

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

DIPARTIMENTO DI BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE

XX CICLO

Tossicogenomica dei metalli in
Saccharomyces cerevisiae

Coordinatore del corso:

Prof. Nelson Marmioli

Tutore:

Prof. Simone Ottonello

Dottoranda:

Dott.ssa Gessica Marchini

INDICE

SOMMARIO	p.6
1. INTRODUZIONE	p.8
1.1 I metalli di transizione	p.8
1.2 Omeostasi dei metalli in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	p.13
1.2a Il lievito <i>Saccharomyces cerevisiae</i> come organismo modello	p.14
1.2b Tossicità delle specie metalliche in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	p.17
1.2c Meccanismi molecolari che regolano le difese cellulari agli ioni metallici in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	p.19
1.2d Metallotioneine	p.25
1.3 Tossicità e omeostasi del cadmio in cellule umane e in cellule di <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	p.28
1.3a Analisi proteomica e trascrittomica in risposta al cadmio in cellule di <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	p.34
1.4 Tossicità e omeostasi del nichel in cellule umane e in cellule di <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	p.37
2. SCOPO DELLA RICERCA	p.44
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	p.45
3.1 <i>Genomic phenotyping study</i> : la tossicità di cadmio e nichel in cellule di <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	p.45
3.1a Organizzazione della collezione di mutanti per delezione di <i>S. cerevisiae</i>	p.45
3.1b <i>Screening</i> della collezione di mutanti per delezione di <i>S. cerevisiae</i> in presenza di cadmio e nichel	p.46
3.1c Analisi dei dati mediante classificazione funzionale (gene ontology)	p.50
3.1d Analisi dei dati mediante rappresentazione in <i>network</i> di interazione	p.52
3.1e Network di interazione: geni la cui mancanza causa Cd/Ni sensibilità in cellule di <i>S. cerevisiae</i>	p.54
3.1f Network di interazione: mutanti sensibili specifici	p.64
3.1g Depauperamento di ferro metallo-indotto: differenti meccanismi d'azione tra cadmio e nichel	p.69
3.1h Mutanti resistenti a cadmio e nichel	p.75

3.1i Mutazioni nei complessi ESCRT e retromero influenzano in modo differente la cadmio- e nichel-tolleranza	p.78
3.1l Tossicità rappresentata da altre specie metalliche	p.85
3.2 Costruzione di un biosensore per la rilevazione di metalli tossici, basato su tecnologia FRET	p.90
3.2a Clonaggio ed espressione della proteina di fusione <i>CFP-MT2a-YFP</i> in cellule di <i>E. coli</i>	p.92
3.2b Rivelamento del segnale FRET	p.94
4. MATERIALI E METODI	p.96
4.1 <i>Screening</i> della risposta fenotipica della collezione di mutanti per delezione di <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in presenza di specie metalliche	p.96
4.1a Collezione di mutanti per delezione di <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	p.96
4.1b <i>Screening</i> della collezione in presenza di cadmio e nichel	p.96
4.2c Test di validazione del fenotipo in presenza di cadmio e nichel (<i>spot assay</i>)	p.98
4.1d <i>Screening</i> di un sottogruppo della collezione di mutanti in presenza di ioni metallici diversi da cadmio e nichel	p.98
4.1e Clonaggio delle sequenze dei geni <i>NRG1</i> , <i>PHO88</i> , <i>SMF1</i> , <i>SMF2</i> e <i>SMP1</i> nel vettore d'espressione pYX212	p.99
4.1f Trasformazione dei costrutti ottenuti in ceppi di lievito, mediante il metodo del litio acetato	p.99
4.1g Colorazione delle cellule di lievito con <i>Newport green</i>	p.100
4.1h Analisi dei dati	p.100
4.2 Realizzazione di un prototipo biosensore basato su tecnologia FRET (<i>Fluorescent resonance energy transfer</i>) per la rilevazione di metalli.	p.102
4.2a Clonaggio della sequenza codificante CFP (<i>Ceruleans Fluorescent Protein</i>) e YFP (<i>Citrine Fluorescent Protein</i>) nel vettore d'espressione pET28.	p.102
4.2b Clonaggio della sequenza codificante la metallotioneina MT2a di <i>A. thaliana</i> nel vettore d'espressione pET28-CFP_YFP.	p.103
4.2c Trasformazione del costrutto pET28-CFP-MT-YFP nei ceppi BL21 <i>codon plus</i> , mediante elettroporazione delle cellule batteriche	p.103
4.2d Prove di espressione e solubilità nelle cellule BL21 c.p. trasformate con il vettore pET28-CFP-MT-YFP.	p.104
4.2e Purificazione su larga scala della proteina <i>CFP-MT-YFP</i> mediante resina <i>TALON[®]</i> (<i>Metal Affinity Resin</i>)	p.105
4.2f Rimozione della coda di istidine dalla proteina <i>CFP-MT-YFP</i> mediante proteolisi con trombina	p.106

4.2g Saggio di alchilazione dei residui di cisteina con Iodoacetamide.	p.106
4.2h Misure allo spettrofluorimetro	p.107
4.3 Ceppi e terreni di crescita utilizzati	p.108
5. CONCLUSIONI	p.110
6. BIBLIOGRAFIA	p.112
7. APPENDICE	p.133
7.1 appendice 1	p.133
7.2 appendice 2	p.169
7.3 appendice 3	p.177
8. ARTICOLI	p.180
8.1 articolo inviato per la pubblicazione durante il periodo di dottorato alla rivista <i>Genome Biology</i>	p.180

SOMMARIO

Le cellule eucariotiche hanno evoluto diversi meccanismi per un'efficiente omeostasi degli ioni metallici, sia essi siano essenziali e quindi indispensabili per il normale funzionamento della cellula, sia essi risultino tossici e dannosi anche alle più basse concentrazioni.

Il sequenziamento dell'intero genoma di *Saccharomyces cerevisiae* e l'alto grado di similarità funzionale tra i prodotti genici degli eucarioti inferiori e superiori ha permesso di capire come una comprensione dei meccanismi di detossificazione in un organismo modello come il lievito, possa essere applicata alle cellule umane, al fine di ottenere informazioni sugli stessi meccanismi regolativi conservati durante l'evoluzione tra le due specie.

In questo scenario si inserisce il mio lavoro di tesi, focalizzato sulla rilevazione dei globali processi cellulari che stanno alla base dei meccanismi di difesa alle specie metalliche, attraverso lo studio della risposta fenotipica (sensibilità e resistenza) della collezione di mutanti per delezione di *Saccharomyces cerevisiae* in presenza di cadmio e nichel, due metalli caratterizzati da distinte proprietà chimiche.

L'approccio *high throughput* utilizzato, ha permesso di analizzare in modo rapido ed efficiente il ruolo di tutti i prodotti genici non essenziali, nell'ambito dello stress provocato da metallo.

Solo dopo aver classificato i geni, coinvolti nella tolleranza a cadmio e nichel, in diverse e informative categorie funzionali e dopo averli analizzati in un contesto di dati di interattomica di *S. cerevisiae*, si sono identificati diversi *network* tra i prodotti genici, dalla quale sono emersi *pathway* cellulari già noti per la loro importanza nei meccanismi di detossificazione (ad es. morfogenesi del vacuolo) e nei sistemi di riparo dei danni provocati, all'interno del sistema cellulare di lievito (*pathway* biosintetico del GSH e degli aminoacidi solforati, meccanismi di difesa antiossidante, etc.), dai due ioni metallici.

Oltre a questi processi, ne abbiamo identificati altri che giocano un ruolo molto più generale nel promuovere la sopravvivenza cellulare sotto condizione di stress (metabolismo degli mRNA, trasporto nucleo-citoplasma, *uptake* di ioni Fe) e per la quale non era mai stato attribuito prima un ruolo all'interno dei sistemi di omeostasi di

cadmio e nichel, oltre all'identificazione di trasportatori non precedentemente associati con la loro tossicità (Pho88, Tat1, etc.).

Le maggiori differenze nelle risposte che le cellule adottano nei confronti di ioni cadmio e nichel, si ritrovano all'interno di uno stesso processo che regola il trasporto intracellulare delle proteine: un vasto set di mutanti (complessi ESCRT e retromero) il cui ruolo dei relativi prodotti genici deleti è importante in tale *pathway* cellulare, rivela come la *down* regolazione dei trasportatori di membrana e il traffico vescicolare verso specifici siti intracellulari (membrana plasmatica e vacuolo) influenzi in modo diversificato la cadmio e nichel tolleranza.

Come rivelato dal confronto con quattro addizionali specie metalliche (e una specie metalloide) la maggior parte dei nuovi processi implicati riflette le differenti proprietà chimiche dei mutanti esaminati, mentre altri esibiscono un certo grado di metallo specificità.

La proteina chimerica costituita da due varianti della GFP (*green fluorescent protein*), usata come *scaffold* molecolare per l'introduzione del gene codificante la metallotioneina (MT2a) di *Arabidopsis thaliana*, è stata realizzata come prototipo biosensore per la rilevazione di ioni metallici (zinco), basandosi sulla tecnologia FRET (*fluorescent resonance energy transfer*).

La sintesi e successiva purificazione della proteina hanno permesso di ottenere un estratto proteico, sottoposto poi ad analisi spettrofluorimetrica, che ha permesso di rilevare l'interazione del metallo ai residui cisteinici della MT dell'intero costrutto.

1. INTRODUZIONE

1.1 I metalli di transizione

I metalli di transizione sono un sottogruppo di elementi localizzati tra il gruppo IIA e il gruppo IIIA della tavola periodica degli elementi.

Tutti gli elementi di transizione sono metallici solidi (ad eccezione del mercurio che è liquido), hanno un'alta conducibilità elettrica e diversi stati di ossidazione.

Le specie metalliche in forma di ioni hanno la tendenza ad interagire coi sistemi viventi e in particolare si legano a specifici gruppi reattivi all'interno delle proteine cellulari; tra i fattori che influenzano la termodinamica del legame vi è l'effetto *HSAB* (*hard soft acid base*) che classifica gli atomi come acidi e basi di *Lewis*, *soft* o *hard* a seconda delle loro differenti proprietà chimiche (figura 1).

HARD
 SOFT
 BORDERLINE

H																	He
	2											13	14	15	16	17	
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe(II) Fe(I)	Co	Ni	Cu(II) Cu(I)	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	*	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb(IV) Pb(II)	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	#	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	110								

* lanthanide

La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

actinide

Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr
-----------	-----------	-----------	----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

Figura 1. Tavola periodica degli elementi che illustra la classificazione dei metalli in specie *hard* (colore nero), *soft* (colore grigio chiaro) e *borderline* (grigio scuro). Il rame, il ferro e il piombo possono rientrare sia nella categoria *hard* che *soft* a seconda del loro stato di ossidazione.

Pearson propose originariamente che il differente comportamento di certi gruppi di basi potesse essere attribuito alla loro differente polarizzabilità e classificò i metalli cationici (acidi) in accordo alla loro attitudine a formare complessi con ligandi *hard* (non polarizzabili) o ligandi *soft* (polarizzabili) (*Pearson*, 1963).

Un ulteriore evoluzione di questa classificazione venne descritta da *Nieboer* e *Richardson* che considerano l'elettronegatività, la carica e il raggio ionico del metallo nel determinare il loro comportamento *hard* o *soft* (*Nieboer et al.*, 1980).

In particolare le specie acide e basiche *hard* hanno diversi stati di ossidazione, sono poco polarizzabili e hanno un alto valore di elettronegatività. Gli ioni metallici appartenenti a questa categoria hanno la configurazione elettronica di un gas inerte e non tendono a subire ossidazione; esempi sono i cationi H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^+ , Mg^{2+} , Al^{3+} e Fe^{3+} .

Al contrario le basi e gli acidi definiti come *soft* sono polarizzabili, hanno bassa elettronegatività e tendono facilmente a subire ossidazione ed esempi sono gli ioni Cd^{2+} , Cu^+ e Hg^{2+} .

Molte delle specie metalliche bivalenti mostrano caratteristiche intermedie tra le due categorie *hard* e *soft* e vengono per questo motivo classificate come *borderline*. Esempi sono gli ioni Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} e Sn^{2+} .

Un'ulteriore classificazione distingue i metalloidi, ossia quelle specie ioniche, come quelle derivanti da arsenico e antimonio, che hanno proprietà sia metalliche che non metalliche.

Il principio *HSAB* predice che i metalli *hard*, generalmente non tossici e spesso essenziali per la crescita, si legano preferenzialmente ai ligandi contenenti ossigeno (ligandi *hard*), mentre i metalli *soft*, che spesso dimostrano grande tossicità, formano stabili legami con ligandi contenenti azoto o zolfo (ligandi *soft*). Il principio stabilisce anche che i legami formati tra i metalli e i ligandi *hard* sono di tipo ionico, mentre quelli del complesso metallo-ligando *soft* hanno carattere covalente (*Avery et al.*, 1993).

I metalli sono definiti essenziali quando sono necessari per la vita della cellula e il corretto funzionamento di molti dei suoi processi fisiologici; un esempio è il ferro, cofattore di numerosi enzimi che negli eucarioti superiori assicura il normale

funzionamento dell'emoglobina, necessaria per il trasporto dell'ossigeno dai polmoni a tutti i tessuti che necessitano di tale apporto.

Anche il rame funge da cofattore per molti enzimi (ad es. superossido dismutasi, citocromo ossidasi, etc.), permettendone l'attività all'interno della cellula.

Altri esempi appartenenti a questa categoria sono lo zinco che forma il centro catalitico di numerosi enzimi e ha un importante ruolo strutturale in un ampio *range* di proteine; il nichel, un cofattore di numerosi enzimi procariotici ed eucariotici inclusi ureasi, CO deidrogenasi, idrogenasi e metil coenzima M reduttasi (Farcasanu et al., 2005); il manganese, un elemento essenziale in tracce, costituente di diversi enzimi manganese-dipendenti trovati all'interno dell'apparato del Golgi e dei mitocondri (Yang et al., 2005); il cobalto, micronutriente essenziale come cofattore della vitamina B12 e di vari altri enzimi dei sistemi eucarioti, superiori ed inferiori, e procarioti (Schweyen et al., 2002).

Per queste loro importanti caratteristiche e per il ruolo giocato in diversi processi biochimici, l'abilità di un organismo ad accumulare tali specie metalliche, considerate quindi come oligoelementi essenziali, diviene critica per la sua salute.

Diverse patologie umane sono infatti associate ad un difetto nel reperimento di questi ioni essenziali, come emocromatosi, acrodermatite enteropatica, *Wilson* e *Menkes disease* (Eide J., 1998).

In natura esistono specie metalliche definite come non essenziali per la cellula e che possono dar origine ad effetti estremamente dannosi, anche alle più basse concentrazioni intracellulari.

All'interno di questa categoria troviamo gli ioni metallici Cd^{2+} riconosciuti come carcinogeni umani (*International Agency for Research on Cancer, European Union*), gli ioni Hg^{2+} la cui esposizione, negli esseri umani, causa severi danni al sistema nervoso centrale (Naganuma et al., 2000), e la specie metalloide arsenico, responsabile di numerosi stati patologici tra cui cancro alla pelle, ai polmoni e al fegato così come neuropatie e malattie cardiovascolari (Tamas et al., 2001).

Tale gruppo di elementi un tempo chiamati *heavy metals*, dove il termine *heavy* indica l'alta densità presentata da questi metalli (oggi tale terminologia non viene più usata in quanto i metalli non vengono più classificati in base a questa loro proprietà chimica),

rivestono un problema non trascurabile a causa del loro alto livello di tossicità, sia per i sistemi viventi, sia per gli ambienti naturali di cui sono i maggiori contaminanti.

Negli ultimi decenni infatti, l'inquinamento di suolo e acque è aumentato notevolmente a causa di varie attività tra cui combustioni di idrocarburi fossili, attività minerarie, uso di fertilizzanti e pesticidi.

I metalli depositati sulla terra, nelle acque e nei sedimenti sono soggetti a cicli che ne determinano una continua circolazione tra i vari comparti ambientali e, direttamente o attraverso la catena alimentare, possono accumularsi nei tessuti di tutti gli organismi viventi. L'inquinamento da metalli ha quindi un rilievo sanitario ed ambientale non trascurabile.

E' riconosciuto che il materiale genetico delle cellule sia estremamente sensibile alla presenza di tali specie metalliche, a causa della loro capacità di generare danni alle basi che compongono la catena nucleica, causando mutazioni nelle cellule somatiche umane in associazione con la formazione di tumori.

Il ruolo giocato dai metalli nella genesi del cancro non è del tutto risolto ma si ipotizza che il loro coinvolgimento nel processo di formazione dei radicali liberi possa essere pertinente con la carcinogenesi metallo-indotta, come rappresentato in figura 2 (Galaris et al., 2002).

Una alternativa linea di pensiero considera le proprietà co-mutagene dei metalli in associazione con altri agenti in grado di danneggiare il DNA (raggi UV o radiazioni ionizzanti): i metalli inibiscono gli enzimi responsabili del riparo del DNA causando un aumento dei danni insorti originariamente dalla presenza di altri agenti o sorti spontaneamente dal normale metabolismo cellulare (Beyersmann, 2002).

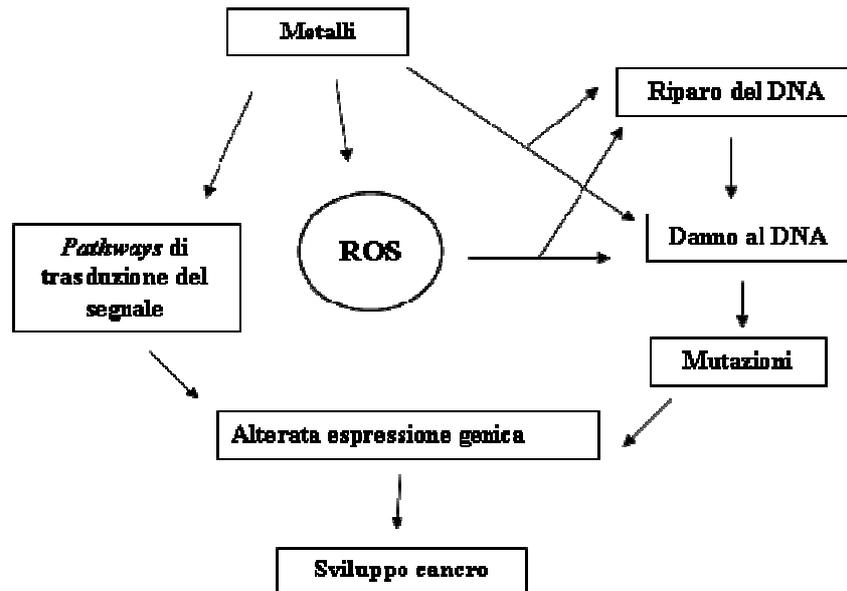


Figura 2. Schema generale della carcinogenesi indotta dai metalli. I metalli possono indurre un danno al DNA sia direttamente o indirettamente attraverso la formazione di specie radicaliche dell'ossigeno (ROS). La maggior parte del DNA danneggiato viene riparato da efficienti meccanismi cellulari mentre solo una piccola parte guida a mutazioni. I cambi nei livelli di ROS possono influenzare l'equilibrio redox cellulare che può avere un effetto su diversi *pathways* di trasduzione, che porta all'attivazione o inattivazione di fattori di trascrizione. Sia le mutazioni che i fattori trascrizionali possono modulare l'espressione di una varietà di geni che giocano un ruolo nel processo di trasformazione cellulare, guidando in ultima analisi allo sviluppo del cancro.

I sistemi cellulari e gli interi organismi di cui fanno parte, interagiscono con gli ioni metallici fin dall'inizio della loro esistenza ed è per questo che la cellula ha evoluto diversi e complessi sistemi che governano la loro omeostasi.

La cellula necessita di sistemi per contrastare la tossicità delle specie metalliche non essenziali, ma anche per arginare un aumento della concentrazione di quelle essenziali al di sopra dei livelli fisiologici, i cui conseguenti effetti tossici sulla cellula possono essere di pari entità rispetto a quelli provocati dai metalli considerati non essenziali per definizione.

Un esempio è il ferro che, sebbene sia implicato in diversi processi fisiologici importanti per la cellula come il trasporto dell'ossigeno, la fosforilazione ossidativa e il

metabolismo degli xenobiotici, può dar origine a diversi stati patologici, come cancro e malattie neurodegenerative, quando i livelli intracellulari superano la soglia considerata fisiologica, e quindi tollerata, per la cellula (Nelson N., 1999).

Anche il rame ad alte concentrazioni è in grado di portare alla formazione di radicali liberi e promuovere la perossidazione lipidica, portando ad un rapido declino dell'integrità delle membrane biologiche (Avery et al., 1996).

L'esposizione prolungata al manganese invece, porta all'insorgere del "manganismo", un disordine neurologico che presenta caratteristiche simili al morbo di *Parkinson* (Yang et al., 2005).

A livelli tossici il nichel inibisce la sintesi di macromolecole, altera il metabolismo dei carboidrati ed interferisce con il ruolo di altri elementi come il magnesio e il ferro (Farcasanu et al., 2005), mentre l'esposizione a dosi eccessive di cobalto è causa di malattie umane come dermatite da contatto, fibrosi intestinale e cancro ai polmoni (Schweyen et al., 2002).

1.2 Omeostasi dei metalli in *Saccharomyces cerevisiae*

Tuttora ancora poco è conosciuto circa i complessi meccanismi che regolano l'omeostasi dei metalli all'interno delle cellule umane.

L'alto grado di similarità, sia funzionale, che strutturale tra i prodotti genici degli eucarioti inferiori e superiori e il sequenziamento dell'intero genoma di *Saccharomyces cerevisiae*, ha permesso di capire come una comprensione dei meccanismi di detossificazione in un eucariote inferiore come il lievito, possa essere applicata alle cellule umane, al fine di ottenere informazioni sugli stessi meccanismi regolativi conservati durante l'evoluzione tra le due specie.

1.2a Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* come organismo modello

Nel 1960 il lievito *Saccharomyces cerevisiae* è stato riconosciuto come organismo modello per le tecniche utilizzate in biologia molecolare. Nel 1980 le sue funzioni cellulari vengono sfruttate per la prima applicazione in ambito farmaceutico, ossia la produzione del vaccino per l'epatite B. Nel 1996 l'intero genoma di questo organismo eucariote viene dettagliatamente sequenziato, portando alla scoperta delle sue 12 Mb organizzate in 16 cromosomi e codificanti circa 6000 geni (Goffeau et al., 1996; Dujon, 1996).

Tramite dirette tecniche sperimentali e analisi di omologia con altri organismi si è arrivati ad avere informazioni funzionali per circa il 70% delle sue *open reading frames* (ORF), mentre per il 7%, sebbene sia presente un omologo in un organismo superiore, una chiara funzione non è ancora stata attribuita (ORF non caratterizzate). Per la restante porzione di geni invece, nulla si conosce (ORF orfane) e spetta agli scienziati il difficile compito di prevedere una struttura e una funzione per la rispettiva proteina codificata dal gene.

E' la potenzialità fornita dalla genetica del lievito a farlo divenire un modello sperimentale per gli studi di genetica e biologia molecolare. Il lievito può alternare uno stato diploide a uno stato aploide, permette alla sua vitalità di non richiedere particolari condizioni di crescita (colture di crescita semplici ed economiche) e può adattarsi sia ad un ambiente aerobico che anaerobico.

Negli anni la biologia molecolare di questo organismo è stata studiata in dettaglio, e si hanno a disposizione diversi plasmidi e regioni promotore per lo studio dell'espressione genica in questo sistema cellulare.

Diverse procedure sono state utilizzate per predire e assegnare ad ogni gene una specifica funzione e queste comprendono tecniche di *forward genetics* (il fenotipo indotto dalla mutazione è seguito dalla complementazione del gene) e *reverse genetics* (l'identificazione di un gene mediante conservazione della sequenza seguita dalla sua mutagenesi per determinarne il ruolo biologico).

L'assegnazione della funzione ad ogni gene è stata condotta anche tramite analisi di interazioni fisiche (*two-hybrid assay*) e genetiche (*synthetic lethality*), profili

trascrizionali (*microarray*) ed espressione eterologa in organismi ospiti (Liu et al., 2004).

Attraverso precisi e potenti programmi di analisi (*BLAST*) gli scienziati hanno potuto confrontare le sequenze nucleotidiche del genoma di *S. cerevisiae* con quelle umane per scoprire che accanto a molte sequenze divergenti esistono diverse zone con un alto grado di somiglianza; circa un terzo del genoma di *S. cerevisiae* ha infatti ortologi umani e molte porzioni di queste regioni contengono geni che in uomo sono associati a gravi condizioni patologiche ereditabili come fibrosi cistica, cancro del colon e distrofia miotonica (Pearsons et al., 2003).

Tra i due tipi di organismi quindi il percorso evolutivo ha permesso di mantenere inalterati molti dei processi cellulari di base, così come l'architettura e l'organizzazione della cellula, consentendo a questo eucariote inferiore di divenire un utile sistema modello per lo studio delle funzioni cellulari degli eucarioti superiori, così come per l'analisi delle risposte metaboliche ottenute in presenza di stimoli esterni, sia chimici che fisici. Il lievito è infatti un eccellente modello per lo studio della risposta a vari agenti citotossici ed è disponibile per lo *screening* di piccole molecole chimiche (Que et al., 2002).

Grazie allo *status* eucariote della cellula di *S. cerevisiae*, lo studio dell'espressione genica in tale organismo serve come paradigma per l'espressione genica degli eucarioti superiori. Il potente uso di oligonucleotidi o *DNA array* (*DNA chips*) ha permesso infatti di analizzare il *pattern* di espressione genica in differenti condizioni di crescita (DeRisi et al., 1997; Lashkari et al., 1997).

Il completamento del sequenziamento di *S. cerevisiae* ha fornito ulteriori tecniche di indagine alla già vasta gamma di strumenti a disposizione degli scienziati.

Un consorzio internazionale di laboratori ha infatti cooperato per eliminare ognuna delle 6000 ORF conosciute di *S. cerevisiae*, usando una tecnica di ricombinazione omologa basata su PCR, al fine di sostituirle con un *marker* di resistenza ad un antibiotico (geneticina) (fig. 3) (Giaever et al., 2002).

Sul totale di 6000 ORF, circa 1100 geni vengono trovati essere essenziali per la vitalità dei mutanti aploidi di *S. cerevisiae* (Desmoucelles et al., 2002).

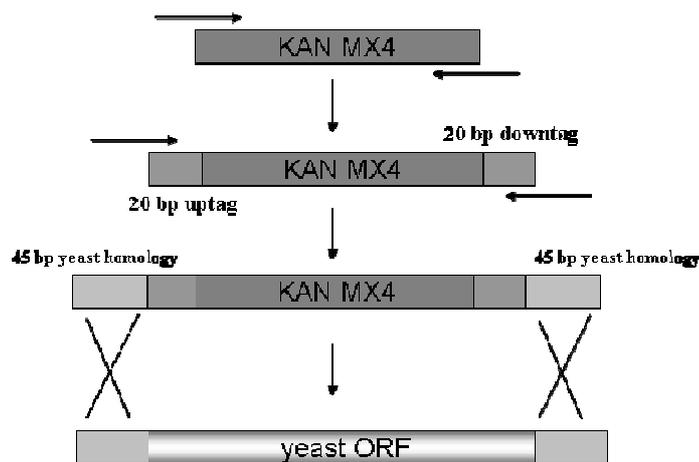


Figura 3. Strategia di realizzazione dei mutanti per delezione di *Saccharomyces cerevisiae*. Ogni gene viene deletato dal codone di *start* al codone di stop (non inclusi) e sostituito con la cassetta KanMX4 che conferisce resistenza alla genitocina. Il primo *round* di PCR incorpora due sequenze, da 20 bp ciascuna (*UPTAG* e *DOWNTAG*), a fianco della cassetta di delezione KanMX4. Il secondo *round* di PCR incorpora sequenze omologhe (*yeast homology*) corrispondenti all'estremità di ogni particolare gene di cui si vuole effettuare la delezione (*yeast ORF*), per permettere l'integrazione della cassetta mediante tecniche di ricombinazione omologa.

Queste collezioni di mutanti per delezione, hanno permesso l'inizio di studi fenotipici *high throughput* sull'intera cellula di lievito, dove l'attività di un putativo composto ha modo di operare all'interno di tale sistema cellulare, che ne favorisce la conformazione nativa e la sua associazione con specifici cofattori.

Uno certo numero di gruppi di ricercatori ha saggiato la sensibilità di ogni singolo mutante della collezione di lievito a diversi composti, per scoprire i *pathway* e le funzioni cellulari influenzate dal trattamento stesso e fornire indicazioni sul meccanismo d'azione intracellulare (Bennett et al., 2001; Shoemake et al., 1996; Fleming et al., 2002).

La cellula di lievito è divenuta utile anche nell'ambito biotecnologico e farmaceutico come strumento nella produzione di proteine eterologhe allo stato nativo, utilizzando tutte le modificazioni post-traduzionali permesse da questo organismo.

1.2b Tossicità delle specie metalliche in *Saccharomyces cerevisiae*

I differenti metalli esplicano la loro tossicità sul sistema cellulare del lievito attraverso modalità differenti d'azione, che riflettono le loro peculiari caratteristiche chimico-fisiche e la loro diversa reattività nei confronti di certi gruppi attivi.

In generale in *S. cerevisiae* i metalli definiti come tossici o un aumento delle concentrazioni delle specie definite essenziali, esercitano un'azione dannosa sulla vita cellulare principalmente attraverso due meccanismi:

- sono in grado di reagire con le macromolecole biologiche alterando la loro funzionalità.
- portano alla formazione di radicali liberi, in particolare specie radicaliche dell'ossigeno (ROS), in grado di catalizzare un deterioramento ossidativo dei principali costituenti cellulari.

Grazie alle loro caratteristiche chimiche di acidi *soft* di *Lewis*, i metalli come cadmio e mercurio e la specie metalloide arsenico, hanno un'elevata affinità per il gruppo tiolico e l'azoto imidazolico dei residui rispettivamente di cisteina e istidina di tutte le proteine cellulari.

Il legame covalente che si forma tra il metallo e il gruppo funzionale dell'amminoacido, porta ad una perturbazione della struttura della proteina corrispondente e in ultima analisi ad un'alterazione dell'attività funzionale della stessa.

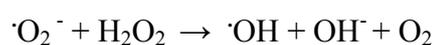
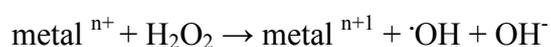
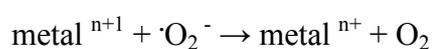
Lo ione tossico, a causa di somiglianze nella chimica di legame e di coordinazione, può inoltre sostituirsi a specie metalliche essenziali, all'interno del centro catalitico della catena polipeptidica. Ad esempio, il cadmio, essendo chimicamente molto simile allo zinco e al calcio, interferisce con la loro omeostasi e si sostituisce nei meccanismi di trasporto e nei siti di legame (Kiss et al., 1994).

Oltre ad impedire il corretto svolgersi dell'attività catalitica dell'enzima, il metallo tossico sostituendosi al metallo essenziale, rende quest'ultimo libero all'interno della cellula alterandone la concentrazione che può divenire quindi non fisiologica.

Una delle principali cause da sempre riconosciute e associate alla tossicità dei metalli di transizione nelle cellule degli eucarioti, è la formazione di radicali liberi, in particolare

dell'ossigeno (*reactive oxygen species*, ROS), specie contenenti uno o più elettroni spaiati nell'orbitale esterno e per tale ragione altamente reattivi verso i costituenti cellulari (proteine, lipidi e DNA). Due metalli di transizione redox attivi in particolare, ferro e rame, sono responsabili della produzione della maggior parte di radicali idrossilici, $\cdot\text{OH}$, una forma estremamente reattiva di ROS in grado di innescare la perossidazione dei lipidi nelle membrane biologiche.

Il meccanismo generale è fornito dalla reazione di *Fenton/Haber-Weiss* in cui l'ossigeno molecolare, una sua forma parzialmente ridotta (l'anione superossido $\cdot\text{O}_2^-$) e il perossido d'idrogeno servono come substrati.



In questa reazione uno ione metallico, ridotto dall'anione superossido ($\cdot\text{O}_2^-$), è in grado di reagire con il perossido d'idrogeno per generare il radicale idrossilico (Bal et al., 2002). L'unico prerequisito richiesto è che la specie metallica, che funge da agente riducente, abbia due stati di ossidazione vicini e disponibili nelle stesse condizioni.

Gli unici ioni metallici in grado di partecipare a tale reazione redox sono Fe (II), Cu (I) e Co (II) (lo ione nichel è in grado di reagire con i perossidi solo quando è legato a residui di cisteina e istidina, condizione che permette la sua ossidazione da Ni^{2+} a Ni^{3+}) (Galaris et al., 2002).

I metalli come cadmio, mercurio e i metalloidi come l'arsenico non appartengono a tale categoria redox attiva, ma possono comunque, in maniera indiretta, portare alla produzione di ROS. È noto infatti che tali ioni sostituendosi a ferro e rame nei siti catalitici delle proteine, li rendano disponibili per la produzione dei radicali all'interno della cellula.

Inoltre gli ioni metallici non essenziali, specie quelli della categoria *soft*, interagendo e quindi interferendo con la normale struttura delle proteine sono in grado di inibire le normali difese antiossidanti della cellula (fornite ad esempio da enzimi come la superossido dismutasi o la glutatione perossidasi/reduccasi, etc.) rendendo possibile uno

squilibrio dello stato redox e quindi un aumento della concentrazione delle ROS intracellulari.

La tossicità dello ione mercurio, ad esempio, è attribuita alla sua abilità a reagire e a ridurre i gruppi sulfidrilici, contenuti principalmente all'interno della struttura del glutatione (GSH), il più importante fattore in grado di mantenere l'omeostasi redox, guidando alla formazione di uno stato di stress ossidativo intracellulare (Stohs et al., 1995).

Anche le due forme ioniche attraverso la quale è presente l'arsenico all'interno della cellula, As (III) e As (V), formano complessi con il GSH che porta ad una sua diminuzione citosolica; inoltre i complessi As-GSH che si formano possono inibire una varietà di enzimi GSH dipendenti come la glutatione reduttasi (Galaris et al., 2002).

Analogamente a quanto succede per le cellule umane, le specie altamente reattive formatesi all'interno della cellula di lievito, sono potenzialmente in grado di indurre la perossidazione dei lipidi, di alterare i *pathway* di trasduzione dei segnali, di portare ad una deplezione dei gruppi sulfidrilici e di indurre un danno al DNA.

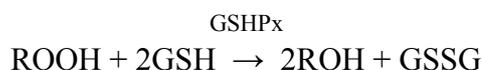
1.2c Meccanismi molecolari che regolano le difese cellulari agli ioni metallici in *Saccharomyces cerevisiae*

Nelle cellule procariotiche il sistema maggiormente utilizzato per contrastare l'effetto tossico degli ioni metallici è la produzione di sistemi in grado di trasportare tali sostanze all'esterno della cellula (codificati da geni plasmidici) mentre negli eucarioti inferiori il meccanismo predominante di detossificazione è quello che coinvolge il sequestro intracellulare.

Grazie alla estrema reattività dei metalli, specie quelli *soft*, con i gruppi tiolici dei residui di cisteina, due diverse tipologie di componenti, il glutatione e la famiglia di metallotioneine giocano un ruolo essenziale nel sequestro intracellulare degli ioni metallici.

Il glutatione (GSH) è un tripeptide composto da acido glutamico, cisteina e lisina, rappresenta l'esempio meglio conosciuto di difesa antiossidante non-enzimatica all'interno della cellula ed è in grado di reagire attraverso il suo gruppo tiolico con

diversi composti, fungendo da substrato per l'azione catalitica della glutatione perossidasi (GSHPx).



La forma ossidata del glutatione (GSSG) viene convertita nella forma ridotta grazie all'azione della glutatione reduttasi, che usa NADPH come agente riducente. Il glutatione forma anche complessi con diverse sostanze elettrofile sfruttando l'azione della glutatione S-transferasi (GST); la coniugazione con il GSH è un aspetto fondamentale del metabolismo di varie tipologie di xenobiotici ed è considerato come parte del loro meccanismo di detossificazione. Ad esempio gli ioni cadmio, arsenico e mercurio formano addotti cellulari GSH-Me che vengono importati all'interno di compartimenti intracellulari, come il vacuolo, al fine di diminuirne la concentrazione citosolica.

I geni coinvolti nella biosintesi del glutatione vengono regolati trascrizionalmente da varie tipologie di xenobiotici come ioni metallici, composti in grado di generare specie reattive dell'ossigeno come menadione e tert-butilidrochinone, ma anche da situazioni di stress differenti come *heat shock* (Dickinson et al., 2002).

La seconda tipologia di proteine coinvolte nel mantenimento di normali livelli di ioni metallici all'interno della cellula di *Saccharomyces cerevisiae*, sono le proteine a basso peso molecolare (6Kda) ricche di gruppi tiolici, chiamate metallotioneine (MT) (vedere sezione 1.2d).

L'azione delle MT si esplica grazie all'azione chelante fornita dagli abbondanti residui di cisteina presenti all'interno della struttura proteica (un terzo dei loro residui amminoacidici sono cisteine) ed è considerata giocare un ruolo essenziale in processi come la detossificazione dei metalli, la regolazione del metabolismo dei metalli essenziali e durante lo *scavenging* dei radicali liberi (Sato et al., 2002).

Le MT hanno grande affinità per gli ioni Zn^{2+} , Cd^{2+} e Hg^{2+} e sono indotte da un innalzamento delle concentrazioni di questi ioni, mentre non proteggono la cellula dalla

tossicità mediata da nichel o cobalto, indicando che il meccanismo di difesa è relativo ad un limitato *range* di ioni metallici tossici.

Oltre al GSH e alle MT anche altri composti fungono da potenziali ligandi nei confronti delle specie metalliche, come ad esempio acidi carbossilici (malico e citrico) e amminoacidi (istidina) in grado quindi di giocare un ruolo nella tolleranza e nella detossificazione nei confronti di queste specie tossiche (Hall J.L., 2002).

Alcuni dei geni di *S. cerevisiae* identificati sulla base della loro abilità a conferire resistenza ai metalli, codificano per proteine con domini in grado di attraversare le membrane cellulari, sia quella plasmatica che quella degli organuli intracitoplasmatici. Questi trasportatori esercitano la loro azione di vere e proprie “pompe proteiche” in grado di mediare l'*uptake* dei metalli in compartimenti che fungono da loro sito di deposito, oppure per l'esporto degli ioni metallici all'esterno della cellula, con lo scopo comune di diminuirne la concentrazione intracellulare al di sotto dei valori tollerati dalla cellula di lievito.

Un esempio di tali depositi sono i vacuoli, strutture dinamiche circondate da un doppio strato lipidico (tonoplasto) caratterizzati da un ambiente interno mantenuto a valori acidi. Contiene enzimi come le endopeptidasi, le aminopeptidasi e le carbossipeptidasi che hanno un ruolo nel processo proteolitico all'interno di questo organello (Teichert et al., 1989; Scott et al., 1997; Distel et al., 1983).

Malgrado il loro ruolo nel processo degradativo, i vacuoli sono coinvolti in altre differenti funzioni fisiologiche come ad esempio nel deposito di amminoacidi, polifosfati e cationi metallici.

Un esempio di trasportatore vacuolare è la proteina di *S. cerevisiae* codificata dal gene *YCF1*, appartenente alla superfamiglia di trasportatori legati all'ATP (*ATP binding cassette superfamily*), localizzata nella membrana vacuolare dove media il trasporto ATP dipendente dei coniugati GSH-Me all'interno di questo compartimento intracellulare (Li et al., 1997). Tale trasportatore è in grado infatti di catalizzare l'*uptake* all'interno del vacuolo di complessi formati dalla coniugazione del glutatione con diverse specie metalliche come gli ioni cadmio, arsenico e mercurio (Rosen et al., 2002, Gueldry et al., 2003, Li et al., 1997).

Altri esempi di trasportatori vacuolari presenti nelle cellule di lievito sono rappresentati da Zrc1 e Cot1, proteine transmembrana che conferiscono resistenza rispettivamente agli ioni zinco e cobalto (Perego et al., 1997).

Ancora, un putativo trasportatore di metalli codificato dal gene *PMRI*, membro della famiglia di ATP-asi di tipo P, è localizzato nella membrana dell'apparato del Golgi dove regola il livello citosolico di calcio e manganese (Lapinskas et al, 1995).

Nel lievito *S. cerevisiae* il gene *ACR3* codifica per una proteina della membrana plasmatica che catalizza l'estrusione di ioni arsenito [As (III)] all'esterno della cellula (Rosen et al., 2002).

Come precedentemente detto, i metalli possono originare in maniera diretta o indiretta uno stato di stress ossidativo intracellulare. Risulta chiaro quindi che diversi componenti a funzione antiossidante sono in prima linea tra i sistemi di detossificazione delle specie metalliche.

Queste si dividono in difese non enzimatiche, come il glutatione e le metallothioneine, ma anche la tioredossina e la glutaredoxina, entrambe piccole proteine contenenti residui critici di cisteina in grado di agire da riducenti per la loro attività di *scavenging* nei confronti dei radicali liberi. Queste proteine fungono da sorgenti di elettroni per enzimi quali la tioredossina e la glutaredoxina perossidasi, che ne catalizzano il trasferimento a specie reattive come l'anione superossido e i radicali idrossilici.

Anche la componente lipidica delle membrane riveste un ruolo di difesa non enzimatico, all'attacco dei ROS: un aumento degli acidi grassi saturi rispetto a quelli insaturi rende il doppio strato lipidico meno suscettibile all'attacco ossidativo dei radicali (Howlett et al., 1997).

Le difese antiossidanti enzimatiche, invece, comprendono proteine come la catalasi, che catalizza la reazione di scissione del perossido d'idrogeno a H₂O e O₂, e la superossido dismutasi che presiede la reazione di dismutazione che converte l'anione superossido in H₂O₂ e O₂.

Anche gli enzimi della via metabolica dei pentoso fosfati sono cruciali per le difese antiossidanti della cellula in quanto forniscono il potere riducente sottoforma di NADPH necessario per convertire le forme ossidate di GSH e TRX nella forma ridotta per le successive reazioni con i ROS (Jamieson et al., 1998).

Al variare delle concentrazioni intracellulari di diverse specie metalliche, le cellule di lievito rispondono regolando i geni che mediano vari aspetti della loro omeostasi intracellulare.

Questa regolazione avviene principalmente a livello trascrizionale: in condizioni di deprivazione di un particolare metallo verranno de-repressi i geni che codificano componenti coinvolti nel loro *uptake*, mentre in condizioni di *surplus* del metallo l'espressione di tali geni verrà inibita.

Conosciuti e specifici fattori di trascrizione regolano la sensibilità delle cellule di *S. cerevisiae* al variare delle concentrazioni di differenti ioni metallici come rame, ferro, cadmio e zinco (fig. 4).

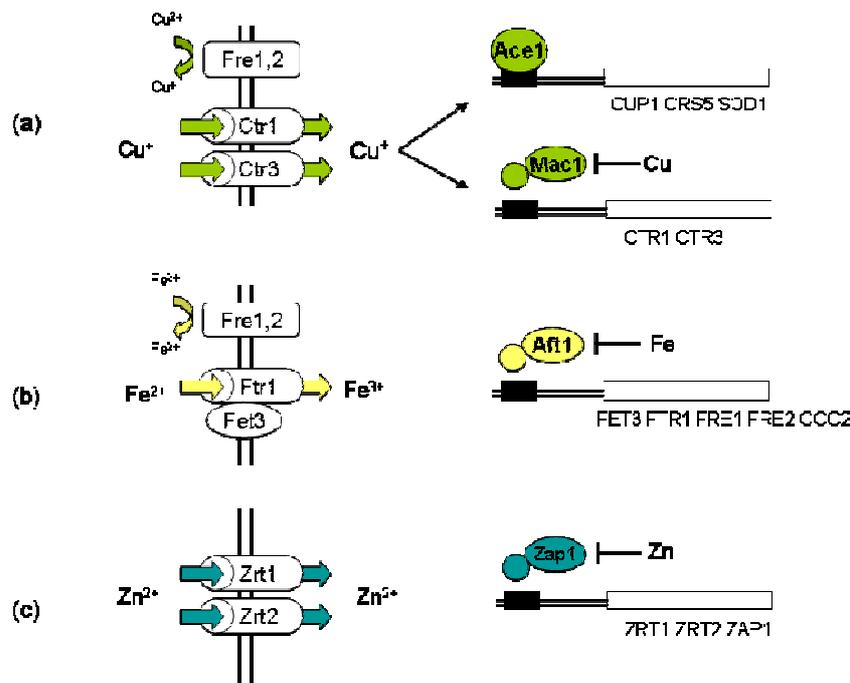


Figura 4. Pathway metalloregolativo in *S. cerevisiae*. (a) Due distinti fattori di trascrizione (Ace1 e Mac1) regolano l'espressione genica in funzione delle diverse concentrazioni di rame: Ace1 media l'attivazione dei geni coinvolti nella detossificazione di ioni Cu, mentre in condizioni di carenza di rame, Mac1 stimola la trascrizione dei geni i cui prodotti sono coinvolti nell'*uptake* dei rispettivi ioni. (b) Aft1 e Zap1 (c) mediano l'espressione dei geni in condizioni, rispettivamente di ferro e zinco carenza nel *medium* di crescita. Le metalloreduttasi Fre1 e Fre2 mobilizzano gli ioni Cu e Fe nell'ambiente attraverso la loro riduzione a Cu (I) e Fe (II). I domini di legame al DNA sono rappresentati da box di colore nero, mentre i geni espressi dagli specifici fattori sono elencati a fianco.

Il fattore di trascrizione Ace1 attiva l'espressione genica in risposta ad un innalzamento, al di sopra delle condizioni fisiologiche, delle concentrazioni di rame e i geni regolati sono deputati al sequestro e/o alla protezione verso tali ioni Cu^{2+} come per esempio i geni *CUP1* e *CRS5* che codificano due membri della famiglia di metallotioneine, e il gene *SOD1* che codifica per la superossido dismutasi.

Una condizione di rame deficienza intracellulare, al contrario, attiva il fattore di trascrizione Mac1 che protegge la cellula da una condizione di *starvation* di tale ione essenziale, regolando l'espressione del sistema di *uptake* ad alta affinità codificato dalle due permeasi Ctr1 e Ctr3 (Rutherford et al., 2004).

Un membro della famiglia di fattori di trascrizione di lievito omologhi alla famiglia c-jun dei mammiferi, Yap1, partecipa al controllo e al mantenimento dei normali livelli di ioni cadmio all'interno della cellula. L'attività trascrizionale di Yap1 porta all'espressione di diversi componenti coinvolti nell'omeostasi del cadmio come il trasportatore vacuolare Ycf1, la glutamil cistein sintetasi Gsh1, il primo enzima della via biosintetica del glutatione e Trx2 che codifica una delle due tioredossine prodotte in lievito (Vido et al., 2001; Perego et al., 1997; Adamis et al., 2004).

Anche per lo ione zinco è conosciuto esistere un meccanismo in grado di mantenere la concentrazione fisiologica di tale ione: il fattore Zap1 infatti incrementa l'espressione dei due sistemi di *uptake*, Zrt1 e Zrt2 ad alta affinità, e Fet4 a bassa affinità, in condizioni limitanti di zinco, mentre la sua attività viene repressa non appena la concentrazione del metallo aumenta all'interno della cellula (Rutherford et al., 2004).

In lievito la concentrazione di zinco è sottoposta anche ad una rapida regolazione attraverso il controllo a livello post-traduzionale dell'attività del trasportatore Zrt1: la proteina presente a livello della membrana plasmatica (condizioni zinco limitanti) viene indirizzata, attraverso il *pathway* endocitotico, al vacuolo per la sua degradazione quando si ha sovraccumulo intracellulare del metallo, prevenendone quindi un'ulteriore *uptake* all'interno della cellula (Eide, 2003).

Questa modalità di regolazione post-traduzionale, adottata da *S. cerevisiae* per il controllo di altri trasportatori coinvolti nell'*uptake* di diverse specie metalliche, fornisce rispetto al controllo a livello di espressione genica, il vantaggio di una più

rapida risposta al variare dei repentini cambiamenti di concentrazione di tali ioni metallici.

Come già ampiamente discusso, uno dei meccanismi con cui si esplica la tossicità dei metalli tossici e in particolare di quelli *soft* come il cadmio, è quello di danneggiare le macromolecole biologiche attraverso il loro legame ai gruppi sulfidrilici e istidinici delle catene laterali delle proteine.

Se da una parte questa proprietà intrinseca dei metalli a reagire con gruppi reattivi è sfruttata da molti sistemi ad azione detossificante per la chelazione e quindi la diminuzione della loro reattività potenzialmente dannosa, dall'altra parte molti substrati proteici vengono danneggiati da questa interazione e resi funzionalmente inattivi a causa di un guasto al loro sito catalitico e/o strutturale.

L'esposizione a tali metalli, proprio a causa dell'aumento del *pool* di proteine aberranti, porta all'induzione dei componenti del *pathway* di degradazione proteica ubiquitina dipendente, attraverso un innalzamento della loro espressione a livello genico per permettere un aumento del *turnover* proteico intracellulare (Joern et al., 1993).

1.2d Metallotioneine

Le metallotioneine (MT) sono proteine ricche in residui di cisteina nella quale i gruppi sulfidrilici (SH), prevalentemente in forma ridotta, sono responsabili dell'azione chelante nei confronti di metalli e di specie radicaliche (ad es. ROS).

Le metallotioneine di tutti i sistemi cellulari di cui fanno parte, esercitano una sorta di "potere tampone" nei confronti delle specie metalliche essenziali: in presenza di elevate concentrazioni intracellulari di oligoelementi, quali rame e zinco, le MT guideranno alla secrezione extracellulare di tali ioni a differenza di una situazione di deprivazione, nella quale i metalli legati da tali proteine verranno resi disponibili per il metabolismo cellulare.

Inoltre la sintesi delle MT metallo dipendente, rende tali proteine importanti nella regolazione della concentrazione di specie non essenziali come cadmio e mercurio (Vallee et al., 1993).

Dall'analisi della struttura delle MT di mammifero si evidenzia una caratteristica conformazione in cui sono presenti due domini (dominio α e dominio β) che, attraverso i gruppi sulfidrilici presenti, coordinano rispettivamente quattro e tre ioni metallici. I due *cluster* sono separati da una breve regione *linker* di 2-3 aminoacidi (figura 5).

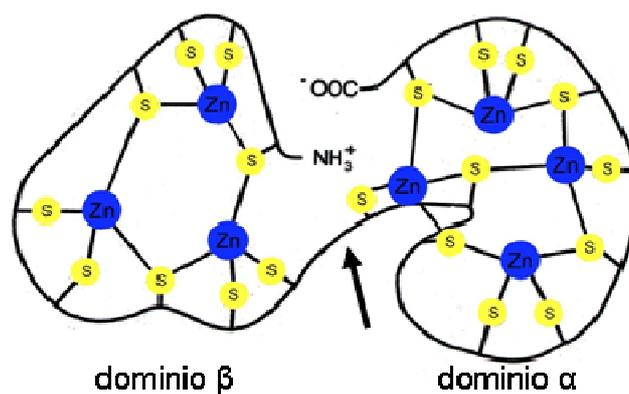


Figura 5. Rappresentazione dei due domini delle MT di mammifero leganti tre ioni Zn^{2+} nel *cluster* β (M_3Cys_9) e quattro ioni Zn^{2+} nel *cluster* α (M_4Cys_{11}). La freccia indica la regione *linker* di unione tra i due domini strutturali.

Gli ioni metallici si legano prima al *cluster* α e poi a quello β , attraverso un'interazione cooperativa nella quale il legame di un primo ione metallico catalizza il legame del secondo ione che si lega al dominio. La presenza del metallo determina la struttura tridimensionale della proteina, come è stato dimostrato da indagini spettroscopiche, studi cristallografici e di NMR bidimensionale (Scudiero et al., 2005; Chan et al., 2005; Vasak M., 1998).

La formazione di legami metallotiolici tra le cisteine e gli atomi di metallo causa il ripiegamento della catena polipeptidica che non presenta α eliche e foglietti β (figura 6).

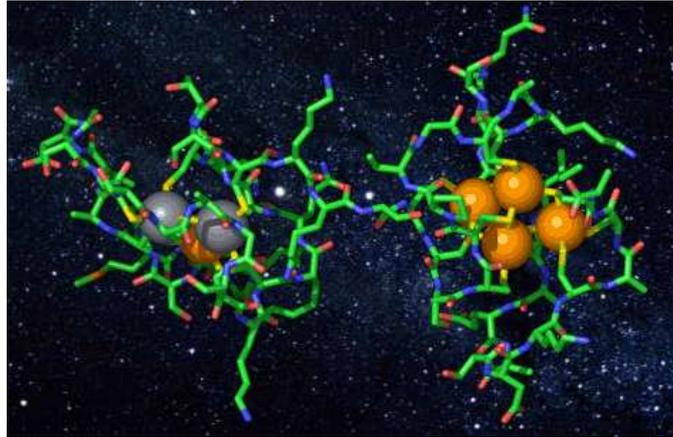


Figura 6. Struttura della MT di mammifero. Le sfere rappresentano gli atomi di metallo: in grigio sono rappresentati gli atomi di cadmio, in arancio quelli di zinco.

L'affinità per le MT animali alle diverse specie metalliche segue l'ordine $Zn < Cd < Cu < Hg-Ag$ (Kagi et al., 1960).

Esistono quattro isoforme di MT di mammifero che presentano la stessa distribuzione di cisteine all'interno della loro sequenza amminoacidica e sono espresse in differenti tessuti all'interno dell'organismo.

L'espressione delle MT di mammifero è indotta, a livello trascrizionale da alte concentrazioni di ioni metallici quali Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} e Ag^{2+} .

Il fattore di trascrizione che regola l'espressione metallo indotta di queste proteine è MTF-1 (*metal transcription factors-1*) che si lega a specifici elementi di sequenza (*metal responsive element, MRE*) presenti a monte della regione promotore del gene codificante la MT (Sato et al., 2002).

In questa regione del gene delle MT esistono anche altri elementi di risposta a diversi stress, giustificando il ruolo protettivo adottato da queste proteine non solo verso i metalli tossici come cadmio e mercurio, ma anche verso diverse perturbazione delle condizioni ambientali in cui la cellula viene a trovarsi.

I geni codificanti metallotioneine sono stati ritrovati nel regno animale e vegetale, ma anche in funghi ed alcuni cianobatteri.

Le MT vegetali possono essere classificate in quattro categorie a seconda della distribuzione dei residui di cisteina nei domini di legame al metallo e della lunghezza del *linker* che unisce i due *cluster*. Esistono sostanziali differenze tra i quattro gruppi

classificati delle MT vegetali in contrasto con l'alta omologia di sequenza presentata dalle isoforme di mammifero; le diverse proteine della famiglia di MT di pianta potrebbero quindi essere implicate in differenti funzioni intracellulari.

I geni codificanti proteine MT identificati in pianta sono state ritrovate in diverse specie di angiosperme come *Arabidopsis thaliana*, riso e canna da zucchero.

La funzione delle metallotioneine di pianta non è ancora stata determinata con esattezza a causa della difficoltà nel loro isolamento (sono estremamente instabili in presenza di ossigeno), ma attraverso analisi indirette si è potuto ipotizzare un ruolo MT-like nella tolleranza agli ioni metallici e nell'omeostasi di specie essenziali come gli ioni Cu.

L'espressione eterologa dei geni codificanti le MT di pianta in mutanti di lievito in cui l'endogena metallotioneina viene distrutta, è in grado infatti di complementare la mutazione e revertire quindi il fenotipo di ipersensibilità di tali ceppi mutanti nei confronti di specie metalliche come Cu e Zn (Zhou et al., 1994).

1.3 Tossicità e omeostasi del cadmio in cellule umane e in cellule di *Saccharomyces cerevisiae*

Il cadmio è stato riconosciuto come carcinogeno umano dalla *World Health Organization's International Agency For Research on Cancer* e dal *National Toxicology Program* degli Stati Uniti (*World Health Organisation*, WHO, 1992).

Il cadmio è presente in molti processi industriali e per tale motivo la sua disponibilità sulla crosta terrestre è variata notevolmente in funzione della continua e crescente antropizzazione.

La tossicità del cadmio supera notevolmente quella di molti altri metalli di transizione e a differenza di quelli essenziali, che a basse concentrazioni forniscono funzioni importanti per la cellula, il cadmio non subisce bio-trasformazioni, non ha funzioni biologiche, e risulta sempre nocivo, anche a basse concentrazioni intracellulari.

Le esposizioni umane a tale carcinogeno sono varie e includono quelle derivanti dal suo utilizzo nelle industrie, nella produzione di certe tipologie di batterie, leghe, ceramiche e vernici e nel consumo di prodotti del tabacco e prodotti alimentari.

La tendenza di molte specie vegetali di tollerare e accumulare metalli non essenziali, come il cadmio, determina un suo conseguente passaggio attraverso la catena alimentare (Dietz et al., 2000).

L'uomo ne viene quindi a contatto, principalmente per inalazione delle sue polveri o per ingestione diretta e oltre ad entrare facilmente nella cellula, il cadmio deve parte della sua tossicità al fatto di accumularsi all'interno dell'organismo dove può raggiungere elevate concentrazioni (Schilderman et al., 1997).

Diversi studi hanno evidenziato una diretta correlazione tra esposizione occupazionale al cadmio e sviluppo di cancro ai polmoni, alla prostata e ai reni (Waalkes et al., 2003).

Il più grave incidente ambientale riguardante il cadmio è avvenuto nella regione giapponese di Jintsu, dove le colture di riso per il consumo locale venivano effettuate con acqua di irrigazione attinta da un fiume contaminato da cadmio proveniente da operazioni di estrazione e fusione dello zinco, che si svolgevano a monte della regione stessa, e che portò nella popolazione la cosiddetta sindrome di *Itai Itai*, caratterizzata da nefrotossicità, epatotossicità e seri danni al sistema nervoso centrale (Shiraishi 1975).

Gli ioni Cd^{2+} assorbiti dalle cellule umane tramite il trasportatore dei metalli divalenti DMT-1, vengono veicolati attraverso il flusso sanguigno in tessuti come quelli epatici e renali, i maggiori produttori di metallotioneine a cui si deve il lungo tempo di residenza di tale specie metallica all'interno del corpo.

Il meccanismo o i meccanismi molecolari che sottendono alla sua carcinogenicità e più in generale alla sua tossicità, non sono ancora stati totalmente definiti; gli ioni Cd^{2+} sono infatti genotossici, che svolgono un ruolo indiretto nella trasformazione neoplastica delle cellule umane in quanto hanno bassa affinità per le molecole di DNA, e meccanismi epigenetici come alterazione dell'espressione genica, soppressione dell'apoptosi e inibizione dei sistemi di riparo del DNA sembrerebbero essere alla base del suo principale ruolo di mutageno umano.

Il cadmio attiva l'espressione di oncogeni o geni associati alla proliferazione cellulare come *C-MYC*, *C-JUN* o *C-FOS*, sia in sistemi *in vivo* che *in vitro* (Abshire et al., 1996; Spruill et al., 2002).

Assieme ad un difetto, provocato dagli ioni cadmio nei sistemi di riparo di un danno al DNA (Waisberg et al., 2003), generato spontaneamente come normale effetto del metabolismo cellulare o dall'azione di sostanze mutagene (sostanze chimiche

genotossiche o radiazioni), questa aberrante attivazione genica metallo indotta potrebbe aumentare la proliferazione di una popolazione cellulare con il proprio materiale genetico danneggiato, preludio del processo di tumorigenesi.

Il cadmio non è un metallo redox attivo in grado di catalizzare la reazione di *Fenton* responsabile della produzione di specie radicaliche dell'ossigeno (ROS), ma una sua esposizione promuove la perossidazione dei lipidi (Stohs et al., 1995) e un diretto *link* tra stress ossidativo e ioni metallici è ribadito dall'osservazione che modulando l'omeostasi delle specie metalliche si provoca una diminuzione della sensibilità delle cellule agli ossidanti.

Il cadmio è un composto citotossico in grado di generare ROS probabilmente attraverso diversi meccanismi indiretti come l'inibizione di componenti del sistema antiossidante della cellula, tramite il legame ai gruppi sulfidrilici, o la competizione con ferro e rame, metalli tipo *Fenton* in grado di catalizzare tale reazione, ai siti attivi delle proteine rendendoli disponibili all'interno della cellula.

