nasmyth, K. CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **7**, 1160–1175 (1993).
198. Darieva, Z. *et al.* Cell Cycle-Regulated Transcription through the FHA Domain of Fkh2p and the Coactivator Ndd1p. *Curr. Biol.* **13**, 1740–1745 (2003).
199. Sethi, N., Monteagudo, M. C., Koshland, D., Hogan, E. & Burke, D. J. The CDC20 gene product of *Saccharomyces cerevisiae*, a beta-transducin homolog, is required for a subset of microtubule-dependent cellular processes. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5592–5602 (1991).
200. Butler, G. & Thiele, D. J. ACE2, an Activator of Yeast Metallothionein Expression Which Is Homologous to SWIS. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 476–485 (1991).
201. Nasmyth, K., Seddon, A. & Ammerer, G. Cell cycle regulation of SW15 is required for mother-cell-specific HO transcription in yeast. *Cell* **49**, 549–558 (1987).
202. Schmoller, K. M., Turner, J. J., Koivomagi, M. & Skotheim, J. M. Dilution of the cell cycle inhibitor Whi5 controls budding-yeast cell size. *Nature* **526**, 268–272 (2015).
203. Pramila, T., Wu, W., Miles, S., Noble, W. S. & Breeden, L. L. The forkhead transcription factor Hcm1 regulates chromosome segregation genes and fills the S-phase gap in the transcriptional circuitry of the cell cycle. *Genes Dev.* **20**, 2266–2278 (2006).
204. Visintin, R. *et al.* The Phosphatase Cdc14 Triggers Mitotic Exit by Reversal of Cdk-Dependent Phosphorylation. *Sciencedirect.Com* **2**, 709–718 (1998).
205. Knapp, D., Bhoite, L., Stillman, D. J. & Nasmyth, K. The transcription factor Swi5 regulates expression of the cyclin kinase inhibitor p40SIC1. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 5701–5707 (1996).
206. Weinreich, M., Liang, C., Chen, H. H. & Stillman, B. Binding of cyclin-dependent kinases to ORC and Cdc6p regulates the chromosome replication cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 11211–7 (2001).
207. Cho, R. J. *et al.* A Genome-Wide Transcriptional Analysis of the Mitotic Cell Cycle. *Mol. Cell* **2**, 65–73 (1998).
208. Spellman, P. T. *et al.* Yeast Cell Cycle Analysis Project. Available at: <http://genome-www.stanford.edu/cgi-bin/cellcycle/search>.
209. Feldman, R. M. R., Correll, C. C., Kaplan, K. B. & Deshaies, R. J. A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* **91**, 221–230 (1997).
210. Connelly, C. & Hieter, P. Budding yeast SKP1 encodes an evolutionarily conserved kinetochore protein required for cell cycle progression. *Cell* **86**, 275–285 (1996).
211. Mathias, N. *et al.* Cdc53p acts in concert with Cdc4p and Cdc34p to control the G1-to-S-phase transition and identifies a conserved family of proteins. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6634–6643 (1996).
212. Goehl, M. *et al.* The yeast cell cycle gene CDC34 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Sci. (New York, NY)* **241**, 1331–1335 (1988).
213. Seol, J. H. *et al.* Cdc53/cullin and the essential Hrt1 RING-H2 subunit of SCF define a ubiquitin ligase module that activates the E2 enzyme Cdc34. *Genes Dev.* **13**, 1614–1626 (1999).
214. Tyers, M., Tokiwa, G., Nash, R. & Futcher, B. The Cln3-Cdc28 kinase complex of *S. cerevisiae* is regulated by proteolysis and phosphorylation. *EMBO J.* **11**, 1773–84 (1992).
215. Landry, B. D., Doyle, J. P., Toczyski, D. P. & Benanti, J. A. F-box protein specificity for G1 cyclins is dictated by subcellular localization. *PLoS Genet.* **8**, (2012).
216. Barral, Y., Jentsch, S. & Mann, C. G1 cyclin turnover and nutrient uptake are controlled by a common pathway in yeast. *Genes Dev.* **9**, 399–409 (1995).

217. Nash, P. *et al.* Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication. *Nature* **414**, 514–521 (2001).
218. Henchoz, S. *et al.* Phosphorylation- and ubiquitin-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor Far1p in budding yeast. *Genes Dev.* **11**, 3046–3060 (1997).
219. Kaiser, P., Sia, R. A. L., Bardes, E. G. S., Lew, D. J. & Reed, S. I. Cdc34 and the F-box protein Met30 are required for degradation of the Cdk-inhibitory kinase Swe1. *Genes Dev.* **12**, 2587–2597 (1998).
220. Drury, L. S., Perkins, G. & Diffley, J. F. X. The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast. *EMBO J.* **16**, 5966–5976 (1997).
221. Uhlmann, F., Wernic, D., Poupart, M. a, Koonin, E. V & Nasmyth, K. Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* **103**, 375–386 (2000).
222. Zachariae, W., Shin, T. H., Galova, M., Obermaier, B. & Nasmyth, K. Identification of subunits of the anaphase-promoting complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. **274**, 1201–4 (1996).
223. Seufert, W. & Jentsch, S. Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *EMBO J.* **9**, 543–550 (1990).
224. Visintin, R., Prinz, S. & Amon, A. CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science*. **278**, 460–463 (1997).
225. Chu, S. *et al.* The Transcriptional Program of Sporulation in Budding Yeast. *Science*. **282**, 699 (1998).
226. Li, R. & Murray, A. W. Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* **66**, 519–531 (1991).
227. Glotzer, M., Murray, A. W. & Kirschner, M. W. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132–138 (1991).
228. Pfleger, C. M. & Kirschner, M. W. The KEN box: An APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev.* **14**, 655–665 (2000).
229. Doncic, A. *et al.* Compartmentalization of a bistable switch enables memory to cross a feedback-driven transition. *Cell* **160**, 1182–1195 (2015).
230. Gallego, C., Garí, E., Colomina, N., Herrero, E. & Aldea, M. The Cln3 cyclin is down-regulated by translational repression and degradation during the G1 arrest caused by nitrogen deprivation in budding yeast. *EMBO J.* **16**, 7196–206 (1997).
231. Yahya, G. Molecular retention mechanisms of the G1 cyclin/Cdk complex in budding yeast. (Barcelona, 2015).
232. Lustig, a J. & Petes, T. D. Identification of yeast mutants with altered telomere structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 1398–1402 (1986).
233. Nakada, D., Shimomura, T., Matsumoto, K. & Sugimoto, K. The ATM-related Tel1 protein of *Saccharomyces cerevisiae* controls a checkpoint response following phleomycin treatment. *Nucleic Acids Research* **31**, 1715–1724 (2003).
234. Kato, R. & Ogawa, H. An essential gene, ESR1, is required for mitotic growth, DNA repair and meiotic recombination *saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **22**, 3104–3112 (1994).
235. Weinert, T. A., Kiser, G. L. & Hartwell, L. H. Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. *Genes Dev.* **8**, 652–665 (1994).
236. Sanchez, Y. *et al.* Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science*. **286**, 1166–71 (1999).
237. Zhou, Z. & Elledge, S. J. DUN1 encodes a protein kinase that controls the DNA damage response in yeast. *Cell* **75**, 1119–27 (1993).
238. Zhao, X. & Rothstein, R. The Dun1 checkpoint kinase phosphorylates and regulates the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 3746–51 (2002).
239. Crasta, K., Lim, H. H., Giddings, T. H., Winey, M. & Surana, U. Inactivation of Cdh1 by synergistic action of Cdk1 and polo kinase is necessary for proper assembly of the mitotic spindle. *Nat. Cell Biol.* **10**, 665–675 (2008).
240. Luo, X. *et al.* The Mad2 spindle checkpoint protein has two distinct natively folded states. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 338–345 (2004).
241. Hwang, L. H. *et al.* Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint. *Science*. **279**, 1041–4 (1998).
242. Nasmyth, K. How do so few control so many? *Cell* **120**, 739–746 (2005).
243. Hartwell, L. H., Culotti, J., Pringle, J. R. & Reid, B. J. Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast. *Science*. **183**, 46–51 (1974).
244. Johnston, G. C., Pringle, J. R. & Hartwell, L. H. Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp. Cell Res.* **105**, 79–98 (1977).
245. Ferrezuelo, F. *et al.* The critical size is set at a single-cell level by growth rate to attain homeostasis and adaptation. *Nat. Commun.* **3**, 1012 (2012).
246. Miller, M. E. & Cross, F. R. Mechanisms controlling subcellular localization of the G(1) cyclins Cln2p and Cln3p in budding yeast. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 6292–311 (2001).

247. Nash, R. S., Volpe, T. & Futcher, B. Isolation and characterization of WHI3, a size-control gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **157**, 1469–1480 (2001).
248. Garí, E. *et al.* Whi3 binds the mRNA of the G1 cyclin CLN3 to modulate cell fate in budding yeast. *Genes Dev.* **15**, 2803–2808 (2001).
249. Wang, H., Garí, E., Vergés, E., Gallego, C. & Aldea, M. Recruitment of Cdc28 by Whi3 restricts nuclear accumulation of the G1 cyclin-Cdk complex to late G1. *EMBO J.* **23**, 180–90 (2004).
250. Caudron, F. & Barral, Y. A Super-Assembly of Whi3 Encodes Memory of Deceptive Encounters by Single Cells during Yeast Courtship. *Cell* **155**, 1244–57 (2013).
251. Vergés, E., Colomina, N., Garí, E., Gallego, C. & Aldea, M. Cyclin Cln3 is retained at the ER and released by the J chaperone Ydj1 in late G1 to trigger cell cycle entry. *Mol. Cell* **26**, 649–62 (2007).
252. Honey, S., Schneider, B. L., Schieltz, D. M., Yates, J. R. & Futcher, B. A novel multiple affinity purification tag and its use in identification of proteins associated with a cyclin-CDK complex. *Nucleic Acids Res.* **29**, E24 (2001).
253. Yahya, G., Parisi, E., Flores, A., Gallego, C. & Aldea, M. A Whi7-anchored loop controls the G1 Cdk-cyclin complex at start. *Mol. Cell* **53**, 115–26 (2014).
254. Edgington, N. P. & Futcher, B. Relationship between the function and the location of G1 cyclins in *S. cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **114**, 4599–4611 (2001).
255. Skotheim, J. M., Di Talia, S., Siggia, E. D. & Cross, F. R. Positive feedback of G1 cyclins ensures coherent cell cycle entry. *Nature* **454**, 291–6 (2008).
256. Pecani, K. & Cross, F. R. Degradation of the Mitotic Cyclin Clb3 Is not Required for Mitotic Exit but Is Necessary for G 1 Cyclin Control of the Succeeding Cell Cycle. *Genetics* **204**, 1479–1494 (2016).
257. Liu, X. *et al.* Reliable cell cycle commitment in budding yeast is ensured by signal integration. *Elife* (2015).
258. Tyers, M., Tokiwa, G. & Futcher, B. Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. *EMBO J.* **12**, 1955–68 (1993).
259. Ghaemmaghami, S. *et al.* Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**, 737–741 (2003).
260. Kulak, N. A., Pichler, G., Paron, I., Nagaraj, N. & Mann, M. Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nat. Methods* **11**, 319–24 (2014).
261. Moreno, D. F. *et al.* Competition for chaperones as a mechanism to adjust cell size to growth rate.
262. Fehrmann, S. *et al.* Aging yeast cells undergo a sharp entry into senescence unrelated to the loss of mitochondrial membrane potential. *Cell Rep.* **5**, 1589–1599 (2013).
263. Yang, J. *et al.* Cell size and growth rate are major determinants of replicative lifespan. *Cell Cycle* **10**, 144–55 (2011).
264. Oguz, C. *et al.* A stochastic model correctly predicts changes in budding yeast cell cycle dynamics upon periodic expression of CLN2. *PLoS One* **9**, (2014).
265. Rose, M., Winston, F. & Hieter, P. *Methods in Yeast Genetics : A Laboratory Course Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990).
266. Saiki, R. K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. **239**, 487–491 (1988).
267. Janke, C. *et al.* A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**, 947–62 (2004).
268. Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R. A. & Schiestl, R. H. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* **20**, 1425 (1992).
269. Orr-Weaver, T. L. & Szostak, J. W. Yeast recombination: the association between double-strand gap repair and crossing-over. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 4417–4421 (1983).
270. Bessa, D., Pereira, F. & Moreira, R. Improved gap repair cloning in yeast : treatment of the gapped vector with Taq DNA polymerase avoids vector. *Yeast* **29**, 419–423 (2012).
271. Tingting, Z. *et al.* An improved method for whole protein extraction from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **28**, 795–798 (2011).
272. Bagriantsev, S. N., Kushnirov, V. V & Liebman, S. W. Analysis of amyloid aggregates using agarose gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* **412**, 33–48 (2006).
273. Yiu, G. *et al.* Pathways change in expression during replicative aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **63**, 21–34 (2008).
274. Lindstrom, D. L. & Gottschling, D. E. The mother enrichment program: a genetic system for facile replicative life span analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **183**, 413–22, 1SI–13SI (2009).
275. Sauer, B. Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2087–2096 (1987).

276. Cheng, T. H., Chang, C. R., Joy, P., Yablok, S. & Gartenberg, M. R. Controlling gene expression in yeast by inducible site-specific recombination. *Nucleic Acids Res.* **28**, E108 (2000).
277. Doolin, M. T., Johnson, A. L., Johnston, L. H. & Butler, G. Overlapping and distinct roles of the duplicated yeast transcription factors Ace2p and Swi5p. *Mol. Microbiol.* **40**, 422–432 (2001).
278. Colman-Lerner, A., Chin, T. E. & Brent, R. Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates. *Cell* **107**, 739–750 (2001).
279. Dieckhoff, P., Boite, M., Sancak, Y., Braus, G. H. & Imniger, S. Smt3/SUMO and Ubc9 are required for efficient APC/C-mediated proteolysis in budding yeast. *Mol. Microbiol.* **51**, 1375–1387 (2004).
280. Schneider, C. a, Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).
281. Chen, C. & Contreras, R. The bud scar-based screening system for hunting human genes extending life span. in *Annals of the New York Academy of Sciences* **1019**, 355–359 (2004).
282. Heim, R., Cubitt, a B. & Tsien, R. Y. Improved green fluorescence. *Nature* **373**, 663–664 (1995).
283. Shaner, N. C. *et al.* Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1567–72 (2004).
284. Cookson, N. A., Cookson, S. W., Tsimring, L. S. & Hasty, J. Cell cycle-dependent variations in protein concentration. *Nucleic Acids Res.* **38**, 2676–2681 (2009).
285. Jorgensen, P. & Nicholas P. Edgington, Brandt L. Schneider, Ivan Rupes, Mike Tyers, B. F. The Size of the Nucleus Increases as Yeast Cells Grow. *Mol. Biol. Cell* **18**, 986–994 (2007).
286. Roberts, C. J., Raymond, C. K., Yamashiro, C. T. & Stevens, T. H. Methods for studying the yeast vacuole. *Methods Enzymol.* **194**, 644–661 (1991).
287. Cole, N. B. *et al.* Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of living cells. *Science*. **273**, 797–801 (1996).
288. Ishikawa-Ankerhold, H. C., Ankerhold, R. & Drummen, G. P. C. Advanced fluorescence microscopy techniques-FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules* **17**, 4047–4132 (2012).
289. Bolognesi, A., Sliwa-Gonzalez, A., Prasad, R. & Barral, Y. in *Methods in Molecular Biology* **1369**, 25–44 (2016).
290. Poo, M. & Cone, R. A. Lateral diffusion of the rhodopsin in the photoreceptor membrane. *Nature* **247**, 81–82 (1974).
291. Xiong, Y., Connolly, T., Futcher, B. & Beach, D. Human D-type cyclin. *Cell* **65**, 691–699 (1991).
292. Magde, D., Elson, E. & Webb, W. W. Thermodynamic fluctuations in a reacting system measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.* **29**, 705–708 (1972).
293. Berland, K. M., So, P. T. & Gratton, E. Two-photon fluorescence correlation spectroscopy: method and application to the intracellular environment. *Biophys. J.* **68**, 694–701 (1995).
294. Widengren, J., Terry, B. & Rigler, R. Protonation kinetics of GFP and FITC investigated by FCS — aspects of the use of fluorescent indicators for measuring pH. *Chem. Phys.* **249**, 259–271 (1999).
295. Tian, Y., Martinez, M. M. & Pappas, D. Fluorescence correlation spectroscopy: A review of biochemical and microfluidic applications. *Appl. Spectrosc.* **65**, 115–124 (2011).
296. Kappel, C. Fluorescence Correlation Spectroscopy The Femtoliter Test Tube – System Calibration and In Vitro Applications. *Leica Microsystems* (2012).
Available at: <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/fluorescence-correlation-spectroscopy/>.
297. Unruh, J. Stowers ImageJ Plugins. Available at: http://research.stowers.org/imageplugins/zipped_plugins.html.
298. Digman, M. A. *et al.* Fluctuation correlation spectroscopy with a laser-scanning microscope: exploiting the hidden time structure. *Biophys. J.* **88**, L33-6 (2005).
299. Digman, M. a & Gratton, E. Analysis of diffusion and binding in cells using the RICS approach. *Microsc. Res. Tech.* **72**, 323–332 (2009).
300. Digman, M. A., Stakic, M. & Gratton, E. *Raster image correlation spectroscopy and number and brightness analysis. Methods in Enzymology* **518**, (Elsevier Inc., 2013).
301. Petersen, N. O., Höddelius, P. L., Wiseman, P. W., Seger, O. & Magnusson, K. E. Quantitation of membrane receptor distributions by image correlation spectroscopy: concept and application. *Biophys. J.* **65**, 1135–46 (1993).
302. Gratton, E. The Number & Molecular Brightness (N & B) Method. *Biophys. J.* **94**, 2320–2332 (2008).
303. Gratton, E. Raster Image Correlation Spectroscopy (RICS). (2011).
Talk aviable at: http://users.df.uba.ar/mad/Workshop/Gratton_RICS.pdf
304. Gratton, E. RICS and FLIM. (2006).
Talk aviable at: <https://www.fluorescence-foundation.org/lectures/genova2006/lecture8.ppt>
305. Brown, A. M. A step-by-step guide to non-linear regression analysis of experimental data using a Microsoft Excel spreadsheet. *Comput. Methods Programs Biomed.* **65**, 191–200 (2001).

306. Hu, W. *et al.* Evaluation of parameter uncertainties in nonlinear regression using Microsoft Excel Spreadsheet. *Environ. Syst. Res.* **4**, 4 (2015).
307. Nash, R., Tokiwa, G., Anand, S., Erickson, K. & Futcher, a B. The WHI1+ gene of *Saccharomyces cerevisiae* tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog. *EMBO J.* **7**, 4335–46 (1988).
308. Tyers, M. & Futcher, B. Far1 and Fus3 link the mating pheromone signal transduction pathway to three G1-phase Cdc28 kinase complexes. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5659–69 (1993).
309. Lowe, A. M., Ozer, B. H., Wiepz, G. J., Bertics, P. J. & Abbott, N. L. Engineering of PDMS surfaces for use in microsystems for capture and isolation of complex and biomedically important proteins: epidermal growth factor receptor as a model system. *Lab Chip* **8**, 1357–64 (2008).
310. Desai, S. P., Freeman, D. M. & Voldman, J. Plastic masters-rigid templates for soft lithography. *Lab Chip* **9**, 1631–1637 (2009).
311. Charvin, G., Cross, F. R. & Siggia, E. D. A microfluidic device for temporally controlled gene expression and long-term fluorescent imaging in unperturbed dividing yeast cells. *PLoS One* **3**, (2008).
312. Warner Instruments. Yeast Cell Chambers (YC-1/YC-2). Available at: https://www.warneronline.com/product_info.cfm?id=1435.
313. Chen, K. L., Crane, M. M. & Kaeberlein, M. Microfluidic technologies for yeast replicative lifespan studies. *Mech. Ageing Dev.* (2016). doi:10.1016/j.mad.2016.03.009
314. Crane, M. M., Clark, I. B. N., Bakker, E., Smith, S. & Swain, P. S. A microfluidic system for studying ageing and dynamic single-cell responses in budding yeast. *PLoS One* **9**, (2014).
315. Jo, M. C., Liu, W., Gu, L., Dang, W. & Qin, L. High-throughput analysis of yeast replicative aging using a microfluidic system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 9364–9369 (2015).
316. Liu, P., Young, T. Z. & Acar, M. Yeast Replicator: A High-Throughput Multiplexed Microfluidics Platform for Automated Measurements of Single-Cell Aging. *Cell Rep.* **13**, (2015).
317. Huberts, D. H. E. W. *et al.* Construction and use of a microfluidic dissection platform for long-term imaging of cellular processes in budding yeast. *Nat. Protoc.* **8**, 1019–27 (2013).
318. Zhang, Y. *et al.* Single cell analysis of yeast replicative aging using a new generation of microfluidic device. *PLoS One* **7**, e48275 (2012).
319. Voth, W. P., Olsen, A. E., Sbia, M., Freedman, K. H. & Stillman, D. J. ACE2, CBK1, and BUD4 in budding and cell separation. *Eukaryot. Cell* **4**, 1018–1028 (2005).
320. Steel, G. J., Harley, C., Boyd, a & Morgan, a. A screen for dominant negative mutants of SEC18 reveals a role for the AAA protein consensus sequence in ATP hydrolysis. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1345–56 (2000).
321. Lajoie, P., Moir, R. D., Willis, I. M. & Snapp, E. L. Kar2p availability defines distinct forms of endoplasmic reticulum stress in living cells. *Mol. Biol. Cell* **23**, 955–964 (2012).
322. Einstein, A. Zur Theorie der Brownschen Bewegung. *Ann. Phys.* **324**, 371–381 (1906).
323. Trotter, E. W. *et al.* Misfolded proteins are competent to mediate a subset of the responses to heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**, 44817–44825 (2002).
324. Sandra Malmgren Hill, Xinxin Hao, Beidong Liu, T. N. Life-span extension by a metacaspase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. **344**, 1389–92 (2014).
325. Shorter, J. The mammalian disaggregase machinery: Hsp110 synergizes with Hsp70 and Hsp40 to catalyze protein disaggregation and reactivation in a cell-free system. *PLoS One* **6**, e26319 (2011).
326. Fehrmann, S. *et al.* Natural sequence variants of yeast environmental sensors confer cell-to-cell expression variability. *Mol. Syst. Biol.* **9**, 695 (2013).
327. Stewart-Ornstein, J., Weissman, J. S. & El-Samad, H. Cellular Noise Regulons Underlie Fluctuations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* **45**, 483–493 (2012).
328. Aldea, M. Control of Cell Cycle and Cell Growth by Molecular Chaperones. *Cell Cycle* 2599–2603 (2007).
329. Thulasiraman, V. & Matts, R. L. Effect of geldanamycin on the kinetics of chaperone-mediated renaturation of firefly luciferase in rabbit reticulocyte lysate. *Biochemistry* **35**, 13443–13450 (1996).
330. Pringle, J. R. *et al.* Chapter 19 Fluorescence Microscopy Methods for Yeast *Fluorescence Microscopy Methods for Yeast. Methods in cell biology* **31**, (1989).
331. Vowinckel, J., Hartl, J., Butler, R. & Ralser, M. MitoLoc: A method for the simultaneous quantification mitochondrial network morphology and membrane potential in single cells. *Mitochondrion* **24**, 77–86 (2015).
332. Janssens, G. E. & Veenhoff, L. M. The natural variation in lifespans of single yeast cells is related to variation in cell size, ribosomal protein, and division time. *PLoS One* **11**, 1–18 (2016).
333. Casas, C. *et al.* The AFT1 transcriptional factor is differentially required for expression of high-affinity iron uptake genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 621–637 (1997).

- 334. Thomas, B. J. & Rothstein, R. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* **56**, 619–630 (1989).
- 335. Brachmann, C. B. *et al.* 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 (1998).
- 336. Huh, W.-K. *et al.* Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**, 686–691 (2003).
- 337. Gietz, R. D. & Sugino, A. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**, 527–534 (1988).
- 338. Wallis, O. C. & Whittaker, P. A. Induction of Petite Mutation in Yeast by Starvation in Glycerol. *J. Gen. Microbiol.* **84**, 11–18 (1974).
- 339. Ferguson, L. R. & von Borstel, R. C. Induction of the cytoplasmic 'petite' mutation by chemical and physical agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **265**, 103–148 (1992).
- 340. Greene, M. K., Maskos, K. & Landry, S. J. Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 6108–13 (1998).

VIII. Annex

1. Llistat d'abreviacions

ACF	AutoCorrelation Function	LB	Lysogeny Broth
AiPD	Age-induced Protein Deposits	MBF	Mlu1-box Binding Factor
ALS-ELA	Amyotrophic Lateral Sclerosis - Esclerosi Lateral Amiotròfica	MEP	Mother Enrichment Program
AP	Ammonium Persulfate	mRNA	messenger RNA
APC	Anaphase Promoting Complex / AlloPhycoCyanin	mtDNA	mitochondrial DNA
ARS	Autonomously Replicating Sequence	MTOC	MicroTubule Organizing Center
ATP	Adenosine Tri-Phosphate	N&B	Number and Brightness
AZC	Azetidine-2-carboxylic acid	NA	Numerical Aperture
A β	Amyloid beta	NLS	Nuclear Localization Signal
BSA	Bovine Serum Albumin	OD	Optical density
CAK	CDK Activating Kinase	ORF	Open Reading Frame
cAMP	cyclic Adenosine MonoPhosphate	PAPA	Prion Aggregation Prediction Algorithm
CDK	Cyclin-Dependent Kinase	PBS(T)	Phosphate-Buffered Saline (Tween-20)
CEN	Centròmer	PCR	Polymerase Chain Reaction
CLiC	Cell Loaded into a Cavity	PDMS	PolyDiMethyl Siloxane
CLS	Chronological LifeSpan	PEG	PolyEthyenGlicol
cPFD	control Prion Forming Domain	PI	Propidium Iodide
DNA	DeoxyriboNucleic Acid	PrP	Prion Protein
dNTP	deoxyNucleotide Tri-Phosphate	PVDF	PolyVinylidene DiFluoride
DSB	Double Strand Brake	rDNA	ribosomal DNA
ECL	Enhanced ChemiLuminescence	RICS	Raster-scan Image Correlation Spectroscopy
EDTA	EthyleneDiamineTetraAcetic acid	RLS	Replicative LifeSpan
ERC	Extrachromosomal rDNA Circles	RNA	RiboNucleic Acid
FACS	Fluorescence Assisted Cell Sorting	RNR	RiboNucleotide Reductase
FCS	Fluorescence Correlation Spectroscopy	ROS	Reactive Oxygen Species
FFT	Fast Fourier Transform	RRM	RNA Recognition Motive
FITC	Fluorescein IsoTioCyanide	rRNA	ribosomal RNA
FLIP	Fluorescence Loss In Photobleaching	SAC	Spindle Assembly Checkpoint
FS	Forward Scatter	SBF	Swi4/6-box Binding Factor
GALp	promotor induible controlat per galactosa	SC	Synthetic Complete media
GFP	Green Fluorescence Protein	SCA3	SpinoCerebellar Ataxia 3
GFP ^{FS}	Green Fluorescence Protein + Faresylation Signal	SCF	Skp, Cullin, F-box
GMC	Ganglion Mother Cell	SDD-AGE	SemiDenaturing Detergent - Agarose Gel Electrophoresis
GuHCl	Guanidine HidroChloride	SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
HEK293	Human Embryonic Kidney 293	SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
HRP	HorseRadish Peroxidase	SEP	Senescence Entry Point
ICS	Image Correlation Spectroscopy	sPFD	synthetic Prion Forming Domain
IDD	Intrinsically Disordered Domain	TAE	Tris-HCl, Acetic acid, EDTA
IDP	Intrinsically Disordered Protein	TE	Tris-HCl, EDTA
INQ	IntraNuclear Quality control compartment	TEMED	TEtraMethylEthyleneDiamine
IPOD	Insoluble PrOtein Deposit	TNEST	Tris-HCl, NaCl, EDTA, SDS, TritonX-100
JUNQ	JUxtaNuclear Quality control compartment	UV	UltraViolet
kDa	kiloDalton	WGA	Wheat Germ Agglutinin
LARP	Long-lived Asymmetrically Retained Protein	YP	Yeast extract Peptone media

2. Índex de figures

Figura 1	3	Figura 38	61
Figura 2	4	Figura 39	62
Figura 3	5	Figura 40	63
Figura 4	6	Figura 41	65
Figura 5	8	Figura 42	66
Figura 6	9	Figura 43	67
Figura 7	9	Figura 44	71
Figura 8	11	Figura 45	73
Figura 9	14	Figura 46	77
Figura 10	16	Figura 47	78
Figura 11	17	Figura 48	79
Figura 12	18	Figura 49	80
Figura 13	19	Figura 50	81
Figura 14	20	Figura 51	82
Figura 15	20	Figura 52	83
Figura 16	21	Figura 53	84
Figura 17	22	Figura 54	85
Figura 18	23	Figura 55	85
Figura 19	24	Figura 56	86
Figura 20	25	Figura 57	87
Figura 21	27	Figura 58	88
Figura 22	29	Figura 59	89
Figura 23	29	Figura 60	90
Figura 24	30	Figura 61	92
Figura 25	31	Figura 62	93
Figura 26	32	Figura 63	94
Figura 27	33	Figura 64	95
Figura 28	34		
Figura 29	35		
Figura 30	36		
Figura 31	48		
Figura 32	52		
Figura 33	55		
Figura 34	56		
Figura 35	57		
Figura 36	59		
Figura 37	60		

