

The background of the cover is a detailed, colorful illustration of a cell. It features various organelles such as a nucleus with a nucleolus, mitochondria with internal folds, and a Golgi apparatus. There are also depictions of DNA double helices, ribosomes, and other cellular components. The style is artistic and scientific, using a palette of purples, pinks, greens, and blues.

Identificación y caracterización de  
nuevos procesos implicados en la  
respuesta a deficiencia de hierro  
en *Saccharomyces cerevisiae*



VNIVERSITAT D VALÈNCIA

Antonia M<sup>a</sup> Romero Cuadrado

Dirigida por Sergi Puig Todolí

# Identificación y caracterización de nuevos procesos implicados en la respuesta a deficiencia de hierro en *Saccharomyces cerevisiae*



Memoria presentada por Antonia M<sup>a</sup> Romero Cuadrado para  
optar al grado de Doctora en Biomedicina y Biotecnología  
por la Universitat de València.

Director: Dr. Sergi Puig Todolí



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

Valencia, Junio 2018



SERGI PUIG TODOLÍ, Doctor en Ciencias Químicas y Científico Titular del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

INFORMA:

Que Antonia M<sup>a</sup> Romero Cuadrado, licenciada en Ciencias Biológicas por la Universitat de València ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título “Identificación y caracterización de nuevos procesos implicados en la respuesta a deficiencia de hierro en *Saccharomyces cerevisiae*”. Revisado el presente trabajo, expresa su conformidad para la presentación del mismo por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al título de Doctora por la Universitat de València.

En Paterna, Junio de 2018.

Dr. Sergi Puig Todolí



# *Agradecimientos*



## *Agradecimientos*

Parecía que esta parte iba a ser la más fácil de escribir, y se ha compartido en la más complicada. Complicada porque resulta muy difícil resumir en unas líneas todo lo que habéis contribuido a mi vida durante estos años y la huella que habéis dejado. GRACIAS a todos por haber formado parte de esta etapa y permitirme llegar hasta aquí sumando momentos junto a cada uno de vosotros.

Gracias a Sergi, por darme esa oportunidad que me ha permitido llegar hasta aquí. Gracias por transmitir esa pasión por la ciencia, por tu impecable trabajo. Gracias por tu cariño, por guiarme, por haber tenido tanta paciencia, por empujarme, por haberme permitido disfrutar y crecer durante estos años. Gracias por tantas horas de dedicación, por conseguir que formarse a tu lado sea una experiencia fácil, gratificante, bonita; no imagino un director mejor. Este trabajo es tuyo.

Gracias a todas las grandes personas que forman o han formado parte del Iron Lab. A Maite, por tus ganas, tu cariño, por tu energía, por tu apoyo y ayuda. A Rosa, por transmitirme desde el primer día tu ternura y tus valiosos consejos con esa dulce voz. A Carlos, por las bromas, las risas y alguna cervecita compartida. A Ana y Pilar, por haber aparecido en esta última etapa y hacer los días más fáciles y divertidos. A las nuevas generaciones del laboratorio, en especial a Tania por tu gran ayuda y a Cristina por transmitirme esa inquietud, ese entusiasmo y tanto cariño.

Gracias a Nerea, por convertirme en tu “chiquilla”, por enseñarme y cuidarme tanto, por ser incansable, por haber estado en los momentos más importantes y bonitos de esta etapa a ambos lados del charco.

Gracias a los laboratorios de plantas, de ciclo celular y GFL, por acogerme y dedicarme parte de vuestro tiempo. Gracias a Toczyski Lab, por vuestra acogida, vuestra ayuda y toda vuestra atención durante 4 meses.

Gracias a las chicas de Haight. A Tamara, por ser esa persona incansable con mil planes que ofrecer, por escucharme, por tu bondad y por quedarte en mi vida. Gracias a Anna por ayudarme y preocuparte por mi cada día en San Francisco. Gracias a las dos por conseguir hacerme sentir como en casa. Gracias a Carlos por contagiarme esa alegría y esa locura, por esas risas interminables. Gracias a Regina, Leti, Nando, Ana, Bennedeta por haber formado parte de mi aventura americana y hacer que sea única e irrepetible.

Gracias a toda la gente que forma o ha formado parte del IATA en estos años, Maria, Ali, Clara, Eli, Bea, Esther, Bruno, Isaac, Laura, David, Roberto.... gracias por vuestro compañerismo y vuestra ayuda. Gracias a los jefes Jose Manuel, Amparo, Eladio, Paloma, Carmela.

Llegó el momento de la Secta, gracias por haber compartido tantos momentos inolvidables, dentro y fuera del laboratorio, y es que con vosotros podría escribir otro capítulo porque... ¡¡sois los mejores resultados de esta tesis!!

Gracias a Adri, mi “Azúcar”, por acompañarme desde el principio, por tus cuidados, por entenderme, por apoyarme, por nuestros bailes y caídas, por “levantarnos”. Gracias amiga. A Jiri, por no guardarme rencor tras robarte la silla (así fueron nuestros principios), por tus bromas, tus enfados, por tus bailes, porque ya no hay congreso ni viaje que se nos resista. A Javi, por esa falta de carácter andaluz, por los largos paseos de vuelta a casa (casi de Oeste a Este), por compartir conmigo la administración de la secta (aunque haya sido sin darte cuenta). A Peris, porque te conocí predoc y te he vuelto a ver como un postdoc triunfador. Gracias por tus consejos, por tu ayuda y por los buenos momentos entre “Los 4 jinetes”. Gracias a Aurora, por entendernos sin que haga falta hablar, por tu imprescindible animación en cada fiesta. A Josepin, por hacerte querer tanto, porque no hay historias tan únicas como las tuyas. A Alba, por tu alegría, por ser tan positiva, por tener siempre una bonita palabra. A Walter, por tu locura, por bajarme a los mares y descubrirme un mundo nuevo. A Fani, por nuestros fines al sol, por compartir los conocimientos de la Fanipedia, por los momentos más “funny”, gracias por tu amistad. A Sara, por tu generosidad, por entusiasmo, tu fuerza, tu espontaneidad, gracias por transmitirme tanto cariño. A Ric, por esa calma que tanto necesitamos y que no somos capaces de transmitir, por tu humor, por tu disposición. Los últimos meses me han servido para descubrir el gran tío que eres. A Ying, por mantener siempre esa sonrisa. A Ceci, quien iba a decirnos que después de pasarnos 5 años sin cruzar dos palabras, íbamos a compartir tanto. Gracias por estar ahí, por tu bipolaridad, por tus detalles...nos queda mucho por compartir. A Lucía, por convertirte en la chiquilla, por tu ayuda, porque me ha encantado poder compartir contigo los últimos años dentro y fuera del laboratorio. Por dejar que los 3 jinetes saquemos tu lado “más joven” ;) . Miguel, gracias por poner esa chispa de ciencia en nuestros ratos, por todo tu cariño. A Laura, gracias por recordarme que los gestos cariñosos están sobrevalorado, por tus cenas, por no saber decirme “no” ;) . A Romain, por descubrirnos que tampoco somos buenos en el vóley.... A Marieta, por

## *Agradecimientos*

tu felicidad, por saber disfrutar de un festival en el que da igual la música. Gracias a todos los miembros fugaces de la Secta, Andrea, Cecilia, en especial a Migue, por traer la magia y buena onda argentina.