Il cadmio a causa di questa tossicità manifestabile anche a bassa concentrazione e alla sua presenza in diversi posti occupazionali, rappresenta una delle sostanze più potenzialmente pericolose per la salute umana ed è per tale motivo che i suoi effetti biologici sono stati attento oggetto di studio in sistemi modello come il lievito *Saccharomyces cerevisiae*.

Il lievito necessita, per il ruolo funzionale e strutturale di molte delle sue proteine, ioni metallici essenziali come ferro, zinco, rame, manganese e magnesio assorbite dalla cellula tramite specifici trasportatori presenti sulla membrana plasmatica.

Alcuni di questi sistemi di *uptake* sono in grado anche di trasportare altri ioni metallici appartenenti a specie non essenziali, come per esempio il trasportatore ad alta affinità del manganese Smf1, che può trasportare non solo ioni Mn^{2+} e Fe^{2+} ma anche ioni Cd^{2+} (Cohen et al., 2000).

Esperimenti di delezione genica di tale trasportatore dimostrano come la sua assenza renda le cellule di lievito resistenti a concentrazioni tossiche di cadmio paragonate alla crescita di cellule WT nelle stesse condizioni, mentre l'inattivazione di uno dei principali componenti coinvolti nella sua degradazione (*bsd2*), rende le cellule ipersensibili al trattamento con un concomitante aumento dei livelli intracellulari di ioni Cd^{2+} (Liu et al., 1997).

Altri sistemi in grado di aumentare le concentrazioni intracellulari di ioni Cd^{2+} sono il sistema di *uptake* a bassa affinità del ferro, composto dal trasportatore Fet4 (Liu et al., 1997) e la proteina Zrt1 coinvolta nell'assorbimento degli ioni zinco, che mostrano una forte analogia con gli ioni cadmio per quanto riguarda le proprietà di coordinazione chimica (Gomes et al., 2002).

Nelle cellule di lievito, esattamente come in quelle degli eucarioti superiori, gli ioni cadmio esercitano, almeno in parte, la loro azione tossica e inducono una condizione di stress, attraverso il legame a gruppi reattivi presenti nei siti attivi e catalitici delle proteine e attraverso la generazione di radicali liberi mediante l'interazione a componenti del sistema antiossidante della cellula o attraverso la liberazione di metalli redox attivi (ioni Fe^{2+} e Cu^{2+}), causando stress ossidativo, in particolare perossidazione dei lipidi (*lipid peroxidation*, LPO) (figura 7).

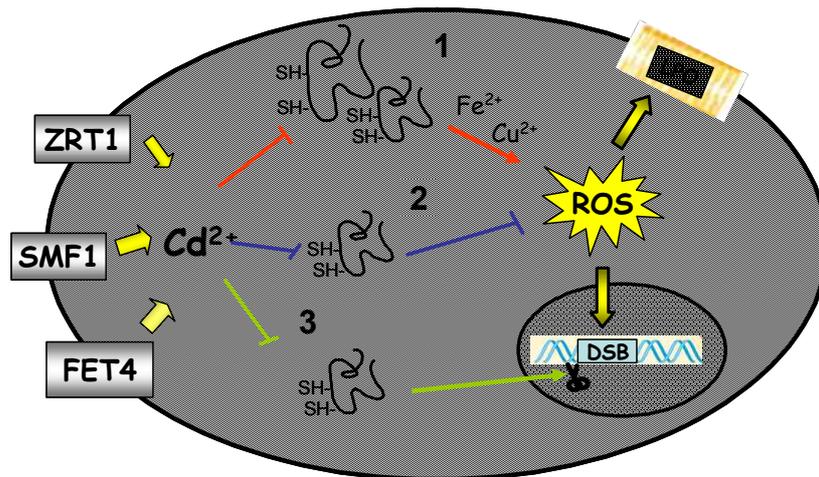


Figura 7. Effetti intracellulari prodotti in seguito ad esposizione a ioni Cd^{2+} . L'*uptake* degli ioni cadmio avviene, in cellule di *S. cerevisiae*, attraverso l'azione di trasportatori di cationi divalenti (Fet4, Smf1 e Zrt1) che mostrano grande versatilità di substrato anche per specie non essenziali come gli ioni Cd^{2+} . In figura sono schematizzate le tre principali interazioni mediate dal metallo all'interno della cellula: (1) legame ai siti catalitici delle proteine e competizione con specie metalliche redox attive (Fe e Cu), (2) interazione e inibizione delle difese antiossidanti della cellula e (3) dei componenti deputati al riparo del DNA danneggiato. Sono inoltre rappresentate le due principali lesioni intracellulari causate dalla formazione delle ROS metallo-dipendente, perossidazione lipidica (*lipid peroxidation*, LPO) e rotture a doppio filamento della catena nucleotidica del DNA (*double strand break repair*, DSB repair).

Un altro meccanismo che contribuisce alla tossicità del cadmio è la diretta influenza sul bilancio redox tiolico della cellula, attraverso l'induzione di un depauperamento di GSH intracellulare e un'inattivazione di un altro importante componente coinvolto nei sistemi di difesa allo stress ossidativo, la tioredossina.

Più recentemente è stato scoperto che il cadmio oltre alla ben nota inibizione dei sistemi di riparo (specie per i *mismatch* del DNA) (Banerjee et al., 2005), è in grado di legare le basi del DNA causando rotture a singolo filamento all'interno della molecola (McMurray et al., 2003).

Sebbene il meccanismo di come il cadmio inibisca il riparo del DNA non sia ancora stato chiarito, è stato suggerito che il deterioramento dei gruppi sulfidrilici contenuti nei componenti del complesso di riparo, possa essere responsabile di tale azione degli ioni cadmio (Jin et al., 2003).

Il lievito *S. cerevisiae* risponde alla presenza tossica del cadmio in vari modi: la prima linea di difesa è fornita dal legame con i gruppi tiolici presenti nel citoplasma, come quelli contenuti all'interno del tripeptide glutatione (ma anche quelli di MT e altri amminoacidi in generale) che ne inibisce in questo modo la reattività nei confronti dei gruppi attivi delle macromolecole biologiche.

I coniugati cadmio-GSH (complessi di bis-glutationato di cadmio) una volta formati sono internalizzati all'interno del vacuolo (tramite il relativo trasportatore Ycf1) o all'esterno della cellula, permettendo di ridurre in questo modo la concentrazione citosolica altrimenti tossica di ioni cadmio.

La cellula di lievito può infatti mantenere tali livelli di metallo al di sotto della soglia di tolleranza servendosi anche dell'azione di esporto da parte di specifiche proteine transmembrana: un esempio di tale funzione è fornita dalla proteina Alr1, normalmente coinvolta in *S. cerevisiae* nell'*uptake* di ioni magnesio (Kern et al., 2005).

La proteina Alr1 forma un canale per gruppi cationici all'interno della membrana plasmatica e la sua espressione e il suo *turnover* sono controllati dalla concentrazione di ioni magnesio.

La sovraespressione della proteina Alr1 altera la tolleranza di cellule di *S. cerevisiae* a diversi cationi metallici, producendo resistenza a ioni Al^{3+} , Ga^{3+} e ipersensibilità a ioni Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , La^{3+} e Cu^{2+} (MacDiarmid et al., 1998), mentre la

delezione del corrispondente gene porta ad un fenotipo di ipersensibilità delle cellule di lievito in presenza di concentrazioni tossiche di ioni cadmio (Kern et al., 2005).

Il meccanismo, raffigurato in figura 8, ipotizza che il trasportatore Alr1 sia in grado, oltre che di catalizzare l'importo di vari cationi metallici, di esportare ioni cadmio o suoi addotti formatesi col glutatione, all'esterno della cellula.

In questo scenario, la mancanza del sistema di efflusso di un eccesso di ioni cadmio catalizzato da Alr1, aumenterebbe la concentrazione del metallo tossico, che avrebbe così un'influenza diretta sulla stabilità di diversi processi cellulari, tra cui il sistema di riparo dei *mismatch* del DNA.

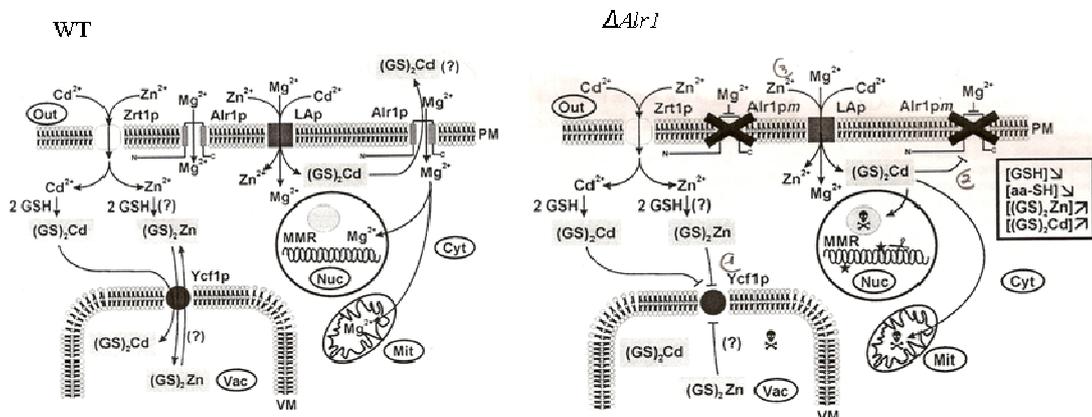


Figura 8. Modello proposto per la funzione del trasportatore Alr1 nella detossificazione degli ioni Cd^{2+} (e Zn^{2+}) in cellule di *Saccharomyces cerevisiae*. Nelle cellule WT gli ioni cadmio (e zinco) che vengono internalizzati all'interno della cellula mediante sistemi a bassa affinità (*low-affinity proteins*, LAs), interagiscono con il GSH per formare addotti $[(\text{GS})_2\text{Cd}]$ e $[(\text{GS})_2\text{Zn}]$ successivamente importati all'interno del vacuolo tramite la proteina Ycf1 o esportati all'esterno della cellula mediante il trasportatore Alr1, che funziona nel normale importo di ioni Mg^{2+} . Anche i sistemi di trasporto a bassa affinità agiscono nell'omeostasi degli ioni Mg^{2+} , sebbene con una minor efficienza. Nelle cellule ΔAlr1 , il fabbisogno cellulare degli ioni Mg^{2+} viene fornito unicamente da questo sistema a bassa affinità che porta ad un concomitante aumento anche delle altre specie metalliche non essenziali (Cd e Zn). Aumenta quindi la concentrazione degli addotti con il GSH, conseguente al ridotto esporto catalizzato normalmente dalla proteina Alr1, che induce un depauperamento dei gruppi tiolici e un'alterazione del metabolismo redox della cellula. Inoltre questi complessi formatesi tra metallo e glutatione, inibiscono la funzione di importo vacuolare della proteina Ycf1 e alcune tipologie di sistemi di riparo del DNA (*DNA mismatch repair enzymes*, MMR).

1.3a Analisi proteomica e trascrittomica in risposta al cadmio nel sistema cellulare di *Saccharomyces cerevisiae*

Le informazioni fino ad oggi reperite riguardo ai processi biologici che mediano gli effetti citotossici del cadmio, sono state ottenute anche grazie a studi condotti a livello proteomico e a livello di espressione genica, riguardo le risposte di cellule di *Saccharomyces cerevisiae* in presenza di tale metallo.

In particolare Vido e i suoi collaboratori in un lavoro del 2001, analizzano e confrontano la risposta proteomica di due gruppi di cellule di *S. cerevisiae*: un gruppo trattato con concentrazioni sub-letali di cadmio e un gruppo non trattato, come controllo dell'esperimento (Vido et al, 2001).

Un totale di più di 50 proteine vengono indotte in modo significativo dopo il trattamento col metallo, mentre altre 40 vengono represses nelle stesse condizioni di crescita. Le proteine indotte dal cadmio includono enzimi con proprietà antiossidanti (Sod1, Sod2, Trx2, etc), proteine *heat shock* (Hsp104, Hsp82), enzimi facenti parte del *pathway* biosintetico degli amminoacidi contenenti zolfo e del glutatione (Cys3, Cys4, Met3, Gsh1, etc.), enzimi del metabolismo dei carboidrati (Zwf1, Tal1, Eno1, etc.) e altre proteine non classificate o a funzione ignota. Parallelamente, le proteine represses dal trattamento con il cadmio erano principalmente componenti dell'apparato traduzionale (Vido et al, 2001).

Più del 60% delle proteine indotte dal trattamento col cadmio trovano il corrispondente gene *up*-regolato in esperimenti di *microarray*, in presenza dello stesso trattamento.

Anche negli esperimenti di Momose e collaboratori infatti viene scelto il cadmio per analizzare la globale risposta trascrizionale del genoma di *S. cerevisiae* in seguito al relativo trattamento, per ottenere informazioni riguardo i processi che stanno alla base della tossicità da specie metalliche (Momose et al., 2001).

Diversi geni implicati nelle risposte ad uno stress di tipo ossidativo, come *HSP26*, *HSP12* e *GRE1* e geni deputati al metabolismo degli amminoacidi solforati vengono *up*-regolati in seguito al trattamento, così come diversi trasportatori dello zolfo.

Entrambe gli approcci sperimentali indicano come la generale risposta delle cellule al trattamento col cadmio venga riflessa da un aumento degli amminoacidi contenenti zolfo, cisteina e metionina, così come da un aumento nella biosintesi di glutatione

(figura 9), indicando il necessario bisogno da parte della cellula di sostituire le proteine ricche di gruppi sulfidrilici danneggiate dall'interazione col metallo.

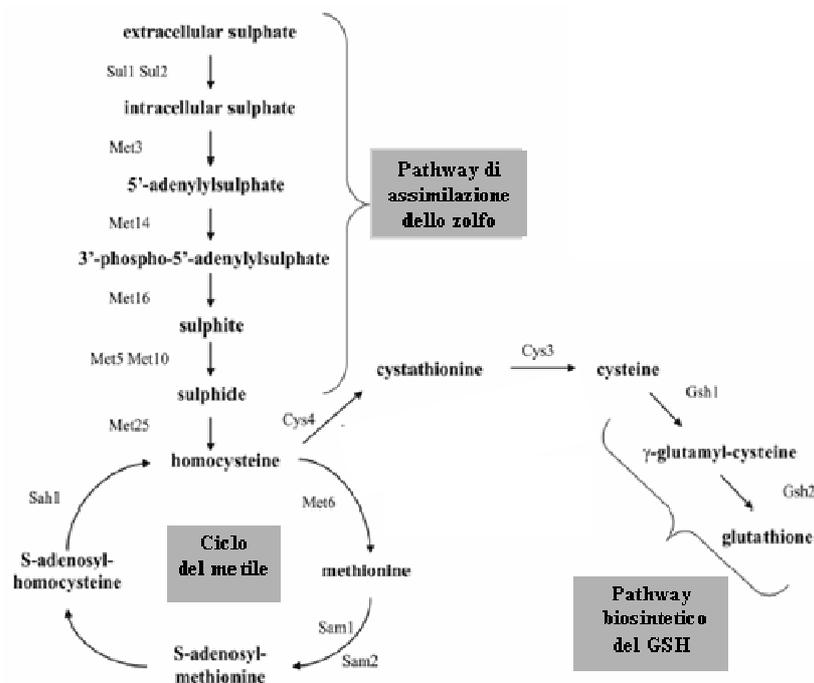


Figura 9. Pathway biosintetico degli aminoacidi contenenti zolfo (cisteina e metionina) e del tripeptide glutatione (GSH). L'intero processo può essere diviso in tre parti: pathway di assimilazione del solfato, ciclo del metile e insieme di reazioni biosintetiche che guidano alla produzione di cisteina e glutatione.

Inoltre il fondamentale ruolo acquisito dal glutatione nella tolleranza delle cellule al cadmio, giustifica l'*up*-regolazione dei geni implicati nella sua biosintesi *ex novo* in presenza dello stesso metallo.

Il cadmio induce anche l'espressione di diversi isoenzimi coinvolti nel metabolismo dei carboidrati come la piruvato decarbossilasi, l'enolasi e l'aldeide deidrogenasi; la peculiarità di queste alternative forme enzimatiche è di possedere un basso contenuto di aminoacidi solforati rispetto alle loro controparti, prodotte in condizioni normali (in assenza di metallo). Questo conosciuto meccanismo di *sulfur sparing* aiuterebbe le cellule a contrastare lo stress da metallo risparmiando e veicolando le fonti di zolfo, e quindi di gruppi sulfidrilici, verso una maggiore produzione di glutatione (figura 10) (Tamas et al., 2005).

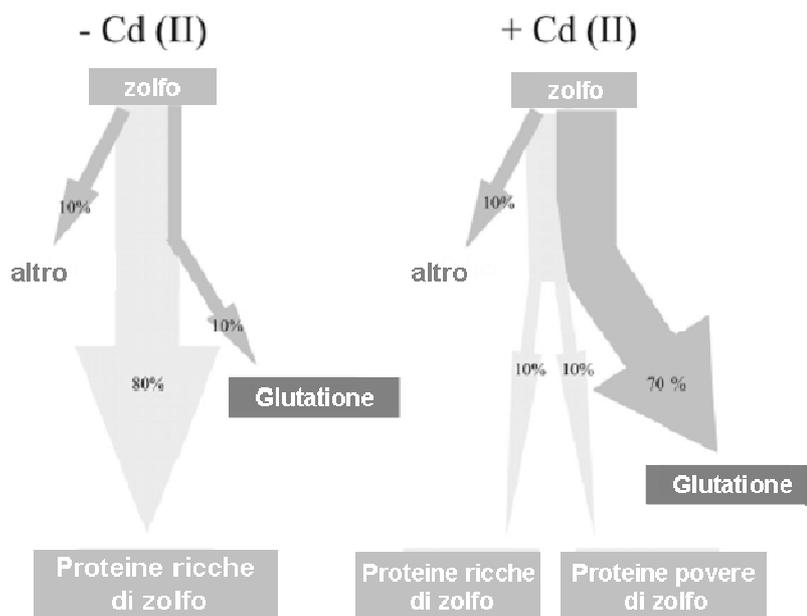


Figura 10. Meccanismo del *sulfur sparing* in risposta a ioni cadmio. L'esposizione a Cd (II) guida ad un forte aumento del livello di glutazione, ad una diminuita sintesi di molte delle proteine ricche in zolfo e sostituzione di queste con isoenzimi poveri di gruppi sulfidrilici.

Inoltre tali isoenzimi sarebbero meno soggetti alla reattività del metallo proprio grazie al basso contenuto di gruppi sulfidrilici, consentendo la protezione di tali vie metaboliche, necessarie alla normale fisiologia della cellula.

La maggioranza di questi geni sono sotto il controllo trascrizionale del complesso dei geni *MET* che includono *CBF1*, *MET28*, *MET32* e *MET4* che rappresenta il fattore chiave della regolazione dei geni delle vie biosintetiche degli amminoacidi cisteina e metionina, così come degli isoenzimi del metabolismo dei carboidrati (Fauchon et al., 2002)

I metalli, cadmio e arsenico sono in grado di indurre l'attivazione del fattore Met4, convertendo la sua forma ubiquitinata (forma inattiva) in quella deubiquitinata (forma attiva) e quindi capace di influire sulla trascrizione genica (Yen et al., 2005).

E' stato inoltre dimostrato che l'inibizione dell'ubiquitinazione di Met4, cadmio dipendente, induce un arresto del ciclo cellulare in fase G1 impedendo l'entrata nella successiva fase S del ciclo.

Questo suggerisce un modello in cui l'attivazione di Met4 in risposta al cadmio, da una parte regola le difese contro il metallo attraverso una maggiore induzione di glutatione e di amminoacidi solforati, e da una parte induce un *checkpoint* del ciclo cellulare in fase G1.

Le cellule hanno sviluppato complessi *pathway* che impediscono la progressione del ciclo cellulare in situazioni di stress, per permettere al DNA danneggiato, da quella data situazione di stress, di essere riparato prima che un nuovo evento di divisione cellulare accada. Questi punti di controllo vengono chiamati *checkpoint* del ciclo cellulare e sono fondamentali per mantenere l'integrità genetica e cellulare (Yen et al., 2005).

Altri processi fondamentali emersi dall'analisi del proteoma e del trascrittoma di *S. cerevisiae* dopo trattamento con ioni Cd^{2+} , coinvolgono componenti del sistema di difesa antiossidante della cellula che dimostrano come una parte della tossicità del cadmio anche in questo organismo sia mediata da un aumento dello stress ossidativo intracellulare. In favore di questa ipotesi, esperimenti con ceppi di *S. cerevisiae* deleti in tali geni (*Δsod1*, *Δsod2*, *Δahp1*, *Δccp1* e *Δtsa1*) mostrano un fenotipo di ipersensibilità in presenza di ioni cadmio nel *medium* di crescita (Brennan et al., 1996).

1.4 Tossicità e omeostasi del nichel in cellule umane e in cellule di *Saccharomyces cerevisiae*

Il nichel è il 24° elemento in ordine di abbondanza naturale presente sulla crosta terrestre ed è ampiamente distribuito nell'ambiente (Kasprzak et al., 2003).

Sorgenti naturali di nichel includono le emissioni vulcaniche e le emissioni prodotte dalla combustione di fossili organici, mentre sorgenti artificiali provengono dall'uso e dalla produzione industriale di composti e leghe di nichel.

Altre fonti di nichel provengono dal suo utilizzo in diversi medicinali ad uso umano, quali per esempio liquidi di radiocontrasto o fluidi da emodialisi, dalla sua presenza in monete o gioielli, che può risultare in un suo continuo assorbimento da parte dei tessuti esposti, e dal suo contenuto in alcuni cibi, specie di origine vegetale.

L'esposizione al nichel avviene principalmente attraverso inalazione e ingestione, ed è particolarmente rilevante nei lavoratori delle industrie metallurgiche che lavorano tale metallo.

L'esposizione ai composti di nichel ha rilevanti effetti sulla salute umana e sono considerati dall'*International Agency for Research on Cancer* come potenti carcinogeni, come anche indicato da studi epidemiologici che indicano un incremento del rischio di cancro al tratto respiratorio e nasofaringeo da parte di lavoratori di miniere e industrie metallurgiche (Kang et al., 2003).

I composti che meglio rappresentano l'attività tossica e mutagenica degli ioni nichel sono il nichel sulfide e il nichel subsulfide (Ni_3S_2 , NiS) che a differenza dei sali di nichel (NiSO_4 e NiCl_2) sono insolubili in acqua.

Questa loro caratteristica è data dal fatto che le particelle formate dai composti insolubili, presentano una netta carica negativa sulla loro superficie che permette loro di essere fagocitati all'interno delle cellule umane, e tale processo di fagocitosi è uno dei meccanismi più efficienti di *uptake* di tale metallo.

Le particelle una volta entrate all'interno della cellula sono contenute in strutture vacuolari, caratterizzate da un pH acido, che permette la solubilizzazione dei composti di nichel liberando i rispettivi ioni Ni^{2+} nello spazio citoplasmatico (Costa et al., 2001).

I solfati e i cloruri di nichel non riescono invece ad entrare tramite questa modalità a causa della carica positiva degli ioni formatosi dalla solubilizzazione dei rispettivi sali e le vie che permettono il loro *uptake* includono la diffusione passiva attraverso la membrana plasmatica e l'entrata attraverso trasportatori di cationi metallici divalenti (DMT-1 e Nramp2) (Davidson et al., 2005).

Queste modalità di entrata sono comunque estremamente inefficienti nel trasporto di ioni nichel all'interno della cellula e giustificano quindi la maggiore attività citotossica e genotossica dimostrata dai composti insolubili in acqua; l'iniezione di cristalli di Ni_3S_2 o NiS in esperimenti con cavie animali risulta infatti in una più alta incidenza di tumori a differenza delle iniezioni effettuate con i sali dello stesso metallo (Kasprzak et al., 1983).

Gli ioni Ni^{2+} intracellulari sono in grado di arrivare fino al nucleo dove esercitano i maggiori effetti deleteri per la normale fisiologia della cellula; tale metallo è in grado di portare alla formazione di danni a livello cromosomico, di alterare le basi del DNA

mediante un meccanismo ROS dipendente e di generare *cross-links* tra DNA e proteine, tutti *step* riconosciuti come parti integranti del processo di carcinogenesi cellulare (figura 11).

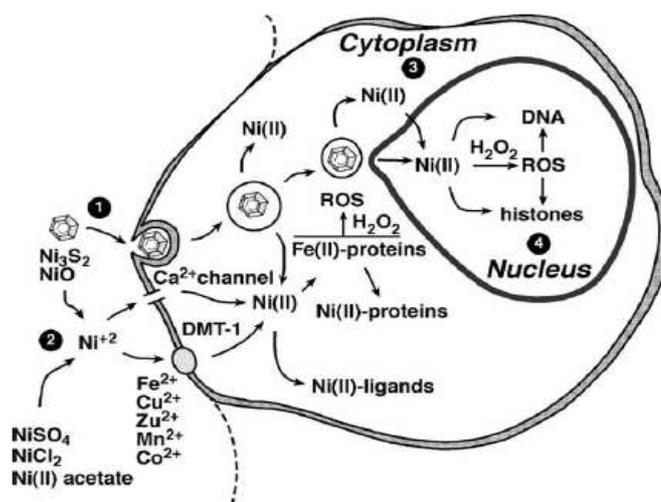


Figura 11. Percorso intrapreso dagli ioni nichel all'interno di una cellula di mammifero. Gli ioni Ni^{2+} generati sia mediante la solubilizzazione intracellulare delle particelle di composti insolubili (1), sia dall'entrata diretta attraverso canali proteici di membrana plasmatica (canali del calcio e trasportatori della famiglia DMT1) (2), vengono attivati dal loro legame con gruppi attivi proteici (ad es, l'anello imidazolico dei residui di istidina) presenti nel citoplasma (3) e nel nucleo della cellula (proteine istoniche) (4). La produzione di ROS e altre specie radicaliche in seguito a questa attivazione, influenzano la stabilità di costituenti cellulari (ad es. DNA).

Sono già state evidenziate infatti in cellule di mammifero esposte al metallo, varie alterazioni a livello del materiale genomico come rotture a doppio filamento del DNA, scambi dei cromatidi fratelli ed aberrazioni cromosomiali.

Anche il ruolo di tale metallo nella formazione di specie radicaliche dell'ossigeno è stato dimostrato in cellule umane, nella quale la formazione di ROS innesca processi quali la perossidazione lipidica, l'alterazione delle macromolecole biologiche come DNA e proteine e infine la morte cellulare (Doreswamy et al., 2004).

Il meccanismo molecolare della carcinogenicità del nichel, che presenta ancora oggi molti lati oscuri, sembra essere dipendente sia da un effetto epigenetico che da un effetto genotossico del metallo.

Gli ioni nichel sono in grado di portare alla formazione di radicali dell'ossigeno solo quando sono complessati a amminoacidi liberi in soluzione o facenti parte di una catena polipeptidica, e data la loro natura di metalli *borderline*, tali ioni sono in grado di formare stabili complessi con donatori *hard* (ossigeno) e donatori *soft* (istidina e zolfo) presenti nelle catene laterali delle proteine.

La maggiore affinità è comunque dimostrata per i residui di istidina, specie se presenti all'interno di un contesto proteico N-terminale XYH (dove X e Y rappresentano un qualsiasi amminoacido): tale motivo coordina infatti gli ioni Ni^{2+} in una conformazione planare quadrata che facilita l'attività ossidativa del nichel, in quanto solo in questo contesto gli ioni Ni (II) possono essere ossidati a Ni (III) a valori di pH fisiologico, prerequisito per la catalisi della reazione di *Fenton* (Bal et al., 2002).

Come risultato dell'attivazione del nichel da parte di questi liganti, gli ioni Ni^{2+} reagiscono con specie dell'ossigeno portando alla formazione di radicali idrossilici, ma anche di altre specie radicaliche contenenti zolfo e carbonio, originati dal peptide che lega il metallo.

All'interno del nucleo della cellula le proteine più abbondanti sono gli istoni (H2A, H2B, H3, H4 e H1) che formano il cuore centrale dei nucleosomi all'interno della struttura dei cromosomi.

A causa della bassa affinità degli ioni Ni^{2+} per le basi del DNA (il livello fisiologico di ioni Mg^{2+} compete infatti con il legame del nichel), la potenziale reattività nei confronti di ligandi contenenti istidina e l'alto contenuto di proteine istoniche nel nucleo della cellula, queste ultime sono state riconosciute come i maggiori *target* dell'interazione del metallo all'interno di questo organulo (vedere figura 11).

In particolare, il legame ad un residuo di istidina nella porzione N-terminale dell'istone H4 (il residuo H18) da parte degli ioni Ni^{2+} , è stato riscontrato essere responsabile della formazione di ROS e del silenziamento dell'espressione genica all'interno di cellule sia umane che di eucarioti inferiori come il lievito.

Il nichel infatti manifesta il suo ruolo nella genesi del cancro attraverso un'azione di soppressione piuttosto che di mutazione nei confronti dei geni nucleari, e il silenziamento di geni deputati alla soppressione dei tumori è oggi riconosciuto come un'importante caratteristica del processo di carcinogenesi (Lee et al., 1995).

Il processo di espressione genica dipende dalle caratteristiche morfologiche e strutturali della cromatina che ne media l'accessibilità da parte di componenti del macchinario trascrizionale della cellula e questo a sua volta dipende dall'interazione della doppia elica con i nucleosomi istonici: il DNA in forma di eterocromatina è compatto e inattivo da un punto di vista trascrizionale a differenza dell'eucromatina nella quale le più deboli interazioni tra nucleo istonico e filamento del DNA lo rendono accessibile per l'espressione genica.

Il nichel legato all'istone H4 è in grado di generare la produzione di ROS che influiscono sull'attività catalitica delle istone acetiltransferasi (*histone acetyltransferase, HAT*), proteine necessarie per il trasferimento di un gruppo acetile su residui di lisina nella coda N-terminale degli istoni, processo che rende maggiormente accessibile quelle regioni del DNA la cui espressione deve essere mediata (Kang et al., 2003).

L'induzione dell'ipoacetilazione degli istoni ROS dipendente, così come pure l'impedimento verso l'accessibilità delle HAT agli istoni esercitato dal legame del nichel, lo rendono protagonista essenziale nel silenziamento di tali zone cromatiniche bersaglio.

Oltre a questo effetto epigenetico nei confronti della cromatina, gli ioni nichel sono dei potenziali carcinogeni in quanto possono portare, come altre specie metalliche, all'inibizione dei sistemi di riparo del DNA e, sebbene in misura minore, anche a danni al materiale genetico come rotture dei filamenti del DNA (Zoroddu et al., 2002).

I composti insolubili di nichel sono stati dimostrati inattivare la trascrizione genica anche attraverso un aumento della metilazione e quindi compattazione delle zone cromatiniche in cui i geni sono situati (Lee et al., 1995).

La metilazione *de novo* di questi geni permetterebbe loro di essere ereditati dalla progenie in una forma inattiva da un punto di vista trascrizionale, anche in assenza di ioni nichel presenti all'interno della cellula (Costa et al., 2001).

Sebbene il lievito non usi la metilazione per il processo di silenziamento del proprio materiale genetico, tale regolazione avviene attraverso la modulazione dello stato di acetilazione degli istoni nucleosomici mediato dall'azione di HAT e istone deacetilasi (*histone deacetylase, DHAT*).

In un lavoro di Costa e collaboratori, è stato infatti esaminato l'effetto del nichel sull'acetilazione degli istoni nel sistema cellulare di *Saccharomyces cerevisiae*, dimostrando che l'uso di sali di nichel (NiCl_2) ha un significativo effetto su tale processo di modificazione proteica.

In tale lavoro i ricercatori ipotizzano che tale inibizione possa essere responsabile del silenziamento genico osservato (Costa et al., 2001).

Anche per un sistema eucariotico inferiore come il lievito, alte concentrazioni di ioni nichel all'interno della cellula possono essere potenzialmente dannose per i normali processi cellulari sebbene esso sia anche un cofattore essenziale per diversi enzimi in vari organismi.

Riguardo agli effetti generati sul proteoma e sul trascrittoma del lievito da parte degli ioni nichel nulla è mai stato analizzato e poco si conosce sui meccanismi molecolari su cui si fonda la tossicità di questo metallo tossico.

Il nichel si presume possa entrare all'interno della cellula di *S. cerevisiae* attraverso il sistema di *uptake* a bassa affinità del Mg^{2+} , catalizzato dal trasportatore di membrana plasmatica *Alr1*, come evidenziato dalla sensibilità di ceppi sovraespressanti la proteina in presenza di ioni Ni^{2+} nel terreno di crescita (MacDiarmid et al., 1998).

In *S. cerevisiae* la concentrazione citoplasmatica del nichel viene mantenuta a livelli fisiologici attraverso il suo legame al glutatione, secreto poi all'esterno delle cellule (Murata et al., 1985).

Ancora, la tossicità del nichel così come per altri sali metallici (ioni Cu e Co in particolare) dipende dal metabolismo dell'istidina come dimostrato da precedenti studi nella quale ceppi *HIS⁻*, mancanti in geni importanti per la biosintesi endogena di questo amminoacido, mostrano un fenotipo ipersensibile in presenza di ioni Ni^{2+} (Pearce et al., 1999).

Come precedentemente riportato, tali specie metalliche hanno una grande affinità per l'azoto imidazolico dell'istidina e il lievito si serve di tale interazione e del successivo accumulo vacuolare come meccanismo di detossificazione per garantire la corretta omeostasi di tale specie metallica (Joho et al., 1992).

Il vacuolo è in grado di internalizzare ioni Ni^{2+} grazie al gradiente protonico creato dall'attività di specifiche V-ATPasi e grazie alla presenza di polifosfati anionici che compensano la carica positiva degli ioni internalizzati: un mutante di lievito resistente a

concentrazioni tossiche di ioni nichel è infatti coinvolto nell'accumulo di tali sostanze all'interno del vacuolo giustificando la maggiore capacità sequestrante verso tali ioni Ni^{2+} da parte di tali specie mutanti (Nishimura et al., 1999).

2. SCOPO DELLA RICERCA

I metalli, specialmente quelli non essenziali, sono tra le maggiori sostanze pericolose riscontrate sia per l'uomo, nella quale esercitano effetti carcinogeni, sia per gli ecosistemi naturali.

Le basi molecolari della loro tossicità, così come i meccanismi che le cellule eucariotiche hanno sviluppato per difendersi da una loro eventuale esposizione, risultano estremamente variegata e non del tutto risolte.

Per ottenere una visualizzazione globale dei processi cellulari implicati nei sistemi di difesa cellulare ai metalli, il mio lavoro di tesi ha sviluppato i seguenti punti:

1. analisi della vitalità della collezione di ceppi mutanti per delezione di *Saccharomyces cerevisiae* esposti a due diversi metalli, il cadmio e il nichel, allo scopo di analizzare il ruolo di tutte le proteine non essenziali nel modulare gli effetti tossici e diversificati di queste due specie metalliche.
2. confrontare le funzioni cellulari determinate come fondamentali per l'omeostasi di cadmio e nichel in lievito, con quelle ottenute con altre tipologie di metalli (essenziali e non) allo scopo di rilevare i *pathway* di difesa comuni e/o eventuali profili metallo specifici.

Nell'ambito del progetto per lo sviluppo di nuovi metodi per il controllo della sicurezza alimentare, è stato inoltre realizzato un prototipo biosensore per metalli, basato su tecnologia FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) costituito da due proteine fluorescenti (appartenenti alla famiglia delle *GFP*) fuse alla metallotioneina MT2a di *Arabidopsis thaliana*, una proteina la cui elevata affinità per metalli come cadmio e zinco è nota in letteratura.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Genomic phenotyping study: la tossicità di cadmio e nichel in cellule di *Saccharomyces cerevisiae*.

E' stato messo a punto un *high throughput screening* per lo studio della risposta fenotipica dei mutanti *knockout* aploidi nei geni non essenziali di *S. cerevisiae* in presenza di due differenti metalli tossici, che presentano caratteristiche chimico-fisiche peculiari, quali il cadmio (acido *soft*, altamente tiofilico, sospetto citotossico) ed il nichel (metallo *borderline*, debolmente tiofilico, sospetto genotossico) .

I mutanti che compongono l'intera collezione di lievito (~4700), la maggior parte dei quali ottenuti dal ceppo parentale BY4742 (solo 79 costruiti nel *background* BY4739) utilizzando una strategia basata su PCR, sono stati organizzati in 13 piastre da 384 pozzetti (*384 plate format*) per permettere un rapido uso della collezione per *screening* su larga scala in presenza di diverse sostanze.

3.1.a Organizzazione della collezione di mutanti per delezione di *S. cerevisiae*

L'intero *set* di mutanti per delezione è stato acquistato dalla *Open Biosystems* organizzato in 52 piastre da 96 pozzetti ciascuna (terreno liquido). Attraverso l'uso di strumenti manuali per la gestione simultanea di tutti i cloni presenti nelle singole piastre, quali un replicatore da 96 pin (*Multi-blot replicator* VP408FH, figura 1) e particolari strumenti adattatori (*library copier*) forniti dalla casa produttrice (*V&P Scientific, Inc.*), le piastre (da 96 pozzetti) che compongono l'intera collezione, sono state convertite in 13 piastre da 384 pozzetti, permettendo di rendere più brevi i tempi di analisi condotta sul *pool* completo di mutanti.

I mutanti contenuti nelle piastre da 384 pozzetti sono poi gestiti mediante l'uso di un replicatore a 384 pin (*Multi-blot replicator* VP384S2A) che permette di prelevare contemporaneamente pochi μ l di coltura dai corrispondenti pozzetti e di inocularli in terreno liquido o in piastre contenenti terreno solido (YPD agar, figura 1).

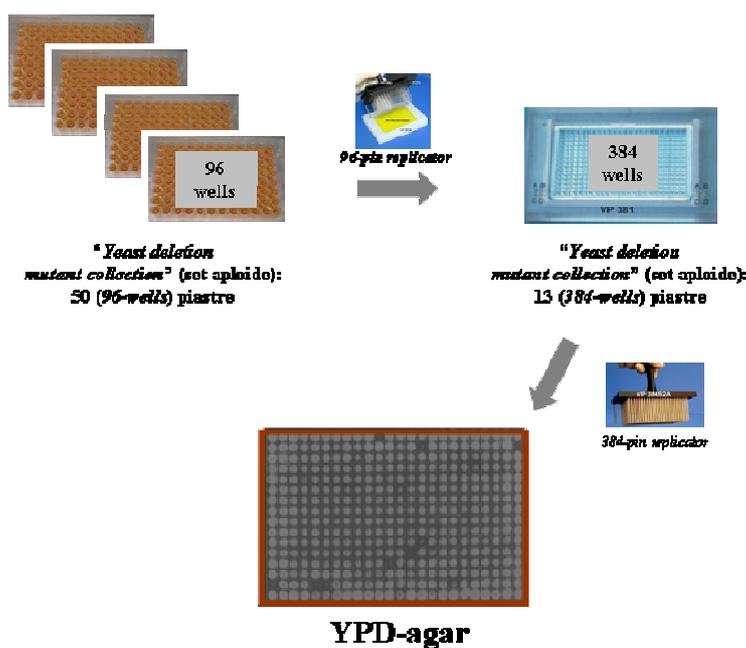


Figura 1. Conversione della collezione di mutanti di *S. cerevisiae* in formato da 384 pozzetti.

3.1.b *Screening* della collezione di mutanti per delezione di *S. cerevisiae* in presenza di cadmio e nichel

Sono stati condotti esperimenti preliminari per studiare i livelli di tolleranza del ceppo *wild-type* (WT) nei confronti di cadmio e nichel, in modo da determinare le condizioni in cui effettuare gli esperimenti. Lo scopo era quello di determinare le concentrazioni sub-letali ($40\text{-}50\ \mu\text{M Cd}^{2+}$, $2.5\ \text{mM Ni}^{2+}$) in corrispondenza delle quali il ceppo WT cominciava ad avere crescita stentata in presenza dei due metalli (figura 2A-B), in modo da determinare le condizioni ideali per uno *screening* volto alla ricerca di mutanti per delezione ipersensibili alle sostanze prese in esame rispetto al ceppo WT.

Sono state inoltre determinate le concentrazioni massime capaci di indurre una minima sopravvivenza del ceppo WT in presenza di ioni tossici ($60\ \mu\text{M Cd}^{2+}$, $3.5\ \text{mM Ni}^{2+}$; figura 2A-C). Tali condizioni sono ideali per la ricerca di mutanti, la cui delezione è in grado di apportare un beneficio (in termini di crescita) rispetto al ceppo parentale in presenza di ioni Cd^{2+} e Ni^{2+} (mutanti resistenti).

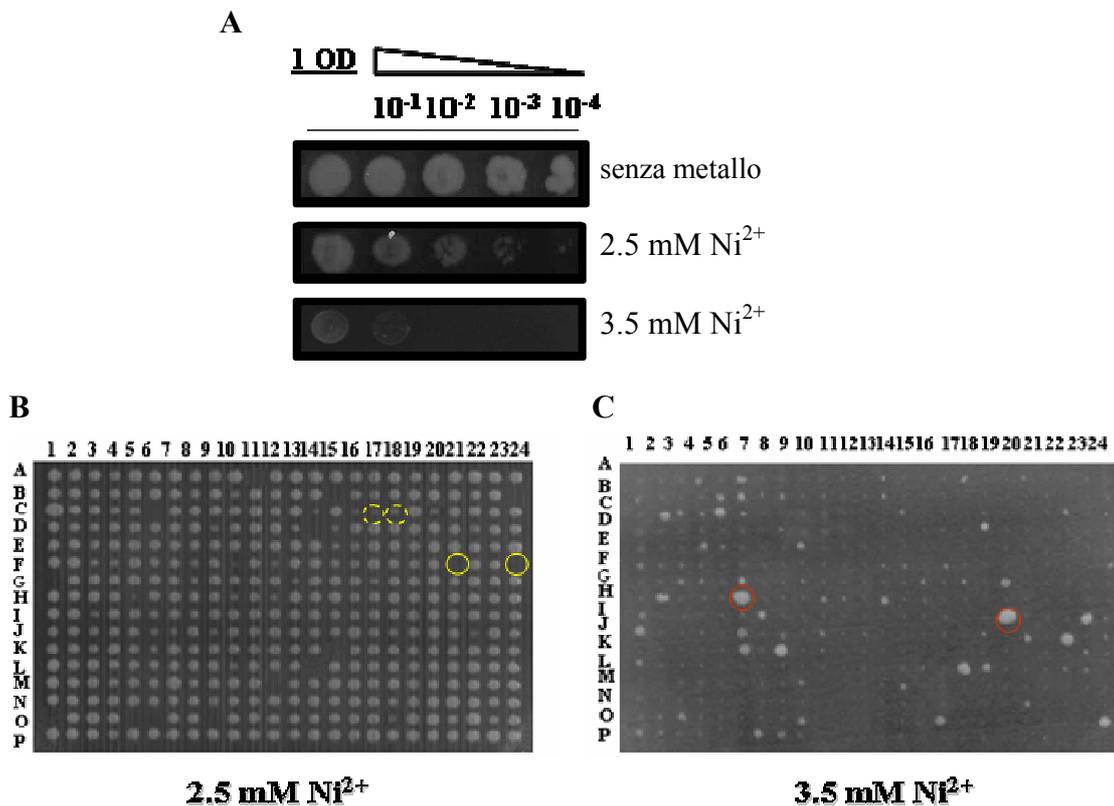


Figura 2. Determinazione dei livelli di tolleranza del ceppo *wild-type* nei confronti di cadmio e nichel. A) *Spot assay* nel quale vengono rappresentate diluizioni seriali [di 10 volte partendo da una coltura con una densità ottica a 600 nm (OD_{600}) pari a 1] del ceppo WT in presenza di diverse concentrazioni di ioni nichel. B-C) Sono rappresentate due piastre di terreno solido YPD contenenti diverse concentrazioni di $NiCl_2$ in cui sono stati inoculati (mediante l'uso del *multipinner* a 384 pin) i mutanti provenienti da una delle 13 piastre che compongono la relativa collezione, al fine di identificare quali ceppi risultano ipersensibili (B) o resistenti (C) in presenza del metallo. Nella figura B), mutanti che muoiono o la cui crescita risulta essere sub-ottimale in presenza del metallo sono rappresentati con cerchi di colore giallo, rispettivamente, con tratto pieno e discontinuo. Possibili mutanti resistenti (figura C) sono invece evidenziati tramite cerchi di colore rosso.

Le condizioni così determinate sono utilizzate per *screenare* tutte le piastre della collezione utilizzando il replicatore da 384 pin per inoculare i diversi cloni, dopo averli opportunamente diluiti prima della piastratura, in terreno solido contenente Cd e Ni. Sono state fatte 5 repliche per ogni metallo ed i ceppi mutanti che in almeno tre repliche mostravano fenotipi di crescita difettivi o tolleranti sono stati catalogati. Sono stati identificati mutanti con diversi livelli di sensibilità [*high sensitive* (HS), *medium sensitive* (MS) e *low sensitive* (LS); figura 3], ma con un solo grado di resistenza (R; figura 3).

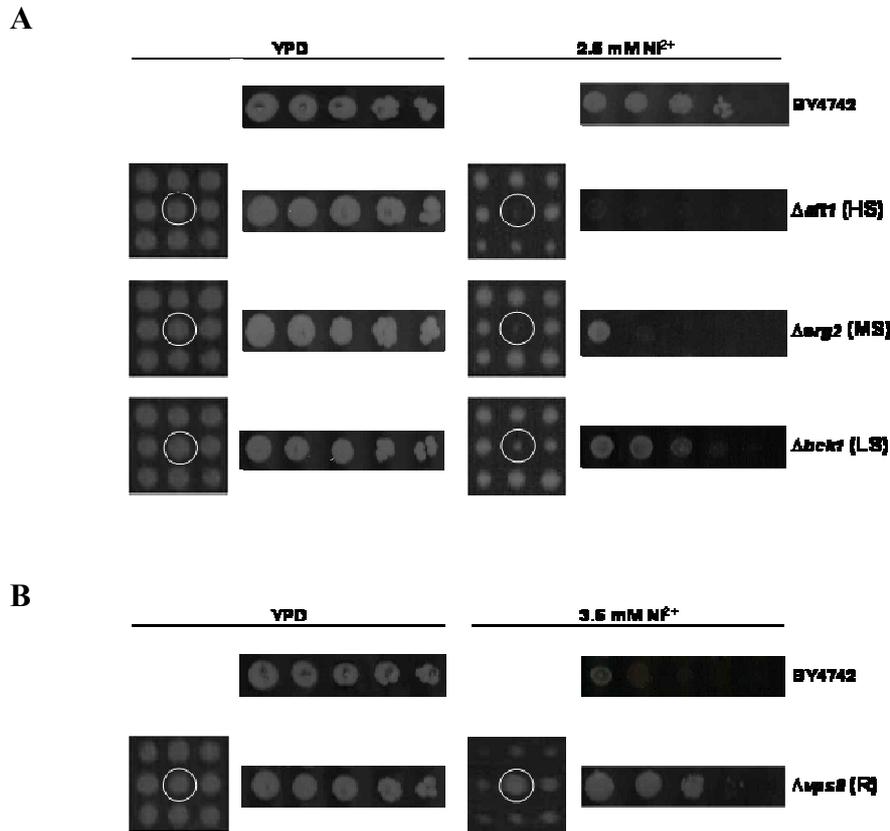


Figura 3. Mutanti per delezione con fenotipo sensibile e resistente. (A) Il ceppo WT (BY4742) ed alcuni ceppi mutanti ($\Delta aft1$, $\Delta erg2$ e $\Delta bck1$) vengono fatti crescere in terreno YPD (parte destra della figura) e terreno YPD addizionato di ioni nichel (parte sinistra della figura). L'immagine è composta da porzioni estratte dalle piastre da 384 pozzetti (che evidenziano il fenotipo di 9 cloni) e dai relativi *spot assay* (vedere "Materiali e metodi" per ulteriori dettagli) dei mutanti indicati con un cerchio bianco. I ceppi mutanti che esibiscono una riduzione dell'abilità a formare colonie alla prima, seconda-terza o quarta diluizione vengono classificati, rispettivamente, come *high* (HS), *medium* (MS) o *low* (LS) *sensitive*. (B) In presenza di concentrazioni più elevate di ioni nichel (3.5 mM), i ceppi mutanti resistenti agli ioni Ni²⁺ (es. $\Delta vps8$) crescono meglio rispetto al ceppo di riferimento. Gli stessi criteri di classificazione vengono applicati anche nel caso del cadmio.

I mutanti risultati essere sensibili o resistenti in almeno tre repliche sperimentali sono stati sottoposti ad ulteriore verifica mediante *spot assay* (figura 4).

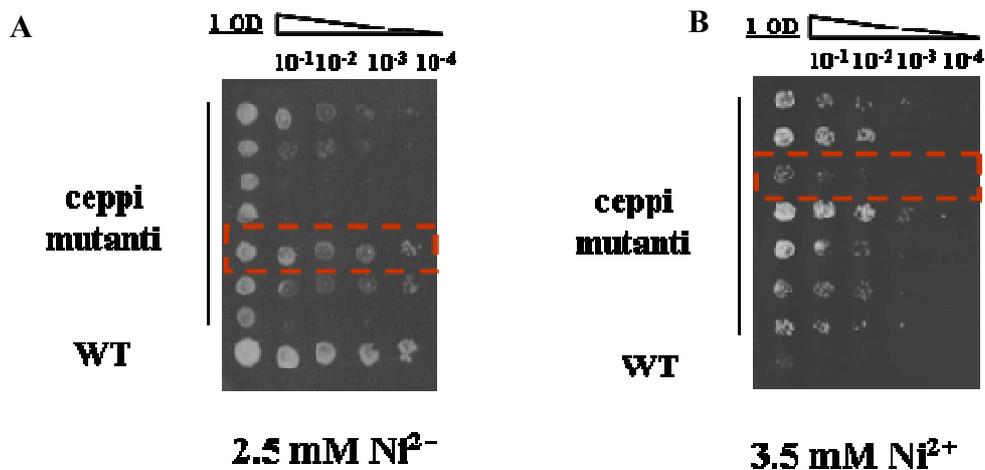


Figura 4. *Spot assay* nella quale vengono rappresentate diluizioni seriali (di 10 volte, partendo da colture a $OD_{600}=1$) del ceppo WT e di ceppi mutanti identificati come ipersensibili (A) o resistenti (B) alla presenza di ioni nichel. I diversi gradi di sensibilità mostrati dai ceppi analizzati dopo 2 giorni di crescita a 30°C, viene determinato secondo i criteri della figura 3. Sono evidenziati con delle *box* tratteggiate di colore rosso, alcuni “falsi positivi”, ossia ceppi risultati avere fenotipo (sensibile o resistente), ma che non vengono validati mediante *spot assay*. Questi ceppi sono stati eliminati dalla lista finale di mutanti implicati nella risposta a cadmio e nichel. Contemporaneamente, ogni ceppo (WT e mutanti) viene fatto crescere anche su terreno privo di ioni metallici, per controllare che i ceppi non presentino crescita stentata anche in assenza di ioni metallici (dato non mostrato).

L'analisi effettuata sui circa 4500 mutanti di *S. cerevisiae* che compongono l'intera collezione, ha portato alla identificazione di 388 ceppi mutanti che mostrano sensibilità o resistenza al trattamento con i due metalli presi in esame.

Come evidenziato dal diagramma di *Venn* rappresentato in figura 5, molti di questi ceppi mutanti mostrano sensibilità o resistenza ad entrambe le specie metalliche, mentre altri sono specifici ad uno solo dei due trattamenti.

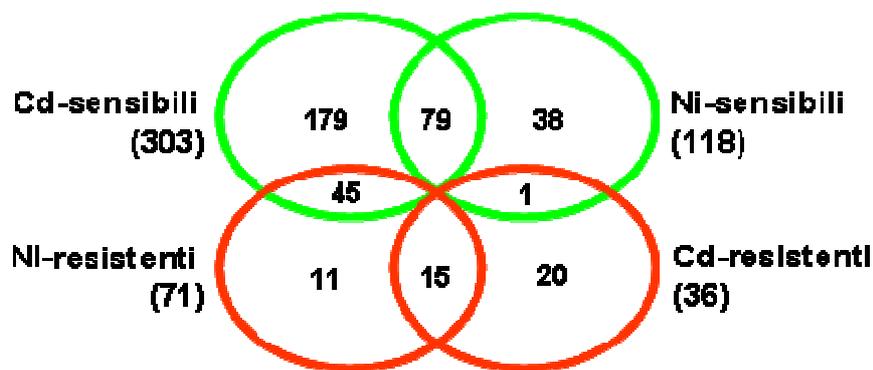


Figura 5. Diagramma di *Venn* che evidenzia il fenotipo dei 388 ceppi mutanti metallo-responsivi identificati. Con un cerchio verde sono indicati i mutanti sensibili, mentre con un cerchio rosso quelli resistenti. Si evidenziano mutanti che mostrano fenotipi di crescita comuni (79 per i mutanti sensibili e 15 per i mutanti resistenti), specifici o, addirittura, opposti (45 Cd-sensibili/Ni-resistenti e 1 Cd-resistente/Ni-sensibile).

Il numero totale dei mutanti sensibili eccede quello dei mutanti resistenti, mentre il numero di quelli sensibili al cadmio è tre volte superiore a quello trovato per il nichel, in linea con il differente grado di tossicità rivelato dai due ioni (il cadmio viene utilizzato in concentrazioni μM , mentre il nichel in concentrazioni mM).

Il numero dei ceppi mutanti che mostrano resistenza al nichel è significativamente più alto rispetto a quello trovato con ioni cadmio ed un terzo di questi presenta un fenotipo di ipersensibilità nei confronti di ioni Cd^{2+} (mutanti con “fenotipo opposto”), mentre viene identificato un solo caso di sensibilità al Ni ma resistenza al Cd.

Circa il 50% dei mutanti sono deleti in geni che presentano un ortologo umano, 11 sono omologhi a geni umani non ancora annotati, mentre 23 corrispondono a geni coinvolti in malattie umane.

3.1c Analisi dei dati mediante classificazione funzionale (*Gene Ontology*)

Gene Ontology (GO; <http://www.geneontology.org/>) è un vocabolario dinamico e controllato che annota geni di ogni specie in relazione alla loro funzione molecolare, al processo biologico in cui essi intervengono e in base alla loro localizzazione cellulare. Strutturato secondo un'organizzazione gerarchica dei termini, esso rappresenta un sistema di riferimento per tutta la comunità scientifica e viene utilizzato da quasi tutte

le maggiori banche dati biologiche proprio perché rappresenta il primo tentativo di standardizzazione delle informazioni biologiche.

Abbiamo quindi proceduto all'annotazione mediante categorie GO (*Biological Process*) dei geni la cui delezione conferisce un fenotipo di sensibilità o resistenza nei confronti di Cd e Ni. Utilizzando per l'analisi il programma *GO Term Finder* disponibile al sito del *Saccharomyces cerevisiae genome database* (SGD, <http://www.yeastgenome.org/>), sono state prese in esame solo le classi funzionali che risultano significativamente arricchite ($P\text{-value} < 10^{-3}$) nel *pool* dei nostri dati rispetto alla normale distribuzione delle stesse classi nel genoma (tabella 1).

categoria funzionale GO	Cd-sensibile		Ni-sensibile		Ni-resistente	
	Enrichment ratio	P-value	Enrichment ratio	P-value	Enrichment ratio	P-value
<i>transport</i>	2.5	1.63E-16	2.7	1.10E-07	3.9	1.91E-12
<i>vacuolar transport</i>	8.1	3.18E-24	6.8	1.70E-05	19.4	4.67E-21
<i>vesicle-mediated transport</i>	4.3	1.31E-19	3.6	0.00068	6.6	6.97E-10
<i>post-Golgi vesicle-mediated transport</i>	6.1	2.05E-06	11.2	4.77E-07		
<i>Golgi to vacuole transport</i>	9.7	0.00026	22.3	1.36E-06		
<i>vacuole organization and biogenesis</i>	9.8	2.07E-17	23.3	8.28E-26		
<i>vacuolar acidification</i>	17.3	3.44E-14	47.7	2.33E-23		
<i>cation homeostasis</i>	5.8	2.10E-10	13.2	9.74E-17		
<i>telomere organization and biogenesis</i>	5.1	1.94E-24	4.4	9.53E-06		
<i>response to chemical stimulus</i>	3.1	2.94E-10	3.5	0.0001		
<i>endosome transport</i>	13.4	1.94E-25			34.1	1.05E-20
<i>ubiquitin-dependent protein catabolic process via the multivesicular body pathway</i>	19.5	9.61E-12			77.5	1.67E-17
<i>protein targeting to vacuole</i>	6.8	3.76E-10			18.3	2.63E-11
<i>protein retention in Golgi</i>	9.7	3.83E-05			37.7	2.35E-09
<i>retrograde transport, endosome to Golgi</i>	18.0	5.72E-09			35.0	0.00016
<i>post-translational protein modification</i>	3.0	1.53E-09				
<i>covalent chromatin modification</i>	5.2	4.62E-06				
<i>Golgi vesicle transport</i>	3.4	9.01E-05				
<i>response to stress</i>	2.4	5.75E-06				
<i>transcription, DNA-dependent</i>	2.1	1.41E-05				
<i>nucleocytoplasmic transport</i>			4.7	6.60E-04		
<i>RNA export from nucleus</i>			6.9	5.85E-05		

Tabella 1. Processi biologici associati con i geni in grado di modulare la tossicità ai metalli. L'analisi dei dati è condotta utilizzando il programma *GO Term Finder* (SGD; <http://www.yeastgenome.org/>). Per ogni categoria GO è rappresentato il relativo valore di *P-value* (< 0.001) e quello dell'*enrichment ratio* calcolato confrontando la rappresentazione di ogni *GO term* all'interno del set di geni trovati dall'analisi con la loro rappresentazione all'interno del genoma di lievito. Sono rappresentate in “grassetto” i *parental term* delle categorie individuate, mentre in “corsivo” i diversi *child term* corrispondenti alla categoria “trasporto”.

Mentre i mutanti resistenti al cadmio sono deleti in geni che risultano dispersi in varie categorie (e quindi non rappresentati in tabella 1), i mutanti nichel-resistenti così come quelli sensibili a cadmio e nichel sono deleti in geni che sono arricchiti in specifiche categorie funzionali.

Dall'analisi GO si evidenzia come un ampio *range* di processi cellulari siano impegnati nel modulare la tossicità a cadmio e nichel. Diversi geni emersi da precedenti studi che analizzavano la risposta delle cellule di lievito al trattamento con cadmio (Momose et al., 2001; Vido et al., 2001), emergono dall'analisi fenotipica dei mutanti per delezione. Molti di questi geni, tra cui ad esempio quelli coinvolti nel metabolismo dello zolfo e del glutatione, sono racchiusi nella categoria *response to stress*.

Uno dei più conosciuti meccanismi con cui il lievito contrasta concentrazioni tossiche di ioni metallici all'interno del citoplasma, è l'internalizzazione in depositi specializzati, quale per esempio il vacuolo. Non sorprende quindi che un numero di classi GO trovate, siano correlate al "trasporto", in particolare al vacuolo, e al mantenimento e funzionamento di questo organello.

L'analisi funzionale ha permesso di evidenziare diversi processi di cui non è mai stata rivelata prima un'associazione con l'omeostasi dei metalli; in particolare, difetti nel processo correlato al "trasporto nucleo-citoplasma" sembrano avere una particolare rilevanza nel trattamento con ioni nichel.

Altri processi, incentrati sul trasporto mediato da vescicole, influenzano invece la tolleranza a cadmio e nichel in modo diverso e spesso contrastante. Per esempio, difetti in prodotti genici appartenenti a classi quali *protein targeting to vacuole*, *endosome transport* e *retrograde transport endosome-to-Golgi* rende le cellule sensibili alla presenza di ioni cadmio, ma aumenta la tolleranza al nichel.

I geni, la cui delezione porta ai diversi gradi di sensibilità (*HS*, *MS*, *LS*), sono distribuiti in modo uniforme tra le differenti classi funzionali, sottolineando che non solo i mutanti con il più alto grado di sensibilità (*HS*) sono maggiormente coinvolti nella tolleranza ai metalli tossici, ma che un vasto insieme di processi cellulari sono alla base dei meccanismi di omeostasi dei metalli nelle cellule eucariotiche.