3. Llistat de soques de llevat utilitzades en aquest treball

Nom sistemàtic	Nom comú	Genotip	Procedència
L-200	CML128	MATa, <i>leu2-3,112, ura3-52, trp1, his4, can1.r</i>	Espora provinent de la soca 1788 (C. Casas) ³³³
#545	W303-1A	MATa, <i>ade2-1, trp1-1, leu2-3,111, his3-11,75, ura3 can1-100</i>	P. Plevani ³³⁴
#654	BY4741	MATa <i>his3-Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i>	Euroscarf ³³⁵
L-344	BF305 <i>Δcln3</i>	MATa <i>leu2 his3 trp1 ura3 ade1 arg5,6 met14 cln3::URA3-GALp>CLN3 cln1::HIS3 cln2::TRP1</i>	B. Futcher ²⁹¹
771-Y	UCC5179 (MEP haploide)	MATa <i>ade2::hisG his3 leu2 lys2 ura3Δ0 trp1Δ63 hoΔ::SCW11pr-Cre-EBD78-NATMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-intron-loxP-HPHMX</i>	Fred Hutchinson Cancer Research Center (D. Gottschling) ²⁷⁴
1181-Y	UCC5185 (MEP diploide)	MATa/α <i>ade2::hisG / ade2::hisG his3 / his3 leu2 / leu2 LYS2 / lys2 ura3Δ0 / ura3Δ0 trp1Δ63 / trp1Δ63 MET15/met15Δ::ADE2 hoΔ::SCW11pr-cre-EBD78-NATMX/ hoΔ::SCW11pr-cre-EBD78-NATMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 / loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX/loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX.</i>	Fred Hutchinson Cancer Research Center (D. Gottschling) ²⁷⁴
1253-Y	MEP hap 2xCRE	MATa <i>ade2::hisG his3 leu2 lys2 ura3Δ0 trp1Δ63::SCW11pr-Cre-EBD78-KANMX4 hoD::SCW11pr-Cre-EBD78-NATMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-intron-loxP-HPHMX</i>	Aquest estudi (PJ Vidal)
248-Y	BY TEFp>GFP	Com BY4741 + <i>ura3Δ0::TEFp>yGFP-NATNT</i>	Aquest estudi (G. Yahya)
261-Y	BY Ydj1-GFP ^{FS}	Com BY4741 + <i>YDJ1::yGFP-FS-HIS3MX</i>	M. Aldea ¹⁶⁷
676-Y	BY Ssa1-GFP	Com BY4741 + <i>SSA1::yGFP-HIS3MX</i>	Yeast GFP Collection (Invitrogen) ³³⁶
#1747	BY Whi5-GFP	Com BY4741 + <i>WHI5::yGFP-HIS3MX</i>	Yeast GFP Collection (Invitrogen) ³³⁶
1391-Y	CML128 Ssa4-GFP	Com CML128 + <i>SSA4::EGFP-kiTRP1</i>	Aquest estudi (G. Yahya)
1078-Y	BY Ydj1-GFP ^{FS} & Ssa1-mCherry	Com BY4741 + <i>YDJ1::yGFP-FS-HIS3MX & SSA1::mCherry-KANMX</i>	Aquest estudi (D. Moreno)
1077-Y	CML128 Whi5-GFP & Hsp104-mCherry	Com CML128 + <i>WHI5::sGFP-KANMX & HSP104::mCherry-HPHMX</i>	Aquest estudi (D. Moreno)
942-Y	MEP hap Whi5-GFP	Com UCC5179 + <i>WHI5-yGFP::HIS3MX</i>	Aquest estudi (D. Moreno)
1013-Y	MEP hap + Chaperone Minichromosome	Com UCC5179 + YAC contenint <i>HSP104, SSA1, YDJ1, HSC82, CDC37, CDC48, UFD1 NPL4 i URA3</i>	Aquest estudi (D. Moreno)
1185-Y	MEP dip Ydj1-GFP ^{FS}	Com UCC5185 + <i>YDJ1::yGFP-FS-HIS3MX / YDJ1</i>	Aquest estudi (D. Moreno)
1186-Y	MEP dip Ssa1-GFP	Com UCC5185 + <i>SSA1::yGFP-HIS3MX / SSA1</i>	Aquest estudi (D. Moreno)
1578-Y	MEP hap <i>Δydj1</i>	Com UCC5179 + <i>Δydj1::KANMX</i>	Aquest estudi (D. Moreno)
1569-Y	MEP hap 2xCRE Clb2-GFP	Com MEP hap 2xCRE + <i>CLB2::yGFP-HIS3MX</i>	Aquest estudi (D. Moreno)
1576-Y	MEP hap 2xCRE Clb2-GFP & GALp>CLN3	Com MEP hap 2xCRE + <i>CLB2::yGFP-HIS3MX & trp1Δ63::GALp>CLN3-HA</i>	Aquest estudi (D. Moreno)

4. Llistat de plasmidis utilitzats en aquest treball

Nom sistemàtic	Nom comú	Descripció	Procedència
B-1	YCpLac33	Vector llançadora entre llevat i bacteri; conté el <i>polylinker</i> de pUC19, i el gen de resistència a ampicil·lina i el gen URA3 com a marcadors de selecció per a <i>E. coli</i> i <i>S. cerevisiae</i> (respectivament)	Gietz & Sugino ³³⁷
B-3	YCpLac22	Vector llançadora entre llevat i bacteri; conté el <i>polylinker</i> de pUC19, i el gen de resistència a ampicil·lina i el gen TRP1 com a marcadors de selecció per a <i>E. coli</i> i <i>S. cerevisiae</i> (respectivament)	Gietz & Sugino ³³⁷
B-4	YCpLac111	Vector llançadora entre llevat i bacteri; conté el <i>polylinker</i> de pUC19, i el gen de resistència a ampicil·lina i el gen LEU2 com a marcadors de selecció per a <i>E. coli</i> i <i>S. cerevisiae</i> (respectivament)	Gietz & Sugino ³³⁷
B-80	YCpGAL	Derivat de YCpLac22 amb el promotor del gen GAL1 clonat al <i>polylinker</i>	A. Boyd ³²⁰
610-P	YCpGAL-GFP	Derivat de YCpGAL amb la ORF de GFP clonada sota el control del promotor GAL1	Aquest estudi (D. Moreno)
605-P	YCpGAL-SUP35 ^N -GFP	Derivat de YCpGAL amb la ORF de SUP35 ^N -GFP clonada sota el control del promotor GAL1	Aquest estudi (D. Moreno)
596-P	YCpGAL-SUP35 ^N m ₁ -GFP	Derivat de YCpGAL amb la ORF de SUP35 ^N m ₁ -GFP clonada sota el control del promotor GAL1	Aquest estudi (D. Moreno)
598-P	YCpGAL-SUP35 ^N m ₂ -GFP	Derivat de YCpGAL amb la ORF de SUP35 ^N m ₂ -GFP clonada sota el control del promotor GAL1	Aquest estudi (D. Moreno)
600-P	YCpGAL-SUP35 ^N m ₃ -GFP	Derivat de YCpGAL amb la ORF de SUP35 ^N m ₃ -GFP clonada sota el control del promotor GAL1	Aquest estudi (D. Moreno)
602-P	YCpGAL-sPFD1-GFP	Derivat de YCpGAL amb la ORF de sPFD1-GFP clonada sota el control del promotor GAL1	Aquest estudi (D. Moreno)
604-P	YCpGAL-cPFD1-GFP	Derivat de YCpGAL amb la ORF de cPFD1-GFP clonada sota el control del promotor GAL1	Aquest estudi (D. Moreno)
469-P	YCpGAL111-SSA1/YDJ1	Derivat del YCpLac111 amb les ORFs de SSA1 i YDJ1 sota el control del promotor GAL1 (aprofitant que és bicistrònic)	G. Yahya ²⁵³
1182-P	YCpGAL33-SSA1/YDJ1	Derivat del YCpLac33 amb les ORFs de SSA1 i YDJ1 sota el control del promotor GAL1 (aprofitant que és bicistrònic)	Aquest estudi (D. Moreno)
#146	YCpGAL33-CLN3-3HA (pCYC87)	Derivat del YCpLac33 amb la ORF de CLN3-3HA sota el control del promotor GAL1	Sònia Rius ²⁴⁹
633-P	YCpGAL33-sPFD1-mCherry	Derivat del YCpLac33 amb la ORF de sPFD1-GFP clonada sota el control del promotor GAL1	Aquest estudi (D. Moreno)
634-P	YCpGAL33-cPFD1-mCherry	Derivat del YCpLac33 amb la ORF de cPFD1-GFP clonada sota el control del promotor GAL1	Aquest estudi (D. Moreno)
853-P	YCp22-TEFp>mCherry	Derivat de YCpLac22 amb la ORF de mCherry clonada sota el control del promotor TEF	Aquest estudi (D. Moreno)
1228-P	YCp33-TEFp>GFP	Derivat de YCpLac33 amb la ORF de GFP clonada sota el control del promotor TEF	Aquest estudi (JM Martínez)
1230-P	YCp111-TEFp>GFP	Derivat de YCpLac111 amb la ORF de GFP clonada sota el control del promotor TEF	Aquest estudi (JM Martínez)

5. Llistat de dominis pròtics utilitzats en aquest estudi

Nom	Seqüència DNA	Seqüència Aminoàcids	Procedència
Sup35 ^N	ATGTCGGATTCAAACCAAGGCAACAATCAGCAAACTACCAGCAATA CAGCCAGAACGGTAACCAACAACAGGTAAACAACAGATACCAAGGT TATCAAGCTTACAATGCTCAAGCCCAACCTGCAGGTGGGTACTACCA AAATTACCAAGGTATTCTGGGTACCAACAAGGTGGCTATCAACAGT ACAATCCCGACGCCGGTTACCAAGCAACAGTATAATCCTCAAGGAGG CTATCAACAGTACAATCCTCAAGGCGGTATCAGCAGCAATTCAATC CACAAGGTGGCCGTGGAATTAACAAAACCTCAACTACAATAACAAT TTGCAAGGATATCAAGCTGGTTTCCAACCAAGTCTCAAGGT	MSDSNQGNNOQNYQQYSQNGNQ QGNRYQGYQAYNAQAPAGGYQ NYQYSGYQGGYQYNPADAGYQ QYNPQGGYQYNPQGGYQQQFN PQGRGN YKFNFNNNLQGYQAGF QPSQG	<i>S. cerevisiae</i> (DNA genòmic)
Sup35 ^{Nm1}	ATGTCGGATTCAAACCAAGGCAACAATCAGCAAACTACCAGCAATA CAGCCAGAACGATACCAACAACAGGTAAACAACAGATACCAAGGT ATCAAGCTTACAATGCTCAAGCCCAACCTGCAGGTGGGTACTACCA AATTACCAAGGTATTCTGGGTACCAACAAGGTGGCTATCAACAGTA CAATCCCGACGCCGGTTACCAAGCAACAGTATAATCCTCAAGGAGG TATCAACAGTACAATCCTCAAGGCATATCAGCAGCAATTCAATCC ACAAGGTGGCCGTGGAATTAACAAAACCTCAACTACAATAACAAT GCAAGATATCAAGCTGGTTTCCAACCAAGTCTCAAGGT	MSDSNQGNNOQNYQQYSQNDNQ QGNRYQGYQAYNAQAPAGGYQ NYQYSGYQGGYQYNPADAGYQ QYNPQGGYQYNPQGGYQQQFN GGRGN YKFNFNNNLQKYQAGFP QSQG	Aquest treball (GeneArt)
Sup35 ^{Nm2}	ATGTCGGATTCAAACCAAGGCAACAATCAGCAAACTACCAGCAATA CAGCCAGAACGGTAACCAACAACAGGTAAACAACAGATACCAAGGT TATCAAGCTTACAATGCTCAAGCCCAACCTGCAGGTGGGTACTACCA AAAATTACCAAGGTATTCTGGGTACCAACAAGGTGGCTATCAACAG TACAATCCCGACGCCGGTTACCAAGCAACAGAAATCCTCAAGGAG GCTATCAACAGTACAATCCTCAAGGCGGTATCAGCAGCAATTCAAT CCACAAGGTGGCCGTGGAATTAACAAAACCTCAACGCAATAACAA TTGCAAGGATATCAAGCTGGTTTCCAACCAAGTCTCAAGGT	MSDSNQGNNOQNKQQYSQNGNQ QGNRYQGYQAYNAQAPAGGYQ NYQYSGYQGGYQYNPADAGYQ QYNPQGGYQYNPQGGYQQQFN PQGRGN YKFNFNNNLQGYQAGF QPSQG	Aquest treball (GeneArt)
Sup35 ^{Nm3}	ATGTCGGATTCAAACCAAGGCAACAATCAGCAAACTACCAGCAATA CAGCCAGAACGATACCAACAACAGGTAAACAACAGATACCAAGGT ATCAAGCTTACAATGCTCAAGCCCAACCTGCAGGTGGGTACTACCA AAATTACCAAGGTATTCTGGGTACCAACAAGGTGGCTATCAACAGT ACAATCCCGACGCCGGTTACCAAGCAACAGAAATCCTCAAGGAGG CTATCAACAGTACAATCCTCAAGGCATATCAGCAGCAATTCAATC CACAAGGTGGCCGTGGAATTAACAAAACCTCAACGCAATAACAA TTGCAAGATATCAAGCTGGTTTCCAACCAAGTCTCAAGGT	MSDSNQGNNOQNKQQYSQNDNQ QGNRYQGYQAYNAQAPAGGYQ NYQYSGYQGGYQYNPADAGYQ QYNPQGGYQYNPQGGYQQQFN QGRGN YKFNFNNNLQKYQAGFP QPSQG	Aquest treball (GeneArt)
sPFD1	ATGTCCTCAACAATATAATCAAAATAATTTGTATCAACAAGGTCAACA CAAAATAATGGTGAACAATCTTTTGGTATCAACAATAATAATTTG CAACAACAAGGTAAATATCAACAATATAATTAATGTAATAATA ATCAAACTCTCAAAATTTCTCAAGGTCAACAAATGGTGGTAATCAAA ATCAAAATAATAGACAACAATAATCAAAATACTGCTCAAAAT CTACTTCTACTTCTACTAATGGTTATGGTGCTTCTGGTCATGGTAGAT CTACTTCTTATGGTGTTCAAGATCATTCTGGTGCTAGAATGAAT CTGCT	MSQQYNQNNLYQQGQQQNNNGESF WYQQNNNLQQQGNYYQYNYTNGNN NQTSQISQGGQNGNQNNNRQQN QNQNTAPNSTSTSTNGYGASGHGRS TTSYGVQDHSGARIESA	Toombs <i>et al</i> ¹⁶⁸ (GeneArt)
cPFD1	ATGTCCTCAAGCTGCTTCTACTAAACAATCTACTGAACTCAAAATGG TGCTTTGAATCAAACTCAAGATCAAAATCATCATCAAACTCCAGTTG GTAGAAATAATCAAAATGGTACTCAAAATCCATATAATTTGAACAAC CAAACTCAAAATAATTTGGAATACTAGAAATCAATCTAATAATTTCTGCTC AAAATCAACAACCAACAAGATAATCAAAATAACTAGAGGTAAT CAACAACAAGAACCAACAAGCTTCTGGTACTTCTTTGGCTATGAA TCAACATACTAAATGAATAATGAAATAATTCTCAAGATTTTTGCA ACAAATGTGG	MSQAASTKQSTETQNGALNQTDQ NHHQTPVGRNNQNGTONPYNSEQP NQNNWNTRNQSNNSAQNOQPQD NQNNTRGNQQQEPQASGTSLAMN QHTKLNENNSQDFLQMW	Toombs <i>et al</i> ¹⁶⁸ (GeneArt)

6. Llistat d'anticossos i altres marcatges específics utilitzats en aquest treball

Nom comercial	Epítop	Tipus d'anticòs / marcatge	Procedència	Proveïdor	Condicions d'us
Anti-GFP	GFP	Mescla de dos anticossos monoclonals primaris (clons 7.1 i 13.1; IgG ₁ K)	Ratolí (<i>Mus musculus</i>)	Roche	Dilució 1:1000 en llet en pols desnatada al 0.25% dissolta PBS-T
Anti-HA (12CA5)	HA	Anticòs monoclonal primari (clon 12CA5, IgG _{2b} K)	Ratolí (<i>Mus musculus</i>)	Carme Gallego	Dilució 1:500 en llet en pols desnatada al 0.25% en PBS-T
Anti-YDJ1	Ydj1	Anticòs monoclonal primari (clon 1G10.H8, IgG1)	Ratolí (<i>Mus musculus</i>)	Abnova	Dilució 1:2000 en llet en pols desnatada al 0.25% dissolta PBS-T
Anti-mouse IgG-HRP	IgG de ratolí	Anticòs policlonal secundari conjugat a HRP (peroxidasa de rave)	Ovella (<i>Ovis aries</i>)	GE Healthcare	Dilució 1:10000 en llet en pols desnatada al 0.25% dissolta PBS-T
Anti-mouse IgG-IRDye 800CW	IgG de ratolí	Anticòs policlonal secundari conjugat a IRDye 800CW	Cabra (<i>Capra aegagrus</i>)	Li-Cor	Dilució 1:10000 en llet en pols desnatada al 0.25% dissolta PBS-T
Avidina - FITC	Biotina	Avidina conjugada a FITC (fluoresceïna isotiocianat) per a detectar substrats biotinilats mitjançant fluorescència	Clara d'ous de gallina (<i>Gallus gallus</i>)	Thermo Fisher Scientific	10µg/ml en PBS
Streptavidina - AlexaFluor405	Biotina	Streptavidina conjugada a AlexaFluor405 per a detectar substrats biotinilats mitjançant fluorescència	<i>Streptomyces avidinii</i>	Thermo Fisher Scientific	10µg/ml en PBS
Streptavidina - APC	Biotina	Streptavidina conjugada a APC (Aloficocianina) per a detectar substrats biotinilats mitjançant fluorescència	<i>Streptomyces avidinii</i>	Thermo Fisher Scientific	2µg/ml en PBS
WGA - AlexaFluor647	N-acetil-D-glucosamina	Aglutinina del germen de blat conjugada a AlexaFluor647 per a detectar quitina en la paret cel·lular dels llevats (<i>budscars</i>)	Blat (<i>Triticum vulgaris</i>)	Thermo Fisher Scientific	20µg/ml en PBS
Concanavalina A - AlexaFluor647	α-D-mannosil	Lectina del fesol conjugada a AlexaFluor647 que s'uneix a glicoproteïnes mannosilades de la paret cel·lular dels llevats	Fesol (<i>Canavalia ensiformis</i>)	Thermo Fisher Scientific	20µg/ml en PBS + 2% sucre

7. Articles

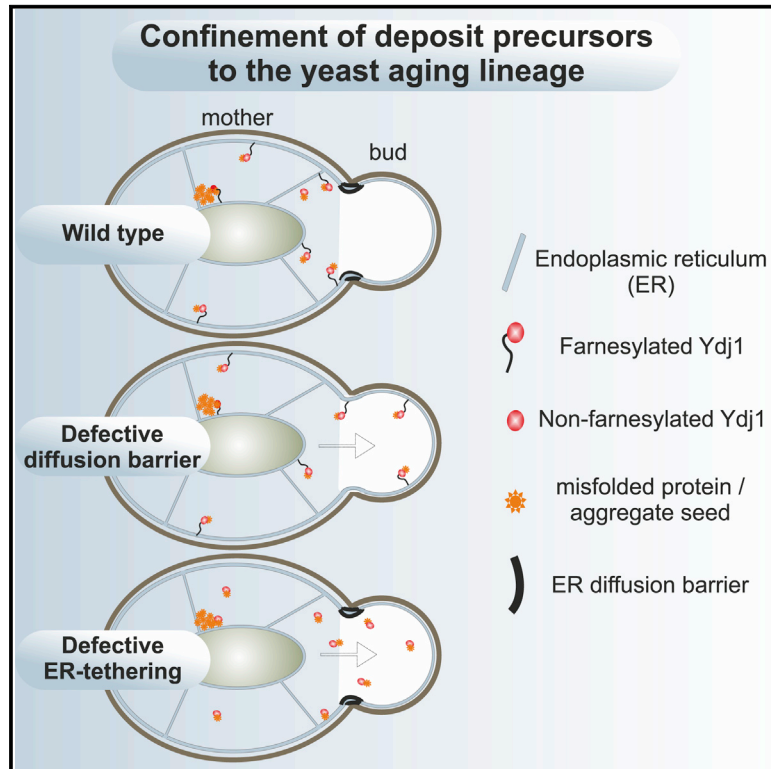
7.1. Saarikangas J, Caudron F, Prasad R, Moreno DF, Bolognesi A, Aldea M and Barral Y. Compartmentalization of ER-bound chaperone confines protein deposit formation to the aging yeast cell. *Current Biology* 27(6):773-783 (20 Març 2017)

7.2. Moreno DF, Parisi E, Yahya G, Vaggi F, Csikász-Nagy A, Aldea M. Competition for chaperones as a mechanism to adjust cell size to growth rate. (enviat)

Current Biology

Compartmentalization of ER-Bound Chaperone Confines Protein Deposit Formation to the Aging Yeast Cell

Graphical Abstract



Authors

Juha Saarikangas, Fabrice Caudron, Rupali Prasad, David F. Moreno, Alessio Bolognesi, Martí Aldea, Yves Barral

Correspondence

yves.barral@bc.biol.ethz.ch

In Brief

Saarikangas et al. report that confinement of age-associated protein deposit formation to the aging lineage in yeast involves a two-tiered mechanism. Deposit precursors are captured by ER-membrane-bound chaperone Ydj1. The compartmentalization of the ER by diffusion barriers then facilitates their asymmetric segregation during cell division.

Highlights

- Protein deposits that form during aging associate with the endoplasmic reticulum (ER)
- ER serves as a platform for deposit coalescence
- Deposit precursors are anchored to ER via farnesylated Hsp40 (Ydj1^{FS})
- ER diffusion barriers ensure the asymmetric partitioning of Ydj1^{FS} during division

Compartmentalization of ER-Bound Chaperone Confines Protein Deposit Formation to the Aging Yeast Cell

Juha Saarikangas,^{1,2} Fabrice Caudron,^{1,3} Rupali Prasad,¹ David F. Moreno,⁴ Alessio Bolognesi,¹ Martí Aldea,⁴ and Yves Barral^{1,5,*}

¹Institute of Biochemistry, ETH Zurich, Otto-Stern-Weg 3, 8093 Zurich, Switzerland

²Wissenschaftskolleg zu Berlin, Institute for Advanced Study, Wallotstrasse 19, 14193 Berlin, Germany

³Randall Division of Cell and Molecular Biophysics, King's College London, London SE1 1UL, UK

⁴Molecular Biology Institute of Barcelona, CSIC, Baldori i Reixac 15, 08028 Barcelona, Spain

⁵Lead Contact

*Correspondence: yves.barral@bc.biol.ethz.ch

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.069>

SUMMARY

In order to produce rejuvenated daughters, dividing budding yeast cells confine aging factors, including protein aggregates, to the aging mother cell. The asymmetric inheritance of these protein deposits is mediated by organelle and cytoskeletal attachment and by cell geometry. Yet it remains unclear how deposit formation is restricted to the aging lineage. Here, we show that selective membrane anchoring and the compartmentalization of the endoplasmic reticulum (ER) membrane confine protein deposit formation to aging cells during division. Supporting the idea that the age-dependent deposit forms through coalescence of smaller aggregates, two deposits rapidly merged when placed in the same cell by cell-cell fusion. The deposits localized to the ER membrane, primarily to the nuclear envelope (NE). Strikingly, weakening the diffusion barriers that separate the ER membrane into mother and bud compartments caused premature formation of deposits in the daughter cells. Detachment of the Hsp40 protein Ydj1 from the ER membrane elicited a similar phenotype, suggesting that the diffusion barriers and farnesylated Ydj1 functioned together to confine protein deposit formation to mother cells during division. Accordingly, fluorescence correlation spectroscopy measurements in dividing cells indicated that a slow-diffusing, possibly client-bound Ydj1 fraction was asymmetrically enriched in the mother compartment. This asymmetric distribution depended on Ydj1 farnesylation and intact diffusion barriers. Taking these findings together, we propose that ER-anchored Ydj1 binds deposit precursors and prevents them from spreading into daughter cells during division by subjecting them to the ER diffusion barriers. This ensures that the coalescence of precursors into a single deposit is restricted to the aging lineage.

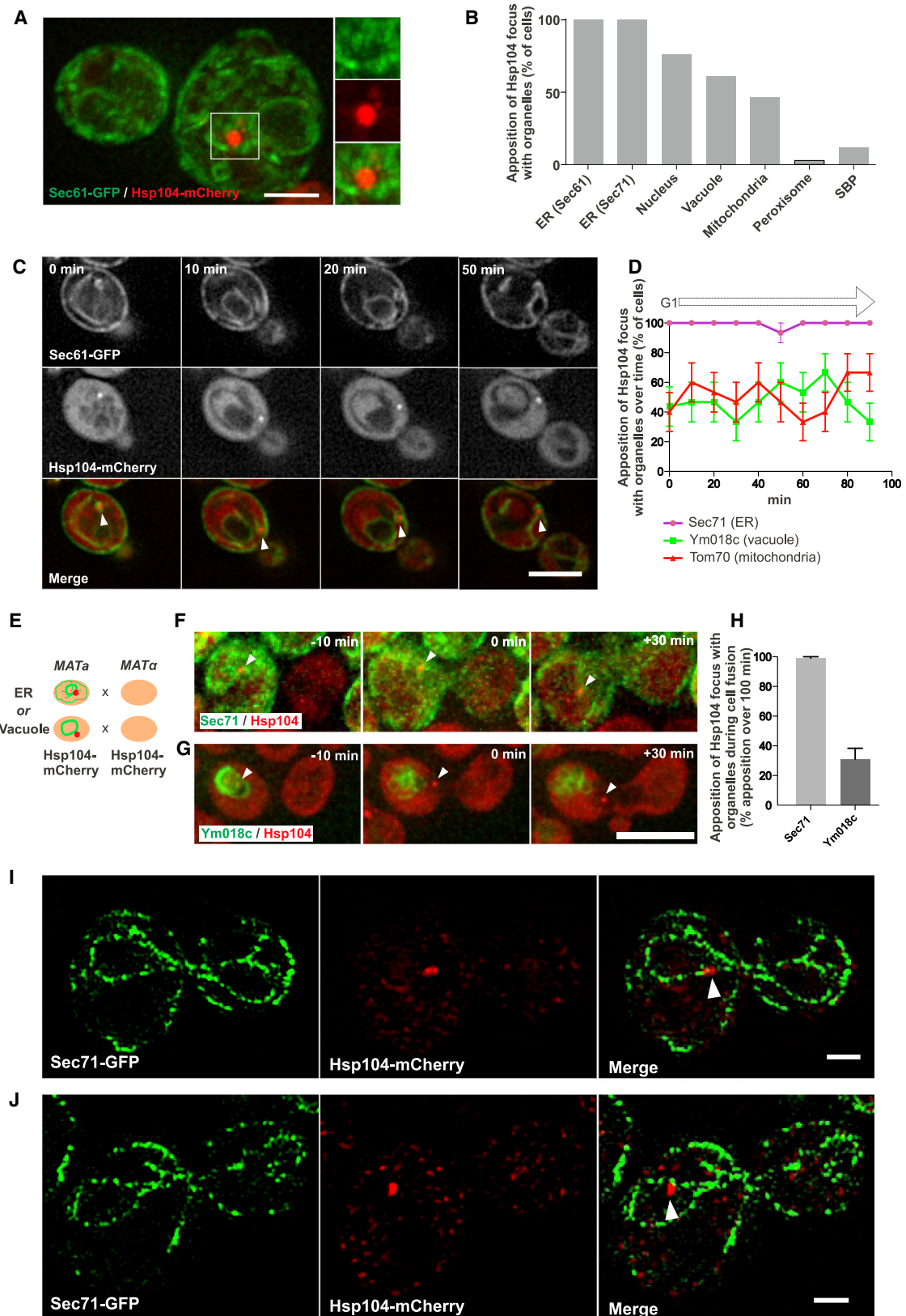
INTRODUCTION

The asymmetric partition of specific macromolecules during cell division is key for development, cellular diversity, cell fate determination, and aging [1–4]. In stem cells and budding yeast, RNA and protein determinants are asymmetrically inherited during division, modifying gene expression only in the recipient cell [3–5]. Also, some cells partition post-translationally modified or damaged macromolecules and organelles unequally between their daughters. This is thought to drive aging of the recipient by negatively influencing its fitness [2, 3, 6, 7]. Although the list of unequally partitioned material is expanding, far less is known about the molecular and biophysical mechanisms underlying their asymmetric partition during cell division.

Coalesced protein assemblies represent a diverse class of asymmetrically inherited cell fate determinants. For example, in budding yeast, some coalesced protein assemblies encode epigenetic information [8, 9], whereas others are associated with cellular dysfunction and linked to aging [2, 3, 8]. In budding yeast cells, Hsp104-labeled protein aggregates appear as singular deposits during early aging. They are retained in the aging lineage during division and contribute to aging [10–12]. It is currently unclear (1) why deposits form in aging mother cells, (2) what are their constituents, and (3) why they are not forming in daughter cells. Rather than resulting from a proteostasis collapse [12], deposits seem to form gradually during early aging, perhaps resulting from slow accumulation of specific misfolded proteins or epigenetic assemblies. If so, the deposit's precursors might also need to be confined to the aging mother cell, in order to prevent their passage and coalescence in the bud. Here, we sought to investigate the mechanisms that restrict the deposit formation to the aging mother cells.