Gracias a mis biologuillos, por llegar hace unos años y seguir conmigo. Gracias a Mariflower, por estar siempre ahí, por tu positividad, por tu alegría, por “rodar” juntas, por todo lo que hemos vivido. Gracias a mi Hippie, porque no importa los Km que haya entre nosotras para que nada cambie. Tenemos un viaje pendiente ;). Gracias mi “Peligroso”, por nuestros ratos en el pisito, por todas nuestras bromas, por ser un gran amigo. Gracias a Arantxita y Sandra, por ser dos grandes personas, luchadoras, incansables, por teneros conmigo. Gracias a Tati, Irene, Víctor, Lito, Mikel...por todo lo que hemos compartido, por conseguir que nuestras citas no tengan fin.

Gracias a mi “compi”, Martita, por haber formado parte de toda esta etapa, por aguantarme, por tu confianza, por tus ricas comiditas. Gracias por esas excusas tontas que acababan con charlas y cenas interminables. Gracias a Elenita, por estar cerca en la distancia.

Gracias a mis amigas Marian, Ali, Nuria, Raquel, Ana, Maria, Miriam, Anita y Patri. Gracias por manteneros a mi lado, por los buenos momentos, por los viajes, las despedidas. Gracias por apoyarme y darme fuerzas. Gracias por ser mi familia.

Gracias a Raúl, por empujarme, por tu paciencia en mis momentos de “ausencia”, por entenderme, por tu apoyo sin barreras, por los achuchones en los mejores y peores momentos. Gracias por acompañarme y recorrer Km conmigo para llegar hasta aquí.

Por último, gracias a mis padres y a mi hermano, porque el llegar hasta aquí es un mérito vuestro. Gracias por vuestro esfuerzo, por haber luchado para permitirme estar aquí. Por entenderme en este difícil camino, por vuestro apoyo, por estar orgullosos de mí. Gracias a mi Beni, por dejarme ser tu nieta favorita y gracias a mi abuelo porque sé que lo que hubieras disfrutado estando aquí.

**Gracias a todos, esto no hubiera sido igual sin vosotros.**



# *Índice*





# Índice

<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción.....</b>	
1. El hierro en las células eucariotas	6
2. Respuestas a la variación de la biodisponibilidad de hierro en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
2.1. Respuesta al exceso de hierro	7
2.2. Respuesta a la deficiencia de hierro	7
2.2.1. Regulación transcripcional: a través de la activación del regulón de hierro	8
-Adquisición del medio extracelular	10
-Movilización y reciclaje del hierro intracelular	11
-Remodelación metabólica	12
2.2.2. Regulación postranscripcional a través de Cth1 y Cth2	12
-Estructura y función	12
-Mecanismo de acción de Cth2	15
-Regulación de los niveles de Cth2	16
-Procesos regulados por Cth1 y Cth2 en deficiencia de hierro	18
3. La desaturasa de ácidos grasos Ole1	19
3.1. Regulación del metabolismo de lípidos	19
3.2. Estructura y función de Ole1	20
3.3. Regulación de la expresión de <i>OLE1</i>	21
3.4. Mga2 como sensor de la fluidez de membrana	23
4. Vía de señalización de nutrientes o ruta TOR.	24
-Regulación transcripcional de los genes RPs (Ribosomal protein) y RiBis (Ribosome biogenesis)	25
-Regulación de la RNA polimerasa I	26
-Regulación de la RNA polimerasa III	27
-Regulación de la síntesis de proteínas	27
-Regulación de la fosforilación de Rps6	29
-Regulación de la ruta retrógrada mitocondrial (RTG)	29
-Regulación de la respuesta a estrés	31

<b>Objetivos</b> .....	35
<b>Materiales y métodos</b> .....	37
1. Técnicas microbiológicas:	39
1.1 Listado de cepas utilizadas <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
1.2. Condiciones de crecimiento en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
1.3. Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42
1.4. Determinación del número de células y volumen celular	43
1.5. Condiciones de crecimiento en <i>Escherichia coli</i>	43
1.6. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	43
2. Técnicas de biología molecular:	44
2.1 Técnicas moleculares para el estudio y manipulación del DNA	44
2.1.1. Obtención de DNA genómico	44
2.1.2. Obtención de DNA plasmídico	44
2.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa	44
-Listado de oligonucleótidos I	45
2.1.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	46
2.1.5. Construcción de plásmidos	46
-Listado de plásmidos	47
2.1.6. Construcción de cepas	48
2.1.7. Inmunoprecipitación de cromatina	48
2.2. Técnicas moleculares para el estudio del RNA	49
2.2.1. Obtención de RNA	50
2.2.2. Tratamiento con DNasa	50
2.2.3. Retrotranscripción de cDNA	50
2.2.4. RT-qPCR	50
-Listado de oligonucleótidos II.	51
2.2.7. Genomic Run On (GRO)	53
2.2.8. Determinación de cantidad de RNA mensajero mediante <i>Dot Blot</i> .	54
2.2.9. Determinación de la estabilidad de mRNA	55
2.2.10. Perfiles de polirribosomas.	56
2.2.11. Extracción de RNA a partir de fraccionamiento de polirribosomas.	57
2.3. Técnicas moleculares para el estudio de proteínas.	57
2.3.1. Obtención de extractos proteicos.	57
2.3.2. Electroforesis e inmunodetección de proteínas ( <i>Western Blot</i> ).	57

-Listado de anticuerpos	59
2.3.4. Determinación de la estabilidad de proteínas	60
2.3.5. Co-Inmunoprecipitación de proteínas	60
2.3.6. Tratamiento con fosfatasa $\lambda$	61
2.3.7. Ensayos de actividad $\beta$ -galactosidasa	61
2.3.8. Localización de proteínas mediante microscopía de fluorescencia	62
3. Determinación de parámetros bioquímicos	62
4. Análisis bioinformáticos	63
<b>Resultados</b> .....	65
<b>Capítulo 1. Identificación de mecanismos transcripcionales y postranscripcionales implicados en respuesta a deficiencia de hierro.</b>	
1.1. Diseño experimental para Genomic Run On en deficiencia de hierro	67
1.2. Efecto de la deficiencia de hierro sobre los niveles globales de mRNA y la tasa de transcripción de la RNA polimerasa II	70
1.3. Los niveles de RNA polimerasa II elongante disminuyen en deficiencia de hierro	72
1.4. Clasificación de los genes según la variación en la tasa de transcripción y cantidad de mRNA durante el transcurso de la respuesta a deficiencia de hierro	73
1.5. Búsqueda de factores transcripcionales asociados a los genes que aumentan su tasa de transcripción	80
1.6. Los genes RPs que codifican para proteínas ribosómicas se estabilizan en respuesta a la deficiencia de hierro	83
1.7. Los genes que codifican para las proteínas ribosómicas (RP) y la biogénesis de ribosomas (RiBi) disminuyen su cantidad de mRNA en etapas prolongadas de la deficiencia de hierro	86
1.8. Los genes RPs y RiBis se reprimen transcripcionalmente en deficiencia de hierro por la acción de las proteínas Dot6, Tod6, Stb3 y Rpd3	87
1.9. La ruta TOR se inactiva como consecuencia de la deficiencia de hierro severa	89
1.10. Regulación de la RNA polimerasa I en respuesta a deficiencia de hierro	90
1.11. Regulación de la RNA polimerasa III en respuesta a deficiencia de hierro	93
1.12. La deficiencia de hierro severa provoca la inhibición de la traducción	95
1.13. La deficiencia de hierro severa favorece la traducción de <i>GCN4</i>	97

## Índice

1.14. La proteína Rrp12 se localiza en el nucleolo en condiciones de deficiencia de hierro severa	98
1.15. La ruta retrógrada mitocondrial (RTG) se activa en condiciones de deficiencia de hierro severas	99
1.16. La activación transcripcional de la ruta retrógrada en deficiencia de hierro depende de los factores transcripcionales Rtg1 y Rtg3	100
-Discusión capítulo 1	103