3.1d Analisi dei dati mediante rappresentazione in *network* di interazione

Utilizzando il *Network Visualization System Osprey* (disponibile al sito <http://biodata.mshri.on.ca/osprey/servlet/Index>), i geni implicati nella tolleranza ai metalli sono stati organizzati in *subnetwork* di interazione funzionale.

Il *software* permette di identificare e rappresentare graficamente le interazioni biologiche (genetiche e fisiche; *database* BIOGRID <http://www.thebiogrid.org/index.php>) che caratterizzano i geni di interesse in modo da ottenere una dettagliata conoscenza sui *pathway* che svolgono un ruolo importante nel controllo della tossicità dei metalli in *S. cerevisiae*.

Il razionale di tale approccio computazionale è che le interazioni spesso avvengono tra geni correlati funzionalmente e simili *pattern* di interazione tendono a identificare componenti appartenenti allo stesso processo cellulare (Breitkreutz et al., 2002).

Sono state condotte analisi di interazione funzionale per i geni la cui delezione determina un fenotipo di sensibilità al trattamento con Cd e Ni, e per quelli che sembrano avere ruoli specifici per uno solo dei due trattamenti.

3.1e Network di interazione: geni la cui mancanza causa Cd/Ni sensibilità in cellule di *S. cerevisiae*

I 79 geni che, quando mutati, causano un fenotipo di sensibilità sia a Cd sia a Ni sono sottoposti ad analisi interattomica (figura 6).

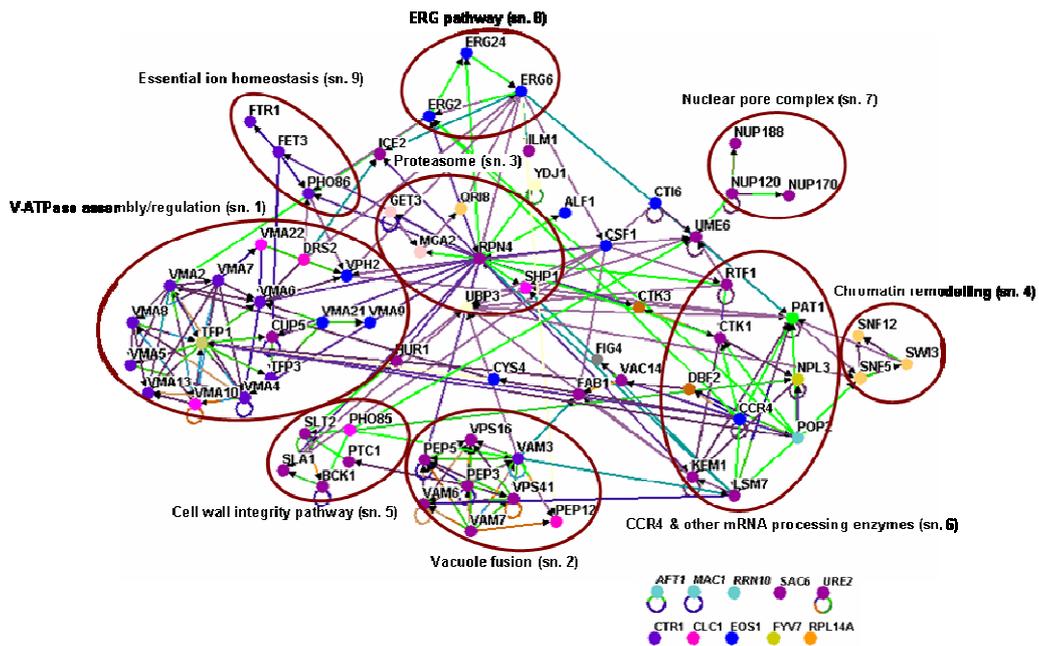


Figura 6. Subnetwork rappresentativi dei prodotti geni la cui distruzione causa Cd/Ni sensibilità. Le interazioni genetiche e fisiche sono identificate usando il *Network Visualization System Osprey* (<http://biodata.mshri.on.ca/osprey>). I prodotti geni sono rappresentati da nodi raffigurati come cerchi colorati in base alla loro classificazione GO, mentre le interazioni sono rappresentate come frecce che connettono i nodi, raffigurate come linee colorate, in accordo al tipo di approccio sperimentale utilizzato per documentare la loro interazione, come specificato dal database BIOGRID (<http://www.thebiogrid.org/>) e dal manuale del programma. Sono evidenziati i nove subnetworks identificati dall'analisi, associati ognuno con una generale descrizione funzionale. Tredici prodotti geni non soddisfano i criteri di associazione (vedere testo per maggiori dettagli) e sono mostrati all'esterno dei subnetwork funzionali, mentre per dieci prodotti geni (rappresentati nella parte bassa della figura) non è stata documentata in letteratura nessuna interazione. Ogni subnetwork è stato ulteriormente analizzato testando il fenotipo di metallo-sensibilità di almeno due ceppi mutanti (deleti in geni che lo caratterizzano) con *mating type a* (ceppi ottenuti dalla collezione EUROSCARF gentilmente fornita dalla prof. Donnini del Dipartimento di Genetica, Biologia dei Microrganismi, Antropologia, Evoluzione), per escludere che il *background* dei ceppi utilizzati possa dare differenze dal punto di vista fenotipico (la collezione da noi utilizzata è costruita in un *background MATalpha*).

Una cospicua parte di questi geni (56) viene catalogata come parte di 9 *subnetwork* funzionali. 13 geni, pur presentando interazioni funzionali documentate in letteratura, non superano i criteri di associazione prestabiliti (infatti un *subnetwork* viene identificato dalla presenza di un minimo di tre prodotti genici che condividono almeno un'annotazione GO, connessi tra loro da almeno due interazioni fisiche o genetiche), mentre 10 rimangono come *entry* solitarie (non sono presenti interazioni documentate nel database BIOGRID).

Come già evidenziato dalla preliminare analisi *Gene Ontology* dei dati, l'importante *link* tra funzionalità/biogenesi del vacuolo e tolleranza ai metalli viene sottolineato anche dalla presenza e dall'abbondanza dei geni interconnessi tra loro presenti nel *subnetwork* n°1 (44 interazioni proteina-proteina; figura 6). Questo sottogruppo comprende al suo interno diversi componenti (subunità e fattori di assemblamento) delle V-ATPasi, proteine transmembrana conservate in tutti i sistemi eucariotici in grado di acidificare gli organelli citoplasmatici come il vacuolo, le cisterne del Golgi e i compartimenti endosomiali. Questa importante caratteristica è dovuta alla capacità intrinseca delle ATPasi di idrolizzare l'ATP accoppiandone il movimento di protoni all'interno di compartimenti intracellulari o all'esterno della cellula, generando un gradiente elettrochimico a ridosso della membrana cellulare che consente il trasporto accoppiato di soluti, metaboliti o ioni.

L'*uptake* di protoni all'interno degli organelli citoplasmatici, e quindi la loro acidificazione, è importante in diversi processi cellulari come l'endocitosi recettore-mediata, il traffico cellulare, il processamento proteico e il trasporto accoppiato.

Ogni subunità delle V-ATPasi è codificata da geni denominati *VMA* (*vacuolar membrane atpase*) e mutazioni che alterano la funzionalità di una qualsiasi delle subunità, determina in cellule di *S. cerevisiae* un fenotipo letale condizionale. I mutanti *vma* sono, infatti, in grado di crescere a $\text{pH} \cong 5$, ma non sono vitali quando il mezzo di coltura presenta un $\text{pH} = 7.5$, alte concentrazioni di calcio, quando il lievito viene fatto crescere su fonti di carbonio non fermentabili o in presenza di metalli tossici (Sambade et al., 2005).

Le V-ATPasi di *S. cerevisiae* mantenendo acido il pH del vacuolo, risultano quindi essenziali per la sua funzionalità dato che in tali condizioni gli enzimi presenti nel lume vacuolare sono presenti in forma attiva. Essenziale per la detossificazione delle specie

metalliche tossiche è la creazione del potenziale elettrochimico che genera il gradiente energetico necessario per il trasporto di tali ioni all'interno dell'organello, sia essi siano essenziali per i vari processi fisiologici, sia essi siano tossici, la cui concentrazione citosolica deve essere sempre mantenuta a livelli molto bassi per prevenirne gli effetti dannosi (Ramsay et al., 1997).

Il cadmio (ma anche arsenico e mercurio) viene sequestrato all'interno di questo organello anche in maniera indipendente dalle V-ATPasi, ad esempio, mediante la pompa vacuolare Ycf1 (*yeast cadmium factors*), un membro della famiglia di proteine ABC (*ATP-binding cassette*) che sfruttano l'idrolisi dell'ATP per catalizzare il trasporto attraverso il tonoplasto di composti coniugati al glutatione, la principale molecola ad azione antiossidante presente nelle cellule di lievito (Li et al., 1997). *Δycf1*, *Δgsh1* e *Δgsh2* presentano un fenotipo di Cd-sensibilità.

Anche per il nichel il vacuolo è stato riconosciuto come il probabile candidato deputato al deposito di tale metallo, sebbene il trasportatore implicato nel suo specifico *uptake* non sia ancora stato caratterizzato (Nishimura et al., 1998).

Tre proteine non inserite nel *subnetwork* n°1 (Fab1, Fig4 e Vac14), ma correlate con questo, sono in relazione al corretto mantenimento della struttura vacuolare; tutti questi prodotti proteici sono, infatti, coinvolti nella regolazione della sintesi di fosfatidilinositolo 3,5 bisfosfato (PI-3,5-P2), implicato a sua volta nel *sorting* vacuolare, nel traffico delle proteine al lume del vacuolo, nel mantenimento della corretta dimensione di questo organello e del giusto grado di acidità interna (Duex et al., 2006).

Sempre correlato alla funzionalità vacuolare è il *subnetwork* n°2 che raggruppa geni appartenenti alla classe delle *vacuolar protein sorting (vps)* il cui ruolo è quello di mediare vari aspetti del traffico proteico intracellulare destinato al vacuolo, oltre a quello di controllare la morfologia vacuolare.

Il traffico intracellulare, che consente alle proteine di essere trasportate all'interno della cellula tra i vari compartimenti delimitati da membrana, gli organelli citoplasmatici, è indispensabile per la loro funzione, modificazione o eliminazione (Bowers et al., 2004).

Grazie a vari *screening* su larga scala in lievito, sono stati identificati i diversi prodotti genici implicati nel traffico intracellulare delle proteine isolando 61 mutanti *vps*, che sono stati suddivisi in sei classi (A-H) ognuna avente caratteristiche morfologiche

distinte; le proteine corrispondenti a mutanti appartenenti ad una stessa classe formano (generalmente) complessi multiproteici.

Il *subnetwork* n°2 comprende otto geni corrispondenti a mutanti *vps* di classe B e C, la cui delezione determina, rispettivamente, la presenza di vacuoli frammentati o la mancanza di strutture vacuolari identificabili. Questo indica che un difetto nella funzionalità del vacuolo, così come nelle ultime fasi del traffico intracellulare a tale organello, è importante nella risposta di *S. cerevisiae* agli ioni metallici presi in esame.

Il terzo *subnetwork* è incentrato sul *master regulator* Rpn4 richiesto per la sintesi dei vari componenti del *pathway* proteasoma-dipendente (vedere figura 6, *subnetwork* n°3).

Tutte le proteine eucariotiche con un'emivita limitata o a funzione obsoleta vengono rimosse dall'ambiente cellulare attraverso il *pathway* di degradazione ubiquitina-dipendente. Attraverso questo percorso, le proteine *target* destinate al processo degradativo vengono "marcate" con ubiquitina, una piccola proteina ubiquitaria in tutti i sistemi eucariotici, attraverso un legame reversibile covalente tra il carbossi-terminale di questa ultima e il gruppo amminico di un residuo di lisina della proteina substrato (Hochstrasser M., 1996). Un vasto gruppo di fattori a diversa funzione partecipa alle principali fasi del *pathway* per assicurare il legame dell'ubiquitina alla catena polipeptidica *target* ed il trasporto del complesso ubiquitina-substrato proteico al 26S proteasoma, un complesso a più subunità caratterizzato dalla presenza di proteinasi in grado di ridurre la proteina *target* in corti polipeptidi. Il fenotipo di ipersensibilità rilevato in presenza di ioni cadmio e nichel dall'analisi della delezione anche di altri componenti del *pathway*, come ad esempio Qri8, Ubp3, Shp1, conferma il ruolo importante nella risposta allo stress metallico della rimozione delle proteine danneggiate a causa del legame dei metalli che tendono a reagire con i gruppi reattivi presenti all'interno delle strutture proteiche, inibendone la funzionalità e inducendo denaturazione proteica. A conferma di tale osservazione, vi sono precedenti lavori in cui si evidenzia, attraverso l'uso di ceppi di lievito ingegnerizzati, che la sovra-espressione della stessa ubiquitina aumenta la resistenza a metalli come il cadmio, e a specie metalloidi come l'arsenito (Chen et al., 1995).

Altri componenti precedentemente associati alla tolleranza al cadmio e ad altre fonti di stress includono le tre subunità del complesso di rimodellamento della cromatina SWI/SNF (*subnetwork* n°4) e un gruppo di componenti regolatori del *pathway* Bck1-

Slp2 implicato nel mantenimento dell'integrità della parete cellulare (*subnetwork* n°5). *Saccharomyces cerevisiae* possiede una veloce, quanto complessa, rete di *pathway*-segnale che lo rendono in grado di adattarsi ai repentini cambiamenti ambientali. Molti segnali, sia intracellulari che extracellulari, vengono trasdotti grazie al *pathway* delle proteine chinasi mitogeno-attivate (*MAP kinase*) che, attraverso una serie di fosforilazioni su residui di serina e treonina conservati dei loro target, mediano il segnale fino al nucleo della cellula, dove proteine effettrici modulano l'espressione genica portando ad una rapida risposta agli stimoli ricevuti dalla cellula (figura 7). Più in particolare, determinate proteine di membrana (codificate da geni a funzione ridondante) fungono da sensori di superficie e trasmettono il segnale attraverso diversi componenti cellulari essenziali (di cui non sono, quindi, presenti nella collezione i corrispondenti mutanti per delezione; es. la chinasi Pkc1), che a loro volta lo trasmettono alle chinasi Bck1 e Slp2 (i mutanti relativi sono Cd-Ni-sensibili). Slp2 attiva in modo specifico determinati *target* nucleari, quali ad esempio alcuni fattori di trascrizione, come Rlm1, il complesso multi-proteico SBF formato dalle catene polipeptidiche di Swi4 e Swi6 (i cui corrispondenti mutanti per delezione risultano sensibili in modo specifico al cadmio) ed il complesso Ccr4-Paf1 (vedere *subnetwork* n°6).

Il *pathway* di integrità della parete influenza alcuni processi importanti per il mantenimento dell'integrità della parete, tra cui la sintesi di β -glucani richiesti per la formazione di una parete funzionale, la biogenesi dei suoi componenti e l'organizzazione del citoscheletro (Levin, 2005). Il *pathway* è attivato da diversi stimoli ambientali tra cui stress termico, iposmotico, trattamento con feromoni e sostanze (es., calcofluorobianco, *congo red*, caffeina) in grado di perturbare il normale assetto e la biologia della parete (Levin, 2001), in risposta all'esposizione all'acido perossilinoico, uno dei radicali perossidici più tossici per la vitalità cellulare che a causa dell'alta affinità con il core idrofobico delle membrane è in grado di destrutturare il doppio strato lipidico, favorendo la perossidazione lipidica (Alic et al., 2003). L'attivazione del *pathway* agisce nel portare al riparo le componenti danneggiate sia della parete che della membrana cellulare, in concerto con una riorganizzazione del citoscheletro di actina. Una mutazione in uno qualsiasi dei componenti del *pathway* porta ad una maggior suscettibilità alla lisi cellulare e alla *down*-regolazione dei geni

target, suggerendo che il trattamento con metalli tossici induca un indebolimento della parete cellulare.

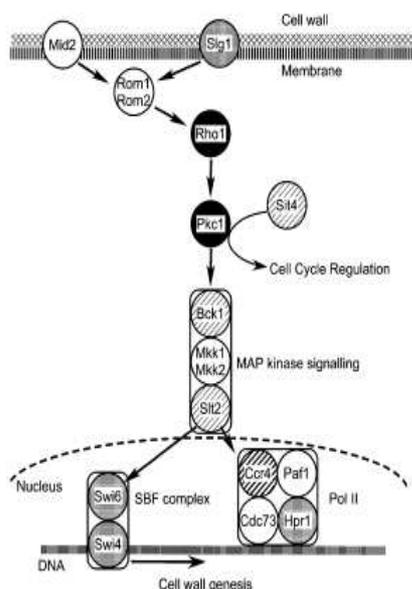


Figura 7. *Pathway* di integrità della parete. Il segnale proveniente da uno stimolo esterno viene trasmesso alla membrana plasmatica a specifiche proteine sensore (es., Mid2, Slg1) che mediano una cascata di eventi che porterà a cambiamenti a livello di espressione genica. La proteina essenziale Rho1 (appartenente alla famiglia delle proteine G) risiede nella membrana plasmatica e riceve gli *input* provenienti dall'esterno per trasmetterli a Pkc1, omologa alla proteina chinasi C. Diverse proteine controllano la funzionalità di Rho1, come alcuni fattori di scambio nucleotidico (*guanosine nucleotide exchange factors*, o *GEF*) quali Rom1 e Rom2 (a funzione ridondante). Pkc1 in forma attiva lega GTP e fosforila la chinasi Bck1, che a sua volta fosforila le chinasi Mkk1 e Mkk2 (a funzione ridondante) che attivano Slt2. Diversi fattori di trascrizione tra cui il complesso SBF (Swi4/Swi6) e quello formato dalle proteine Ccr4-Not, sono gli effettori a valle della cascata.

Evidenze sperimentali mostrano che un eccesso di ioni cadmio porta all'attivazione di distinti *MAPK pathway* in pianta (Jonak et al., 2004) e che mutanti nei geni codificanti per le chinasi Slt2 e Bck1 mostrano sensibilità agli ioni Al^{3+} (Kakimoto et al., 2005).

I metalli potrebbero portare ad un indebolimento della struttura e delle funzioni della parete e delle membrane cellulari (plasmatica, ma anche organellari) formando dei complessi di coordinazione con i gruppi reattivi delle proteine (fosfati, piridinici, cisteinici e istidinici) e determinando in ultima analisi la formazione di specie radicaliche. E' noto, in particolare per il cadmio, che, pur non essendo un metallo redox attivo, indirettamente porta alla genesi di specie radicaliche (e quindi a stress

ossidativo) determinando una diminuzione degli *scavenger* delle specie ROS (es. il glutatione) a causa della forte affinità di legame per i gruppi tiolici di questi polipeptidi. E' stato evidenziato che il cadmio aumenta i livelli di perossidazione lipidica nel fegato di ratti esposti al metallo (Beyersmann., 2003), portando a supporre che il cadmio sia in grado di provocare un danneggiamento della parete cellulare attraverso un meccanismo indiretto di formazione di radicali lipidici, che attivano il *pathway* implicato nel mantenimento dell'integrità della parete.

Il fulcro del *subnetwork* n°6 è la proteina Ccr4 che, a seconda delle proteine interagenti, forma diversi complessi multifunzionali, di cui il più noto è il complesso Ccr4-Not coinvolto in diversi processi cellulari che mediano la modificazione delle proteine, il *turnover* degli mRNA, l'inizio e la fase di allungamento della trascrizione (figura 8).

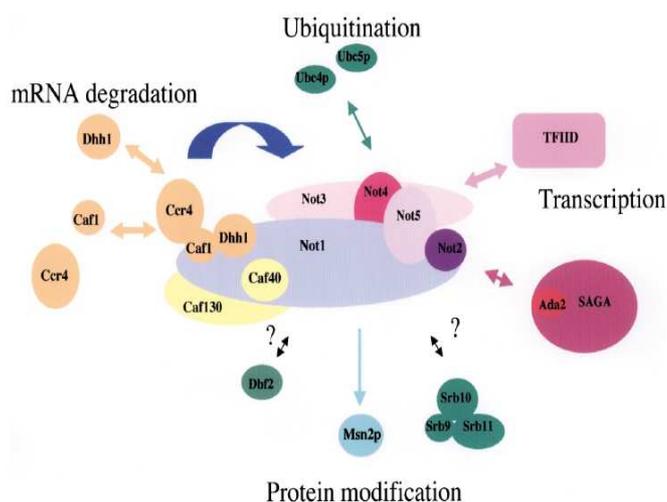


Figura 8. Rappresentazione del complesso Ccr4-Not in cui sono mostrati tutti i diversi componenti in grado di interagire con il *core* del complesso. La proteina Not1 agisce da *scaffold* molecolare per l'intero complesso e, mentre Ccr4 e Caf1 sono legate alla porzione N-terminale, le altre subunità Not interagiscono col complesso attraverso la porzione C-terminale. Diverse proteine interagiscono con distinte parti del complesso: la proteina Dhh1, una putativa RNA elicasi coinvolta nel *pathway* di degradazione dell'mRNA si associa *in vivo* con la proteina Caf1, mentre la porzione C-terminale di Not1 e alcuni componenti Not si associano con varie proteine coinvolte nell'inizio della trascrizione come la subunità Ada2 del *SAGA complex*, varie subunità della RNA polimerasi II, Srb9, Srb10 e Srb11 e subunità del complesso TFIID come Taf13 e Taf1 (Lenssen et al., 2005). La proteina Not4, inoltre, interagisce con le ubiquitina-ligasi di tipo 2 (Ubc4 e Ubc5) coinvolte nella degradazione proteica ubiquitina-dipendente, sottolineando il coinvolgimento del complesso in tale processo.

Il complesso è formato dalle esonucleasi Ccr4 (il cui dominio C-terminale presenta attività esonucleasica 3'-5' specifica sia per DNA che per RNA a singolo filamento) e Caf1 (i mutanti sono Cd/Ni sensibili), che hanno un ruolo nel *turnover* degli mRNA, dalle cinque proteine Not (Not1-5) principalmente coinvolte nell'inizio della trascrizione RNA polimerasi II-dipendente e nella modificazione proteica, e dalle due proteine Caf40 e Caf130 la cui funzione rimane ancora da chiarire (Collart, 2003; Lenssen et al., 2005). Mutazioni in diverse subunità del complesso conferiscono ipersensibilità a vari composti in grado di provocare danni al DNA (es., idrossiurea, metilmetan sulfonato, raggi IR), ed il ruolo del complesso in tale risposta coinvolge sia l'attività deadenilasica, sia l'attività deputata al controllo della trascrizione (Traven et al., 2004). Nessun mutante deleto in geni *NOT* è stato identificato nel nostro *screening*, che ha invece evidenziato la presenza di altri regolatori trascrizionali interagenti con Ccr4 (es., Rtf1 e Dbf2). Oltre a Caf1 e Ccr4, anche Pop2, un'altra delle maggiori deadenilasi di *S. cerevisiae*, e tre addizionali enzimi coinvolti nel processamento dell'RNA (Pat1, Kem1 e Lsm7) sono coinvolti nella Cd-Ni tolleranza. Il ruolo che sembra quindi avere maggiore rilievo nell'omeostasi dei metalli è quello coinvolto nel *turnover* delle molecole di RNA messaggero, come evidenziato anche dalla tipologia delle proteine che interagiscono con Ccr4 all'interno del relativo *subnetwork*.

Il processo di degradazione degli mRNA in lievito avviene attraverso diversi *step*: l'accorciamento della coda di *poly-A* presente nell'estremità 3' della molecola, la rimozione del "cap" presente in 5' e la degradazione dell'intero trascritto mediante l'azione delle riboesonucleasi. Il controllo della velocità con cui avviene tale processo influenza sia la stabilità dei messaggeri sia la loro traduzione in prodotti proteici e quindi anche l'espressione genica cellulare (Tucker et al., 2002).

Ccr4 ed altre proteine accessorie sembrano quindi giocare un ruolo nella tolleranza ai metalli che potrebbe essere legato ad una ipotetica riprogrammazione traduzionale sotto condizioni di stress.

Questa ipotesi viene avvalorata anche dall'identificazione di mutanti Cd/Ni sensibili in subunità del complesso del poro nucleare (*subnetwork* n°7) ed in un fattore di esporto nucleare dell'mRNA (Npl3). I pori nucleari mediano il traffico tra nucleo e citoplasma e consistono di più di 30 nucleoporine (codificate dai geni *NUP*) reclutate dal citoplasma e che si assemblano tra l'interno e l'esterno dell'*envelope* nucleare,

formando una struttura chiamata complesso del poro nucleare (*nuclear pore complex, NPC*). L'importo e l'esporto nucleare richiedono recettori che riconoscono e legano specifici segnali di localizzazione nucleare (NLS e NES) presenti in proteine *cargo* di cui mediano il trasporto. L'esporto degli RNA messaggeri dal nucleo è un processo complesso accoppiato alla fase di trascrizione: nel nucleo il trascritto nascente viene rivestito da una varietà di proteine di legame all'RNA per formare un messaggero ribonucleoproteico (mRNP). Tali proteine di rivestimento servono per processare e portare alla maturazione del trascritto e per coniugarlo ai componenti dell'NPC, come ad esempio proteine appartenenti alla famiglia SR, incluso il fattore Npl3, che si associano con gli mRNA per mediarne il trasporto fino al citoplasma (Sanjay et al., 2001).

Diversi studi hanno mostrato una redistribuzione degli mRNA citoplasmatici in cellule esposte a stress; in tali condizioni, infatti, la traduzione dei trascritti viene inibita e il *pool* di mRNA citoplasmatici viene inviato a strutture, simili a granuli chiamati *P-body* (da *processing body*), in cui l'mRNA può essere riconosciuto per la degradazione oppure conservato in una forma non tradotta, fino al ripristino delle condizioni fisiologiche della cellula (Bond, 2006). Teixeira e collaboratori hanno recentemente dimostrato che i *P-body* aumentano nelle cellule sottoposte ad uno stress di tipo osmotico (Teixeira et al., 2005). Anche altre tipologie di corpi granulosi sono stati identificati negli eucarioti superiori esposti a stress come *heat shock*, stress ossidativo e stress da UV (Anderson et al., 2002). Anche in questi casi tali strutture sono il sito per la deposizione di mRNA, in particolare quelli codificanti per proteine espresse costitutivamente (*housekeeping*), mentre quelli codificanti per proteine necessarie per la risposta allo stress (come per esempio le *heat shock protein*) vengono esclusi da tali granuli citosolici. Si può quindi speculare che il controllo della degradazione delle molecole di RNA e il loro traffico intracellulare abbiano un ruolo anche nella difesa da stress metallico.

Gli ultimi due *subnetwork* messi in evidenza dall'analisi interattomica dei mutanti, i cui rispettivi prodotti genici deleti sono importanti per la risposta al trattamento ai due metalli, sono implicati nella biosintesi dell'ergosterolo (*subnetwork* n°8) e nell'omeostasi degli ioni (*subnetwork* n°9). Ceppi con mutazioni negli enzimi deputati alla catalisi degli ultimi *step* della biosintesi dell'ergosterolo (*Δerg2*, *Δerg6* e *Δerg24*,

che mostrano Cd/Ni sensibilità) sono vitali, ma risultano essere sensibili a diverse sostanze citotossiche, a causa sia di un effetto diretto sull'aumento della permeabilità della membrana (dovuto alla presenza di mutazioni in geni del *pathway* dell'ergosterolo), sia di una ridotta efficienza della pompa di efflusso Pdr5 (*ATP-binding cassette*), un trasportatore di membrana coinvolto nel trasporto di steroidi, nella resistenza a cationi e nella detossificazione cellulare, la cui funzionalità dipende, almeno in parte, dalla composizione della membrana plasmatica (Bachhawat et al., 1999).

Il *subnetwork* n°9 comprende la proteina transmembrana Pho86, richiesta per la corretta traslocazione alla membrana plasmatica del trasportatore del fosfato Pho84 ed il complesso deputato all'*uptake* ad alta affinità di ioni Fe^{2+} (Ftr1/Fet3). Nonostante non siano state documentate interazioni fisico-genetiche in BIOGRID, anche altri prodotti genici possono essere messi in relazione con il *subnetwork* n°9. Tra questi, ad esempio, il fattore di trascrizione Aft1, che regola positivamente l'espressione di Fet3-Ftr1 in condizioni di carenza di ferro, il trasportatore ad alta affinità del rame (Ctr1) e il fattore di trascrizione Mac1 che ne regola l'espressione. Questi geni, la cui delezione determina Cd-Ni-sensibilità, evidenziano la possibilità che i metalli tossici possano determinare un depauperamento di ferro, e di altri ioni essenziali, limitandone la disponibilità per la crescita cellulare (vedere sezione 3.1g). E' interessante notare che Fet3, l'ossidasi che catalizza la conversione di Fe^{2+} in Fe^{3+} (trasportato poi da Ftr1), è una proteina che richiede rame come cofattore. Mutazioni in geni quali *MAC1* o *CTR1* determinano carenza intracellulare di rame, che indirettamente potrebbe portare a *starvation* di ferro a causa della sintesi di una proteina Fet3 non funzionale.

3.1f Network di interazione: mutanti sensibili specifici

La stessa analisi di identificazione di *network* di interazione viene applicata anche ai geni corrispondenti a mutanti specificamente sensibili a uno solo dei due trattamenti. Sono stati identificati sette nuovi *subnetwork* metallo-specifici, mentre altri geni arricchiscono le sottocategorie precedentemente trovate per i mutanti comuni.

Per quanto riguarda i mutanti nichel sensibili (figura 9), significativa è l'espansione del *subnetwork* n°7 relativo al complesso del poro nucleare, mentre l'unico *subnetwork* specifico (n°10) ritrovato è quello che comprende tutti i componenti dell'*AP-3 complex*, un eterotetramero formato da due adaptine ad alto peso molecolare (Apl5, Apl6), una di medie (Apm3) ed una di piccole dimensioni (Aps3), coinvolto nel traffico proteico Golgi-vacuolo (vedere di seguito). Il mutante *vps* di classe B $\Delta vps41$ (che è Cd-Ni-sensibile) è caratterizzato da un blocco nella formazione de l'*AP-3 complex*; queste ed altre osservazioni hanno portato a dimostrare che uno dei ruoli di Vps41 sia quello di partecipare alla formazione del complesso (Bowers et al., 2005).

Il *subnetwork* n°11 (*General transcription*) viene identificato anche quando si analizza la mappa interatomica del cadmio (figura 10). In realtà, i due gruppi sono caratterizzati da proteine diverse con funzioni legate alla trascrizione.

Quando si analizza la mappa interatomica del cadmio (figura 10) si osserva, tra gli altri, un arricchimento del *subnetwork* n°4 che comprende diversi membri di complessi di rimodellamento della cromatina (*SAGA complex*, *INO80 complex* e l'istone deacetilasi HDA1). Il fatto che mutanti in geni che codificano componenti di tali complessi abbiano un fenotipo di Cd-sensibilità mette in evidenza la genotossicità del cadmio già evidenziata in precedenti lavori scientifici (Jin et al., 2003). Il cadmio potrebbe influenzare non solo l'accesso al DNA da parte di enzimi deputati alla riparazione di un danno della doppia elica (Jin et al., 2003), ma anche cambiamenti nell'espressione genica necessari per la modulazione di geni che permettano di ripristinare le condizioni fisiologiche della cellula dopo l'azione tossica del metallo.

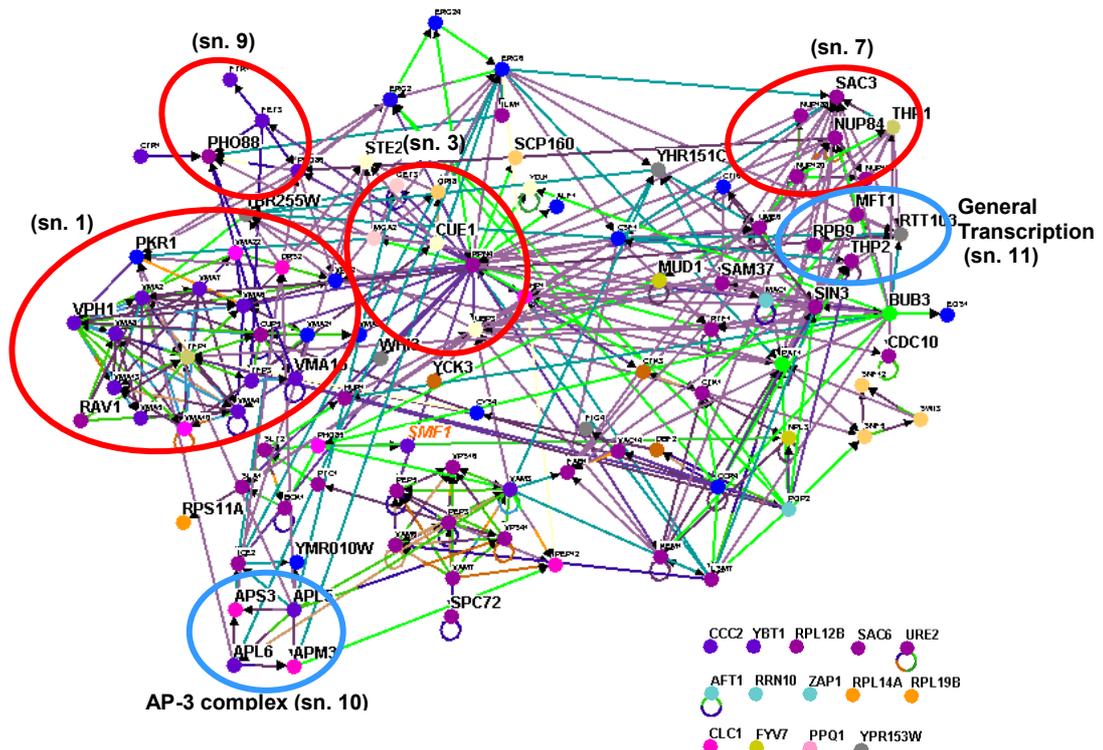


Figura 9. *Subnetwork* identificati tra i prodotti genici la cui delezione causa sensibilità specifica al nichel. Sia i mutanti co-sensibili (rappresentati con un carattere più piccolo) che quelli specificamente sensibili al nichel (rappresentati con un carattere più grande) vengono usati per la costruzione del *network*. I *subnetwork* Ni-specifici sono rappresentati da cerchi di color blu, quelli precedentemente identificati dall'analisi dei mutanti co-sensibili da cerchi colorati di rosso.

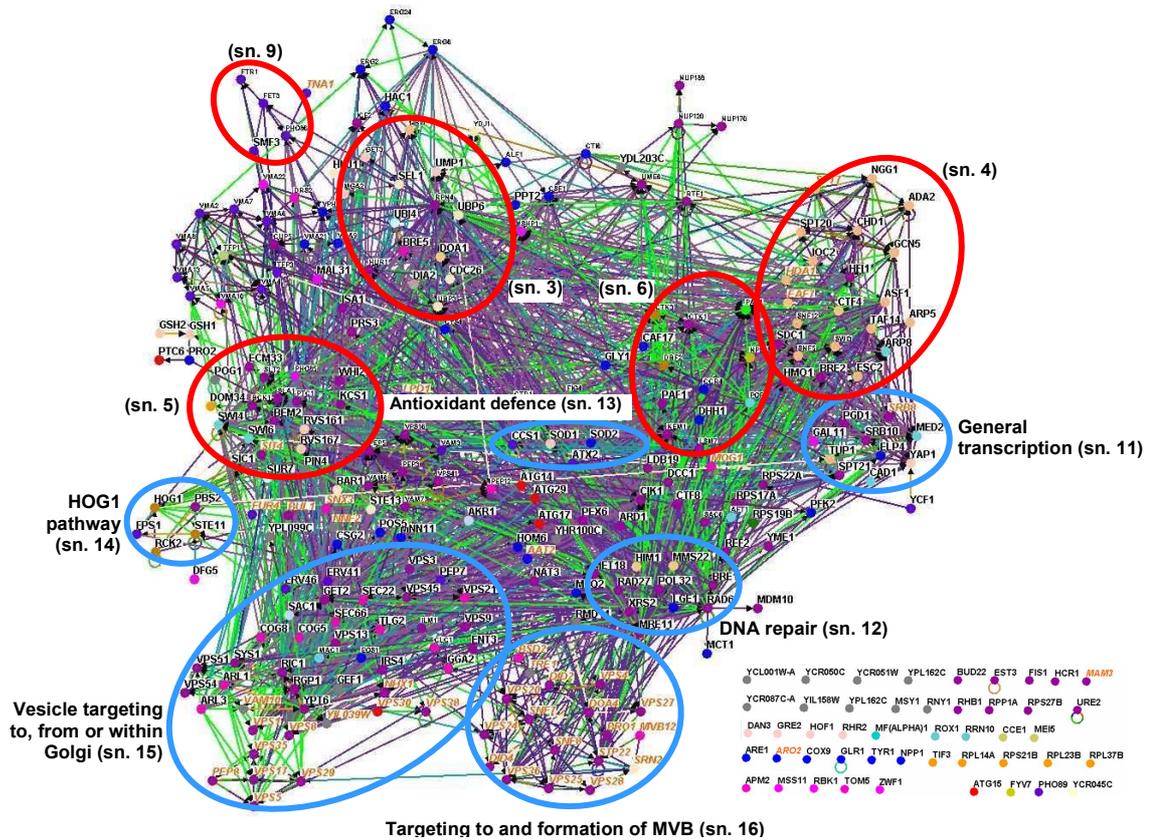


Figura 10. *Subnetwork* coinvolti nella sensibilità specifica al cadmio. I *subnetwork* che caratterizzano mutanti co-sensibili e quelli emersi dall'analisi dei mutanti cadmio-specifici sono evidenziati da cerchi colorati rispettivamente di rosso e di blu (vedere legenda figura 9 per ulteriori dettagli). In arancione sono rappresentati i prodotti genici la cui delezione determina Cd-sensibilità, ma Ni-resistenza.

Subnetwork cadmio-specifici già precedentemente associati alla cadmio-tolleranza in *S. cerevisiae* sono coinvolti nel *DNA repair* (n°12), ne l'*antioxidant defence* (n°13) e nel *pathway* di Hog1 (n°14). La categoria “*DNA repair*” comprende componenti di differenti meccanismi che preservano l'integrità genomica della cellula, tra cui la riparazione del DNA e il mantenimento della struttura cromatinica. La maggior parte di queste funzioni biologiche sono fornite da complessi proteici piuttosto che singoli componenti come nel caso dell'enzima Rad6, un enzima coniugante l'ubiquitina coinvolto nel riparo post-replicativo e nel silenziamento dei telomeri che in concerto con l'azione di Bre1 (ubiquitina ligasi di tipo E3) e Lge1 (a funzione sconosciuta)

catalizza l'ubiquitinizzazione delle proteine istoniche, importante per la modificazione dell'espressione genica in risposta a vari tipi di stress genotossico (Pan et al., 2006). *Arad6*, *Abre1* e *Alge1* mostrano tutti fenotipo ipersensibile in presenza di ioni cadmio.

Anche le subunità dell'*MRX complex*, di cui fanno parte le proteine Mre11 e Xrs2 (i relativi mutanti sono cadmio sensibili) hanno un ruolo in *Saccharomyces cerevisiae* nella riparazione delle rotture a doppio filamento del DNA (*DNA double-strand break*), una severa forma di danno al DNA che causa instabilità genomica e conseguente morte cellulare (Usui et al., 2001; D'Amours et al., 2001; Osley et al., 2007).

I prodotti dei geni *RAD27* e *POL32* hanno un ruolo nel controllo di eventuali errori generati durante la replicazione genica, che possono guidare ad endogene forme di danno al DNA (Pan et al., 2006; Huang et al., 2005).

I sistemi di difesa antiossidante della cellula (ad es., Sod1 e Sod2) presenti nella sottocategoria n°13, specifica per la risposta al cadmio, sono stati ampiamente riportati essere coinvolti nelle difese ai metalli tossici, a causa della formazione di specie radicaliche dell'ossigeno dovuta ad una diminuzione metallo-mediata dei gruppi tiolici dei componenti antiossidanti (Brennan et al., 1996).

Il *pathway* di Hog1 (*high-osmolarity glycerol response*) è caratterizzato da una cascata chinasi formata dalla MAPK chinasi Pbs2 e dalla MAP chinasi Hog1. Si è pensato per molto tempo che fosse attivato esclusivamente da stress di tipo iperosmotico, a differenza di *pathway* omologhi ritrovati nel lievito *S. pombe*, in cellule di mammifero e di pianta attivati anche da altre e diverse perturbazioni ambientali (Gustin et al., 1998). Il lavoro di Bilsland e collaboratori (Bilsland et al., 2004) mostra che molti componenti del *pathway*, quando deleti, determinano sensibilità ad agenti ossidanti, come il terbutil idroperossido (tBOOH), ed a metalli non essenziali (es., Cd e Hg), rinforzando ulteriormente l'idea che il fattore Hog1 ed i relativi componenti funzionali siano implicati nella tolleranza allo stress ossidativo e metallico.

I *subnetwork* n°15 e n°16 raggruppano una serie di prodotti genici implicati nel traffico intracellulare, la mutazione di molti dei quali determina un fenotipo di Cd-sensibilità, ma Ni-resistenza (vedere figura 10 e paragrafo 3.1i).

Esistono differenti destinazioni per le proteine neo-sintetizzate che escono dalle cisterne dell'apparato del Golgi (figura 11). Alcune proteine possono essere trasportate alla membrana plasmatica per essere secrete o incorporate nel doppio strato lipidico.

Tale percorso può essere diretto o mediato da compartimenti endosomiali, corpi endocellulari delimitati da membrana costituiti dalla confluenza di vescicole di endocitosi.

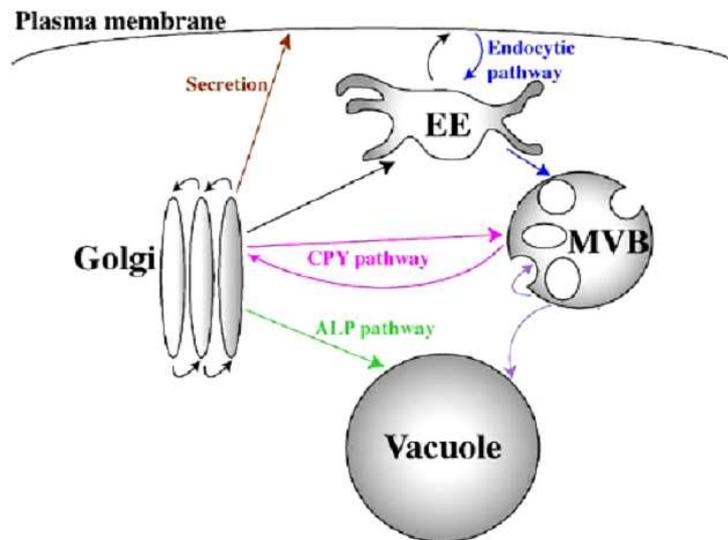


Figura 11. Rappresentazione del *trafficking* proteico all'interno di una cellula di lievito. Le proteine provenienti dall'apparato del Golgi possono essere destinate alla membrana plasmatica per la secrezione nel mezzo extracellulare (*secretion*), oppure per divenire componenti integrali del doppio strato lipidico. Alternativamente le proteine sono dirette al vacuolo, attraverso un diretto passaggio (*ALP pathway*) o mediato da compartimenti endosomiali (*CPY pathway*). Le proteine transmembrana provenienti sia dall'apparato del Golgi (idrolasi o proteine riconosciute per la loro degradazione) che dalla membrana plasmatica (*endocytic pathway*) e destinate al lume del vacuolo sono presenti all'interno delle strutture membranose interne delle vescicole dell'endosoma tardivo/MVB, a differenza delle proteine destinate al tonoplasto (V-ATPasi), incluse invece nel loro lume interno. E' evidenziato in figura anche il trasporto retrogrado endosoma-Golgi (vedere sezione 3.1i). Abbreviazioni: ALP, fosfatasi alcalina; CPY, carbossi peptidasi Y; EE, endosoma precoce; MVB, *multivesicular body*.

Il traffico vescicolare Golgi-vacuolo in cellule di *S. cerevisiae* procede secondo due direzioni: la prima (*CPY pathway*) passa attraverso l'endosoma tardivo (*late endosome*) caratterizzato dalla presenza dei *multivesicular body* (MVB) e prende il nome dalla proteina *cargo* (per eccellenza) che viene trasportata, la carbossi peptidasi Y; la seconda (*ALP pathway*) rappresenta una via di traffico diretta tra Golgi e vacuolo e viene definita "*pathway della fosfatasi alcalina*". Mutazioni in componenti dell'*ALP pathway* (es., *AP-3 complex*) determinano un fenotipo di sensibilità specifico per il

nicel, mentre mutazioni in componenti del CPY *pathway* causano Cd-sensibilità, ma Ni-resistenza (vedere sezione 3.1i). Particolarmente interessante è l'osservazione che anche i mutanti nel trasporto retrogrado endosoma-Golgi dei recettori richiesti per il traffico attraverso il CPY *pathway* sono sensibili agli ioni cadmio, ma resistenti al nichel (vedere sezione 3.1i). Risulta chiaro quindi che differenti metalli o differenti componenti associati allo loro specifica detossificazione, si muovono in maniera diversa attraverso il *network* di traffico Golgi-vacuolo.

L'importanza di un corretto *trafficking* destinato al vacuolo evidenzia ulteriormente il ruolo esercitato dal vacuolo nel contrastare la tossicità dei metalli. *In primis*, il vacuolo permette di diminuire la concentrazione citosolica di tali ioni mediante il loro sequestro nel lume vacuolare e per far ciò è necessario che le proteine transmembrana che mediano il trasporto degli ioni siano trafficate dal Golgi al vacuolo. Il vacuolo, inoltre, è necessario per la degradazione di proteine metallo-danneggiate e quindi risulta evidente l'importanza del trasporto Golgi-vacuolo di idrolasi e peptidasi necessarie per espletare tale funzione.

Altri geni la cui mutazione determina Cd- o Ni-sensibilità specifica codificano per trasportatori sia della membrana plasmatica (Smf1 e Mal31) che delle membrane che delimitano i compartimenti intracellulari (Pho88, Pho89, Smf3, Ycf1, Ccc2, Ybt1) per i quali non è mai stato riportato prima un coinvolgimento nella mobilizzazione dei metalli tossici (esporto o ridotto *uptake*).

3.1g Depauperamento di ferro metallo-indotto: differenti meccanismi d'azione tra cadmio e nichel

Per osservare potenziali analogie tra lo stress da metalli e altre perturbazioni ambientali in cellule di *S. cerevisiae*, utili allo scopo di ottenere informazioni su meccanismi di detossificazione comuni, abbiamo confrontato i nostri dati con quelli ottenuti da simili studi di fenotipizzazione genomica (Bennett et al., 2001; Serrano et al., 2004; Thorpe et al., 2004). Come mostrato dal *clustering* in figura 12, il pH alcalino è la tipologia di stress che più si avvicina alle condizioni determinate dalla presenza di cadmio e nichel nel mezzo di crescita.

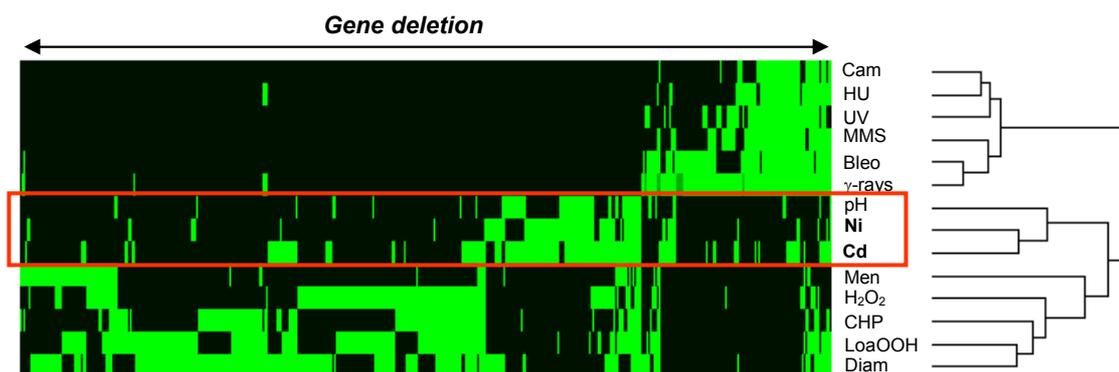


Figura 12. Confronto dello stress da metalli con altre tipologie di stress. *Clustering* gerarchico delle mutazioni che conferiscono Cd- e Ni-sensibilità con quelle che conferiscono sensibilità ad altri agenti in grado di provocare stress cellulare (Bennett et al., 2001; Serrano et al., 2004; Thorpe et al., 2004). Nell'asse delle X sono rappresentati i geni la cui delezione conferisce un fenotipo, mentre nell'asse delle Y i vari trattamenti presi in esame; i ceppi mutanti che mostrano un fenotipo di sensibilità sono mostrati in verde, mentre quelli a cui non è associato nessun fenotipo in nero. L'analisi viene condotta con il programma *EPCLUST* (<http://www.bioinf.ebc.ee/EP/EP/EPCLUST>). I trattamenti vengono selezionati da *screening* genomici condotti sulla collezione aploide dei mutanti per delezione: *camptothecin* (*Cam*); *hydroxurea* (*HU*); *ultraviolet radiation* (*UV*); *methyl methane sulfonate* (*MMS*); *bleomycin* (*Bleo*); *γ-radiation* (*γ-rays*); *alkaline pH* (*pH*); *menadione* (*Men*); *hydrogen peroxide* (*H₂O₂*); *cumene hydroperoxide* (*CHP*); *linoleic acid 13-hydroperoxide* (*LoaOOH*); *diamide* (*Diam*).

Circa la metà dei mutanti trovati sensibili al trattamento con i due metalli risulta sensibile anche al trattamento con pH alcalino. Tra questi mutanti troviamo quelli deleti in componenti coinvolti direttamente o indirettamente nell'omeostasi del ferro (*Fet3/Ftr1*, *Aft1*, *Ctrl* e *Mac1*; figura 13) la cui distruzione porta ad una condizione di ferro-deficienza. Serrano et al. dimostrano che la risposta al pH alcalino è legata, infatti, almeno in parte, all'omeostasi del ferro in quanto alti valori di pH riducono la solubilità di tale metallo (oltre che del rame) impedendo un corretto rifornimento citosolico alla cellula (Serrano et al., 2004). La cellula per crescere in queste condizioni attiva quello che viene chiamato l'*iron regulon*, che consiste nell'espressione dei geni deputati all'entrata di ferro portando in ultima analisi ad un maggior *uptake* di tale ione, essenziale per diverse funzioni cellulari.

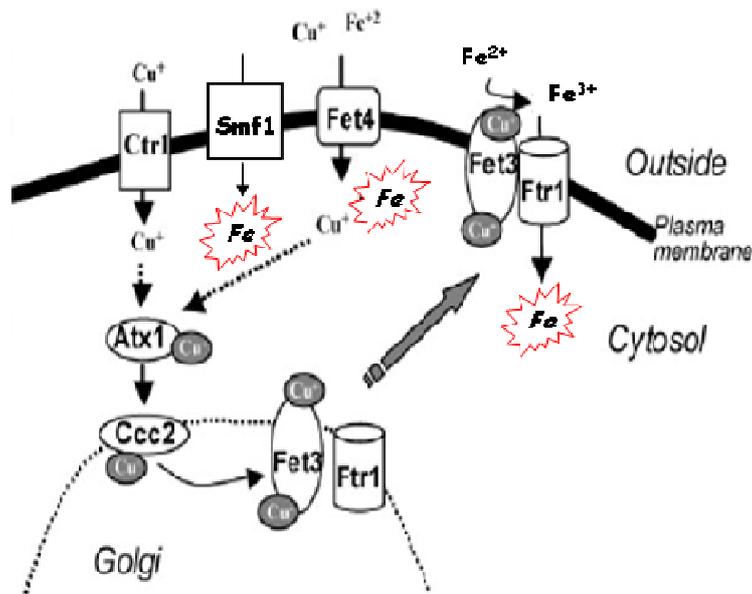


Figura 13. Sistemi di trasporto del ferro nel lievito *S. cerevisiae*. L'*uptake* di ioni ferro in una cellula di lievito in condizioni normali di crescita è mediata dai sistemi di trasporto a bassa affinità (es., trasportatori di membrana Fet4 e Smf1), che permettono anche il trasporto di altri ioni metallici di- e tri-valenti. In condizioni di carenza di ferro, il lievito *up*-regola il sistema di trasporto ad alta affinità costituito dal complesso proteico formato dalla permeasi Ftr1 e dalla ossido-reduttasi Fet3. Il trasporto ad alta affinità del ferro richiede la presenza intracellulare di rame, necessario per una corretta maturazione di Fet3 nell'apparato vescicolare. Il rame, trasportato nel citosol dal trasportatore Ctr1 e catturato dalla metallo-*chaperone* Atx1, viene utilizzato per la formazione di una proteina Fet3 funzionale dopo essere stato trasportato nell'apparato del Golgi dalla pompa ATP-asi (di tipo P) Ccc2. Tale processo richiede un ambiente acido nell'apparato vescicolare fornito dall'attività di H⁺-ATPasi vacuolari.

E' noto in letteratura che esiste una correlazione tra il difetto nel sistema di trasporto ad alta affinità del ferro e la sensibilità delle cellule a diversi metalli di transizione, come ad esempio cobalto, zinco e manganese (Li et al., 1998). L'ipotesi verte sul fatto che, in condizioni normali di crescita cellulare, l'*uptake* di ferro è mediato dall'utilizzo dei sistemi di trasporto a bassa affinità, i trasportatori Fet4 ed Smf1, che trasportano anche altri metalli di transizione (mostrati nella parentesi a fianco dei relativi trasportatori a bassa affinità). Questi metalli addizionali (se presenti in alte concentrazioni) possono quindi competere con il ferro per l'entrata nella cellula che diviene ipersensibile ai metalli stessi. L'aggiunta di ferro al *medium* di coltura, infatti, determina una reversione del fenotipo delle cellule a causa di una diminuzione della concentrazione intracellulare dei metalli non specifici (Li et al., 1998).

La risposta trascrizionale delle cellule di lievito allo stress esercitato da concentrazioni sub-tossiche di cobalto è molto simile a quella osservata durante condizioni limitanti di ferro (Stadler et al., 2002). In queste condizioni venivano infatti *up*-regolati i geni del *iron regulon*, che risultano per la maggior parte sotto il controllo del fattore di trascrizione Aft1, e altri geni che presentano nel loro promotore sequenze consenso riconosciute dal fattore stesso. Uno dei meccanismi con cui il cobalto esercita, quindi, la sua tossicità è quello di competere con il ferro intracellulare per specifici siti di legame proteici, pregiudicandone la funzione. La principale risposta allo stress indotto da tale metallo è dunque un incremento del trasporto del ferro all'interno della cellula attraverso un'attivazione dei relativi sistemi di *uptake*, analogamente a quanto accade per lo stress alcalino.

Anche la risposta cellulare ad un eccesso di zinco porta ad una *up*-regolazione di diversi geni implicati nell'omeostasi del ferro e di molti geni *target* del fattore Aft1, a causa del fatto che lo zinco sembra competere con il ferro sia per l'entrata nella cellula sia per il legame a specifici siti di legame proteici (Pagani et al., 2007).

Per quanto riguarda gli ioni cadmio e nichel, è noto che in cellule animali e di pianta sembrano ridurre i livelli di ferro intracellulare (Davidson et al., 2005; Raja et al., 2006; Wang et al., 2007; Yoshihara 2006).

Sulla base dei fenotipi di ipersensibilità osservati ed alla luce di queste precedenti conoscenze sugli effetti provocati dai metalli sulla bio-disponibilità di ferro, abbiamo voluto approfondire la relazione tra deficienza di ferro e tossicità a cadmio e nichel.

Per prima cosa abbiamo analizzato quali potessero essere le conseguenze dell'aggiunta di ioni ferro sulla vitalità di cellule WT o delete nel sistema di *uptake* ad alta affinità del ferro ($\Delta fet3/\Delta ftr1$), in presenza di ioni cadmio o nichel nel terreno di crescita. Come mostrato dal fenotipo ipersensibile del mutante $\Delta fet3$ (figura 14), la presenza di ioni Cd ed Ni induce una *starvation* di ferro e l'aggiunta di $\sim 30 \mu\text{M}$ di FeCl_3 migliora in modo significativo la tolleranza ad entrambi gli ioni, sia per quanto riguarda i ceppi WT, sia per il ceppo $\Delta fet3$ (e $\Delta ftr1$, dati non mostrati).

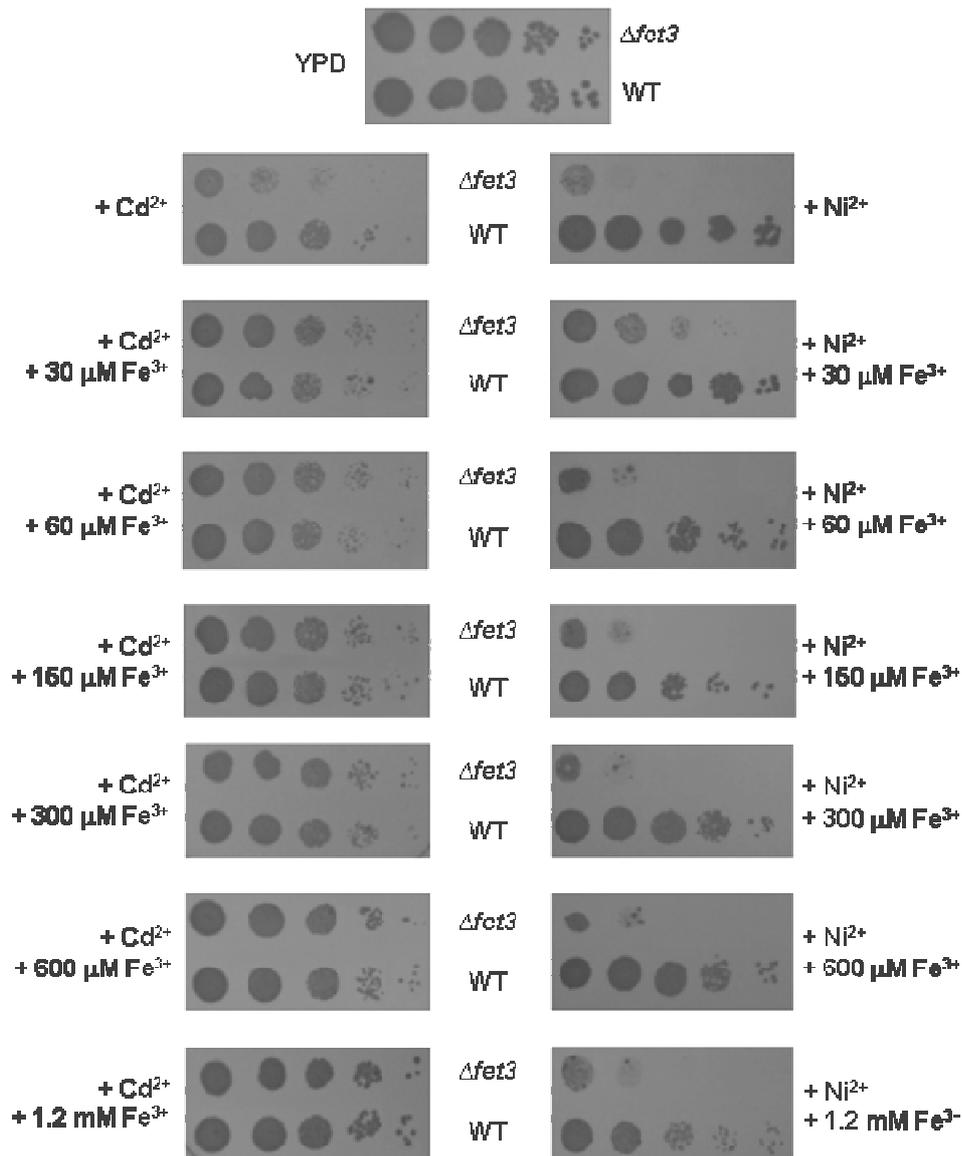


Figura 14. Effetto provocato dall'aggiunta di ioni ferro nel *medium* di crescita. Sono state effettuate diluizioni seriali (di dieci volte, partendo da una coltura con OD₆₀₀=1) del ceppo WT e del ceppo mutante $\Delta fet3$, piastrate in terreno YPD addizionato di ioni Cd (40 μ M) o Ni (2.5 mM) e diverse concentrazioni di FeCl₃. Una piastra di controllo senza l'aggiunta di metalli è mostrata nella parte alta della figura. Simili risultati (non mostrati in figura) sono stati ottenuti anche con il ceppo deleto $\Delta ftr1$.