RESULTS

In order to understand where coalescence might take place in the aging mother cells of *Saccharomyces cerevisiae*, we imaged three- to six-generation-old cells co-expressing Hsp104-mCherry together with GFP-tagged markers for the endoplasmic reticulum (ER) (Sec61 and Sec71; [Figures 1A and S1B](#)), nucleus (Pre6; [Figure S1C](#)), vacuole (Yml018c; [Figure S1D](#)), mitochondria



(legend on next page)

(Tom70; [Figure S1E](#)), peroxisomes (Pex3; [Figure S1F](#)), and spindle pole bodies (SPBs) (centrosome equivalents; Spc72; [Figure S1G](#)) and characterized the localization of the age-associated deposit relative to these organelles. Strikingly, the deposit (bright Hsp104-labeled dot) [12] was always apposed to the ER membrane, typically at the nuclear envelope (NE) ([Figures 1A, 1B, S1A, and S1B](#)). However, the deposits did not co-localize with SPBs ([Figures 1B and S1G](#)), unlike aggresomes in mammalian cells [13]. Approximately 60% and 40% of them also touched vacuolar and mitochondrial membranes, respectively ([Figure 1B](#)). These results are consistent with different protein inclusions associating with specific organelles during division [14–18].

Live-cell imaging confirmed that ER extensions, generally emanating from the nuclear envelope, encapsulated the age-associated deposit ([Figure 1C](#)). The localization of the Hsp104-labeled deposit relative to ER (Sec71-GFP), vacuole (Ym018c), and mitochondrial markers was imaged every 10 min over 100 min and quantified as cells progressed through a full division cycle ($n = 15$; [Figures S2A–S2C](#)). At each time point, the frequency of apposition to the ER varied between 93% and 100% over the duration of the movie. The average frequency of apposition to the vacuole and mitochondria were consistently lower (33%–66% and to 33%–60%, respectively; [Figure 1D](#)). Accordingly, in time-lapse movies of mating cells ([Figure 1E](#)), age-associated deposits followed the movements of the ER ([Figure 1F](#)), but not of the vacuole ([Figures 1G and 1H](#)). We concluded that the age-associated deposit was tethered to the ER membrane and transiently contacted vacuoles and mitochondria. In contrast, heat-stress-induced inclusions favor inter-organelle (ER-mitochondrion) contact sites [14].

Structured illumination microscopy of cells co-expressing the ER marker Sec71-GFP and Hsp104-mCherry validated that age-associated deposits were apposed to the ER, typically at the nuclear rim (96% of cases; [Figure 1I](#)) and occasionally inside the nucleus (38%; $n = 26$ cells; [Figure 1J](#)). This intranuclear localization is reminiscent of the intranuclear quality control compartment (INQ) [19], despite the INQ marker Btn2 not co-localizing with the age-associated deposit [12]. The exact structural and functional relationships between the Hsp104 structures that arise during aging and INQ/JUNQ deposits remain to be determined [12, 15, 19]. Collectively, our data establish that age-associated deposits are tethered to the ER membranes.

Age-Associated Deposits Tend to Merge

Limiting the deposits' number facilitates their asymmetric partition between daughters during cell division [20, 21]. During budding

yeast aging, states of two or more Hsp104 foci are rare and unstable [12], typically reverting to a single deposit state ([Figure 2A](#)), suggesting that large deposits form through merger of smaller entities over time. However, due to the small size of these entities, such events have not been visualized with conventional microscopy. To investigate whether merger could underlie the deposits' singularity, we tested the consequence of introducing two deposits into the same cell. Hence, haploid cells of opposite mating types, expressing either Hsp104-GFP or Hsp104-mCherry, were mixed, and fusing partners each containing one visible deposit ([Figure 2B](#)) were monitored ([Figures 2B and 2C](#)). As expected, the cytoplasmic Hsp104-GFP and Hsp104-mCherry signals mixed homogeneously immediately after cell fusion ([Figure 2D](#); [Movie S1](#)). However, the signal at the deposit typically remained initially in its original color (green or red; [Figure 2D](#); [Movie S1](#)), consistent with deposit-associated Hsp104 exchanging slowly [12]. Remarkably, the majority of the original deposits (82%; $n = 82$ cell pairs) merged together into a single deposit, which remained in the zygote throughout its subsequent budding cycles ([Figures 2E–2G, S3A, and S3B](#); [Movie S1](#)). Thus, fusion of coexisting deposits ensured their singularity, at least upon mating.

Merging of Deposits Requires a Continuous ER Membrane

Homozygous *prm3Δ/prm3Δ* mutant zygotes are defective in fusing the ER and NE of the partner cells upon mating [23] ([Figure 2H](#)). We reasoned that this should impede the merger of ER-tethered deposits. Accordingly, we observed that, prior to their first division, most homozygous *prm3Δ/prm3Δ* mutant zygotes (81%) failed to merge their deposits ([Figures 2I–2L](#); $p < 0.001$; $n = 42–82$). Beyond confirming that the deposits localize to the ER surface, this observation indicates (1) that the deposit is in a “coalescent state” and can grow through coalescence of precursor structures and (2) that the ER membrane serves as a platform for coalescence.

Compartmentalization of the ER Membrane Helps Confine Deposit Formation into the Mother Cells

Lateral diffusion barriers compartmentalize the ER membrane at the future division plane of dividing yeast, mouse neural stem cells, and embryos of *C. elegans* [24–29]. To test whether the diffusion barriers help retain the age-associated protein deposits into yeast mother cells, we harvested aged cells (~10–14 generations) [30] and measured the frequencies at which deposits passed to the daughter cell upon division. Passage was observed in <2% of wild-type cells ([Figures 3A and 3B](#)).

Figure 1. Age-Dependent Deposits Associate with the Endoplasmic Reticulum

- (A) Representative 3D projected image of a cell expressing Sec61-GFP and Hsp104-mCherry.
 (B) The percentages of age-associated protein deposits (Hsp104-mCherry focus) in contact with different organelles ($n = 18–51$ /group).
 (C) Time-lapse imaging of budding cell expressing Hsp104-mCherry and Sec61-GFP. Arrowhead, deposit surrounded by an ER extension.
 (D) Quantification of the apposition of Hsp104-mCherry-labeled deposits to the ER (Sec71-GFP), vacuole (Ym018c-GFP), and mitochondria (Tom70-GFP) during cell division. Images were acquired every 10 min over 100 min. 0 min time point is set at G1 ($n = 15$ /each).
 (E) Design of the mating experiments.
 (F and G) Time-lapse images at indicated time points after conjugation. *MATa* cell expresses Hsp104-mCherry (arrowhead, deposit) and Sec71-GFP (ER membrane marker) (F); *MATα* cell expresses Hsp104-mCherry or Ym018c-GFP (vacuolar membrane) (G).
 (H) Quantification of apposition between labeled deposit (Hsp104-mCherry) and the ER (Sec71-GFP) or vacuole (Ym018c) starting from first frame before fusion.
 (I and J) Single-plane SIM images of cells expressing Sec71-GFP and Hsp104-mCherry. Arrowheads, deposits at the nuclear envelope (I) and inside the nucleus (J).
 Scale bars represent 2 μ m (A), 5 μ m (C, F, and G), and 1 μ m (I and J). See also [Figures S1 and S2](#).

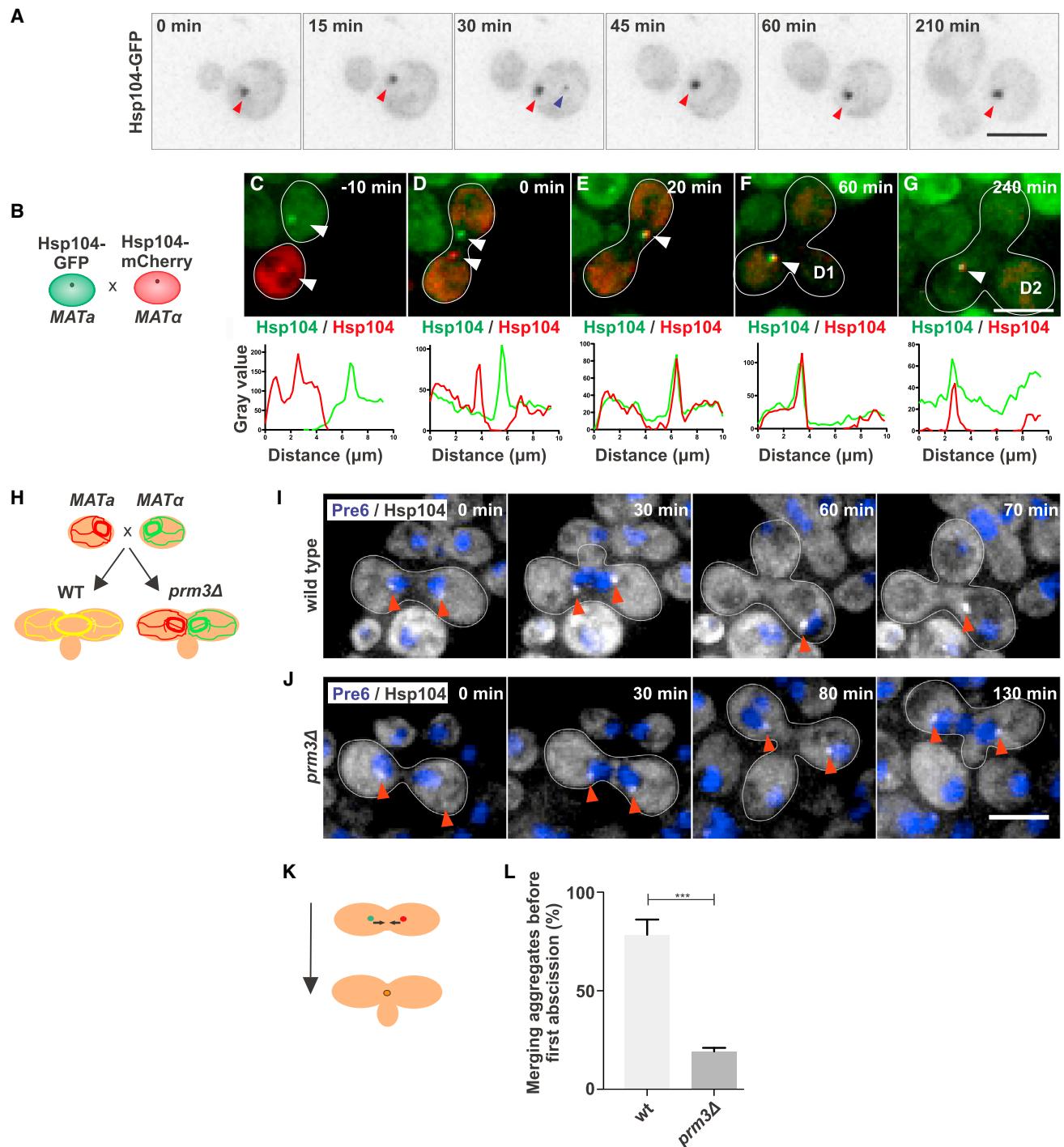


Figure 2. Localization to the ER Membrane Promotes the Singularity of Age-Associated Deposits

(A) Time-lapse imaging of Hsp104-GFP in a middle-age mother cell (12–15 generations). Arrowheads, pre-existing age-associated deposit (red) and transient appearance of a second one (blue).

(B–G) The experimental principles (B) and representative 3D projected images captured with time-lapse microscopy at indicated time points of a MATa cell expressing Hsp104-GFP (Mata) fusing with a MATα cell expressing Hsp104-mCherry (C–G). The fluorescence intensity line profiles depicted in the lower panel span across the fusing cells crossing the site of aggregates (intensity peaks). 0 min corresponds to time of cell-cell fusion.

(H) Deletion of *PRM3* impairs nuclear and ER fusion [22].

(I and J) Representative images at indicated time points after fusion of wild-type zygotes (I) and *prm3Δ/prm3Δ* mutant zygotes (J) expressing Hsp104-mCherry (gray) and Pre6-GFP (blue, nucleus).

(legend continued on next page)

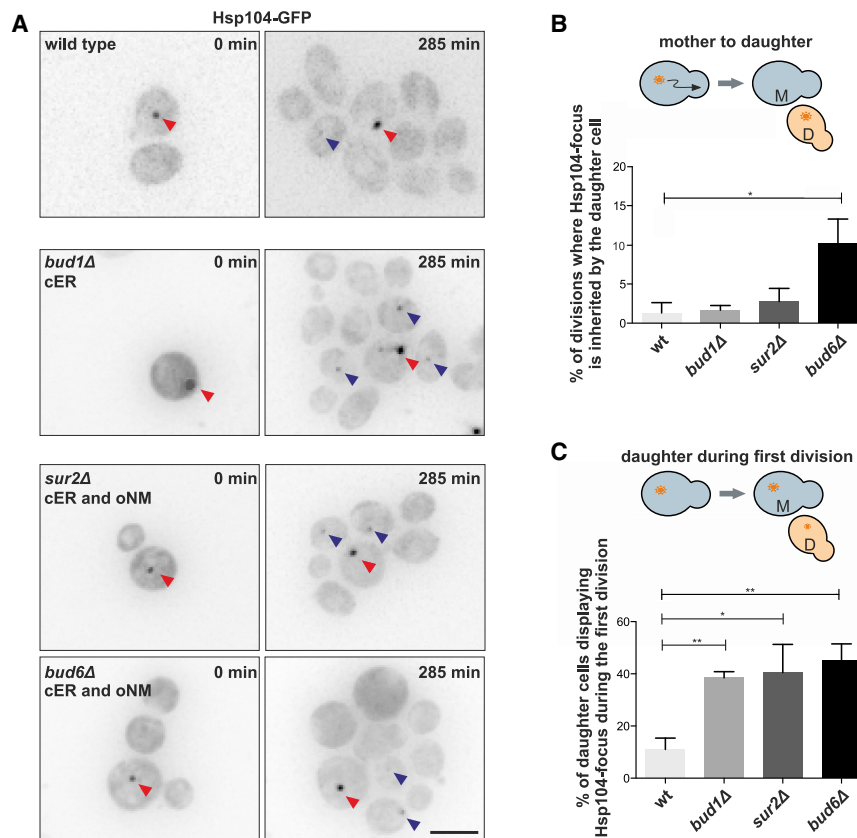


Figure 3. Lateral Diffusion Barriers at the Endoplasmic Reticulum Inhibit Deposit Formation in the Daughter Cells

(A) Representative projections of wild-type, *bud1Δ*, *bud6Δ*, and *sur2Δ* mutant cells expressing Hsp104-GFP (gray) imaged 285 min apart. Red arrowheads, deposit in the aged mother cell (red) and deposits appearing in the daughter cells (blue).

(B) Percentage of divisions in which the deposit passes to the daughter cells (from aged mother cell with a single deposit) in strains of indicated genotype ($n = 117$ –269).

(C) Percentage of daughter cells forming a stable deposit during their first cell cycle as in (B) ($n = 82$ –244). The graphs display mean $\pm$ SEM. Scale bars represent 5 μ m. See also Figure S4.

confine the deposit formation to the aging lineage. Furthermore, because the *sur2Δ* mutant cells did not show a stronger phenotype than the *bud1Δ* mutant cells, the confinement depended mainly on the cER barrier.

Confinement of Deposit Precursors to the Mother Cell Requires Ydj1 Tethering to ER Membrane

One possible mechanism by which the ER barrier could confine deposit formation to the mother cell would be if proteins targeted to deposits were anchored to the cytoplasmic side of the ER membrane prior to coalescing into the deposit.

Thus, we investigated whether interaction of Ydj1 with the ER membrane helped confine deposit formation into the mother cell. Mutating the cysteine 406 to serine abrogates Ydj1 farnesylation and renders the cells heat sensitive but does not abrogate Ydj1 function in protein folding [33]. Time-lapse imaging of

Weakening of the diffusion barrier at the cortical ER (cER) (*bud1Δ*) [24] or at both the cER and the outer nuclear membrane (ONM) (*sur2Δ*) [29] did not significantly promote passage of deposits into the bud (wild-type [WT]: 1.3%; *bud1Δ*: 1.7%; *sur2Δ*: 2.8%; not significant [n.s.]). Deletion of *BUD6*, which is required for integrity of both the cER and ONM barriers [25] and for actin cable assembly [31], increased 5-fold the passage frequency of deposits into the bud (Figures 3A and 3B; 10.2%; $p < 0.05$) without changing their number (Figure S3). We conclude that the decreased retention of the deposits into the *bud6Δ* mutant mother cells is due to actin cable defects, consistently with actin cables promoting the partition of protein inclusions [32]. Together, our data indicate that age-dependent deposits do not need the diffusion barriers at the bud neck for their retention in the aging lineage upon cell division.

However, all barrier-defective strains shared a remarkable phenotype: the daughter cells of aged *bud1Δ*, *sur2Δ* and *bud6Δ* mutant cells formed a deposit greater than three times faster than wild-type daughter cells (daughter cells forming deposit during their first cell cycle: 38%, $p < 0.01$; 40%, $p < 0.05$; 45%, $p < 0.01$; and 11%, respectively; Figures 3A and 3C). Thus, although retention of assembled age-dependent deposits did not depend on diffusion barriers, the barrier was required to

(K) Graph explains how deposit fusion events were quantified.

(L) Quantification of wild-type and *prn3Δ/prn3Δ* mutant zygotes fusing deposits before completing their first division. Graph displays mean in % $\pm$ SEM ($n = 42$ –81).

Scale bars represent 5 μ m. See also Figure S3 and Movie S1.

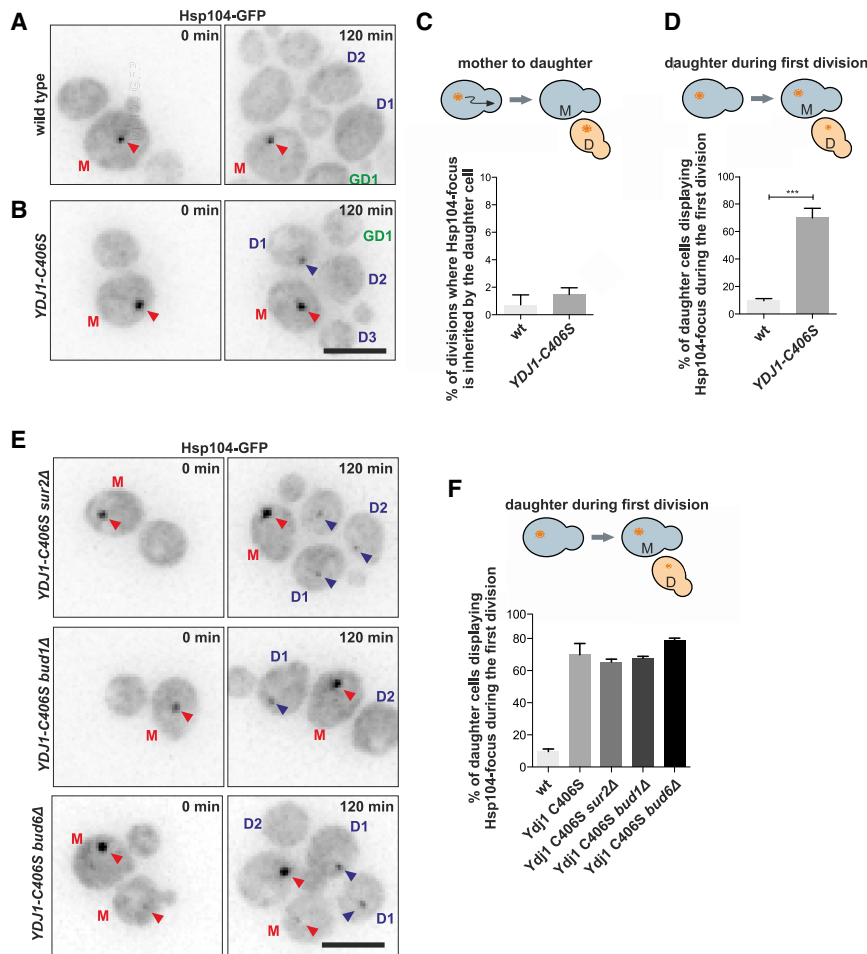


Figure 4. Farnesylated Ydj1 and the Diffusion Barriers Confine Protein Deposit Formation to the Mother Cell

(A and B) Representative projections of wild-type (A) and *Ydj1-C406S* mutant cells (B) imaged 120 min apart as in Figure 3A. Arrowheads, deposits of the mother cell (red) and deposits appearing in the daughter cells (blue). D, daughter; GD, granddaughter cell; M, mother.

(C) Percentage of divisions with deposit passing from the mother cell into her daughter (n = 217–502).

(D) Percentage of daughter cells forming a stable deposit during their first division cycle (as in Figure 1C; n = 318–343).

(E) Representative images of *YDJ1-C406S sur2Δ*, *YDJ1-C406S bud1Δ*, and *YDJ1-C406S bud6Δ* double-mutant cells as in (A).

(F) Percentage of daughter cells forming a deposit during their first division cycle (n = 256–343).

Scale bars represent 5 μ m; graphs display mean $\pm$ SEM. See also Figure S5.

The Diffusion Barrier Facilitates the Asymmetric Retention of Slow-Diffusing Ydj1^{FS} into the Mother Cells during Mitosis

The results above suggested that farnesylated Ydj1 acted as a membrane anchor for proteins destined to the age-dependent deposit, thereby subjecting them to compartmentalization by the lateral diffusion barriers and preventing their transmission to daughter cells. In order to test this idea, we next compared the diffusion dynamics of Ydj1 in mother and bud compartments using fluorescence correlation spectroscopy (FCS) (Figure 5A).

Because the diffusion rate of a protein reflects the size of the particle and the environment in which it diffuses, increased association of Ydj1 with clients in the mother cell should slow down its diffusion. However, such effects could be compounded by the degree of membrane association of Ydj1 in one compartment versus the other. Thus, we generated two chromosomally inserted constructs: one allowing Ydj1 to be farnesylated (Ydj1-GFP^{FS}) and a similar construct lacking the farnesylation site (C406S; Ydj1-GFP^{C406S}). Importantly, analysis of wild-type mother-bud pairs revealed that Ydj1-GFP^{FS} diffused on average significantly slower in the mother than in the bud compartment ($D = 3.86 \pm 0.059$ versus 4.53 ± 0.073 ; $p < 0.0001$; Figure 5B). In contrast, Ydj1-GFP^{C406S} diffused significantly faster both in the mother and the bud (Ydj1-GFP^{C406S} $D = 5.34 \pm 0.147$ and 5.48 ± 0.149 ; Figure 5B), consistent with the protein being detached from the membrane. Furthermore, its speed was similar in both compartments (Ydj1-GFP^{C406S} Mother^D versus Bud^D n.s.). In the barrier-defective *sur2Δ* mutant cells, Ydj1^{FS} diffused nearly as fast in the mother and in the bud (3.91 ± 0.066 versus 4.15 ± 0.084 ; $p < 0.05$; Figure 5B). Importantly, the diffusion of Ydj1^{FS} was significantly slower in the *sur2Δ* mutant than in wild-type buds (Bud^D in wild-type versus *sur2Δ*, $p < 0.005$), whereas diffusion in the mother compartment

Hsp104-GFP indicated that the daughters of *YDJ1-C406S* mutant cells formed a deposit >6-fold faster than wild-type daughter cells (Figures 4A, 4B, and 4D). Subsequently, these cells efficiently retained this deposit (frequency of passage into the bud: 0.7% in wild-type versus 1.5% in *YDJ1-C406S*; n.s.; Figures 4A–4C), which still remained associated to the ER membrane (co-localization with Sec71: wild-type 99.5%; Ydj1C406S 99.5%; Figures S5D–S5F). Thus, detaching Ydj1 from the ER specifically expedites the deposit formation in the bud, whereas ER association and mother retention of the deposits is facilitated by other factors.

In order to understand how Ydj1 function relates to that of the barrier in the cER, we first tested whether the Ydj1-C406S mutation affected barrier formation. We assayed barrier strength using fluorescent loss in photobleaching (FLIP) [29, 37] and the ER membrane protein Sec71 as a reporter (Figures S5G–S5K). No barrier decrease was observed in the *YDJ1-C406S* mutant cells (barrier index: wild-type: 5.4 ± 0.7 ; Ydj1C406S: 6.5 ± 0.8 ; Figure S5K). Furthermore, we noted that the daughter cells of *YDJ1-C406S sur2Δ* (65.4%), *YDJ1-C406S bud1Δ* (67.7%), and *YDJ1-C406S bud6Δ* (78.7%) double-mutant cells formed deposits as frequently as those of the *YDJ1-C406S* single-mutant cells (69.8%; n.s.; Figures 4E and 4F). Thus, the diffusion barriers and ER tethering of Ydj1 function jointly in confining deposit formation to the mother cell.

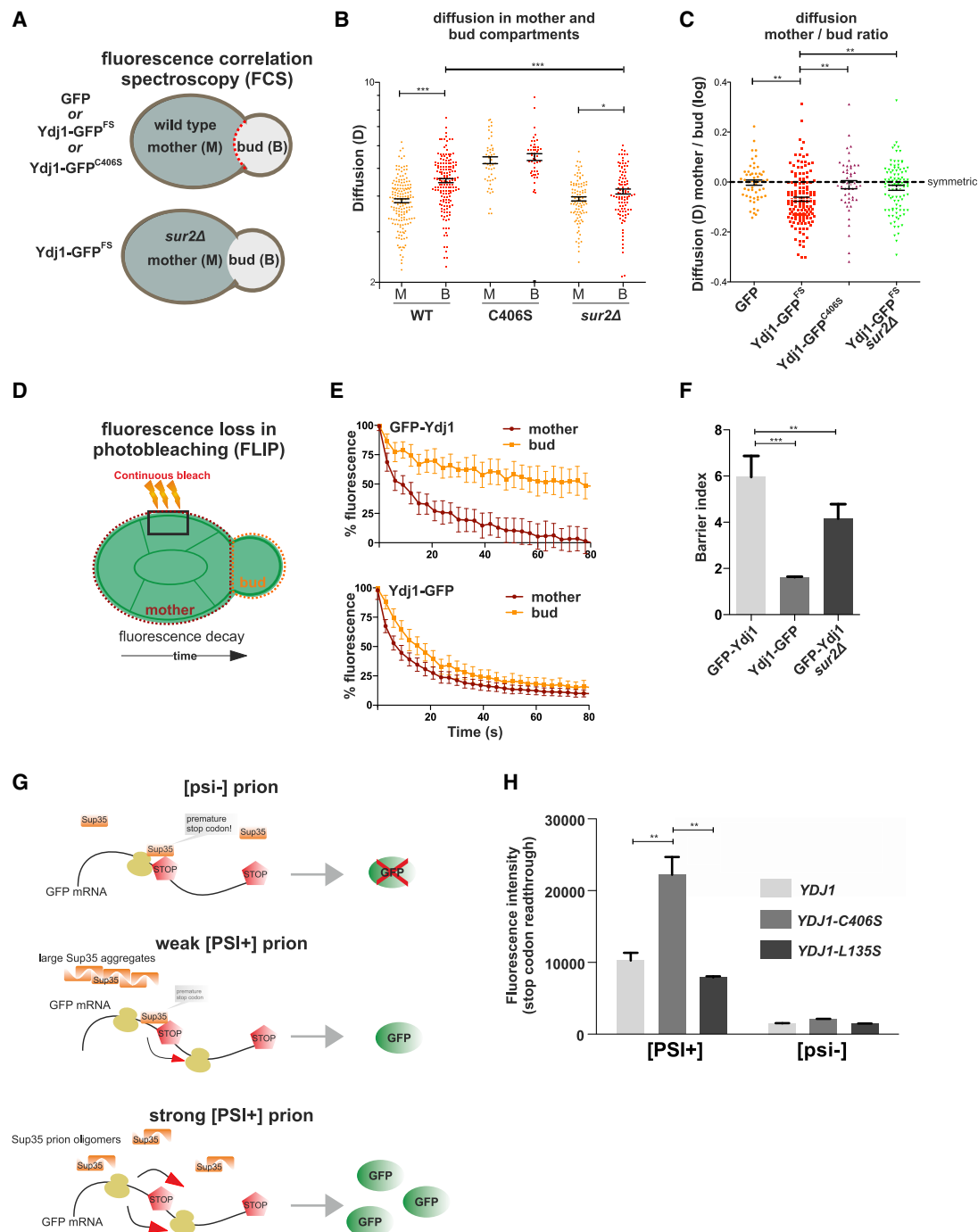


Figure 5. Ydj1 Is Compartmentalized to the Mother Cells by ER Tethering and Diffusion Barriers, and Its ER Anchoring Suppresses the Sup35 Prion Phenotype

(A) Sketch of the experimental design.

(B and C) Quantification of the diffusion coefficient presented (in log scale) in the indicated compartments (B), or presented as a mother/bud ratio of GFP (n = 53), Ydj1-GFP^{FS} (n = 149), Ydj1-GFP^{C406S} (n = 48), and Ydj1-GFP^{FS} in *sur2Δ* cells (n = 98) (C).

(D) Schematic representation of the FLIP assay: GFP-Ydj1 was continuously photobleached in the mother domain, and the fluorescence decay was measured over time in mother (red) and bud (orange).