### **Capítulo 2. Regulación de *OLE1* en respuesta a deficiencia de hierro.**

2.1. <i>OLE1</i> se induce a nivel transcripcional en deficiencia de hierro	115
2.2. Identificación de Mga2 como responsable de la activación transcripcional de <i>OLE1</i> en déficit de hierro	116
2.3. La activación de <i>OLE1</i> por Mga2 es esencial para el crecimiento en deficiencia de hierro	119
2.4. Mga2 es necesario para mantener los niveles de ácidos grasos insaturados requeridos durante el crecimiento bajo déficit de hierro	121
2.5. La activación de <i>OLE1</i> requiere el procesamiento de Mga2 a través de la ubiquitin ligasa Rsp5, el complejo segregasa Cdc48 Npl4/Ufd1 y el proteasoma	123
2.6. Mga2 se activa a nivel transcripcional en deficiencia de hierro	125
2.7. Mga2 autorregula su expresión en condiciones de deficiencia de hierro, hipoxia, baja temperatura y bajas concentraciones de ácidos grasos insaturados	127
-Discusión capítulo 2	131

### **Capítulo 3. Regulación postraducciona de la proteína Cth2 en deficiencia de hierro.**

3.1. Cth2 se fosforila durante la deficiencia de hierro	141
3.2. La fosforilación de las serinas S64/S65 y S68/S70 es necesaria para el crecimiento en deficiencia de hierro	143
3.3. La degradación de mRNA dianas de Cth2 es independiente de la fosforilación de la proteína en las serinas S64/S65 y S68/S70	145
3.4. La sobreexpresión de Cth2 resulta tóxica en condiciones de deficiencia de hierro	147
3.5. La fosforilación de las serinas S64/S65 y S68/S70 regula la estabilidad de Cth2	149
3.6. La quinasa Hrr25 es esencial para la degradación de Cth2 en deficiencia de hierro	151
3.7. La degradación de Cth2 se lleva a cabo a través del proteasoma	153

3.8. El complejo ubiquitin-ligasa SCF <sup>Grr1</sup> provoca la degradación de Cth2	154
3.9. Grr1 interacciona con Cth2 a través de las serinas S64/S65 y S68/S70 fosforiladas	157
3.10. Grr1 es esencial para el crecimiento en deficiencia de hierro	158
-Discusión capítulo 3	161
<b>Conclusiones.....</b>	<b>169</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>173</b>







## Lista de abreviaturas

ARE: Elemento de secuencia rico en AU, del inglés *AU Rich Element*

BPS: Sulfato de bazofenantrolina

dNTPs: Desoxirribonucleósidos trifosfato

FAS: Sulfato amónico ferroso Fe Hierro

Fe: Hierro

GFP: Proteína verde fluorescente, del inglés *Green Fluorescent Protein*

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

TZF: Dominio de dedo de zinc repetido en tándem, del inglés *Tandem Zinc-Finger domain*.

UTR: Región no traducible, del inglés *UnTranslated Region*.

mRNA: RNA mensajero

rRNA: RNA ribosómico

tRNA: RNA de transferencia

TR: Tasa de transcripción del inglés *Transcription Rate*

RA: cantidad de mRNA, del inglés *RNA Amount*

UFAs: Ácidos grasos insaturados, del inglés *Unsaturated Fatty acids*

SFAs: Ácidos grasos saturados, del inglés *Saturated Fatty acids*



# *Introducción*



El hierro es un micronutriente esencial para todos los organismos eucariotas, siendo necesario a pequeñas concentraciones para mantener la fisiología de las células. Su importancia se debe a su papel esencial como cofactor de muchos procesos celulares, entre los que se incluyen: la respiración, la biosíntesis de los principales componentes celulares, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas, el transporte de oxígeno y la fotosíntesis. A pesar de esto, concentraciones elevadas de hierro resultan tóxicas para los organismos.

Las condiciones de anoxia de la atmósfera primitiva y la elevada presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  en los océanos, probablemente provocaron que el hierro fuese el elemento principal utilizado como cofactor en numerosas proteínas. El cambio a una atmósfera oxidante provocó que el hierro pasase mayoritariamente a su forma oxidada  $\text{Fe}^{3+}$ , la cual resulta insoluble a pH fisiológico. A pesar de ser el cuarto elemento más abundante de la corteza terrestre, su baja solubilidad ( $10^{-18}$  M) provoca que la deficiencia de hierro sea uno de los desórdenes nutricionales más extendidos del planeta. El déficit de hierro causa graves síntomas en las plantas, entre ellos la clorosis férrica que reduce la fertilidad, teniendo un impacto perjudicial en el rendimiento y la calidad de las cosechas (Puig et al., 2007). En humanos, la anemia por deficiencia de hierro o anemia ferropénica es el desorden nutricional más extendido, particularmente en países en desarrollo. Según la organización mundial de la salud afecta al 25% de la población mundial, principalmente a mujeres y niños. También se han descrito otro tipo de alteraciones en la homeostasis del hierro que provocan enfermedades humanas como la hemocromatosis, cáncer, y algunas enfermedades neurodegenerativas como la ataxia de Friedrich o la aceruloplasminemia (Andrews et al., 2002)

Conocer los mecanismos que los organismos han desarrollado para mantener la homeostasis del hierro resulta de gran interés, ya que puede suponer un avance en el desarrollo de estrategias para tratar un gran número de enfermedades y alteraciones fisiológicas en los seres vivos.

## 1. El hierro en las células eucariotas.

El hierro es un elemento que presenta la propiedad de oscilar entre su estado oxidado, hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), y su estado reducido, hierro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Esta propiedad le permite su participación en numerosos procesos de oxidación-reducción. El hierro está presente en la estructura de numerosas proteínas formando parte de tres cofactores diferentes:

- Grupos hemo: el hierro se encuentra unido al anillo de la protoporfirina IX formando el grupo prostético de las hemoproteínas. Gracias a su grupo hemo, la hemoglobina y la mioglobina participan en el transporte y almacenaje del oxígeno en los organismos. Por otra parte, los citocromos son moléculas capaces de aceptar y donar electrones, generando energía a través de las cadenas de transporte electrónico fotosintéticas y respiratorias debido a la presencia de hemo. El grupo hemo de las catalasas es necesario para que éstas lleven a cabo su actividad antioxidante en presencia de peróxido de hidrógeno.

- Centros o *clusters* Fe-S (4Fe-4S, 3Fe-4S, 2Fe-2S): el ensamblaje de los centros Fe-S es un proceso altamente conservado a lo largo de la evolución, desde levaduras hasta mamíferos. Estudios con levaduras han permitido diferenciar tres pasos fundamentales en el proceso de maduración de las proteínas con centros Fe-S. El primer paso es el ensamblaje de los centros Fe-S y tiene lugar en la mitocondria. Las proteínas implicadas en este paso son esenciales para la viabilidad de las células y forman la maquinaria de síntesis mitocondrial ISC (ISC, "*Iron Sulfur Cluster*"). El segundo paso es la exportación de un producto denominado X-S, del cual sólo se conoce que es producto de la síntesis de centros Fe-S mitocondrial, a través del transportador de la membrana mitocondrial Atm1. En último lugar, se produce el ensamblaje de los centros Fe-S a las apoproteínas citosólicas y nucleares, a través de la maquinaria citoplasmática denominada CIA (CIA, "*Cytosolic ISC Assembly*") (Lill et al., 2012; Braymer et al., 2017). Defectos en la síntesis mitocondrial de los centros Fe-S provocan daños en el DNA y consecuentemente inestabilidad genómica (Stehling et al., 2012; Pijuan et al.,

2015). El principal papel de los centros Fe-S es su participación en la transferencia de electrones, teniendo una función destacable durante la fosforilación oxidativa mitocondrial. También están presentes en enzimas responsables del metabolismo de aminoácidos como Met5-Met10 y Leu1, requeridas para el metabolismo de la metionina y la leucina, respectivamente. Los centros Fe-S también son necesarios en la biogénesis de ribosomas y la traducción de proteínas puesto que el factor esencial de traducción Rli1 de *S. cerevisiae* contiene dos centros Fe-S (Kispal et al., 2005; Yarunin et al., 2005). Numerosas enzimas implicadas en el metabolismo del DNA poseen centros Fe-S, entre ellas: las DNA helicasas Rad3 y Dna2, la DNA polimerasa Pol  $\delta$  y la DNA glicosilasa Ntg2. Los centros Fe-S presentes en esta maquinaria tienen un papel esencial en el modelo del transporte de cargas en el DNA y el mantenimiento de la integridad genómica en las células (Puig et al., 2017).