In presenza di ioni cadmio si osserva che i ceppi analizzati evidenziano una tolleranza al metallo che è proporzionale alla quantità di ferro aggiunta al terreno, mentre in presenza di ioni nichel la tossicità a tale metallo è solo parzialmente revertita in un *range* di concentrazioni di ioni Fe³⁺ ristretto (30-60 μ M). E' possibile inoltre osservare

che il grado di sensibilità del mutante *Δfet3* mostrato nei confronti dei due metalli è differente, risulta infatti debolmente sensibile agli ioni cadmio (fenotipo LS), e fortemente sensibile agli ioni nichel (fenotipo HS). Si può quindi concludere che entrambi i metalli sono coinvolti nell'omeostasi del ferro, e sebbene tramite distinti (e indiretti) meccanismi d'azione, il depauperamento di ferro prodotto è un importante determinante della tossicità esercitata da tali metalli tossici.

Per gli ioni Cd^{2+} si è ipotizzato un meccanismo basato su una diretta competizione con gli ioni ferro per l'entrata nella cellula attraverso i trasportatori a bassa affinità Fet4 e Smf1. Infatti, abbiamo osservato che la delezione dei geni *FET4* e *SMF1* conferisce tolleranza al cadmio (ma non al nichel) e che il ceppo decto in un regolatore negativo di Fet4 (*Δrox1*) risulta ipersensibile in maniera specifica al cadmio (figura 15).

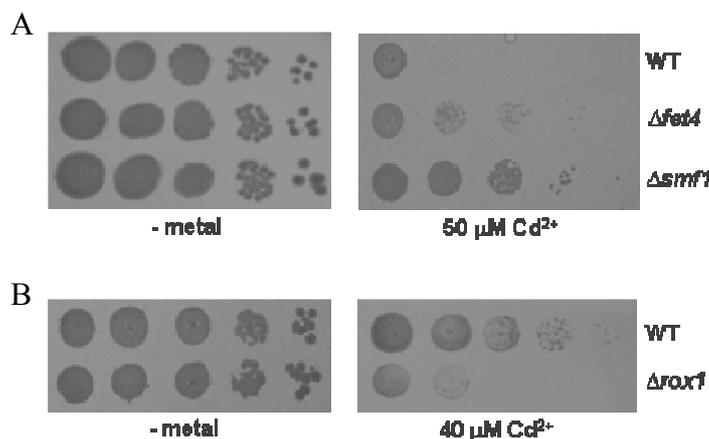


Figura 15. Il cadmio compete con il ferro per l'entrata nella cellula. A) Diluizioni seriali (di dieci volte, partendo da una coltura di $OD_{600}=1$) che permettono di confrontare la differente vitalità cellulare del ceppo WT con quella dei ceppi decti nei geni che codificano per i trasportatori a bassa affinità Fet4 e Smf1, che cresciuti in presenza di ioni cadmio ($50 \mu M Cd^{2+}$) risultano maggiormente tolleranti. B) Diluizioni seriali del ceppo WT e del ceppo *Δrox1* (un regolatore negativo di Fet4) in presenza di concentrazioni sub-letali di cadmio ($40 \mu M Cd^{2+}$). E' evidente il fenotipo ipersensibile di *Δrox1*.

Simmetricamente, la sovraespressione del trasportatore Smf1 causa Cd (ma non Ni) sensibilità (vedere figura 19).

L'aggiunta di concentrazioni via via crescenti di ferro al terreno di coltura (concentrazioni di $FeCl_3$ maggiori di $40 \mu M$, figura 14) determina quindi una maggior

tolleranza nei confronti degli ioni cadmio a causa della competizione tra i due ioni per l'entrata all'interno della cellula, ma anche a causa di una diminuzione della concentrazione sulla membrana plasmatica dei due trasportatori. E' noto, infatti, che un aumento della concentrazione di ferro nel terreno determina la *down*-regolazione dei due sistemi di trasporto a livello trascrizionale (per il gene *FET4*) ed a livello post-traduzionale (per la proteina Smf1) attraverso il *pathway* endocitotico (vedere figura 11 e paragrafo 2.1i; Liu et al., 1999; Water set al., 2002).

Il nichel invece non sembra competere con i sistemi di trasporto a bassa affinità, infatti, la delezione di *FET4* e *SMF1* non determina nessun fenotipo di resistenza in presenza di ioni nichel, ma piuttosto si riscontra un fenotipo di ipersensibilità per quanto riguarda *SMF1*. L'aumento della concentrazione di ferro nel terreno (maggiore di 40 μ M, figura 14) risulta addirittura tossica per la cellula come evidenziato dalla diminuzione della vitalità dei ceppi (incluso il WT) all'aumentare della concentrazione di ioni $FeCl_3$. In questo scenario, si può ipotizzare che la *down*-regolazione di Smf1 indotta dalle alte concentrazioni di ferro aggiunte al terreno possa contribuire all'aumento della tossicità del nichel, dato che la delezione di *SMF1* conferisce alla cellula un fenotipo di sensibilità al nichel. Il nichel quindi interferisce con l'omeostasi del ferro analogamente agli ioni cadmio, ma tramite un meccanismo differente e in gran parte sconosciuto.

3.1h Mutanti resistenti a cadmio e nichel

Dall'analisi dell'intero *pool* di deleti di *S. cerevisiae* in presenza di cadmio e nichel, sono emersi un totale di 45 ceppi mutanti con un'aumentata resistenza ai metalli testati: 20 e 11 di questi ceppi sono rispettivamente resistenti a cadmio e nichel, mentre i restanti 15 mutanti sono comuni ai due trattamenti (vedere figura 5).

Appartengono a quest'ultima classe il regolatore trascrizionale Rim101, più sette geni codificanti proteine coinvolte nella sua attivazione funzionale (figura 16 A). Rim101 fa parte di un complesso che comprende le proteasi Rim13 e Rim20, una putativa proteina transmembrana Rim9 e i prodotti dei geni *RIM21* e *RIM8* a funzione biologica sconosciuta; il ruolo di tutti questi componenti è quello di catalizzare il taglio

proteolitico nella porzione C-terminale della proteina Rim101, permettendone l'attivazione (Lamb et al., 2001).

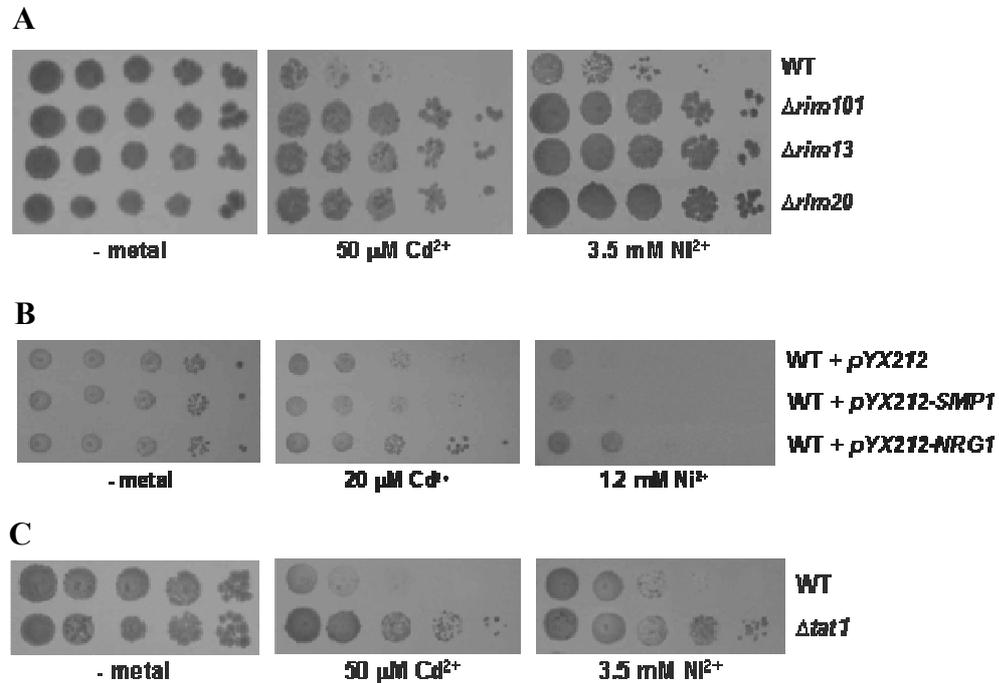


Figura 16. A) Diluizioni seriali dei mutanti *Δrim101*, *Δrim13* e *Δrim20* (coinvolti nel processamento proteolitico della proteina Rim101). E' evidente il loro fenotipo di resistenza rispetto al ceppo WT in presenza di cadmio ($50 \mu\text{M Cd}^{2+}$) e nichel (3.5 mM Ni^{2+}) nel terreno di crescita (YPD *medium*). B) Diluizioni seriali del ceppo WT trasformato con il vettore pYX212 e con i costrutti overesprimenti i geni *SMP1* e *NRG1*. Si osserva che il costrutto che porta alla sovraespressione di *NRG1* determina una aumentata tolleranza nel WT sia in presenza di ioni cadmio ($20 \mu\text{M Cd}^{2+}$) che nichel (1.2 mM Ni^{2+}) addizionati al terreno di crescita selettivo (SD *medium*). C) Diluizioni seriali del ceppo WT e del mutante *Δtat1* che evidenziano il fenotipo di resistenza del mutante rispetto al ceppo WT sia in presenza di cadmio ($50 \mu\text{M Cd}^{2+}$) che di nichel (3.5 mM Ni^{2+}).

Rim101 è stato per la prima volta identificato come regolatore positivo dell'espressione dei geni meiotici e di quelli coinvolti nel processo di sporulazione (Su et al., 1993).

Proteine omologhe a Rim101 sono ampiamente distribuite nei funghi e sono richieste per l'espressione genica, indotta da pH alcalino, di pompe ioniche e trasportatori che promuovono le risposte adattative degli organismi a cambiamenti di pH (Lamb et al., 2001; Tenney et al., 1999). Il mutante *Δrim101* presenta crescita stentata in presenza di

pH alcalino, elevate concentrazioni di ioni Li^+ e Na^+ , mentre l'espressione dei geni è indotta da un ambiente basico (Lamb et al., 2003).

Rim101 funziona principalmente come repressore trascrizionale e studi di espressione genica utilizzando *microarray* hanno premesso di identificare i geni sotto il suo controllo (Lamb et al., 2003). Tra questi, i *target* più studiati sono *NRG1* e *SMP1* che codificano per repressori che potrebbero mediare molte delle funzioni cellulari Rim-dipendenti. Nrg1 ha il ruolo maggiore nella regolazione delle risposte pH-dipendenti e nella tolleranza ionica (Haro et al., 1991; Serrano, 1996); la funzione di Smp1 è in gran parte sconosciuta, risulta omologo al fattore Rlm1, uno dei *target* di Slt2 del *MAPK pathway*, ed è stato quindi supposto un suo coinvolgimento nel mantenimento dell'integrità della parete e nel *pathway* di Hog1 (Dodou et al., 1997). Studi *in vivo* hanno, infatti, dimostrato che la proteina Hog1 interagisce con Smp1 (Nadal et al., 2003).

Per analizzare la relazione esistente tra Rim101 e la resistenza agli ioni cadmio e nichel, abbiamo sovraespresso nel ceppo WT, entrambi i *target* di Rim101 (Smp1 e Nrg1). Solo Nrg1 determina un aumento della tolleranza nelle cellule esposte ai due metalli (figura 16 B). Uno dei *target* del repressore Nrg1 è *TAT1*, che codifica per il trasportatore a bassa affinità degli amminoacidi triptofano e istidina, la cui delezione nel nostro *screening* determina resistenza agli ioni cadmio e nichel (figura 16 C). Abbiamo quindi supposto che il fenotipo osservato nel mutante $\Delta rim101$ possa essere dovuto, almeno in parte, ad una aumentata sintesi di Nrg1 che determina la *down-regolazione* di un possibile trasportatore promiscuo di amminoacidi e metalli presente sulla membrana plasmatica, ovvero Tat1. Per determinare se nei mutanti $\Delta rim101$ e $\Delta tat1$ vi sia un ridotto accumulo intracellulare di ioni Ni^{2+} , abbiamo utilizzato un *dye* fluorescente con una alta affinità di legame per il nichel, il *Newport Green* (Ke et al., 2007), caratterizzato da un aumento della fluorescenza in forma metallo-legata. I mutanti $\Delta rim101$ e $\Delta tat1$ presentano entrambi una forte riduzione della concentrazione di nichel all'interno della cellula, rispetto al ceppo WT (figura 17).

Dai risultati così ottenuti possiamo ipotizzare che il trasportatore Tat1 rappresenti una nuova via di entrata per specie metalliche non essenziali come cadmio e nichel, e che sia l'effettore a valle responsabile del fenotipo di resistenza del mutante $\Delta rim101$.

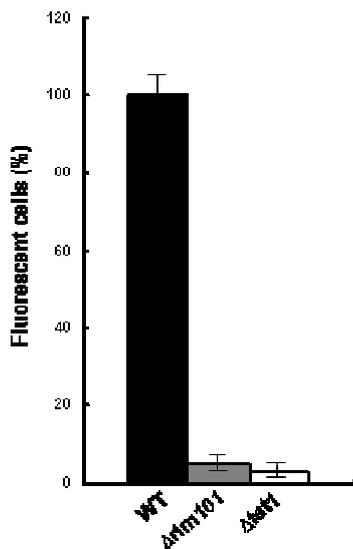


Figura 17. Accumulo di ioni nichel nel ceppo WT e nei ceppi mutanti *Δrim101* e *Δtat1*. I ceppi sono esposti per 18 h a 1 mM Ni²⁺, si effettuano dei lavaggi e poi si aggiunge il colorante *Newport green* e si procede ad una incubazione per 30' a 37°C e 30' a temperatura ambiente. Dopo lavaggio, le cellule vengono visualizzate mediante microscopio a fluorescenza. La percentuale di cellule fluorescenti (cellule fluorescenti/cellule tot), determinata in tre esperimenti indipendenti, viene espressa in relazione al WT (100%).

Altri trasportatori la cui mutazione porta a resistenza a ioni cadmio (ma non a nichel) sono Smf2, un trasportatore intracellulare del Mn (Liu, 1997) e Zrt3, un trasportatore che esporta ioni Zn dal vacuolo al citoplasma (MacDiarmid et al., 2000).

Fenotipi di metallo-resistenza sono inoltre determinati dalla distruzione dei *vacuolar transporter chaperone* Vtc4 (Cd/Ni resistente) e Vtc1 (Ni resistente), per i quali è noto che un aumento della tolleranza al Mn quando le loro funzioni sono distrutte (Nelson et al., 2000).

Tra i geni, che quando mutati causano Cd e/o Ni resistenza, troviamo anche *SIF2*, una subunità del complesso deacetilasi di Set3C la cui distruzione aumenta il silenziamento dei telomeri, i regolatori del ciclo cellulare *CLN3* e *SAP190*, e il regolatore delle MAP chinasi, *SIS2*.

3.1i Mutazioni nei complessi ESCRT e retromero influenzano in modo differente la cadmio- e nichel-tolleranza.

Come già anticipato (vedere figure 5 e 10), mutazioni in 45 geni influenzano in maniera opposta la Cd/Ni tossicità, rendendo le cellule sensibili al cadmio, ma incrementando la tolleranza al nichel. Il 70% di questi geni sono coinvolti nel traffico proteico al (e nella formazione del) compartimento prevacuolare [*prevacuolar compartment (PVC)* o

endosoma tardivo] (*pathway I*), e nel trasporto retrogrado dal PVC alle cisterne del Golgi (*pathway II*) (figura 18).

Alcuni di questi mutanti, tutti appartenenti al *pathway I* sono stati precedentemente trovati essere cadmio sensibili (Liu et al., 1997; Stimpson et al., 2006; Swaminathan et al., 1999; Wolfe et al., 1999) o nichel resistenti (Bishop et al., 2007), mentre sette mutazioni che influenzano il *pathway II* causano una tolleranza dei relativi ceppi deleti agli ioni nichel (e solo uno anche agli ioni cadmio) (Borelly et al., 2001).

I mutanti appartenenti al *pathway I* includono vari componenti che agiscono nelle prime fasi del processo di endocitosi ubiquitina-dipendente (es. Bsd2, Tre1), così come tutti i componenti dell'*endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT I, II, III)* (Bowers et al., 2005), i cui mutanti corrispondenti sono *vps* di classe E.

I complessi ESCRT si assemblano in concerto a livello dell'endosoma e determinano il reclutamento di proteine transmembrana monoubiquitinate, che vengono internalizzate in vescicole che si formano per endoflessione verso l'interno della membrana endosomiale che delimita gli MVB. La rimozione delle ubiquitine (mediata da Doa4) risulta essenziale per la terminale localizzazione negli MVB e l'ubiquitina così rimossa va a reintegrare il *pool* cellulare. Diversi fattori partecipano a questo processo che si conclude con la fusione del PVC al vacuolo con conseguente degradazione delle vescicole MVB ivi contenute (Bowers et al., 2005).

I mutanti appartenenti al *pathway II* sono deleti in geni coinvolti nel trasporto retrogrado endosoma-Golgi, inclusi tutti i componenti del complesso del retromero oltre ad altre proteine correlate funzionalmente a tale processo (ad es., Vps30 e Snx3) (Seaman, 2005; Strohlic et al., 2007). Il complesso del retromero è formato dall'associazione di due sub-complessi: Vps35, Vps29 e Pep8 che hanno il compito di selezionare i *target* da trasportare; Vps5 e Vps17 che hanno un ruolo prettamente strutturale nella formazione delle vescicole.

Il fenotipo di alcuni mutanti appartenenti ad entrambi i *pathway*, sono mostrati in figura 18 B.

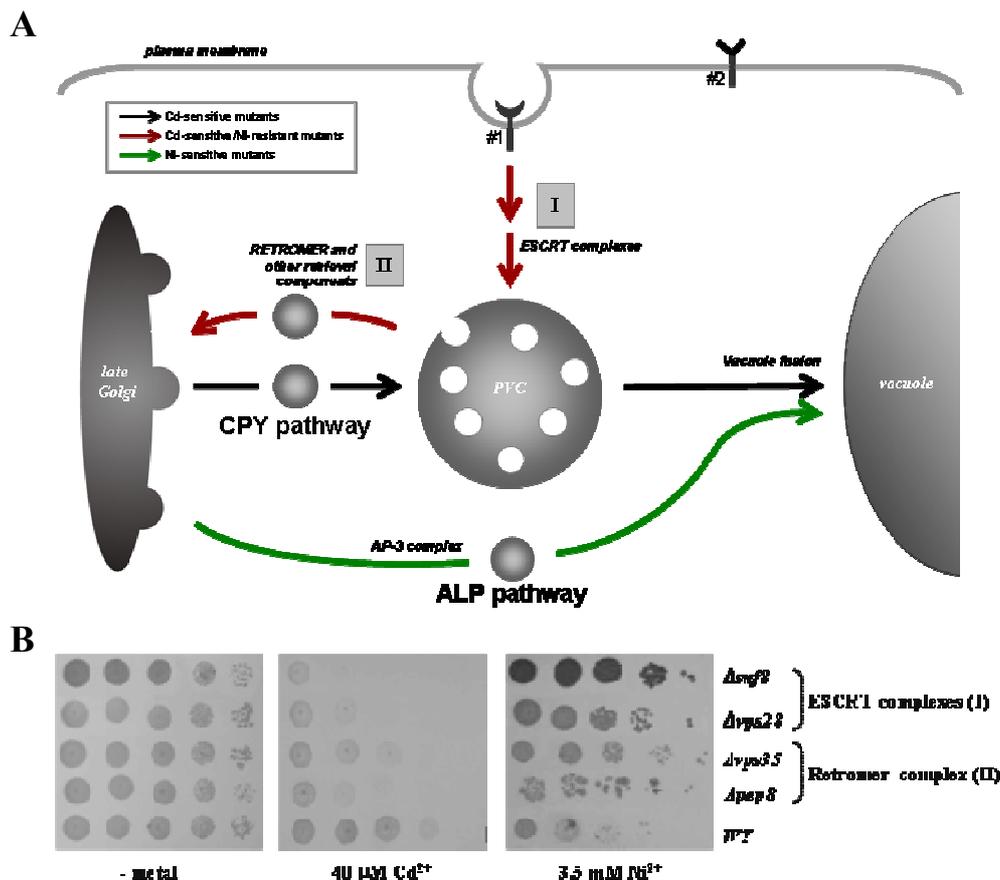


Figura 18. A) Schema raffigurante diverse vie di traffico intracellulare in *S. cerevisiae*. Le diverse vie di traffico (CPY pathway, ALP pathway, pathway endocytotic e retromer complex), sono rappresentata da frecce in cui un codice colore illustra il fenotipo assunto dai mutanti dei componenti del relativo pathway, in presenza di cadmio e nichel. Un difetto nel trasporto dalla membrana plasmatica ai compartimenti prevacuolari (PVC) (pathway I) e nel trasporto retrogrado dal PVC alle cisterne del Golgi (pathway II) determina Cd sensibilità/Ni resistenza. Mutazioni nei componenti dei due pathway di traffico Golgi-vacuolo (CPY e ALP pathway) determinano rispettivamente sensibilità agli ioni cadmio ed agli ioni nichel. Nella figura è riportato un generale trasportatore (#1) localizzato alla membrana plasmatica, che viene down-regolato attraverso il pathway endocitotico (es., Smf1) o trasportatori (#2) che non dovrebbero essere trafficati nelle condizioni prese in esame (es., Fur4 o Tna1). B) Diluizioni seriali di due mutanti, *Δsnf8* e *Δvps28*, appartenenti al pathway I e due mutanti, *Δvps35* e *Δpep8*, appartenenti al pathway II, caratterizzati da fenotipo Cd sensibile, ma Ni resistente.

Il traffico intracellulare diretto al compartimento del PVC e la formazione del *multivesicular body* operato dai vari complessi ESCRT sono processi indispensabili per il corretto *turnover* dei recettori di superficie e dei trasportatori presenti nella membrana plasmatica, per la rimozione delle proteine di membrana *misfolded* e per il sequestramento di porzioni di membrana in maniera accoppiata con l'inglobamento di

piccole molecole, durante il processo della *fluid phase endocytosis* (Hurley et al., 2006; Shaw et al., 2001).

I mutanti *vps* di classe E, deficienti nel formare un PVC funzionale, sono caratterizzati dalla presenza di un grande e aberrante MVB in cui si accumulano le proteine provenienti dal Golgi (*CPY pathway*) e dal *pathway* endocitotico, ed inoltre presentano difetti nel trasporto retrogrado endosoma-Golgi.

Il *pathway* II è invece responsabile del ricircolo dei recettori delle idrolasi e di altri componenti che vengono trafficati al vacuolo dal PVC alle cisterne del Golgi ed alla membrana plasmatica (Hetteema et al., 2003; Seaman, 2004; Seaman et al., 2005). E' importante, infatti, che, dopo che la fusione vescicole-compartimento è avvenuta, determinati componenti possano ritornare ai loro siti di origine per mantenere una corretta composizione dei vari compartimenti ed una giusta localizzazione dei fattori necessari per il *trafficking*, per permettere al successivo ciclo di trasporto di avvenire in modo specifico e regolato.

L'inattivazione dei componenti che regolano questi *pathway* possono condurre sia ad un accumulo in membrana plasmatica di trasportatori che dovrebbero essere degradati e che quindi potrebbero determinare una maggior internalizzazione di metalli tossici, sia portare ad un indebolimento funzionale del vacuolo, che potrebbe precludere importanti funzioni quali sequestro e detossificazione dei metalli. Entrambi gli scenari possono dare una valida spiegazione alla cadmio-sensibilità riscontrata per i ceppi mutanti nei componenti dei due *pathway* (I e II). Questo metallo infatti viene importato e mobilizzato all'interno della cellula attraverso i trasportatori Smf1 e Smf2, noti per essere *down-regolati* attraverso il *pathway* endocitotico (che richiede complessi ESCRT funzionali) e la cui sovraespressione incrementa la tossicità al cadmio (figura 19) (Liu et al., 1997).

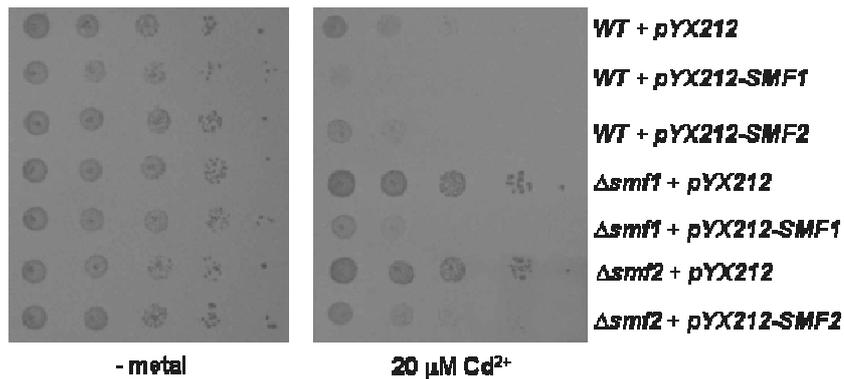


Figura 19. Ruolo di Smf1 e Smf2 nell'*uptake* di cadmio in *S. cerevisiae*. Diluizioni seriali dei ceppi WT e deleti nei due trasportatori coinvolti nell'*uptake* e mobilizzazione di ioni cadmio ($\Delta smf1$ e $\Delta smf2$) piastrate in piastre selettive (SD medium, senza l'aggiunta di uracile) con e senza $CdCl_2$. Il ceppo WT ed i mutanti *smf* sono stati trasformati con i costrutti ottenuti nel vettore pYX212 per la sovraespressione di *SMF1* e *SMF2*. Il ceppo WT trasformato con il vettore vuoto, così come i ceppi deleti $\Delta smf1$ e $\Delta smf2$ trasformati sia col vettore vuoto che con i due trasportatori (pYX212-SMF1 e pYX212-SMF2), servono come controlli dell'esperimento. Si osserva che la sovraespressione dei geni *SMF1* e *SMF2* nei corrispondenti ceppi deleti porta alla reversione del fenotipo (il ceppo delecto Cd-resistente diventa ipersensibile agli ioni cadmio).

Come detto in precedenza, il cadmio viene internalizzato nel vacuolo mediante l'azione di trasportatori, come Ycf1 che trasporta i coniugati GS-X (dove X è un composto elettrofilo), la cui delezione indebolisce la cadmio-tolleranza (Li et al., 1998). La cadmio-sensibilità evidenziata da questi mutanti potrebbe anche essere spiegata tenendo quindi in considerazione che queste mutazioni interferiscono con il corretto trasporto al vacuolo di questi componenti essenziali vacuolari.

Meno intuitiva sembra essere, invece la relazione tra questi mutanti e la tolleranza agli ioni nichel, un metallo il cui meccanismo di internalizzazione (ed esporto) è ancora in gran parte sconosciuto. Come evidenziato in figura 20 A, tutti i mutanti del *pathway* I esibiscono una significativa riduzione dell'accumulo intracellulare di nichel, suggerendo che l'esporto e/o un ridotto *uptake* possa essere una spiegazione per la nichel-tolleranza. Potenziali candidati per questo ruolo, sono trasportatori di membrana plasmatica che, quando deleti, determinano un fenotipo di nichel-sensibilità, quali Smf1 e Pho88, noti entrambi per interagire con uno o più componenti del *pathway* I (Liu et al., 1997; dati *database* BIOGRID).

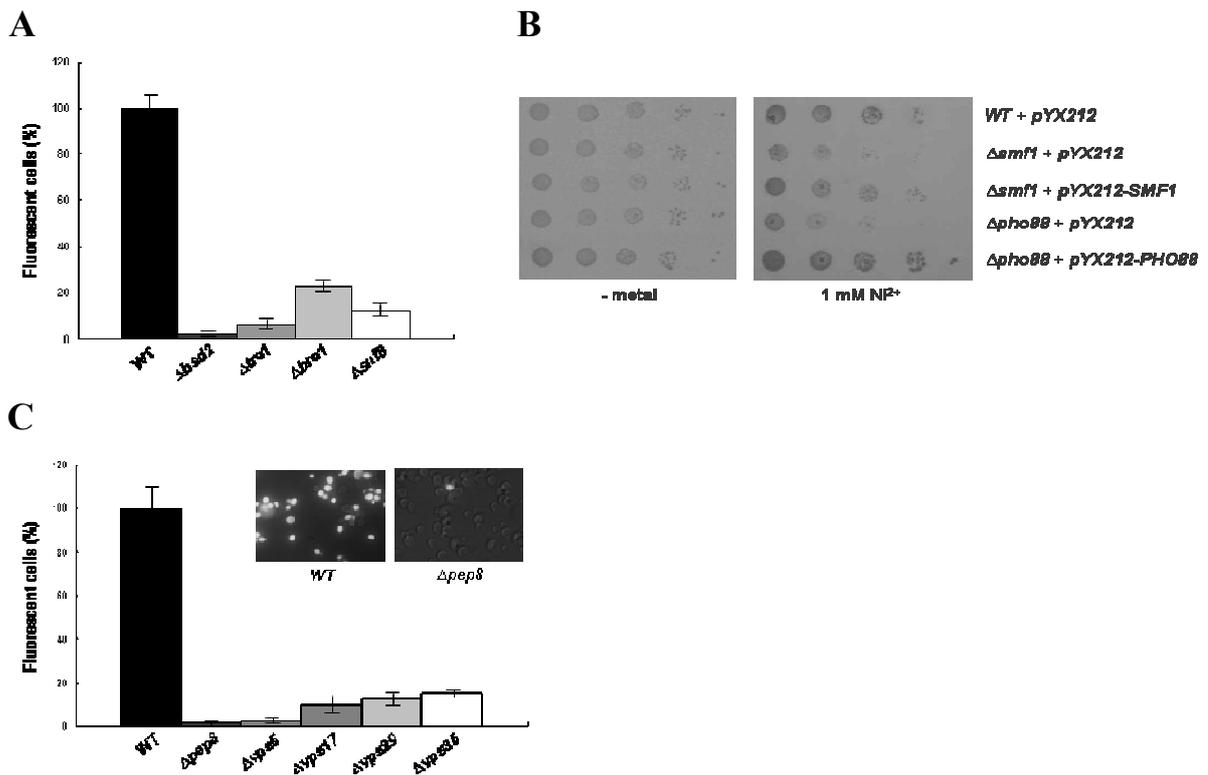


Figura 20. Aumento della tolleranza al nichel in ceppi mutanti del *pathway* endocitotico e del trasporto retrogrado endosoma-Golgi. A) Accumulo di ioni nichel nel ceppo WT e ceppi deleti in componenti del *pathway* endocitotico. I mutanti vengono fatti crescere in presenza di ioni nichel (1 mM Ni²⁺) trattati con *Newport green* (vedere “Materiali e metodi” per maggiori dettagli) e le cellule sono visualizzate utilizzando un microscopio a fluorescenza. La percentuale di cellule fluorescenti (cellule fluorescenti/cellule tot), determinata in tre esperimenti indipendenti, viene espressa in relazione al WT (100 %). B) Diluizioni seriali dei ceppi WT e deleti nei trasportatori Smf1 e Pho88, cresciuti in presenza di nichel (1 mM Ni²⁺). Viene confrontata la vitalità dei ceppi deleti ($\Delta pho88$ e $\Delta smf1$) rispetto agli stessi trasformati con costrutti che permettono la sovraespressione delle sequenze codificanti per i due trasportatori (pYX212-*PHO88* e pYX212-*SMF1*). Le cellule WT e i mutanti, $\Delta pho88$ e $\Delta smf1$, vengono trasformati col vettore vuoto come controllo dell’esperimento. Si osserva un aumento della resistenza associata alla sovraespressione di *PHO88*. C) Accumulo di ioni nichel in cellule WT e ceppi deleti in componenti del *retromer complex*. Per maggiori dettagli vedere didascalia della figura A). Un’immagine rappresentativa della fluorescenza delle cellule WT e di un mutante del complesso ($\Delta pep8$) viene visualizzata in alto alla figura C).

Per giustificare questa ipotesi abbiamo analizzato la nichel-tolleranza dei corrispondenti ceppi sovraespressivi i due trasportatori ed abbiamo osservato un aumento della resistenza al nichel solo nel caso di Pho88, ma non di Smf1 (figura 20

B). Questo risultato punta a sottolineare il ruolo non ancora del tutto chiarito di Pho88 nella tolleranza al nichel. E' inoltre possibile che altri sistemi di *uptake* (come ad esempio il processo di *fluid phase endocytosis*) indeboliti nei mutanti ESCRT, così come una aberrante traslocazione alla membrana plasmatica di uno sconosciuto componente deputato all'esporto dei metalli, possa contribuire alla tolleranza agli ioni Ni^{2+} . Tra le mutazioni che causano resistenza a tale specie metallica, c'è infatti *SIW14*, una tirosina fosfatasi coinvolta nell'organizzazione dei filamenti di actina, la cui distruzione determina difetti di *fluid phase endocytosis* (Care et al., 2004).

Per quanto riguarda i mutanti del *pathway II*, è stato riportato in letteratura che il mutante *Avps5* presenta una capacità di importo del nichel simile a quella di cellule intatte WT, ma tre volte superiore in seguito a permeabilizzazione della membrana di tali cellule (Borrelly et al., 2001). Basandosi su queste ed altre osservazioni, gli autori hanno proposto che in questo mutante, un putativo e non ancora identificato trasportatore Mg^{2+}/H^{+} residente nel Golgi (gli ioni Ni^{2+} sono analoghi citotossici del Mg^{2+}), possa essere traslocato erroneamente al vacuolo, dove la sua presenza può promuovere un aumento dell'accumulo di nichel all'interno di questo organello, determinando quindi una diminuzione della sua concentrazione intracellulare. In contrasto con questa ipotesi, esperimenti effettuati mediante l'uso del *Newport green* evidenziano che solo una piccola frazione delle cellule mutate nei vari componenti del retromero esibiscono un fenotipo di aumentato accumulo vacuolare, mentre per la maggior parte di loro si ha una forte riduzione del contenuto di nichel intracellulare (figura 20 C). Si deve comunque sottolineare che difetti in questi complessi possono influenzare non solo il trasporto proteico al vacuolo, ma anche verso la membrana plasmatica (Burda et al., 2002; Luo et al., 2000; Nothwehr et al., 2000; Seaman, 2004). E' quindi possibile che non vi sia solo un iperaccumulo vacuolare, ma anche una aumentata estrusione di ioni nichel mediata da un possibile trasportatore di cationi divalenti erroneamente traslocato alla membrana plasmatica, responsabile di un aumento della nichel-tolleranza nei mutanti del retromero.

Altri mutanti che presentano fenotipo Cd-sensibile/Ni-resistente codificano, ad esempio, per due trasportatori presenti nella membrana plasmatica, *Fur4* e *Tna1* (figura 21). Questi mutanti presentano un ridotto accumulo intracellulare di ioni Ni^{2+} (dati non mostrati) e supponiamo un promiscuo ruolo nell'internalizzazione del metallo.

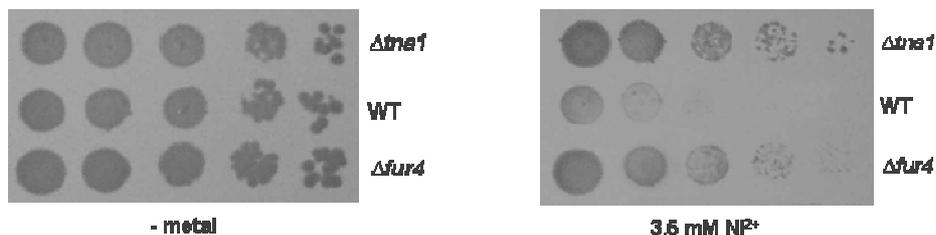


Figura 21. Nichel-resistenza associata ai mutanti *Δfur4* e *Δtna1*. Diluizioni seriali in cui viene confrontata la vitalità del ceppo WT e dei ceppi *Δfur4* e *Δtna1*, deleti nelle sequenze codificanti per due trasportatori della membrana plasmatica, in presenza di ioni nichel (3.5 mM Ni²⁺). La diluizione di ogni ceppo (WT e mutante) viene fatta crescere in assenza di metallo nel terreno di crescita come controllo dell'esperimento.

Altri ceppi esibiscono mutazioni in enzimi del metabolismo degli amminoacidi (Aat2, Aro2, etc.) e componenti nucleari (Spt7, Srb8, Nnf2 e Mog1), inclusa una subunità catalitica dell'istone deacetilasi di classe II HdaI, così come la ORF non caratterizzata YIL039W.

Altri mutanti sono difettivi in funzioni mitocondriali (es., Mam3, Lpd1), uno dei quali (*Δmam3*) è già stato riportato in letteratura essere cadmio sensibile, ma resistente a cobalto e zinco (Yang et al., 2005).

3.11 Tossicità rappresentata da altre specie metalliche

In ultima analisi abbiamo verificato se i geni ed i *pathway* identificati in precedenza potessero avere un ruolo importante anche nelle risposte del lievito ad altre specie metalliche. L'intero *set* di mutanti resistenti e sensibili a cadmio e nichel è stato sottoposto a concentrazioni sub-letali di quattro ioni metallici, Hg²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺ e Co²⁺ oltre alla specie metalloide AsO₂⁻. A tal scopo, i mutanti Cd/Ni sensibili/resistenti, sono stati raggruppati in tre piastre "dedicate" (in formato 384, due specifiche per i mutanti ipersensibili e una per quelli resistenti comprensive di diverse repliche dei ceppi e di ceppi di controllo come il WT e di ceppi scelti a caso dalla collezione da utilizzare come controlli negativi), usate per gli *screening* con le altre specie metalliche.

Abbiamo utilizzato la stessa metodologia *high throughput* utilizzata per cadmio e nichel ed il fenotipo dei mutanti è stato confermato da successivi *spot assay*.

Come mostrato dal *clustering* in figura 22, si osserva una forte sovrapposizione tra le risposte fenotipiche ai vari metalli per quanto riguarda i mutanti che conferiscono sensibilità piuttosto che resistenza. *Pathway* comuni di risposta a tutti i metalli presi in esame riguardano soprattutto quelli incentrati nella biogenesi e nella corretta funzionalità del vacuolo (*V-ATPase assembly regulation* e *vacuole fusion*) così come nell'integrità della parete cellulare (*ERG pathway* e *Cell wall integrity pathway*).

In base alla sovrapposizione dei fenotipi dei relativi mutanti al trattamento con i vari metalli, il *clustering* distingue tre gruppi in cui si collocano le diverse specie di metallo che permettono di identificare quali metalli inducano simili risposte fenotipiche (figura 22).

Il gruppo n°1 comprende, oltre a cadmio e mercurio, anche il metalloide arsenito [As(III)]. Significativo è l'alto grado di conservazione di alcuni *pathway*, tra cui quello della degradazione proteica ubiquitina-dipendente e quello deputato al *DNA repair*, che sottolineano meccanismi comuni di tossicità delle tre specie metalliche, ossia il legame a gruppi reattivi (specialmente cisteinici) all'interno dei siti attivi delle proteine e il potenziale danno ossidativo esercitato verso le macromolecole biologiche, tra cui il DNA.

Il mercurio è infatti un metallo tiofilico, estremamente tossico anche a basse concentrazioni cellulari, e la cui tossicità è stata attribuita alla capacità di reagire coi gruppi funzionali delle proteine, tra cui quelli sulfidrilici, carbossile e fosfato (Whittaker et al., 1990).

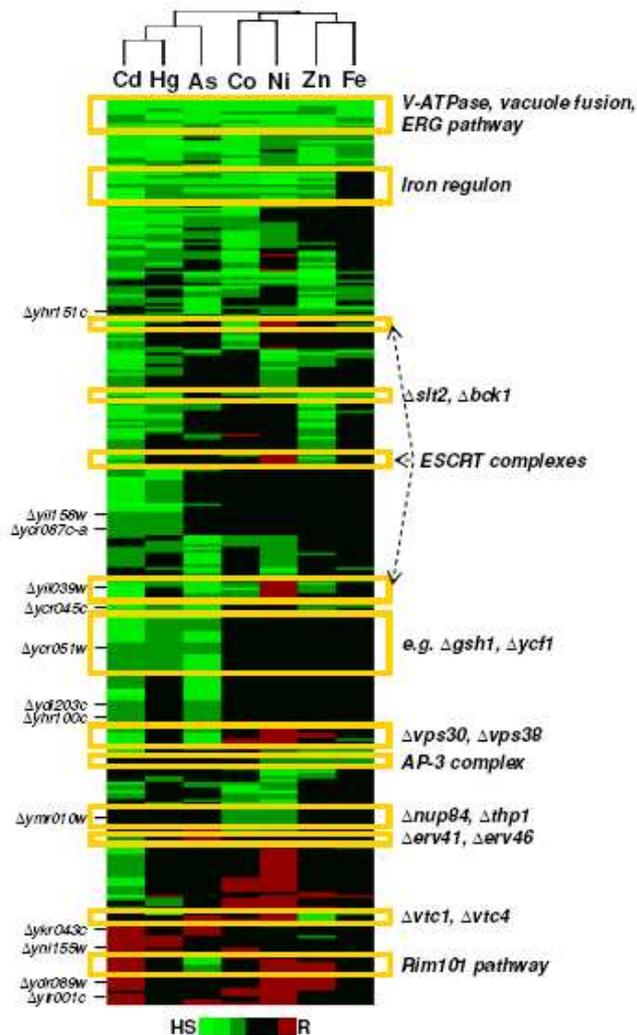


Figura 22. *Clustering* gerarchico che evidenzia le risposte fenotipiche dei mutanti presi in esame sottoposti al trattamento con diversi metalli. L'intero *set* di ceppi sensibili e resistenti a ioni Cd^{2+} e Ni^{2+} viene esposto a concentrazioni sub-letali di $HgCl_2$ (190 μM), $NaAsO_2$ (1.5 mM), $CoCl_2$ (2 mM), $ZnCl_2$ (18 mM) e $FeCl_3$ (15 mM), seguito da validazione dei mutanti trovati mediante *spot assay*. L'asse delle X mostra i vari trattamenti, mentre l'asse delle Y i mutanti presi in esame. I mutanti che mostrano un'aumentata sensibilità, un'aumentata resistenza o nessun fenotipo sono rappresentati rispettivamente in verde, rosso e nero; solo i ceppi mutanti sensibili o resistenti ad almeno due differenti metalli vengono mostrati. L'analisi è stata effettuata utilizzando il programma EPCLUST; i geni e i *pathway* che influenzano la tolleranza ai metalli utilizzati, così come il *subset* di ORF non caratterizzate, sono indicate rispettivamente a destra e a sinistra del grafico.

L'arsenico, appartenente al gruppo VA della tavola periodica, esiste in natura in varie forme che presentano caratteristiche chimiche e gradi di tossicità differenti: *in vivo* la forma As (V) (arsenato) viene ridotta nella forma altamente tossica arsenito (AsIII) (Szihicz et al., 1988). Quest'ultimo, analogamente agli ioni cadmio e mercurio, reagisce con i gruppi sulfidrilici (in genere di-tioli) dei residui di cisteina delle proteine, che spesso costituiscono parte integrante del sito attivo dell'enzima, e induce danno ossidativo mediante accumulo di ROS (Tamas et al., 2001).

I meccanismi con cui la cellula contrasta la tossicità di questi metalli sembra essere molto simile, come emerge dal fenotipo di sensibilità comune mostrato dai mutanti *Δgsh1*, *Δycf1* e *Δyap1* coinvolti nell'internalizzazione vacuolare degli ioni metallici complessati al glutatione. In cellule di *S. cerevisiae* esposte a questi ioni metallici, vi è, infatti, una forte conversione dello zolfo assimilato dalla cellula sottoforma di glutatione (Fauchon et al., 2001; Tamas et al., 2001).

La più significativa differenza tra cadmio e arsenito riguarda il *pathway* del fattore Rim101, in quanto la delezione dei suoi componenti causa sensibilità ad AsO_2^- , ma resistenza a ioni Cd^{2+} (oltre che a Zn^{2+} e Ni^{2+}), e altri mutanti che mostrano un "opposto" tipo di risposta (*Δerv41* e *Δerv46*). Analogamente, la delezione del trasportatore Tat1, regolato dal *pathway* di Rim101/Nrg1, causa resistenza a ioni Cd^{2+} (Zn^{2+} e Ni^{2+}), ma non a ioni AsO_2^- .

Il gruppo n°2 evidenzia un certo *overlap* tra le risposte fenotipiche di cobalto e nichel, nonostante il grado di sovrapposizione sia comunque meno elevato di quanto atteso tenendo in considerazione la notevole somiglianza chimica dei due ioni. Rilevante è la sensibilità agli ioni Co^{2+} dei mutanti nei componenti del complesso *ESCRT*, contrapposta alla nichel-tolleranza evidenziata da questi mutanti, ed una parziale sovrapposizione tra le risposte a cobalto e nichel per quanto riguarda i mutanti nei componenti del complesso del retromero. Questo dato rivela la possibilità che *network* di traffico intracellulare possano discriminare tra metalli molto simili tra di loro e che esistano meccanismi di *uptake* o esporto differenti che la cellula utilizza in modo specifico ed efficiente.

Da notare sono anche le differenze fenotipiche associate alla delezione dei trasportatori Fur4 e Tna1: solo quest'ultimo causa Co/Ni resistenza quando deletato, mentre la distruzione di Fur4 rende le cellule resistenti a nichel e zinco, ma non a cobalto.

In linea con tali differenze, *Δsmf1* ed i componenti dell'AP-3 *complex* (coinvolti nell'*ALP pathway*) causano nichel- (ma non cobalto-) sensibilità.

Zinco e ferro (III), ioni metallici essenziali, sono associati nel 3° gruppo rivelato dall'analisi, malgrado le loro conosciute differenze chimiche.

Gli ioni Fe^{3+} hanno il più alto grado di divergenza rispetto a tutti gli altri metalli esaminati; dalla figura 22 si nota che in condizioni di disponibilità di ferro, le mutazioni nei geni appartenenti all'*iron regulon*, causano un aumento della sensibilità a tutti i metalli esaminati, eccetto il ferro stesso. Questo potrebbe suggerire che, sebbene tramite meccanismi differenti, il depauperamento di ferro indotto da metallo, potrebbe essere una caratteristica comune alla quasi totalità delle specie metalliche (e metalloidi) esistenti.

In generale, abbiamo trovato una buona sovrapposizione tra le proprietà chimiche dei metalli esaminati e le risposte fenotipiche osservate, come evidenziato nel caso del gruppo n°1 di cui fanno parte cadmio, mercurio e arsenico che sono in grado di formare sulfidrili insolubili in un ambiente acido, a differenza invece dei restanti metalli.

In conclusione, la cellula adotta sia generali meccanismi per difendersi dalla presenza di ioni metallici tossici, quali la loro internalizzazione all'interno del vacuolo e la prevenzione della loro entrata (in maniera più o meno metallo-specifica), sia meccanismi specifici che variano a seconda della diversa tipologia di metallo presa in esame.

L'analisi dei profili fenotipici ottenuti con i diversi metalli messi a confronto permettono di poter annotare varie ORF non caratterizzate, alcune delle quali sono omologhe a proteine umane associate a malattie. Per esempio, le ORF YCR045C e YCR051W sono omologhe, rispettivamente, a Pcsk9, una serina proteasi del reticolo endoplasmatico coinvolta in una forma dominante di ipercolesteroloemia (Horton et al., 2007), e a Tnks2, un membro citosolico della famiglia di polimerasi poli ADP ribosio (*poly (ADP)ribose polymerase family, PARP*), la cui sovraespressione fornisce cito-protezione prevenendo una eccessiva attivazione di PARP e deplezione di NAD in seguito ad esposizione ad agenti in grado di danneggiare il DNA (Yeh et al., 2005).

3.2 Costruzione di un biosensore per la rilevazione di metalli tossici basato sulla tecnologia FRET

Allo scopo di realizzare un sensore biomolecolare in grado di rilevare la presenza di metalli tossici *in vitro*, è stata progettata e realizzata una proteina chimerica costituita da due proteine fluorescenti della famiglia delle *Green Fluorescent Protein (GFP)*, la *ceruleans fluorescent protein (CFP)* e la *yellow fluorescent protein (YFP)*, fuse rispettivamente all'N- e al C-terminale della metallotioneina MT2a di *Arabidopsis thaliana*.

Le metallotioneine (MT) sono piccole proteine (6-7 Kda) ubiquitarie del regno animale e vegetale, ricche in residui di cisteina che, grazie alla presenza dei gruppi sulfidrilici (SH) presentano un'elevata affinità di legame per alcune specie metalliche quali cadmio, zinco e mercurio.

La MT2a di *A. thaliana*, identificata mediante uno *screening* per la rilevazione di geni implicati nelle difese da stress metallico in questo organismo (Bolchi A., manoscritto in preparazione), è stata scelta per l'elevato effetto protettivo presentato nei confronti di ioni metallici in *screening* di complementazione in lievito basati sulla capacità di conferire protezione allo stress metallico al ceppo mutante di lievito *Δyap1*, deleto nel fattore di trascrizione YAP1 implicato nella risposta del lievito a vari stress ambientali.

La struttura tridimensionale delle MT di pianta non è stata ancora risolta a causa delle difficoltà riscontrate nel loro isolamento e purificazione. Sulla base di analisi di sequenza, si ipotizza che abbiano, come quelle di mammifero, una tipica conformazione a campana caratterizzata da due domini ricchi in residua di cisteina (chiamati α e β in analogia con le MT animali) separati da un *linker* di aminoacidi, che nel caso delle MT di pianta è più lungo (qualche aminoacido per le MT animali, una trentina di aminoacidi per quelle di pianta). I due domini legano gli ioni metallici in maniera indipendente e il dominio N-terminale di MT2a (chiamato β), dotato di un maggior numero di cisterne (8 residui), rispetto al dominio C-terminale (6 residui), presenta le prestazioni migliori.

In questo lavoro MT2a di *A. thaliana* è stata espressa e purificata in un organismo eterologo (*E. coli*) come proteina ricombinante fusa a due proteine fluorescenti, allo

scopo di rilevare il cambiamento conformazionale indotto dal legame del metallo nei due domini della MT.

La metodologia usata ha preso spunto da un lavoro di Awais e collaboratori, nella quale veniva analizzata l'interazione di putative sostanze ad azione estrogenica al dominio di legame del recettore degli estrogeni ($ER\alpha$), mediante l'applicazione di un costrutto chimero basato su tecnologia FRET in grado di rilevare il cambiamento conformazionale della proteina in risposta al legame della sostanza (Awais et al., 2004). La tecnologia FRET (*fluorescent resonance energy transfer*) si basa sul trasferimento di energia tra due sonde (*probe*), quando queste si trovano ad un'adeguata distanza e orientazione tra di loro, al fine di permettere la sovrapposizione fra lo spettro di emissione e quello di eccitazione dei due fluorofori. In queste condizioni, il trasferimento di energia tra le due sonde viene rilevato come segnale FRET: il fluoroforo donatore eccitato alla idonea lunghezza d'onda, attraverso il trasferimento di energia, può eccitare il fluoroforo accettore che emetterà a sua volta l'energia radiante ad una certa e specifica lunghezza d'onda. Il trasferimento di energia porta ad una diminuzione dell'intensità di fluorescenza del fluoroforo donatore ed un concomitante aumento nell'intensità di fluorescenza dell'accettore (Zoccolo M., 2004).

Il biosensore da noi realizzato sfrutta le variazioni della fluorescenza della coppia *CFP* e *YFP* (proteine segnale) in seguito al legame di specifici analiti, gli ioni metallici, al dominio della MT (proteina sensore). Il cambio conformazionale metallo-indotto verrà trasmesso alle due sonde che verranno a trovarsi nelle condizioni di generare un segnale di FRET (figura 23).

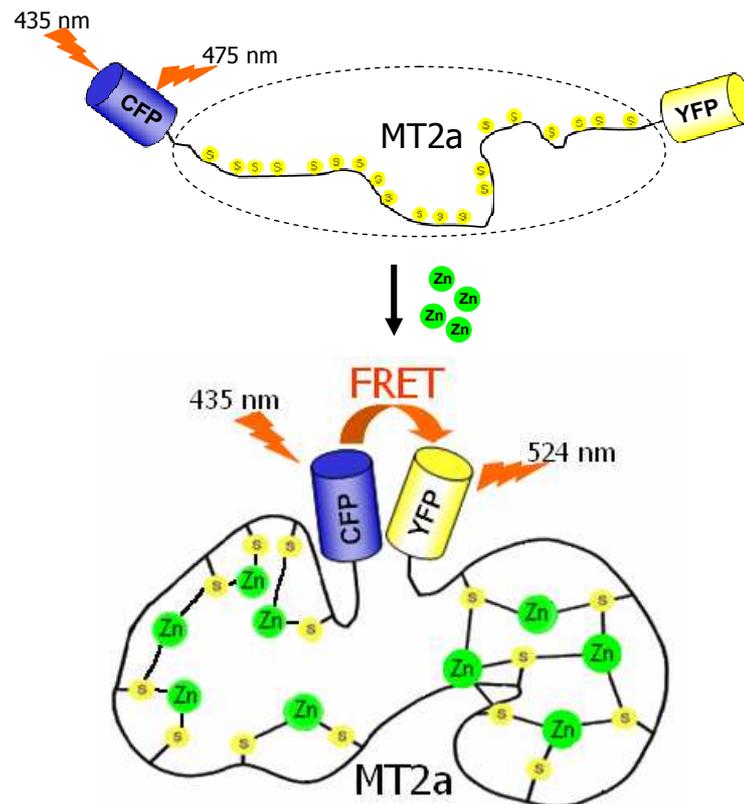


Figura 23. Rappresentazione della chimera *CFP-MT2a-YFP*. In seguito al legame degli ioni metallici (Zn^{2+}) ai due domini della MT2a presenti all'interno della chimera proteica, la catena polipeptidica subisce un cambiamento conformazionale che permette alle due proteine fluorescenti (*CFP* e *YFP*) di avvicinarsi. L'energia utilizzata per eccitare selettivamente la *CFP* (435 nm) verrà in questo modo trasmessa alla seconda molecola fluoroforo (*YFP*) che emetterà a sua volta energia radiante (aumento dell'emissione a 524 nm), contrariamente a quanto accade in assenza di metallo, in cui l'energia non viene trasferita e verrà emessa esclusivamente dalla *CFP* (aumento dell'emissione a 475 nm).

3.2a Clonaggio ed espressione della proteina di fusione *CFP-MT2a-YFP* in cellule di *E. coli*

La sequenza codificante la MT2a di *A. thaliana* è stata clonata in un vettore per l'espressione di proteine ricombinanti (pET28b) in cui precedentemente avevamo clonato le due sequenze codificanti per *CFP* e *YFP*. Sfruttando il sito di restrizione *SnaBI* opportunamente creato tra il C-terminale della *CFP* e l'N-terminale della *YFP*, abbiamo clonato la sequenza della MT *in frame* con quella delle altre proteine. In questo costrutto, la sequenza codificante della proteina di fusione è sotto il controllo del promotore *Lac*, inducibile da IPTG (vedere per maggiori dettagli sezione di "Materiali

e metodi”). Il costrutto pET28_CFP-MT2a-YFP così ottenuto è stato sequenziato ed utilizzato per trasformare il ceppo batterico BL21 *star* per l’espressione della proteina ricombinante.

Abbiamo fatto diverse prove di induzione cambiando la temperatura di incubazione delle cellule dopo l’aggiunta dell’induttore (1 mM di IPTG) aggiungendo ioni Zn^{2+} nel terreno di crescita (400 μM $ZnCl_2$) per permettere un corretto *fold*ing proteico della MT. L’analisi elettroforetica mediante SDS-PAGE dopo colorazione con *Coomassie brilliant blue* ha permesso di evidenziare una banda relativa specifica alla proteina di fusione *CFP-MT2a-YFP*, indotta nel clone selezionato in presenza di IPTG (figura 24).

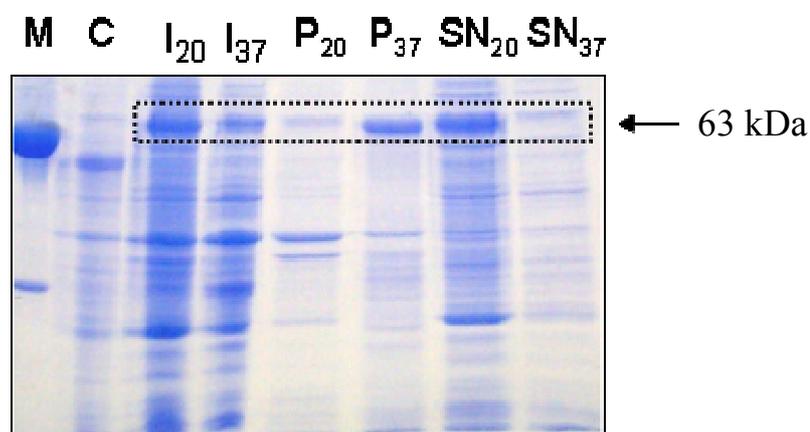


Figura 24. Gel di poliacrilamide (11%) in cui sono visualizzate alcune prove di induzione e solubilità effettuate con i ceppi esprimenti la proteina chimera *CFP-MT2a-YFP*. La proteina di fusione (63 KDa) è stata espressa nel ceppo BL21 *star* di *E. coli* a due diverse temperature di induzione (20-37°C, lane I₂₀ e I₃₇ rispettivamente) per 24 h in presenza di IPTG (1 mM finale) e $ZnCl_2$ (400 μM). Dopo lisi cellulare dei campioni indotti sono stati ottenuti la frazione insolubile (*pellet*, P) e la frazione solubile (surnatante, SN) del lisato; è stata caricata inoltre un’aliquota di campione controllo (C) che contiene la proteina di fusione *CFP-YFP* (55 Kd) ed un *marker* (M) a peso molecolare noto costituito da BSA (67 Kd) e anidrasi carbonica (29 Kd). Per ogni campione caricato si può notare la banda di induzione, relativa alla proteina di fusione *CFP-MT2a-YFP* (riquadro tratteggiato). Come si osserva dall’immagine, la condizione che porta ad una maggior induzione, ma soprattutto ad una maggior frazione di proteina solubile, è quella in cui si effettua l’induzione alla temperatura di 20°C.

Le colture cellulari sono state in seguito sottoposte a prove di solubilità tramite lisi cellulare e successiva separazione mediante centrifugazione della frazione insolubile (*pellet*) e della frazione solubile (surnatante), in modo da identificare le condizioni che permettono un maggior recupero di proteina nella porzione solubile (figura 24).

La proteina chimerica è stata poi purificata dall'estratto proteico solubile totale mediante cromatografia ad affinità attraverso l'uso di resine al cobalto in grado di legare in modo specifico il *tag* di istidina presente all'N-terminale della proteina di fusione.

Per evitare eventuali interferenze con il legame ai metalli, la coda di istidine è stata poi rimossa dalla catena polipeptidica mediante digestione con la proteasi trombina, in grado di riconoscere lo specifico sito di taglio presente tra l'N-terminale della chimera e i residui di istidina della stessa.

3.2b Rivelamento del segnale FRET

Un'aliquota dell'estratto proteico ottenuto mediante espressione eterologa in cellule batteriche in presenza di ioni Zn^{2+} , viene usata per rilevare il segnale FRET come variazione dei rapporti di emissione tra *CFP* e *YFP*.

L'analisi allo spettrofluorimetro è stata condotta eccitando il campione alla lunghezza d'onda di 435 nm (I_{ext} di *CFP*) e rilevando l'intensità della radiazione emessa successivamente dalla proteina chimerica.

In seguito al trasferimento di energia tra i due fluorofori, dovuto alla presenza degli ioni Zn^{2+} legati ai domini della MT, si ha un aumento dell'emissione a 524 nm (I_{ems} *YFP*) (figura 25).

La stessa analisi è stata condotta sull'estratto proteico deprivato di ioni zinco, mediante saggio di alchilazione (vedere fig. 25 e "Materiali e metodi"). In questo caso l'assenza degli ioni metallici legati ai due domini della MT, impedisce il corretto cambiamento conformazionale che favorisce il trasferimento di energia tra i due fluorofori proteici, come rivelato dal cambio nel rapporto di emissione tra *CFP* e *YFP*.