(E) Average FLIP curves of GFP-Ydj1 (upper panel; n = 40); Ydj1-GFP (lower panel; n = 39).

(F) Barrier index for the indicated markers in cells of indicated genotypes.

(G) Schematic representation of the effects of Sup35 in translation termination in its non-prion [psi⁻] and weak- and strong-prion [PSI⁺] states.

(H) Fluorescence intensity measured by flow cytometer of YDJ1, YDJ1-C406S, and Ydj1-L135S cells in the [PSI⁺] and [psi⁻] states.

Graphs display mean ± SEM.

was not significantly affected. Analysis of the diffusion profiles in single mother-bud pairs indicated that cytosolic GFP alone diffused at a similar speed in both the mother and bud compartments (GFP Mother^D/Bud^D = 1.01 ± 0.03), whereas the diffusion of Ydj1-GFP^{FS} was asymmetric, being on average $\sim 12\%$ slower in the mother than in the bud compartment (Figure 5C; Ydj1-GFP^{FS} Mother^D/Bud^D = 0.88 ± 0.02 ; GFP versus Ydj1-GFP^{FS}, $p < 0.005$). Importantly, both the C406S mutation and barrier inactivation abolished this asymmetry (Figure 5C; Ydj1-GFP^{C406S} Mother^D/Bud^D = 1.01 ± 0.04 ; Ydj1-GFP^{FS} versus Ydj1-GFP^{C406S}, $p < 0.005$; *sur2Δ* Mother^D/Bud^D = 0.970 ± 0.02 ; wild-type versus *sur2Δ*, $p < 0.005$). Thus, Ydj1 diffused slower in the mother than in her bud; this difference required its farnesylation and intact diffusion barriers.

The slower diffusion of Ydj1-GFP^{FS} in mother versus bud compartments might reflect the protein being more frequently farnesylated and tethered to the membrane in mother cells and/or being more frequently associated with clients or other factors. The average diffusion speed of GFP (21.22 ± 0.09) was 4.7 times faster than the non-membrane-bound Ydj1-GFP^{C406S} (4.52 ± 0.09) at similar molecular brightness (GFP 5.54 ± 0.26 ; Ydj1-GFP^{C406S} 7.46 ± 0.21). If only their own size affected their diffusion, Ydj1-GFP^{C406S} should be only 1.34-fold slower than GFP alone. Hence, cargo binding seems to slow down Ydj1^{C406S} diffusion in vivo.

Next, we asked whether increased detachment of Ydj1 from the ER membrane caused its accelerated diffusion in the bud (Figure 5B). Molecules freely diffusing in a continuous aqueous phase (cytoplasm or ER lumen) exchange nearly instantly between mother and bud, and thus, in FLIP assays, their fluorescence decays at similar speeds in both compartments [24, 38]. Upon continuously photobleaching a small area in the mother cell [29, 37], the fluorescence of GFP-Ydj1 (intact farnesylation motif in the C terminus) decayed six times slower in the bud than in the mother compartment (Figures 5D–5F). In contrast, the fluorescence of the Ydj1-GFP protein (non-farnesylated and cytoplasmic) decayed nearly as fast in the bud as in the mother compartments (Figures 5E and 5F; barrier index GFP-Ydj1: 5.96 ± 0.45 ; Ydj1-GFP 1.62 ± 0.01 ; $p < 0.001$). Thus, the farnesylated species of Ydj1 do not exchange rapidly between bud and mother, excluding the possibility that they are cytoplasmic in the bud. We conclude that Ydj1 compartmentalization requires its farnesylation and that Ydj1 is anchored to the ER membrane in both mother and bud compartments. Thus, increased cargo binding in the mother cell likely underlies the slower diffusion of Ydj1 in that compartment.

Comparing FLIP traces between wild-type and *sur2Δ* mutant cells indicated that GFP-Ydj1 exchanged $\sim 30\%$ faster between mother and bud upon barrier inactivation (Figure 5F; barrier index wild-type: 5.96 ± 0.45 ; *sur2Δ*: 4.16 ± 0.31 ; $p < 0.01$). We conclude that the diffusion barrier helps compartmentalize the cargo-bound, slow-diffusing Ydj1 to the mother cell during division.

Ydj1-Mediated Membrane Confinement Suppresses the Prion Phenotype of Sup35

In order to gain insights into the possible relevance of Ydj1 confinement, we sought to test how ER tethering of Ydj1 affects one of its known clients. The translation termination factor Sup35

accumulates in the age-associated Hsp104 deposit of [PSI⁺], but not of [psi[−]] cells, i.e., only when it is converted into its amyloid-forming prion form [12]. Thus, prion-converted Sup35 is a potential client of Ydj1 during aging. Supporting this notion, Ydj1 physically associates with Sup35 [39], and its overexpression cures the [PSI⁺] prion state [40]. Importantly, diffusion of Sup35 aggregation oligomers (propagons) into buds ensures the heritability of the [PSI⁺] prion state. The number of Sup35 propagons determines the strength of the [PSI⁺] phenotype: strong variants show large numbers of small, cytosolic oligomers that propagate the prion phenotype and convert the functional soluble Sup35 (inactivating its translation termination activity) more robustly than weak variants, which contain larger Sup35 aggregates and smaller number of converting and propagating species (see, e.g., [41, 42]). Thus, [PSI⁺] strength is a proxy for the spreading of Sup35 propagons in the population. Therefore, we quantified this strength by expressing an mRNA carrying the GFP coding sequence interrupted by a premature stop codon. In [psi[−]] strains, translation termination at the stop prevents GFP expression (see Figure 5G), whereas increased readthrough in the [PSI⁺] allows GFP accumulation. The degree of this accumulation depends on prion strength [42]. Using flow cytometry, we assayed how mutating the farnesylation site (YDJ1-C406S) or the peptide-binding pocket of Ydj1 (YDJ1-L135S—hampering protein folding, but not in prion binding) [43] affected stop codon readthrough in [PSI⁺] and [psi[−]] cells (Figure 5G). As reported [42], GFP fluorescence was increased >6 -fold in the [PSI⁺] strain expressing wild-type YDJ1 compared to the [psi[−]] strain (Figure 5F; [PSI⁺]: $10,273 \pm 1,074$ a.u.; [psi[−]]: $1,523 \pm 11$ a.u.). In comparison, the [PSI⁺] cells expressing Ydj1-C406S displayed an additional >2 -fold increase in GFP expression (Figure 5F; $22,218 \pm 2,461$ a.u.; $p < 0.01$). In contrast, the peptide-binding mutant did not potentiate the [PSI⁺] phenotype (Figure 5F; L135S: $7,923 \pm 129$ a.u.) [39]. Taken together, these results indicate that farnesylated Ydj1 and not Ydj1 function in protein folding suppresses the number of Sup35 propagons in the population. We propose that this effect is due to loading of Sup35 oligomers to ER-bound Ydj1 to limit their propagation from aging mothers to their buds.

DISCUSSION

Organismal aging is associated with proteome changes, including the appearance of protein deposits [44]. In replicative aged budding yeast cells, microscopically visible protein deposits appear during early aging, yet their appearance does not seem to be caused by proteostasis collapse [12]. Their origin in the aging lineage remains therefore unclear. We found that age-associated protein deposits have the propensity to merge (Figure 2) [12], suggesting that they are built over time through fusion of smaller, microscopically invisible precursors. Because the deposits do not form in the growing bud, these small precursors must be somehow confined into the mother cells prior to their solubilization, degradation, or incorporation into the large deposits and not passed on during mitosis.

Here, we propose a framework to explain how deposit formation is confined to the aging lineage. Age-associated deposits are tethered to the ER membrane. This continuous membrane is laterally compartmentalized at the future cell division plane

by diffusion barriers [24, 25, 29]. Both disruption of ER compartmentalization and detachment of the ER-anchored DnaJ protein, Ydj1, accelerated deposit appearance in the daughter cells, suggesting that deposit constituents might enter the buds more frequently in these mutants. Molecule measurements established that Ydj1 diffused significantly slower in the mother than in the bud (Figure 5) and that abrogating the barrier or detaching Ydj1 from the ER membrane erased this difference and accelerated deposit formation in daughter cells. Based on this, we suggest that Ydj1 is more frequently associated with client proteins and macrocomplexes in the mother cell than in her bud (Figure 5). Although unequivocal demonstration of Ydj1 client binding will require additional work, our results provide a plausible mechanistic explanation for how protein deposit formation is confined in a lineage-specific manner. We propose that capturing of deposit precursors to the ER membrane by Ydj1 and the impeded diffusion of such species from the mother into the bud by the diffusion barriers together ensure that the coalescence of precursors into a larger deposit takes place primarily in the aging mother cell.

Alternatively, all of these mutants could accelerate deposit formation by increasing the rate of protein misfolding. However, we find this alternative unlikely because neither the barrier mutant cells nor cells expressing non-farnesylated Ydj1 displayed noticeable reduction of Ydj1 diffusion. Thus, it is unlikely that they accumulate more unfolded proteins. Furthermore, the *YDJ1-C406S* mutation and all barrier defects accelerated deposit formation through the same mechanism, which is therefore unlikely to rely on increased protein misfolding. Finally, whereas the membrane-detached version of Ydj1 increased Sup35 prion strength, which reflects an increased number of spreading propagons, this effect was not recapitulated by the Ydj1 mutant that impaired protein folding. From these lines of evidence, we conclude that increased deposit formation in the daughter cells of diffusion-barrier-defective or membrane-detached Ydj1 mutant cells is caused by defective confinement of aggregate precursors rather than increased protein misfolding.

It is unknown why protein deposits form with age and what they are constituted of. We suggest that the formation of deposits during aging might be associated with the gradual accumulation of deposit precursors in the mother cells. It is possible that the progressive accumulation of such species may overwhelm the capturing system over time. Furthermore, the deposits may then themselves become a source of propagating seeds, as the disaggregation machinery attempts to dissociate them. Indeed, we found that the deposit formation frequencies in daughter cells correlated with the deposit status of mother cells. In wild-type and *sur2Δ* mutant cells, the daughters born from mothers with pre-existing deposit formed a deposit more frequently during their first cycle than daughter cells born from a mother that neither contained a deposit nor formed one immediately after division ($9.0\% \pm 3.2\%$ versus $2.8\% \pm 2\%$ in wild-type and $33.8\% \pm 6.8\%$ versus $1.9\% \pm 1.9\%$ in the *sur2Δ* mutant cells, respectively). Thus, the formation of visible deposits over time takes place through diffusion-barrier-mediated confinement of deposit precursors. Furthermore, the growing deposits of aged cells may lead to increased seeding of deposit precursors.

From yeast to mammals, aggregation-prone protein sequences, such as intrinsically disordered and prion-like domains, have been associated with the formation of phase-separated protein assemblies involved in many processes, including epigenetic and adaptive regulations and the compartmentalization of biochemical reactions [8, 45]. The dynamics of these stoichiometrically ambiguous assemblies are governed by their material state, which can vary from liquid-like to less-dynamic hydrogels and solids [46]. Such assembly mechanisms may require particularly high maintenance and could be vulnerable to transit into aberrant states of aggregation [45, 47]. Therefore, it is now very timely to identify the mechanisms that prevent the uncontrolled formation and spreading of different aggregation oligomers. Indeed, such uncontrolled spreading is particularly linked to age-associated neurodegenerative conditions in humans [43], such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's diseases. There, the spread of aggregating species and the mode of their aggregation are potentially key features in aggregation-induced pathogenicity [43, 48]. Thus, spatial confinement and collection of aggregating oligomers into larger deposits potentially protects the cell against their toxicity. It is noteworthy that human DnaJ proteins have been found to be key regulators of aggregating proteins in various proteopathic diseases and that mutations in genes encoding DnaJ proteins can predispose to certain protein aggregation diseases [49]. Thus, Ydj1 and its human homologs are key coordinators of aging- and disease-associated protein aggregation.

Intriguingly, the confinement of aggregate precursors shows similarities with the confinement of extra-chromosomal DNA circles (ERCs) into yeast mother cells [6, 25, 50]. Mediated by the SAGA complex, ERCs bind to a subset [50] of nuclear pore complexes, facilitating their retention by the diffusion barrier at the bud neck [25, 50]. Therefore, we propose that selective anchorage to the ER membrane together with membrane compartmentalization by diffusion barriers represent a general theme to promote the asymmetric partitioning of diverse fate determinants during asymmetric cell division. This concept may be widespread, because diffusion barriers confine other membranes as well [22], for example, the plasma membrane at the base of primary cilia [51] and dendritic spines [52]. Our finding that post-translational lipidation can prevent proteins from passing diffusion barriers may therefore explain how certain cytoplasmic proteins can be enriched to specific regions of the cell to carry out compartment-specific tasks.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Microscopy

All images (except Figures 11, 1J, S5G, and S5H) were acquired at 30°C with a DeltaVision microscope (GE Healthcare/Applied Precision) equipped with 100×/1.40 and 60×/1.42 numerical aperture (NA) Olympus objectives, 250W Xenon lamps, and a coolSNAP CCD HQ2 camera. Imaging was performed with the indicated time intervals by obtaining 9–15 z sections for each time point. Images were deconvolved with Softworx (Applied Precision) and maximum projected unless otherwise indicated.

Structured illumination microscopy was performed with Applied Precision OMX Blaze (GE Healthcare) microscope, using a 60× 1.42 NA Plan Apo oil objective and sCMOS OMX V4 camera. Imaging was performed with immersion oil (refractive index 1.516), using 488- and 568-nm lasers and 528/35- and 609/37-nm emission filters. Total depth was 1.25 μm, with one focal plane

every 150 nm. Image reconstruction was performed using Softworx with a Wiener filter of 0.002.

FLIP experiments were performed as described [29, 37] on an LSM 780 (Carl Zeiss) confocal microscope with a 63×/1.4 NA objective and a multiarray 32PMT GaAsP detector, using 3.5% (Sec71) and 12% (GFP-Ydj1) of 488-nm argon laser intensity. Bleaching was applied with 100 iterations at 100% laser power over a period of 50 frames. The strains are listed and the growth conditions, image analyses, fluorescence correlation spectroscopy, and flow cytometry experiments are described in [Supplemental Experimental Procedures](#).

Statistical Analyses

All the statistical analyses were performed and the graphs prepared with PRISM5 software (Graphpad Software). Comparisons between two groups were done with t test and multiple groups with one-way ANOVA, using Dunnett's or Newman-Keuls post tests; *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001. In the text, "±" values indicate SEM.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes five figures, Supplemental Experimental Procedures, one table, and one movie and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.069>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.S., F.C., and Y.B. conceived the study. J.S., F.C., R.P., D.F.M., A.B., and M.A. performed experiments and analyzed the data. J.S. and Y.B. wrote the manuscript with input from all the authors.

ACKNOWLEDGMENTS

This study is supported by FEBS and the Finnish Cultural Foundation (to J.S.) and the European Research Council (BarrAge 250278) and ETH Zurich (to J.S., F.C., R.P., A.B., and Y.B.). We are grateful to Maya Schuldiner, Tricia Serio, Simon Alberti, and Douglas Cyr for kindly providing strains and plasmids. ETH Zurich Scientific Center for Optical and Electron Microscopy (ScopeM) and the Flow Cytometry core facilities are acknowledged for instrumentation and technical support. We thank Anne Meinema for providing computational tools and Haochen Yu for giving valuable feedback on the manuscript.

Received: May 20, 2016

Revised: December 21, 2016

Accepted: January 31, 2017

Published: March 2, 2017

REFERENCES

- Mortimer, R.K., and Johnston, J.R. (1959). Life span of individual yeast cells. *Nature* 183, 1751–1752.
- Denoth Lippuner, A., Julou, T., and Barral, Y. (2014). Budding yeast as a model organism to study the effects of age. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 300–325.
- Higuchi-Sanabria, R., Pernice, W.M., Vevea, J.D., Alessi Wolken, D.M., Boldogh, I.R., and Pon, L.A. (2014). Role of asymmetric cell division in lifespan control in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 14, 1133–1146.
- Neumüller, R.A., and Knoblich, J.A. (2009). Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. *Genes Dev.* 23, 2675–2699.
- Singer-Krüger, B., and Jansen, R.P. (2014). Here, there, everywhere. mRNA localization in budding yeast. *RNA Biol.* 11, 1031–1039.
- Ouellet, J., and Barral, Y. (2012). Organelle segregation during mitosis: lessons from asymmetrically dividing cells. *J. Cell Biol.* 196, 305–313.
- Liu, L., and Rando, T.A. (2011). Manifestations and mechanisms of stem cell aging. *J. Cell Biol.* 193, 257–266.
- Saarikangas, J., and Barral, Y. (2016). Protein aggregation as a mechanism of adaptive cellular responses. *Curr. Genet.* 62, 711–724.
- Caudron, F., and Barral, Y. (2013). A super-assembly of Whi3 encodes memory of deceptive encounters by single cells during yeast courtship. *Cell* 155, 1244–1257.
- Aguilaniu, H., Gustafsson, L., Rigoulet, M., and Nyström, T. (2003). Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science* 299, 1751–1753.
- Erjavec, N., Larsson, L., Grantham, J., and Nyström, T. (2007). Accelerated aging and failure to segregate damaged proteins in Sir2 mutants can be suppressed by overproducing the protein aggregation-remodeling factor Hsp104p. *Genes Dev.* 21, 2410–2421.
- Saarikangas, J., and Barral, Y. (2015). Protein aggregates are associated with replicative aging without compromising protein quality control. *eLife* 4, e06197.
- Johnston, J.A., Ward, C.L., and Kopito, R.R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J. Cell Biol.* 143, 1883–1898.
- Zhou, C., Slaughter, B.D., Unruh, J.R., Guo, F., Yu, Z., Mickey, K., Narkar, A., Ross, R.T., McClain, M., and Li, R. (2014). Organelle-based aggregation and retention of damaged proteins in asymmetrically dividing cells. *Cell* 159, 530–542.
- Kaganovich, D., Kopito, R., and Frydman, J. (2008). Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* 454, 1088–1095.
- Spokoini, R., Moldavski, O., Nahmias, Y., England, J.L., Schuldiner, M., and Kaganovich, D. (2012). Confinement to organelle-associated inclusion structures mediates asymmetric inheritance of aggregated protein in budding yeast. *Cell Rep.* 2, 738–747.
- Escusa-Toret, S., Vonk, W.I., and Frydman, J. (2013). Spatial sequestration of misfolded proteins by a dynamic chaperone pathway enhances cellular fitness during stress. *Nat. Cell Biol.* 15, 1231–1243.
- Hill, S.M., Hao, X., Grönvall, J., Spikings-Nordby, S., Widlund, P.O., Amen, T., Jörhov, A., Josefson, R., Kaganovich, D., Liu, B., and Nyström, T. (2016). Asymmetric inheritance of aggregated proteins and age reset in yeast are regulated by Vac17-dependent vacuolar functions. *Cell Rep.* 16, 826–838.
- Miller, S.B., Ho, C.T., Winkler, J., Khokhrina, M., Neuner, A., Mohamed, M.Y., Guilbride, D.L., Richter, K., Lisby, M., Schiebel, E., et al. (2015). Compartment-specific aggregates direct distinct nuclear and cytoplasmic aggregate deposition. *EMBO J.* 34, 778–797.
- Coelho, M., Lade, S.J., Alberti, S., Gross, T., and Tolić, I.M. (2014). Fusion of protein aggregates facilitates asymmetric damage segregation. *PLoS Biol.* 12, e1001886.
- Lade, S.J., Coelho, M., Tolić, I.M., and Gross, T. (2015). Fusion leads to effective segregation of damage during cell division: an analytical treatment. *J. Theor. Biol.* 378, 47–55.
- Caudron, F., and Barral, Y. (2009). Septins and the lateral compartmentalization of eukaryotic membranes. *Dev. Cell* 16, 493–506.
- Melloy, P., Shen, S., White, E., and Rose, M.D. (2009). Distinct roles for key karyogamy proteins during yeast nuclear fusion. *Mol. Biol. Cell* 20, 3773–3782.
- Luedeke, C., Frei, S.B., Sbalzarini, I., Schwarz, H., Spang, A., and Barral, Y. (2005). Septin-dependent compartmentalization of the endoplasmic reticulum during yeast polarized growth. *J. Cell Biol.* 169, 897–908.
- Shcheprova, Z., Baldi, S., Frei, S.B., Gonnet, G., and Barral, Y. (2008). A mechanism for asymmetric segregation of age during yeast budding. *Nature* 454, 728–734.
- Chao, J.T., Wong, A.K., Tavassoli, S., Young, B.P., Chruscicki, A., Fang, N.N., Howe, L.J., Mayor, T., Foster, L.J., and Loewen, C.J. (2014). Polarization of the endoplasmic reticulum by ER-septin tethering. *Cell* 158, 620–632.
- Lee, Z.Y., Prouteau, M., Gotta, M., and Barral, Y. (2016). Compartmentalization of the endoplasmic reticulum in the early *C. elegans* embryos. *J. Cell Biol.* 214, 665–676.

28. Moore, D.L., Pilz, G.A., Araúzo-Bravo, M.J., Barral, Y., and Jessberger, S. (2015). A mechanism for the segregation of age in mammalian neural stem cells. *Science* 349, 1334–1338.
29. Clay, L., Caudron, F., Denoth-Lippuner, A., Boettcher, B., Buvelot Frei, S., Snapp, E.L., and Barral, Y. (2014). A sphingolipid-dependent diffusion barrier confines ER stress to the yeast mother cell. *eLife* 3, e01883.
30. Lindstrom, D.L., and Gottschling, D.E. (2009). The mother enrichment program: a genetic system for facile replicative life span analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 183, 413–422.
31. Moseley, J.B., and Goode, B.L. (2005). Differential activities and regulation of *Saccharomyces cerevisiae* formin proteins Bni1 and Bn1 by Bud6. *J. Biol. Chem.* 280, 28023–28033.
32. Liu, B., Larsson, L., Caballero, A., Hao, X., Oling, D., Grantham, J., and Nyström, T. (2010). The polarisome is required for segregation and retrograde transport of protein aggregates. *Cell* 140, 257–267.
33. Caplan, A.J., Tsai, J., Casey, P.J., and Douglas, M.G. (1992). Farnesylation of YDJ1p is required for function at elevated growth temperatures in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 267, 18890–18895.
34. Cyr, D.M. (1995). Cooperation of the molecular chaperone Ydj1 with specific Hsp70 homologs to suppress protein aggregation. *FEBS Lett.* 359, 129–132.
35. Glover, J.R., and Lindquist, S. (1998). Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* 94, 73–82.
36. Hill, S.M., Hao, X., Liu, B., and Nyström, T. (2014). Life-span extension by a metacaspase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 344, 1389–1392.
37. Bolognesi, A., Sliwa-Gonzalez, A., Prasad, R., and Barral, Y. (2016). Fluorescence recovery after photo-bleaching (FRAP) and fluorescence loss in photo-bleaching (FLIP) experiments to study protein dynamics during budding yeast cell division. *Methods Mol. Biol.* 1369, 25–44.
38. Dobbelaere, J., and Barral, Y. (2004). Spatial coordination of cytokinetic events by compartmentalization of the cell cortex. *Science* 305, 393–396.
39. Summers, D.W., Douglas, P.M., Ren, H.Y., and Cyr, D.M. (2009). The type I Hsp40 Ydj1 utilizes a farnesyl moiety and zinc finger-like region to suppress prion toxicity. *J. Biol. Chem.* 284, 3628–3639.
40. Kushnirov, V.V., Kryndushkin, D.S., Boguta, M., Smirnov, V.N., and Ter-Avanesyan, M.D. (2000). Chaperones that cure yeast artificial [PSI⁺] and their prion-specific effects. *Curr. Biol.* 10, 1443–1446.
41. Tanaka, M., Collins, S.R., Toyama, B.H., and Weissman, J.S. (2006). The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. *Nature* 442, 585–589.
42. Derdowski, A., Sindi, S.S., Klaips, C.L., DiSalvo, S., and Serio, T.R. (2010). A size threshold limits prion transmission and establishes phenotypic diversity. *Science* 330, 680–683.
43. Polymenidou, M., and Cleveland, D.W. (2012). Prion-like spread of protein aggregates in neurodegeneration. *J. Exp. Med.* 209, 889–893.
44. Vilchez, D., Saez, I., and Dillin, A. (2014). The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases. *Nat. Commun.* 5, 5659.
45. March, Z.M., King, O.D., and Shorter, J. (2016). Prion-like domains as epigenetic regulators, scaffolds for subcellular organization, and drivers of neurodegenerative disease. *Brain Res.* 1647, 9–18.
46. Hyman, A.A., Weber, C.A., and Jülicher, F. (2014). Liquid-liquid phase separation in biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 39–58.
47. Alberti, S., and Hyman, A.A. (2016). Are aberrant phase transitions a driver of cellular aging? *BioEssays* 38, 959–968.
48. Tyedmers, J., Mogk, A., and Bukau, B. (2010). Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 777–788.
49. Kakkar, V., Prins, L.C., and Kampinga, H.H. (2012). DNAJ proteins and protein aggregation diseases. *Curr. Top. Med. Chem.* 12, 2479–2490.
50. Denoth-Lippuner, A., Krzyzanowski, M.K., Stober, C., and Barral, Y. (2014). Role of SAGA in the asymmetric segregation of DNA circles during yeast ageing. *eLife* 3, e03790.
51. Hu, Q., Milenkovic, L., Jin, H., Scott, M.P., Nachury, M.V., Spiliotis, E.T., and Nelson, W.J. (2010). A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. *Science* 329, 436–439.
52. Ewers, H., Tada, T., Petersen, J.D., Racz, B., Sheng, M., and Choquet, D. (2014). A septin-dependent diffusion barrier at dendritic spine necks. *PLoS ONE* 9, e113916.