- Grupos oxo-dihierro: los átomos de hierro se encuentran coordinados a átomos de oxígeno en algunas enzimas como Ole1, implicada en el metabolismo ácidos grasos insaturados, o la ribonucleótido reductasa que cataliza la síntesis de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs) y es esencial para la replicación y reparación del DNA en todos los organismos eucariotas (Kolberg et al., 2004).

La esencialidad del hierro en las células se debe principalmente a su papel como cofactor redox en numerosos procesos biológicos. Sin embargo, estas propiedades redox hacen que el hierro resulte perjudicial en concentraciones elevadas. Esto es consecuencia de su participación en reacciones Fenton, en las que se generan altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno que provocan la oxidación de proteínas, lípidos y DNA, causando graves daños celulares.

## **2. Respuestas a la variación de la biodisponibilidad de hierro en *Saccharomyces cerevisiae*.**

*S. cerevisiae* ha sido utilizada como organismo modelo para estudiar cómo las células eucariotas responden a alteraciones en la biodisponibilidad de hierro. Hasta el momento se han descrito cambios en la expresión de numerosos genes implicados en mantener la homeostasis de hierro en función de la presencia o ausencia de hierro en el medio. Aft1 y Aft2 son los factores transcripcionales implicados en la respuesta a deficiencia de hierro, mientras que Yap5 regula la expresión génica en respuesta a un exceso de hierro (Philpott et al., 2012; Pimentel et al., 2012).

### **2.1. Mecanismo de respuesta al exceso de hierro.**

La respuesta a altas concentraciones de hierro está coordinada por el factor transcripcional Yap5. Yap5 activa la expresión de una serie de genes *CCC1*, *CUP1*, *GRX4* y *TYW1*. *CCC1* codifica para el transportador de hierro a la vacuola, que representa principal almacén del hierro para las células. *CUP1* codifica para la metaloproteína Cup1 que une cobre citosólico, limitando la disponibilidad de éste para la multicobre ferroxidasa Fet3, implicada en el sistema de adquisición de hierro de alta afinidad. *GRX4* codifica para la monotiolo glutarredoxina Grx4, que participa en la distribución de hierro y en la transmisión de la señal del hierro mitocondrial e inactiva los factores transcripcionales Aft1 y Aft2 en suficiencia de hierro. *TYW1* codifica para un enzima con [4Fe-4S], la cual se ha sugerido que protege las células del exceso de hierro secuestrando el hierro citosólico libre (Pimentel et al., 2012).

### **2.2. Mecanismos de respuesta a deficiencia de hierro.**

#### **2.2.1. Regulación transcripcional a través del regulón de hierro.**

Hasta el momento se han realizado múltiples estudios que han permitido caracterizar los mecanismos moleculares que las células eucariotas utilizan para responder a la deficiencia de hierro. Numerosos estudios indican que la síntesis y la

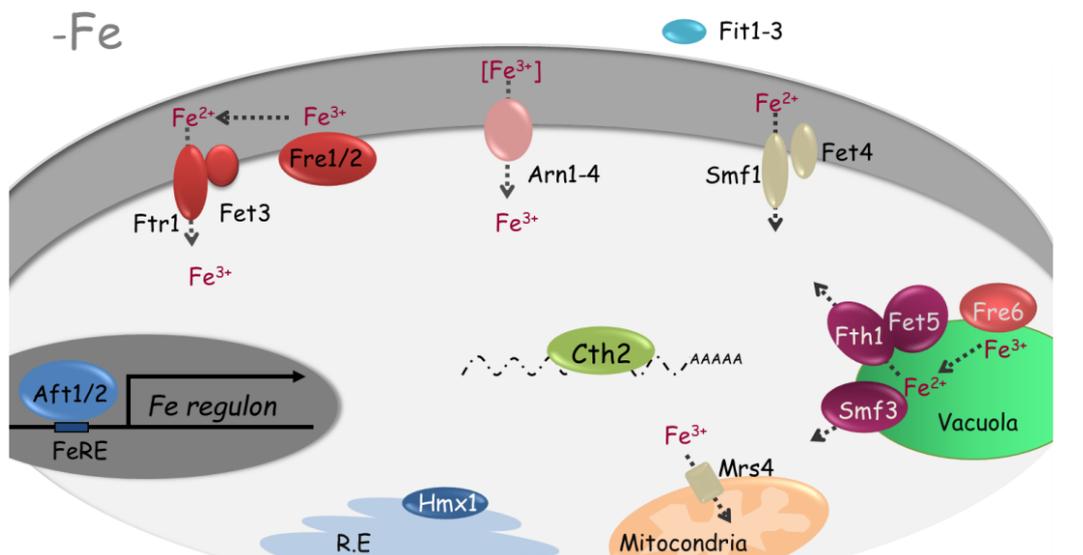
exportación de los centros Fe-S de la mitocondria actúan como mecanismo de percepción para regular la homeostasis de hierro en las células, de forma independiente de los niveles de hierro citosólicos (Sanvisens et al., 2011; Lill et al., 2012). La mutación de los componentes de la ruta de síntesis de centros Fe-S mitocondrial y su exportador Atm1 provoca una remodelación de la expresión génica similar a la de células crecidas en ausencia de hierro. Ambas condiciones inducen la activación del regulón de hierro (Hausmann et al., 2008; Miao et al., 2011).

El regulón de hierro lo constituyen un conjunto de unos 25-30 genes que codifican proteínas implicadas en la adquisición de hierro extracelular, en la movilización de reservas, en su redistribución y reciclaje en el interior de la célula y en la remodelación metabólica de procesos dependientes de hierro, optimizando su uso para procesos prioritarios en condiciones de ausencia de hierro (figura I-1) (Kaplan et al., 2009; Philpott et al., 2012). La activación del regulón de hierro está dirigida por los factores transcripcionales Aft1 y Aft2 (Blaiseau et al., 2001; Yamaguchi-Iwai et al., 2002; Rutherford et al., 2003). Ambos factores entran al núcleo y se unen a secuencias consenso (PyPuCACCCPu) denominadas *FeRE*, elementos de respuesta a hierro, presentes en la secuencia promotora de los genes del regulón (Yamaguchi-Iwai et al., 1996). La interacción de Aft1 con el DNA ocurre a través de un dominio rico en residuos básicos en el extremo amino terminal de la proteína. Sin embargo, su activación depende de un dominio rico en residuos de glutamina situado en el extremo carboxilo terminal (Ueta et al., 2007).