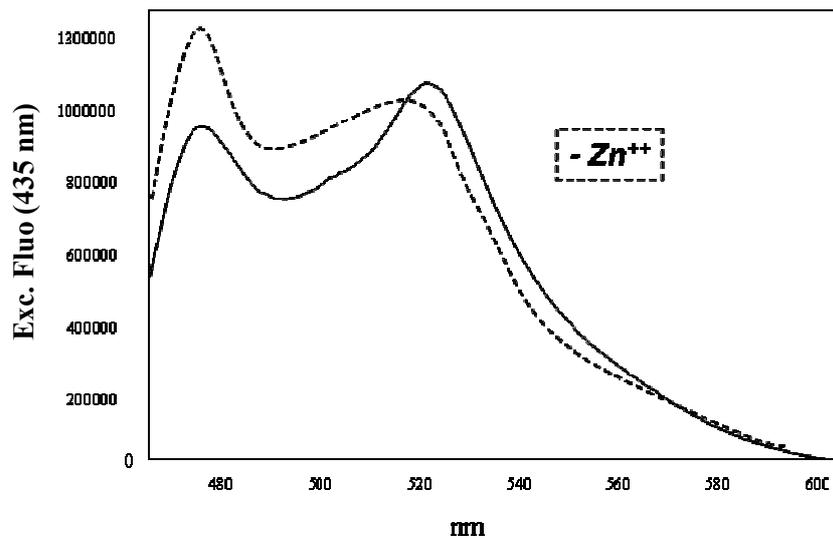


Figura 25. Spettro che illustra l'emissione di fluorescenza della proteina chimera *CFP-MT2a-YFP*. L'asse delle Y rappresenta l'intensità della radiazione fluorescente emessa, mentre l'asse delle X rappresenta le lunghezze d'onda espresse in nm. In presenza di ioni Zn^{2+} (grafico rappresentato da linea continua), il segnale FRET dell'estratto proteico viene rilevato da un aumento dell'intensità di fluorescenza a 524 nm (relativo all'emissione della *YFP*) e una diminuzione a 475 nm. Mediante saggio di alchilazione, la rimozione degli ioni metallici dai domini delle MT2a della chimera determinano un aumento dell'intensità di fluorescenza a 475 nm (relativo all'emissione della *CFP*), ma diminuzione a 524 nm, come conseguenza del cambio conformazionale avvenuto all'interno della catena polipeptidica della proteina di fusione (grafico rappresentato da linea tratteggiata).

4. MATERIALI E METODI

4.1 *Screening* della risposta fenotipica della collezione di mutanti per delezione di *Saccharomyces cerevisiae* in presenza di specie metalliche.

4.1a Collezione di mutanti per delezione di *Saccharomyces cerevisiae*

Le singole delezioni di ognuna delle ORF non essenziali di *S. cerevisiae* che compongono la collezione, sono state ottenute mediante una strategia basata su PCR partendo dai ceppi parentali BY4742 e BY4739, e ogni delezione viene sostituita con un modulo KanMX, etichettata con una o due sequenze da 20 bp (*bar code*).

L'intera collezione di mutanti (4826 ceppi), conservata in 52 piastre (formato 96 pozzetti della collezione) viene convertita in un totale di 13 piastre (formato 384 pozzetti della collezione) attraverso l'uso manuale del replicatore da 96 pin (*Multi-blot replicator* VP408FH) e di particolari strumenti adattatori (*library copier*) forniti dalla casa produttrice (*V&P Scientific, Inc.*).

L'intero set di mutanti viene replicato mediante replicatore da 384 pin (*Multi-blot replicator* VP384S2A), su terreno massimo solido (YPD agar) contenente l'antibiotico G418 (150 µg/ml), e fatto crescere per 48 h a 30°C.

Ogni procedimento di replica viene sempre preceduto dalla sterilizzazione dei pin del replicatore, che consiste nel passaggio (30'') in candeggina (10%) seguito da due lavaggi in acqua sterile (1' ciascuno) e flambatura, previo passaggio in isopropanolo.

Ogni soluzione necessaria per la sterilizzazione è contenuta in piastre sterili, e durante ogni passaggio da una soluzione all'altra il replicatore viene asciugato su carta assorbente (*lint-free blotting paper*, V&P Scientific, Inc.).

4.1b *Screening* della collezione in presenza di cadmio e nichel

Per lo *screening* della collezione in presenza di ioni Cd²⁺ e Ni²⁺ vengono usati un totale di 4688 ceppi mutanti, dalla quale sono stati eliminati i 90 ceppi che non hanno superato il controllo di qualità e i 48 ceppi che mostrano un *deficit* di crescita anche in

condizioni normali (*slow growth*) (*Yeast Deletion Mutant Database* http://www.sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/deletions3.html).

Ognuno dei 384 mutanti delle 13 piastre della collezione, viene deposto simultaneamente su piastra solida (YPD agar) nella quale sono contenuti gli ioni metallici. Questo passaggio da piastra solida a piastra solida, consiste nel prelevare le colonie mediante i pin del replicatore, diluirle in acqua sterile (immergendo i pin in una piastra da 384 pozzetti riempita di 50 µl/pozzetto di acqua sterile) e depositarle su terreno solido.

Il fenotipo di ogni mutante, cresciuto in presenza di ioni metallici, viene rilevato dopo 48 h di crescita a 30°C, nella quale la vitalità viene confrontata rispetto alla stessa in assenza di metallo (YPD agar senza metallo).

La concentrazione sub-letale di ioni metallici usata durante lo *screening* della collezione, determinata come la concentrazione in grado di permettere il 90% di sopravvivenza del ceppo WT dopo 48 h di crescita a 30°C, viene scelta mediante esperimenti preliminari, condotti tramite un *sub set* di mutanti, inclusi due ceppi conosciuti essere Cd-sensibili (*Ayap1* e *Aycf1*) (Tamás et al., 2005; Li et al., 1997) e un ceppo conosciuta essere Ni-sensibile (*Δpep5*) (Persane et al., 2001) come controlli positivi, oltre ai due ceppi WT (BY4742 e BY4739), in presenza di ioni metallici nel *medium* di crescita. La concentrazione ottimale scelta è quella pari a 50 µM per cadmio e 2.5 mM per nichel, che viene usata per i successivi *screening* della collezione.

Mediante analoghe prove preliminari, sono state scelte concentrazioni stringenti di cadmio e nichel, rispettivamente di 60 µM e 3.5 mM, per determinare il fenotipo di resistenza (rispetto al ceppo parentale) dei relativi mutanti.

Vengono effettuate 5 repliche indipendenti dell'intero set di mutanti, in presenza di ognuno dei metalli nel terreno di crescita.

4.1c Test di validazione del fenotipo in presenza di cadmio e nichel (*spot assay*)

Il fenotipo di ogni mutante risultato essere sensibile o resistente in almeno tre repliche sperimentali, viene confermato mediante diluizioni seriali delle relative cellule.

Viene preparata una precoltura inoculando le cellule (provenienti dalle originali piastre cresciute su terreno privo di metalli) in terreno massimo (YPD liquido) e fatte crescere O/N a 30°C.

La precoltura viene diluita serialmente (incrementi di 10 volte) partendo da OD₆₀₀ di 1. Un volume di 4 µl per ogni diluizione viene fatto crescere su terreno massimo con e senza l'aggiunta della appropriata concentrazione di ioni metallici (40 µM Cd²⁺ e 2.5 mM Ni²⁺ per l'analisi dei ceppi ipersensibili e 50 µM Cd²⁺ e 3.5 mM Ni²⁺ per l'analisi dei ceppi resistenti).

La crescita viene seguita per 48 h a 30°C e il fenotipo viene classificato come *high* (HS), *medium* (MS) o *low* (LS) *sensitive* a seconda che i ceppi mutanti esibiscano una riduzione dell'abilità a formare colonie alla prima, seconda-terza o quarta diluizione, rispettivamente.

Solo una categoria di resistenza viene determinata per i relativi ceppi mutanti.

4.1d *Screening* di un sottogruppo della collezione di mutanti in presenza di ioni metallici diversi da cadmio e nichel.

Lo stesso approccio sperimentale e gli stessi test di validazione vengono condotti in presenza di altri quattro ioni metallici più una specie metalloide, sul sottogruppo di mutanti della collezione risultati essere ipersensibili o resistenti agli ioni cadmio e nichel.

Le concentrazioni scelte, determinate come per cadmio e nichel, sono le seguenti: 190 µM HgCl₂, 1.5 mM NaAsO₂, 2 mM CoCl₂, 18 mM ZnCl₂ and 15 mM FeCl₃.

4.1e Clonaggio delle sequenze dei geni *NRG1*, *PHO88*, *SMF1*, *SMF2* e *SMP1* nel vettore d'espressione pYX212

La reazione polimerasica a catena (PCR) viene usata per amplificare le sequenze codificanti i geni di interesse (*NRG1*, *PHO88*, *SMF1*, *SMF2* e *SMP1*) usando come template il DNA genomico del ceppo parentale BY4742 e le coppie di *primer* le cui sequenze sono riportate in tabella 1.

I prodotti amplificati vengono clonati all'interno del vettore d'espressione pYX212, sfruttando il sito unico di restrizione *CpoI*.

N°	NOME	PRIMER
1	NRG1-FW	5'-CTCGGTCCGCCACCATGTTTTACCCATATAACTATAGTAAC-3'
2	NRG1-RE	5'-CTCGGACCGTTATTGTCCCTTTTTCAAATGTGTTC-3'
3	PHO88-FW	5'CGCGGTCCGCTACGTAGCCACCATGAATCCTCAAGTCAGTAACATC-3'
4	PHO88-RE	5'-CGCGGACCGTCATTCAGCCTTAACACCAGCG-3'
5	SMF1-FW	5'-CGCGGTCCGGTTTAAACAGGCCACCATGGTGAACGTTGGTCCTTCTC-3'
6	SMF1-RE	5'-CGCGGACCGTTAACTGATATCACCATGAGACATG-3'
7	SMF2-FW	5'-CGCGGTCCGCTACGTAGCCACCATGACGTCCCAAGAATATGAACC-3'
8	SMF2-RE	5'-CGCGGACCGTTAGAGGTGTACTTCTTTGCCCG-3'
9	SMP1-FW	5'-CTCGGTCCGCCACCATGGGTAGAAGAAAAATTGAAATTGAACC-3'
10	SMP1-RE	5'-CTCGGACCGTTAATCTGGAGAGTTTGTGCGAACTCG-3'

Tabella 1. Caratteristiche delle coppie di *primer* utilizzate durante il clonaggio.

4.1f Trasformazione dei costrutti ottenuti in ceppi di lievito, mediante il metodo del litio acetato.

Viene inoculata una singola colonia del ceppo di lievito da trasformare in 5 ml di YPD e fatto crescere in agitazione O/N a 30°C.

L'inoculo viene rinfrescato e fatto crescere fino a OD₆₀₀ di 1.

Si centrifuga il campione e il pellet viene lavato con 10 ml di TE/LiOAc pH 7.5.

Si centrifuga il campione e si risospende in 500 µl dello stesso buffer.

Si utilizzano 50 µl per la trasformazione, aggiungendo 15 µg di *salmon sperm* DNA e 1-2 µg di vettore.

Si incuba per 30' a 30°C.

Si aggiunge al campione 300 µl di PEG 8000/TE LiOAc pH7.5 0.1 M.

Si incuba per 30' a 30°C.

Si incuba a 42°C (*shock* termico).

Si piastra su terreno selettivo per 48 h a 30°C.

Concentrazioni di 15-20 μM Cd^{2+} e 1-1,2 mM Ni^{2+} rispettivamente per la rilevazione della sensibilità e della resistenza, vengono usate per analizzare i ceppi sovraesprimenti sotto condizione selettive in *SD medium*.

4.1g Colorazione delle cellule di lievito con *Newport green*

Cellule di lievito vengono fatte crescere a 30°C fino a saturazione, diluite ad OD_{600} di 0.3 ed esposte alla presenza di 1 mM di NiCl_2 , per 18 h.

Le cellule vengono lavate tre volte con PBS prima di essere incubate per 30' a 37°C in 1 ml di PBS contenente 7 μM di colorante *Newport green* DCF e 0.2% di F-127 *Pluoronic acid* (*Invitrogen-Molecular Probes, Eugene, OR*), seguito da un'ulteriore incubazione a temperatura ambiente.

Dopo un addizionale lavaggio con PBS, le cellule vengono analizzate mediante microscopia a fluorescenza (microscopio a fluorescenza Zeiss, argon laser: 488nm).

4.1h Analisi dei dati

I processi biologici associati con la tossicità dei metalli vengono identificati e valutati in base al loro significato statistico (*p-value*), con il programma *Gene Ontology* (GO) *Term Finder* (<http://www.yeastgenome.org/>).

Viene confrontata la rappresentazione di ogni GO *term* all'interno del set di geni in grado di modulare la tossicità dei metalli con la loro rappresentazione nel genoma di *S. cerevisiae* (*Enrichment ratios*).

Le interazioni tra i geni che modulano la tolleranza ai metalli vengono identificate usando il *Network Visualization System Osprey* (<http://biodata.mshri.on.ca/osprey>) e visualizzati come specificato dal *database* BIOGRID (<http://www.thebiogrid.org/>) a dal relativo manuale *Osprey*.

I *subnetwork* vengono definiti come un minimo di tre prodotti genici interagenti, che mostrano almeno un'annotazione GO *Biological Process*, connessi da almeno due

interazioni fisiche (*two-hybrid, affinity capture-western, affinity capture-MS, reconstituted complex*) o genetiche (*synthetic lethality, synthetic growth defect, synthetic rescue, dosage rescue, phenotypic suppression, phenotypic enhancement*).

4.2 Realizzazione di un prototipo biosensore basato su tecnologia FRET (*Fluorescent resonance energy transfer*) per la rilevazione di metalli

4.2a Clonaggio della sequenza codificante CFP (*Ceruleans Fluorescent Protein*) e YFP (*Citrine Fluorescent Protein*) nel vettore d'espressione pET28.

La reazione polimerasica a catena (PCR) viene usata per amplificare l'inserto CFP e YFP (100 ng), utilizzando le idonee coppie di *primer* (25 μ M) (Tab.2) e l'enzima Pfu Turbo DNA polimerasi (3 U/ μ l) (V_f 50 μ l) (figura 1).

Il prodotto amplificato relativo alla CFP viene clonato nel vettore d'espressione pET28 (*Novagen pET system manual*) sfruttando il sito di restrizione *SnaBI* presente nel *polycloning site*; la sequenza codificante la YFP (contenente il sito di restrizione *SnaBI* in posizione 5') viene successivamente clonata all'interno del vettore pET28-CFP sfruttando il sito di restrizione *PmeI*, presente nel *polycloning site*.

Tutte le reazioni di ligazioni sono fatte avvenire con l'enzima T4 DNA ligasi (2.5 U) in presenza di ATP e BSA e si usa come concentrazione molare dell'inserto e del vettore un rapporto pari a 50:1 rispettivamente.

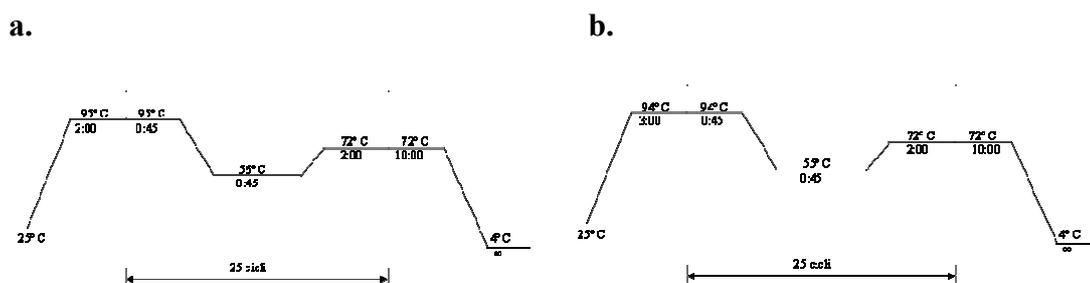


Figura 1. Parametri usati per le reazioni polimerasiche a catena (PCR) utilizzate per amplificare la sequenza corrispondente alla *CFP* (a) e alla *YFP* (b).

N°	NOME	PRIMER
1	CYANO_GFP_FW	5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3'
2	CYANO_GFP_RE	5'-ACCACCACCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'
3	CITRINA_GFP_FW_NEW	5'-TACGTAGGTGGTATGAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTC-3'
4	CITRINA_GFP_RE	5'-TTATTTGTATAGTTCATCCATGC-3'

Tabella 2. Caratteristiche dei *primer* utilizzati nel clonaggio.

4.2b Clonaggio della sequenza codificante la metallothioneina MT2a di *A. thaliana* nel vettore d'espressione pET28-CFP_YFP

La sequenza codificante per MT2a è stata clonata *in frame* nel vettore d'espressione pET28-CFP_YFP sfruttando il sito di restrizione *SnaBI* posizionato tra il C-terminale della CFP e l'N-terminale della YFP, attraverso reazione di ligazione con l'enzima T4 DNA ligasi (2.5 U) (in presenza di ATP e BSA).

Per la reazione di ligazione si usa come concentrazione molare dell'inserto e del vettore un rapporto pari a 50:1 rispettivamente.

4.2c Trasformazione del costrutto pET28-CFP-MT-YFP nei ceppi BL21 *codon plus*, mediante elettroporazione delle cellule batteriche.

Prelevare un'aliquota (50 µl) di cellule elettrocompetenti BL21 *codon plus* precedentemente preparate e lasciarle scongelare in ghiaccio (potere di trasformazione: 10^6 - 10^7 cell/µg di DNA).

Raffreddare la *cuvette* da elettroporazione in ghiaccio.

Aggiungere il DNA pET28-CFP-MT-YFP (circa 1 ng-10 µg) alle cellule.

Mescolare con il puntale, trasferire nella *cuvette* ed elettroporare (1500 V, 50 A, 50 W) il campione.

Trasferire le cellule in 1ml di terreno liquido SOC e crescere a 37°C per 1 h.

Si piastra su terreno solido addizionato con gli antibiotici kanamicina e cloranfenicolo per selezionare le cellule trasformate.

4.2d Prove di espressione e solubilità nelle cellule BL21 c.p. trasformate con il vettore pET28-CFP-MT-YFP.

Per l'espressione del prodotto genico *CFP-MT-YFP* codificato dal relativo costrutto, si sfrutta il sistema di espressione pET28, IPTG dipendente (*Novagen pET system manual*).

Si prepara una precoltura inoculando una singola colonia delle cellule BL21 c.p. trasformate con il vettore pET28-CFP-MT-YFP in 3 ml di terreno LB supplementato con gli antibiotici kanamicina e cloranfenicolo.

Si lascia crescere a 37°C, O/N.

Si rinfresca 1/100 della precoltura in 10 ml di terreno fino ad OD₆₀₀ di 0.6.

Si preleva 1 ml di coltura (campione non indotto) e si aggiunge IPTG alla concentrazione finale di 1 mM e ZnCl₂ alla concentrazione finale di 400 µM.

Si incuba O/N a 20°C.

Si preleva 0.5 ml di coltura (campione indotto).

Entrambi i campioni (non indotto e indotto) vengono centrifugati e il pellet ottenuto viene risospeso in 30 µl di Tris-HCl 10mM (pH 8) + 10 µl SB4x (conservare i campioni alla temperatura di -20°C).

Centrifugare il resto della coltura a 3500 rpm per 15' a 4°C.

Effettuare un lavaggio del pellet mediante 2 ml di Tris-HCl 10mM (pH 8) e centrifugare a 3500 rpm per 15' a 4°C.

Risospesare il *pellet* in 1 ml di buffer di lisi composto da 25 mM Tris-HCl (pH 8), 0.3 M NaCl ed inibitori di proteasi (PMSF e benzamidina 0.5 mM).

Aggiungere al preparato lisozima (0.1mg/ml finale) ed incubare 10' a temperatura ambiente seguito da 20' in ghiaccio.

Aggiungere 1.6 µl di Tween 20.

Procedere alla sonicazione (mediante micropunta) del campione in *eppendorf* mediante 9 colpi da 15'', con pause di 10-15' tra una sonicata e l'altra.

Centrifugare per 15' a 10000 rpm, recuperare il sovrantante e risospesare il pellet in uguale volume di buffer di lisi.

Caricare su gel di poliacrilammide aliquote dei campioni per verificare l'induzione e la solubilità della proteina di interesse.

4.2e Purificazione su larga scala della proteina *CFP-MT-YFP* mediante resina *TALON*[®] (*Metal Affinity Resin*)

Si prepara una coltura (100 ml di terreno) ottenuta da inoculo da singola colonia di cellule BL21 c.p. trasformate con il vettore pET28-CFP-MT-YFP.

Si induce il campione con IPTG (1 mM finale) più ZnCl₂ (400 μM finale) O/N a 20°C.

Si procede al protocollo di lisi, risospesando in 10 ml di idoneo buffer (vedere sezione 4.2d).

Si equilibra la resina *TALON*[®] (1ml/5mg di proteina) con *buffer binding* (BB) composto da Tris-HCl 20 mM, 0.1 M NaCl ed inibitori di proteasi (PMSF e benzamidina 0.5 mM) (3 lavaggi da 10 ml).

Si incuba la resina con il sovrnatante ottenuto dopo lisi (10 ml) per 1 h a 4°C in rotazione.

Si centrifuga il campione (resina + lisato) per 10' a 10000 rpm a 4°C e si separa resina e sovrinatante (*flow through*).

Si effettuano lavaggi della resina con BB (3 lavaggi da 10 ml).

Si effettua un lavaggio con imidazolo alla concentrazione finale di 10 mM (in 10 ml di BB).

Si eluisce la proteina dalla resina mediante imidazolo alla concentrazione finale di 100 mM.

4.2f Rimozione della coda di istidine dalla proteina *CFP-MT-YFP* mediante proteolisi con trombina.

La proteina *CFP-MT-YFP*, risospesa in Tris-HCl 20 mM (pH 8) 0.1 M NaCl, è stata digerita mediante l'attività proteasica della trombina, alla temperatura di reazione di 37°C per 3 h (1:50, rapporto molare trombina-proteina).

L'enzima è stato successivamente inattivato mediante aggiunta di 1 mM di PMSF per 15' a 37°C.

L'estratto proteico è stato sottoposto a purificazione mediante il protocollo descritto in sezione 4.2e.

4.2g Saggio di alchilazione dei residui di cisteina con Iodoacetamide.

100 µl di soluzione proteica (2.5 µg/ml) viene aggiunta a 875 µl di Tris-HCl 0.5 M e 5 mM di DTT (il pH adatto alla reazione di alchilazione è tra 7.5 e 8.5).

La concentrazione finale di DTT è sufficiente per ottenere completa riduzione delle proteine.

Un'aliquota di iodoacetamide 1 M (25 µl) viene aggiunta a 900 µl di campione ridotto (rapporto molare 5:1 di iodoacetamide-DTT).

Vortex per mischiare.

La risultante miscela viene incubata al buio per 1 h a 20°C.

La reazione viene fermata mediante l'aggiunta di 25 µl di DTT 1 M e la soluzione conservata a -80°C al buio.

Prima delle successive analisi allo spettrofluorimetro la soluzione viene dializzata per rimuovere l'eccesso di I⁻, conosciuti essere dei *quencher* della fluorescenza.

4.2h Misure allo spettrofluorimetro

Una aliquota del campione (700 μ l) contenente la proteina *CFP-MT-YFP* purificata e risospesa in Tris HCl 20 mM (pH 8) viene eccitata mediante radiazione alla lunghezza d'onda di 435 nm (eccitazione selettiva della *CFP*) seguita dalla rilevazione della radiazione emessa dal campione in analisi, mediante spettrofluorimetro FluoroMax-3 (Jobin Yvon Horiba).

Il segnale di FRET (*Fluorescent Resonance Energy Transfer*) del campione in presenza di metallo (zinco), viene rilevato come aumento del rapporto delle intensità di fluorescenza tra *YFP* (524 nm) e *CFP* (475 nm) rispetto allo stesso campione nella quale gli ioni metallici sono stati eliminati tramite saggio di alchilazione.

4.3 Ceppi e terreni di crescita utilizzati

Batteri

Per le varie manipolazioni del DNA plasmidico è stato utilizzato il ceppo XL1Blue di *Escherichia coli*:

Genotipo

SupE44 hsdR17 recA1 end A1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F' [proAB⁺ lacI^q l acZΔM15 tn10 (tet^r)]

Per l'espressione delle proteine CFP-MT-YFP sono stati utilizzati i ceppi di *Escherichia coli*:

BL21 (DE3) *star* (NOVAGEN):

Genotipo

F⁻ omp T hsdS_b (r_b⁻ m_b⁻) gal dcm (DE3)

Codon plus (DE3)-RIL (Stratagene):

Genotipo

E.coli B F⁻ amp^r hsdS (r_b⁻ m_b⁻) dcm⁺ gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]

Lieviti

Per lo *screening* dei metalli è stata utilizzata la collezione di 4850 mutanti per delezione di *S. cerevisiae* (Open Biosystem/Research Genetics; http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/deletions3.html).

I ceppi selvatici aploidi utilizzati per la costruzione della collezione sono BY4742 e BY4739:

Genotipo

BY4742 MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0

BY4739 MAT α leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0

Per i test di verifica dei fenotipi vengono utilizzati i mutanti per delezione di *S. cerevisiae* derivanti dal ceppo parentale BY4741:

Genotipo

BY4741 MAT α ura3 Δ 0 leu2 Δ 0 his3 Δ 1 met15 Δ 0

Terreni utilizzati

Per la crescita dei ceppi batterici è stato utilizzato il terreno Massimo LB (Luria Bertani) (Sambrook et al., 2001) e SOC (*Bacto Yeast Extract*, *Bacto Triptone*, NaCl, KCl, Mg²⁺, Glucosio).

Per la crescita delle cellule di lievito è stato utilizzato il terreno massimo YPD (1% *Yeast Extract*, 2% Peptone, 2% Glucosio, 1.5% Agar) con l'aggiunta dell'antibiotico G418 (gentamicina) per la crescita dei mutanti per delezione e di determinate concentrazioni di CdCl₂, CdSO₄, NiSO₄, NiCl₂, HgCl₂, NaAsO₂, ZnCl₂, CoCl₂ e FeCl₃ necessarie per gli *screening* in presenza di tali metalli.

Come terreno minimo selettivo per lieviti è stato utilizzato SD (0.67% *Yeast Nitrogen Base*, 2% Glucosio) supplementato con gli opportuni amminoacidi.

5. CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi ha permesso di individuare i prodotti genici e i relativi *pathway* interessati nella risposta delle cellule di *Saccharomyces cerevisiae* alla tossicità di diversi metalli.

Lo studio è stato focalizzato principalmente sulla risposta fenotipica (sensibilità o resistenza) a cadmio e nichel (due metalli caratterizzati da differenti proprietà fisico-chimiche) in mutanti *knockout* per delezione di *Saccharomyces cerevisiae*, mediante un sistema *high throughput* che ha consentito di analizzare in modo rapido ed efficace l'intera collezione di mutanti.

Le informazioni ottenute hanno permesso di identificare sia meccanismi di risposta comuni sia specifici ai differenti tipi di metalli analizzati, permettendo di determinare i peculiari meccanismi di tossicità.

Dall'analisi dei dati emergono processi che sottolineano aspetti già ampiamente noti per essere coinvolti nei sistemi di tolleranza del lievito ai metalli tossici, come ad esempio il sequestro vacuolare, l'attivazione di componenti delle difese antiossidanti della cellula e la rimozione delle proteine danneggiate.

Diversi aspetti nuovi, mai associati prima all'omeostasi dei metalli, emergono dai risultati ottenuti, confermando l'efficacia di tale metodologia di derivazione post-genomica nel rilevare le differenti risposte adottate dalle cellule di lievito alle differenti tipologie di xenobiotici. Uno degli esempi più intriganti di questi nuovi *hot spot*, è la riprogrammazione traduzionale che è alla base del ruolo esercitato da alcuni *pathway* (*Ccr4* e *NPC complex*) nel controllo della degradazione degli mRNA e dell'esporto nucleare dei trascritti, che consentono alle cellule di modulare l'espressione genica, al fine di ottenere una esclusiva risposta alla condizione di stress indotta.

Particolarmente interessante risulta la scoperta del fatto che ioni cadmio e nichel, analogamente ad altre specie metalliche ed altri stress, inducano attraverso distinte modalità d'azione una carenza intracellulare di ferro.

I risultati del nostro *screening* hanno permesso inoltre di rilevare come uno stesso processo possa influenzare in maniera opposta la detossificazione dei due metalli. Un caso esemplare è quello rappresentato dai sistemi di traffico vescicolare Golgi-

endosoma-vacuolo, osservando che mutazioni in specifici componenti (es., i complessi ESCRT o retromero) rendono le cellule ipersensibili agli ioni cadmio, ma tolleranti agli ioni nichel.

Sulla base di ulteriori studi condotti, abbiamo ipotizzato che l'inibizione di sistemi di *uptake* o una aberrante traslocazione alla membrana plasmatica di componenti deputati all'esporto di ioni metallici siano responsabili dei fenotipi osservati, rispettivamente, con cadmio e nichel.

Il *set* di mutanti che mostra un'alterata vitalità dopo l'esposizione a ioni cadmio e nichel è stato sottoposto all'azione di altre specie metalliche (Hg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} e Co^{2+}) e metalloidi (AsO_2^-). Sebbene vi sia una buona correlazione tra proprietà chimiche e profili di tossicità cellulare dei metalli esaminati, molti *pathway* centrati sul traffico vescicolare esibiscono un inaspettato grado di specificità nei confronti dei diversi metalli.

L'analisi ha permesso di identificare un certo numero di nuovi trasportatori di membrana (es. Tat1) che sono deputati al trasporto (promiscuo) in maniera più o meno generalizzata degli ioni metallici.

Il confronto dei profili fenotipici ottenuti con i diversi metalli ha permesso inoltre di associare un putativo ruolo nella detossificazione dei metalli tossici di ORF di *S. cerevisiae* non ancora annotate, alcune delle quali presentano omologia con geni associati a malattie umane.

L'ultima parte di questo lavoro di tesi è incentrata sulla realizzazione di un prototipo di biosensore per metalli, costituito da due proteine fluorescenti (appartenenti alla famiglia delle *GFP*) fuse alla metallothioneina MT2a di *Arabidopsis thaliana*, una proteina la cui elevata affinità per metalli come cadmio e zinco è nota in letteratura.

Basato sulla tecnologia FRET, il sensore ricombinante ha confermato la presenza di ioni metallici (Zn^{2+}) in un preliminare esperimento *in vitro*, dimostrando la capacità del costruito proteico di rilevare l'interazione di metalli con i domini della MT.

Questo biosensore potrà essere utilizzato per lo *screening* di xenobiotici presenti all'interno di diverse matrici (ad es. alimentari) e per lo studio dell'interazione fra ligando e proteina di interesse.

6. BIBLIOGRAFIA

Abshire M.K., G.S. Buzard, N. Shiraishi, M.P. Waalkes. (1996) Induction of proto-oncogene expression in rat L6 myoblasts by cadmium is inhibited by zinc preinduction of the metallothionein gene. *J. Toxicol. Environ. Health* 48 359–377.

Adamis Paula D.B., Debora S. Gomes, Maria Lucia C.C. Pinto, Anita D. Panek, Elis C.A. Eleutherio. (2004) The role of glutathione transferases in cadmium stress. *Toxicology Letters* 154, 81–88.

Ana Traven, Andrew Hammet, Nora Tennis, Clyde L. Denis and Jorg Heierhorst. (2004) Ccr4-Not complex mRNA deadenylase activity contributes to DNA damage responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 169: 65-75.

Anderson P. and Kedersha N. (2002) Stressful initiations. *J. Cell. Sci.* 115: 3227-3234.

Avery Simon V. and John M. Tobin. (1993) Mechanism of Adsorption of hard and soft metal ions to *Saccharomyces cerevisiae* and influence of hard and soft anions. *Applied and Environmental Microbiology*, Sept. p. 2851-2856, vol. 59, No 9.

Avery Simon V., Niall G. Howlett and Stefania Radice. (1996) Copper toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: dependence on plasma membrane fatty acid composition. *Applied and Environmental Microbiology*, Nov. p. 3960-3966, vol. 62, No 11.

Awais Muhammad, Moritoshi Sato, Kazuki Sasaki and Yoshio Umezawa. (2004) A genetically encoded fluorescent indicator capable of discriminating estrogen agonists from antagonists in living cells. *Analytical Chemistry*, Vol. 76, No. 8, April 15.

Bachhawat Anad K. and Rupinder Kaur. (1999) The yeast multidrug resistance pump, Pdr5p, confers reduced drug resistance in *erg* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 145, 809-818.

Bal Wojciech and Kazimierz S. Kasprzak. (2002) Induction of oxidative DNA damage by carcinogenic metals. *Toxicology Letters* 127 55-62.

Banerjee Sreeparna and Hernan Flores-Rozas. (2005) Cadmium inhibits mismatch repair by blocking the ATPase activity of the MSH2–MSH6 complex *Nucleic Acids Research*, Vol. 33, No. 4 1410–1419.

Bennett, C.B., Lewis, L.K., Karthikeyan, G., Lobachev, K.S., Jin, Y.H., Sterling, J.F., Stipe, J.R., and Resnick, M.A. (2001) Genes required for ionizing radiation resistance in yeast. *Nature Genetics* 29, 426-434.

Beyersmann Detmar. (2002) Effects of carcinogenic metals on gene expression. *Toxicology Letters* 127 63-68.

Bilsland Elizabeth, Claes Molin, Swarna Swaminathan, Anna Ramne And Per Sunnerhagen. (2004) Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the Hog pathway are required for oxidative stress resistance. *Molecular Microbiology* 53 (6), 1743-1756.

Bishop AL, Rab FA, Sumner ER, Avery SV. (2007) Phenotypic heterogeneity can enhance rare cell survival in 'stress-sensitive' yeast populations. *Mol Microbiol*, 63(2):507-520.

Bobby-Joe Breitkreutz, Chris Stark and Mike Tyers. (2002) Osprey: A Network Visualization System. *Genome Biology*, 3(12).

Bonifacino Juan S. and Raul Rojas. (2006) Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, Vol. 7, 569.

Borrelly Gilles, Jean-Christophe Boyer, Brigitte Touraine, Wojciech Szponarski, Michèle Rambier and Rémy Gibrat. (2001) The yeast mutant vps5delta affected in the recycling of golgi membrane proteins displays an enhanced vacuolar Mg^{2+}/H^{+} exchange activity. *PNAS*, Vol. 98, No 17.

Bowers Katherine, Jillian Lottridge, Stephen B. Helliwell, Lisa M. Goldthwaite, J. Paul Luzio and Tom H. Stevens. (2004) Protein-protein interactions of ESCRT complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic*; 5: 194-210.

Bowers Katherine, Tom H. Stevens. (2005) Protein transport from the late golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1744; 438-454.

Brennan R. J. and Schiestl R. H. (1996) Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. *Mutat. Res.* 356, 171-178.

Burda P, Padilla SM, Sarkar S, Emr SD. (2002). Retromer function in endosome-to-Golgi retrograde transport is regulated by the yeast Vps34 PtdIns 3-kinase. *J Cell Sci*, 115(Pt 20):3889-3900.

Care A, Vousden KA, Binley KM, Radcliffe P, Trevethick J, Mannazzu I, Sudbery PE. (2004) A synthetic lethal screen identifies a role for the cortical actin patch/endocytosis complex in the response to nutrient deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 166(2):707-719.

Chan J, Merrifield ME, Soldatov AV, Stillman MJ. (2005) XAFS spectral analysis of the cadmium coordination geometry in cadmium thiolate clusters in metallothionein. *Inorg Chem.* 44:4923-33.

Chen Y., Piper PW. (1995) Consequences of the overexpression of ubiquitin in yeast: elevated tolerances of osmostress, ethanol and canavanine, yet reduced tolerances of cadmium, arsenite and paromomycin. *Biochim. Biophys. Acta.* Jul 20;1268(1):59-64.

Claudia Jonak, Hirofumi Nakagami, and Heribert Hirt. (2004) Heavy metals stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiology* Vol. 136, pp. 3276–3283.

Cohen Adiel, Hannah Nelson, and Nathan Nelson. (2000) The family of SMF metal ion transporters in yeast cells. *The Journal of biological chemistry* Vol.275 No. 43 pp. 33388-33394.

Costa Max, Jessica E. Sutherland, Wu peng, Konstantin Salnikow, Limor Broday and Thomas Kluz. (2001) Molecular biology of nickel carcinogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 222: 205-211.

D'Amours Damien and Stephen P. Jackson. (2001) The yeast Xrs2 complex functions in S phase checkpoint regulation. *Genes and Dev.* 15: 2238-2249.

Davidson T, Chen H, Garrick MD, D'Angelo G, Costa M. (2005) Soluble nickel interferes with cellular iron homeostasis. *Mol Cell Biochem* 279(1-2):157-162.

Davidson Todd, Chen Haobin, Garrick Michael, D'angelo Gisela and Costa Max. (2005) Soluble nickel interferes with cellular iron homeostasis. *Mol. And Cell. Homeostasis*, Vol. 279, No. 1-2, 157-162.

DeRisi JL, Iyer VR and Brown PO. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*; 278:680.

Desmoucelles, C., Pinson, B., Saint-Marc, C. and Daignan-Fornier, B. (2002) Screening the Yeast "Disruptome" for Mutants Affecting Resistance to the Immunosuppressive Drug, Mycophenolic Acid. *J. Biol. Chem.* 277: 27036-27044.

Dickinson Dale A. and Henry Jay Forman. (2002) Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology* 64 1019-1026.

Dietz R, Riget F, Cleemann M, Aarkrog A, Johansen P, Hansen JC. (2000) Comparison of contaminants from different trophic levels and ecosystems. *Sci Total Environ.* 245:221-31.

Distel B., Al EJ, Tabak HF and Jones EW. (1983) Synthesis and maturation of the yeast vacuolar enzymes carboxypeptidase Y and aminopeptidase I. *Biochim Biophys Acta*. Oct 13;741(1):128-35.

Dodou E. and R. Treisman. (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen –activated protein kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.* 17: 1848-1859.

Doreswamy Kodipura, Balakrishna Shilatha, Thimappa Rajeshkumar and Muralidhara. (2004) Nickel-induced oxidative stress in testis of mice: evidence of DNA damage and genotoxic effects. *Journal of Andrology*, Vol. 25, No. 6.

Duex JE, Tang F, Weisman LS. (2006) The Vac14p–Fig4p complex acts independently of Vac7p and couples PI3,5P2 synthesis and turnover. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 172, No. 5, 693–704.

Dujon B. (1996) The yeast genome project: what did we learn? *Trends Genet.* 12; 263-270.

Eide David J. (2003) Multiple Regulatory Mechanisms Maintain Zinc Homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Nutr.* 133: 1532S–1535S.

Eide J. David. (1998) The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Nutr.* 18:441-69.

Eve Lenssen, Nicole James, Ivo Pedruzzi, Frederique Dubouloz, Elisabetta Cameroni, Evelyne Dubois, Bart Scherens, Fabienne Vierendeels, Melisa M. W. Ho, Francine Messenguy, and Stephen B. Shears. (2002) In *Saccharomyces cerevisiae*, the Inositol Polyphosphate Kinase Activity of Kcs1p Is Required for Resistance to Salt Stress, Cell Wall Integrity, and Vacuolar Morphogenesis. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 277, No. 26, Issue of June 28, pp. 23755–23763.

Farcasanu Ileana Cornelia, Masaki Mizunuma, Fumitaka Nishiyama and Tokichi Miyakawa. (2005) Role of L-Histidine in conferring tolerance to Ni²⁺ in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69 (12), 2343-2348.

Fauchon M., Gilles Lagniel, Jean-Christophe Aude, Luis Lombardia, Pascal Soularue, Cyrille Petat, Gérard Marguerie, André Sentenac, Michel Werner and Jean Labarre. (2002) Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulphur demand. *Molecular Cell*, Vol. 9, 713-723.

Fleming, J.A., Lightcap, E.S., Sadis, S., Thoroddsen, V., Bulawa, C.E., and Blackman, R.K. (2002) Complementary whole-genome technologies reveal the cellular response to proteasome inhibition by PS-341. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 1461-1466.

Galaris Dimitrios and Angelos Evangelou. (2002) The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. *Critical reviews in Oncology/Hematology* 42 93-103.

Giaever Guri, Angela M. Chu, Li Ni, Carla Connelly, Linda Riles, Steeve Veronneau, Sally Dow, Ankuta Lucau-Danila, Keith Anderson, Bruno Andre', Adam P. Arkin1, Anna Astromoff, Mohamed El Bakkoury, Rhonda Bangham, Rocio Benito, Sophie Brachat, Stefano Campanaro, Matt Curtiss, Karen Davis, Adam Deutschbauer, Karl-Dieter Entian, Patrick Flaherty, Francoise Foury, David J. Garfinkel, Mark Gerstein, Deanna Gotte, Ulrich Gu' Idener, Johannes H. Hegemann, Svenja Hempel, Zelek Herman, Daniel F. Jaramillo, Diane E. Kelly, Steven L. Kelly, Peter Kotter, Darlene LaBonte, David C. Lamb, Ning Lan, Hong Liang, Hong Liao, Lucy Liu, Chuanyun Luo, Marc Lussier, Rong Mao, Patrice Menard, Siew Loon Ooi, Jose L. Revuelta, Christopher J. Roberts, Matthias Rose, Petra Ross-Macdonald, Bart Scherens, Greg Schimmack, Brenda Shafer, Daniel D. Shoemaker, Sharon Sookhai-Mahadeo, Reginald K. Storms, Jeffrey N. Strathern, Giorgio Valle, Marleen Voet, Guido Volckaert, Chingyun Wang, Teresa R. Ward, Julie Wilhelmy, Elizabeth A. Winzeler, Yonghong Yang, Grace Yen, Elaine Youngman, Kexin Yu, Howard Bussey, Jef D. Boeke, Michael

Snyder, Peter Philippsen, Ronald W. Davis and Mark Johnston. (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. NATURE |VOL 418 | 25 JULY.

Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H. and Oliver S.G. (1996) Life with 6000 genes. Science, 274; 546-567.

Gomes D. S., L.C. Fragoso, C.J. Riger, A.D. Panek, E.C.A Eleutherio (2002). Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. Biochimica et Biophysica Acta 1573 21-25.

Götte M. and T. Lazar. (1998) The ins and outs of yeast vacuole trafficking .Protoplasma 209:9-18.

Gustavo C. MacIntosh, Pauline A. Bariola, Ed Newbigin, and Pamela J. Green. (2001) Characterization of Rny1, the *Saccharomyces cerevisiae* member of the T2 RNase family of RNases: Unexpected functions for ancient enzymes? PNAS 30, vol. 98, no. 3.

Gustin Michael C., Jacobus Albertyn, Matthew Alexander And Kenneth Davenport. (1998) Map kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology And Molecular Biology Reviews p. 1264-1300, Vol. 62, No 4.

Hall J.L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. Journal of Experimental Botany, Vol. 53 No. 336, pp 1-11.

Haro R., B. Garciadeblas and A. Rodriguez-Navarro. (1991) A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. FEBS lett. 291: 189-191.

Hettema EH, Lewis MJ, Black MW, Pelham HR. (2003) Retromer and the sorting nexins Snx4/41/42 mediate distinct retrieval pathways from yeast endosomes. Embo J, 22(3):548-557.

Hiroshi Kitagaki, Hong Wu, Hitoshi Shimoi and Kiyoshi Ito (2002) Two homologous genes, DCW1(YKL046c) and DFG5, are essential for cell growth and encode glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins required for cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 46 (4), 1011–1022.

Hochstrasser M. (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* 30:405-39.

Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. (2007) Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends Biochem Sci*, 32(2):71-77.

Howlett N. G. and Avery S. V. (1997) Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2971-2976.

Huang Meng-Er and Richard D. Kolodner. (2005) A biological network in *saccharomyces cerevisiae* prevents the deleterious effects of endogenous oxidative DNA damage. *Molecular Cell*, Vol. 17, 709-720.

Hurley JH, Emr SD. (2006) The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane trafficking network. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 35:277-298.

Jamieson Derek J. (1998) Oxidative stress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1511-1527.

Jin Y.H., Clark A.B., Slebos R.J., Al-Refai H., Taylor J.A., Kunkel T.A., Resnick M.A. and Gordenin D.A. (2003) Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat Genet.* 34, 326-329.

Joern Jungmann, Julian C. Rayner, and Sean Munro. (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* Protein Mnn10p/Bed1p Is a Subunit of a Golgi Mannosyltransferase Complex. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 274, No. 10, Issue of March 5, pp. 6579–6585.

Joho M., Ishikawa Y, Kunikane M., Inouhe M., Tohoyama H. and Murayama T. (1992) The subcellular distribution of nickel in Ni-sensitive and Ni-resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbios.* 71, 149-159.

Kagi, J.H.R. and Vallee B.L. (1960) Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.*, 235, 3460-3465.

Kang Jiuhong, Yuntao Zhang, Jie Chen, Haifeng Chen, Changjum Lin, Qin Wang and Yingxian Ou. (2003) Nickel-induced histone hypoacetylation: the role of reactive oxygen species. *Toxicological Sciences* 74, 279-286.

Kasprzak K.S., P. Gabryel, K. Jarczewska. (1983) Carcinogenicity of nickel(II)hydroxides and nickel(II)sulfate in Wistar rats and its relation to the in vitro dissolution rates. *Carcinogenesis* 4, 275–279.

Kasprzak Kazimierz S., F. William Sunderman Jr., Konstantin Salnikow. (2003) Nickel carcinogenesis. *Mutation Research* 533 67-97.

Katherine Bowers, Jillian Lottridge, Stephen B. Helliwell, Lisa M. Goldthwaite, J. Paul Luzio and Tom H. Stevens. (2004) Protein-protein interactions of ESCRT complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic*; 5: 194-210.

Katherine Bowers, Tom H. Stevens. (2005) Protein transport from the late golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1744; 438-454.

Ke Q, Davidson T, Kluz T, Oller A, Costa M. (2007) Fluorescent tracking of nickel ions in human cultured cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 219(1):18-23.

Ken Nishimura, Kazuei Igarashi and Yoshimi Kakinuma. (1998) Proton gradient-driven nickel uptake by vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 180, No 7, p. 1962-1964.

Kern Ana Lucia, Diego Bonatto, Johnny Ferraz Dias, Maria-Lucia Yoneama, Martin Brendel and Joao Antonio Pegas Henriques. (2005) The function of Alr1 of *Saccharomyces cerevisiae* in cadmium detoxification: insights from phylogenetic studies and particle-induced X-ray emission. *Biometals* 18: 31-41.

Kiss T., Osipenko O.N. (1994) Toxic effects of heavy metals on ionic channels. *Pharmacol. Rev*, 3, 245-246.

Lamb T. M., W. Xu, A. Diamond and A. P. Mitchell. (2001) Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. *J. Biol. Chem.* 276: 1850-1856.

Lamb Teresa M. and Aaron P. Mitchell. (2003) The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes NRG1 and SMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* p. 677-686, Vol. 23 No.2.

Lapinskas P.J., Cunningham K. W., Liu X. F. Fink G.R. and Culotta V.C. (1995) Mutations in PMR1 suppress oxidative damage in yeast cells lacking superoxide dismutase. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1382-1388.

Lashkari DA, DeRisi JL, McCusker JH, et al. (1997) Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 94: 13057.

Lee Y.W., C.B. Klein, B. Kargacin, K. Salnikow, J. Kitahara, K. Dowjat, A. Zhitkovich, N.T. Christie and M. Costa. (1995) Carcinogenic nickel silences gene expression by chromatin condensation and DNA methylation: a new model for epigenetic carcinogens. *Molecular and Cellular Biology*, May, p. 2547-2557, Vol. 15, No. 5.

Levin D. (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, p. 262–291 Vol. 69, No. 2.

Levin D. and Bevin Philip. (2001) Wsc1 and Mid2 Are Cell Surface Sensors for Cell Wall Integrity Signaling That Act through Rom2, a Guanine Nucleotide Exchange Factor for Rho1. *Molecular And Cellular Biology*, p. 271–280 Vol. 21, No.1.

Li Liangtao and Jerry Kaplan. (1998) Defects in the yeast high affinity transport system result in increased metal sensitivity because of the increased expression of transporters with a broad transition metal specificity. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 273, No 35, pp 22181-22187.

Li Z., Lu Y., Zhen R., Szczypka M., Thiele D.J., and Rea P.A. (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 42-47.

Liu XF, Culotta VC. (1999) Post-translation control of Nramp metal transport in yeast. Role of metal ions and the BSD2 gene. *J Biol Chem*, 274(8):4863-4868.

Liu Xiu Fen, Frantisek Supek, Nathan Nelson, and Valeria Cizewski Culotta. (1997) Negative Control of Heavy Metal Uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 Gene *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 272, No. 18, Issue of May 2, pp. 11763–11769.

Liu Ying, MA, and Stephen L. Sturley, PhD. (2004) Nutritional genomics in yeast models. *Nutrition* 20: 166-172.

Luo W, Chang A. (2000) An endosome-to-plasma membrane pathway involved in trafficking of a mutant plasma membrane ATPase in yeast. *Mol Biol Cell*, 11(2):579-592.

Lynn M. Ramsay, Geoffrey M. Gadd. (1997) Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function confirm a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification. *FEMS Microbiology Letters* 152 pp. 293-298.

MacDiarmid Colin W. and Richard C. Gardner. (1998) Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* magnesium transport system confers resistance to aluminium ion. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 273, No. 3, Issue of January 16, pp 1727-1732.

MacDiarmid CW, Gaither LA, Eide D. (2000) Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, 19(12):2845-2855.

Maria Sambade, Mercedes Alba, Anne M. Smardon, Robert W. West and Patricia M. Kane. (2005) A genomic screen for yeast vacuolar membrane ATPase mutants. *Genetics* 170: 1539-1551.

Martine A. Collart. (2003) Global control of gene expression in yeast by the Ccr4-Not complex. *Gene* 313; 1-16.

Masayuki Kakimoto, Atsushi Kobayashi, Ryouichi Fukuda, Yasuke Ono, Akinori Ohta and Etsuro Yoshimura. (2005) Genome-wide screening of aluminium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *BioMetals* 18: 467-474

McMurray CT, Tainer JA. (2003) Cancer, cadmium and genome integrity. *Nat Genet* 34, 34239-34241.

Mercedes Pardo, Lucía Monteoliva, Paloma Va' zquez, Raquel Martinez, Gloria Molero, Ce' sar Nombela and Concha Gil. (2004) PST1 and ECM33 encode two yeast cell surface GPI proteins important for cell wall integrity. *Microbiology* 150, 4157–4170.

Momose Yuko and Hitoshi Iwahashi. (2001) Bioassay of cadmium using a DNA microarray: genome-wide expression patterns of *Saccharomyces cerevisiae* response to cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 20, No 10, pp 2353-2360.

Morgan Tucker, Robin R. Staples, Marco A.Valencia-Sanchez, Denise Muhlrud and Roy Parker. (2002) Ccr4 is the catalytic subunit of a Ccr4p /Pop2p Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO journal* Vol. 21 No.6 pp 1427-1436.

Murata K., Fukuda Y., Shimosaka M., Watanabe K., Saikusa T and Kimura A. (1985) Phenotype character of the methylglyoxal resistance gene in *Saccharomyces cerevisiae*: expression in *Escherichia coli* and application to breeding wild-type yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 1200-1207.

Nadal Eulàlia, Laura Casadomé and Francesc Posas. (2003) Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase. *Molecular and Cellular Biology* p. 229-237, Vol. 23 No.1.

Naganuma Akira, Nobuhiko Miura, Satoshi Kaneko, Tetsuya Mishina, Shinji Hosoya, Shinichi Miyairi, Takemitsu Furuchi, And Shusuke Kuge. (2000) GFAT as a target molecule of methylmercury toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *FASEB J.* 14, 968–972.

Nazif Alic, Vincent J. Higgins, Alena Pichova, Michael Breitenbach and Ian W. Dawes. (2003) Lipid hydroperoxides activated the mitogen-activated protein kinase Mpk1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *JBC Papers in Press*. Published on August 11, 2003 as Manuscript M307760200.

Nelson N, Perzov N, Cohen A, Hagai K, Padler V, Nelson H. (2000) The cellular biology of proton-motive force generation by V-ATPases. *J Exp Biol*, 203(Pt 1):89-95.

Nelson Nathan. (1999) Metal ion transporters and homeostasis. *EMBO J*. Vol. 18 No. 16 pp 4361-4371.

Nieboer E. and D. H. S. Richardson. (1980) The replacement of the nondescript term heavy metals by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut. Ser. B* 1:3-26.

Nishimura Ken, Kyoko Yasumura, Kazuei Igarashi and Yoshimi Kakinuma. (1999) Involvement of Spt7 in vacuolar polyphosphate level of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 257, 835-838.

Nothwehr SF, Ha SA, Bruinsma P. (2000) Sorting of yeast membrane proteins into an endosome-to-Golgi pathway involves direct interaction of their cytosolic domains with Vps35p. *J Cell Biol*, 151(2):297-310.

Olivier Gueldry, Myriam Lazard, Florence Delort, Marc Dauplais, Ioana Grigoras, Sylvain Blanquet and Pierre Plateau. (2003) Ycf1p-dependent Hg(II) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 270, 2486–2496 FEBS.

Osley Mary Ann, Toyoko Tsukuda and Jac A. Nickoloff. (2007) ATP-dependent chromatin remodelling factors and DNA damage repair. *Mutant Res.* May 1; 618 (1-2): 65-80.

Pagani M. Ayelen, Antonio Casamayor, Raquel Serrano, Silvia Atrian And Joaquin Arino. (2007) Disruption of iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* by high zinc levels: a genome-wide study. *Molecular Microbiology* 65 (2), 521-537.

Pan Xuewen, Ping Ye, Daniel S. Yuan, Xiaoling Wang, Joel S. Bader And Jef Boeke. (2006) A DNA integrity network in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 124, 1068-1081.

Parsons Ainslie B., Ron Geyer, Timothy R. Hughes, Charles Boone (2003) Yeast genomics and proteomics in drug discovery and target validation. *Progress in Cell Cycle Research*, Vol. 5, 159-166.

Pearce David A. and Fred Sherman. (1999) Toxicity of copper, cobalt and nickel salts is dependent on histidine metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, Aug., p. 4774-4779 Vol. 181, No. 16.

Pearson , R. G. (1963) Hard and soft acids and bases. *J. Am. Chem. Soc.* 85: 3533-3539.

Perego P. and Stephen B. Howell. (1997) Molecular Mechanisms controlling sensitivity to toxic metal ions in yeast. *Toxicology and applied pharmacology* 147, 312-318.

Persans MW, Nieman K, Salt DE. (2001) Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(17):9995-10000.

Que Qiang Q., Elizabeth A. Winzeler. (2002) Large-scale mutagenesis and functional genomics in yeast. *Funct. Integr. Genomics* 2: 193-198.

Raja KB, Jafri SE, Peters TJ, Simpson RJ. (2006) Iron and cadmium uptake by duodenum of hypotransferrinaemic mice. *Biometals* 19(5):547-553.

Raquel Serrano, Humberto Martí'n, Antonio Casamayor, and Joaquín Arin˜o. (2006) Signaling Alkaline pH Stress in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 Cell Surface Sensor and the Slt2 MAPK Pathway. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 281, No. 52, pp. 39785–39795.

Rosen Barry P. (2002) Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 133 689-693.

Ruth Bisig, Laurent Maillet, Michel Werner, Johnny Roosen, Katarina Petrovic, Joris Winderickx, Martine A. Collart, and Claudio De Virgilio. (2005) The Ccr4-Not Complex Independently Controls both Msn2-Dependent Transcriptional Activation via a Newly Identified Glc7/Bud14 Type I Protein Phosphatase Module and TFIID Promoter Distribution. *Molecular and Cellular Biology*, Jan. p.488-498 Vol. 25, No1.

Rutherford J.C. and Amanda J.Bird (2004) Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryotic Cell.*, Feb. p. 1-13 Vol. 3, No1.

Sambrook J., Russel D. W. (2001) *Molecular cloning-A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanjay K. Vasu and Douglass J. Forbes. (2001) Nuclear pores and nuclear assembly. *Current Opinion in Cell Biology* 13:363-375.

Sarit Markovich, Aya Yekutieli, Itamar Shalit, Yona Shadkchan, and Nir Osherov. (2004) Genomic Approach to Identification of Mutations Affecting Caspofungin Susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, p. 3871–3876 Vol. 48, No. 10.

Sato Masao and Masuo Kondoh. (2002) Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Tohoku J. Exp. Med.*, 196, 9-22.

Schilderman PA, Moonen EJ, Kempkers P, Kleinjans JC. (1997) Bioavailability of soil-adsorbed cadmium in orally exposed male rats. *Environ Health Perspect.* 105:234-8.

Schweyen Rudolf J and Jochen A. Stadler. (2002) The Yeast Iron Regulon Is Induced upon Cobalt Stress and Crucial for Cobalt Tolerance. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 277, No. 42, Issue of October 18, pp. 39649–39654.

Scott Sidney V., Misuzu Baba, Yoshinori Ohsumi, and Daniel J. Klionsky. (1997) Aminopeptidase I Is Targeted to the Vacuole by a Nonclassical Vesicular Mechanism. *J. Cell Biol.* 138: 37-44.

Scudiero R, Temussi PA, Parisi E. (2005) Fish and mammalian metallothioneins: a comparative study. *Gene.* 345:21-6.

Seaman MN. (2004) Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J Cell Biol,* 165(1):111-122.

Seaman MN. (2005) Recycle your receptors with retromer. *Trends Cell Biol,* 15(2):68-75.

Serrano R. (1996) Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets defense responses. *Int. Rev. Cytol.* 165: 1-52.

Serrano Raquel, Dolores Bernal, Ernesto Simon And Joaquin Arino. (2004) Copper and iron are the limiting factors for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an alkaline environment. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 279, No 19, pp 19698-19704.

Shaw JD, Cummings KB, Huyer G, Michaelis S, Wendland B. (2001) Yeast as a model system for studying endocytosis. *Exp Cell Res,* 271(1):1-9.

Shiraishi Y. (1975) Cytogenetic studies in 12 patients with itai-itai disease. *Humangenetik* 27:31-44.

Shoemaker, D.D., Lashkari, D.A., Morris, D., Mittmann, M., and Davis, R.W. (1996) Quantitative Phenotypic Analysis of Yeast Deletion Mutants Using a Highly Parallel Molecular Bar-Coding Strategy. *Nature Genetics*, 14, 1996, 450-456.

Spruill M.D., B. Song, W.-Z. Whong, T. (2002) Proto-oncogene amplification and overexpression in cadmium-induced cell transformation, *J. Toxicol. Environm. Health* 65 2131– 2144.

Stadler Jochen A. and Rudolf J. Schweywn. (2002) The yeast iron regulon is induced upon cobalt stress and crucial for cobalt tolerance. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 277, No 42, pp 39649-39654.

Stimpson HE, Lewis MJ, Pelham HR. (2006) Transferrin receptor-like proteins control the degradation of a yeast metal transporter. *Embo J*, 25(4):662-672.

Stohs S.J. and D. Bagchi. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology e Medicine*. Vol. 18 No 2, pp 321-336.

Strochlic TI, Setty TG, Sitaram A, Burd CG. (2007) Grd19/Snx3p functions as a cargo-specific adapter for retromer-dependent endocytic recycling. *J Cell Biol*, 177(1):115-125.

Su, S. S. and A. P. Mitchell. (1993) Identification of functionally related genes that stimulate early meiotic gene expression in yeast. *Genetics* 133: 67-77.

Swaminathan S, Amerik AY, Hochstrasser M. (1999) The Doa4 deubiquitinating enzyme is required for ubiquitin homeostasis in yeast. *Mol Biol Cell*, 10(8):2583-2594.

Szihicz L. and Forth W. (1988) Effect of As₂O₃ on gluconeogenesis. *Arch. Toxicol.* 61:444-476.

Tamás J. Markus and Robert Wysocki. (2001) Mechanisms involved in metalloid transport and tolerance acquisition. *Curr. Genet.* 40:2-12.

Tamás Markus J., Jean Labarre, Michel B. Toledano, and Robert Wysocki. (2005) Mechanisms of toxic metal tolerance in yeast. *Topics in Current Genetics*, Vol. 14.