Current Biology, Volume 27

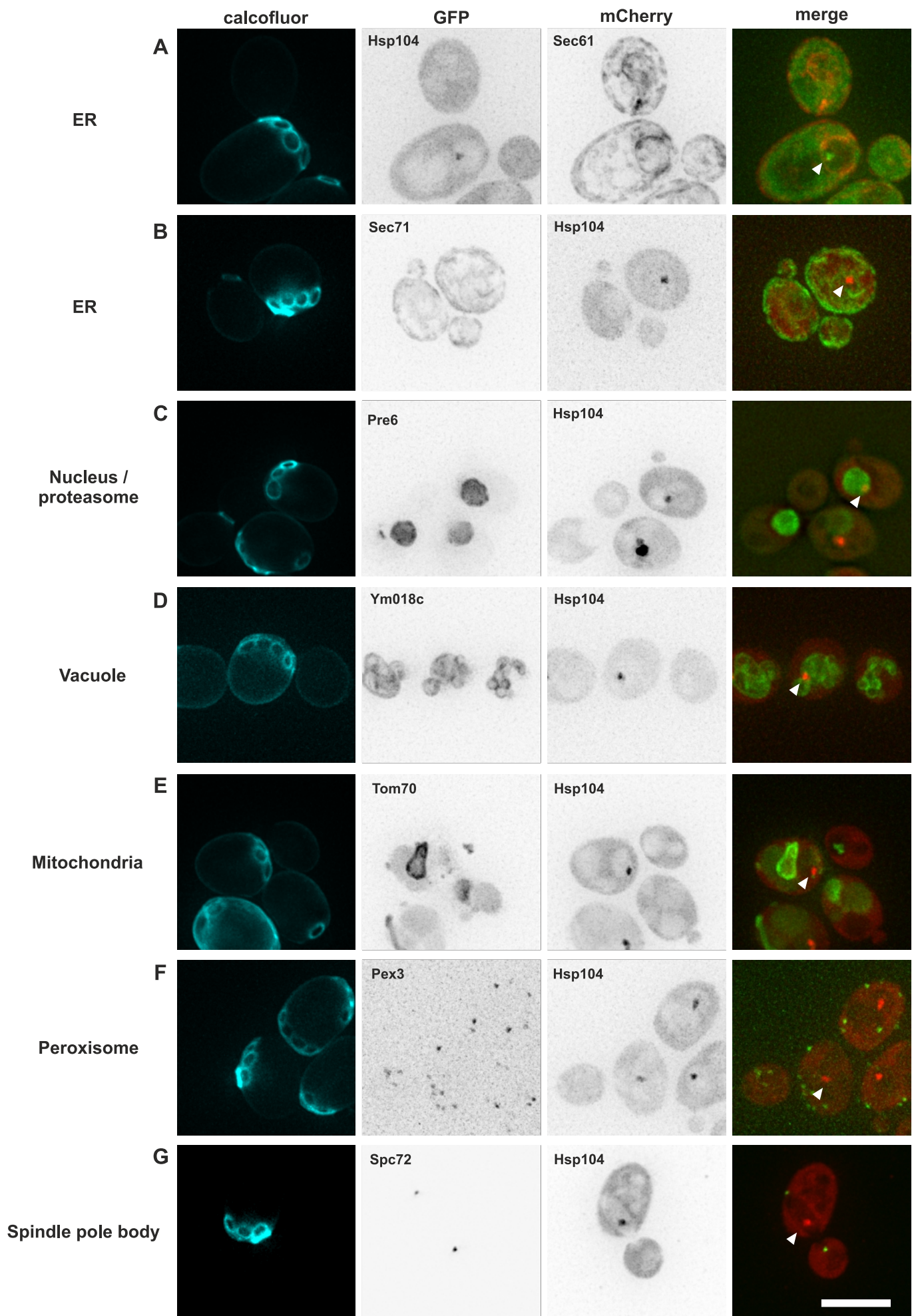
Supplemental Information

Compartmentalization of ER-Bound Chaperone

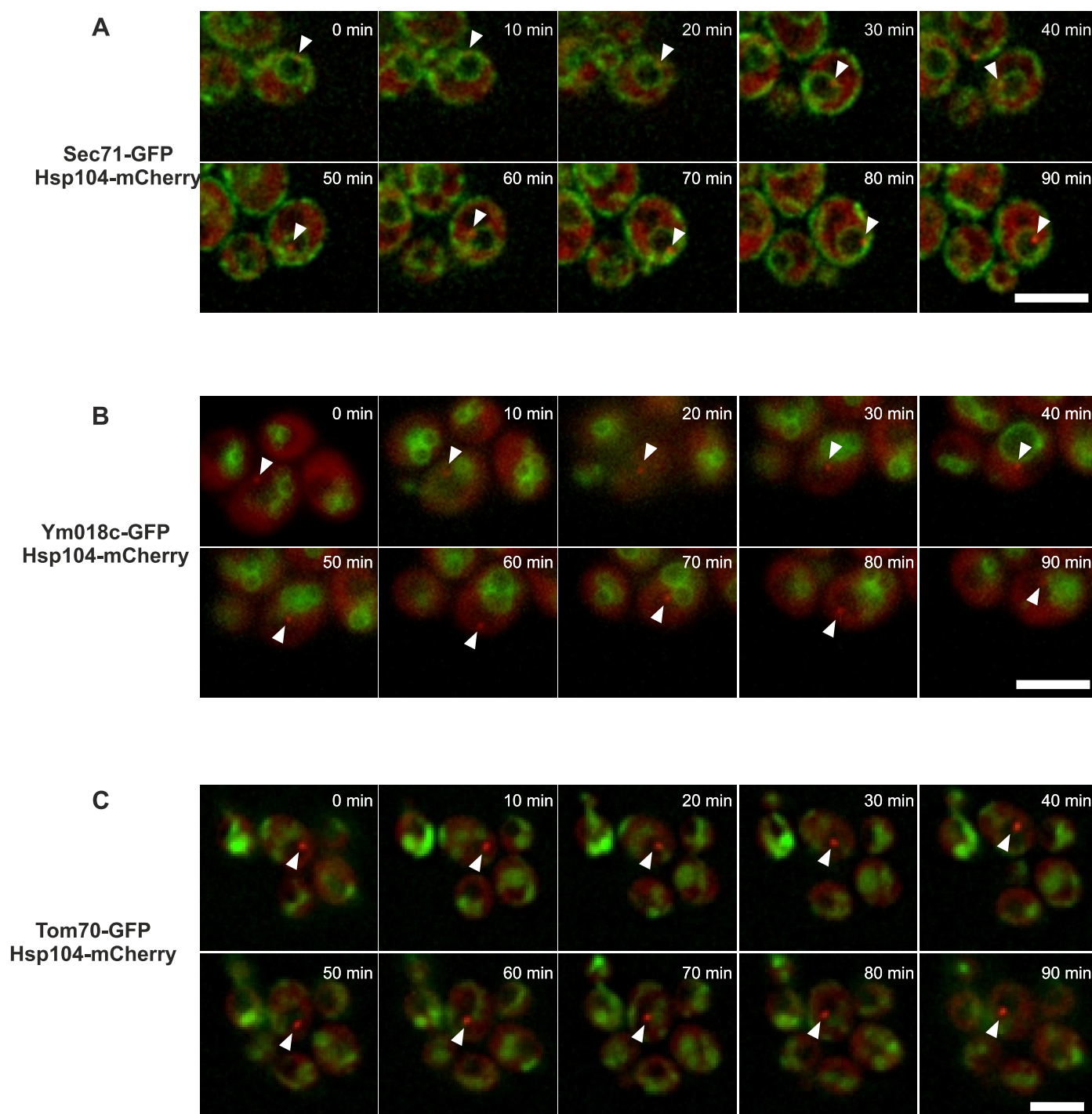
Confines Protein Deposit Formation

to the Aging Yeast Cell

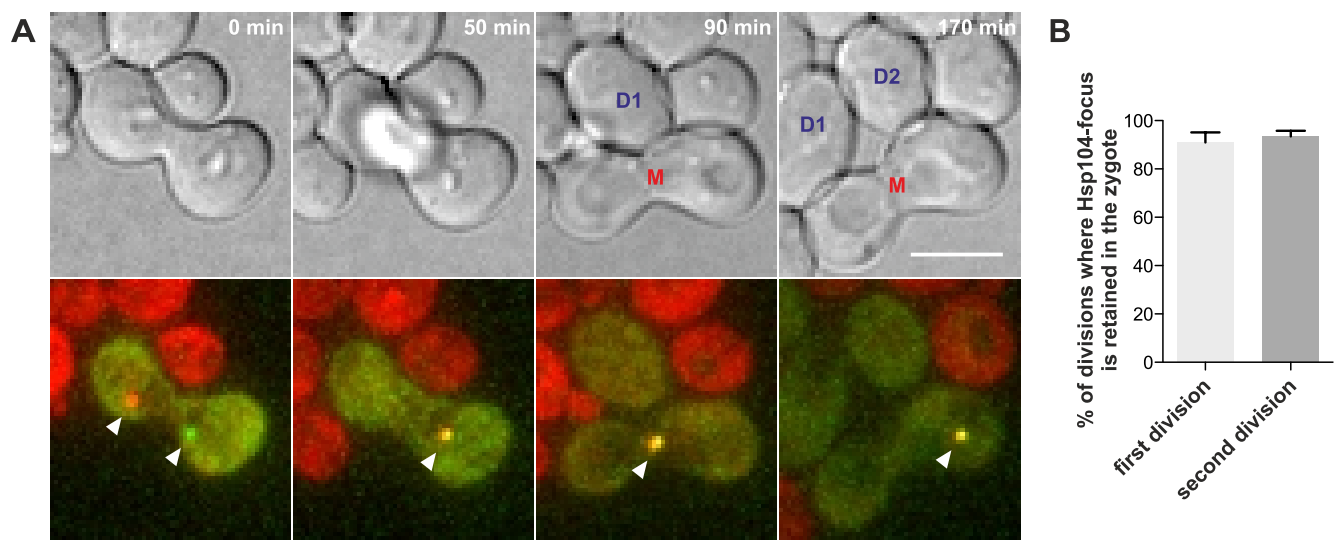
Juha Saarikangas, Fabrice Caudron, Rupali Prasad, David F. Moreno, Alessio Bolognesi, Martí Aldea, and Yves Barral



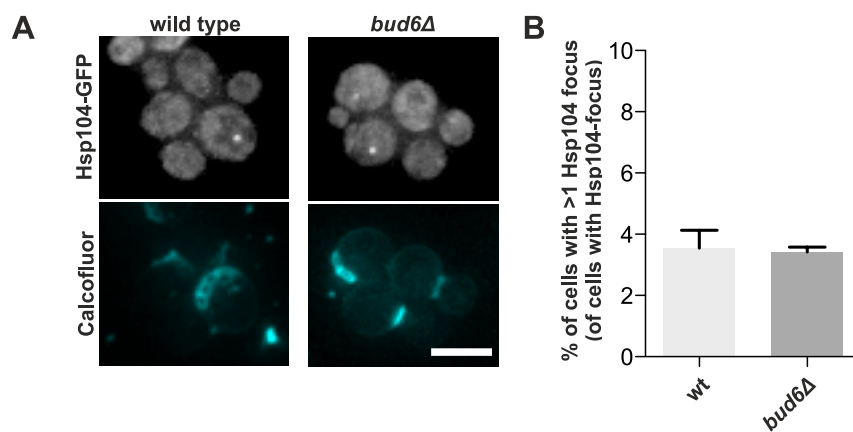
Supplemental Figure 1, Relates to Figure 1. Localization of age-associated deposits in respect to organelles. Representative z-projected images of age-associated protein deposits in 3-6 generation old cells expressing (A) Hsp104-GFP and Sec61-mCherry (ER); (B) Hsp104-mCherry and Sec71-GFP (ER); (C) Pre6-GFP (nucleus/proteasome); (D) Yml018c-GFP (vacuolar membrane); (E) Tom-70-GFP (mitochondria); (F) Pex3-GFP (peroxisome) and (G) Spc72-GFP (spindle pole bodies). Scale bar: 5µm.



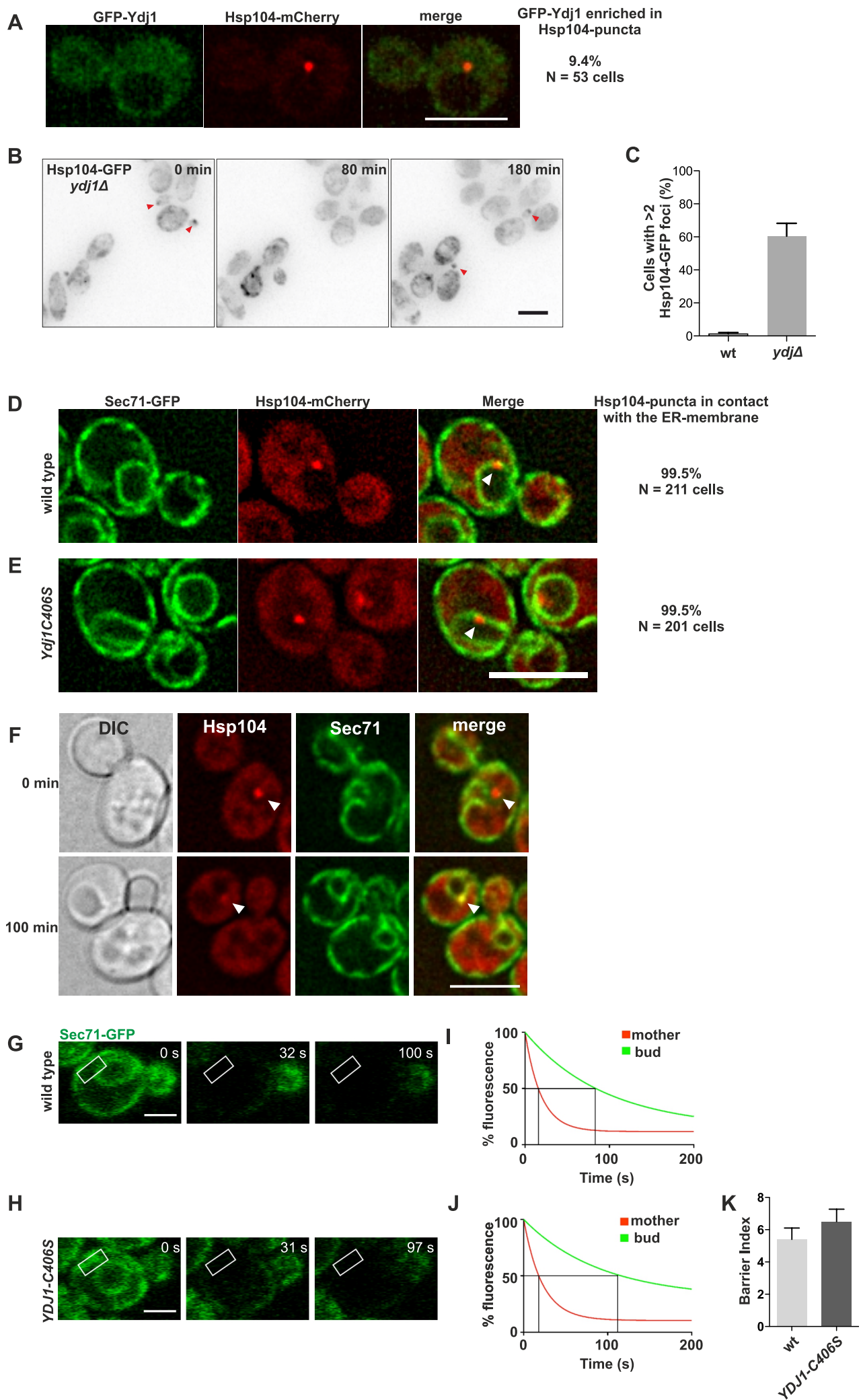
Supplemental Figure 2, Relates to Figure 1. Time lapse analysis of the apposition of Hsp104-labelled deposits with organelles. Individual frames corresponding to the focal plane of the deposit over the course of a cell division of (A) Hsp104-mCherry and Sec71-GFP; (B) Hsp104-mCherry and Ym018c-GFP and (C) Hsp104-mCherry and Tom70-GFP. Scale bars: 5 μ m.



Supplemental Figure 3, Relates to Figure 2. Age-associated deposits are retained in the zygote during cell division. (A) Time lapse images of age-associated protein deposits (arrowheads) in a newly formed zygote. M = zygote, D1 and D2, daughter cells. (B) Percentages of zygotic divisions where the deposit is retained during the first and second division. (N=130-180). Graph displays $\pm$ SEM. Scale bar: 5 μ m.



Supplemental Figure 4, Relates to Figure 3. Downregulation of the diffusion barriers does not lead to deposit fragmentation. (A) Representative images of wild type and *bud6Δ* cells expressing Hsp104-GFP (upper panel) and stained with calcofluor (lower panel). (B) Quantification of the percentage of cells displaying ≥ 2 deposits per cell (of all deposit containing cells). (N=201-348 from three biological replicates). Graph displays mean $\pm$ SEM. Scale bar: 5 μ m.



Supplemental Figure 5, Relates to Figure 4. *YDJ1C406S* mutant cells do not display a barrier defect or obvious disengagement of deposits from the ER membrane. (A) Representative aged mother cell expressing GFP-Ydj1 and Hsp104-mCherry. (B) Representative time-frame images from Hsp104-GFP expressing *ydj1Δ* mutant cells. Arrowheads indicate small deposits entering the bud. (C) Percentage of cells displaying >2 Hsp104 foci N=2 (wt); 3(*ydj1Δ*), 87-251 cells per group. (D-E) Representative images of wild type (D) and *Ydj1-C406S* (E) cells expressing Sec71-GFP and Hsp104-mCherry. (F) Representative time-lapse frames of *YDJ1-C406S* cells expressing Sec71-GFP and Hsp104-mCherry prior to (left) and after (right) the formation of Hsp104-deposit in the daughter cell. (G-H) Representative time frames from the FLIP analysis of Sec71-GFP in wild type and *Ydj1C406S* mutant cells. (I-J) Fluorescence decay over time for the wild type (I) and *Ydj1C406S* (J) are shown. (K) Graph shows Barrier index (BI), indicating the time of 50% fluorescence loss in bud compartment divided by the time of 50% fluorescence loss in mother compartment. Total of 60 cells were analysed per genotype. Mean ± SD. Scale bars: 5μm (A-G; D-F), 2 μm (G-H).

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Yeast strains

Yeast strains were generated as described in [S1] and are listed below.

Strain	Genotype
5644	ade2::hisG his3 leu2 lys2 ura3D0 trp1D63 hoD::SCW11pr-Cre-EBD78-NatMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX Hsp104-GFP:HIS3
5658	ade2::hisG his3 leu2 met15D::ADE2 ura3D0 trp1D63 hoD::SCW11pr-Cre-EBD78-NatMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX Hsp104-mCherry:KanMX
5683	ade2::hisG his3 leu2 met15D::ADE2 ura3D0 trp1D63 hoD::SCW11pr-Cre-EBD78-NatMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX Hsp104-Cherry:KanMX SPC72-GFP:HIS3
5761	ade2::hisG his3 leu2 lys2 ura3D0 trp1D63 hoD::SCW11pr-Cre-EBD78-NatMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX sur2::kanMX Hsp104-GFP:HIS3
5781	ade2::hisG his3 leu2 met15D::ADE2 ura3D0 trp1D63 hoD::SCW11pr-Cre-EBD78-NatMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX Hsp104-Cherry:KanMX Sec61-GFP:HIS3
5791	ade2::hisG his3 leu2 lys2 ura3D0 trp1D63 hoD::SCW11pr-Cre-EBD78-NatMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX bud6::kanMX Hsp104-GFP:HIS3
5792	ade2::hisG his3 leu2 lys2 ura3D0 trp1D63 hoD::SCW11pr-Cre-EBD78-NatMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX bud1::kanMX Hsp104-GFP:HIS3
5812	ade2::hisG his3 leu2 met15D::ADE2 ura3D0 trp1D63 hoD::SCW11pr-Cre-EBD78-NatMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX Pre6-GFP:HIS3 Hsp104-Cherry:KanMX
5840	YML018C-GFP:HIS3 HSP104-Cherry:KanMX ade2::hisG his3 leu2 met15D::ADE2 ura3D0 trp1D63 hoD::SCW11pr-Cre-EBD78-NatMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX
6617	MATa his3D1 leu2D0 met15D0 ura3D0 Ydj1-GFP:HIS
11533	MATa his3D1 leu2D0 met15D0 ura3D0 Pre6-GFP:HIS Hsp104-mCherry:KanMX
11534	MATalpha his3D1 leu2D0 met15D0 ura3D0 Pre6-GFP:HIS Hsp104-Cherry:KanMX
11535	MATa his3D1 leu2D0 met15D0 ura3D0 Pre6-GFP:HIS Hsp104-Cherry:KanMX pre3::NatMX
11536	MATalpha his3D1 leu2D0 met15D0 ura3D0 Pre6-GFP:HIS Hsp104-Cherry:KanMX prm3::NatMX
11538	ade2::hisG his3 leu2 lys2 ura3D0 trp1D63 hoD::SCW11pr-Cre-EBD78-NatMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX Tom70-GFP:HIS3 Hsp104-mCherry:KanMX
11539	ade2::hisG his3 leu2 lys2 ura3D0 trp1D63 hoD::SCW11pr-Cre-EBD78-NatMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX Pex3-GFP:HIS3 Hsp104-mCherry:KanMX
13352	ura3-52 his3Δ200 leu2 lys2-801 trp1Δ63, MET15 Sec71-GFP:HIS3 Hsp104-mCherry:KanMX
13353	ade2::hisG his3 leu2 met15D::ADE2 ura3D0 trp1D63 hoD::SCW11pr-Cre-EBD78-NatMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX Ydj1C406S:TRP Hsp104-GFP:HIS3

13459	ade2::hisG his3 leu2 met15D::ADE2 ura3D0 trp1D63 hoD::SCW11pr-Cre-EBD78-NatMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX Ydj1C406S:TRP sur2::KanMX Hsp104-GFP:HIS3
13460	ade2::hisG his3 leu2 met15D::ADE2 ura3D0 trp1D63 hoD::SCW11pr-Cre-EBD78-NatMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX Ydj1C406S:TRP bud6::KanMX Hsp104-GFP:HIS3
13554	ade2::hisG his3 leu2 met15D::ADE2 ura3D0 trp1D63 hoD::SCW11pr-Cre-EBD78-NatMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX Ydj1_C406S_TRP Sec71-GFP:HIS3 Hsp104-mCherryKanMX
13555	ade2::hisG his3 leu2 met15D::ADE2 ura3D0 trp1D63 hoD::SCW11pr-Cre-EBD78-NatMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX Sec71-GFP:HIS3 Hsp104-mCherryKanMX
13729	his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Ydj1-GFP-FS:HIS3
13775	ade2::hisG his3 leu2 met15D::ADE2 ura3D0 trp1D63 hoD::SCW11pr-Cre-EBD78-NatMX loxP-UBC9-loxP-LEU2 loxP-CDC20-Intron-loxP-HPHMX Ydj1_C406S:TRP Bud6::KANMX Ydj1::C406S:TRP Hsp104-GFP:HIS3
13776	his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 Sec61-mCherry:KanMX Hsp104-GFP:HIS3
14009	his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 Ydj1-GFP-FS:HIS3 Ydj1-GFP-FS:HIS3 sur2::NatMX
14010	leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 S.cer_CYC1ter-hph_dN-SceI-URA3pr-URA3-URA3ter-S.par NOP1pr-sfGFP-Ydj1
14011	leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 S.cer_CYC1ter-hph_dN-SceI-URA3pr-URA3-URA3ter-S.par NOP1pr-sfGFP-Ydj1 sur2::HygMX
14015	leu2-3,-112; his3-11,-15; trp1-1; ura3-1; ade1-4; can1-100, Ydj1::KanMX +pRS304 pGPD GST-UGA-GFP-pest:URA3 pRS315 Ydj1:LEU [RNQ+] [PSI+]
14016	leu2-3,-112; his3-11,-15; trp1-1; ura3-1; ade1-4; can1-100, Ydj1::KanMX +pRS304 pGPD GST-UGA-GFP-pest:URA3 pRS315 Ydj1:LEU [RNQ+] [psi-]
14017	leu2-3,-112; his3-11,-15; trp1-1; ura3-1; ade1-4; can1-100, Ydj1::KanMX +pRS304 pGPD GST-UGA-GFP-pest:URA3 pRS315 Ydj1-C406S:LEU [RNQ+] [PSI+]
14018	leu2-3,-112; his3-11,-15; trp1-1; ura3-1; ade1-4; can1-100, Ydj1::KanMX +pRS304 pGPD GST-UGA-GFP-pest:URA3 pRS315 Ydj1-C406S:LEU [RNQ+] [psi-]
14019	leu2-3,-112; his3-11,-15; trp1-1; ura3-1; ade1-4; can1-100, Ydj1::KanMX +pRS304 pGPD GST-UGA-GFP-pest:URA3 pRS315 Ydj1-L135S:LEU [RNQ+] [PSI+]
14020	leu2-3,-112; his3-11,-15; trp1-1; ura3-1; ade1-4; can1-100, Ydj1::KanMX +pRS304 pGPD GST-UGA-GFP-pest:URA3 pRS315 Ydj1-L135S:LEU [RNQ+] [psi-]
M. Aldea	his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YDJ1-GFP-FS-C406S::HIS3
M. Aldea	his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 TEFp-GFP-NatN2::ura3-0

For the Ydj1 mutagenesis, *TRP1* gene was PCR amplified using oligonucleotides that contained a (1217 G->C) substitution in the overhang *YDJ1*-targeting sequence to change the cysteine 406 into serine. The cassette amplification and transformation into yeast cells was done as described in [S2] and the correct targeting was validated by sequencing.

Cell culturing and preparation

For imaging, cells were cultured at 30°C in YPD media and prepared for imaging (performed in synthetic complete media) as described in [S1]. For the mating experiments, cells (1.85×10^7) of opposite mating types were centrifuged 500g for 5 minutes and re-suspended in 40 μ l SC media, mixed and immediately imaged with 10min intervals. To obtain aged cells, cells were biotinylated with Sulfo-NHS-LC biotin (Pierce), grown for the desired period in YPD, incubated with uMACS Streptavidin microbeads (Miltenyi Biotec) and affinity purified with the MACS separation column. For aging periods >8 hrs, the mother enrichment program was used [S3]. For analysis of replicative age, bud scars were stained with 5 μ g/ml Calcofluor White (Fluorescece Brightner 28, F3543, Sigma). For structured illumination microscopy, cells were fixed in 4 % paraformaldehyde for 15

min, washed once in 100mM potassium phosphate buffer containing 1,2M sorbitol and stored in this buffer in a light-sealed environment at 4°C. Prior to imaging, cells were placed in Vectashield antifade mounting media (H1000, Vector), mounted between a #1.5 high precision coverslip (Marienfeld Superior) and an objective slide and (Marienfeld Superior) and sealed with nail polish.

FLIP experiment was performed as described in [S4, S5]. Briefly, cells were grown at 30°C on YPD for 12-16 hours prior to imaging, and immobilized on a 2% agar pad containing synthetic non-fluorescent medium.

Image analyses

All image analyses were performed with Image J (Fiji) software as described in [S1]. The quantification of age-associated deposit (Hsp104-labelled focus) inheritance in Figures 1 and 4 was performed from mother cells with a single deposit that were imaged every 10-15 minutes. For appearance of deposits in the daughter cells, only those cells that were born without a deposit but formed an deposit that was present until the completion of the first division were counted. The co-localization with the organelles was quantified by examining all the z-planes where the deposit (bright Hsp104 focus) was detected. Deposits that displayed overlapping or adjacent localization with the organelle markers were scored as co-localizing structures.

For the FLIP quantification, the total integrated fluorescent density in the entire the mother and bud was quantified. After subtracting background, the fluorescent signal of the mother and bud were normalized to the mean of five neighboring control cells and set to 100% at the beginning of the experiment. All experiments were pooled and analyzed using Prism 5b to fit a one-phase decay curve constraining the first bleaching point to 100%. The barrier index was defined as the ratio of the times needed to lose 50% of the initial fluorescent signal in the bud over the mother compartment.

Fluorescence correlation spectroscopy

Quantitative analysis of Ydj1-GFP diffusion by FCS was performed essentially as described [S6]. Specifically, cells were prebleached to attain count rates within the 100-500 kHz range during acquisition for periods of 5 sec. Correlation data were fitted in the 10 μ sec to 100 msec range of time intervals with the aid of ImageJ plugins developed by Jay Unruh (Stowers Institute for Medical Research, Kansas City, MO) to obtain diffusion coefficients. Duplicate measurements were always taken and outliers were removed from analysis if the relative standard error of the fitted coefficient of diffusion was higher than 50%, or the fitted autocorrelation intersect was higher than 1.01 as a result of strong perturbations in the average count rate during acquisition.

Flow cytometry

For the stop codon read through experiments, *ydj1Δ* [*PSI+*] and [*psi-*] cells expressing PRS315- *YDJI*, *YDJI-C406S* or *YDJI-L135S* [S7] and chromosomally integrated pGPD GST-UGA-GFP-pest [S8] were grown in SC-leu media. The GFP fluorescence intensity was measured with a BD Accuri C6 Flow Cytometer using 488 nm laser and 533/30 BD filter for 100 000 cells/ clone (3 clones each). The data was analyzed using FlowJo software (FlowJo LLC).

SUPPLEMENTAL REFERENCES

- S1. Saarikangas, J., and Barral, Y. (2015). Protein aggregates are associated with replicative aging without compromising protein quality control. *eLife* 4.
- S2. Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., et al. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21, 947-962.
- S3. Lindstrom, D.L., and Gottschling, D.E. (2009). The mother enrichment program: a genetic system for facile replicative life span analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 183, 413-422, 411SI-413SI.
- S4. Bolognesi, A., Sliwa-Gonzalez, A., Prasad, R., and Barral, Y. (2016). Fluorescence Recovery After Photo-Bleaching (FRAP) and Fluorescence Loss in Photo-Bleaching (FLIP) Experiments to Study Protein Dynamics During Budding Yeast Cell Division. *Methods Mol Biol* 1369, 25-44.
- S5. Clay, L., Caudron, F., Denoth-Lippuner, A., Boettcher, B., Buvelot Frei, S., Snapp, E.L., and Barral, Y. (2014). A sphingolipid-dependent diffusion barrier confines ER stress to the yeast mother cell. *eLife* 3, e01883.
- S6. Slaughter, B.D., Schwartz, J.W., and Li, R. (2007). Mapping dynamic protein interactions in MAP kinase signaling using live-cell fluorescence fluctuation spectroscopy and imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 20320-20325.

- S7. Summers, D.W., Douglas, P.M., Ren, H.Y., and Cyr, D.M. (2009). The type I Hsp40 Ydj1 utilizes a farnesyl moiety and zinc finger-like region to suppress prion toxicity. *J Biol Chem* *284*, 3628-3639.
- S8. Derdowski, A., Sindi, S.S., Klaips, C.L., DiSalvo, S., and Serio, T.R. (2010). A size threshold limits prion transmission and establishes phenotypic diversity. *Science* *330*, 680-683.

Competition for chaperones as a mechanism to adjust cell size to growth rate

David F. Moreno^{1,*}, Eva Parisi^{1,*}, Galal Yahya^{1,2,*}, Federico Vaggi³, Attila Csikász-Nagy^{4,5,†} & Martí Aldea^{1,6,†}

¹ Molecular Biology Institute of Barcelona (IBMB), CSIC, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

² Department of Microbiology and Immunology, Zagazig University, Zagazig, Egypt

³ Department of Informatics, Ecole Normale Supérieure, INRIA, Sierra Team, Paris Cedex 05, France

⁴ Randall Division of Cell and Molecular Biophysics and Institute of Mathematical and Molecular Biomedicine, King's College London, London SE1 1UL, UK

⁵ Pázmány Péter Catholic University, Faculty of Information Technology and Bionics, 1083 Budapest, Hungary

⁶ Department of Basic Sciences, Universitat Internacional de Catalunya, 08195 Sant Cugat del Vallès, Spain

* These authors contributed equally to this work

† Corresponding authors: attila.csikasz-nagy@kcl.ac.uk and marti.aldea@ibmb.csic.es

Abstract

The precise coordination of growth and proliferation has a universal prevalence in cell size homeostasis. Bacterial, yeast and mammalian cells modulate their size as a function of growth rate, but the underlying molecular mechanisms are largely unknown. Here we show that multifunctional chaperone systems play a concerted and limiting role in cell cycle entry, specifically driving nuclear accumulation of the G1 Cdk-cyclin complex. Based on these findings, we establish and test a molecular competition model that explains cell size dependence on growth rate. As key predictions at a single-cell level, we found that availability of the Ydj1 chaperone and nuclear accumulation of the G1 cyclin Cln3 are inversely dependent on growth rate and readily respond to conditions that alter protein synthesis and folding. Thus, chaperone availability would subordinate Start to the biosynthetic machinery and dynamically adjust the critical size to the growth potential of the cell.