Estudios anteriores han descrito cómo Aft1 entra al núcleo a través de la importina Pse1 (Ueta et al., 2003) independientemente de los niveles de hierro intracelulares; mientras que su salida se produce a través de la exportina Msn5 de una forma dependiente de hierro. Sin embargo, recientemente se ha descrito que la exportación de Aft1 al citosol no es necesaria para inhibir su función transcripcional. En su lugar, el hierro desempeña un papel importante en la liberación de Aft1 de las secuencias de promotoras a las que se une, regulando así su actividad transcripcional (Ueta et al., 2012).

## Introducción

Aft1 y Aft2 guardan un 39% de homología y realizan funciones parcialmente solapantes. La delección de *AFT1* en condiciones de deficiencia de hierro provoca un defecto de crecimiento, que se exagera con la delección de *AFT2*. Se ha descrito que, mientras Aft1 controla la expresión de los genes responsables de la adquisición de hierro extracelular, Aft2 tiene mayor implicación en la redistribución del hierro intracelular (Rutherford et al., 2001; Courel et al., 2005).



**Figura I-1. Activación del regulón de hierro durante la deficiencia de hierro en *S. cerevisiae*.** Los factores transcripcionales Aft1 y Aft2 promueven un aumento en la adquisición de hierro extracelular, junto a su redistribución y reciclaje en el interior de la célula y la remodelación metabólica de procesos dependientes de hierro.

### - Adquisición de hierro del medio extracelular:

*S. cerevisiae* ha desarrollado tres mecanismos diferentes para aumentar la adquisición del hierro extracelular.

- Transporte reductivo de alta afinidad: debido a la baja solubilidad del hierro en un medio aeróbico, las células han desarrollado un sistema reductivo de alta afinidad dependiente de oxígeno. Las metalorreductasas Fre1 y Fre2

reducen el hierro a su estado ferroso, para que pueda transportarse al interior celular mediante el complejo transportador de alta afinidad formado por Fet3 y Ftr1. Fet3 es una multicobre ferroxidasa que oxida el hierro, a la vez que reduce una molécula de oxígeno, para ser transportado al interior celular por Ftr1 (Sanvisens et al., 2011).

- Transporte de baja afinidad: en ausencia de oxígeno, el hierro se transporta al interior celular por los transportadores de baja afinidad Fet4 y Smf1. *FET4* también se regula en función de la disponibilidad de oxígeno. En condiciones aeróbicas, el represor transcripcional Rox1 reprime la expresión de *FET4* para disminuir la entrada excesiva del metal que puede resultar tóxica para las células (Jensen et al., 2002; Sanvisens et al., 2011).

- Transporte de sideróforos: los sideróforos son moléculas orgánicas de bajo peso molecular quelantes de hierro, sintetizados por bacterias, plantas y hongos. *S. cerevisiae* no es capaz de sintetizar sideróforos, pero sí de transportarlos al interior de la célula gracias a la expresión de los genes *FIT1-3*, *FRE1-4* y *ARN1-4*, que forman parte del regulón. *FIT1-3* codifican para las manoproteínas que transportan los complejos  $Fe^{3+}$ /sideróforos a través de la pared celular. Posteriormente el hierro es reducido por las metalorreductasas Fre1-4 y transportado al citoplasma por el complejo Fet3/Ftr1 (Kaplan et al., 2009).

- Movilización y reciclaje del hierro intracelular:

Las vacuolas son los principales orgánulos para el almacenamiento de hierro en las células mediante el transportador de hierro Ccc1. En condiciones de exceso de hierro, Yap5 activa la expresión de *CCC1* aumentando el transporte de hierro a la vacuola. Sin embargo, en condiciones de escasez de hierro, Aft1 y Aft2 activan la expresión de *FRE6*, *FET5*, *FTH1* y *SMF3*, promoviendo la movilización del hierro almacenado en la vacuola. El hierro se reduce por la metalorreductasa Fre6 y posteriormente es transportado al citosol por el complejo Fet5/Fth1, homólogo al complejo Fet3/Ftr1. Además, el hierro también es exportado de la vacuola por el

## *Introducción*

transportador de baja afinidad Smf3, cuyos niveles de expresión también están regulados según los niveles de hierro y oxígeno, igual que ocurre con *FET4* (Kaplan et al., 2009).

Las mitocondrias también poseen cantidades importantes de hierro almacenado en forma de centros Fe-S y grupos hemo, que pueden ser reutilizados como cofactores de numerosas proteínas durante la deficiencia de hierro. La activación del regulón de hierro induce la expresión de *MRS4* que codifica para el transportador de hierro a la mitocondria, sugiriendo que la síntesis de centros Fe-S mitocondrial es uno de sus principales destinos (Mühlenhoff et al., 2003; Froschauer et al., 2009).

El retículo endoplásmico también participa en la movilización y el reciclaje de hierro, ya que en su membrana se encuentra la hemo-oxigenasa Hmx1, cuya expresión se induce por Aft1 y Aft2, como parte del regulón. Hmx1 promueve la degradación de grupos hemo de las diferentes hemoproteínas permitiendo que el hierro pueda ser utilizado en otros procesos.

### - Remodelación metabólica:

La activación del regulón de hierro induce la expresión de los genes que codifican para las proteínas Cth1 y Cth2. Durante la deficiencia de hierro, ambas proteínas dirigen la respuesta postranscripcional mediante la desestabilización de mRNAs ejerciendo un papel clave en la remodelación metabólica.

#### 2.2.2. Regulación postranscripcional a través de las proteínas Cth1 y Cth2.

Cth2 es una proteína esencial en la homeostasis del hierro debido a su papel como factor postranscripcional. En un medio con déficit de hierro, los factores transcripcionales Aft1 y Aft2 se unen a las secuencias *FeRE* que se encuentran en la región promotora de *CTH2* e inducen su transcripción. La expresión de Cth2 provoca una remodelación metabólica en las células esencial para el crecimiento en estas condiciones.

## -Estructura y función de Cth2:

Cth2 es una proteína de 285 aminoácidos que presenta en su estructura un dominio de dedos de zinc repetidos en tándem de tipo C<sub>x8</sub>C<sub>x5</sub>C<sub>x3</sub>H (TZF, “*Tandem Zinc-Finger*”, donde “x” es cualquier aminoácido) situados en el extremo carboxilo terminal. Estos dominios permiten la unión de Cth2 a secuencias ricas en adenina y uracilo conocidos con el nombre de elementos ricos en AU o AREs (“*AU Rich Elements*”) situados en la región 3’ no-traducida (3’-UTR, “*UnTranslated Region*”) de algunos RNAs mensajeros. La unión de Cth2 a estas secuencias induce la desestabilización de estos mRNAs diana implicados en procesos dependientes de hierro (figura I-2). La interacción entre Cth2 y los mRNAs dianas exige la integridad de ambos elementos, ya que la mutación de uno de los TZFs o las secuencias AREs impide la unión y posterior degradación del RNA mensajero (Puig et al., 2005).