Teichert U, B Mechler, H Muller and DH Wolf. (1989) Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation, and cell survival. *J. Biol. Chem.*, Vol. 264, Issue 27, 16037-16045.

Teixeira D., Shet U., Valencia-Sanchez M. A., Brengues M. and Parker R. (2005) Processing bodies require RNA for assembly and contain non-translating mRNAs. *RNA* 11: 371-382.

Tenney K. A. and C. V. Glover. (1999) Transcriptional regulation of the *S. cerevisiae* ENA1 gene by casein kinase II. *Mol. Cell. Biochem.* 191: 161-167.

Ursula Bond. (2006) Stressed out! Effects of environmental stress on mRNA metabolism. *FEMS Yeast Res* 6 160-170.

Usui Takehiko, Hideyuki Ogawa and John H.J. Petrini. (2001) A DNA damage response pathway controlled by Tel1 and Mre11 complex. *Molecular Cell*, Vol.7, 1255-1266.

Vallee B. L., Maret W. (1993) The functional potential and potential functions of metallothioneins: a personal perspective. In *Metallothionein III - Biological roles and medical implications*. (Suzuki KT., Imura N. & Kimura M Eds.), Birkhauser Verlag, Basel Switzerland, pp. 1-27.

Vasak M. (1998) Application of ¹¹³Cd NMR to metallothioneins. *Biodegradation*. 9:501-12.

Vido Karin, Daniel Spector, Gilles Lagniel, Sebastien Lopez, Michel B. Toledano and Jean Labarre. (2001) A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 276, No. 3, Issue of March 16, pp 8469-8474.

Waalkes Michael P. (2003) Cadmium carcinogenesis. *Mutation Research* 533 107-120
Waisberg Michael, Pius Joseph, Beverley Hale, Detmar Beyersmann. (2003) Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192, 95–117.

Wang HY, Klatter M, Jakoby M, Baumlein H, Weisshaar B, Bauer P. (2007) Iron deficiency-mediated stress regulation of four subgroup Ib BHLH genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 226(4):897-908.

Waters BM, Eide DJ. (2002) Combinatorial control of yeast FET4 gene expression by iron, zinc, and oxygen. *J Biol Chem*, 277(37):33749-33757.

Whittaker G. Stephen, David G. Smith, John R. Foster And Ian R. Rowland. (1990) Cytochemical localization of mercury in *Saccharomyces cerevisiae* treated with mercuric chloride. *The Journal Of Histochemistry And Cytochemistry* vol.38, no.6, pp 823-827.

Williams Roger L. and Sylvie Urbe. (2007) The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, Vol. 8, 355.

Wolfe D, Reiner T, Keeley JL, Pizzini M, Keil RL. (1999) Ubiquitin metabolism affects cellular response to volatile anesthetics in yeast. *Mol Cell Biol*, 19(12):8254-8262.

World Health Organisation (WHO) (1992) Environmental Health Criteria 134 - Cadmium International Programme on Chemical Safety (IPCS) Monograph.

Yang Mei, Laran T. Jensen, Allison J. Gardner and Valeria C. Culotta. (2005) Manganese toxicity and *Saccharomyces cerevisiae* Mam3p, a member of the ADCP (ancient conserved domain protein) family. *Biochem J.* 386, 479-487.

Yeh TY, Sbodio JI, Nguyen MT, Meyer TN, Lee RM, Chi NW. (2005) Tankyrase-1 overexpression reduces genotoxin-induced cell death by inhibiting PARP1. *Mol Cell Biochem*, 276(1-2):183-192.

Yen L.J., Ning-Yuan Su, and Peter Kaiser. (2005) The yeast ubiquitin ligase SCF^{met30} regulates heavy metal response. *Molecular biology of the cell* Vol. 16, 1872-1882.

Yoshihara T, Hodoshima H, Miyano Y, Shoji K, Shimada H, Goto F. (2006) Cadmium inducible Fe deficiency responses observed from macro and molecular views in tobacco plants. *Plant Cell Rep*, 25(4):365-373.

Zaccolo Manuela. (2004) Use of chimeric fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer to monitor cellular responses. *Circ Res*; 94: 866-873.

Ze-Sheng Li, Yu-Ping Lu, Rui-Guang Zhen, Mark Szczyepka, Dennis J. Thiele, and Philip a. Rea. (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 94, pp. 42–47.

Zhou J., Goldsbrough P.B. (1994) Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6: 875-884.

Zoroddu Maria Antonietta, Laura Schinocca, Teresa Kowalik-Jankowska, Henryk Kozlowski, Konstantin Salnikow and Max Costa. (2002) Molecular mechanisms in nickel carcinogenesis: modelling Ni (II) binding site in histone H4. *Environmental Health Perspectives* volume 110, supplement 5.

7.APPENDICE

7.1 APPENDICE 1

Tabella che riporta il nome, il fenotipo [0= no fenotipo; 2= fenotipo resistente; -2 = *low sensitive* (LS); -4= *medium sensitive* (MS); -6= *high sensitive* (HS)], la descrizione (GO), i relativi dati *microarray* (per il Cd) e sullo ionoma (per il Ni) di *S. cerevisiae*, gli ortologi umani con le eventuali malattie correlate, e il GO ID (identificatore univoco) dei geni che modulano la tossicità alle specie metalliche cadmio e nichel.

ORF	Cd	Ni	ORF name	Description	ORF type	Overlap with dubious ORFs	Cd microarray data	Ionome Ni data	Blast P (Best Hit)	<i>H. sapiens</i> orthologs	Human disease	GO ID
YAL002W	-4	2	VPS8	Membrane-associated protein that interacts with Vps21p to facilitate soluble vacuolar protein localization; component of the CORVET complex; required for localization and trafficking of the CPY sorting receptor; contains RING finger motif	Verified	-----	1,04	-----	AFR002C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-173)	Vacuolar protein sorting-associated protein 8 homolog	---	GO:0045324
YAL007C	2	2	ERP2	Protein that forms a heterotrimeric complex with Erp1p, Emp24p, and Erv25p; member, along with Emp24p and Erv25p, of the p24 family involved in ER to Golgi transport and localized to COPII-coated vesicles	Verified	-----	0,86	-----	YOR016C (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 6E-58)	Transmembrane emp24 domain containing protein 5 precursor	---	GO:0006888
YAL010C	-2	0	MDM10	Subunit of both the Mdm10-Mdm12-Mmm1 complex and the mitochondrial sorting and assembly machinery (SAM complex); functions in both the general and Tom40p-specific pathways for import and assembly of outer membrane beta-barrel proteins	Verified	-----	0,98	-----	AEL335C (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-98)	---	---	GO:0000001 GO:0000002 GO:000723 GO:0006461 GO:0007005 GO:0045040
YAL021C	-4	-2	CCR4	Component of the CCR4-NOT transcriptional complex, which is involved in regulation of gene expression; component of the major cytoplasmic deadenylase, which is involved in mRNA poly(A) tail shortening	Verified	-----	-----	-----	ACR288W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	Carbon catabolite repressor protein 4 homolog (Cytoplasmic deadenylase) (CCR4 carbon catabolite repression 4-like) (Nocturnin homolog)	---	GO:0000288 GO:0000289 GO:0000289 GO:0006357 GO:0006368 GO:0006368 GO:0007089 GO:0042493
YAL026C	-2	-2	DRS2	Aminophospholipid translocase (flippase) that maintains membrane lipid asymmetry in post-Golgi secretory vesicles; contributes to clathrin-coated vesicle formation and endocytosis; mutations in human homolog ATP8B1 result in liver disease	Verified	-----	1,16	-----	ENSP00000371078 (<i>Homo sapiens</i> , 1E-261)	Probable phospholipid transporting ATPase (EC 3.6.3.1, ATPase class I type)	---	GO:0000028 GO:0006886 GO:0006892 GO:0006892 GO:0006897 GO:0006897 GO:0045332 GO:0045332
YAL040C	0	2	CLN3	G1 cyclin involved in cell cycle progression; activates Cdc28p kinase to promote the G1 to S phase transition; plays a role in regulating transcription of the other G1 cyclins, CLN1 and CLN2; regulated by phosphorylation and proteolysis	Verified	-----	1,44	-----	ADR384W (<i>Ashbya gossypii</i> , 4E-41)	---	---	GO:0000079 GO:0000082 GO:0007033 GO:0008361 GO:0042144 GO:0042144
YAL042W	-2	0	ERV46	Protein localized to COPII-coated vesicles, forms a complex with Erv41p; involved in the membrane fusion stage of transport	Verified	overlaps dubious ORF YAL043C-A	0,58	-----	ADR389C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-130)	Serologically defined breast cancer antigen NY-BR-84	---	GO:0006888

YAL047C	0	-4	SPC72	Component of the cytoplasmic Tub4p (gamma-tubulin) complex, binds spindle pole bodies and links them to microtubules; has roles in astral microtubule formation and stabilization	Verified	-----	0,85	-----	ADR400W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-14)	-----	---	GO:000022 GO:000070 GO:0007020 GO:0030473 GO:0031578 GO:0031578
YAL059W	2	0	ECM1	Protein of unknown function, localized in the nucleoplasm and the nucleolus, genetically interacts with MTR2 in 60S ribosomal protein subunit export	Verified	-----	0,68	-----	ADR419C (<i>Ashbya gossypii</i> , 3E-21)	-----	---	GO:0007047
YBL007C	-2	-2	SLA1	Cytoskeletal protein binding protein required for assembly of the cortical actin cytoskeleton; interacts with proteins regulating actin dynamics and proteins required for endocytosis; found in the nucleus and cell cortex; has 3 SH3 domains	Verified	-----	0,60	-----	AGR170C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	GRB2-related adaptor protein	---	GO:0000147 GO:0006897 GO:0006897 GO:0007015 GO:0007047 GO:0007121
YBL025W	-4	-2	RRN10	Protein involved in promoting high level transcription of rDNA, subunit of UAF (upstream activation factor) for RNA polymerase I	Verified	-----	0,92	-----	AFR180C (<i>Ashbya gossypii</i> , 6E-29)	-----	---	GO:0006360
YBL027W	0	-2	RPL19B	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit, nearly identical to Rpl19Ap and has similarity to rat L19 ribosomal protein; rpl19a and rpl19b single null mutations result in slow growth, while the double null mutation is lethal	Verified	-----	-----	-----	YBR084C-A (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 5E-59)	60S ribosomal protein L19	---	GO:0006412
YBL051C	-2	0	PIN4	Protein involved in G2/M phase progression and response to DNA damage, interacts with Rad53p; contains an RNA recognition motif, a nuclear localization signal, and several SQ/TQ cluster domains; hyperphosphorylated in response to DNA damage	Verified	-----	0,82	-----	ACR235W (<i>Ashbya gossypii</i> , 3E-88)	-----	---	GO:0000086
YBL058W	-6	-4	SHP1	UBX (ubiquitin regulatory X) domain-containing protein that regulates Glc7p phosphatase activity and interacts with Cdc48p; interacts with ubiquitylated proteins in vivo and is required for degradation of a ubiquitylated model substrate	Verified	-----	1,35	-----	ABR211C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-84)	UBX domain-containing protein 4	---	GO:0000723 GO:0005977 GO:0030437 GO:0043161
YBL079W	-6	-4	NUP170	Abundant subunit of the nuclear pore complex (NPC), required for proper localization of specific nucleoporins within the NPC, involved in nuclear envelope permeability and in chromosome segregation, has similarity to Nup157p	Verified	-----	0,78	-----	AER397C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	Nuclear pore complex protein Nup155 (Nucleoporin Nup155)	---	GO:0000059 GO:0006406 GO:0006407 GO:0006408 GO:0006409 GO:0006607 GO:0006608 GO:0006609 GO:0006610 GO:0006611 GO:0006612 GO:0006999 GO:0007059
YBR021W	-4	2	FUR4	Uracil permease, localized to the plasma membrane; expression is tightly regulated by uracil levels and environmental cues	Verified	-----	0,99	-----	YIR028W (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 1E-261)	-----	---	GO:0015857
YBR036C	-4	0	CSG2	Endoplasmic reticulum membrane protein, required for mannosylation of inositolphosphorylceramide and for growth at high calcium concentrations	Verified	-----	2,02	-----	-----	-----	---	GO:0006888 GO:0006874 GO:0042493
YBR059C	2	0	AKL1	Ser-Thr protein kinase, member (with Ark1p and Prk1p) of the Ark kinase family; involved in endocytosis and actin cytoskeleton organization	Verified	-----	1,16	-----	AGR027C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-131)	AP2 associated kinase 1	---	GO:0030036 GO:0030100
YBR069C	2	2	TAT1	Amino acid transport protein for valine, leucine, isoleucine, and tyrosine, low-affinity tryptophan and histidine transporter; overexpression confers FK506 and FTY720 resistance	Verified	-----	0,36	-----	AGR040C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-177)	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 14	---	GO:0006865 GO:0015827 GO:0015828

YBR078 W	-2	0	ECM33	GPI-anchored protein of unknown function, has a possible role in apical bud growth; GPI-anchoring on the plasma membrane crucial to function; phosphorylated in mitochondria; similar to Sps2p and Pst1p	Verified	-----	-----	-----	YDR055W (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 1E-74)	-----	---	GO:0007047
YBR081C	-4	2	SPT7	Subunit of the SAGA transcriptional regulatory complex, involved in proper assembly of the complex; also present as a C-terminally truncated form in the SLIK/SALSA transcriptional regulatory complex	Verified	-----	0,44	-----	AER172C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	bromodomain containing 7	-----	GO:0000747 GO:0006461 GO:0016568 GO:0016573
YBR098 W	2	0	MMS4	Subunit of the structure-specific Mms4p-Mus81p endonuclease that cleaves branched DNA; involved in recombination and DNA repair	Verified	-----	1,35	-----	ADL318C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-52)	-----	---	GO:0006265 GO:0006281 GO:0006974 GO:0007131
YBR103 W	2	2	SIF2	WD40 repeat-containing subunit of the Set3C histone deacetylase complex, which represses early/middle sporulation genes; antagonizes telomeric silencing; binds specifically to the Sir4p N-terminus	Verified	-----	1,21	-----	ADL322C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-131)	F-box-like/WD-repeat protein TBL1XR1 (Transducin beta-like 1X-linked receptor 1) (Nuclear receptor corepressor/HDAC3 complex subunit TBLR1) (TBL1-related protein 1)	-----	GO:0000122 GO:0006348 GO:0006348 GO:0016575 GO:0016575 GO:0045835
YBR106 W	0	-4	PHO88	Probable membrane protein, involved in phosphate transport; pho88 pho86 double null mutant exhibits enhanced synthesis of repressible acid phosphatase at high inorganic phosphate concentrations	Verified	-----	1,20	-----	ADL332C (<i>Ashbya gossypii</i> , 4E-70)	-----	---	GO:0000723 GO:0006817
YBR119 W	0	-2	MUD1	U1 snRNP A protein, homolog of human U1-A; involved in nuclear mRNA splicing	Verified	-----	-----	-----	ADL371C (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-26)	-----	---	GO:0000398
YBR127C	-4	-4	VMA2	Subunit B of the eight-subunit V1 peripheral membrane domain of the vacuolar H ⁺ -ATPase (V-ATPase), an electrogenic proton pump found throughout the endomembrane system; contains nucleotide binding sites; also detected in the cytoplasm	Verified	-----	0,60	-----	AT1G7603 0.1 (<i>Arabidopsis thaliana</i> , 1E-261)	Vacuolar ATP synthase subunit B, brain isoform (EC 3.6.3.14) (V-ATPase B2 subunit) (Vacuolar proton pump B isoform 2) (Endomembrane proton pump 58 kDa subunit) (HO57)	-----	GO:0006874 GO:0007035
YBR128C	-4	0	ATG14	Subunit of an autophagy-specific phosphatidylinositol 3-kinase complex (with Vps34p, Vps15p, and Vps30p) required for organization of a pre-autophagosomal structure; ATG14 transcription is activated by Gln3p during nitrogen starvation	Verified	-----	1,04	-----	ADL381W (<i>Ashbya gossypii</i> , 5E-14)	-----	---	GO:0006914
YBR164C	-2	0	ARL1	Soluble GTPase with a role in regulation of membrane traffic; regulates potassium influx; G protein of the Ras superfamily, similar to ADP-ribosylation factor	Verified	-----	1,24	-----	AGR221W (<i>Ashbya gossypii</i> , 9E-78)	ADP-ribosylation factor-like protein 1	-----	GO:0006623 GO:0016192 GO:0043001
YBR166C	-2	0	TYR1	Prephenate dehydrogenase involved in tyrosine biosynthesis, expression is dependent on phenylalanine levels	Verified	-----	0,67	-----	AGR219W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-166)	-----	---	GO:0006570
YBR171 W	-2	0	SEC66	Non-essential subunit of Sec63 complex (Sec63p, Sec62p, Sec66p and Sec72p); with Sec61 complex, Kar2p/BiP and Lhs1p forms a channel competent for SRP-dependent and post-translational SRP-independent protein targeting and import into the ER	Verified	-----	0,95	-----	AGR210C (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-63)	-----	---	GO:0030447

YBR173C	-2	0	UMP1	Short-lived chaperone required for correct maturation of the 20S proteasome; may inhibit premature dimerization of proteasome half-mers; degraded by proteasome upon completion of its assembly	Verified	-----	2,24	-----	orf19.3140.1 (<i>Candida albicans</i> , 3E-27)	-----	---	GO:0006511 GO:0006974 GO:0043248	
YBR222C	2	0	PCS60	Peroxisomal AMP-binding protein, localizes to both the peroxisomal peripheral membrane and matrix, expression is highly inducible by oleic acid, similar to <i>E. coli</i> long chain acyl-CoA synthetase	Verified	-----	1,26	-----	AAR168C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	SA hypertension-associated homolog isoform 1	-----	---	GO:0008150
YBR255 W	0	-2	YBR255 W	Protein of unknown function, required for normal growth rate at 15 degrees C; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm in a punctate pattern	Uncharacterized	-----	1,42	> internalization	AGR245C (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-29)	-----	-----	---	GO:0008150
YBR279 W	-4	0	PAF1	RNAP II-associated protein; defines large complex biochemically and functionally distinct from the Srb-Mediator form of Pol II holoenzyme; required for full expression of a subset of cell cycle-regulated genes; homolog of human PD2/hPAF1	Verified	-----	0,50	-----	AEL157W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-76)	Paf1, RNA polymerase II associated factor, homolog	-----	---	GO:0000723 GO:0006310 GO:0006368 GO:0016571
YBR288C	0	-4	APM3	Mu3-like subunit of the clathrin associated protein complex (AP-3); functions in transport of alkaline phosphatase to the vacuole via the alternate pathway	Verified	-----	1,96	-----	AGL061W (<i>Ashbya gossypii</i> , 6E-72)	-----	-----	---	GO:0006896 GO:0016192
YBR289 W	-2	-2	SNF5	Subunit of the SWI/SNF chromatin remodeling complex involved in transcriptional regulation; functions interdependently in transcriptional activation with Snf2p and Snf6p	Verified	-----	0,68	-----	AGL062C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-115)	-----	-----	---	GO:0006302 GO:0006338
YBR290 W	-4	2	BSD2	Heavy metal ion homeostasis protein, facilitates trafficking of Smf1p and Smf2p metal transporters to the vacuole where they are degraded, controls metal ion transport, prevents metal hyperaccumulation, functions in copper detoxification	Verified	-----	1,37	-----	AGL063C (<i>Ashbya gossypii</i> , 3E-81)	-----	-----	---	GO:0006511 GO:0006623 GO:0030001
YBR296C	-2	0	PHO89	Na+/Pi cotransporter, active in early growth phase; similar to phosphate transporters of <i>Neurospora crassa</i> ; transcription regulated by inorganic phosphate concentrations and Pho4p	Verified	-----	6,10	-----	orf19.4599 (<i>Candida albicans</i> , 1E-167)	solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1	-----	---	GO:0006817
YBR298C	-4	0	MAL31	Maltose permease, high-affinity maltose transporter (alpha-glucoside transporter); encoded in the MAL3 complex locus; member of the 12 transmembrane domain superfamily of sugar transporters; functional in genomic reference strain S288C	Verified	-----	0,98	-----	YJR160C (<i>Saccharo myces cerevisiae</i> , 1E-261)	-----	-----	---	GO:0000017
YBR301 W	-2	0	DAN3	Cell wall mannoprotein with similarity to Tir1p, Tir2p, Tir3p, and Tir4p; expressed under anaerobic conditions, completely repressed during aerobic growth	Verified	overlaps dubious ORF YBR300C	0,70	-----	YGR294W (<i>Saccharo myces cerevisiae</i> , 9E-44)	-----	-----	---	GO:0008150
YCL001W -A	-2	0	YCL001 W-A	Putative protein of unknown function; YCL001W-A is not an essential gene	Uncharacterized	-----	-----	-----	YNL001W (<i>Saccharo myces cerevisiae</i> , 5E-7)	-----	-----	---	GO:0008150
YCL005W -A	-4	-6	VMA9	Vacuolar H+ ATPase subunit e of the V-ATPase V0 subcomplex; essential for vacuolar acidification; interacts with the V-ATPase assembly factor Vma21p in the ER; involved in V0 biogenesis	Verified	overlaps dubious ORF YCL007C	-----	-----	AAL005W (<i>Ashbya gossypii</i> , 4E-15)	-----	-----	---	GO:0000032 GO:0006461 GO:0007035

YCL008C	-2	2	STP22	Component of the ESCRT-I complex, which is involved in ubiquitin-dependent sorting of proteins into the endosome; homologous to the mouse and human Tsg101 tumor susceptibility gene; mutants exhibit a Class E Vps phenotype	Verified	-----	1,03	-----	AAL006C (<i>Ashbya gossypii</i> , 9E-41)	Tumor susceptibility gene 101 protein	Breast cancer	GO:0000723 GO:0006612 GO:0006623 GO:0043162
YCL016C	-2	0	DDC1	Subunit of a complex with Ctf8p and Ctf18p that shares some components with Replication Factor C, required for sister chromatid cohesion and telomere length maintenance	Verified	-----	0,87	-----	AAL015W (<i>Ashbya gossypii</i> , 3E-78)	defective in sister chromatid cohesion homolog 1	---	GO:0000723 GO:0006974 GO:0007064
YCL058W-A	2	2	YCL058W-A	Protein of unknown function; identified by homology to <i>Ashbya gossypii</i>	Uncharacterized	overlaps dubious ORF YCL058C	-----	-----	-----	-----	---	GO:0008150
YCR002C	0	-4	CDC10	Component of the septin ring of the mother-bud neck that is required for cytokinesis; septins recruit proteins to the neck and can act as a barrier to diffusion at the membrane, and they comprise the 10nm filaments seen with EM	Verified	-----	0,50	-----	AAR001C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-132)	Septin-9 (MLL septin-like fusion protein) (MLL septin-like fusion protein MSF-A) (Ovarian/Breast septin) (Ov/Br septin) (Septin D1)	Leukemia acute myeloid, therapy-related, Ovarian carcinoma	GO:0000747 GO:0000753 GO:0000902 GO:0000910 GO:0007047 GO:0007120 GO:0007121 GO:0030010 GO:0030476
YCR009C	-4	0	RVS161	Amphiphysin-like lipid raft protein; subunit of a complex (Rvs161p-Rvs167p) that regulates polarization of the actin cytoskeleton, endocytosis, cell polarity, cell fusion and viability following starvation or osmotic stress	Verified	-----	0,94	< internalization	AER193W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-109)	Bridging integrator 3	---	GO:0006897 GO:0006970 GO:0007121
YCR026C	-2	0	NPP1	Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member; mediates extracellular nucleotide phosphate hydrolysis along with Npp2p and Pho5p; activity and expression enhanced during conditions of phosphate starvation	Verified	-----	-----	-----	YEL016C (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 4E-93)	Ectonucleotide dephosphatase/phosphodiesterase 5 precursor (E-NPP5)	---	GO:0006796 GO:0016036
YCR027C	-2	0	RHB1	Putative Rheb-related GTPase involved in regulating canavanine resistance and arginine uptake; member of the Ras superfamily of G-proteins	Verified	-----	0,46	-----	orf19.5994 (<i>Candida albicans</i> , 7E-34)	GTP-binding protein Rheb (Ras homolog enriched in brain)	---	GO:0015809 GO:0015819 GO:0042147
YCR036W	-2	0	RBK1	Putative ribokinase	Verified	-----	1,12	-----	AFR626W (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-82)	Ribokinase (EC 2.7.1.15)	---	GO:0006014
YCR045C	-4	0	YCR045C	Putative protein of unknown function	Uncharacterized	-----	-----	-----	AAR069W (<i>Ashbya gossypii</i> , 4E-86)	Membrane-bound transcription factor site-1 protease precursor (Subtilisin/kexin-isozyme 1, MBTPS1)	Hypercholesterolemia, familial, 3	GO:0008150
YCR048W	-2	0	ARE1	Acyl-CoA:sterol acyltransferase, isozyme of Are2p; endoplasmic reticulum enzyme that contributes the major sterol esterification activity in the absence of oxygen	Verified	overlaps dubious ORF YCR049C	1,06	-----	YNR019W (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 1E-145)	Sterol O-acyltransferase 1	---	GO:0016125
YCR050C	-4	0	YCR050C	Non-essential protein of unknown function; deletion mutant is synthetically sick or lethal with alpha-synuclein	Uncharacterized	-----	1,05	-----	-----	-----	---	GO:0008150
YCR051W	-2	0	YCR051W	Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm and nucleus; contains ankyrin (Ank) repeats; YCR051W is not an essential gene	Uncharacterized	-----	0,86	-----	AAR063C (<i>Ashbya gossypii</i> , 4E-44)	TNKS2 tankyrase-related protein	---	GO:0008150
YCR068W	-2	0	ATG15	Lipase, required for intravacuolar lysis of autophagic bodies; located in the endoplasmic reticulum membrane and targeted to intravacuolar vesicles during autophagy via the multivesicular body (MVB) pathway	Verified	-----	1,14	-----	AAR046C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-138)	---	---	GO:0006624 GO:0006914 GO:0030397

YCR077C	-4	-2	PAT1	Topoisomerase II-associated deadenylation-dependent mRNA-decapping factor; also required for faithful chromosome transmission, maintenance of rDNA locus stability, and protection of mRNA 3'-UTRs from trimming; functionally linked to Pab1p	Verified	-----	0,79	-----	AGL220W (Ashbya gossypii, 1E-158)	ENSGACG0000016448 (no description)	---	GO:0000290 GO:0006446 GO:0007059
YCR079W	-4	0	PTC6	Phosphoprotein phosphatase type 2C similar to mammalian PP1Ks; involved in mitophagy; localized to mitochondrial inner membrane space; null mutant is sensitive to rapamycin	Verified	-----	0,87	-----	AGL223C (Ashbya gossypii, 1E-106)	-----	---	GO:0000422 GO:0016236
YCR081W	-4	2	SRB8	Subunit of the RNA polymerase II mediator complex; associates with core polymerase subunits to form the RNA polymerase II holoenzyme; essential for transcriptional regulation; involved in glucose repression	Verified	-----	1,00	-----	AGL226C (Ashbya gossypii, 1E-261)	-----	---	GO:0000122 GO:0000723
YCR084C	-4	0	TUP1	General repressor of transcription, forms complex with Cyc8p, involved in the establishment of repressive chromatin structure through interactions with histones H3 and H4, appears to enhance expression of some genes	Verified	-----	2,55	-----	AGL234W (Ashbya gossypii, 1E-261)	-----	---	GO:0016481 GO:0016584
YCR087C-A	-2	0	YCR087C-A	Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the nucleolus; YCR087C-A is not an essential gene	Uncharacterized	dubious ORF YCR087W overlaps 5' of gene	-----	-----	AGL236W (Ashbya gossypii, 7E-26)	Cell growth regulating nucleolar protein	---	GO:0008150
YDL005C	-6	0	MED2	Subunit of the RNA polymerase II mediator complex; associates with core polymerase subunits to form the RNA polymerase II holoenzyme; essential for transcriptional regulation	Verified	-----	0,95	-----	AEL009C (Ashbya gossypii, 9E-9)	-----	---	GO:0006366
YDL006W	-2	-2	PTC1	Type 2C protein phosphatase (PP2C); inactivates the osmosensing MAPK cascade by dephosphorylating Hog1p; mutation delays mitochondrial inheritance; deletion reveals defects in precursor tRNA splicing, sporulation and cell separation	Verified	-----	0,80	-----	AEL010W (Ashbya gossypii, 1E-120)	-----	---	GO:0000001 GO:0000173 GO:0000723 GO:0006388 GO:0006470
YDL020C	-4	-2	RPN4	Transcription factor that stimulates expression of proteasome genes; Rpn4p levels are in turn regulated by the 26S proteasome in a negative feedback control mechanism; RPN4 is transcriptionally regulated by various stress responses	Verified	-----	1,07	-----	AER227W (Ashbya gossypii, 7E-22)	-----	---	GO:0000086 GO:0000723 GO:0045732 GO:0045739 GO:0045941 GO:0045941 GO:0046685
YDL047W	-6	2	SIT4	Type 2A-related serine-threonine phosphatase that functions in the G1/S transition of the mitotic cycle; cytoplasmic and nuclear protein that modulates functions mediated by Pkc1p including cell wall and actin cytoskeleton organization	Verified	-----	2,62	-----	ENSP00000238362 (Homo sapiens, 1E-261)	Serine/threonine protein phosphatase 6	---	GO:0000082 GO:0000723 GO:0001302 GO:0006281 GO:0007047 GO:0007243 GO:0016311 GO:0030036 GO:0031929
YDL067C	-4	0	COX9	Subunit VIIa of cytochrome c oxidase, which is the terminal member of the mitochondrial inner membrane electron transport chain	Verified	-----	0,95	-----	AER063W (Ashbya gossypii, 3E-10)	-----	---	GO:0006123
YDL074C	-4	0	BRE1	E3 ubiquitin ligase for Rad6p, required for the ubiquitination of histone H2B, recruitment of Rad6p to promoter chromatin and subsequent methylation of histone H3 (on K4 and K79), contains RING finger domain	Verified	-----	1,22	-----	AER074W (Ashbya gossypii, 1E-121)	-----	---	GO:0000723 GO:0006348 GO:0006513 GO:0016571 GO:0016574 GO:0042493

YDL077C	-4	-2	VAM6	Vacuolar protein that plays a critical role in the tethering steps of vacuolar membrane fusion by facilitating guanine nucleotide exchange on small guanosine triphosphatase Ypt7p	Verified	-----	0,78	-----	AER080W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-153)	-----	---	GO:0000723 GO:0007033 GO:0042144	
YDL081C	-2	0	RPP1A	Ribosomal stalk protein P1 alpha, involved in the interaction between translational elongation factors and the ribosome; accumulation of P1 in the cytoplasm is regulated by phosphorylation and interaction with the P2 stalk component	Verified	-----	0,54	-----	orf19.2992 (<i>Candida albicans</i> , 1E-15)	60S acidic ribosomal protein P1	-----	---	GO:0000723 GO:0006412 GO:0006414
YDL100C	-2	-2	GET3	ATPase, subunit of the GET complex; required for the retrieval of HDDEL proteins from the Golgi to the ER in an ERD2 dependent fashion; involved in resistance to heat and metal stress	Verified	-----	1,10	-----	ADR285W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-145)	Arsenical pump-driving ATPase (EC 3.6.3.16) (Arsenite-translocating ATPase) (Arsenical resistance ATPase) (Arsenite-transporting ATPase) (ARSA) (ASNA-1)	-----	---	GO:0006890 GO:0009408 GO:0010038
YDL116W	0	-2	NUP84	Subunit of the nuclear pore complex (NPC), forms a subcomplex with Nup85p, Nup120p, Nup145p-C, Sec13p, and Seh1p that plays a role in nuclear mRNA export and NPC biogenesis	Verified	-----	1,82	-----	ADL289C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	Nuclear pore complex protein Nup107 (Nucleoporin Nup107)	-----	---	GO:0006259 GO:0006406 GO:0006407 GO:0006408 GO:0006409 GO:0006607 GO:0006608 GO:0006609 GO:0006610 GO:0006611 GO:0006974 GO:0006998 GO:0006999 GO:0050000
YDL160C	-2	0	DHH1	Cytoplasmic DEXD/H-box helicase, stimulates mRNA decapping, coordinates distinct steps in mRNA function and decay, interacts with both the decapping and deadenylation complexes, may have a role in mRNA export and translation	Verified	-----	1,27	-----	orf19.6197 (<i>Candida albicans</i> , 1E-261)	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6 (DEAD box protein 6)	HLR2 oncogene RCK	-----	GO:0000184 GO:0000290
YDL185W	-6	-2	TFP1	Vacuolar ATPase V1 domain subunit A containing the catalytic nucleotide binding sites; protein precursor undergoes self-catalyzed splicing to yield the extein Tfp1p and the intein Vde (PI-SceI), which is a site-specific endonuclease	Verified	-----	0,39	< internalization	Y49A3A.2 (<i>Caenorhabditis elegans</i> , 1E-261)	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A, ubiquitous isoform (EC 3.6.3.14) (V-ATPase A subunit 1) (Vacuolar proton pump alpha subunit 1) (V-ATPase 69 kDa subunit 1) (Isoform VA68)	-----	---	GO:0006314 GO:0007035 GO:0019538
YDL203C	-2	0	YDL203C	Putative protein of unknown function; GFP-fusion protein expression is induced in response to the DNA-damaging agent MMS; the authentic, non-tagged protein is detected in purified mitochondria	Uncharacterized	-----	0,85	-----	ABR200W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-112)	-----	-----	---	GO:0008150
YDR017C	-4	0	KCS1	Inositol hexakisphosphate (IP6) and inositol heptakisphosphate (IP7) kinase; generation of high energy inositol pyrophosphates by Kcs1p is required for many processes such as vacuolar biogenesis, stress response and telomere maintenance	Verified	-----	0,83	-----	AAR184W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-150)	Inositol hexaphosphate kinase 1 (EC 2.7.4.21) (InsP6 kinase 1) (Inositol hexakisphosphate kinase 1)	-----	---	GO:0006950 GO:0007033 GO:0019220 GO:0042493
YDR025W	0	-2	RPS11A	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit; identical to Rps11Bp and has similarity to E. coli S17 and rat S11 ribosomal proteins	Verified	-----	-----	-----	YBR048W (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 9E-74)	40S ribosomal protein S11	-----	---	GO:0000028 GO:0006412 GO:0006450

YDR027C	-2	0	VPS54	Component of the GARP (Golgi-associated retrograde protein) complex, Vps51p-Vps52p-Vps53p-Vps54p, which is required for the recycling of proteins from endosomes to the late Golgi; potentially phosphorylated by Cdc28p	Verified	-----	0,86	-----	ABL093W (Ashbya gossypii, 1E-142)	-----	---	GO:0000723 GO:0006896 GO:0042147	
YDR069C	-6	2	DOA4	Ubiquitin isopeptidase, required for recycling ubiquitin from proteasome-bound ubiquitinated intermediates, acts at the late endosome/prevacuolar compartment to recover ubiquitin from ubiquitinated membrane proteins en route to the vacuole	Verified	-----	0,86	< internalization	AFR007W (Ashbya gossypii, 1E-261)	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8 (EC 3.1.2.15) (Ubiquitin thiolesterase 8) (Ubiquitin-specific processing protease 8) (Deubiquitinating enzyme 8) (hUBPy)	-----	---	GO:0000723 GO:0006275 GO:0006511 GO:0006897 GO:0016579 GO:0043162
YDR080 W	-4	-4	VPS41	Vacuolar membrane protein that is a subunit of the homotypic vacuole fusion and vacuole protein sorting (HOPS) complex; essential for membrane docking and fusion at the Golgi-to-endosome and endosome-to-vacuole stages of protein transport	Verified	-----	1,61	< internalization	AGR149W (Ashbya gossypii, 1E-261)	Vacuolar assembly protein VPS41 homolog (S53)	-----	---	GO:0006624 GO:0007033 GO:0015031 GO:0042144
YDR089 W	2	2	YDR089 W	Protein of unknown function; deletion confers resistance to Nickel	Uncharacterized	-----	0,78	-----	AGR160W (Ashbya gossypii, 1E-97)	-----	---	GO:0016044	
YDR129C	-2	-2	SAC6	Fimbrin, actin-bundling protein; cooperates with Scp1p (calponin/transgelin) in the organization and maintenance of the actin cytoskeleton	Verified	-----	-----	< internalization	orf19.5544 (Candida albicans, 1E-261)	T-plastin (Plastin-3)	-----	---	GO:0006897 GO:0006970 GO:0007015 GO:0007121
YDR135C	-6	0	YCF1	Vacuolar glutathione S-conjugate transporter of the ATP-binding cassette family; has a role in detoxifying metals such as cadmium, mercury, and arsenite; also transports unconjugated bilirubin; similar to human cystic fibrosis protein CFTR	Verified	-----	-----	-----	SPAC3F10.11c (Schizosaccharomyces pombe, 1E-261)	Multidrug resistance-associated protein 1 (ATP-binding cassette sub-family C member 1)	Pseudoxanthoma elasticum, forme fruste pseudoxanthoma elasticum, autosomal dominant	-----	GO:0010038 GO:0015723 GO:0042493
YDR137 W	-4	0	RGP1	Subunit of a Golgi membrane exchange factor (Ric1p-Rgp1p) that catalyzes nucleotide exchange on Ypt6p	Verified	dubious ORF YDR136C overlaps 5' of gene	0,77	-----	AGL179C (Ashbya gossypii, 7E-71)	-----	---	GO:0042147	
YDR140 W	-2	0	MTQ2	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase of the seven beta-strand family; methylates release factor eRF1 (Sup45p) in vitro; is not an essential gene; similar to E.coli PmC	Verified	-----	1,31	< internalization	AGL186C (Ashbya gossypii, 8E-62)	Putative N6-DNA-methyltransferase (M.HsaHemK2P)	-----	---	GO:0018364
YDR159 W	0	-2	SAC3	Nuclear pore-associated protein, forms a complex with Thp1p that is involved in transcription and in mRNA export from the nucleus	Verified	-----	1,66	-----	AGL173W (Ashbya gossypii, 1E-261)	SAC3 domain containing 1	-----	---	GO:0006283 GO:0006406 GO:0006611 GO:0007067 GO:0030029
YDR174 W	-2	0	HMO1	Chromatin associated high mobility group (HMG) family member involved in genome maintenance, rDNA-binding component of the Pol I transcription system; associates with a 5'-3' DNA helicase and Fpr1p, a prolyl isomerase	Verified	-----	1,06	-----	AGL141W (Ashbya gossypii, 3E-58)	-----	-----	-----	GO:0000723 GO:0006276 GO:0006356 GO:0006357 GO:0006366
YDR176 W	-2	0	NGG1	Transcriptional regulator involved in glucose repression of Gal4p-regulated genes; component of transcriptional adaptor and histone acetyltransferase complexes, the ADA complex, the SAGA complex, and the SLIK complex	Verified	-----	0,90	-----	AGL139W (Ashbya gossypii, 1E-142)	-----	-----	-----	GO:0016568 GO:0016573 GO:0042493
YDR195 W	-6	0	REF2	RNA-binding protein involved in the cleavage step of mRNA 3'-end formation prior to polyadenylation, and in snoRNA maturation; part of holo-CPF subcomplex APT, which associates with 3'-ends of snoRNA- and mRNA-encoding genes	Verified	-----	0,58	-----	AGL111W (Ashbya gossypii, 1E-52)	-----	-----	-----	GO:0000723 GO:0006397 GO:0030846 GO:0030847 GO:0031126

YDR207C	-2	-2	UME6	Key transcriptional regulator of early meiotic genes, binds URS1 upstream regulatory sequence, couples metabolic responses to nutritional cues with initiation and progression of meiosis, forms complex with Ime1p, and also with Sin3p-Rpd3p	Verified	-----	0,97	-----	AGL099C (<i>Ashbya gossypii</i> , 4E-11)	-----	---	GO:0007068 GO:0007131 GO:0016575 GO:0030437 GO:0042493 GO:0045836 GO:0051276	
YDR264C	-4	0	AKR1	Palmitoyl transferase involved in protein palmitoylation; acts as a negative regulator of pheromone response pathway; required for endocytosis of pheromone receptors; involved in cell shape control; contains ankyrin repeats	Verified	-----	2,37	-----	AER388C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	Huntingtin-interacting protein 14 (Zinc finger DHHC domain containing protein 17) (Huntingtin-interacting protein 3) (Huntingtin-interacting protein HYPH) (Putative NF-kappa-B-activating protein 205) (Putative MAPK-activating protein PM11)	-----	---	GO:0000750 GO:0006612 GO:0006897 GO:0018318
YDR270W	0	-4	CCC2	Cu(+2)-transporting P-type ATPase, required for export of copper from the cytosol into an extracytosolic compartment; has similarity to human proteins involved in Menkes and Wilsons diseases	Verified	dubious ORF YDR269C overlaps 3' of gene	1,36	-----	orf19.4328 (<i>Candida albicans</i> , 1E-164)	Copper-transporting ATPase 2 (EC 3.6.3.4) (Copper pump 2) (Wilson disease-associated protein)	Wilson disease	GO:0006879 GO:0015680	
YDR289C	0	-2	RTT103	Protein that interacts with exonuclease Rat1p and Rai1p and plays a role in transcription termination by RNA polymerase II, has an RPR domain (carboxy-terminal domain interacting domain); also involved in regulation of Ty1 transposition	Verified	dubious ORF YDR290W overlaps 5' of gene	0,55	-----	AAL081C (<i>Ashbya gossypii</i> , 9E-51)	Uncharacterized protein C20orf77	-----	---	GO:0000335 GO:0030846
YDR300C	0	2	PRO1	Gamma-glutamyl kinase, catalyzes the first step in proline biosynthesis	Verified	-----	0,54	-----	AAL061C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-159)	-----	-----	GO:0000723 GO:0006561 GO:0042254	
YDR317W	-2	0	HIM1	Protein of unknown function involved in DNA repair	Verified	-----	2,01	< internalization	AGR348W (<i>Ashbya gossypii</i> , 6E-31)	-----	-----	GO:0006281	
YDR323C	-4	0	PEP7	Multivalent adaptor protein that facilitates vesicle-mediated vacuolar protein sorting by ensuring high-fidelity vesicle docking and fusion, which are essential for targeting of vesicles to the endosome; required for vacuole inheritance	Verified	-----	0,56	-----	AGR365C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-113)	FYVE-finger-containing Rab5 effector protein rabenosyn-5	-----	---	GO:0006896 GO:0006904 GO:0006906
YDR363W	-4	0	ESC2	Protein involved in mating-type locus silencing, interacts with Sir2p; probably functions to recruit or stabilize Sir proteins	Verified	-----	1,59	-----	AER251W (<i>Ashbya gossypii</i> , 3E-26)	-----	-----	GO:0030466	
YDR369C	-4	0	XRS2	Protein required for DNA repair; component of the Mre11 complex, which is involved in double strand breaks, meiotic recombination, telomere maintenance, and checkpoint signaling	Verified	-----	1,21	-----	AER402C (<i>Ashbya gossypii</i> , 3E-20)	-----	-----	GO:0000723 GO:0000727 GO:0006303 GO:0030435 GO:0042138	
YDR388W	-2	0	RVS167	Actin-associated protein, subunit of a complex (Rvs161p-Rvs167p) involved in regulation of actin cytoskeleton, endocytosis, and viability following starvation or osmotic stress; homolog of mammalian amphiphysin	Verified	-----	0,73	< internalization	orf19.1220 (<i>Candida albicans</i> , 1E-120)	-----	-----	---	GO:0006897 GO:0006970 GO:0007121 GO:0016192
YDR418W	0	-2	RPL12B	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit, nearly identical to Rpl12Ap; rpl12a rpl12b double mutant exhibits slow growth and slow translation; has similarity to E. coli L11 and rat L12 ribosomal proteins	Verified	-----	0,36	-----	YEL054C (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 2E-66)	60S ribosomal protein L12	-----	---	GO:0000027 GO:0000723 GO:0006412

YDR423C	-2	0	CAD1	AP-1-like bZIP transcriptional activator involved in stress responses, iron metabolism, and pleiotropic drug resistance; controls a set of genes involved in stabilizing proteins; binds consensus sequence TTAATA; 5' UTR contains uORFs	Verified	-----	1,19	-----	YML007W (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 0.009)	-----	---	GO:0045944 GO:0046686
YDR432W	-4	-2	NPL3	RNA-binding protein that carries poly(A) ⁺ mRNA from the nucleus into the cytoplasm; dissociation from mRNAs is promoted by Mtr10p; phosphorylated by Sky1p in the cytoplasm	Verified	dubious ORF YDR433W overlaps 3' of gene	0,83	-----	ADR183C (<i>Ashbya gossypii</i> , 9E-45)	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R (hnRNP R)	-----	GO:0006406 GO:0007124
YDR448W	-2	0	ADA2	Transcription coactivator, component of the ADA and SAGA transcriptional adaptor/HAT (histone acetyltransferase) complexes	Verified	-----	0,65	-----	AER318C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	Transcriptional adaptor 2-like (ADA2-like protein)	-----	GO:0016568 GO:0016573
YDR456W	-2	2	NHX1	Endosomal Na ⁺ /H ⁺ exchanger, required for intracellular sequestration of Na ⁺ ; required for osmotolerance to acute hypertonic shock	Verified	-----	0,90	-----	AER308C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	Sodium/hydrogen exchanger 6 (Na ⁺ /H ⁺ exchanger 6) (NHE-6) (Solute carrier family 9 member 6)	-----	GO:0007035 GO:0015672 GO:0016197 GO:0030004 GO:0006348 GO:0016571
YDR469W	-2	0	SDC1	Subunit of the COMPASS (Set1C) complex, which methylates histone H3 on lysine 4 and is required in transcriptional silencing near telomeres; has similarity to <i>C. elegans</i> Dpy-30	Verified	-----	0,98	-----	AFR374C (<i>Ashbya gossypii</i> , 8E-11)	-----	-----	---
YDR486C	0	2	VPS60	Cytoplasmic and vacuolar membrane protein involved in late endosome to vacuole transport; required for normal filament maturation during pseudohyphal growth; may function in targeting specific cargo proteins for degradation	Verified	-----	1,36	-----	ADR116C (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-39)	Charged multivesicular body protein 5 (Chromatin modifying protein 5) (Vacuolar protein sorting 60) (Vps60) (hVps60) (SNF7 domain-containing protein 2)	-----	GO:0030447 GO:0042493 GO:0045324
YDR495C	-4	0	VPS3	Component of CORVET tethering complex; cytoplasmic protein required for the sorting and processing of soluble vacuolar proteins, acidification of the vacuolar lumen, and assembly of the vacuolar H ⁺ -ATPase	Verified	-----	0,77	-----	AFR341C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-111)	-----	-----	GO:0000011 GO:0000723 GO:0006623 GO:0007035
YDR500C	-4	0	RPL37B	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit, has similarity to Rpl37Ap and to rat L37 ribosomal protein	Verified	-----	-----	-----	orf19.667.1 (<i>Candida albicans</i> , 7E-23)	60S ribosomal protein L37 (G1.16)	-----	GO:0006412
YEL003W	0	2	GIM4	Subunit of the heterohexameric cochaperone prefoldin complex which binds specifically to cytosolic chaperonin and transfers target proteins to it	Verified	-----	0,82	-----	ADL004W (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-30)	Prefoldin subunit 2	-----	GO:0007021
YEL027W	-4	-4	CUP5	Proteolipid subunit of the vacuolar H ⁺ -ATPase V0 sector (subunit c; dicyclohexylcarbodiimide binding subunit); required for vacuolar acidification and important for copper and iron metal ion homeostasis	Verified	-----	0,68	< internalization	AEL074W (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-47)	Vacuolar ATP synthase 16 kDa proteolipid subunit (EC 3.6.3.14)	-----	GO:0006623 GO:0006878 GO:0006879 GO:0006897 GO:0007033 GO:0007035 GO:0015992
YEL046C	-2	0	GLY1	Threonine aldolase, catalyzes the cleavage of L-allo-threonine and L-threonine to glycine; involved in glycine biosynthesis	Verified	dubious ORF YEL045C upstream to gene	1,03	-----	AFR366W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-177)	ENSP0000331953 (no description)	-----	GO:0006545 GO:0006567
YEL051W	-4	-2	VMA8	Subunit D of the eight-subunit V1 peripheral membrane domain of the vacuolar H ⁺ -ATPase (V-ATPase), an electrogenic proton pump found throughout the endomembrane system; plays a role in the coupling of proton transport and ATP hydrolysis	Verified	-----	0,84	< internalization	AAR130C (<i>Ashbya gossypii</i> , 5E-92)	Vacuolar ATP synthase subunit D (EC 3.6.3.14) (V-ATPase D subunit) (Vacuolar proton pump D subunit)	-----	GO:0007035

YER072W	0	2	VTC1	Vacuolar transporter chaperon (VTC) involved in distributing V-ATPase and other membrane proteins; together with other VTC proteins, forms a heterotetrameric complex that associates with the SNARE Nyv1p and the V0 sector of the V-ATPase	Verified	-----	2,05	< internalization	SPBC21B1 0.04c (<i>Schizosaccharomyces pombe</i> , 3E-41)	-----	---	GO:0007034 GO:0016237 GO:0042144
YER083C	-4	0	GET2	Subunit of the GET complex; required for meiotic nuclear division and for the retrieval of HDEL proteins from the Golgi to the ER in an ERD2 dependent fashion; may be involved in cell wall function	Verified	-----	23,81	-----	ACL036W (<i>Ashbya gossypii</i> , 4E-26)	-----	---	GO:0006890 GO:0007047
YER111C	-2	0	SWI4	DNA binding component of the SBF complex (Swi4p-Swi6p), a transcriptional activator that in concert with MBF (Mbp1-Swi6p) regulates late G1-specific transcription of targets including cyclins and genes required for DNA synthesis and repair	Verified	-----	0,80	-----	AGL297C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-124)	-----	---	GO:0000082 GO:0006350
YER117W	-2	0	RPL23B	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit, identical to Rpl23Ap and has similarity to E. coli L14 and rat L23 ribosomal proteins	Verified	-----	-----	-----	YER117W (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 5E-65)	60S ribosomal protein L23 (Ribosomal protein L17)	---	GO:0006412 GO:0042493
YER123W	0	-4	YCK3	Palmitoylated, vacuolar membrane-localized casein kinase I isoform; negatively regulates vacuole fusion during hypertonic stress via phosphorylation of the HOPS complex subunit, Vps41p; shares overlapping essential functions with Hrr25p	Verified	-----	1,08	-----	ADL053C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-159)	Casein kinase I, gamma 3 isoform (CKI-gamma 3)	---	GO:0006468
YER145C	-4	-4	FTR1	High affinity iron permease involved in the transport of iron across the plasma membrane; forms complex with Fet3p; expression is regulated by iron	Verified	-----	-----	-----	AGR129C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-118)	-----	---	GO:0006827 GO:0033215
YER151C	-2	-2	UBP3	Ubiquitin-specific protease that interacts with Bre5p to co-regulate anterograde and retrograde transport between endoplasmic reticulum and Golgi compartments; inhibitor of gene silencing; cleaves ubiquitin fusions but not polyubiquitin	Verified	-----	-----	-----	AGR139C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-142)	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10 (EC 3.1.2.15) (Ubiquitin thiolesterase 10) (Ubiquitin-specific processing protease 10) (Deubiquitinating enzyme 10)	---	GO:0016579 GO:0042493
YER155C	-4	0	BEM2	Rho GTPase activating protein (RhoGAP) involved in the control of cytoskeleton organization and cellular morphogenesis; required for bud emergence	Verified	-----	-----	-----	AGR144C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	ARHGAP15	---	GO:0000226 GO:0007047 GO:0007117 GO:0007264 GO:0030010 GO:0030036
YER164W	-2	0	CHD1	Nucleosome remodeling factor that functions in regulation of transcription elongation; contains a chromo domain, a helicase domain and a DNA-binding domain; component of both the SAGA and SILK complexes	Verified	-----	1,61	-----	SPAC3G6.01 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i> , 1E-261)	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1 (CHD-1)	---	GO:0006338
YFL018C	-2	2	LPD1	Dihydrolipoamide dehydrogenase, the lipoamide dehydrogenase component (E3) of the pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase multi-enzyme complexes	Verified	-----	1,04	-----	ENSP0000 0205402 (<i>Homo sapiens</i> , 1E-261)	Dihydrolipoamide dehydrogenase, mitochondrial precursor (EC 1.8.1.4) (Dihydrolipoamide dehydrogenase) (Glycine cleavage system L protein)	Leigh syndrome, Maple syrup urine disease, type III	GO:0006086 GO:0006546 GO:0006550 GO:0006552 GO:0006564 GO:0006574
YFL031W	-2	0	HAC1	bZIP transcription factor (ATF/CREB1 homolog) that regulates the unfolded protein response, via UPRE binding, and membrane biogenesis; ER stress-induced splicing pathway utilizing Ire1p, Trif1p and Ada5p facilitates efficient	Verified	-----	1,17	-----	ACR216C (<i>Ashbya gossypii</i> , 8E-10)	-----	---	GO:0006357 GO:0006644 GO:0006990 GO:0030968 GO:0045893

				Hac1p synthesis									
YFR010W	-2	0	UBP6	Ubiquitin-specific protease situated in the base subcomplex of the 26S proteasome, releases free ubiquitin from branched polyubiquitin chains; deletion causes hypersensitivity to cycloheximide and other toxic compounds	Verified	-----	1,01	-----	AEL029W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-144)	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14 (EC 3.1.2.15) (Ubiquitin thiolesterase 14) (Ubiquitin-specific processing protease 14) (Deubiquitinating enzyme 14)	---	GO:0016579	
YFR019W	-4	-6	FAB1	1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase; vacuolar membrane kinase that generates phosphatidylinositol (3,5)P ₂ , which is involved in vacuolar sorting and homeostasis	Verified	-----	-----	-----	SPBC3E7.01 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i> , 1E-261)	FYVE finger-containing phosphoinositide kinase (EC 2.7.1.68) (1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase) (PIP5K) (PtdIns(4)P-5-kinase) (Plkfyve) (p235)	---	GO:0000433 GO:0006644 GO:0006896 GO:0007033 GO:0045324	
YFR036W	-6	0	CDC26	Subunit of the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome (APC/C), which is a ubiquitin-protein ligase required for degradation of anaphase inhibitors, including mitotic cyclins, during the metaphase/anaphase transition	Verified	-----	1,79	-----	-----	-----	---	GO:0000022 GO:0000070 GO:0007091 GO:0008054 GO:0016567 GO:0031145	
YFR038W	2	0	YFR038W	Putative ATPase containing the DEAD/H helicase-related sequence motif; null mutant displays increased levels of spontaneous Rad52 foci	Uncharacterized	-----	1,30	-----	ADL098C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	Helicase, lymphoid-specific	Helicase, lymphoid-specific	GO:0008150	
YGL016W	2	0	KAP122	Karyophem beta, responsible for import of the Toa1p-Toa2p complex into the nucleus; binds to nucleoporins Nup1p and Nup2p; may play a role in regulation of pleiotropic drug resistance	Verified	-----	0,61	-----	AGR166W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-150)	-----	---	GO:0006606 GO:0008361 GO:0042493	
YGL025C	-2	0	PGD1	Subunit of the RNA polymerase II mediator complex; associates with core polymerase subunits to form the RNA polymerase II holoenzyme; essential for basal and activated transcription; direct target of Cyc8p-Tup1p transcriptional corepressor	Verified	dubious ORF YGL024W overlaps 5' of gene	2,18	-----	AFR486C (<i>Ashbya gossypii</i> , 0.007)	-----	---	GO:0000723 GO:0006366 GO:0042493	
YGL045W	2	2	RIM8	Protein of unknown function, involved in the proteolytic activation of Rim101p in response to alkaline pH; has similarity to <i>A. nidulans</i> PalF	Verified	-----	1,15	-----	AFR108W (<i>Ashbya gossypii</i> , 3E-81)	-----	---	GO:0001403 GO:0007126 GO:0016485	
YGL058W	-2	0	RAD6	Ubiquitin-conjugating enzyme (E2), involved in postreplication repair (with Rad18p), sporulation, telomere silencing, and ubiquitin-mediated N-end rule protein degradation (with Ubr1p)	Verified	-----	1,17	-----	AAR156C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-76)	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 B (EC 6.3.2.19) (Ubiquitin-protein ligase B) (Ubiquitin carrier protein B) (HR6B) (hHR6B) (E2-17 kDa)	Male infertility	GO:0000723 GO:0006281 GO:0006301 GO:0006511 GO:0006513 GO:0016574	
YGL070C	0	-2	RPB9	RNA polymerase II subunit B12.6; contacts DNA; mutations affect transcription start site; involved in telomere maintenance	Verified	-----	0,75	-----	AFI088W (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-53)	DNA-directed RNA polymerase II 14.5 kDa polypeptide (EC 2.7.7.6) (RPB9) (RPB14.5)	---	GO:0000723 GO:0006283 GO:0006366 GO:0006974 GO:0042493	

YGL071W	-6	-6	AFT1	Transcription factor involved in iron utilization and homeostasis; binds the consensus site PyPuCACCCPu and activates the expression of target genes in response to changes in iron availability	Verified	-----	-----	< internalization	AFL087C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-52)	-----	---	GO:0006827 GO:0045944	
YGL095C	-4	0	VPS45	Protein of the Sec1p/Munc-18 family, essential for vacuolar protein sorting; required for the function of Pep12p and the early endosome/late Golgi SNARE Tlg2p; essential for fusion of Golgi-derived vesicles with the prevacuolar compartment	Verified	-----	1,83	> internalization	AFL053W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-161)	Vacuolar protein sorting-associated protein 45 (hVPS45)	-----	---	GO:0006461 GO:0006896 GO:0007033
YGL148W	-2	2	ARO2	Bifunctional chorismate synthase and flavin reductase; catalyzes the conversion of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate (EPSP) to form chorismate, which is a precursor to aromatic amino acids	Verified	-----	0,57	-----	ADL287C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	-----	-----	---	GO:0009073
YGL168W	-2	-2	HUR1	Protein required for hydroxyurea resistance; has possible roles in DNA replication and maintenance of proper telomere length	Verified	-----	0,69	-----	-----	-----	-----	---	GO:0000723 GO:0006260
YGL173C	-4	-2	KEM1	Evolutionarily-conserved 5'-3' exonuclease component of cytoplasmic processing (P) bodies involved in mRNA decay; plays a role in microtubule-mediated processes, filamentous growth, ribosomal RNA maturation, and telomere maintenance	Verified	-----	1,26	-----	Y39G8C.1 (<i>Caenorhabditis elegans</i> , 1E-261)	5'-3' exonuclease 1	-----	---	GO:0000723 GO:0000742 GO:0006364 GO:0006402 GO:0007089 GO:0030447 GO:0043330
YGL212W	-4	-4	VAM7	Component of the vacuole SNARE complex involved in vacuolar morphogenesis; SNAP-25 homolog; functions with a syntaxin homolog Vam3p in vacuolar protein trafficking	Verified	-----	0,91	-----	AER438C (<i>Ashbya gossypii</i> , 4E-21)	-----	-----	---	GO:0000723 GO:0006896 GO:0006906 GO:0042144
YGL244W	-4	-4	RTF1	Subunit of the RNA polymerase II-associated Paf1 complex; directly or indirectly regulates DNA-binding properties of Spt15p and relative activities of different TATA elements; involved in telomere maintenance	Verified	-----	0,88	-----	AFR266W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-123)	RNA polymerase-associated protein RTF1 homolog	-----	---	GO:0000723 GO:0006366 GO:0006368 GO:0010390 GO:0016571
YGR020C	-4	-4	VMA7	Subunit F of the eight-subunit V1 peripheral membrane domain of vacuolar H ⁺ -ATPase (V-ATPase), an electrogenic proton pump found throughout the endomembrane system; required for the V1 domain to assemble onto the vacuolar membrane	Verified	-----	1,03	< internalization	AGL052W (<i>Ashbya gossypii</i> , 5E-43)	Vacuolar ATP synthase subunit F (EC 3.6.3.14) (V-ATPase F subunit) (Vacuolar proton pump F subunit) (V-ATPase 14 kDa subunit)	-----	---	GO:0007035
YGR089W	-2	2	NNF2	Protein that exhibits physical and genetic interactions with Rpb8p, which is a subunit of RNA polymerases I, II, and III; computational analysis of large-scale protein-protein interaction data suggests a role in chromosome segregation	Verified	-----	0,74	-----	ADR028W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-63)	-----	-----	---	GO:0007059
YGR092W	-4	-4	DBF2	Ser/Thr kinase involved in transcription and stress response; functions as part of a network of genes in exit from mitosis; localization is cell cycle regulated; activated by Cdc15p during the exit from mitosis	Verified	-----	1,19	-----	ADR033W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	-----	-----	---	GO:0000280 GO:0006468
YGR105W	-4	-4	VMA21	Integral membrane protein that is required for vacuolar H ⁺ -ATPase (V-ATPase) function, although not an actual component of the V-ATPase complex; functions in the assembly of the V-ATPase; localized to the yeast endoplasmic reticulum (ER)	Verified	-----	0,98	< internalization	orf19.4090.1 (<i>Candida albicans</i> , 1E-12)	-----	-----	---	GO:0006461