Introduction

Under unperturbed conditions of growth cells maintain their size within constant limits. In addition, nutrients and trophic factors are potent modulators of cell size, and cells use different pathways to stimulate growth and proliferation as a function of these environmental signals¹⁻⁴. Cell growth is dictated by many environmental factors in budding yeast, one of the most important being nutrient availability, and the rate at which cells grow has profound effects on their size. In the presence of high levels of rich nutrients, cells maintain high rates of macromolecular synthesis in order to promote growth and increase their size. Conversely, limiting nutritional conditions restrain protein synthesis, limit macromolecular turnover and reduce cell size. This behavior is nearly universal and it has been well characterized in bacteria⁵, yeast^{6,7}, diatoms⁸, and mammalian cells of different origins when analyzed under different trophic or nutritional conditions supporting different growth rates⁹⁻¹⁴. A current view on these nutritional shift-up and shift-down experiments sustains that cell cycle and cell growth machineries should be deeply interconnected to ensure cell size homeostasis and adaptation, but the causal molecular mechanism is still poorly understood¹⁵.

In budding yeast, cyclin Cln3 is the most upstream activator of Start¹⁶⁻¹⁹, where a transcriptional wave driven by SBF (Swi6-Swi4) and MBF (Mbp1-Swi6) induce the expression of ca. two hundred genes to trigger cell cycle entry^{20,21}. Cyclin Cln3 forms a complex with Cdc28, the cell cycle Cdk in budding yeast, which phosphorylates Whi5 (and presumably Swi6) to activate SBF and MBF-dependent transcription^{22,23}. Two other G1 cyclins, Cln1 and Cln2, are under the control of SBF and create a positive feedback loop that provides Start with robustness and irreversibility^{24,25}. The core of the Start network is exquisitely conserved at the onset of the mammalian cell cycle, where Cdk4,6-cyclin D complexes phosphorylate RB and activate E2F-DP transcription factors in a positive feedback loop involving Cdk2-cyclin E²⁶.

Cell size displays the lowest variability at Start compared to other cell cycle transitions, which lead to the proposal that cells have to attain a critical size as a prerequisite for Start²⁷. On the other hand, alteration of key molecules of the Start network has prominent effects on cell size²⁸. Particularly, Cln3 and Whi5 modulate cell size in a precise dose-dependent manner, and they have been proposed as key size molecules. Whi5, which is synthesized during the previous cycle independently of cell mass, is diluted by growth in G1 until a threshold is reached²⁹. On the other hand, as they are intrinsically unstable, G1 cyclins are thought to transmit growth information for adapting cell size to environmental conditions. The Cln3 cyclin is a dose-dependent activator of Start^{16,18,30} that is present at low but nearly constant

levels throughout G1¹⁹. Nuclear accumulation of Cln3 is driven by a constitutive C-terminal NLS^{31,32}, but requires the participation of Hsp70-Hsp40 chaperones, namely Ssa1,2 and Ydj1³³. In addition, Ydj1 also regulates Cln3 stability³⁴, and plays an essential role in setting the critical size as a function of growth rate³⁵. In mammalian cells cyclin D1 depends on Hsp70 chaperone activity to form trimeric complexes with Cdk4 and NLS-containing KIP proteins (p21, p27, p57) that drive their nuclear accumulation³⁶. Despite these data we do not understand yet how chaperones might affect the critical cell size.

Molecular chaperones assist nascent proteins in acquiring their native conformation and prevent their aggregation by constraining non-productive interactions. These specialized folding factors also guide protein transport across membranes and modulate protein complex formation by controlling conformational changes³⁷. Chaperones are involved in most growth-related cellular processes and many chaperone-client proteins have crucial roles in the control of growth, cell division, environmental adaptation and development. Thus, since chaperones required for Cdk-cyclin activation are also involved in the vast majority of processes underlying cell growth, we hypothesized that competition for shared multifunctional chaperones could subordinate entry into the cell cycle to the biosynthetic machinery of the cell.

Here we show that chaperones play a concerted and limiting role in cell cycle entry, specifically driving nuclear accumulation of the G1 Cdk-cyclin complex. Ydj1 availability is inversely dependent on growth rate and, based on our findings, we have established a molecular competition model that explains cell size dependence on growth rate. As key predictions of the model, we show that nuclear accumulation of the G1 cyclin Cln3 is negatively affected by growth rate in a chaperone-dependent manner, and rapidly responds to conditions that perturb or boost chaperone activity. Thus chaperone availability would act as a G1-Cdk modulator transmitting both intrinsic and extrinsic information to adjust the critical size to the growth potential of the cell.

Results

Whi5 dilution during G1 passively follows growth-rate dependent kinetics

We had previously found that integrity of the Start network is essential for setting the critical size as a function of growth rate³⁵. In particular, cells lacking both negative (Whi5) and positive (Cln3) factors of Start fully uncoupled cell size control from growth rate. More recently, Whi5 has been shown to constitute a key element in the sizer mechanism of budding yeast. Whi5 is mainly synthesized in the G2-M phases of the previous cycle in a size-independent manner, and becomes diluted in the subsequent G1

phase of the daughter cell until a threshold is reached²⁹. Thus, to test whether growth rate modulates the critical size by adjusting Whi5 levels we decided to analyze Whi5 kinetics during G1 progression as a function of growth rate in individual cells. After careful measurement of nuclear and cytoplasmic fluorescence levels (Supplementary Fig. 1a,b) we observed that, while Cdc28-GFP levels stayed constant, cellular Whi5-mCherry concentration steadily decreased during G1 progression as described²⁹, and reached minimum values after complete nuclear export at Start²² (Supplementary Fig. 1c,d). However, by comparing groups of cells growing in G1 at different rates under the same experimental conditions, we observed that the Whi5 dilution rate was larger in cells growing faster (Fig. 1a). By plotting the Whi5 dilution rate as a function of the volume growth rate at a single-cell level we obtained a strong ($p < 10^{-4}$) positive correlation (Fig. 1b). These results would be expected if growth rate only determined the slope with which Whi5 is diluted in G1 and did not modulate synthesis (and/or degradation) of Whi5 in the previous cycle. Consistent with this notion, we found that Whi5 levels both in early G1 and Start did not change much as a function of growth rate (Fig. 1c). Finally, nuclear levels of Cdc28-GFP at Start were also constant independently of growth rate (Fig. 1d; Supplementary Fig. 1e), which supports the idea that the Whi5 inhibitor is not actively modulated by growth-rate dependent processes, and points to the G1 Cdk as a likely target in the mechanisms that coordinate growth rate and proliferation.

Nuclear accumulation of the G1 Cdk depends on chaperone activity

Cln3 contains a bipartite nuclear localization signal at its C terminus that is essential for setting cell size at Start^{31,32}, and we had found that the Ydj1 chaperone is important for nuclear accumulation of Cln3³³ and for setting the critical size as a function of growth rate³⁵. Thus, we decided to characterize the role of chaperones as regulators of the G1 Cdk during G1 progression at a single-cell level. Cln3 is too short-lived to be detected as a fluorescent-protein fusion in single cells unless stabilized mutants are used^{29,38}. As previously described, mCitrine-Cln3-11A displayed a distinct nuclear signal in most asynchronously growing cells. However, while overall levels as determined by immunoblotting were not altered, nuclear mCitrine-Cln3-11A levels strongly decreased in Ydj1-deficient cells (Fig. 2a-c), which confirmed previous observations obtained on 3HA-tagged wild-type Cln3 by immunofluorescence^{33,39}. Moreover, while nuclear levels of Cdc28-GFP in late G1 cells were also negatively affected by the *ydj1* deletion, overexpression of both Ydj1 and Ssa1 significantly increased the nuclear to cytoplasmic ratio of Cdc28-GFP both in mid- and late-G1 cells (Fig. 2d). Likely due to the fact that Cdc28 is present at much higher levels than Cln3^{19,40} differences in the steady-state nuclear levels of Cdc28 when comparing wild-type and Ydj1-deficient or overexpressing cells were only modest (Fig. 2d). Thus, we decided to analyze

directly the import kinetics of Cdc28-GFP by nuclear FLIP (Fig. 2e; Supplementary Fig. 2a,b). We found that, while being extremely dependent on Cln3 (Fig. 2f-h), the nuclear import rate of Cdc28-GFP decreased in Ydj1-deficient cells and was clearly impaired when chaperone function was compromised by azetidine 2-carboxylic acid (AZC, Fig. 2h), a proline analog that interferes with proper protein folding⁴¹. These data are consistent with a chaperone-dependent mechanism that drives nuclear import of the Cdc28-Cln3 complex in G1 for the timely execution of Start, reinforcing the notion that cells integrate signals on both the G1 Cdk and the Whi5 inhibitor when entering the cell cycle³⁸.

Multifunctional chaperones have a limiting role in setting cell size at budding

If chaperones have a role in coordinating cell growth and Start machineries, chaperone availability ought to be limiting for cell cycle entry. Thus, we decided to test this proposition by increasing the gene dosage of different chaperone sets in low-copy centromeric vectors. In addition to the Hsp70 system (Ssa1 and Ydj1), we analyzed the effects of key components of the Hsp90 system (Hsc82 and Cdc37), which is important for holding the Cdk in a productive conformation for binding cyclins⁴², and the segregase Cdc48 system (Cdc48, Ufd1, and Npl4), which associates to G1 cyclins⁴³ and plays a role in G1 progression and cell cycle entry^{44,45}. We found that increasing chaperone gene dosage caused an additive reduction of the budding volume in asynchronous cultures (Fig. 3a) and newborn daughter cells (Fig. 3b). This effect was barely observed in large cells deficient for Cln3 (Fig. 3b), and was totally abolished in cells lacking Cln3 as well as Whi5 and Stb1, two key inhibitors of the Start network. This triple mutant displays unaltered average budding volume but has lost the dependency on growth rate³⁵. However, the effect was still clear in cells lacking Whi7, an inhibitor of Start that acts at an upstream step⁴⁶. Finally, we observed a comparable reduction of the budding volume when genes of the three chaperone systems were duplicated together in an artificial chromosome (Fig. 3c).

Molecular competition for chaperones predicts nuclear Cln3 dependency on growth rate

As they are associated with client proteins mostly in a transient manner, the level of free chaperones should be inversely dependent on protein synthesis and trafficking rates, thus constituting a simple mechanism to report growth rate to the Start network. To test this notion, we developed a mathematical model (Fig. 4a) wherein protein synthesis and G1 Cdk-cyclin complex assembly compete for limiting amounts of Ydj1, the best characterized chaperone in terms of regulating Cln3^{33,34}. Although the specific affinity of Ydj1 for the various Cln3 domains was similar to other proteins (Supplementary Fig. 3), the

number of client proteins being synthesized at any given time is in overwhelming excess relative to those of Ydj1⁴⁷ and especially of Cln3, which is present at very low levels^{19,40,48}.

In our model, the level of available, unbound Ydj1 (Ydj1_A) is a key parameter and, since client-engaged chaperones offer a reduced mobility^{49,50}, we decided to use FLIP and FCS to obtain a mobility index of fully functional Ydj1 and Ssa1 fusions as reporter of their availability in single cells. First we tested this methodological approach by compromising chaperone function with AZC, which induces misfolded protein accumulation with chaperones into disperse cellular aggregates⁵¹, thus reducing levels of soluble available chaperones. While GFP mobility remained unaffected by AZC treatment, both Ssa1 and Ydj1 fusions to GFP decreased their mobility upon AZC treatment (Fig. 4b; Supplementary Fig. 4a-c). Next, with the purpose of perturbing the system in the opposite direction, we used sublethal doses of cycloheximide (CHX) that do not trigger stress gene activation (see Methods), to decrease protein synthesis and relieve chaperones temporarily from the load of nascent polypeptides. As expected, CHX increased the rate at which heat-treated luciferase was renatured and became active in cell-free extracts (Fig. 4d) and, more important, it also increased the average diffusion coefficient of Ydj1-GFP as measured by FCS (Fig. 4e; Supplementary Fig. 4d,e) and FLIP (Fig. 4f), thus supporting mobility as a proxy of the availability of chaperones.

Perturbations of chaperone availability should in turn have an effect in the nuclear accumulation of Cln3. We found that relative nuclear levels of Cln3-3HA decreased sharply after AZC addition (Fig. 4c). Since *CLN1,2* transcription depends on Cln3 activity, these findings would explain why expression of these two genes is repressed in the presence of AZC⁴¹. On the other hand, sublethal doses of CHX caused the opposite effect, namely a Ydj1-dependent rapid increase of the relative nuclear levels of Cln3-3HA (Fig. 4g), which decreased at later times due to the intrinsic instability of Cln3. These data support the notion that overall chaperone availability influences the rate at which the G1 Cdk-cyclin complex is properly formed to accumulate in the nucleus.

Growth rate modulates chaperone availability and nuclear accumulation of Cln3 in G1

The molecular competition model predicted that increasing growth rate would decrease available levels of chaperones (Ydj1_A) and, hence, decrease the steady-state level of folded free Cln3 (Cln3_F) in the nucleus (Fig. 5a,b). Conversely, a decrease in growth rate would rapidly relieve chaperones from client protein load and, as a consequence, would boost release of folded Cln3 to be imported in the nucleus by its own NLS. Individual genetically-identical cells display a large variability in multifactorial processes such

as gene expression and growth^{35,52} and we reasoned that, if the molecular competition model is correct, endogenous variability in growth rate should have an effect on nuclear Cln3 (and on chaperone availability) at the single-cell level. We found that Ydj1-GFP diffusion was correlated negatively with growth rate in single G1 cells by both FCS (Fig. 5c) and FLIP (Supplementary Fig. 5a) analysis, and at a population level in media sustaining different growth rates (Supplementary Fig. 5b). Moreover, whereas the total concentration of mCitrine-Cln3-11A in G1 remained unaltered on average at different growth rates (Supplementary Fig. 5c), nuclear levels of mCitrine-Cln3-11A displayed a strong negative correlation ($p=2.10^{-4}$) with growth rate in cells of similar volume (Fig. 5d). Notably, this negative correlation was totally lost in Ydj1-deficient cells (Fig. 5d). Assuming that Start is executed when the cell reaches a fixed Cln3 to Whi5 ratio in the nucleus^{29,38}, these results provide a straightforward explanation for the growth-rate dependence of the critical size. The chaperone-competition model perfectly fitted the dependence of Ydj1 availability on growth rate (Fig. 5c) and, more important, it also simulated very closely the increase of the budding volume with growth rate³⁵ (Fig. 5e). Interestingly, the competition model produced acceptable fits with parameters spanning several orders of magnitude (Fig. 5b), which underlines the robustness of the chaperone competition design in predicting growth-rate dependent chaperone availability and cell size. In summary, our experimental results and modeling simulations support the notion that levels of available chaperones would be sufficient for setting the critical size as a function of growth rate.

Discussion

Our data show that multifunctional chaperone systems play a limiting role in driving nuclear accumulation of the Cdc28-Cln3 complex during G1 progression. We also show that increased growth rates, by allocating higher levels of chaperones to protein synthesis and transport, reduce free chaperone pools that, in turn, restrain nuclear accumulation of the G1 cyclin Cln3 and delay cell cycle entry until a larger cell size is attained. If Cln3 has to reach a threshold concentration set by Whi5 in the nucleus to execute Start^{29,38}, fast growing cells would need to grow larger to attain the same pool of free chaperones and, as a consequence, the critical size would be set as a function of growth rate. Due to the close molecular connection proposed here between protein synthesis and folding/release of the G1 cyclin, our model would allow cells to quickly adjust their size to many different intrinsic and extrinsic signals as long as they modulate protein synthesis, making the existence of dedicated pathways linking a plethora of different nutrients and/or trophic factors to the Start network unnecessary. This view would

also explain, at least in part, why deleterious mutations in nutrient sensing pathways that control ribosome biogenesis and cell growth cause a small cell size phenotype^{53–56}. A recent comprehensive analysis of cell size mutants concluded that, in the majority of *whi* mutants, the small cell size was due to indirect effects mostly caused by a decrease in growth rate⁵⁷.

The chaperone competition mechanism would only operate above a minimal translation rate to sustain G1-cyclin synthesis⁵⁸, and it would act independently of specific pathways regulating G1-cyclin expression under sudden alterations of essential nutrients^{48,55,56,59}. In this respect, Cln3 synthesis is strongly downregulated at low growth rates by a uORF-dependent mechanism⁶⁰, and shifting cells from poor to rich carbon sources increases Cln3 abundance but yet delays Start in terms of cell size^{56,61,62}. Moreover, nutrient modulation appears to be independent of the core components of the Start network⁵⁴. From this point of view, modulation of the critical cell size threshold by nutrients and growth rate has remained a mysterious issue during decades^{7,61,63}. Our findings provide a general mechanism to modulate cell size as a function of growth rate. The model correctly predicts that when cells are shifted to a rich carbon source, the faster growth rate compromises chaperone availability and hinders nuclear accumulation of Cln3, which delays execution of Start until enough chaperones are produced by growth (Fig. 6). Since shifting cells to faster growing conditions compromises Cln3 activity, it should also delay SBF activation as previously observed^{55,56}. On the opposite side, chaperone demands quickly drop after a nutritional shift-down, enabling the efficient folding and release of Cln3 at a smaller cell size (Fig. 6).

Cells deficient for Cln3 still maintain a growth-rate dependent size at Start, but with a much larger variability compared to wild type cells⁴⁶. Cln1 and Cln2 become essential in the absence of Cln3, and cells lacking these two other G1 cyclins also display a wider range of sizes at Start as a function of growth rate. Moreover, the *CLN2* mRNA has also been found enriched in Whi3 pulldowns^{64,65}, suggesting that the chaperone competition mechanism would also apply to Cln2, particularly in the absence of Cln3.

Our data indicate that Whi5 levels are not modulated by growth rate. Thus, while Whi5 acts as an inherent sizer²⁹, chaperone availability would dynamically transmit growth rate information to modulate G1 Cdk activation and adjust the critical size as a function of the individual growth potential (Fig. 6).

Free chaperone levels could also report growth capability to other processes controlled by growth rate⁶⁶ through similar competition settings. Furthermore, imposing a high level of free chaperones as a requirement for Start would ensure their availability in highly-demanding downstream processes such as polarized growth for bud emergence or nucleosome remodeling during replication.

Methods

Strain constructions. Yeast parental strains and methods used for chromosomal gene transplacement and PCR-based directed mutagenesis have been described^{35,39,48}. Unless stated otherwise, all gene fusions in this study were expressed at endogenous levels at their respective loci. As C-terminal fusions of GFP or other tags has strong deleterious effects on Ydj1 function⁶⁷, we inserted GFP at amino acid 387, between the dimerization domain and the C-terminal farnesylation sequence of Ydj1. This construct had no detectable effects on growth rate or cell volume when expressed at endogenous levels. C-terminal fusions of GFP to Cdc28⁶⁸ or Ssa1⁶⁹ and mCherry to Whi5²⁹ or Htb2²⁴ have been previously characterized. The Cln3-3HA fusion fully complements *cln3* cells¹⁹. The mCitrine-Cln3-11A fusion protein contains a hypoactive and hyperstable cyclin with 11 amino acid substitutions (R108A, T420A, S449A, T455A, S462A, S464A, S468A, T478A, S514A, T517A, T520A) that allows its detection by fluorescence microscopy with no gross effects on cell cycle progression²⁹. Centromeric plasmids and yeast artificial chromosomes containing chaperone genes were obtained by multiple-fragment recombination in yeast cells as described⁷⁰.

Growth conditions. Cells were grown under exponential conditions for 7-8 generations in SC medium with 2% glucose at 30°C before microscopy unless stated otherwise. Other carbon sources used were 2% galactose, 2% raffinose and 3% ethanol. GAL1p-driven gene expression was induced by addition of 2% galactose to cultures grown in 2% raffinose at OD₆₀₀=0.5. When stated, 10 µM β-estradiol was used to induce the GAL1 promoter in strains expressing the Gal4-hER-VP16 (GEV) transactivator⁷¹. Where indicated, azetidine 2-carboxylic acid (AZC) was used at 10 mM, and cycloheximide was added at a sublethal dose of 200 ng/ml that does not trigger stress gene activation^{72,73}. Small newly-born cells were isolated from Ficoll gradients⁷⁴.

Time-lapse microscopy. Cells were analyzed by time-lapse microscopy in 35-mm glass-bottom culture dishes (GWST-3522, WillCo) in SC-based media at 30°C essentially as described³⁵ using a fully-motorized Leica AF7000 microscope. Time-lapse images were analyzed with the aid of BudJ³⁵, an ImageJ (Wayne Rasband, NIH) plugin that can be obtained from www.ibmb.csic.es/home/maldea to obtain cell dimensions and fluorescence data. Volume growth rate in G1 were obtained as described³⁵. Start was estimated at a single-cell level as the time where the nuclear to cytoplasmic ratio of Whi5 had decreased below 1.5. Photobleaching during acquisition was negligible (less than 0.1% per time point) and background autofluorescence was always subtracted.

Determination of nuclear and cellular concentrations of fluorescent fusion proteins. Wide-field microscopy is able to collect the total fluorescence emitted by yeast cells⁷⁵ and, consequently, cellular concentration of fluorescent fusion proteins was obtained by dividing the integrated fluorescence signal within the projected area of the cell by its volume. Regarding the quantification of nuclear levels, since the signal in the nuclear projected area is influenced by both nuclear and cytoplasmic fluorescence, determination of the nuclear concentration required specific calculations as described in Supplementary Fig 1a. In confocal microscopy the fluorescence signal is directly proportional to the concentration of the fluorescent fusion protein, and required no further calculations. The nuclear compartment was delimited as described³⁵. Briefly, the gravity center from brightest pixels in the cell was used as center of a projected circle with area equal to that expected for the nucleus (17% of the cell projected area)⁷⁶. In some experiments (Fig. 2e-h), the nuclear compartment was delimited by means of histone Htb2 fused to mCherry.

Chaperone mobility analysis by FLIP and FCS. As the level of availability of chaperones has been shown to be a function of their intracellular mobility⁴⁹, we used fluorescence loss in photobleaching (FLIP) or fluorescence correlation spectroscopy (FCS) to analyze chaperone mobility in a Zeiss LSM780 confocal microscope. FLIP was used as a qualitative assay to determine overall Ssa1-GFP and Ydj1-GFP chaperone mobility. A small circular region of the cytoplasm ($3.6 \mu\text{m}^2$) was repetitively photobleached at full laser power while the cell was imaged with low intensity light every 0.5 sec to record fluorescence loss. Quantitative analysis of Ydj1-GFP diffusion by FCS was performed essentially as described⁷⁷. Specifically, FCS analysis was done at 25°C to minimize signal variability in the 0.1-1 sec range, and cells were prebleached to attain count rates within the 50-100 kHz range during acquisition for periods of 5 sec. After background subtraction, fluorescence data from an unbleached cell region were made relative to the initial time point in FLIP experiments, and a mobility index was calculated as the inverse of the fluorescence half-life obtained by fitting an exponential function to fluorescence emitted as a function of time. FCS correlation data were fitted in the 10 μsec to 100 msec range of time intervals with the aid of QuickFit 3 (<http://www.dkfz.de/Macromol/quickfit/>), assuming a 1-component anomalous mode of diffusion ($\alpha=0.5$) in the Levenberg-Marquardt algorithm to obtain diffusion coefficients. Duplicate measurements were always taken and outliers were removed from analysis if the relative standard error of the fitted coefficient of diffusion was higher than 50%, or the fitted autocorrelation intersect was higher than 1.01 as a result of strong perturbations in the average count rate during acquisition. In time-lapse experiments outliers were removed if the relative difference to neighbor values was higher than 50%. Removed outliers were always less than 5% of all measurements in an experiment.

Nuclear import rate determinations by FLIP. To analyze nuclear import kinetics of Cdc28-GFP, a circle inscribed within the Htb2-mCherry nuclear region was repetitively photobleached while the cell was imaged every 0.5 sec to record fluorescence loss. After background subtraction, fluorescence data were corrected with those from a non-bleached cell. Finally, fluorescence signals within nuclear and cytoplasmic areas were used to analyze import kinetics as described in Supplementary Fig 2a. The export rate was assumed constant among G1 cells and obtained as described in Supplementary Fig 2b.

Immunofluorescence. Immunofluorescence of endogenous levels of Cln3-3HA was done by a signal-amplification method³⁹ with α HA (clone 3F10, Roche) and goat- α rat and rabbit- α goat Alexa555-labeled antibodies (Molecular Probes) on methanol-pemeabilized cells. To analyze localization of Cln3-3HA we used N2CJ, a plugin for ImageJ (Wayne Rasband, NIH), to perform accurate quantification in both cytoplasmic and nuclear compartments of cells⁴⁶.

Chaperone *in vitro* analysis. *In vitro* luciferase refolding assays were performed as described⁷⁸. Ydj1 binding assays to GST-fusions of Cln3, luciferase and P6, a selected Ydj1-target peptide⁷⁹ used as reference, were done with purified proteins as described⁸⁰.

Model equations. The model in Fig. 4a was simulated with a set of non-linear differential equations.

$$\begin{aligned}
 \frac{dProt_U}{dt} &= s_{Prot} * Vol - kb * Prot_U * Ydj1_A / Vol - kd_{ProtU} * Prot_U + kd_{Ydj1} * YP \\
 \frac{dYP}{dt} &= kd_{ProtU} * Prot_U * Ydj1_A / Vol - k_r * YP - kd_{Ydj1} * YP - kd_{ProtU} * YP \\
 \frac{dProt_F}{dt} &= kr * YP - kd_{ProtU} * Prot_F * \beta \\
 \frac{dCln3_U}{dt} &= s_{Cln3} * Vol - kb * Cln3_U * Ydj1_A / Vol - kd_{Cln3U} * Cln3_U + kd_{Ydj1} * YC \\
 \frac{dYC}{dt} &= kb * Cln3_U * Ydj1_A / Vol - kr * YC - kd_{Ydj1} * YC - kd_{Cln3U} * YC \\
 \frac{dCln3_F}{dt} &= kr * YC - kd_{Cln3F} * Cln3_F \\
 \frac{dYdj1_A}{dt} &= s_{Ydj1} * Vol - kb * Prot_U * Ydj1_A / Vol - kb * Cln3_U * Ydj1_A / Vol \\
 &\quad + kr * YP + kr * YC - kd_{Ydj1} * Ydj1_A + kd_{Cln3U} * YC + kd_{ProtU} * YP
 \end{aligned}$$

This model has seven state variables: $Prot_U$, unfolded proteins; YP , Ydj1-bound proteins; $Prot_F$, folded proteins; $Cln3_U$, unfolded Cln3 protein; YC , Ydj1-bound Cln3 protein; $Cln3_F$, folded Cln3 protein; and $Ydj1_A$, free available Ydj1 protein. In the model we define ten parameters: Ydj1 binding and release (kb , kr), which are assumed to be the same for $Prot_U$ and $Cln3_U$ (see Supplementary Fig. 3), and synthesis (s_{Prot} , s_{Cln3} , s_{Ydj1}) and degradation (kd_{ProtU} , kd_{Cln3U} , kd_{Cln3F} , kd_{Ydj1}) of the different components. A scaling factor ($\beta=0.01$) is used to ensure that folded protein ($Prot_F$) has a half-life 100 times that of unfolded

protein ($Prot_U$). The state variables in the model are in units of molecular number, not concentration, and therefore all 0th and 2nd order reactions are explicitly scaled by cell volume (Vol). In the model, we assume that the rate of change of cell volume with time is much lower than the rates of the biochemical reactions studied. This allowed us to treat the cell volume as a pseudo-parameter, so the steady state of other variables with respect to cell volume and growth rate could be analyzed more straightforwardly.

Model parameters and simulations. The half-life of unfolded (kd_{Cln3U}) Cln3 was set to be 1.8 times longer than folded (kd_{Cln3F}) Cln3 as deduced from steady-state levels of Cln3-3HA in wild-type and Ydj1-deficient cells, while Ydj1 was assumed to be a much more stable protein, with a half-life 20 times longer than folded Cln3. We converted half-lives to degradation rates using the formula $\lambda = \log(2)/t_{1/2}$. The remaining five parameters were used to quantitatively fit two distinct set of measurements: the relationship between the diffusion rate of Ydj1 and growth rate in G1 cells (Fig. 5c), and the relationship between the budding volume and growth rate (Fig. 5e).

Budding volume vs growth rate. In the model, we assume that Start is triggered by Cln3 when reaches a given critical threshold ($Cln3_F^{crit} = 25$) that, together with Cdc28, is needed to phosphorylate and inactivate a fixed given amount of stable Whi5 molecules synthesized in the previous cycle²⁹. Our objective was then to minimize the difference between experimental measurements and simulation results by changing the five free parameters in $L1(\theta) = (Vol(s_{Vol})_{exp} - Vol(\theta | s_{Vol})_{sim})^2$, where $Vol(s_{Vol})_{exp}$ is the experimentally measured budding volume(as a proxy for the critical volume at Start) of a cell growing at rate s_{Vol} , and $Vol(\theta | s_{Vol})_{sim}$ is the volume of cells growing at rate s_{Vol} reach a steady state value where $Cln3_F$ equals the critical threshold $Cln3_F^{crit}$.