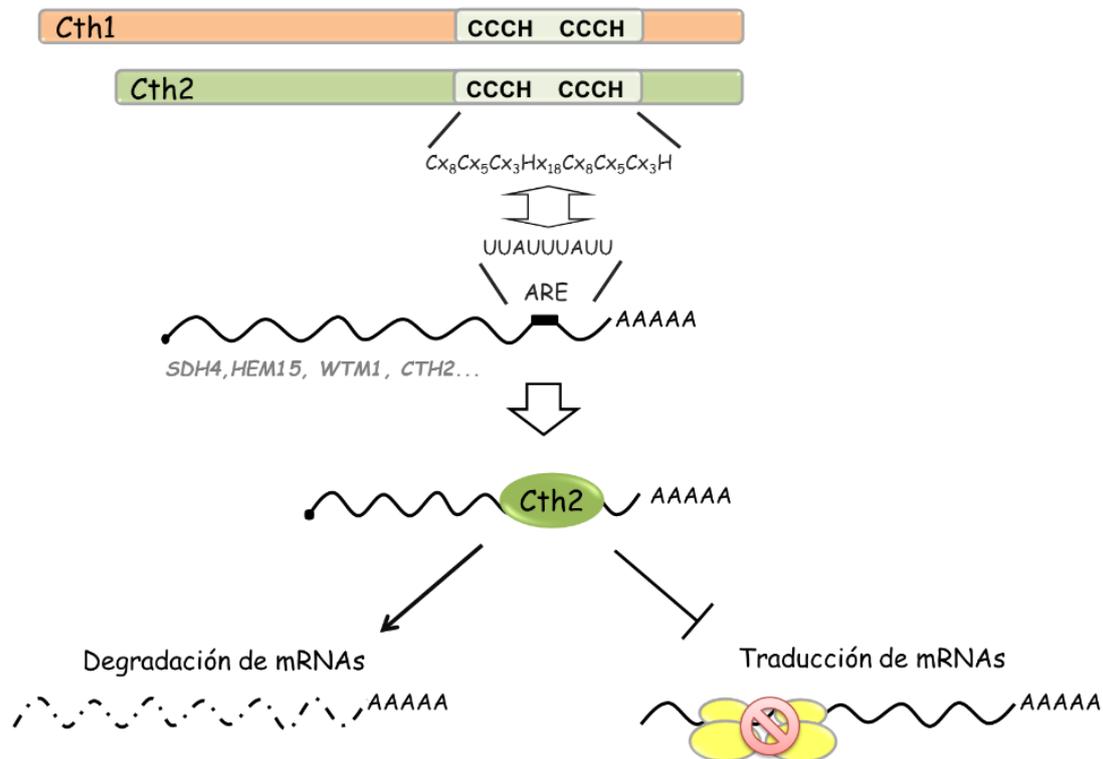
Además de la inducción de Cth2, Aft1 y Aft2 también activan la expresión del gen *CTH1*, que codifica para una proteína de 325 aminoácidos con dos TZFs y que presenta un 46% de identidad con Cth2. Al igual que Cth2, Cth1 se une a las secuencias ARE de mRNAs que codifican para procesos dependientes de hierro a través de sus TZFs. Se ha observado que dobles mutantes *cth1Δcth2Δ* presentan defectos de crecimiento en medios con baja biodisponibilidad de hierro más severos que los mutantes simples *cth1Δ* y *cth2Δ* (Puig et al., 2008). A pesar de que ambas proteínas tienen una función redundante, se han observado cambios en sus patrones de expresión. Cth1 se expresa de manera transitoria durante las primeras etapas del crecimiento en ausencia de hierro, mientras que la inducción de Cth2 ocurre cuando el déficit de hierro es más severo y los niveles que se alcanzan son más elevados. Estas diferencias de expresión podrían deberse a sus preferencias por los mRNAs dianas que degradan. Cth1 produciría cambios en las funciones mitocondriales, que serían suficientes en etapas tempranas de escasez de hierro; mientras que Cth2 induciría cambios en otros procesos dependientes de hierro cuando la deficiencia de hierro es más severa (Puig et al., 2005; Puig et al., 2008).

La homología entre Cth2 y la proteína humana hTTP es mayor en los TZFs. TTP tiene un papel importante en la respuesta antiinflamatoria y en procesos de supresión de tumores, ya que participa en la degradación de mRNAs que codifican

## *Introducción*

para el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), mediadores pro-inflamatorios y reguladores del ciclo celular. Debido a la importancia de TTP, numerosos grupos se han centrado en caracterizar la expresión y función de la proteína. Así pues, se ha caracterizado como la unión de TTP a sus mRNAs diana se da través de los TZFs que reconocen las secuencias AREs en los mensajeros. Esta unión provoca una desestabilización y una bajada en la eficiencia de traducción de los mRNAs (Sanduja et al., 2012; Brooks et al., 2013). Asimismo, se ha identificado TTP como una proteína altamente modificada a nivel postraduccional, ya que se fosforila en más de 30 residuos. La fosforilación de TTP en los diferentes residuos provoca cambios en su estabilidad, localización y en la regulación de su función (Mahtani et al., 2001; Clark et al., 2016).

De la misma forma, estudios recientes han caracterizado cómo la proteína Cth2 participa en la inhibición de la traducción de sus mRNAs dianas durante la deficiencia de hierro (figura I-2). La unión de Cth2 a través de sus TZFs a las AREs de los mRNAs provoca una bajada en la eficiencia de traducción de los transcritos. Al igual que ocurre con la degradación de mensajeros, la inhibición de la traducción por Cth2 requiere que se mantenga la integridad de los TZFs de la proteína y las AREs de los mRNAs diana. Además, se ha caracterizado la importancia del dominio amino terminal de Cth2 en la degradación e inhibición de la traducción de los mRNAs diana, mientras que el dominio carboxi terminal solo se requiere para la regulación de la traducción de sus dianas ( Ramos-Alonso et al., 2018).



**Figura I-2. Representación esquemática de la estructura y función de las proteínas Cth1 y Cth2.** Las proteínas Cth1 y Cth2 se unen a través de sus TZFs a las secuencias AREs de sus mRNAs diana. La unión de Cth2 a los mRNAs induce su desestabilización y la inhibición de su traducción.

#### - Mecanismo de acción de Cth2:

Cth2 es un factor postranscripcional que transita entre el núcleo y el citoplasma de las células durante la deficiencia de hierro. Cth2 entra al núcleo, donde une sus mRNAs diana. Se ha descrito la acumulación de Cth2 en el núcleo cuando la proteína presenta los TZFs mutados y es incapaz de unirse a sus mRNAs diana. También se ha descrito esta acumulación nuclear tras inhibir la transcripción de la RNA polimerasa II y en mutantes de la exportación de mRNAs *mex67-5* o *xpo1-1* (Vergara et al., 2011). Estos resultados sugieren que la salida de Cth2 del núcleo requiere la unión a sus mRNAs diana.

Estudios previos han identificado la interacción entre Cth2 y el dominio carboxilo terminal de la RNA helicasa Dhh1 en condiciones de deficiencia de hierro

## Introducción

(Pedro-Segura et al., 2008). Hasta el momento se ha descrito como Dhh1 participa, a nivel global, en el proceso de eliminación de la caperuza (“*decapping*”) de los mRNAs mediante el reclutamiento de la maquinaria de *decapping* de mensajeros. De esta forma, promueve la desestabilización de los mRNAs por la exonucleasa Xrn1, que degrada los mRNAs en dirección 5'→3' en los cuerpos de procesamiento o “*P-bodies*”. (Coller et al., 2004; Carroll et al., 2011; Mugler et al., 2016). De la misma forma, Dhh1 participa en la represión del inicio de la traducción de los mRNAs (Coller & Parker 2005). Recientemente, se ha identificado su papel como sensor de la velocidad de los ribosomas durante la traducción, mediando el acoplamiento entre la traducción y la degradación de los mRNAs (Presnyak et al., 2013; Radhakrishnan et al., 2016). En deficiencia de hierro, se ha demostrado como Cth2 promueve la degradación 5'→3' del mRNA *SDH4*. Sin embargo, esto no ocurre en ausencia de la helicasa Dhh1, sugiriendo su participación en la regulación de los mRNAs en estas condiciones. Por otra parte, a pesar de no haberse detectado la formación de *P-bodies* en deficiencia de hierro, la delección de las proteínas de *decapping* o la exonucleasa Xrn1 en ausencia de hierro promueven la acumulación de Cth2 en estos complejos (Pedro-Segura et al., 2008).