YGR122 W	2	0	YGR122 W	Putative protein of unknown function; deletion mutants do not properly process Rim101p and have decreased resistance to rapamycin; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm	Uncharacterized	-----	0,71	< internalization	<i>AAR081C</i> (<i>Ashbya gossypii</i> , 0.00000000000005)	-----	---	GO:0000122		
YGR135 W	2	0	PRE9	20S proteasome beta-type subunit; the only nonessential 20S subunit	Verified	-----	0,91	-----	<i>AFR318W</i> (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-109)	Proteasome subunit alpha type 4 (EC 3.4.25.1) (Proteasome component C9) (Macropain subunit C9) (Multicatalytic endopeptidase complex subunit C9) (Proteasome subunit L)	-----	---	GO:0006511 GO:0030447	
YGR155 W	-6	-2	CYS4	Cystathionine beta-synthase, catalyzes the synthesis of cystathionine from serine and homocysteine, the first committed step in cysteine biosynthesis	Verified	-----	1,89	-----	<i>AGR012C</i> (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	Cystathionine beta-synthase (EC 4.2.1.22) (Serine sulphydrase) (Beta-thionase)	Homocystinuria, B6-responsive and nonresponsive types, Thrombosis, hyperhomocysteinemic	-----	---	GO:0019344 GO:0042493
YGR167 W	-4	-2	CLC1	Clathrin light chain, subunit of the major coat protein involved in intracellular protein transport and endocytosis; thought to regulate clathrin function, two Clathrin heavy chains (CHC1) form the clathrin triskelion structural component	Verified	-----	1,03	< internalization	<i>AGR309C</i> (<i>Ashbya gossypii</i> , 8E-23)	-----	-----	---	GO:0006897 GO:0016192	
YGR206 W	-2	2	MVB12	ESCRT-I subunit necessary for the efficient transport of cargo proteins to the vacuolar lumen; deletion mutant sensitive to rapamycin and nystatin; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to endosome	Verified	-----	1,15	< internalization	<i>ACL128C</i> (<i>Ashbya gossypii</i> , 5E-7)	-----	-----	---	GO:0006623	
YGR252 W	-4	0	GCN5	Histone acetyltransferase, acetylates N-terminal lysines on histones H2B and H3; catalytic subunit of the ADA and SAGA histone acetyltransferase complexes; founding member of the Gcn5p-related N-acetyltransferase superfamily	Verified	-----	0,81	-----	<i>AER297C</i> (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	Histone acetyltransferase PCAF (EC 2.3.1.48) (P300/CBP-associated factor) (P/CAF) (Histone acetylase PCAF)	-----	---	GO:0016568 GO:0016573	
YGR260 W	-4	2	TNA1	High affinity nicotinic acid plasma membrane permease, responsible for uptake of low levels of nicotinic acid; expression of the gene increases in the absence of extracellular nicotinic acid or para-aminobenzoate (PABA)	Verified	-----	0,69	-----	<i>ADR330W</i> (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-178)	-----	-----	---	GO:0015890	
YGR261C	0	-2	APL6	Beta3-like subunit of the yeast AP-3 complex; functions in transport of alkaline phosphatase to the vacuole via the alternate pathway; exists in both cytosolic and peripherally associated membrane-bound pools	Verified	-----	0,51	-----	<i>ADR335C</i> (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-162)	Adapter-related protein complex 3 beta 1 subunit (Beta3A-adaptin) (Adaptor protein complex AP-3 beta-1 subunit) (AP-3 complex beta-1 subunit) (Clathrin assembly protein complex 3 beta-1 large chain)	Hermansky-Pudlak syndrome	-----	---	GO:0006896 GO:0016192
YHL011C	-4	0	PRS3	5-phospho-ribosyl-1(alpha)-pyrophosphatase, involved in nucleotide, histidine, and tryptophan biosynthesis; one of five related enzymes, which are active as heteromultimeric complexes	Verified	-----	0,57	-----	<i>ENSP0000218027</i> (<i>Homo sapiens</i> , 1E-261)	-----	-----	---	GO:0000105 GO:0000162 GO:0000723 GO:0006166 GO:0006189 GO:0006207 GO:0008361 GO:0042254	

YHL019C	-2	0	APM2	Protein of unknown function, homologous to the mammalian clathrin-associated protein complex; involved in vesicular transport	Verified	-----	0,89	-----	ABR047W (<i>Ashbya gossypii</i> , 6E-99)	-----	---	GO:0006896 GO:0016192
YHL023C	-4	0	RMD11	Protein required for sporulation	Verified	-----	0,59	-----	AGL039W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-136)	-----	---	GO:0008150
YHL027W	2	2	RIM101	Transcriptional repressor involved in response to pH and in cell wall construction; required for alkaline pH-stimulated haploid invasive growth and sporulation; activated by proteolytic processing; similar to <i>A. nidulans</i> PacC	Verified	-----	1,33	-----	AFR190C (<i>Ashbya gossypii</i> , 9E-40)	Core promoter element-binding protein (Krüppel-like factor 6) (B-cell derived protein 1) (Proto-oncogene BCD1) (Transcription factor ZF9) (GC-rich sites binding factor GBF)	-----	GO:0000122 GO:0007126 GO:0009268 GO:0009272 GO:0030437
YHR008C	-2	0	SOD2	Mitochondrial superoxide dismutase, protects cells against oxygen toxicity; phosphorylated	Verified	-----	4,96	-----	orf19_3340 (<i>Candida albicans</i> , 3E-71)	Superoxide dismutase [Mn], mitochondria I precursor (EC 1.15.1.1)	-----	GO:0001302 GO:0001320 GO:0001324 GO:0006800
YHR012W	-2	2	VPS29	Endosomal protein that is a subunit of the membrane-associated retromer complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport; forms a subcomplex with Vps35p and Vps26p that selects cargo proteins for endosome-to-Golgi retrieval	Verified	-----	0,93	-----	AFR411C (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-77)	Vacuolar protein sorting 29 (Vesicle protein sorting 29) (hVPS29)	-----	GO:0042147
YHR013C	-4	0	ARD1	Subunit of the N-terminal acetyltransferase NatA (Nat1p, Ard1p, Nat5p); N-terminally acetylates many proteins, which influences multiple processes such as the cell cycle, heat-shock resistance, mating, sporulation, and telomeric silencing	Verified	-----	1,20	-----	AFR409W (<i>Ashbya gossypii</i> , 5E-71)	N-terminal acetyltransferase complex ARD1 subunit homolog (EC 2.3.1.88) (EC 2.3.1.-)	-----	GO:0000723 GO:0006474 GO:0016573
YHR021C	-4	0	RPS27B	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit; nearly identical to Rps27Ap and has similarity to rat S27 ribosomal protein	Verified	-----	0,49	-----	YKL156W (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 2E-33)	Ribosomal protein S27 (Metalloprotein 1) (RPS27) pseudogene	-----	GO:0000723 GO:0006412
YHR026W	0	-2	PPA1	Subunit c ⁺ of the vacuolar ATPase, which functions in acidification of the vacuole; one of three proteolipid subunits of the V0 domain	Verified	-----	0,87	-----	ACR071W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-49)	Vacuolar ATP synthase 21 kDa proteolipid subunit (EC 3.6.3.14) (HATPL)	-----	GO:0007035 GO:0042493
YHR030C	-2	-2	SLT2	Serine/threonine MAP kinase involved in regulating the maintenance of cell wall integrity and progression through the cell cycle; regulated by the PKC1-mediated signaling pathway	Verified	-----	0,71	-----	AER232C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	Mitogen-activated protein kinase 7 (EC 2.7.1.37) (Extracellular signal-regulated kinase 5) (ERK-5) (ERK4) (BMK1 kinase)	-----	GO:0001101 GO:0006468 GO:0007047 GO:0007165 GO:0008361 GO:0030968
YHR039C-A	-2	-4	VMA10	Vacuolar H ⁺ ATPase subunit G of the catalytic (V1) sector, involved in vacuolar acidification	Verified	-----	-----	-----	AAL076W (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-15)	Vacuolar ATP synthase subunit G 1 (EC 3.6.3.14) (V-ATPase G subunit 1) (Vacuolar proton pump G subunit 1) (V-ATPase 13 kDa subunit 1) (Vacuolar ATP synthase subunit M16)	-----	GO:0005977 GO:0007035
YHR050W	2	0	SMF2	Divalent metal ion transporter involved in manganese homeostasis; has broad specificity for di-valent and tri-valent metals; post-translationally regulated by levels of metal ions; member of the Nramp family of metal transport proteins	Verified	-----	1,05	-----	ACR037C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-174)	Natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP 1)	Anemia, hypochromic microcytic	GO:0006828

YHR060 W	-4	-4	VMA22	Integral membrane protein that is required for vacuolar H ⁺ -ATPase (V-ATPase) function, although not an actual component of the V-ATPase complex; functions in the assembly of the V-ATPase; localized to the yeast endoplasmic reticulum (ER)	Verified	-----	1,01	-----	AAL048W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-22)	-----	---	GO:0005977 GO:0006461 GO:0007035
YHR091C	2	0	MSR1	Mitochondrial arginyl-tRNA synthetase	Verified	-----	1,13	-----	YDR341C (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 1E-261)	arginyl-tRNA synthetase-like	---	GO:0006412 GO:0006420
YHR100C	-2	0	YHR100C	Putative protein of unknown function, required for respiratory growth; the authentic, non-tagged protein is detected in highly purified mitochondria in high-throughput studies	Uncharacterized	-----	-----	-----	AER392W (<i>Ashbya gossypii</i> , 8E-63)	-----	---	GO:0008150
YHR108 W	-6	0	GGA2	Golgi-localized protein with homology to gamma-adaptin, interacts with and regulates Arf1p and Arf2p in a GTP-dependent manner in order to facilitate traffic through the late Golgi	Verified	-----	0,80	-----	AER243W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-160)	ADP-ribosylation factor binding protein GGA3 (Golgi-localized, gamma ear-containing, ARF-binding protein 3)	---	GO:0006895 GO:0006896 GO:0043328
YHR151C	0	-2	YHR151C	Putative protein of unknown function	Uncharacterized	-----	0,86	-----	ADL137W (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-49)	-----	---	GO:0008150
YHR167 W	0	-4	THP2	Subunit of the THO complex, which connects transcription elongation and mitotic recombination, and of the TREX complex, which is recruited to activated genes and couples transcription to mRNA export; involved in telomere maintenance	Verified	-----	0,62	-----	ABR205C (<i>Ashbya gossypii</i> , 7E-9)	-----	---	GO:0000723 GO:0006310 GO:0006368 GO:0006406
YHR178 W	2	0	STB5	Activator of multidrug resistance genes, forms a heterodimer with Pdr1p; contains a Zn(II)2Cys6 zinc finger domain that interacts with a PDRE (pleiotropic drug resistance element) in vitro; binds Sin3p in a two-hybrid assay	Verified	-----	2,15	-----	AER291C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	-----	---	GO:0006350 GO:0009410 GO:0042493 GO:0043619
YHR191C	-2	0	CTF6	Subunit of a complex with Ctf18p that shares some subunits with Replication Factor C and is required for sister chromatid cohesion	Verified	-----	0,84	> internalization	AER166C (<i>Ashbya gossypii</i> , 3E-23)	-----	---	GO:0000723 GO:0006974 GO:0007064
YIL009C- A	-6	0	EST3	Component of the telomerase holoenzyme, involved in telomere replication	Verified	-----	-----	-----	ADL016C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-23)	-----	---	GO:0000723 GO:0007004
YIL015W	-2	0	BAR1	Aspartyl protease secreted into the periplasmic space of mating type a cells, helps cells find mating partners, cleaves and inactivates alpha factor allowing cells to recover from alpha-factor-induced cell cycle arrest	Verified	-----	1,56	-----	AGR240W (<i>Ashbya gossypii</i> , 7E-62)	-----	---	GO:0000754 GO:0043171
YIL039W	-4	2	YIL039W	Conserved phosphoesterase domain-containing protein that acts together with Emp24p/Erv25p in cargo exit from the ER; deletion confers sensitivity to 4-(N-(S-glutathionylacetyl)amino) phenylarsenoxide (GSAO)	Uncharacterized	-----	0,55	-----	ADL110W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-133)	-----	---	GO:0006888 GO:0042493
YIL053W	-2	0	RHR2	Constitutively expressed isoform of DL-glycerol-3-phosphatase; involved in glycerol biosynthesis, induced in response to both anaerobic and, along with the Hor2p/Gpp2p isoform, osmotic stress	Verified	-----	0,73	< internalization	YER062C (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 1E-110)	-----	---	GO:0006114 GO:0006970 GO:0042493
YIL065C	-2	0	FIS1	Mitochondrial outer membrane protein involved in membrane fission, required for localization of Dnm1p and Mdv1p during mitochondrial division; mediates ethanol-induced apoptosis and ethanol-induced mitochondrial fragmentation	Verified	-----	1,37	> internalization	ADL058W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-43)	Tetratricopeptide repeat protein 11 (TPR repeat protein 11)	---	GO:0000266 GO:0042493

YIL090W	-4	-2	ICE2	Integral ER membrane protein with type-III transmembrane domains; mutations cause defects in cortical ER morphology in both the mother and daughter cells	Verified	-----	0,85	-----	ADL208W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-115)	-----	---	GO:0007029
YIL122W	-2	0	POG1	Putative transcriptional activator that promotes recovery from pheromone induced arrest; inhibits both alpha-factor induced G1 arrest and repression of CLN1 and CLN2 via SCB/MCB promoter elements; potential Cdc28p substrate; SBF regulated	Verified	-----	1,09	-----	-----	-----	---	GO:0000083 GO:0000321
YIL128W	-4	0	MET18	DNA repair and TFIIH regulator, required for both nucleotide excision repair (NER) and RNA polymerase II (RNAP II) transcription; involved in telomere maintenance	Verified	-----	1,54	-----	AER377C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	MMS19-like protein (hMMS19) (MET18 homolog)	---	GO:0000723 GO:0006289 GO:0006366 GO:0006555
YIL158W	-2	0	YIL158W	Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the vacuole	Uncharacterized	-----	0,57	-----	AFR300C (<i>Ashbya gossypii</i> , 0.003)	-----	---	GO:0008150
YIR023W	0	2	DAL81	Positive regulator of genes in multiple nitrogen degradation pathways; contains DNA binding domain but does not appear to bind the dodecanucleotide sequence present in the promoter region of many genes involved in allantoin catabolism	Verified	-----	-----	-----	ACL093C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	-----	---	GO:0006357 GO:0019740
YIR033W	-4	-6	MGA2	ER membrane protein involved in regulation of OLE1 transcription, acts with homolog Spt23p; inactive ER form dimerizes and one subunit is then activated by ubiquitin/proteasome-dependent processing followed by nuclear targeting	Verified	-----	1,17	-----	ACR165W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-156)	-----	---	GO:0006631 GO:0009409 GO:0045944
YJL004C	-2	0	SYS1	Integral membrane protein of the Golgi required for targeting of the Arl-like GTPase Arl3p to the Golgi; multicopy suppressor of ypt6 null mutation	Verified	-----	1,46	-----	AAL163W (<i>Ashbya gossypii</i> , 4E-49)	-----	---	GO:0006895 GO:0016050 GO:0043001
YJL012C	2	2	VTC4	Vacuolar membrane protein involved in vacuolar polyphosphate accumulation; functions as a regulator of vacuolar H ⁺ -ATPase activity and vacuolar transporter chaperones; involved in non-autophagic fusion	Verified	-----	0,53	< internalization	SPCC1322.14c (<i>Schizosaccharomyces pombe</i> , 1E-261)	-----	---	GO:0007034 GO:0016237 GO:0042144
YJL024C	0	-4	APS3	Small subunit of the clathrin-associated adaptor complex AP-3, which is involved in vacuolar protein sorting; related to the sigma subunit of the mammalian clathrin AP-3 complex; suppressor of loss of casein kinase 1 function	Verified	-----	0,79	-----	AAL143W (<i>Ashbya gossypii</i> , 4E-63)	Adapter-related protein complex 3 sigma 1 subunit (Sigma-adaptin 3a) (AP-3 complex sigma-3A subunit) (Sigma-3A-adaptin) (Clathrin-associated/assembly/adaptor protein, small 3)	---	GO:0006896 GO:0016192
YJL053W	-4	2	PEP8	Vacuolar protein sorting protein that forms part of the multimeric membrane-associated retromer complex along with Vps35p, Vps29p, Vps17p, and Vps5p; essential for endosome-to-Golgi retrograde protein transport	Verified	-----	0,82	-----	AEL178C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-104)	Vacuolar protein sorting-associated protein 26A	---	GO:0042147 GO:0045053
YJL056C	0	-2	ZAP1	Zinc-regulated transcription factor, binds to zinc-responsive promoter elements to induce transcription of certain genes in the presence of zinc; regulates its own transcription; contains seven zinc-finger domains	Verified	-----	1,02	-----	AEL174W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-75)	Zinc finger protein 542	---	GO:0006357 GO:0006882

YJL080C	0	-2	SCP160	Essential RNA-binding G protein effector of mating response pathway, mainly associated with nuclear envelope and ER, interacts in mRNA-dependent manner with translating ribosomes via multiple KH domains, similar to vertebrate vigilins	Verified	-----	0,83	-----	AAL177W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	Vigilin (High density lipoprotein-binding protein) (HDL-binding protein)	---	GO:0000750 GO:0006348 GO:0007059 GO:0008298 GO:0030466 GO:0042493 GO:0045141
YJL095W	-4	-2	BCK1	Mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase kinase acting in the protein kinase C signaling pathway, which controls cell integrity; upon activation by Pkc1p phosphorylates downstream kinases Mkk1p and Mkk2p	Verified	-----	1,34	-----	AFR092W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	-----	---	GO:0001101 GO:0006468 GO:0007243 GO:0007584 GO:0030010 GO:0030968
YJL101C	-6	0	GSH1	Gamma glutamylcysteine synthetase catalyzes the first step in glutathione (GSH) biosynthesis; expression induced by oxidants, cadmium, and mercury	Verified	-----	1,70	-----	ENSP0000 0229416 (<i>Homo sapiens</i> , 1E-261)	Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit (EC 6.3.2.2) (Gamma-glutamylcysteine synthetase) (Gamma-ECS) (GCS heavy chain)	Hemolytic anemia due to gamma-glutamylcysteine synthetase deficiency	GO:0006750 GO:0009408 GO:0009409 GO:0042493 GO:0042542 GO:0046686 GO:0046689
YJL115W	-4	0	ASF1	Nucleosome assembly factor, involved in chromatin assembly and disassembly, anti-silencing protein that causes derepression of silent loci when overexpressed	Verified	-----	1,21	-----	ADR320C (<i>Ashbya gossypii</i> , 3E-74)	anti-silencing function 1B	---	GO:0006335 GO:0006336 GO:0006337 GO:0006348 GO:0016573 GO:0030466 GO:0035065 GO:0043486
YJL117W	-4	-2	PHO86	Endoplasmic reticulum (ER) resident protein required for ER exit of the high-affinity phosphate transporter Pho84p, specifically required for packaging of Pho84p into COPII vesicles	Verified	-----	1,00	-----	ADR325C (<i>Ashbya gossypii</i> , 3E-60)	-----	---	GO:0006457 GO:0006817 GO:0045045
YJL128C	-4	0	PBS2	MAP kinase kinase that plays a pivotal role in the osmosensing signal-transduction pathway, activated under severe osmotic stress	Verified	-----	1,31	-----	AFL217C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-177)	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2 (EC 2.7.1.-) (MAP kinase kinase 2) (MAPKK 2) (ERK activator kinase 2) (MAPK/ERK kinase 2) (MEK2)	---	GO:0000169 GO:0000208 GO:0006468 GO:0006972 GO:0007015 GO:0007231
YJL136C	-4	0	RPS21B	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit; nearly identical to Rps21Ap and has similarity to rat S21 ribosomal protein	Verified	-----	-----	-----	YKR057W (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 2E-39)	40S ribosomal protein S21	---	GO:0006412
YJL154C	-2	2	VPS35	Endosomal subunit of membrane-associated retromer complex required for retrograde transport; receptor that recognizes retrieval signals on cargo proteins, forms subcomplex with Vps26p and Vps29p that selects cargo proteins for retrieval	Verified	-----	2,45	-----	AEL107W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	Vacuolar protein sorting 35 (Vesicle protein sorting 35) (hVPS35) (Maternal-embryonic 3)	---	GO:0042147 GO:0045053
YJL176C	-4	-2	SWI3	Subunit of the SWI/SNF chromatin remodeling complex, which regulates transcription by remodeling chromosomes; required for transcription of many genes, including ADH1, ADH2, GAL1, HO, INO1 and SUC2	Verified	dubious ORF YJL175W overlaps 5' of gene	-----	-----	AEL135C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-127)	-----	---	GO:0006338
YJL183W	-2	0	MNN11	Subunit of a Golgi mannosyltransferase complex that also contains Anp1p, Mnn9p, Mnn10p, and Hoc1p, and mediates elongation of the polysaccharide mannan backbone; has homology to Mnn10p	Verified	-----	1,27	-----	AEL142W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-88)	-----	---	GO:0006486
YJL190C	-4	0	RPS22A	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit; nearly identical to Rps22Bp and has similarity to E. coli S8 and rat S15a ribosomal proteins	Verified	-----	-----	-----	YLR367W (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 1E-66)	40S ribosomal protein S15a	---	GO:0000723 GO:0006412

YJR033C	0	-2	RAV1	Subunit of the RAVE complex (Rav1p, Rav2p, Skp1p), which promotes assembly of the V-ATPase holoenzyme; required for transport between the early and late endosome/PVC and for localization of TGN membrane proteins; potential Cdc28p substrate	Verified	-----	0,85	-----	AEL063W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	-----	---	GO:0007035 GO:0043254 GO:0045022
YJR040W	-2	0	GEF1	Chloride channel localized to late- or post-Golgi vesicles, involved in iron metabolism; highly homologous to voltage-gated chloride channels in vertebrates	Verified	-----	2,19	< internalization	AEL071C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	Chloride channel protein 5 (CIC-5)	Dent disease, Hypophosphatemia type III, Nephrolithiasis type I, Proteinuria with hypercalciuria nephrocalcinosis	GO:0006878 GO:0006879
YJR043C	-4	0	POL32	Third subunit of DNA polymerase delta, involved in chromosomal DNA replication; required for error-prone DNA synthesis in the presence of DNA damage and processivity; interacts with Hys2p, PCNA (Pol30p), and Pol1p	Verified	-----	1,38	-----	AEL075W (<i>Ashbya gossypii</i> , 4E-12)	-----	---	GO:0000723 GO:0006272 GO:0006273 GO:0006278 GO:0006280 GO:0006284 GO:0006289 GO:0006298 GO:0006301 GO:0043137
YJR074W	-4	2	MOG1	Conserved nuclear protein that interacts with GTP-Gsp1p, which is a Ran homolog of the Ras GTPase family, and stimulates nucleotide release, involved in nuclear protein import, nucleotide release is inhibited by Yrb1p	Verified	-----	1,26	-----	AFR434W (<i>Ashbya gossypii</i> , 6E-31)	RAN guanine nucleotide release factor	---	GO:0006606
YJR102C	-6	2	VPS25	Component of the ESCRT-II complex, which is involved in ubiquitin-dependent sorting of proteins into the endosome	Verified	-----	0,92	-----	AGL318W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-38)	Vacuolar protein sorting protein 25 (hVps25) (ELL-associated protein of 20 kDa) (Dermal papilla derived protein 9)	---	GO:0004433 GO:0000723 GO:0006623 GO:0043162
YJR104C	-6	0	SOD1	Cytosolic superoxide dismutase; some mutations are analogous to those that cause ALS (amyotrophic lateral sclerosis) in humans	Verified	-----	1,69	-----	AGL321W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-55)	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Amyotrophic lateral sclerosis, due to SOD1 deficiency	GO:0001320 GO:0006801 GO:0006878 GO:0006882 GO:0009409 GO:0042493
YJR117W	0	-2	STE24	Highly conserved zinc metalloprotease that functions in two steps of a-factor maturation, C-terminal CAAX proteolysis and the first step of N-terminal proteolytic processing; contains multiple transmembrane spans	Verified	-----	2,04	-----	orf19.5654 (<i>Candida albicans</i> , 1E-116)	CAAX prenyl protease 1 homolog (Zinc metalloprotease Ste24 homolog)	Lipodystrophy, type b, associated with mandibuloacral dysplasia	GO:0007323 GO:0007323
YJR118C	-2	-2	ILM1	Protein of unknown function; may be involved in mitochondrial DNA maintenance; required for slowed DNA synthesis-induced filamentous growth	Verified	-----	0,78	-----	ABR166C (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-29)	-----	---	GO:0000002
YJR122W	-2	0	CAF17	Mitochondrial protein that interacts with Ccr4p in the two-hybrid system; 3'-untranslated region contains a putative mRNA localization element common to genes encoding mitochondrial proteins	Verified	-----	1,26	-----	ABR170W (<i>Ashbya gossypii</i> , 6E-66)	Uncharacterized protein C1orf69	---	GO:0008150
YJR125C	-2	0	ENT3	Protein containing an N-terminal epsin-like domain involved in clathrin recruitment and traffic between the Golgi and endosomes; associates with the clathrin adaptor Gga2p	Verified	-----	0,93	-----	AER155C (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-69)	Epsin-4 (Epsin-related protein) (EpsinR) (Enthoprotin) (Clathrin interacting protein localized in the trans-Golgi region) (Clint)	---	GO:0000147 GO:0006805 GO:0006895 GO:0006897 GO:0007015

YJR139C	-4	0	HOM6	Homoserine dehydrogenase (L-homoserine:NADP oxidoreductase), dimeric enzyme that catalyzes the third step in the common pathway for methionine and threonine biosynthesis; enzyme has nucleotide-binding, dimerization and catalytic regions	Verified	-----	2,38	-----	ABL080W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-113)	-----	---	GO:0006555 GO:0006566 GO:0009090 GO:0042493	
YKL002W	-4	2	DID4	Class E Vps protein of the ESCRT-III complex, required for sorting of integral membrane proteins into luminal vesicles of multivesicular bodies, and for delivery of newly synthesized vacuolar enzymes to the vacuole, involved in endocytosis	Verified	-----	1,09	-----	ABR002C (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-57)	Charged multivesicular body protein 2a (Chromatin modifying protein 2a) (CHMP2a) (Vacuolar protein sorting 2-1) (Vps2-1) (hVps2-1) (Putative breast adenocarcinoma marker BC-2)	-----	---	GO:0043162 GO:0045053 GO:0045324
YKL003C	2	0	MRP17	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit; MRP17 exhibits genetic interactions with PET122, encoding a COX3-specific translational activator	Verified	-----	0,64	< internalization	ABR003W (<i>Ashbya gossypii</i> , 4E-35)	-----	---	GO:0006412	
YKL006W	-2	-4	RPL14A	N-terminally acetylated protein component of the large (60S) ribosomal subunit, nearly identical to Rpl14Bp and has similarity to rat L14 ribosomal protein; rpl14a csh5 double null mutant exhibits synthetic slow growth	Verified	-----	0,31	-----	YHL001W (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 1E-44)	60S ribosomal protein L14 (CAG-ISL 7)	-----	---	GO:0006412
YKL011C	-2	0	CCE1	Mitochondrial cruciform cutting endonuclease, cleaves Holliday junctions formed during recombination of mitochondrial DNA	Verified	-----	1,10	-----	YIR021W (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 4E-10)	-----	---	GO:0006310	
YKL041W	-4	2	VPS24	One of four subunits of the endosomal sorting complex required for transport III (ESCRT-III); forms an ESCRT-III subcomplex with Did4p; involved in the sorting of transmembrane proteins into the multivesicular body (MVB) pathway	Verified	-----	0,73	-----	ABR049C (<i>Ashbya gossypii</i> , 4E-54)	Charged multivesicular body protein 3 (Chromatin modifying protein 3) (Vacuolar protein sorting 24) (hVps24) (Neuroendocrine differentiation factor)	-----	---	GO:0043162 GO:0045324
YKL057C	-2	-2	NUP120	Subunit of the Nup84p subcomplex of the nuclear pore complex (NPC), required for even distribution of NPCs around the nuclear envelope, involved in establishment of a normal nucleocytoplasmic concentration gradient of the GTPase Gsp1p	Verified	-----	0,96	-----	ABR073C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-166)	-----	---	GO:0006259 GO:0006406 GO:0006407 GO:0006408 GO:0006409 GO:0006607 GO:0006608 GO:0006609 GO:0006610 GO:0006611 GO:0006999 GO:0050000	
YKL080W	-4	-4	VMA5	Subunit C of the eight-subunit V1 peripheral membrane domain of vacuolar H ⁺ -ATPase (V-ATPase), an electrogenic proton pump found throughout the endomembrane system; required for the V1 domain to assemble onto the vacuolar membrane	Verified	-----	-----	< internalization	ADR146C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-93)	Vacuolar ATP synthase subunit C (EC 3.6.3.14) (V-ATPase C subunit) (Vacuolar proton pump C subunit)	-----	---	GO:0007035
YKL113C	-4	0	RAD27	5' to 3' exonuclease, 5' flap endonuclease, required for Okazaki fragment processing and maturation as well as for long-patch base-excision repair; member of the S. pombe RAD2/FEN1 family	Verified	-----	0,64	-----	ENSP00000305480 (<i>Homo sapiens</i> , 1E-261)	Flap endonuclease-1 (EC 3.-.-.-) (Maturation factor 1) (MF1)	-----	---	GO:0000723 GO:0000734 GO:0001302 GO:0006286 GO:0006303 GO:0043137
YKL119C	-4	-2	VPH2	Integral membrane protein required for vacuolar H ⁺ -ATPase (V-ATPase) function, although not an actual component of the V-ATPase complex; functions in the assembly of the V-ATPase; localized to the	Verified	dubious ORF YKL118W overlaps 5' of gene	0,69	-----	VPH2 (<i>Pichia stipitis</i> , 1E-21)	-----	---	GO:0006461 GO:0007035	

				endoplasmic reticulum (ER)								
YKL139W	-6	-4	CTK1	Catalytic (alpha) subunit of C-terminal domain kinase I (CTDK-I), which phosphorylates the C-terminal repeated domain of the RNA polymerase II large subunit (Rpo21p) to affect both transcription and pre-mRNA 3' end processing	Verified	-----	0,82	-----	AFR205C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-130)	Cell division cycle 2-related protein kinase 7 (EC 2.7.1.37) (CDC2-related protein kinase 7) (CrkRS)	---	GO:0000723 GO:0006468 GO:0031124 GO:0032786
YKL175W	2	0	ZRT3	Vacuolar membrane zinc transporter, transports zinc from storage in the vacuole to the cytoplasm when needed; transcription is induced under conditions of zinc deficiency	Verified	-----	1,17	-----	AEL126W (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-77)		---	GO:0006829 GO:0006882
YKL121W	-2	0	SAC1	Lipid phosphoinositide phosphatase of the ER and Golgi, involved in protein trafficking and secretion	Verified	-----	0,57	< internalization	AER447C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	inositol polyphosphate-5-phosphatase F isoform 1	---	GO:0006887 GO:0017157 GO:0048856 GO:0048017
YKL213C	-6	0	DOA1	WD repeat protein required for ubiquitin-mediated protein degradation, forms complex with Cdc48p, plays a role in controlling cellular ubiquitin concentration; also promotes efficient NHEJ in postdiauxic/stationary phase	Verified	-----	0,71	< internalization	AER448W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	Phospholipase A-2-activating protein (PLAP) (PLA2P)	---	GO:0006303 GO:0006511 GO:0006512
YKR001C	-4	2	VPS1	Dynammin-like GTPase required for vacuolar sorting; also involved in actin cytoskeleton organization, late Golgi-retention of some proteins, regulating peroxisome biogenesis	Verified	-----	0,58	-----	ABL001W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)		---	GO:0006623 GO:0007031 GO:0007034 GO:0030036 GO:0045053
YKR019C	-2	0	IRS4	Protein involved in regulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate concentrations; Irs4p and Tax4p bind and activate the phosphatase Inp51p; mutation confers an increase in rDNA silencing	Verified	-----	0,98	-----	YJL083W (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 4E-43)		---	GO:0000183 GO:0007047 GO:0048017
YKR020W	-2	0	VPS51	Component of the GARP (Golgi-associated retrograde protein) complex, Vps51p-Vps52p-Vps53p-Vps54p, which is required for the recycling of proteins from endosomes to the late Golgi; links the VFT/GARP complex to the SNARE Tlg1p	Verified	-----	1,72	-----	AFR102C (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-11)		---	GO:0006623 GO:0007118 GO:0008361 GO:0016050 GO:0042147
YKR028W	0	2	SAP190	Protein that forms a complex with the Sit4p protein phosphatase and is required for its function; member of a family of similar proteins including Sap4p, Sap155p, and Sap185p	Verified	-----	1,10	-----	AFR089W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	SAPS domain family member 2	---	GO:0000082 GO:0016311 GO:0031929
YKR035W-A	-4	2	DID2	Class E protein of the vacuolar protein-sorting (Vps) pathway, associates reversibly with the late endosome, has human ortholog that may be altered in breast tumors	Verified	dubious ORF YKR035C overlaps 5' of gene	-----	< internalization	AFR068C (<i>Ashbya gossypii</i> , 7E-62)		---	GO:0006623 GO:0045324
YKR043C	2	0	YKR043C	Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm and nucleus	Uncharacterized	-----	1,69	-----	ADR323C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-109)		---	GO:0008150
YKR072C	0	2	SIS2	Negative regulatory subunit of the protein phosphatase 1 Ppz1p; involved in ion homeostasis and cell cycle progression	Verified	-----	0,78	-----	AAR140W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-100)	Phosphopanthenoylcysteine decarboxylase (EC 4.1.1.36) (PPC-DC) (CoaC)	---	GO:0000082 GO:0007346 GO:0009651 GO:0015937
YLL027W	-4	0	ISA1	Mitochondrial matrix protein involved in biogenesis of the iron-sulfur (Fe/S) cluster of Fe/S proteins. isa1 deletion causes loss of mitochondrial DNA and respiratory deficiency; depletion reduces growth on nonfermentable carbon sources	Verified	-----	1,57	-----	AGL033C (<i>Ashbya gossypii</i> , 8E-47)	HESB like domain containing 2	---	GO:0000723 GO:0006826

YLL039C	-2	0	UBI4	Ubiquitin, becomes conjugated to proteins, marking them for selective degradation via the ubiquitin-26S proteasome system; essential for the cellular stress response; encoded as a polyubiquitin precursor comprised of 5 head-to-tail repeats	Verified	-----	0,88	-----	AT4G0532.02 (<i>Arabidopsis thaliana</i> , 1E-261)	Ubiquitin (UBI4)	---	GO:0000209 GO:0006513 GO:0006950 GO:0016567 GO:0016579 GO:0030437 GO:0007039 GO:0030437 GO:0045053 GO:0045324
YLL040C	-2	0	VPS13	Protein of unknown function; heterooligomeric or homooligomeric complex; peripherally associated with membranes; homologous to human COH1; involved in sporulation, vacuolar protein sorting and protein-Golgi retention	Verified	-----	-----	-----	ACL064C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	Vacuolar protein sorting-associated protein 13D	Levine-Critchley Syndrome Acanthocytosis with neurologic disorder (Choreoacanthocytosis)	---
YLL043W	-4	0	FPS1	Plasma membrane glycerol channel, member of the major intrinsic protein (MIP) family of channel proteins; involved in efflux of glycerol and in uptake of the trivalent metalloids arsenite and antimonite	Verified	-----	1,02	-----	ACL068W (<i>Ashbya gossypii</i> , 7E-95)	-----	-----	GO:0000747 GO:0006810 GO:0006946 GO:0015793 GO:0042493 GO:0046885
YLL048C	0	-6	YBT1	Transporter of the ATP-binding cassette (ABC) family involved in bile acid transport; similar to mammalian bile transporters	Verified	-----	-----	-----	CG6214-PL (<i>Drosophila melanogaster</i> , 1E-261)	-----	-----	GO:0015721
YLR001C	2	2	YLR001C	Putative protein of unknown function; the authentic, non-tagged protein is detected in highly purified mitochondria in high-throughput studies; YLR001C is not an essential gene	Uncharacterized	-----	1,10	-----	ACR029C (<i>Ashbya gossypii</i> , 4E-80)	Periostin, osteoblast specific factor, isoform CRA_b	Breast cancer	GO:0008150
YLR015W	-2	0	BRE2	Subunit of the COMPASS (Set1C) complex, which methylates histone H3 on lysine 4 and is required in transcriptional silencing near telomeres; involved in telomere maintenance; similar to trithorax-group protein ASH2L	Verified	-----	1,33	-----	AER231W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-119)	-----	-----	GO:0000723 GO:0006348 GO:0006350 GO:0016571
YLR025W	-6	2	SNF7	One of four subunits of the endosomal sorting complex required for transport III (ESCRT-III); involved in the sorting of transmembrane proteins into the multivesicular body (MVB) pathway; recruited from the cytoplasm to endosomal membranes	Verified	-----	4,60	-----	AFR209W (<i>Ashbya gossypii</i> , 7E-45)	Charged multivesicular body protein 4a (Chromatin modifying protein 4a) (CHMP4a) (Vacuolar protein sorting 7-1) (SNF7-1) (hSnf-1) (SNF7 homolog associated with Alix 2)	---	GO:0000723 GO:0043162 GO:0045324
YLR027C	-4	2	AAT2	Cytosolic aspartate aminotransferase, involved in nitrogen metabolism; localizes to peroxisomes in oleate-grown cells	Verified	-----	-----	-----	AFR211C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-160)	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic (EC 2.6.1.1) (Transaminase A) (Glutamate oxaloacetate transaminase 1)	---	GO:0006532 GO:0006533 GO:0006536 GO:0006807 GO:0019266
YLR034C	-4	0	SMF3	Putative divalent metal ion transporter involved in iron homeostasis; transcriptionally regulated by metal ions; member of the Nramp family of metal transport proteins	Verified	-----	1,16	> internalization	AFR224C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-172)	Natural resistance-associated macrophage protein 2 (NRAMP 2) (Divalent metal transporter 1) (DMT1)	Microcytic anemia	GO:0006880
YLR039C	-2	0	RIC1	Protein involved in retrograde transport to the cis-Golgi network; forms heterodimer with Rgp1p that acts as a GTP exchange factor for Ypt6p; involved in transcription of rRNA and ribosomal protein genes	Verified	-----	-----	< internalization	ADR241C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-144)	-----	---	GO:0006886 GO:0042147

YLR068W	-2	-2	FYV7	Protein of unknown function, required for survival upon exposure to K1 killer toxin; involved in processing the 35S rRNA primary transcript to generate the 20S and 27SA2 pre-rRNA transcripts	Verified	-----	0,57	-----	ABR226W (Ashbya gossypii, 3E-6)	-----	---	GO:0000462	
YLR079W	-2	0	SIC1	Inhibitor of Cdc28-Cln kinase complexes that controls G1/S phase transition, preventing premature S phase and ensuring genomic integrity; phosphorylation targets Sic1p for SCF(CDC4)-dependent turnover; functional homolog of mammalian Kip1	Verified	-----	0,93	-----	ABR240W (Ashbya gossypii, 1E-7)	-----	---	GO:0000079 GO:0000082	
YLR087C	-4	-2	CSF1	Protein required for fermentation at low temperature; the authentic, non-tagged protein is detected in highly purified mitochondria in high-throughput studies	Verified	-----	-----	-----	orf19_956 (Candida albicans, 1E-261)	-----	---	GO:0006113	
YLR095C	-2	0	IOC2	Member of a complex (Isw1b) with Isw1p and loc4p that exhibits nucleosome-stimulated ATPase activity and acts within coding regions to coordinate transcription elongation with termination and processing, contains a PHD finger motif	Verified	-----	0,75	-----	AGR057C (Ashbya gossypii, 5E-99)	-----	---	GO:0006338	
YLR113W	-2	0	HOG1	Mitogen-activated protein kinase involved in osmoregulation via three independent osmosensors; mediates the recruitment and activation of RNA Pol II at Hot1p-dependent promoters; localization regulated by Ptp2p and Ptp3p	Verified	-----	0,98	-----	AGR048C (Ashbya gossypii, 1E-261)	Mitogen-activated protein kinase 14 (EC 2.7.1.37) (Mitogen-activated protein kinase p38 alpha) (MAP kinase p38 alpha) (Cytokine suppressive anti-inflammatory drug binding protein) (CSAID binding protein) (CSBP) (MAX-interacting protein 2) (MAP kinase MXI2)	-----	---	GO:0006468 GO:0006972 GO:0007231 GO:0045944 GO:0046020 GO:0046685
YLR119W	-4	2	SRN2	Component of the ESCRT-I complex, which is involved in ubiquitin-dependent sorting of proteins into the endosome; suppressor of rna1-1 mutation; may be involved in RNA export from nucleus	Verified	-----	1,40	-----	AGL189C (Ashbya gossypii, 4E-14)	-----	---	GO:0006612 GO:0006623 GO:0043162	
YLR148W	-6	-2	PEP3	Component of CORVET tethering complex; vacuolar peripheral membrane protein that promotes vesicular docking/fusion reactions in conjunction with SNARE proteins, required for vacuolar biogenesis	Verified	-----	1,33	-----	AGL156W (Ashbya gossypii, 1E-150)	Vacuolar protein sorting 18 (hVPS18)	-----	---	GO:0000723 GO:0006895 GO:0006904 GO:0042144 GO:0042493 GO:0045324
YLR181C	0	2	VTA1	Multivesicular body (MVB) protein involved in endosomal protein sorting; regulates Vps4p activity by promoting its oligomerization; binds to Vps4p, Vps20p, and Vps60p; may act at a late step in MVB formation	Verified	-----	0,79	-----	AFR691W (Ashbya gossypii, 8E-14)	-----	---	GO:0032461 GO:0032511 GO:0045324	
YLR182W	-2	0	SWI6	Transcription cofactor, forms complexes with DNA-binding proteins Swi4p and Mbp1p to regulate transcription at the G1/S transition; involved in meiotic gene expression; localization regulated by phosphorylation; potential Cdc28p substrate	Verified	-----	0,64	-----	AFR690C (Ashbya gossypii, 1E-140)	-----	---	GO:0000083 GO:0006350 GO:0007126	

YLR192C	-2	0	HCR1	Dual function protein involved in translation initiation as a substoichiometric component of eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) and required for processing of 20S pre-rRNA; binds to eIF3 subunits Rpg1p and Prt1p and 18S rRNA	Verified	-----	1,03	-----	ACR229W (Ashbya gossypii, 2E-46)	-----	---	GO:0000462 GO:0000723 GO:0006412
YLR248W	-2	0	RCK2	Protein kinase involved in the response to oxidative and osmotic stress; identified as suppressor of <i>S. pombe</i> cell cycle checkpoint mutations	Verified	-----	0,72	-----	AAL029W (Ashbya gossypii, 1E-151)	-----	---	GO:0006468 GO:0007231 GO:0040020
YLR262C	-2	0	YPT6	GTPase, Ras-like GTP binding protein involved in the secretory pathway, required for fusion of endosome-derived vesicles with the late Golgi, maturation of the vacuolar carboxypeptidase Y; has similarity to the human GTPase, Rab6	Verified	-----	0,99	< internalization	AGR257C (Ashbya gossypii, 3E-85)	Ras-related protein Rab-6B	---	GO:0006886 GO:0042147
YLR268W	-4	0	SEC22	R-SNARE protein; assembles into SNARE complex with Bet1p, Bos1p and Sed5p; cycles between the ER and Golgi complex; involved in anterograde and retrograde transport between the ER and Golgi; synaptobrevin homolog	Verified	-----	0,78	-----	AGR267W (Ashbya gossypii, 2E-69)	Vesicle trafficking protein SEC22b (SEC22 vesicle trafficking protein-like 1)	---	GO:0006888 GO:0006890 GO:0006891 GO:0006906
YLR320W	-2	0	MMS22	Protein involved in resistance to ionizing radiation; acts with Mms1p in a repair pathway that may be involved in resolving replication intermediates or preventing the damage caused by blocked replication forks	Verified	-----	1,02	-----	AFR496W (Ashbya gossypii, 3E-99)	-----	---	GO:0006302 GO:0042493
YLR330W	2	2	CHS5	Component of the exomer complex, which also contains Csh6p, Ecl1p, Ecl2p, and Bud7p and is involved in export of selected proteins, such as chitin synthase Chs3p, from the Golgi to the plasma membrane	Verified	-----	0,57	< internalization	AGL051C (Ashbya gossypii, 4E-83)	-----	---	GO:0000282 GO:0000747 GO:0006039 GO:0006893 GO:0030476 GO:0045324
YLR360W	-4	2	VPS38	Part of a Vps34p phosphatidylinositol 3-kinase complex that functions in carboxypeptidase Y (CPY) sorting; binds Vps30p and Vps34p to promote production of phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns3P) which stimulates kinase activity	Verified	-----	1,88	-----	ABL008C (Ashbya gossypii, 7E-34)	-----	---	---
YLR362W	-4	0	STE11	Signal transducing MEK kinase involved in pheromone response and pseudohyphal/invasive growth pathways where it phosphorylates Ste7p, and the high osmolarity response pathway, via phosphorylation of Pbs2p, regulated by Ste20p and Ste50p	Verified	-----	1,24	-----	ABL011C (Ashbya gossypii, 1E-261)	-----	---	GO:0000161 GO:0000186 GO:0000750 GO:0001402 GO:0001403 GO:0006468 GO:0007124 GO:0007232
YLR386W	-4	-4	VAC14	Protein involved in regulated synthesis of PtdIns(3,5)P(2), in control of trafficking of some proteins to the vacuole lumen via the MVB, and in maintenance of vacuole size and acidity; interacts with Fig4p; activator of Fab1p	Verified	-----	1,32	< internalization	AER049W (Ashbya gossypii, 1E-261)	Vac14 homolog	---	GO:0000011 GO:0006644
YLR417W	-4	2	VPS36	Component of the ESCRT-II complex; contains the GLUE (GRAM Like Ubiquitin binding in EAP45) domain which is involved in interactions with ESCRT-I and ubiquitin-dependent sorting of proteins into the endosome	Verified	-----	0,77	< internalization	AER092W (Ashbya gossypii, 1E-135)	-----	---	GO:0000433 GO:0000723 GO:0006623 GO:0043162 GO:0045053

YLR423C	-4	0	ATG17	Scaffold protein responsible for pre-autophagosomal organization; interacts with and is required for activation of Apg1p protein kinase; involved in autophagy but not in the Cvt (cytoplasm to vacuole targeting) pathway	Verified	-----	1,57	-----	AER106C (<i>Ashbya gossypii</i> , 3E-61)	-----	---	GO:0000723 GO:0006914	
YLR447C	-4	-6	VMA6	Subunit d of the five-subunit V0 integral membrane domain of vacuolar H ⁺ -ATPase (V-ATPase), an electrogenic proton pump found in the endomembrane system; stabilizes V0 subunits; required for V1 domain assembly on the vacuolar membrane	Verified	-----	0,59	-----	AER146C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-154)	Vacuolar ATP synthase subunit d (EC 3.6.3.14) (V-ATPase d subunit) (Vacuolar proton pump d subunit) (V-ATPase AC39 subunit) (V-ATPase 40 kDa accessory protein) (P39) (32 kDa accessory protein)	-----	---	GO:0007034 GO:0007035
YML007W	-4	0	YAP1	Basic leucine zipper (bZIP) transcription factor required for oxidative stress tolerance; activated by H ₂ O ₂ through the multistep formation of disulfide bonds and transit from the cytoplasm to the nucleus; mediates resistance to cadmium	Verified	-----	0,72	-----	orf19.1623 (<i>Candida albicans</i> , 4E-15)	-----	---	GO:0000304 GO:0009408 GO:0010038 GO:0042493 GO:0043619 GO:0046685	
YML008C	-4	-2	ERG6	Delta(24)-sterol C-methyltransferase, converts zymosterol to fecosterol in the ergosterol biosynthetic pathway by methylating position C-24; localized to both lipid particles and mitochondrial outer membrane	Verified	-----	1,43	-----	ADR196W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-151)	-----	---	GO:0006696	
YML013W	-2	0	SEL1	Protein involved in ER-associated protein degradation; proposed to coordinate the assembly of proteins involved in ERAD; contains a UBX (ubiquitin regulatory X) domain and a ubiquitin-associated (UBA) domain	Verified	dubious ORF YML012C-A overlaps 5' of gene	1,05	-----	ADR182W (<i>Ashbya gossypii</i> , 4E-79)	-----	---	GO:0009306 GO:0030433 GO:0043161	
YML024W	-2	0	RPS17A	Ribosomal protein 51 (rp51) of the small (40S) subunit; nearly identical to Rps17Bp and has similarity to rat S17 ribosomal protein	Verified	-----	-----	-----	YDR447C (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 2E-56)	40S ribosomal protein S17	-----	---	GO:0000028 GO:0000723 GO:0006412
YML036W	2	0	CGI121	Protein involved in telomere uncapping and elongation as component of the KEOPS protein complex with Bud32p, Kae1p, Pcc1p, and Gon7p; also shown to be a component of the EKC protein complex; homolog of human CGI-121	Verified	-----	-----	-----	ABR201W (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-24)	PRPK (p53-related protein kinase)-binding protein	-----	---	GO:0000723 GO:0045944
YML062W	-2	0	SUR7	Putative integral membrane protein; component of eisosomes; associated with endocytosis, along with Pil1p and Lsp1p; sporulation and plasma membrane sphingolipid content are altered in mutants	Verified	-----	-----	-----	orf19.3414 (<i>Candida albicans</i> , 2E-45)	-----	---	GO:0006897 GO:0030437	
YML062C	0	-2	MFT1	Subunit of the THO complex, which is a nuclear complex comprised of Hpr1p, Mft1p, Rlr1p, and Thp2p, that is involved in transcription elongation and mitotic recombination; involved in telomere maintenance	Verified	-----	0,49	-----	AER130W (<i>Ashbya gossypii</i> , 7E-14)	-----	---	GO:0000723 GO:0006310 GO:0006368 GO:0006406	
YML067C	-2	0	ERV41	Protein localized to COPII-coated vesicles, forms a complex with Erv46p; involved in the membrane fusion stage of transport; has homology to human ERGIC2 (PTX1) protein	Verified	-----	-----	-----	AER136W (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-87)	-----	---	GO:0006888	

YML071C	-2	0	COG8	Component of the conserved oligomeric Golgi complex (Cog1p through Cog8p), a cytosolic tethering complex that functions in protein trafficking to mediate fusion of transport vesicles to Golgi compartments	Verified	-----	-----	-----	AER147W (Ashbya gossypii, 1E-56)	-----	---	GO:0006891	
YML097C	-2	0	VPS9	A guanine nucleotide exchange factor involved in vesicle-mediated vacuolar protein transport; specifically stimulates the intrinsic guanine nucleotide exchange activity of Vps21p/Rab5; similar to mammalian ras inhibitors; binds ubiquitin	Verified	-----	1,71	-----	ADL349W (Ashbya gossypii, 9E-96)	BTB/POZ domain-containing protein KCTD7	-----	---	GO:0000723 GO:0006623
YML103C	-2	-2	NUP188	Subunit of the nuclear pore complex (NPC), involved in the structural organization of the complex and of the nuclear envelope, also involved in nuclear envelope permeability, interacts with Pom152p and Nic96p	Verified	-----	1,40	-----	AER284W (Ashbya gossypii, 1E-261)	-----	-----	---	GO:0006406 GO:0006407 GO:0006408 GO:0006409 GO:0006607 GO:0006608 GO:0006609 GO:0006610 GO:0006611 GO:0006999
YML112 W	-2	-4	CTK3	Gamma subunit of C-terminal domain kinase I (CTDK-I), which phosphorylates the C-terminal repeated domain of the RNA polymerase II large subunit (Rpo21p) to affect both transcription and pre-mRNA 3' end processing	Verified	-----	0,91	> internalization	ABL130C (Ashbya gossypii, 5E-39)	-----	-----	---	GO:0006468 GO:0031124 GO:0032786
YMR010 W	0	-2	YMR010 W	Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm; YMR010W is not an essential gene; YMR010W mRNA is transcribed with AD1	Uncharacterized	-----	0,56	-----	ADR022W (Ashbya gossypii, 9E-79)	PQ loop repeat containing 1 (PQLC1)	-----	---	GO:0008152
YMR014 W	-2	0	BUD22	Protein involved in bud-site selection; diploid mutants display a random budding pattern instead of the wild-type bipolar pattern	Verified	-----	0,75	-----	ABR052W (Ashbya gossypii, 1E-26)	-----	-----	---	GO:0000282 GO:0042254
YMR021C	-2	-2	MAC1	Copper-sensing transcription factor involved in regulation of genes required for high affinity copper transport	Verified	-----	0,84	-----	ABR058C (Ashbya gossypii, 1E-60)	-----	-----	---	GO:0006876 GO:0042176 GO:0042493 GO:0045944
YMR022 W	-2	-2	QR18	Ubiquitin conjugating enzyme, involved in the ER-associated protein degradation pathway; requires Cue1p for recruitment to the ER membrane; proposed to be involved in chromatin assembly	Verified	-----	1,10	-----	ABR059W (Ashbya gossypii, 2E-73)	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 G2 (EC 6.3.2.19) (Ubiquitin-protein ligase G2) (Ubiquitin carrier protein G2)	-----	---	GO:0006333 GO:0030433
YMR032 W	-4	0	HOF1	Bud neck-localized, SH3 domain-containing protein required for cytokinesis; regulates actomyosin ring dynamics and septin localization; interacts with the formins, Bni1p and Bnr1p, and with Cyk3p, Vrp1p, and Bni5p	Verified	-----	0,49	-----	ABR082W (Ashbya gossypii, 2E-67)	Growth-arrest-specific protein 7 (GAS-7)	-----	---	GO:0000910 GO:0006974
YMR038C	-4	0	CCS1	Copper chaperone for superoxide dismutase Sod1p, involved in oxidative stress protection; Met-X-Cys-X2-Cys motif within the N-terminal portion is involved in insertion of copper into Sod1p under conditions of copper deprivation	Verified	-----	1,51	-----	ABR091C (Ashbya gossypii, 3E-55)	-----	-----	---	GO:0015680
YMR058 W	-2	-4	FET3	Ferro-O2-oxidoreductase required for high-affinity iron uptake and involved in mediating resistance to copper ion toxicity; belongs to class of integral membrane multicopper oxidases	Verified	dubious ORF YMR057C upstream to gene	3,09	-----	ADR132W (Ashbya gossypii, 1E-261)	-----	-----	---	GO:0006827 GO:0033215 GO:0046688
YMR060C	0	-2	SAM37	Component of the mitochondrial outer membrane sorting and assembly machinery (SAM) complex; required for the sorting of some proteins to the outer membrane after import by the TOM complex	Verified	-----	-----	-----	ADR136C (Ashbya gossypii, 3E-24)	-----	-----	---	GO:0007008

YMR063 W	2	2	RIM9	Protein of unknown function, involved in the proteolytic activation of Rim101p in response to alkaline pH; has similarity to <i>A. nidulans</i> Pall; putative membrane protein	Verified	-----	1,05	-----	ADR141W (<i>Ashbya gossypii</i> , 3E-9)	-----	---	GO:0030437
YMR077C	-2	2	VPS20	Myristoylated subunit of ESCRTIII, the endosomal sorting complex required for transport of transmembrane proteins into the multivesicular body pathway to the lysosomal/vacuolar lumen; cytoplasmic protein recruited to endosomal membranes	Verified	-----	3,67	-----	AGR014W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-34)	Charged multivesicular body protein 6 (Chromatin modifying protein 6) (Vacuolar protein sorting 20) (hVps20)	---	GO:0043162 GO:0045324
YMR092C	2	0	AIP1	Actin cortical patch component, interacts with the actin depolymerizing factor cofilin; required to restrict cofilin localization to cortical patches; contains WD repeats	Verified	-----	1,11	-----	ABL043W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	-----	---	GO:0006970 GO:0030042
YMR123 W	0	-4	PKR1	V-ATPase assembly factor, functions with other V-ATPase assembly factors in the ER to efficiently assemble the V-ATPase membrane sector (V _{sub} 0</sub>); overproduction confers resistance to <i>Pichia farinosa</i> killer toxin	Verified	-----	1,12	-----	orf19_2378 (<i>Candida albicans</i> , 4E-11)	-----	---	GO:0006461
YMR154C	2	2	RIM13	Calpain-like cysteine protease involved in proteolytic activation of Rim101p in response to alkaline pH; has similarity to <i>A. nidulans</i> paIB	Verified	-----	0,91	-----	ADR274C (<i>Ashbya gossypii</i> , 8E-41)	-----	---	GO:0006461
YMR161 W	-2	0	HLJ1	Co-chaperone for Hsp40p, anchored in the ER membrane; with its homolog Hdj1p promotes ER-associated protein degradation (ERAD) of integral membrane substrates; similar to <i>E. coli</i> DnaJ	Verified	-----	-----	-----	AFL190C (<i>Ashbya gossypii</i> , 3E-31)	DnaJ homolog subfamily B member 12	---	GO:0006457 GO:0030433
YMR164C	-4	0	MSS11	Transcription factor involved in regulation of invasive growth and starch degradation; controls the activation of MUC1 and STA2 in response to nutritional signals	Verified	-----	-----	-----	AFL194W (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-9)	Trinucleotide repeat-containing gene 6A protein (CAG repeat protein 26) (Glycyl-tryptophan protein of 182 kDa) (GW182 autoantigen) (GW1 protein) (EMS1 interactor protein)	---	GO:0005983 GO:0007124 GO:0045944
YMR179 W	-2	0	SPT21	Protein required for normal transcription at several loci including HTA2-HTB2 and HHF2-HHT2, but not required at the other histone loci; functionally related to Spt10p; involved in telomere maintenance	Verified	-----	1,59	-----	AFL132C (<i>Ashbya gossypii</i> , 5E-39)	-----	---	GO:0000723 GO:0006357
YMR198 W	-2	0	CIK1	Kinesin-associated protein required for both karyogamy and mitotic spindle organization, interacts stably and specifically with Kar3p and may function to target this kinesin to a specific cellular role; has similarity to <i>Vik1p</i>	Verified	-----	2,13	-----	AFL170C (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-28)	-----	---	GO:0000070 GO:0000132 GO:0000742 GO:0007126 GO:0030472
YMR202 W	-2	-4	ERG2	C-8 sterol isomerase, catalyzes the isomerization of the delta-8 double bond to the delta-7 position at an intermediate step in ergosterol biosynthesis	Verified	-----	0,54	-----	AFL181C (<i>Ashbya gossypii</i> , 5E-95)	opioid receptor, sigma 1 isoform 4	---	GO:0000723 GO:0006696
YMR205C	-2	0	PFK2	Beta subunit of heterooctameric phosphofructokinase involved in glycolysis, indispensable for anaerobic growth, activated by fructose-2,6-bisphosphate and AMP, mutation inhibits glucose induction of cell cycle-related genes	Verified	-----	0,66	-----	SPBC16H 5.02 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i> , 1E-261)	6-phosphofructokinase type C (EC 2.7.1.11) (Phosphofructokinase 1) (Phosphofructokinase) (Phosphofructo-1-kinase isozyme C) (PFK-C) (6-phosphofructokinase, platelet type)	---	GO:0006096