Ydj1 diffusion vs growth rate. We assume that Ydj1 is present in two distinct pools: a fast diffusing free fraction ($Ydj1_A$), and a slowly diffusing fraction bound to either $Prot$ or $Cln3$ ($YP+YC$). To compare the experimentally measured diffusion rate of Ydj1 to our simulations, we define the simulated diffusion rate of Ydj1 as the average diffusion coefficient for all species of Ydj1 in our model as follows:

$$D_{sim} = \frac{Ydj1_A}{Ydj1} * D_{free} + \frac{YP + YC}{Ydj1} * D_{bound}$$

For Ydj1-GFP we estimated that $D_{bound} = 1 \mu m^2/min$ from minimal values observed in AZC-treated cells, and $D_{free} = 30 \mu m^2$ from maximal values obtained with GFP and corrected by the different Stokes radius. As above, we sought to minimize $L2(\theta) = (D_{exp}(s_{Vol}, Vol) - D_{sim}(\theta | s_{Vol}, Vol))^2$, where $D_{exp}(s_{Vol}, Vol)$ and $D_{sim}(\theta | s_{Vol}, Vol)$ are the experimental and simulated diffusion coefficients at a given growth rate and volume in G1 cells.

Fitting procedures. For fitting Ydj1 diffusion and budding volume as a function of growth rate we combined the respective square differences to seek $\underset{\theta}{\operatorname{argmin}} L1(\theta) + L2(\theta)$. To find the optimal value of θ we used a variant of the Levenberg-Marquardt algorithm with a 2nd order correction⁸¹. As all the simulations were done at steady state, to obtain the Jacobian of the steady state with respect to the parameters, we applied the implicit function theorem following the approach described here: <https://arxiv.org/pdf/1602.02355.pdf>. Numerical integration of the differential equations (to obtain an initial value for the steady state root finding) was done using the *SciPy routine odeint*, which automatically switches between stiff and non-stiff solvers. After identifying the minima, we performed a Markov Chain Monte Carlo⁸² exploration of the parameter space using *emcee*⁸³. We then repeated all simulations using the full ensemble of parameters to estimate the uncertainty in both simulations and parameters.

Parameter distributions. As amply described in the literature, parameters in systems biology models are disheveled⁸⁴ or structurally unidentifiable⁸⁵. We observed this behavior as well (Fig. 5b), with parameters spanning several orders of magnitude and equally consistent with the experimental data.

Statistical analysis. We routinely show the standard error of the mean (N<10) or confidence limits at $\alpha=0.05$ (N>10) to allow direct evaluation of variability and differences between mean values in plots. Sample size is always indicated in the figure legend and, when appropriate, t-test p values are shown in the text. For model predictions the mean values and standard deviations are plotted.

Acknowledgments

We thank A. Cornadó and E. Rebollo for technical assistance, T. Zimmermann for technical advice in FCS experiments, and B. Futcher and J. Skotheim for providing strains. We also thank C. Rose for editing the manuscript, and F. Antequera, Y. Barral, C. Gallego, J.C. Igual and S. Oliferenko for helpful comments. This work was funded by the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain, Consolider-Ingenio 2010, and the European Union (FEDER) to M.A. D.F.M. is an FI fellow of *Generalitat de Catalunya*.

Author Contributions

D.F.M., E.P. and G.Y. built genetic constructs and strains, and performed the experiments. F.V. and A. C.-N. implemented the mathematical model and performed the informatic analysis. A. C.-N. and M.A. conceived the study, designed the mathematical model, analyzed the data and wrote the manuscript.

References

1. Cook, M. & Tyers, M. Size control goes global. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**, 341–50 (2007).
2. Davie, E. & Petersen, J. Environmental control of cell size at division. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 838–844 (2012).
3. Marshall, W. F. *et al.* What determines cell size? *BMC Biol.* **10**, 101 (2012).
4. Turner, J. J., Ewald, J. C. & Skotheim, J. M. Cell size control in yeast. *Curr. Biol.* **22**, R350–9 (2012).
5. Schaechter, M., MaalOe, O. & Kjeldgaard, N. O. Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* **19**, 592–606 (1958).
6. Johnston, G. C., Pringle, J. R. & Hartwell, L. H. Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp. Cell Res.* **105**, 79–98 (1977).
7. Fantes, P. & Nurse, P. Control of cell size at division in fission yeast by a growth-modulated size control over nuclear division. *Exp. Cell Res.* **107**, 377–386 (1977).
8. Von Dassow, P., Chepurnov, V. A. & Armbrust, E. V. Relationships between growth rate, cell size, and induction of spermatogenesis in the centric diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyta). *J. Phycol.* **42**, 887–899 (2006).
9. Hola, M. & Riley, P. a. The relative significance of growth rate and interdivision time in the size control of cultured mammalian epithelial cells. *J. Cell Sci.* **88**, 73–80 (1987).
10. Conlon, I. J., Dunn, G. A., Mudge, A. W. & Raff, M. C. Extracellular control of cell size. *Nat. Cell Biol.* **3**, 918–21 (2001).
11. Dolznig, H., Grebien, F., Sauer, T., Beug, H. & Müllner, E. W. Evidence for a size-sensing mechanism in animal cells. *Nat. Cell Biol.* **6**, 899–905 (2004).
12. Echave, P., Conlon, I. J. & Lloyd, A. C. Cell size regulation in mammalian cells. *Cell Cycle* **6**, 218–24 (2007).
13. Zetterberg, A., Engström, W., Dafgård, E., Engström, W. & Dafgård, E. The relative effects of different types of growth factors on DNA replication, mitosis, and cellular enlargement. *Cytometry* **5**, 368–375 (1984).
14. Rathmell, J. C., Heiden, M. G. V., Harris, M. H., Frauwirth, K. A. & Thompson, C. B. In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability. *Mol. Cell* **6**, 683–692 (2000).
15. Lloyd, A. The regulation of cell size. *Cell* **154**, 1194–1205 (2013).
16. Sudbery, P. E., Goodey, A. R. & Carter, B. L. Genes which control cell proliferation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **288**, 401–4 (1980).
17. Cross, F. R. DAF1, a mutant gene affecting size control, pheromone arrest, and cell cycle kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 4675–84 (1988).
18. Nash, R., Tokiwa, G., Anand, S., Erickson, K. & Futcher, A. B. The WHI1+ gene of *Saccharomyces cerevisiae* tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog. *EMBO J.* **7**, 4335–46 (1988).
19. Tyers, M., Tokiwa, G. & Futcher, B. Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. *EMBO J.* **12**, 1955–68 (1993).
20. Eser, U., Falleur-Fettig, M., Johnson, A. & Skotheim, J. M. Commitment to a cellular transition precedes genome-wide transcriptional change. *Mol. Cell* **43**, 515–27 (2011).

21. Ferrezuelo, F., Colomina, N., Futcher, B. & Aldea, M. M. The transcriptional network activated by Cln3 cyclin at the G1-to-S transition of the yeast cell cycle. *Genome Biol.* **11**, R67 (2010).
22. Costanzo, M. *et al.* CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast. *Cell* **117**, 899–913 (2004).
23. de Bruin, R. A. M., McDonald, W. H., Kalashnikova, T. I., Yates, J. & Wittenberg, C. Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5. *Cell* **117**, 887–98 (2004).
24. Skotheim, J. M., Di Talia, S., Siggia, E. D. & Cross, F. R. Positive feedback of G1 cyclins ensures coherent cell cycle entry. *Nature* **454**, 291–6 (2008).
25. Charvin, G., Oikonomou, C., Siggia, E. D. & Cross, F. R. Origin of irreversibility of cell cycle start in budding yeast. *PLoS Biol.* **8**, e1000284 (2010).
26. Bertoli, C., Skotheim, J. M. & de Bruin, R. a M. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 518–28 (2013).
27. Hartwell, L. H. & Unger, M. W. Unequal division in *Saccharomyces cerevisiae* and its implications for the control of cell division. *J. Cell Biol.* **75**, 422–35 (1977).
28. Jorgensen, P. & Tyers, M. How cells coordinate growth and division. *Curr. Biol.* **14**, R1014–R1027 (2004).
29. Schmoller, K. M., Turner, J. J., Kõivomägi, M. & Skotheim, J. M. Dilution of the cell cycle inhibitor Whi5 controls budding yeast cell size. *Nature* **526**, 268–72 (2015).
30. Cross, F. R. & Blake, C. M. The yeast Cln3 protein is an unstable activator of Cdc28. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 3266–71 (1993).
31. Edgington, N. P. & Futcher, B. Relationship between the function and the location of G1 cyclins in *S. cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **114**, 4599–611 (2001).
32. Miller, M. E. & Cross, F. R. Mechanisms Controlling Subcellular Localization of the G 1 Cyclins Cln2p and Cln3p in Budding Yeast. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 6292–6311 (2001).
33. Vergés, E. *et al.* Cyclin Cln3 is retained at the ER and released by the J chaperone Ydj1 in late G1 to trigger cell cycle entry. *Mol. Cell* **26**, 649–62 (2007).
34. Yaglom, J. A., Goldberg, A. L., Finley, D. & Sherman, M. Y. The molecular chaperone Ydj1 is required for the p34CDC28-dependent phosphorylation of the cyclin Cln3 that signals its degradation. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3679–84 (1996).
35. Ferrezuelo, F. *et al.* The critical size is set at a single-cell level by growth rate to attain homeostasis and adaptation. *Nat. Commun.* **3**, 1012 (2012).
36. Diehl, J. A., Yang, W., Rimerman, R. A., Xiao, H. & Emili, A. Hsc70 regulates accumulation of cyclin D1 and cyclin D1-dependent protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1764–74 (2003).
37. Kampinga, H. H. & Craig, E. a. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 579–92 (2010).
38. Liu, X. *et al.* Reliable cell cycle commitment in budding yeast is ensured by signal integration. *Elife* **4**, e03977 (2015).
39. Wang, H. Y., Garí, E., Vergés, E., Gallego, C. & Aldea, M. Recruitment of Cdc28 by Whi3 restricts nuclear accumulation of the G1 cyclin-Cdk complex to late G1. *EMBO J.* **23**, 180–90 (2004).

40. Cross, F. R., Archambault, V., Miller, M. & Klovstad, M. Testing a Mathematical Model of the Yeast Cell Cycle. *Mol. Biol. Cell* **13**, 52–70 (2002).
41. Trotter, E. W., Berenfeld, L., Krause, S. a, Petsko, G. a & Gray, J. V. Protein misfolding and temperature up-shift cause G1 arrest via a common mechanism dependent on heat shock factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 7313–8 (2001).
42. Vaughan, C. K. *et al.* Structure of an Hsp90-Cdc37-Cdk4 complex. *Mol. Cell* **23**, 697–707 (2006).
43. Archambault, V. *et al.* Targeted proteomic study of the cyclin-Cdk module. *Mol. Cell* **14**, 699–711 (2004).
44. Hsieh, M.-T. & Chen, R.-H. Cdc48 and cofactors Npl4-Ufd1 are important for G1 progression during heat stress by maintaining cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* **6**, e18988 (2011).
45. Fu, X., Ng, C., Feng, D. & Liang, C. Cdc48p is required for the cell cycle commitment point at Start via degradation of the G1-CDK inhibitor Far1p. *J. Cell Biol.* **163**, 21–26 (2003).
46. Yahya, G., Parisi, E., Flores, A., Gallego, C. & Aldea, M. A Whi7-Anchored Loop Controls the G1 Cdk-Cyclin Complex at Start. *Mol. Cell* **53**, 115–126 (2014).
47. Gong, Y. *et al.* An atlas of chaperone-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*: implications to protein folding pathways in the cell. *Mol. Syst. Biol.* **5**, 275 (2009).
48. Gallego, C. *et al.* The Cln3 cyclin is down-regulated by translational repression and degradation during the G1 arrest caused by nitrogen deprivation in budding yeast. *EMBO J.* **16**, 7196–206 (1997).
49. Lajoie, P., Moir, R. D., Willis, I. M. & Snapp, E. L. Kar2p availability defines distinct forms of endoplasmic reticulum stress in living cells. *Mol. Biol. Cell* **23**, 955–64 (2012).
50. Saarikangas, J. *et al.* Compartmentalization of ER-Bound Chaperone Confines Protein Deposit Formation to the Aging Yeast Cell. *Curr. Biol.* **27**, 773–783 (2017).
51. Escusa-Toret, S., Vonk, W. I. M. & Frydman, J. Spatial sequestration of misfolded proteins by a dynamic chaperone pathway enhances cellular fitness during stress. *Nat. Cell Biol.* **15**, 1231–43 (2013).
52. Blake, W. J., KAErn, M., Cantor, C. R. & Collins, J. J. Noise in eukaryotic gene expression. *Nature* **422**, 633–7 (2003).
53. Jorgensen, P., Nishikawa, J. L., Breikreutz, B.-J. & Tyers, M. Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* **297**, 395–400 (2002).
54. Jorgensen, P. *et al.* A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev.* **18**, 2491–505 (2004).
55. Baroni, M. D., Monti, P. & Alberghina, L. Repression of growth-regulated G1 cyclin expression by cyclic AMP in budding yeast. *Nature* **371**, 339–42 (1994).
56. Tokiwa, G., Tyers, M., Volpe, T. & Futcher, B. Inhibition of G1 cyclin activity by the Ras/cAMP pathway in yeast. *Nature* **371**, 342–345 (1994).
57. Soifer, I. & Barkai, N. Systematic identification of cell size regulators in budding yeast. *Mol. Syst. Biol.* **10**, 761 (2014).
58. Schneider, B. L. *et al.* Growth rate and cell size modulate the synthesis of, and requirement for, G1-phase cyclins at Start. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 10802–10813 (2004).

59. Newcomb, L. L., Hall, D. D. & Heideman, W. AZF1 is a glucose-dependent positive regulator of CLN3 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1607–1614 (2002).
60. Polymenis, M. & Schmidt, E. V. Coupling of cell division to cell growth by translational control of the G1 cyclin CLN3 in yeast. *Genes Dev.* **11**, 2522–31 (1997).
61. Johnston, G. C., Ehrhardt, C. W., Lorincz, A. & Carter, B. L. Regulation of cell size in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **137**, 1–5 (1979).
62. Hall, D. D., Markwardt, D. D., Parviz, F. & Heideman, W. Regulation of the Cln3-Cdc28 kinase by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **17**, 4370–8 (1998).
63. Tyson, C. B., Lord, P. G. & Wheals, a E. Dependency of size of *Saccharomyces cerevisiae* cells on growth rate. *J. Bacteriol.* **138**, 92–8 (1979).
64. Colomina, N., Ferrezuelo, F., Wang, H., Aldea, M. & Gari, E. Whi3, a Developmental Regulator of Budding Yeast, Binds a Large Set of mRNAs Functionally Related to the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* **283**, 28670–28679 (2008).
65. Holmes, K. J., Klass, D. M., Guiney, E. L. & Cyert, M. S. Whi3, an *S. cerevisiae* RNA-binding protein, is a component of stress granules that regulates levels of its target mRNAs. *PLoS One* **8**, e84060 (2013).
66. Brauer, M. J. *et al.* Coordination of growth Rate , cell cycle , stress response , and metabolic activity in yeast. *Mol. Biol. Cell* **19**, 352–367 (2008).
67. Georgieva, M. V *et al.* Inntags: small self-structured epitopes for innocuous protein tagging. *Nat. Methods* **12**, 955–958 (2015).
68. Maekawa, H., Usui, T., Knop, M. & Schiebel, E. Yeast Cdk1 translocates to the plus end of cytoplasmic microtubules to regulate bud cortex interactions. *EMBO J.* **22**, 438–49 (2003).
69. Cherkasov, V. *et al.* Coordination of Translational Control and Protein Homeostasis during Severe Heat Stress. *Curr. Biol.* **23**, 2452–2462 (2013).
70. Gibson, D. G. *et al.* One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 20404–9 (2008).
71. Louvion, J. F., Havaux-Copf, B. & Picard, D. Fusion of GAL4-VP16 to a steroid-binding domain provides a tool for gratuitous induction of galactose-responsive genes in yeast. *Gene* **131**, 129–34 (1993).
72. Jacquet, M. Oscillatory nucleocytoplasmic shuttling of the general stress response transcriptional activators Msn2 and Msn4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **161**, 497–505 (2003).
73. Trotter, E. W. *et al.* Misfolded proteins are competent to mediate a subset of the responses to heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**, 44817–25 (2002).
74. Mitchison, J. M. in *Yeast, a practical approach* (eds. Campbell, I. & Duffus, J.) 51–64 (IRL Press, 1988).
75. Cookson, N. a, Cookson, S. W., Tsimring, L. S. & Hasty, J. Cell cycle-dependent variations in protein concentration. *Nucleic Acids Res.* **38**, 2676–81 (2010).
76. Jorgensen, P. *et al.* The size of the nucleus increases as yeast cells grow. *Mol. Biol. Cell* **18**, 3523–32 (2007).

77. Slaughter, B. D., Schwartz, J. W. & Li, R. Mapping dynamic protein interactions in MAP kinase signaling using live-cell fluorescence fluctuation spectroscopy and imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 20320–5 (2007).
78. Summers, D. W., Douglas, P. M., Ren, H.-Y. Y. & Cyr, D. M. The type I Hsp40 Ydj1 utilizes a farnesyl moiety and zinc finger-like region to suppress prion toxicity. *J. Biol. Chem.* **284**, 3628–39 (2009).
79. Kota, P., Summers, D. W., Ren, H.-Y., Cyr, D. M. & Dokholyan, N. V. Identification of a consensus motif in substrates bound by a Type I Hsp40. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 11073–11078 (2009).
80. Lee, S., Fan, C. Y., Younger, J. M., Ren, H. & Cyr, D. M. Identification of essential residues in the type II Hsp40 Sis1 that function in polypeptide binding. *J. Biol. Chem.* **277**, 21675–82 (2002).
81. Transtrum, M. K. & Sethna, J. P. Improvements to the Levenberg-Marquardt algorithm for nonlinear least-squares minimization. *arXiv* **1201**, 1–32 (2012).
82. Goodman, J. & Weare, J. Ensemble samplers with affine invariance. *Commun. Appl. Math. Comput. Sci.* **5**, 65–80 (2010).
83. Foreman-Mackey, D., Hogg, D. W., Lang, D. & Goodman, J. emcee : The MCMC Hammer. *Publ. Astron. Soc. Pacific* **125**, 306–312 (2013).
84. Gutenkunst, R. N. *et al.* Universally sloppy parameter sensitivities in systems biology models. *PLoS Comput. Biol.* **3**, e189 (2007).
85. Szederkényi, G., Banga, J. R. & Alonso, A. A. Inference of complex biological networks: distinguishability issues and optimization-based solutions. *BMC Syst. Biol.* **5**, 177 (2011).

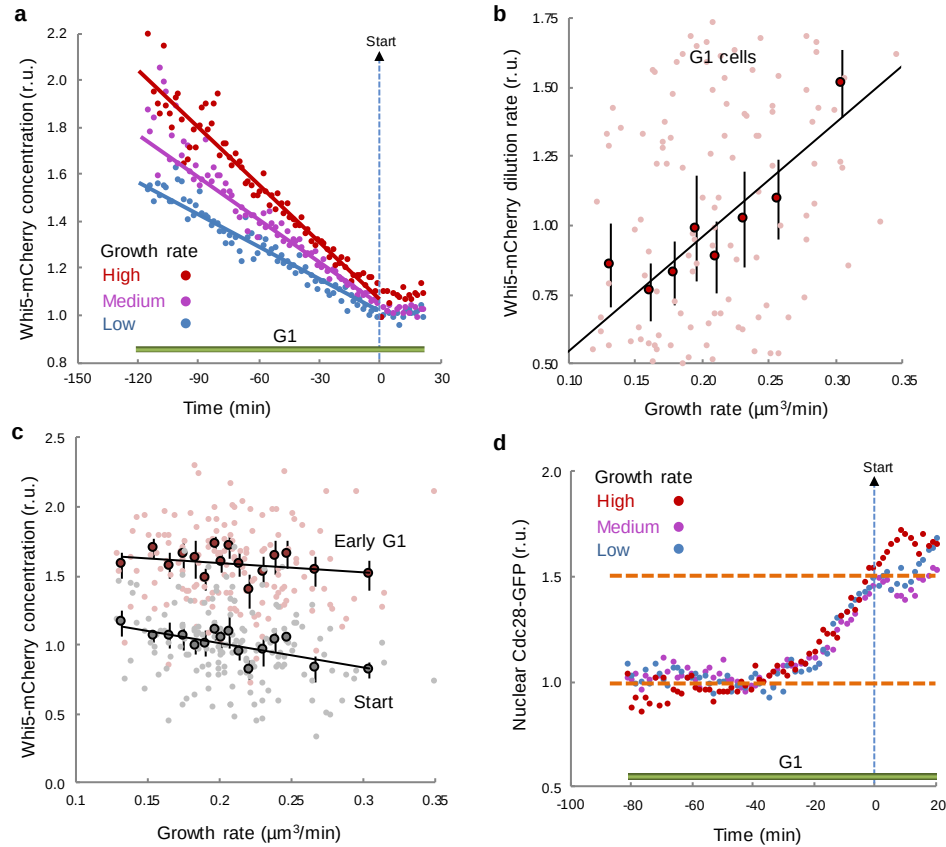


Figure 1 | Whi5 dilution in G1 passively adapts to growth rate. (a) Cells expressing Whi5-mCherry were analyzed by time-lapse microscopy during G1 progression and entry into the cell cycle, and time-lapse data from individual cells were aligned to Start and binned into three groups by growth rate in G1 (high: red; medium: cyan; low: blue). Mean ($N > 50$) relative cellular concentrations of Whi5-mCherry are plotted as a function of time during G1. (b) Cells as in panel a were used to obtain the dilution rate of Whi5-mCherry in G1. Single-cell (small red circles) or binned (large red circles, mean $\pm$ SEM, 10 cells/bin) relative dilution rates are plotted as a function of growth rate. A linear regression line is also plotted. (c) Whi5-mCherry concentration in early G1 (red symbols) and Start (gray symbols) as a function of growth rate in G1. Single-cell (small circles) or binned (large circles, mean $\pm$ SEM, 10 cells/bin) data and linear regression lines are plotted. (d) Cells expressing Cdc28-GFP and Whi5-mCherry were analyzed by time-lapse microscopy during G1 progression and entry into the cell cycle, and time-lapse data from individual cells were aligned to Start and binned into three groups by growth rate in G1 (high: red; medium: cyan; low: blue). Mean ($N > 50$) nuclear to cytoplasmic ratios of Cdc28-GFP are plotted as a function of time during G1. See also Supplementary Fig. 1.

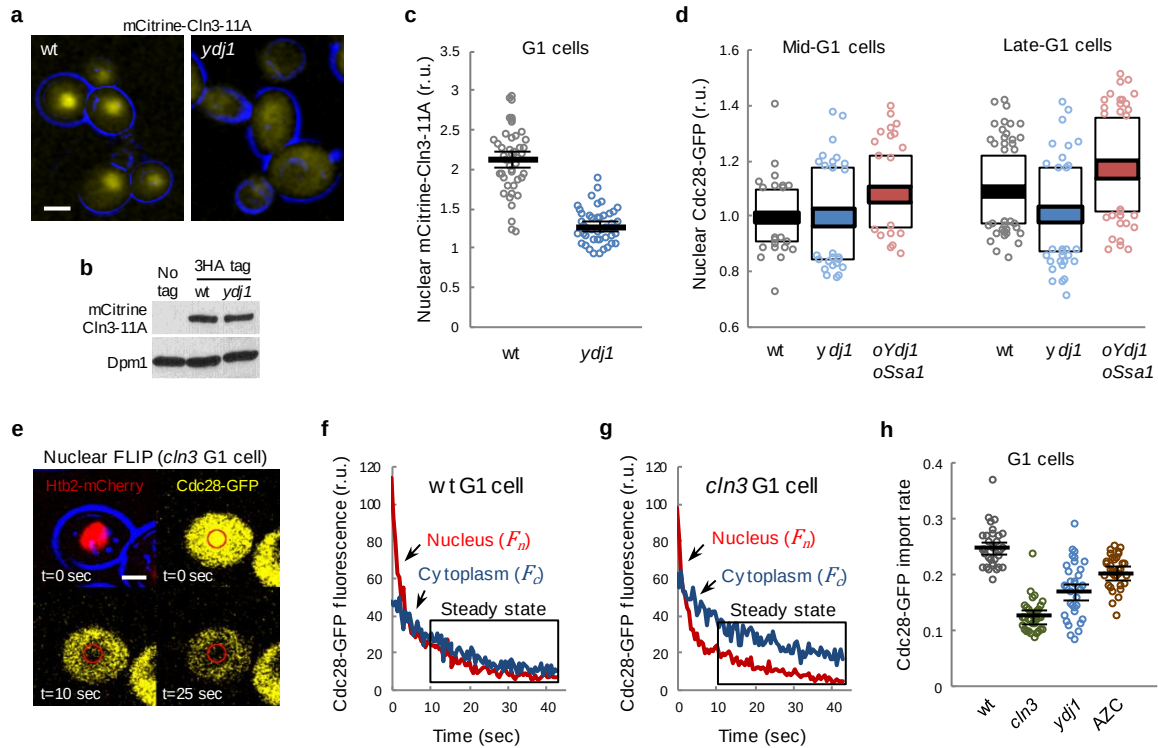


Figure 2 | Nuclear accumulation of the G1 Cdk depends on chaperone function. (a) Images corresponding to wild-type (wt) and Ydj1-deficient (*ydj1*) cells expressing mCitrine-Cln3-11A. Bar is 2 μ m. (b) Immunoblotting analysis of 3HA-tagged mCitrine-Cln3-11A levels in wild-type and *ydj1* cells. Dpm1 is shown as loading control. (c) Nuclear to cytoplasmic mCitrine-Cln3-11A ratios for individual G1 cells. Mean (N=30, thick lines) and confidence limits ($\alpha=0.05$, thin lines) for the mean are also plotted. (d) Cdc28-GFP wild-type (wt), Ydj1-deficient (*ydj1*) or overexpressing Ydj1 and Ssa1 (*oYdj1 oSsa1*) cells were analyzed by time-lapse microscopy during G1 progression. Mean (N>100) nuclear to cytoplasmic Cdc28-GFP ratios are plotted with respective standard deviation (white boxes) and confidence ($\alpha=0.05$, colored boxes) intervals for the mean at either mid (36-45 min before Start) or late G1 (18-21 min before Start). (e) Analysis of Cdc-28-GHFP import by nuclear FLIP. A representative *cln3* cell expressing Cdc28-GFP and Htb2-mCherry at different times during nuclear photobleaching is shown. Bar is 1 μ m. (f,g) Representative nuclear FLIP outputs of Cdc28-GFP in wild-type (f) and Cln3-deficient (g) G1 cells showing fluorescence decay in nuclear and cytoplasmic compartments. (h) Cdc28-GFP import rates in wild-type (wt), Cln3-deficient (*cln3*), and Ydj1-deficient (*ydj1*) single cells in G1 phase. Wild-type cells treated with AZC are also shown. Mean values (N>30, thick lines) with confidence limits for the mean ($\alpha=0.05$, thin lines) are also plotted. See also Supplementary Fig. 2.

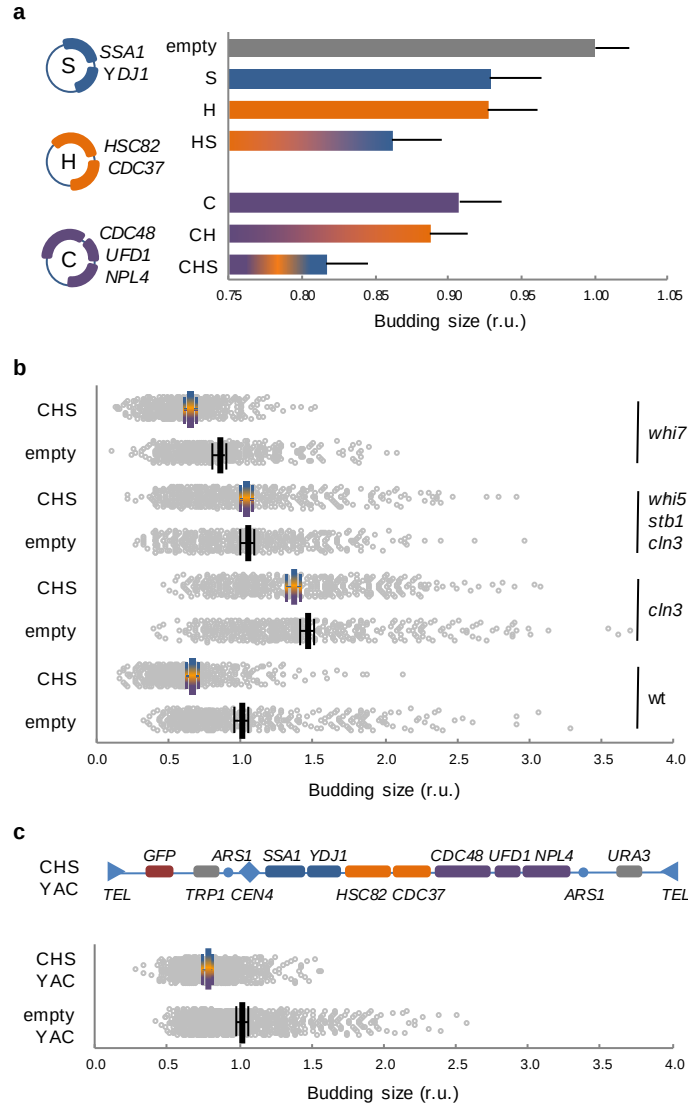


Figure 3 | Chaperones of the Hsp70, Hsp90 and Cdc48 systems are limiting for cell cycle entry. (a) Budding volume of yeast cells transformed with the indicated combinations of compatible centromeric vectors encoding chaperones of the Hsp70 (S, *SSA1* and *YDJ1*), Hsp90 (H, *HSC82* and *CDC37*), and Cdc48 (C, *CDC48*, *UFD1* and *NPL4*) systems. Individual budding volumes were determined and made relative to the mean value for wild-type cells transformed with the corresponding empty vectors. Mean values ($N > 200$) and confidence limits ($\alpha = 0.05$, thin vertical lines) for the mean are plotted. (b) Yeast cells with indicated genotypes were transformed with empty or compatible centromeric vectors encoding the three chaperone systems (CHS) and budding volumes were determined as in panel a. Individual data ($N > 400$), mean values (thick vertical lines) and confidence limits ($\alpha = 0.05$, thin vertical lines) for the mean are plotted. (c) Budding volume of yeast cells transformed with an artificial chromosome encoding the three chaperone systems (CHS YAC) or empty vector. Budding volumes were determined as in panel a. Individual data ($N < 400$), mean values (thick vertical lines) and confidence limits ($\alpha = 0.05$, thin vertical lines) for the mean are plotted.