A partir de estos resultados se ha propuesto un modelo en el que la proteína Cth2 entraría al núcleo, donde se produciría la unión a los mRNAs diana de forma cotranscripcional. A continuación, Cth2 unido al mRNA se exportaría al citoplasma, a través de la maquinaria de exportación de mRNAs, donde se reclutaría la maquinaria de *decapping* y desadenilación de mRNA. Finalmente, la exonucleasa Xrn1 produciría la degradación del mRNA en sentido 5'→3' (Martínez-Pastor et al., 2013).

- Regulación de los niveles de Cth2:

### Regulación postranscripcional:

Estudios previos han mostrado como la sobreexpresión de la proteína Cth2 resulta tóxica para la célula (Pedro-Segura et al., 2008). Por este motivo, las células han desarrollado diferentes mecanismos que regulan los niveles de Cth2. Por un

lado, se ha identificado un mecanismo postranscripcional por el que se regulan los niveles de mensajero *CTH1* y *CTH2* a través de AREs presentes en la región 3'UTR de ambos mRNAs (Ciais et al., 2008; Martínez-Pastor et al., 2013). El modelo propone que durante la progresión de la deficiencia de hierro ocurre una regulación cruzada entre Cth1 y Cth2 que facilita los cambios en sus perfiles de expresión. A medida que los niveles de proteína Cth2 aumentan, se acelera la degradación del mRNA *CTH1*, restringiendo la expresión de Cth1 a las primeras etapas de limitación de hierro, y quedando Cth2 como regulador principal durante la deficiencia de hierro más severa. Además, durante la deficiencia de hierro la proteína Cth2 limita su propia expresión, induciendo la degradación de su mRNA y evitando que se acumule y resulte perjudicial para las células. Este mecanismo, además de impedir un aumento excesivo de los niveles de Cth2, permite que la proteína Cth2 desaparezca rápidamente si se produce un aumento en la disponibilidad de hierro facilitando la adaptación a este nuevo medio. Por otro lado, recientemente se ha demostrado que la autorregulación de Cth2 también se da a nivel traduccional. Al igual que ocurre con sus mRNA diana, Cth2 es capaz de inhibir su propia traducción a través de las AREs de su mRNA (Ramos-Alonso et al., 2018). La mutación de las secuencias AREs del mRNA *CTH2* resulta tóxica para las células, ya que se impide su autorregulación a ambos niveles y esto conlleva una acumulación de la proteína Cth2 (Martínez-Pastor et al., 2013).

#### Regulación postraduccional:

Estudios globales sugieren la interacción de Cth2 con la proteína Grr1, implicada en la ubiquitinación y degradación de proteínas, que forma parte del complejo SCF<sup>Grr1</sup> E3 ubiquitin ligasa (Mark et al., 2014). El complejo está formado por la culina Cdc53, que actúa de andamio, y las proteínas adaptadoras Rbx1, que interacciona con la E2 del mecanismo de ubiquitinación, y Skp1 que une a Grr1. Grr1 es una F-box y se encarga del reconocimiento específico de sustratos previamente fosforilados, a través de un dominio rico en leucinas. La interacción entre Grr1 y la proteína Skp1 del complejo se da a través de su dominio F-box, cuya delección impide la formación del complejo, pero no la interacción de Grr1 con sus sustratos

## Introducción

(Hsiung et al., 2001). Este mecanismo de degradación de proteínas podría ser utilizado por las células para mantener los niveles adecuados de proteína Cth2.

En mamíferos ya se ha descrito la participación de los complejos E3 ubiquitin ligasa en la homeostasis de hierro. En este caso, el sistema IRE-IRP desempeña un papel muy importante en la homeostasis celular de hierro. IRP1 e IRP2 son proteínas de unión a RNA, que se unen a elementos de respuesta a hierro o IREs (*Iron Response Elements*) de sus mRNAs dianas. De esta manera, las IRPs modulan la estabilidad o la eficiencia de traducción de transcritos implicados en el metabolismo del hierro (Ruiz et al., 2013; Muckenthaler et al., 2017). En condiciones de suficiencia de hierro, la proteína FBLX5 promueve la degradación de IRP2. FBLX5 es la F-box encargada del reconocimiento de sustratos dentro del complejo E3 ubiquitin ligasa SCF<sup>FBLX5</sup>. El complejo está compuesto por la proteína CUL1 que actúa como andamio y las proteínas adaptadoras RBX1 y SKP1. Al igual que ocurre en levaduras, SKP1 es la encargada de anclar a FBLX5 al complejo (Jin et al., 2004). Al igual que Grr1, FBLX5 posee un dominio rico en leucinas con el que interacciona con sus sustratos fosforilados. Además, se ha caracterizado en su extremo amino terminal un dominio hemeritina (Thompson et al., 2012). A través de este dominio FBLX5 es capaz de percibir cambios en la concentración de hierro y oxígeno, que provocan cambios en la estabilidad de la proteína. En presencia de hierro se estabiliza la proteína induciendo la degradación de IRP2; mientras que en ausencia del metal FBLX5 se desestabiliza favoreciendo la estabilización de IRP2 (Ruiz et al., 2014).

- Procesos regulados por Cth1 y Cth2 en deficiencia de hierro.

En respuesta al déficit de hierro en el medio, Cth1 y Cth2 promueven la desestabilización de un gran número de mRNAs de manera coordinada. Estos mRNAs codifican para proteínas implicadas en procesos metabólicos dependientes de hierro u otras proteínas que utilizan hierro como cofactor. Algunos de estos mRNAs codifican para enzimas implicadas en (Puig et al., 2005):

- Ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico: aconitasa y succinato deshidrogenasa.

- Respiración: algunos complejos de la cadena de transporte electrónico.
- Metabolismo de lípidos: proteínas de la síntesis de ergosterol como Erg11 y Erg5, y la desaturasa de ácidos grasos Ole1.
- Biosíntesis de grupos hemo: la ferroquelatasa Hem15 o la hemoproteína Cox10.
- Síntesis de centros Fe-S: las enzimas Isa1 y Nfu1.
- Metabolismo de aminoácidos: Leu1 en el caso de la leucina, Glt1 para la síntesis de glutamato.
- Almacenaje de hierro en la vacuola: Ccc1, importador vacuolar de hierro.
- Síntesis de dNTPs: degrada el mensajero de la proteína Wtm1 que mantiene anclada al núcleo la subunidad pequeña de la ribonucleótido reductasa, favoreciendo su activación y con ello un aumento de los dNTPs en estas condiciones.

### 3. La desaturasa de ácidos grasos Ole1.

#### 3.1. Regulación del metabolismo de lípidos.

*Saccharomyces cerevisiae* ha sido utilizada como modelo para estudiar la regulación del metabolismo de lípidos en células eucariotas. Muchas enzimas y regulaciones de las rutas del metabolismo de lípidos se han conservado desde levaduras hasta humanos, y tienen un importante papel en la constitución de las membranas celulares. Las membranas biológicas son estructuras dinámicas formadas por proteínas asociadas a la bicapa lipídica. Su composición varía entre diferentes organismos, tipos celulares y orgánulos; y determina sus diferentes funciones y propiedades. La permeabilidad y fluidez de membranas, dependen en gran medida de la composición y proporción de ácidos grasos saturados (SFAs) e insaturados (UFAs) y el nivel de esteroides.