YMR224C	-2	0	MRE11	Subunit of a complex with Rad50p and Xrs2p (RMX complex) that functions in repair of DNA double-strand breaks and in telomere stability, exhibits nuclease activity that appears to be required for RMX function; widely conserved	Verified	-----	2,52	-----	AFR553C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	Double-strand break repair protein MRE11A (MRE11 homolog 1) (MRE11 meiotic recombination 11 homolog A)	Ataxia-telangiectasia-like disorder	GO:0000706 GO:0000723 GO:0000727 GO:0006281 GO:0006303 GO:0030437 GO:0042138 GO:0051037
YMR231W	-4	-4	PEP5	Component of CORVET tethering complex; peripheral vacuolar membrane protein required for protein trafficking and vacuole biogenesis; interacts with Pep7p	Verified	-----	0,93	-----	ABL012C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	Vacuolar protein sorting 11 (hVPS11)	---	GO:0006895 GO:0006904 GO:0042144 GO:0045324
YMR238W	-2	0	DFG5	Putative mannosidase, essential glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane protein required for cell wall biogenesis in bud formation, involved in filamentous growth, homologous to Dcw1p	Verified	-----	1,20	-----	AFR530W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-164)	-----	---	GO:0007117 GO:0007124 GO:0009272
YMR264W	0	-2	CUE1	Endoplasmic reticulum membrane protein that recruits the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc7p to the ER where it functions in protein degradation; contains a CUE domain that binds ubiquitin to facilitate intramolecular monoubiquitination	Verified	-----	1,36	-----	AER279W (<i>Ashbya gossypii</i> , 4E-30)	-----	---	GO:0030433 GO:0045184
YMR275C	-4	2	BUL1	Ubiquitin-binding component of the Rsp5p E3-ubiquitin ligase complex, functional homolog of Bul2p, disruption causes temperature-sensitive growth, overexpression causes misrouting of amino acid permeases	Verified	-----	0,61	-----	ABL131C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	-----	---	GO:0000001 GO:0000209 GO:0000209 GO:0006513
YMR319C	2	0	FET4	Low-affinity Fe(II) transporter of the plasma membrane	Verified	-----	0,38	-----	SPBP26C9 03c (<i>Schizosaccharomyces pombe</i> , 3E-77)	-----	---	GO:0000040 GO:0015877 GO:0015880
YNL001W	-2	0	DOM34	Endoribonuclease; functions in no-go mRNA decay, protein translation to promote G1 progression and differentiation, required for meiotic cell division; similar to the eukaryotic Pelota	Verified	-----	0,69	-----	AAL001W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-123)	-----	---	GO:0006412 GO:0007124 GO:0007128 GO:0030437
YNL021W	-2	2	HDA1	Putative catalytic subunit of a class II histone deacetylase complex that also contains Hda2p and Hda3p; Hda1p interacts with the Hda2p-Hda3p subcomplex to form an active tetramer; deletion increases histone H2B, H3 and H4 acetylation	Verified	-----	1,00	-----	orf19.2606 (<i>Candida albicans</i> , 1E-261)	Histone deacetylase 6 (HD6)	---	GO:0001308 GO:0006325 GO:0006355 GO:0006476
YNL032W	0	2	SIW14	Tyrosine phosphatase that plays a role in actin filament organization and endocytosis; localized to the cytoplasm	Verified	-----	0,64	-----	ADL204W (<i>Ashbya gossypii</i> , 5E-74)	-----	---	GO:0000723 GO:0006470 GO:0006897 GO:0006950 GO:0007015
YNL051W	-2	0	COG5	Component of the conserved oligomeric Golgi complex (Cog1p through Cog8p), a cytosolic tethering complex that functions in protein trafficking to mediate fusion of transport vesicles to Golgi compartments	Verified	-----	-----	-----	ADL241W (<i>Ashbya gossypii</i> , 9E-49)	-----	---	GO:0006891
YNL059C	-2	0	ARP5	Nuclear actin-related protein involved in chromatin remodeling, component of chromatin-remodeling enzyme complexes	Verified	-----	0,50	-----	ADL253C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	-----	---	GO:0006338 GO:0006623
YNL064C	-2	-2	YDJ1	Protein chaperone involved in regulation of the HSP90 and HSP70 functions; involved in protein translocation across membranes; member of the DnaJ family	Verified	-----	1,78	-----	ADL257C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-128)	DnaJ homolog subfamily A member 2 (HIRA-interacting protein 4) (Cell cycle progression restoration gene 3 protein) (Dnj3)	---	GO:0006458 GO:0006626 GO:0030433 GO:0042026 GO:0045047

YNL080C	-2	-2	EOS1	Protein involved in N-glycosylation; deletion mutation confers sensitivity to oxidative stress and shows synthetic lethality with mutations in the spindle checkpoint genes BUB3 and MAD1; YNL080C is not an essential gene	Verified	-----	2,45	-----	AER423C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-63)	-----	---	GO:0006487 GO:0006979
YNL136W	-2	2	EAF7	Subunit of the NuA4 histone acetyltransferase complex, which acetylates the N-terminal tails of histones H4 and H2A	Verified	-----	0,98	-----	AFR063W (<i>Ashbya gossypii</i> , 5E-24)	-----	---	GO:0006281 GO:0006357 GO:0016573
YNL147W	-4	-2	LSM7	Lsm (Like Sm) protein; part of heteroheptameric complexes (Lsm2p-7p and either Lsm1p or 8p); cytoplasmic Lsm1p complex involved in mRNA decay, nuclear Lsm8p complex part of U6 snRNP and possibly involved in processing tRNA, snoRNA, and rRNA	Verified	-----	2,21	< internalization	AFR053C (<i>Ashbya gossypii</i> , 4E-28)	LSM7 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae) (LSM7)	---	GO:0000398 GO:0000723 GO:0006402
YNL148C	-2	-2	ALF1	Alpha-tubulin folding protein, similar to mammalian cofactor B; Alf1p-GFP localizes to cytoplasmic microtubules; required for the folding of alpha-tubulin and may play an additional role in microtubule maintenance	Verified	-----	-----	-----	AFR054W (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-24)	Tubulin-specific chaperone B (Tubulin folding cofactor B) (Cytoskeleton associated protein 1) (Cytoskeleton-associated protein CKAPI)	---	GO:0007023 GO:0007024
YNL155W	2	0	YNL155W	Putative protein of unknown function, contains DHHC domain, also predicted to have thiol-disulfide oxidoreductase active site	Uncharacterized	-----	1,20	-----	AFR041C (<i>Ashbya gossypii</i> , 9E-44)	AN1-type zinc finger protein 1	---	GO:0008150
YNL197C	0	-2	WHI3	RNA binding protein that sequesters CLN3 mRNA in cytoplasmic foci; cytoplasmic retention factor for Cdc28p and associated cyclins; regulates cell fate and dose-dependently regulates the critical cell size required for passage through Start	Verified	-----	0,81	-----	ABL158C (<i>Ashbya gossypii</i> , 4E-46)	-----	---	GO:0001403 GO:0007124 GO:0008361 GO:0051220
YNL229C	-2	-2	URE2	Nitrogen catabolite repression transcriptional regulator that acts by inhibition of GLN3 transcription in good nitrogen source; altered form of Ure2p creates [URE3] prion	Verified	-----	-----	< internalization	ABL195C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-139)	-----	---	GO:0000723 GO:0006808 GO:0010044 GO:0032447 GO:0042994
YNL241C	-2	0	ZWF1	Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), catalyzes the first step of the pentose phosphate pathway; involved in adapting to oxidative stress; homolog of the human G6PD which is deficient in patients with hemolytic anemia	Verified	-----	2,38	-----	ABL206C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (EC 1.1.1.49) (G6PD)	Favism, Hemolytic anemia due to G6PD deficiency	GO:0006740 GO:0009051 GO:0042542 GO:0045013
YNL280C	-2	-6	ERG24	C-14 sterol reductase, acts in ergosterol biosynthesis; mutants accumulate the abnormal sterol 14-dihydroergosterol (ergosta-8,14-dienol), and are viable under anaerobic growth conditions but inviable on rich medium under aerobic conditions	Verified	-----	0,87	-----	AFR346W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-169)	Lamin B receptor (Integral nuclear envelope inner membrane protein) (LMN2R)	Greenberg dysplasia, Pelger-Huet anomaly	GO:0006696
YNL294C	2	2	RIM21	Component of the RIM101 pathway, has a role in cell wall construction and alkaline pH response; has similarity to A. nidulans PalH	Verified	-----	0,69	-----	AEL202C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-80)	-----	---	GO:0001403 GO:0009272 GO:0030437
YNL302C	-2	0	RPS19B	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit, required for assembly and maturation of pre-40S particles; mutations in human RPS19 are associated with Diamond Blackfan anemia; nearly identical to Rps19Ap	Verified	-----	-----	-----	YOL121C (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 3E-70)	40S ribosomal protein S19	Anemia, Diamond-Blackfan	GO:0000056 GO:0006364 GO:0006412 GO:0042274
YNL325C	-2	-2	FIG4	Protein that forms a complex with Vac14p and is involved in turnover of PI3,5P2 (phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate) after hyperosmotic shock; required for efficient mating; member of a protein family with a	Verified	dubious ORF YNL324W overlaps 5' of gene	0,70	-----	ADL195C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	SAC domain-containing protein 3	---	GO:0000753

				domain homologous to Sac1p								
YNL329C	-2	0	PEX6	AAA-peroxin that heterodimerizes with AAA-peroxin Pex6p and participates in the recycling of peroxisomal signal receptor Pex5p from the peroxisomal membrane to the cytosol	Verified	-----	1,20	-----	<i>orf19.3573</i> (<i>Candida albicans</i> , 1E-261)	Peroxisome assembly factor 2 (PAF-2) (Peroxisomal-type ATPase 1) (Peroxin-6) (Peroxisomal biogenesis factor 6)	Peroxisomal biogenesis disorder, complementation group 4	GO:0001302 GO:0016562
YNR006W	-4	2	VPS27	Endosomal protein that forms a complex with Hse1p; required for recycling Golgi proteins, forming luminal membranes and sorting ubiquitinated proteins destined for degradation; has Ubiquitin Interaction Motifs which bind ubiquitin (Ubi4p)	Verified	dubious ORF YNR005C overlaps 5' of gene	1,83	-----	<i>AFL176C</i> (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-119)	Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (Protein pp110) (Hrs)	---	GO:0006623 GO:0045053 GO:0045324
YNR023W	-4	-2	SNF12	73 kDa subunit of the SWI/SNF chromatin remodeling complex involved in transcriptional regulation; homolog of Rsc6p subunit of the RSC chromatin remodeling complex; deletion mutants are temperature-sensitive	Verified	-----	0,94	-----	<i>AAR060C</i> (<i>Ashbya gossypii</i> , 5E-80)	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily D member 1 (SWI/SNF complex 60 kDa subunit) (60 kDa BRG-1/Brm associated factor subunit A) (BRG1-associated factor 60A)	---	GO:0006338
YNR051C	-2	0	BRE5	Ubiquitin protease cofactor, forms deubiquitination complex with Ubp3p that coregulates anterograde and retrograde transport between the endoplasmic reticulum and Golgi compartments; null is sensitive to brefeldin A	Verified	-----	0,48	-----	<i>ABR118C</i> (<i>Ashbya gossypii</i> , 6E-51)		---	GO:0016579
YNR052C	-4	-2	POP2	RNase of the DEDD superfamily, subunit of the Ccr4-Not complex that mediates 3' to 5' mRNA deadenylation	Verified	-----	0,88	-----	<i>ABR119C</i> (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-95)	CCR4-NOT transcription complex subunit 8 (CCR4-associated factor 8) (CAF1-like protein) (CALIFp) (CAF2)	---	GO:0000289 GO:0006357 GO:0006368
YOL004W	0	-2	SIN3	Component of the Sin3p-Rpd3p histone deacetylase complex, involved in transcriptional repression and activation of diverse processes, including mating-type switching and meiosis; involved in the maintenance of chromosomal integrity	Verified	-----	1,07	-----	<i>orf19.6011</i> (<i>Candida albicans</i> , 1E-261)	Paired amphipathic helix protein Sin3a (Transcriptional corepressor Sin3a) (Histone deacetylase complex subunit Sin3a)	---	GO:0000122 GO:0000183 GO:0000723 GO:0006303 GO:0006348 GO:0016575 GO:0030466 GO:0045944
YOL018C	-2	0	TLG2	Syntaxin-like t-SNARE that forms a complex with Tlg1p and Vti1p and mediates fusion of endosome-derived vesicles with the late Golgi; binds Vps45p, which prevents Tlg2p degradation and also facilitates t-SNARE complex formation	Verified	-----	0,81	-----	<i>AEL026C</i> (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-67)	Syntaxin-16 (Syn16)	---	GO:0006906
YOL049W	-6	0	GSH2	Glutathione synthetase, catalyzes the ATP-dependent synthesis of glutathione (GSH) from gamma-glutamylcysteine and glycine; induced by oxidative stress and heat shock	Verified	-----	0,99	-----	<i>ACR284C</i> (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-126)	Glutathione synthetase (EC 6.3.2.3) (Glutathione synthase) (GSH synthetase) (GSH-S)	5-oxoprolinuria Hemolytic anemia due to glutathione synthetase deficiency	GO:0006750 GO:0009408
YOL051W	-4	0	GAL11	Subunit of the RNA polymerase II mediator complex; associates with core polymerase subunits to form the RNA polymerase II holoenzyme; affects transcription by acting as target of activators and	Verified	-----	0,56	-----	<i>ACR285C</i> (<i>Ashbya gossypii</i> , 4E-51)		---	GO:0000723 GO:0006366

				repressors									
YOL060C	-2	2	MAM3	Protein required for normal mitochondrial morphology, has similarity to hemolysins	Verified	-----	0,91	-----	ADR312W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	-----	---	GO:0007005 GO:0030026	
YOL072W	0	-2	THP1	Nuclear pore-associated protein, forms a complex with Sac3p that is involved in transcription and in mRNA export from the nucleus; contains a PAM domain implicated in protein-protein binding	Verified	-----	0,78	-----	AER203C (<i>Ashbya gossypii</i> , 6E-79)	PCI domain-containing protein 2 (CSN12-like protein)	---	GO:0000282 GO:0006283 GO:0006310 GO:0006368 GO:0006405	
YOL075C	2	0	YOL075C	Putative ABC transporter	Uncharacterized	-----	0,60	-----	orf19.4531 (<i>Candida albicans</i> , 1E-261)	ATP-binding cassette sub-family G member 8 (Sterolin-2)	Sitosterolemia	GO:0006810	
YOL122C	2	-2	SMF1	Divalent metal ion transporter with a broad specificity for di-valent and tri-valent metals; post-translationally regulated by levels of metal ions; member of the Nramp family of metal transport proteins	Verified	-----		-----	ADL159C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-168)	Natural resistance-associated macrophage protein 2 (NRAMP 2) (Divalent metal transporter 1) (DMT1)	---	GO:0006828	
YOL148C	-4	0	SPT20	Subunit of the SAGA transcriptional regulatory complex, involved in maintaining the integrity of the complex	Verified	-----		-----	AGR401W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-107)	---	---	GO:0016568 GO:0016573	
YOL151W	-4	0	GRE2	NADPH-dependent methylglyoxal reductase (D-lactaldehyde dehydrogenase); stress induced (osmotic, ionic, oxidative, heat shock and heavy metals); regulated by the HOG pathway	Verified	-----	3,50	-----	YDR541C (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 1E-115)	---	---	GO:0006950 GO:0009636	
YOR026W	0	-2	BUB3	Kinetochore checkpoint WD40 repeat protein that localizes to kinetochores during prophase and metaphase, delays anaphase in the presence of unattached kinetochores; forms complexes with Mad1p-Bub1p and with Cdc20p, binds Mad2p and Mad3p	Verified	-----	0,70	-----	AEL226W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-48)	---	---	GO:0007094	
YOR030W	2	2	DFG16	Probable multiple transmembrane protein, involved in diploid invasive and pseudohyphal growth upon nitrogen starvation; required for accumulation of processed Rim101p	Verified	-----	0,79	-----	AEL219W (<i>Ashbya gossypii</i> , 7E-43)	---	---	GO:0007124 GO:0016485	
YOR036W	-6	-2	PEP12	Target membrane receptor (t-SNARE) for vesicular intermediates traveling between the Golgi apparatus and the vacuole; controls entry of biosynthetic, endocytic, and retrograde traffic into the prevacuolar compartment; syntaxin	Verified	-----	0,84	> internalization	ACR092C (<i>Ashbya gossypii</i> , 3E-43)	Syntaxin-12	---	GO:0006896	
YOR043W	-2	0	WHI2	Protein required, with binding partner Psr1p, for full activation of the general stress response, possibly through Msn2p dephosphorylation; regulates growth during the diauxic shift; negative regulator of G1 cyclin expression	Verified	-----	1,78	> internalization	ACR082C (<i>Ashbya gossypii</i> , 3E-99)	---	---	GO:0000723 GO:0006897 GO:0006950 GO:0007015 GO:0009408 GO:0009651 GO:0040008	
YOR068C	-2	2	VAM10	Protein involved in vacuole morphogenesis; acts at an early step of homotypic vacuole fusion that is required for vacuole tethering	Verified	-----	0,87	< internalization	-----	-----	---	GO:0042144	
YOR069W	-4	2	VP55	Nexin-1 homolog required for localizing membrane proteins from a prevacuolar/late endosomal compartment back to the late Golgi apparatus; structural component of the retromer membrane coat complex; forms a retromer subcomplex with Vps17p	Verified	-----	1,43	-----	ADR211W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-115)	Sorting nexin-1	---	GO:0042147 GO:0045053	

YOR079C	-4	0	ATX2	Golgi membrane protein involved in manganese homeostasis; overproduction suppresses the <i>sod1</i> (copper, zinc superoxide dismutase) null mutation	Verified	-----	0,90	-----	ADR229C (<i>Ashbya gossypii</i> , 4E-22)	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 9	---	GO:0030026
YOR080W	-2	0	DIA2	Origin-binding F-box protein that forms an SCF ubiquitin ligase complex with Skp1p and Cdc53p; plays a role in DNA replication, involved in invasive and pseudohyphal growth	Verified	-----	1,12	-----	ADR230W (<i>Ashbya gossypii</i> , 9E-39)	-----	---	GO:0001403 GO:0006260 GO:0016567
YOR089C	-2	0	VPS21	GTPase required for transport during endocytosis and for correct sorting of vacuolar hydrolases; localized in endocytic intermediates; detected in mitochondria; geranylgeranylation required for membrane association; mammalian Rab5 homolog	Verified	-----	0,82	-----	ACL084C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-72)	Ras-related protein Rab-5A.	---	GO:0006623 GO:0006897
YOR106W	-4	-2	VAM3	Syntaxin-related protein required for vacuolar assembly; functions with Vam7p in vacuolar protein trafficking; member of the syntaxin family of proteins	Verified	-----	0,40	< internalization	AFL232W (<i>Ashbya gossypii</i> , 5E-25)	-----	---	GO:0006896 GO:0006906
YOR132W	-2	2	VPS17	Subunit of the membrane-associated retromer complex essential for endosome-to-Golgi retrograde protein transport; peripheral membrane protein that assembles onto the membrane with Vps5p to promote vesicle formation	Verified	-----	1,75	-----	AFR143C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-139)	-----	---	GO:0042147
YOR141C	-4	0	ARP8	Nuclear actin-related protein involved in chromatin remodeling, component of chromatin-remodeling enzyme complexes	Verified	-----	1,29	-----	AFR135W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	Actin-related protein 8	---	GO:0006312 GO:0006338 GO:0006974
YOR219C	-2	0	STE13	Dipeptidyl aminopeptidase, Golgi integral membrane protein that cleaves on the carboxyl side of repeating -X-Ala- sequences; required for maturation of alpha factor, transcription is induced by a-factor	Verified	-----	1,58	-----	ACR103C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	Dipeptidyl peptidase 4 (EC 3.4.14.5) (Dipeptidyl peptidase IV) (DPP IV) (T-cell activation antigen CD26) (TP103) (Adenosine deaminase complexing protein 2) (ADABP) [Contains: Dipeptidyl peptidase 4 membrane form (Dipeptidyl peptidase IV membrane form)]	---	GO:0007323
YOR221C	-2	0	MCT1	Predicted malonyl-CoA:ACP transferase, putative component of a type-II mitochondrial fatty acid synthase that produces intermediates for phospholipid remodeling	Verified	-----	0,88	-----	ACR108C (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-33)	-----	---	GO:0006631 GO:0009060
YOR270C	0	-6	VPH1	Subunit a of vacuolar-ATPase V0 domain, one of two isoforms (Vph1p and Stv1p); Vph1p is located in V-ATPase complexes of the vacuole while Stv1p is located in V-ATPase complexes of the Golgi and endosomes	Verified	-----	0,52	-----	SPAC16E8.07c (<i>Schizosaccharomyces pombe</i> , 1E-261)	Vacuolar proton translocating ATPase 116 kDa subunit a isoform 1 (V-ATPase 116-kDa isoform a1) (Clathrin-coated vesicle/synaptic vesicle proton pump 116 kDa subunit) (Vacuolar proton pump subunit 1) (Vacuolar adenosine triphosphatase subunit Ac116)	---	GO:0006461 GO:0006797 GO:0007035

YOR275C	2	2	RIM20	Protein involved in proteolytic activation of Rim101p in response to alkaline pH; PalA/AIP1/Alix family member; interaction with the ESCRT-III subunit Snf7p suggests a relationship between pH response and multivesicular body formation	Verified	-----	0,67	-----	AER342C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-112)	Programmed cell death 6-interacting protein (PDCD6-interacting protein) (ALG-2 interacting protein 1) (Hp95)	---	GO:0001403 GO:0006508 GO:0016485 GO:0030435
YOR322C	-4	0	LDB19	Protein of unknown function involved in maintenance of proper telomere length; null mutant shows a reduced affinity for the alcian blue dye suggesting a decreased net negative charge of the cell surface	Verified	-----	0,54	-----	ACR291C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-121)	-----	---	GO:0000723
YOR323C	-4	0	PRO2	Gamma-glutamyl phosphate reductase, catalyzes the second step in proline biosynthesis	Verified	-----	0,68	-----	ADR351C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-172)	Delta 1-pyrraline-5-carboxylate synthetase (P5CS) (Aldehyde dehydrogenase 18 family member A1) [Includes: Glutamate 5-kinase (EC 2.7.2.11) (Gamma-glutamyl kinase) (GK); Gamma-glutamyl phosphate reductase (GPR)]	P5CS deficiency	GO:0006561
YOR332W	-4	-4	VMA4	Subunit E of the eight-subunit V1 peripheral membrane domain of the vacuolar H ⁺ -ATPase (V-ATPase), an electrogenic proton pump found throughout the endomembrane system; required for the V1 domain to assemble onto the vacuolar membrane	Verified	dubious ORF YOR331C overlaps 5' of gene	1,24	< internalization	ADR358W (<i>Ashbya gossypii</i> , 5E-52)	Vacuolar ATP synthase subunit E (EC 3.6.3.14) (V-ATPase E subunit) (Vacuolar proton pump E subunit) (V-ATPase 31 kDa subunit) (P31)	---	GO:0007035
YOR357C	-2	2	SNX3	Sorting nexin required to maintain late-Golgi resident enzymes in their proper location by recycling molecules from the prevacuolar compartment; contains a PX domain and sequence similarity to human Snx3p	Verified	-----	1,17	-----	ADR390C (<i>Ashbya gossypii</i> , 3E-48)	Sorting nexin-11	---	GO:0008104
YPL002C	-4	2	SNF8	Component of the ESCRT-II complex, which is involved in ubiquitin-dependent sorting of proteins into the endosome; appears to be functionally related to SNF7; involved in glucose depression	Verified	-----	1,10	< internalization	AGL002C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-77)	Vacuolar sorting protein SNF8 (ELL-associated protein of 30 kDa)	---	GO:0000433 GO:0000723 GO:0006623 GO:0043162
YPL031C	-6	-2	PHO85	Cyclin-dependent kinase, with tan cyclin partners; involved in environmental stress response; in phosphate-rich conditions, Pho85p-Pho80p complex phosphorylates Pho4p which in turn represses PHO5	Verified	-----	1,79	-----	AGL242C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-139)	-----	---	GO:0000723 GO:0005977 GO:0006468 GO:0007049 GO:0042493
YPL042C	-4	0	SSN3	Cyclin-dependent protein kinase, component of RNA polymerase II holoenzyme; involved in phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain; involved in glucose repression	Verified	-----	0,34	-----	AGL249C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-179)	Cell division protein kinase 8 (EC 2.7.1.37) (Protein kinase K35)	---	GO:0000122 GO:0000723 GO:0006468 GO:0007126 GO:0045449
YPL045W	-4	-2	VPS16	Subunit of the vacuole fusion and protein sorting HOPS complex and the CORVET tethering complex; part of the Class C Vps complex essential for membrane docking and fusion at Golgi-to-endosome and endosome-to-vacuole protein transport stages	Verified	-----	0,94	< internalization	AGL252W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-178)	Vacuolar protein sorting 16 (hVPS16)	---	GO:0006623 GO:0006895 GO:0007033 GO:0042144 GO:0045324
YPL051W	-2	0	ARL3	GTPase of the Ras superfamily required to recruit Arl1p to the Golgi; similar to ADP-ribosylation factor	Verified	-----	0,87	< internalization	AGL261W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-82)	ARF-related protein 1 (ARP)	---	GO:0006886 GO:0043001

YPL055C	-4	0	LGE1	Protein of unknown function; null mutant forms abnormally large cells	Verified	-----	1,37	-----	ADR060C (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-10)	-----	---	GO:0006513 GO:0008361 GO:0016571 GO:0016574
YPL065W	-4	2	VPS28	Component of the ESCRT-I complex, which is involved in ubiquitin-dependent sorting of proteins into the endosome; involved in transport of precursors for soluble vacuolar hydrolases from the late endosome to the vacuole	Verified	-----	0,66	-----	ADR043W (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-60)	VPS28 protein homolog	-----	GO:0000723 GO:0006612 GO:0006623 GO:0043162
YPL084W	-4	2	BRO1	Cytoplasmic class E vacuolar protein sorting (VPS) factor that coordinates deubiquitination in the multivesicular body (MVB) pathway by recruiting Doa4p to endosomes	Verified	-----	0,87	< internalization	AGR204W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	-----	---	GO:0000723 GO:0006511 GO:0007034 GO:0007584 GO:0016579 GO:0043328
YPL091W	-4	0	GLR1	Cytosolic and mitochondrial glutathione oxidoreductase, converts oxidized glutathione to reduced glutathione	Verified	-----	-----	-----	AGR196W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	Glutathione reductase, mitochondria I precursor (EC 1.8.1.7) (GR) (GRase)	Hemolytic anemia due to glutathione reductase deficiency	GO:0006979
YPL097W	-2	0	MSY1	Mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase	Verified	-----	0,76	-----	ABR192W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-138)	Tyrosyl-tRNA synthetase, mitochondria I precursor	---	GO:0006437
YPL099C	-4	0	YPL099C	Putative protein of unknown function; the authentic, non-tagged protein is detected in highly purified mitochondria in high-throughput studies	Uncharacterized	-----	1,70	-----	ABR190C (<i>Ashbya gossypii</i> , 3E-19)	-----	---	GO:0008150
YPL101W	-2	0	ELP4	Subunit of Elongator complex, which is required for modification of wobble nucleosides in tRNA; required for Elongator structural integrity	Verified	-----	0,94	-----	ABR188W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-100)	elongation protein 4 homolog	---	GO:0006357 GO:0006400
YPL120W	-4	2	VPS30	Protein that forms a membrane-associated complex with Apg14p that is essential for autophagy; involved in a retrieval step of the carboxypeptidase Y receptor, Vps10p, to the late Golgi from the endosome; involved in vacuolar protein sorting	Verified	-----	0,95	-----	ACR154W (<i>Ashbya gossypii</i> , 7E-84)	Beclin-1 (Coiled-coil myosin-like BCL2-interacting protein) (Protein GT197)	---	GO:0006623 GO:0006914
YPL121C	-2	0	MEI5	Meiosis specific protein involved in DMC1-dependent meiotic recombination, forms heterodimer with Sae3p; proposed to be an assembly factor for Dmc1p	Verified	-----	1,21	-----	ADL276W (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-18)	-----	---	GO:0000707 GO:0007131
YPL123C	-4	0	RNY1	RNAse; member of the T(2) family of endoribonucleases	Verified	-----	0,72	-----	orf19.3926 (<i>Candida albicans</i> , 3E-64)	-----	---	GO:0000902
YPL129W	-4	0	TAF14	Subunit of TFIID, TFIIF, INO80, SWISNF, and Nua3 complexes, involved in RNA polymerase II transcription initiation and in chromatin modification; contains a YEATS domain	Verified	-----	0,85	-----	ACR099C (<i>Ashbya gossypii</i> , 4E-95)	-----	---	GO:0000114 GO:0006338 GO:0006367 GO:0016573
YPL148C	-2	0	PPT2	Phosphopantetheinyl transferase (PPTase), activates mitochondrial acyl carrier protein (Acp1p) by phosphopantetheinylation	Verified	-----	0,83	-----	ACR129W (<i>Ashbya gossypii</i> , 6E-11)	-----	---	GO:0018065
YPL162C	-2	0	YPL162C	Putative protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the membrane of vacuole with cell cycle-correlated morphology	Uncharacterized	-----	0,69	-----	AAL091C (<i>Ashbya gossypii</i> , 3E-72)	Transmembrane protein 110 (TMEM110)	---	GO:0008150
YPL166W	-2	0	ATG29	Protein specifically required for autophagy; may function in autophagosome formation at the pre-autophagosomal structure in collaboration with other autophagy proteins	Verified	-----	1,31	-----	AAL098W (<i>Ashbya gossypii</i> , 2-14)	-----	---	GO:0006914
YPL176C	-2	2	TRE1	Plasma membrane protein that binds to Irs2p and regulates ubiquitylation and vacuolar degradation of the metal transporter Smf1p; function is redundant with that of	Verified	-----	-----	-----	YOR256C (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 1E-179)	-----	---	GO:0006511

				Tre2p; has similarity to transferrin receptors									
YPL179W	0	-2	PPQ1	Putative protein serine/threonine phosphatase; null mutation enhances efficiency of translational suppressors	Verified	-----	1,36	-----	AFL051W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-148)	-----	---	GO:0006417 GO:0006470	
YPL181W	-2	-2	CTI6	Protein that relieves transcriptional repression by binding to the Cyc8p-Tup1p corepressor and recruiting the SAGA complex to the repressed promoter; contains a PHD finger domain	Verified	-----	2,63	-----	AFL052C (<i>Ashbya gossypii</i> , 5E-49)	-----	---	GO:0016575 GO:0045941	
YPL187W	-2	0	MF(ALPHA)1	Mating pheromone alpha-factor, made by alpha cells; interacts with mating type a cells to induce cell cycle arrest and other responses leading to mating; also encoded by MF(ALPHA)2, although MF(ALPHA)1 produces most alpha-factor	Verified	-----	-----	-----	YGL089C (<i>Saccharo myces cerevisiae</i> , 1E-33)	-----	---	GO:0000750	
YPL188W	-2	0	POSS5	Mitochondrial NADH kinase, phosphorylates NADH; also phosphorylates NAD(+) with lower specificity; required for the response to oxidative stress	Verified	-----	1,08	-----	AFL063W (<i>Ashbya gossypii</i> , 6E-99)	-----	---	GO:0006741 GO:0006979	
YPL195W	0	-2	APL5	Delta adaptin-like subunit of the clathrin associated protein complex (AP-3); functions in transport of alkaline phosphatase to the vacuole via the alternate pathway, suppressor of loss of casein kinase 1 function	Verified	-----	0,48	-----	AFL076W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	Adapter-related protein complex 3 delta 1 subunit (Delta-adaptin 3) (AP-3 complex delta subunit) (Delta-adaptin)	-----	---	GO:0006896 GO:0016192
YPL234C	-2	-2	TFP3	Vacuolar ATPase V0 domain subunit c, involved in proton transport activity; hydrophobic integral membrane protein (proteolipid) containing four transmembrane segments; N and C termini are in the vacuolar lumen	Verified	-----	0,64	-----	AFL141C (<i>Ashbya gossypii</i> , 3E-51)	-----	---	GO:0007035	
YPL254W	-6	0	HFI1	Adaptor protein required for structural integrity of the SAGA complex, a histone acetyltransferase-coactivator complex that is involved in global regulation of gene expression through acetylation and transcription functions	Verified	-----	1,51	-----	AFL171W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-120)	-----	---	GO:0000723 GO:0006366 GO:0016568 GO:0016573	
YPL260W	2	0	YPL260W	Putative substrate of cAMP-dependent protein kinase (PKA); green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm and nucleus; YPL260W is not an essential gene	Uncharacterized	-----	3,54	-----	ADL019W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-140)	-----	---	GO:0008150	
YPR024W	-2	0	YME1	Subunit, with Mgr1p, of the mitochondrial inner membrane F ₁ -AAA protease complex, which is responsible for degradation of unfolded or misfolded mitochondrial gene products; mutation causes an elevated rate of mitochondrial turnover	Verified	-----	1,05	-----	AGL274W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	ATP-dependent metalloprotease YME1L1 (EC 3.4.24.-) (YME1-like protein 1) (ATP-dependent metalloprotease FtsH1) (Meg-4) (Presenilin-associated metalloprotease) (PAMP)	-----	---	GO:0007005
YPR036W	-4	-4	VMA13	Subunit H of the eight-subunit V1 peripheral membrane domain of the vacuolar H ⁺ -ATPase (V-ATPase), an electrogenic proton pump found throughout the endomembrane system; serves as an activator or a structural stabilizer of the V-ATPase	Verified	-----	0,76	-----	ACR181C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-124)	-----	---	GO:0007035	

YPR065W	-4	0	ROX1	Heme-dependent repressor of hypoxic genes; contains an HMG domain that is responsible for DNA bending activity	Verified	dubious ORF YPR064W is upstream to gene	1,06	-----	orf19.2823 (<i>Candida albicans</i> , 1E-12)	-----	---	GO:0000122
YPR124W	-2	-2	CTR1	High-affinity copper transporter of the plasma membrane, mediates nearly all copper uptake under low copper conditions; transcriptionally induced at low copper levels and degraded at high copper levels	Verified	dubious ORF YPR123C upstream to gene	0,39	-----	AAR030W (<i>Ashbya gossypii</i> , 3E-55)	-----	---	GO:0015677
YPR131C	-2	0	NAT3	Catalytic subunit of the NatB N-terminal acetyltransferase, which catalyzes acetylation of the amino-terminal methionine residues of all proteins beginning with Met-Asp or Met-Glu and of some proteins beginning with Met-Asn or Met-Met	Verified	-----	1,19	-----	ADR038C (<i>Ashbya gossypii</i> , 3E-64)	N-acetyltransferase 5	---	GO:0000001 GO:0000723 GO:0007010 GO:0017196
YPR133W-A	-2	0	TOM5	Small mitochondrial outer membrane protein crucial to a binding relay for the import of proteins into mitochondria; subunit on the outer mouth of the TOM channel that accepts precursors from the receptors Tom20p and Tom22p	Verified	-----	-----	-----	AAR106C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-6)	-----	---	GO:0030150
YPR135W	-4	0	CTF4	Chromatin-associated protein, required for sister chromatid cohesion; interacts with DNA polymerase alpha (Pol1p) and may link DNA synthesis to sister chromatid cohesion	Verified	-----	1,06	> internalization	AAR103C (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	WD repeat and HMG-box DNA binding protein 1 (Acidic nucleoplasmic DNA-binding protein 1) (And-1)	---	GO:0001302 GO:0006261 GO:0006281 GO:0007064
YPR139C	0	2	VPS66	Cytoplasmic protein of unknown function involved in vacuolar protein sorting.	Verified	-----	0,61	< internalization	AGR255W (<i>Ashbya gossypii</i> , 3E-26)	-----	---	GO:0006623
YPR153W	0	-2	YPR153W	Putative protein of unknown function	Uncharacterized	-----	1,27	-----	AFR319W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-18)	-----	---	GO:0008150
YPR163C	-2	0	TIF3	Translation initiation factor eIF-4B, has RNA annealing activity; contains an RNA recognition motif and binds to single-stranded RNA	Verified	-----	0,86	-----	ABR179C (<i>Ashbya gossypii</i> , 2E-73)	Eukaryotic translation initiation factor 4B (eIF-4B)	---	GO:0006412 GO:0006413
YPR173C	-2	2	VPS4	AAA-type ATPase that is regulated by Vta1p; required for late endosome to vacuole transport; catalyzes the release of an endosomal membrane-associated class E VPS protein complex; regulates cellular sterol metabolism	Verified	-----	0,96	< internalization	AEL265W (<i>Ashbya gossypii</i> , 1E-261)	Vacuolar sorting protein 4b (SKD1 protein)	---	GO:0016125 GO:0032511 GO:0045053 GO:0045324

7.2 APPENDICE 2

Tabella che riporta il fenotipo di sensibilità o resistenza [0= no fenotipo; 2= fenotipo resistente; -2= *low sensitive* (LS); -4= *medium sensitive* (MS); -6= *high sensitive* (HS)] dei 388 ceppi mutanti che mostrano un'alterata tolleranza a Cd/Ni, esposti a concentrazioni sub-letali di quattro addizionali metalli più una specie metalloide.

ORF	Cd	Hg	As	Zn	Co	Ni	Fe
YAL002W	-4	0	-2	2	-2	2	-2
YAL007C	2	0	0	2	0	2	0
YAL010C	-2	0	0	0	0	0	0
YAL021C	-4	-2	-2	-2	-2	-2	0
YAL026C	-2	0	-2	0	-4	-2	0
YAL040C	0	0	0	0	2	2	0
YAL042W	-2	0	2	0	0	0	0
YAL047C	0	-2	0	0	0	-4	0
YAL059W	2	0	2	0	0	0	0
YBL007C	-2	-2	-4	0	0	-2	0
YBL025W	-4	-2	0	0	-4	-2	0
YBL027W	0	0	0	0	0	-2	0
YBL051C	-2	0	-2	0	0	0	0
YBL058W	-6	-2	-2	-2	-2	-4	0
YBL079W	-6	-2	-4	-4	-4	-4	0
YBR021W	-4	0	-4	2	0	2	0
YBR036C	-4	0	0	0	0	0	-2
YBR059C	2	0	0	0	0	0	0
YBR069C	2	0	0	2	0	2	0
YBR078W	-2	-2	-4	0	0	0	0
YBR081C	-4	0	0	0	-4	2	0
YBR098W	2	0	0	0	0	0	0
YBR103W	2	0	2	0	2	2	0
YBR106W	0	0	-2	0	-2	-4	0
YBR119W	0	0	2	0	-2	-2	0
YBR127C	-4	-4	-2	-4	-4	-4	-2
YBR128C	-4	-4	0	0	0	0	0
YBR164C	-2	0	0	0	0	0	0
YBR166C	-2	-4	0	0	0	0	0
YBR171W	-2	0	0	0	0	0	0
YBR173C	-2	0	0	0	0	0	0
YBR222C	2	0	0	0	0	0	0
YBR255W	0	-2	0	-2	0	-2	0
YBR279W	-4	-4	0	-4	0	0	0
YBR288C	0	0	0	-2	0	-4	0
YBR289W	-2	-4	0	0	-4	-2	0
YBR290W	-4	0	0	0	0	2	0
YBR296C	-2	-2	0	0	0	0	0
YBR298C	-4	-2	-2	-2	0	0	0

YBR301W	-2	-2	-4	0	0	0	0
YCL001W-A	-2	-2	-4	0	0	0	0
YCL005W-A	-4	-4	-4	-2	-4	-6	0
YCL008C	-2	0	-2	0	0	2	0
YCL016C	-2	-2	-4	0	0	0	0
YCL058W-A	2	0	2	0	0	2	0
YCR002C	0	-2	-4	0	0	-4	-2
YCR009C	-4	0	0	0	0	0	0
YCR026C	-2	-2	-4	0	0	0	0
YCR027C	-2	0	0	0	0	0	0
YCR036W	-2	0	0	0	0	0	0
YCR045C	-4	-2	-4	0	0	0	0
YCR048W	-2	0	-4	-2	-2	0	-2
YCR050C	-4	0	0	0	0	0	0
YCR051W	-2	-2	-2	0	0	0	0
YCR068W	-2	-2	-2	0	0	0	0
YCR077C	-4	-2	0	-4	-2	-2	0
YCR079W	-4	-2	-4	0	0	0	0
YCR081W	-4	0	0	0	2	2	0
YCR084C	-4	-2	0	0	0	0	0
YCR087C-A	-2	-2	0	0	0	0	0
YDL005C	-6	0	0	2	-4	0	0
YDL006W	-2	-2	0	-4	-4	-2	-2
YDL020C	-4	-2	-2	0	-4	-2	0
YDL047W	-6	2	0	2	0	2	2
YDL067C	-4	-2	0	0	0	0	0
YDL074C	-4	-2	0	0	0	0	0
YDL077C	-4	0	0	-4	0	-2	-4
YDL081C	-2	0	0	0	0	0	0
YDL100C	-2	0	-2	0	0	-2	0
YDL116W	0	0	0	0	-2	-2	0
YDL160C	-2	0	0	0	0	0	0
YDL185W	-6	-4	-2	-2	-6	-2	-4
YDL203C	-2	0	-2	0	0	0	0
YDR017C	-4	-2	0	-4	0	0	0
YDR025W	0	0	0	0	0	-2	0
YDR027C	-2	-2	-6	-2	-4	0	-2
YDR069C	-6	-2	0	0	-4	2	0
YDR080W	-4	0	-2	-4	0	-4	-2
YDR089W	2	0	0	0	2	2	0
YDR129C	-2	0	-4	0	0	-2	0
YDR135C	-6	-4	-4	0	0	0	0
YDR137W	-4	-2	-2	-4	0	0	0
YDR140W	-2	0	0	-2	0	0	0
YDR159W	0	0	-2	0	0	-2	0
YDR174W	-2	-2	2	0	0	0	0
YDR176W	-2	-4	-2	0	0	0	0
YDR195W	-6	0	0	0	0	0	0
YDR207C	-2	-2	-2	0	0	-2	0
YDR264C	-4	0	0	0	0	0	0
YDR270W	0	-2	0	0	-4	-4	0

YDR289C	0	0	0	0	0	-2	0
YDR300C	0	0	0	0	0	2	0
YDR317W	-2	0	0	-2	0	0	0
YDR323C	-4	-2	-4	-2	0	0	-2
YDR363W	-4	0	0	0	0	0	0
YDR369C	-4	-2	-2	0	0	0	0
YDR388W	-2	-2	-2	0	0	0	0
YDR418W	0	0	0	0	0	-2	0
YDR423C	-2	-2	0	0	0	0	0
YDR432W	-4	-4	0	0	-2	-2	0
YDR448W	-2	-4	-2	0	0	0	0
YDR456W	-2	0	0	0	0	2	0
YDR469W	-2	0	0	0	0	0	0
YDR486C	0	-2	0	0	2	2	0
YDR495C	-4	0	-2	-4	0	0	0
YDR500C	-4	-2	0	0	0	0	0
YEL003W	0	0	0	0	0	2	0
YEL027W	-4	-2	-4	-6	-6	-4	-2
YEL046C	-2	-2	-4	-2	0	0	0
YEL051W	-4	-4	-4	-4	-4	-2	-2
YER072W	0	0	2	-4	2	2	0
YER083C	-4	-2	0	-2	0	0	0
YER111C	-2	0	0	-4	0	0	-2
YER117W	-2	0	0	0	0	0	0
YER123W	0	0	0	-2	-2	-4	0
YER145C	-4	-2	-2	-4	-4	-4	0
YER151C	-2	-2	0	0	0	-2	0
YER155C	-4	-2	-2	0	0	0	0
YER164W	-2	0	0	0	0	0	0
YFL018C	-2	0	0	0	0	2	0
YFL031W	-2	0	0	-2	0	0	0
YFR010W	-2	-2	-4	0	0	0	0
YFR019W	-4	-2	-4	-2	0	-6	-4
YFR036W	-6	0	-4	0	0	0	0
YFR038W	2	0	0	0	0	0	0
YGL016W	2	2	0	0	0	0	0
YGL025C	-2	0	0	0	0	0	0
YGL045W	2	0	-2	2	0	2	0
YGL058W	-2	-2	0	-2	0	0	0
YGL070C	0	-2	-2	0	-2	-2	0
YGL071W	-6	-4	-2	-4	-4	-6	0
YGL095C	-4	0	0	-2	-4	0	-2
YGL148W	-2	-4	-4	2	0	2	-4
YGL168W	-2	0	-4	0	0	-2	0
YGL173C	-4	-6	-4	-2	-4	-2	-2
YGL212W	-4	-2	0	-6	-2	-4	-2
YGL244W	-4	-2	0	-2	0	-4	0
YGR020C	-4	-4	-2	-2	-6	-4	-2
YGR089W	-2	0	0	0	2	2	0
YGR092W	-4	-2	-4	-2	-4	-4	0
YGR105W	-4	-4	-4	-2	-4	-4	-4

YGR122W	2	0	0	0	0	0	0
YGR135W	2	0	0	0	0	0	0
YGR155W	-6	-4	-2	0	-2	-2	0
YGR167W	-4	0	-2	0	-2	-2	0
YGR206W	-2	0	0	0	0	2	0
YGR252W	-4	-4	-4	0	-4	0	0
YGR260W	-4	0	-4	0	2	2	-2
YGR261C	0	0	0	-2	0	-2	-2
YHL011C	-4	0	0	0	-2	0	0
YHL019C	-2	0	0	0	0	0	0
YHL023C	-4	0	0	0	0	0	0
YHL027W	2	0	-4	2	0	2	0
YHR008C	-2	0	0	0	0	0	0
YHR012W	-2	0	0	-2	0	2	0
YHR013C	-4	-2	-4	0	0	0	0
YHR021C	-4	-2	0	-2	-4	0	-4
YHR026W	0	-2	-4	-4	-2	-2	-4
YHR030C	-2	-4	0	-4	0	-2	-2
YHR039C-A	-2	-4	-4	-4	-4	-4	-2
YHR050W	2	2	0	0	2	0	0
YHR060W	-4	-6	-2	-4	-6	-4	-4
YHR091C	2	2	0	-2	0	0	0
YHR100C	-2	0	-2	0	0	0	0
YHR108W	-6	0	0	0	0	0	0
YHR151C	0	0	-4	-2	0	-2	-2
YHR167W	0	0	-4	0	0	-4	0
YHR178W	2	2	0	0	0	0	0
YHR191C	-2	0	-4	0	0	0	0
YIL009C-A	-6	0	0	0	0	0	0
YIL015W	-2	0	0	0	0	0	0
YIL039W	-4	-2	-4	-4	-2	2	0
YIL053W	-2	0	0	0	0	0	0
YIL065C	-2	0	-2	0	0	0	0
YIL090W	-4	0	0	-2	0	-2	0
YIL122W	-2	0	2	0	0	0	0
YIL128W	-4	0	0	0	0	0	0
YIL158W	-2	-2	0	0	0	0	0
YIR023W	0	0	0	2	0	2	0
YIR033W	-4	0	0	0	-4	-6	0
YJL004C	-2	0	0	0	0	0	0
YJL012C	2	0	2	-4	2	2	0
YJL024C	0	0	0	-4	0	-4	0
YJL053W	-4	0	0	0	2	2	0
YJL056C	0	0	0	0	-2	-2	0
YJL080C	0	0	-2	0	0	-2	0
YJL095W	-4	-4	0	-4	-2	-2	-4
YJL101C	-6	-6	-2	0	0	0	0
YJL115W	-4	0	0	0	0	0	0
YJL117W	-4	-4	-4	-2	-2	-2	-4
YJL128C	-4	0	-4	0	0	0	0
YJL136C	-4	-2	0	-4	0	0	-2

YJL154C	-2	0	0	0	0	2	0
YJL176C	-4	-4	0	-2	-4	-2	-2
YJL183W	-2	-4	0	-4	-2	0	0
YJL190C	-4	0	0	0	0	0	0
YJR033C	0	0	0	-4	-2	-2	-4
YJR040W	-2	-2	0	-4	0	0	0
YJR043C	-4	0	0	0	0	0	0
YJR074W	-4	0	0	0	0	2	0
YJR102C	-6	0	-2	0	-2	2	0
YJR104C	-6	-2	-2	-4	-6	0	0
YJR117W	0	0	0	0	-2	-2	0
YJR118C	-2	0	0	0	0	-2	0
YJR122W	-2	-4	0	0	0	0	0
YJR125C	-2	0	0	0	0	0	0
YJR139C	-4	0	-2	-2	-2	0	-2
YKL002W	-4	0	0	-2	0	2	0
YKL003C	2	0	-4	0	2	0	0
YKL006W	-2	-2	-2	-2	-4	-4	0
YKL011C	-2	0	0	0	0	0	0
YKL041W	-4	0	0	-4	0	2	0
YKL057C	-2	0	0	0	0	-2	0
YKL080W	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4
YKL113C	-4	0	0	0	0	0	0
YKL119C	-4	-6	-4	-4	-4	-2	-4
YKL139W	-6	-2	0	-2	0	-4	-2
YKL175W	2	2	0	0	0	0	0
YKL212W	-2	-2	-4	-4	0	0	-2
YKL213C	-6	0	-4	0	0	0	0
YKR001C	-4	0	0	-2	-2	2	0
YKR019C	-2	-2	0	-2	-2	0	0
YKR020W	-2	0	-4	-6	0	0	0
YKR028W	0	0	0	2	2	2	0
YKR035W-A	-4	0	0	0	-4	2	-2
YKR043C	2	0	2	0	0	0	0
YKR072C	0	0	2	-4	0	2	0
YLL027W	-4	-4	0	0	0	0	0
YLL039C	-2	-2	0	0	0	0	0
YLL040C	-2	-2	-2	0	0	0	0
YLL043W	-4	-2	0	0	0	0	0
YLL048C	0	0	0	0	0	-6	0
YLR001C	2	0	0	0	0	2	0
YLR015W	-2	0	0	-2	0	0	0
YLR025W	-6	0	-4	-2	-4	2	0
YLR027C	-4	0	-4	2	0	2	0
YLR034C	-4	0	0	0	0	0	0
YLR039C	-2	0	0	0	0	0	0
YLR068W	-2	0	0	0	0	-2	0
YLR079W	-2	0	-2	0	0	0	0
YLR087C	-4	-4	-2	-4	-2	-2	-2
YLR095C	-2	0	0	0	0	0	0
YLR113W	-2	0	-4	0	0	0	0

YLR119W	-4	0	-4	0	0	2	0
YLR148W	-6	-4	-2	-4	-4	-2	-2
YLR181C	0	0	0	0	0	2	0
YLR182W	-2	-2	0	-2	-4	0	0
YLR192C	-2	0	0	0	-4	0	0
YLR248W	-2	-2	0	0	0	0	0
YLR262C	-2	0	0	-2	0	0	0
YLR268W	-4	-4	-4	-4	-4	0	-2
YLR320W	-2	-2	-2	-2	-4	0	0
YLR330W	2	0	-4	0	0	2	0
YLR360W	-4	0	-2	0	2	2	0
YLR362W	-4	-2	-2	0	-4	0	0
YLR386W	-4	-2	0	0	0	-4	0
YLR417W	-4	0	-4	-2	-2	2	0
YLR423C	-4	-2	0	0	0	0	0
YLR447C	-4	-4	-4	-4	-4	-6	0
YML007W	-4	-2	-4	-2	0	0	0
YML008C	-4	-4	-4	-2	-2	-2	0
YML013W	-2	0	0	0	0	0	0
YML024W	-2	0	0	0	0	0	0
YML036W	2	0	0	0	-4	0	0
YML052W	-2	0	0	0	0	0	0
YML062C	0	0	0	0	0	-2	0
YML067C	-2	0	2	0	0	0	0
YML071C	-2	0	0	0	0	0	0
YML097C	-2	0	0	0	0	0	0
YML103C	-2	0	0	0	-2	-2	0
YML112W	-2	-4	-2	-2	-2	-4	0
YMR010W	0	0	0	0	-2	-2	0
YMR014W	-2	0	0	0	0	0	0
YMR021C	-2	-2	-2	0	-4	-2	0
YMR022W	-2	0	0	0	-2	-2	0
YMR032W	-4	0	0	0	0	0	0
YMR038C	-4	-2	-2	0	-2	0	0
YMR058W	-2	-2	0	-2	-4	-4	0
YMR060C	0	0	0	0	-2	-2	0
YMR063W	2	0	0	2	0	2	0
YMR077C	-2	-2	0	0	-4	2	0
YMR092C	2	0	2	0	0	0	0
YMR123W	0	0	-2	-4	-4	-4	-2
YMR154C	2	0	0	2	2	2	0
YMR161W	-2	0	0	0	0	0	0
YMR164C	-4	-4	0	-4	0	0	0
YMR179W	-2	0	0	0	0	0	0
YMR198W	-2	0	-4	0	0	0	0
YMR202W	-2	-2	-4	-4	-2	-4	-2
YMR205C	-2	0	0	0	-2	0	0
YMR224C	-2	0	0	0	-2	0	0
YMR231W	-4	-2	-4	-2	-4	-4	-4
YMR238W	-2	-2	0	0	-2	0	0
YMR264W	0	0	0	0	-2	-2	0

YMR275C	-4	0	-4	0	2	2	0
YMR319C	2	2	0	2	2	0	0
YNL001W	-2	0	0	0	0	0	0
YNL021W	-2	0	0	0	0	2	0
YNL032W	0	-2	0	0	2	2	0
YNL051W	-2	0	0	0	0	0	0
YNL059C	-2	0	0	0	0	0	0
YNL064C	-2	-2	-2	-2	-2	-2	0
YNL080C	-2	0	0	0	-4	-2	0
YNL136W	-2	0	0	0	0	2	0
YNL147W	-4	-2	0	0	0	-2	0
YNL148C	-2	0	-4	0	0	-2	0
YNL155W	2	0	0	0	2	0	0
YNL197C	0	0	0	0	-2	-2	0
YNL229C	-2	0	-4	0	-2	-2	0
YNL241C	-2	0	0	0	0	0	0
YNL280C	-2	-6	-4	-4	-6	-6	-4
YNL294C	2	0	-2	2	0	2	0
YNL302C	-2	0	0	0	0	0	0
YNL325C	-2	0	-4	-2	0	-2	0
YNL329C	-2	0	0	0	0	0	0
YNR006W	-4	-2	-2	-4	-4	2	0
YNR023W	-4	-4	-2	0	-4	-2	0
YNR051C	-2	0	-2	0	0	0	0
YNR052C	-4	-4	-2	-2	-4	-2	-2
YOL004W	0	0	-4	0	-2	-2	0
YOL018C	-2	0	-2	-4	-2	0	-2
YOL049W	-6	-4	0	0	0	0	0
YOL051W	-4	-4	-2	0	-2	0	0
YOL060C	-2	0	0	2	2	2	0
YOL072W	0	0	0	0	-2	-2	0
YOL075C	2	0	0	0	0	0	0
YOL122C	2	2	2	0	0	-2	0
YOL148C	-4	-4	0	-2	0	0	0
YOL151W	-4	-2	-2	0	0	0	0
YOR026W	0	-2	-4	0	-2	-2	0
YOR030W	2	0	0	2	0	2	0
YOR036W	-6	-2	-4	-2	-4	-2	-2
YOR043W	-2	0	0	2	0	0	0
YOR068C	-2	0	0	0	0	2	0
YOR069W	-4	0	0	0	2	2	0
YOR079C	-4	0	-2	-2	2	0	0
YOR080W	-2	0	-2	0	0	0	0
YOR089C	-2	-2	0	0	0	0	0
YOR106W	-4	-2	0	-2	0	-2	0
YOR132W	-2	0	0	0	0	2	0
YOR141C	-4	-4	-2	0	-2	0	0
YOR219C	-2	0	0	0	0	0	0
YOR221C	-2	0	0	0	0	0	0
YOR270C	0	-2	0	-2	-2	-6	-2
YOR275C	2	0	-2	2	0	2	0

YOR322C	-4	-2	-4	0	0	0	0
YOR323C	-4	-2	-4	-2	0	0	0
YOR332W	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4
YOR357C	-2	-2	0	0	2	2	0
YPL002C	-4	0	-2	0	-2	2	0
YPL031C	-6	-4	-4	-2	-4	-2	0
YPL042C	-4	-2	-2	0	0	0	0
YPL045W	-4	-6	-2	-2	-4	-2	0
YPL051W	-2	0	0	0	0	0	0
YPL055C	-4	0	0	0	0	0	0
YPL065W	-4	0	-2	0	-2	2	0
YPL084W	-4	-2	-4	-2	-2	2	0
YPL091W	-4	-2	0	0	0	0	0
YPL097W	-2	0	0	0	0	0	0
YPL099C	-4	0	0	0	0	0	0
YPL101W	-2	0	0	0	0	0	0
YPL120W	-4	0	-2	2	2	2	0
YPL121C	-2	-4	-2	-4	0	0	0
YPL123C	-4	0	-4	0	0	0	0
YPL129W	-4	-4	-4	-4	0	0	0
YPL148C	-2	0	0	0	0	0	0
YPL162C	-2	0	0	0	0	0	0
YPL166W	-2	0	-2	0	0	0	0
YPL176C	-2	0	0	0	2	2	0
YPL179W	0	0	0	-4	-2	-2	0
YPL181W	-2	0	0	0	0	-2	0
YPL187W	-2	0	-4	0	0	0	0
YPL188W	-2	0	-2	0	0	0	0
YPL195W	0	0	0	-2	0	-2	-2
YPL234C	-2	-4	-2	-4	-6	-2	-4
YPL254W	-6	-4	-4	0	-6	0	0
YPL260W	2	0	0	0	0	0	0
YPR024W	-2	0	-4	0	0	0	0
YPR036W	-4	0	-4	-6	-4	-4	0
YPR065W	-4	0	0	0	-4	0	0
YPR124W	-2	0	-2	-4	-2	-2	0
YPR131C	-2	-2	0	0	0	0	0
YPR133W-A	-2	-2	-4	-4	0	0	0
YPR135W	-4	-2	0	0	0	0	0
YPR139C	0	-4	0	-4	0	2	-2
YPR153W	0	-2	-4	-2	0	-2	0
YPR163C	-2	-2	-4	0	0	0	0
YPR173C	-2	0	0	-4	-4	2	0

7.3 APPENDICE 3

Sequenze nucleotidiche e proteiche della metallotioneina MT2a di *Arabidopsis thaliana*, della *ceruleans fluorescent protein (CFP)* e della *yellow fluorescent protein (YFP)*.

MT2a (246 bp)

```
ATGTCTTGCTGTGGAGGAAACTGCGGATGTGGATCTGGCTGCAAGTGCGGCAACG
GTTGTGGAGGTTGCAAAATGTACCCTGACTTGGGATTCTCCGGCGAGACAACCACA
ACTGAGACTTTTGTCTTGGGCGTTGCACCGGCGATGAAGAATCAGTACGAGGCTTC
AGGGGAGAGTAACAACGCTGAGAACGATGCTTGCAAGTGTGGATCTGACTGCAAG
TGTGATCCTTGCACCTGCAAGTGA
```

MT2a (8.2kDa)

```
MSCCGGNCGCGSGCKCGNGCGGCKMYPDLGFSGETTTTETFLVGVAPAMKNQYEA
SGESNNAENDACKCGSDCKCDPCTCK-
```

CFP (720 bp)

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGC
TGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGA
TGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCG
TGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCGCCCCG
TACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTA
CGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCC
GAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCG
ACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACGCCATCAG
CGACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTC
AAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGC
AGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGC
ACCCAGTCCAAGCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGC
TGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

CFP (26.84kDa)

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPW
PTLVTTLTWGVQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKF
EGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNAISDNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDG
SVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLG
MDELYK-

YFP (717 bp)

ATGAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGA
TGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAA
CATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCCAT
GGCCAACACTTGTCACTACTTTCGCGTATGGTCTTCAATGCTTTGCGAGATACCCAG
ATCATATGAAACAGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAG
GAAAGAACTATATTTTTCAAAGATGACGGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCA
GTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAG
AAGATGGAAACATTCTTGGACACAAATTGGAATACAACATAACTCACACAATGT
ATACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAATTAGA
CACAACTTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTC
CAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCT
GCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGT
AACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAATAA

YFP (26.94kDa)

MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVWP
TLVTTFA YGLMCFARYPDHMKQHDFK SAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFE
GDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNI EGS
VQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNH YLSYQSALS KDPNEKRDH MVLLEFVTAAGITHG
MDELYK-

8. ARTICOLI

**8.1 Articolo inviato per la pubblicazione durante il periodo di dottorato alla rivista
*Genome Biology***