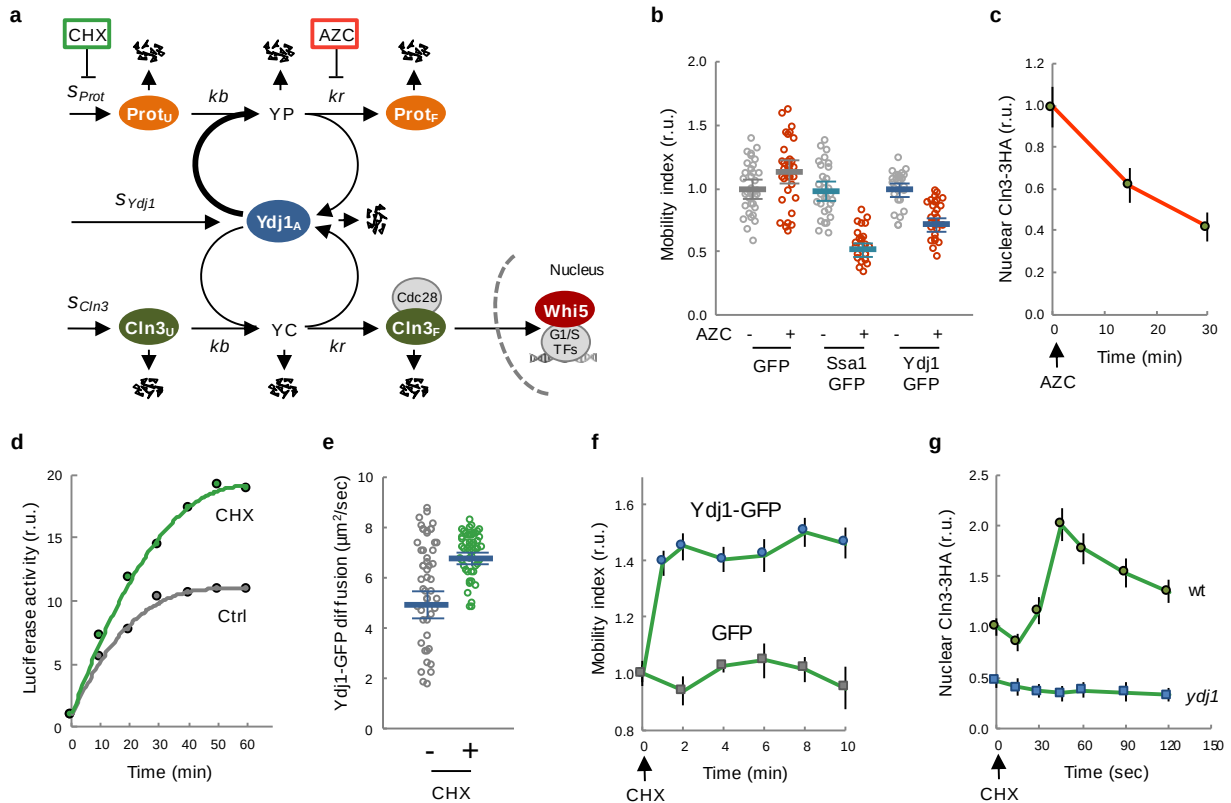


Figure 4 | The molecular competition model and qualitative predictions of chaperone availability and nuclear accumulation of Cln3. (a) Scheme of the chaperone competition model connecting protein synthesis and Cln3 folding and complex formation with Cdc28. Chaperones associate to the unfolded protein (Prot_U) mostly in a transient manner until the properly folded protein (Prot_F) is released. Thus, protein synthesis rate would be a key determinant of the level of available Ydj1 (Ydj1_A) in the free pool and, as it is essential in proper folding and release of Cln3 (Cln3_F), it would in turn govern the rate of Whi5 phosphorylation in the nucleus for triggering Start. Variables and parameters used in the model are indicated. (b) Yeast cells expressing the indicated GFP fusions were analyzed by confocal microscopy to quantify intracellular mobility of Ssa1 and Ydj1 chaperones before (-) or 15 to 30 min after adding AZC (+). Since AZC-containing proteins accumulate with chaperones into disperse cellular aggregates⁵¹, FLIP was used to include both soluble and aggregated forms of these chaperones in the analysis. Individual protein mobility values are plotted (N>25). Mean values (thick lines) and confidence limits for the mean ($\alpha=0.05$, thin lines) are also shown. (c) Nuclear accumulation of Cln3-3HA in asynchronous individual yeast cells before and 15 to 30 min after addition of AZC as measured by semiautomated quantification of immunofluorescence levels in both nuclear and cytoplasmic compartments. Relative mean values (N>200) and confidence limits ($\alpha=0.05$, thin horizontal lines) are shown. (d) Refolded luciferase activity as a function of time in yeast cell extracts treated or not with CHX in the presence of an ATP-regenerating system. (e) Yeast cells expressing Ydj1-GFP were analyzed by FCS before (-) or 5 to 10 min after adding a sublethal dose of CHX (+). Individual protein diffusion coefficients are plotted (N>50). Mean values (thick lines) and confidence limits for the mean ($\alpha=0.05$, thin lines) are also shown. (f) Ydj1-GFP and GFP mobility assayed by FLIP at the indicated time points after cycloheximide addition. Relative mean values and confidence limits ($\alpha=0.05$) for the mean are shown. (g) Nuclear accumulation of Cln3-3HA in asynchronous individual wild type (wt) and Ydj1-deficient (*ydj1*) yeast cells before or at the indicated times after adding CHX (+) as measured as in panel e. Relative mean values (N>200) and confidence limits ($\alpha=0.05$, thin horizontal lines) for the mean are shown. See also Supplementary Fig.3 and Supplementary Fig. 4.

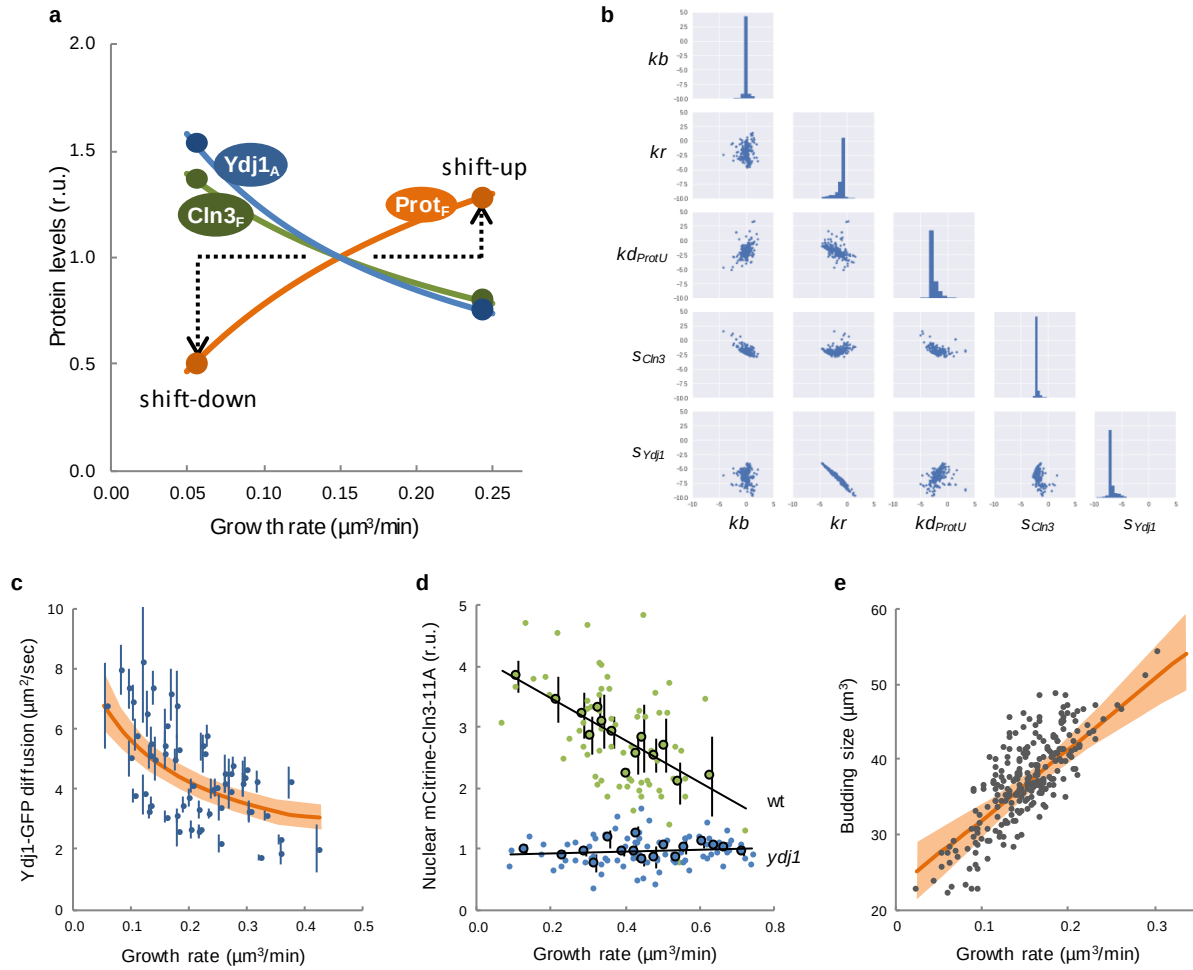


Figure 5 | Growth rate is a key determinant of chaperone availability and nuclear accumulation of Cln3. (a)

Shifting cells to a medium sustaining a higher growth rate increases the rate of protein synthesis, compromises more Ydj1 chaperone in folding and trafficking of new proteins (Prot_F), and decreases the level of available chaperone (Ydj1_A). Hence, folding and release of Cln3 by available Ydj1 is also hindered and levels of free Cln3 (Cln3_F) decrease as well. By contrast, a nutritional shift-down will decrease protein synthesis and relieve Ydj1 from folding demands. In turn, the higher free-Ydj1 pool will increase the efficiency of Cln3 folding and release. **(b)** Distribution of parameters of the model fitted to experimental data of Ydj1 diffusion and critical volume as a function of growth rate. Plots on diagonal are one-dimensional histograms of parameter densities in log space. Other plots correspond to parameter sets sampled using Markov Chain Monte Carlo. **(c)** Yeast cells expressing Ydj1-GFP were analyzed by FCS in time-lapse experiments to determine growth rate at a single-cell level. Individual protein diffusion coefficients (circles) with standard error are plotted. The simulation produced by the full ensemble of parameter sets is plotted as a line with mean and one standard deviation intervals. **(d)** Nuclear to cytoplasmic ratios for mCitrine-Cln3-11A from wild-type (wt, green, N=68) and Ydj1-deficient (*ydj1*, blue, N=85) cells as a function of growth rate in G1. Mean values (large circles), confidence limits ($\alpha=0.05$) for binned (5 cells/bin) data and a linear regression are also plotted. **(e)** The chaperone competition model predicts the critical size being a function of growth rate at the single-cell level. Experimental budding volumes as a function of growth rate (closed circles) and the simulation as in panel **c** are shown. See also Supplementary Fig. 5.

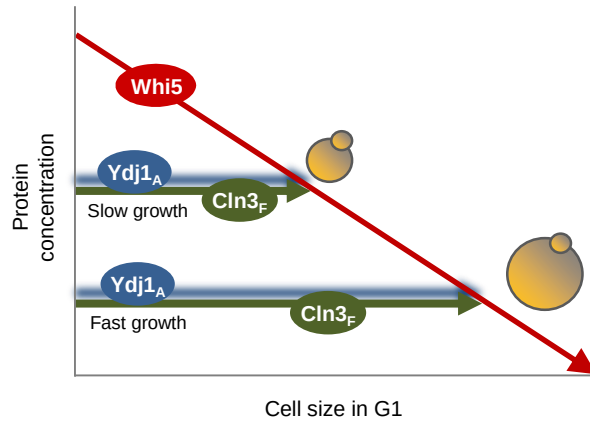
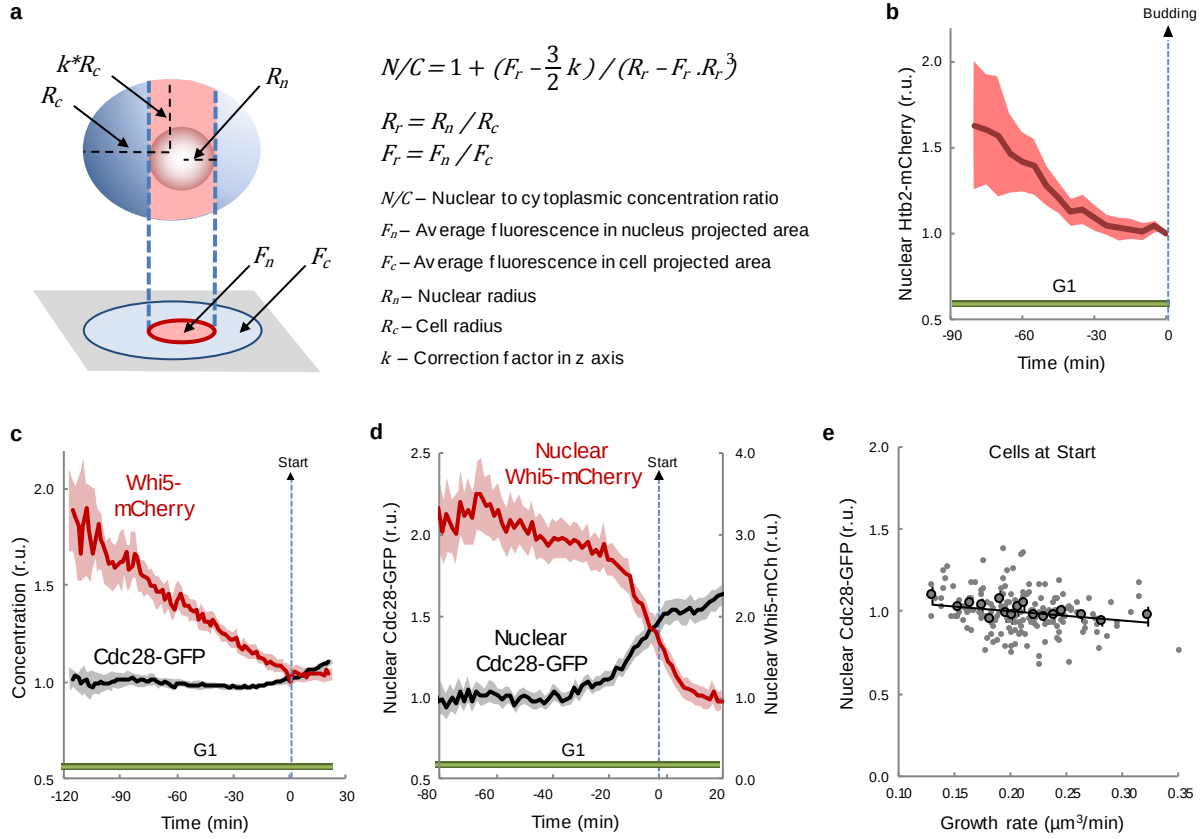
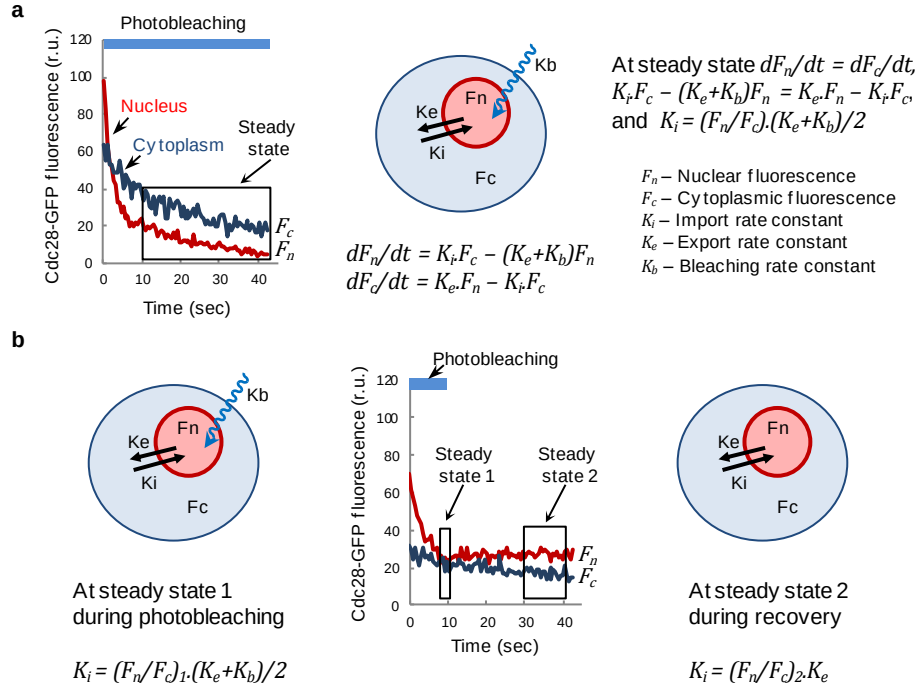


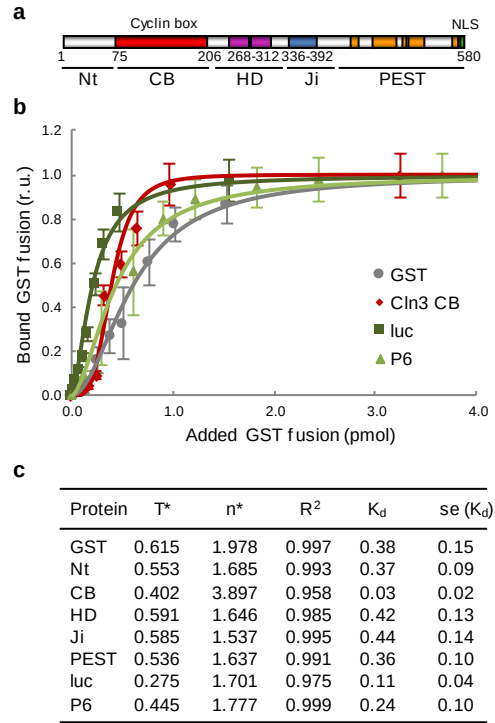
Figure 6 | An inherent sizer and a growth-rate dependent modulator act cooperatively to set the critical size. While Whi5 acts as an inherent sizer that is diluted by growth²⁹, chaperone-dependent Cln3 folding and release would act as an extrinsic modulator to subjugate cell size to growth rate. By compromising higher levels of chaperones in growth processes, fast growing cells restrain nuclear accumulation of Cln3 until a larger cell size is attained.



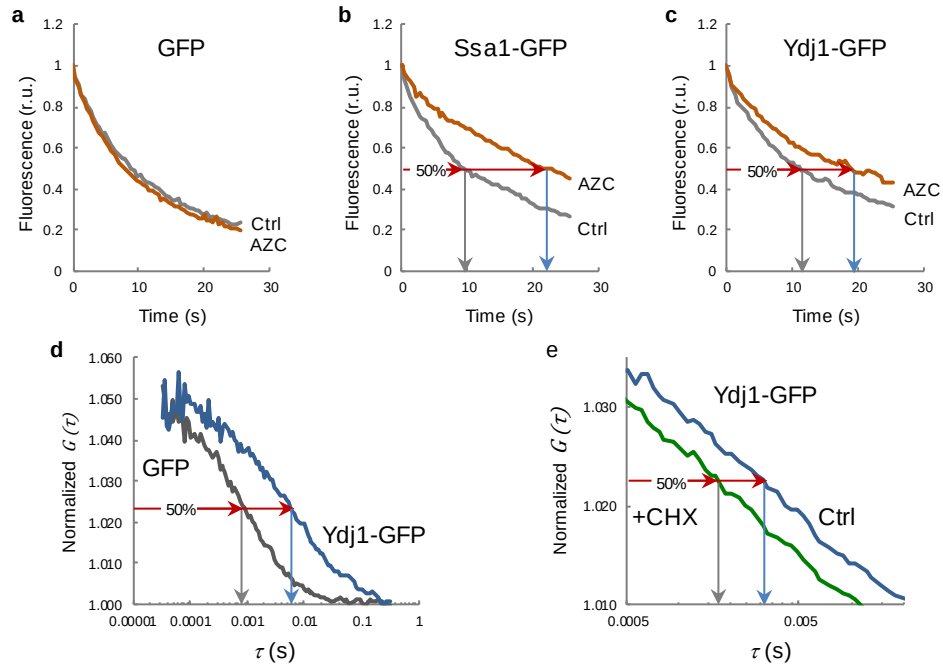
Supplementary Figure 1 | Determination of nuclear to cytoplasmic concentration ratios. (a) Fluorescence within the nuclear projected area is influenced by fluorescence levels in both nuclear and cytoplasmic compartments. In consequence, the ratio of the nuclear to cytoplasmic concentration of a fluorescent protein is $N/C = 1 + (F_r - \frac{3}{2} * k) / (R_r - F_r * R_r^3)$, where F_r is the ratio of average fluorescence signal in nuclear (F_n) and cell (F_c) projected areas, R_r is the ratio of nuclear (R_n) and cell (R_c) radius, and k corrects for cell radius variation in the z axis, which was experimentally obtained from GFP-expressing wild-type cells. (b) Nuclear concentration of histone Htb2 during G1. Cells expressing Htb2-mCherry were analyzed by time-lapse microscopy during G1 progression and entry into the cell cycle. Individual time-lapse data of cells were aligned and made relative to budding time. Mean nuclear concentration of Htb2-mCherry (N=95) with confidence limits ($\alpha=0.05$) for the mean are plotted. (c) Cells expressing Cdc28-GFP and Whi5-mCherry were analyzed by time-lapse microscopy during G1 progression and entry into the cell cycle, and time-lapse data from individual cells were aligned to budding. Mean (N>100) relative cellular concentrations of Cdc28-GFP (black lines) and Whi5-mCherry (red lines), and the respective confidence limits ($\alpha=0.05$) for the mean are plotted. (d) Mean (N>100) nuclear to cytoplasmic Cdc28-GFP (black lines) and Whi5-mCherry (red lines) ratios from cells in panel c and the respective confidence limits ($\alpha=0.05$) for the mean are plotted. (e) Nuclear concentration of Cdc28-GFP in late G1 cells as a function of growth rate in G1. Single-cell (small gray circles) or binned (large gray circles, mean $\pm$ SEM, 10 cells/bin) relative data and a linear regression are plotted.



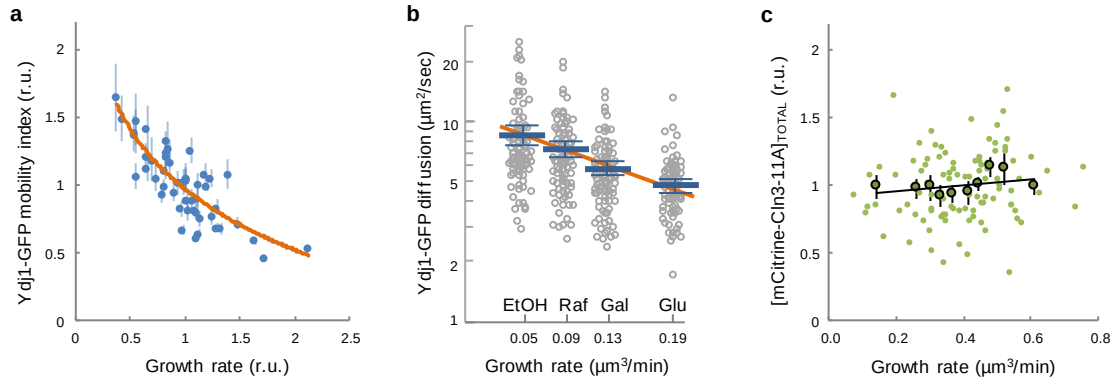
Supplementary Figure 2 | FLIP analysis of nuclear import rates of the yeast Cdk. (a) Schematic showing equations and parameters used to analyze Cdc28-GFP import and export kinetics as described under Methods. Fluorescence signals within nuclear (F_n) and cytoplasmic (F_c) areas were used to obtain a nuclear to cytoplasmic ratio (F_n/F_c). This ratio dropped to different extents during the first 10 sec of exposure, reflecting a population of Cdc28-GFP molecules in the nucleus not in dynamic equilibrium with the cytoplasm. After this period, however, the (F_n/F_c) ratio reached a steady state defined by $dF_n/dt = dF_c/dt$, being $dF_n/dt = K_i F_c - (K_e + K_b) F_n$, and $dF_c/dt = K_e F_n - K_i F_c$, where K_i , K_e and K_b are the import, export and bleaching rate constants, respectively. Thus, $K_i F_c - (K_e + K_b) F_n = K_e F_n - K_i F_c$, and $K_i = (F_n/F_c) \cdot (K_e + K_b)/2$. The bleaching rate constant was obtained from Htb2-mCherry fluorescence loss in the same cell and corrected by a bleaching factor of 1.94 ± 0.09 to account for intrinsic differences in bleaching rates for GFP and mCherry, which was obtained from G1 cells (N=33) under conditions that minimize import contribution (Cln3-deficient cells). **(b)** Schematic showing equations and parameters used to obtain Cdc28-GFP export kinetics. In this case, the nuclear region of wild-type G1 cells (N=34) was only photobleached for 10 s and allowed to recover fluorescence by nuclear import of Cdc28-GFP. F_n/F_c ratio steady states were used to calculate import rate constants at photobleaching, $K_i = (F_n/F_c)_1 \cdot (K_e + K_b)/2$, and recovery, $K_i = (F_n/F_c)_2 \cdot K_e$, to finally obtain the export rate constant $K_e = 0.199 \pm 0.020$.



Supplementary Figure 3 | Parameter analysis of the chaperone competition model and Ydj1 binding affinity to Cln3 and reference proteins. (a) Cln3 scheme indicating the N-terminal domain (N_t), the cyclin box (CB), a hydrophobic bi-partite domain (HD), the inhibitory J domain (J_i), the C-terminal PEST rich region and the nuclear localization signal (NLS). (b) Binding efficiencies of increasing amounts (0-4 pmol) of the referred GST fusions to Ydj1 (1 pmol). Luciferase (luc) and P6, a selected Ydj1-target peptide were used as references. Mean relative bound levels (N=3) and standard deviations are plotted. (c) Binding parameters of Ydj1 to the referred GST fusions in assays as in panel b. A simultaneous mode of binding was assumed for fitting the Hill equation, $y = xn / (Tn + xn)$, and obtained parameters are shown



Supplementary Figure 4 | FLIP and FCS analysis of Ydj1-GFP mobility. (a-c) Cells were analyzed by FLIP to quantify intracellular mobility of the indicated fusion proteins before (Ctrl) or 15 to 30 min after adding AZC. Representative fluorescence decay curves of individual cells are plotted. (d) Cells expressing GFP or Ydj1-GFP were analyzed by FCS to measure the intracellular mobility of the indicated fusion proteins in cells growing in G1. Representative experimental correlation curves of individual cells are plotted, which were fitted to a 1-component anomalous mode of diffusion ($\alpha=0.5$) model. As observed in the plot, the Ydj1-GFP protein displays a 5-6 fold longer diffusion time compared to GFP. (e) Yeast cells expressing Ydj1-GFP were analyzed by FCS before or 5 to 10 min after adding a sublethal dose of CHX. Representative experimental correlation curves of individual cells are plotted. As observed in the plot, the Ydj1-GFP protein displays a ca. 2-fold shorter diffusion time in the CHX-treated cell compared to the untreated cell.



Supplementary Figure 5 | Ydj1-GFP mobility as a function of growth rate. (a) Ydj1-GFP mobility assayed by FLIP in time-lapse experiments to determine growth rate at a single-cell level. Individual mobility index values, confidence limits ($\alpha=0.05$) and a logarithmic regression line are plotted. (b) Ydj1-GFP diffusion assayed by FCS in cells growing at different population growth rates in the indicated carbon sources. Individual diffusion coefficients, mean values ($N=90$, thick blue lines), confidence limits for the mean ($\alpha=0.05$, thin lines), and a linear fit (thick orange line) are plotted. (c) Cells ($N=100$) were analyzed to obtain the mean cellular concentration of mCitrine-Cln3-11A during G1. Single-cell (small circles) or binned data (large circles, 10 cells/bin) by growth rate are plotted. Confidence limits ($\alpha=0.05$) and a linear regression line for binned data are also plotted.