La disminución de ácidos grasos monoinsaturados, que constituyen el 70% del total de ácidos grasos, causa estrés en la bicapa lipídica. Este estrés provoca la

## Introducción

activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, “*Unfolded Protein Response*”) y cambios en la estructura y morfología de los orgánulos, llegando a producir en ocasiones la muerte celular (Deguil et al., 2011; Surma et al., 2013). Por otra parte, la sobreproducción de ácidos grasos insaturados también provoca daños en las células, llegando a causar necrosis (Ballweg et al., 2016). En humanos, la falta de regulación del metabolismo lipídico se ha asociado a diferentes enfermedades neurológicas como la esquizofrenia, el Parkinson o el Alzheimer y otras patologías como la obesidad o la diabetes (Adibhatla et al., 2007; Stordeur et al., 2014).

En condiciones de deficiencia de hierro, *S. cerevisiae* presenta una disminución de la biosíntesis de ergosterol y esfingolípidos, debido a la participación de enzimas dependientes de hierro en ambas rutas (Shakoury-Elizeh et al., 2010). En el caso de la síntesis de ácidos grasos insaturados, se ha observado un aumento en la expresión de *OLE1* que codifica para la enzima responsable de la desaturación de los ácidos grasos y que utiliza el hierro como cofactor (Vasconcelles et al., 2001; Puig et al., 2005; Shakoury-Elizeh et al., 2010).

### 3.2. Estructura y función de Ole1:

El gen *OLE1* de *S. cerevisiae* codifica para la desaturasa  $\Delta 9$  de ácidos grasos cuya función es esencial para la síntesis *de novo* de ácidos grasos insaturados. Ole1 es una enzima de 53 kDa asociada a la membrana del retículo endoplásmico. Se trata de una proteína dependiente de hierro y oxígeno, ya que posee un grupo oxodihierro (Fe-O-Fe) en su centro catalítico, y está formada por un dominio desaturasa amino-terminal fusionado a un dominio citocromo b5 que también posee hierro (Martin et al., 2007). Esta enzima cataliza la introducción de dobles enlaces entre los carbonos 9 y 10 de los ácidos grasos monoinsaturados, palmitoil-CoA (16:0) y estearoil-CoA (18:0), dando lugar a los ácidos grasos insaturados, ácidos palmitoleico (16:1) y oleico (18:1), respectivamente (Stukey et al., 1990). A pesar de que solo pueden sintetizar ácidos grasos monoinsaturados, estas levaduras son capaces de captar ácidos grasos poliinsaturados del medio e incorporarlos a sus membranas lipídicas (Martin et al., 2007). La proporción de ácidos grasos saturados

e insaturados es un factor determinante para el empaquetamiento de lípidos que afecta a la fluidez de membranas. Por este motivo la falta de *OLE1* causa letalidad tras varias divisiones celulares, pero puede rescatarse añadiendo ácidos grasos insaturados al medio (Zhang et al., 1999).

### 3.3. Regulación de la expresión de *OLE1*:

Los niveles de expresión de *OLE1* están regulados en respuesta a gran variedad de estímulos como cambios en la fuente de carbono, la temperatura, los niveles de oxígeno y algunos metales o la presencia de ácidos grasos insaturados. En concreto, se ha descrito un aumento de los niveles de mensajero *OLE1* en respuesta a disminución en la temperatura, bajada en los niveles de oxígeno o presencia de agentes quelantes de algunos metales. Por el contrario, la presencia de ácidos grasos insaturados en el medio provoca una represión de la expresión de *OLE1* (Kwast et al., 1999; Hoppe et al., 2000; Chellappa et al., 2001; Vasconcelles et al., 2001; Nakagawa et al., 2002).

Estudios centrados en la regulación de *OLE1* en ausencia de oxígeno y ácidos grasos insaturados han permitido identificar elementos *cis* en la secuencia promotora del gen *OLE1* que intervienen en la regulación de su expresión. El elemento FAR (*"Fatty Acid Repression"*) situado 580 pares de bases aguas arriba (*"upstream"*) del codón de inicio de la traducción es esencial para la represión por ácidos grasos insaturados (Choi et al., 1996). El segundo elemento *cis* identificado, LORE (*"Low Oxygen Element Response"*) se encuentra 200 pares de bases aguas abajo (*"downstream"*) del elemento FAR y es esencial para la activación de la transcripción en respuesta a hipoxia (Vasconcelles et al., 2001; Jiang et al., 2001).

La expresión de *OLE1* está controlada por los factores transcripcionales Spt23 y Mga2. La delección de alguno de estos factores transcripcionales no tiene ningún efecto en la viabilidad de las células en condiciones normales. Sin embargo, la delección simultánea de ambos factores causa letalidad y puede rescatarse añadiendo ácidos grasos insaturados al medio (Zhang et al., 1999). Ambos factores se sintetizan como precursores inactivos de 120 kDa (p120) que forman

## Introducción

homodímeros anclados a la membrana del retículo endoplásmico a través de su dominio hélice transmembrana (TM) de la región carboxilo terminal. El procesamiento proteolítico de uno de los miembros del dímero genera un fragmento de 90 kDa (p90) del extremo amino terminal, que finalmente se libera y se transloca al núcleo produciendo la activación de la expresión de *OLE1*. La activación de ambos factores transcripcionales requiere la poliubiquitinación del precursor p120 por la E3 ubiquitin ligasa Rsp5, que posibilita el reclutamiento y el procesamiento por el proteasoma y por el complejo segregasa Cdc48<sup>Ufd1/Npl4</sup>. De esta forma se produce la liberación del péptido p90 que entra al núcleo y promueve la activación transcripcional de *OLE1*. Mga2 y Spt23 no poseen dominios clásicos de unión a DNA, esto sugiere que la regulación de la transcripción ocurre a través de la remodelación de la cromatina (Zhang et al. 1997).

Rsp5 es una E3 ubiquitin ligasa de la familia HECT que participa en la ubiquitinación de proteínas y está implicada en una gran variedad de funciones entre las que se incluyen la endocitosis, distribución de enzimas específicas entre la mitocondria y el citosol y la herencia mitocondrial (Kaliszewski et al., 2008). Rsp5 es esencial para la supervivencia de las células debido a su papel en la regulación de la síntesis de ácidos grasos insaturados, ya que su letalidad puede rescatarse parcialmente al suplementar el medio con ácidos grasos insaturados (Hoppe et al., 2000) . La interacción de Rsp5 con Spt23 y Mga2 provoca la ubiquitinación y procesamiento del precursor p120 mediante el reclutamiento del complejo segregasa Cdc48<sup>Ufd1/Npl4</sup>. Este complejo está formado por la subunidad catalítica Cdc48 de la familia AAA ATP-asa y los cofactores Ufd1 y Npl4; y forma parte de la maquinaria general que libera proteínas ubiquitinadas asociadas a la membrana del retículo endoplásmico a través del proteasoma (Hitchcock et al., 2001). Este mecanismo implicado en la regulación de *OLE1* se ha descrito como vía *OLE* ("*OLE pathway*") y guarda muchas similitudes con el sistema de degradación de proteínas asociadas al retículo endoplásmico (ERAD, "*ER-associated degradation*") que elimina proteínas mal plegadas del retículo a través del proteasoma (Vembar et al., 2008).

### 3.4. Mga2 como sensor de la fluidez de membrana.

Mga2 es el factor transcripcional dominante en la regulación de *OLE1* y actúa como sensor del empaquetamiento de lípidos de la membrana de retículo endoplásmico a través de su dominio hélice transmembrana. El aumento de ácidos grasos saturados en la membrana del retículo provoca un cambio en la orientación rotacional del segmento transmembrana de Mga2. Este cambio rotacional induce la activación de Mga2 a través del procesamiento proteolítico descrito previamente que produce la activación transcripcional de *OLE1* para aumentar la concentración de ácidos grasos insaturados (Covino et al., 2016).

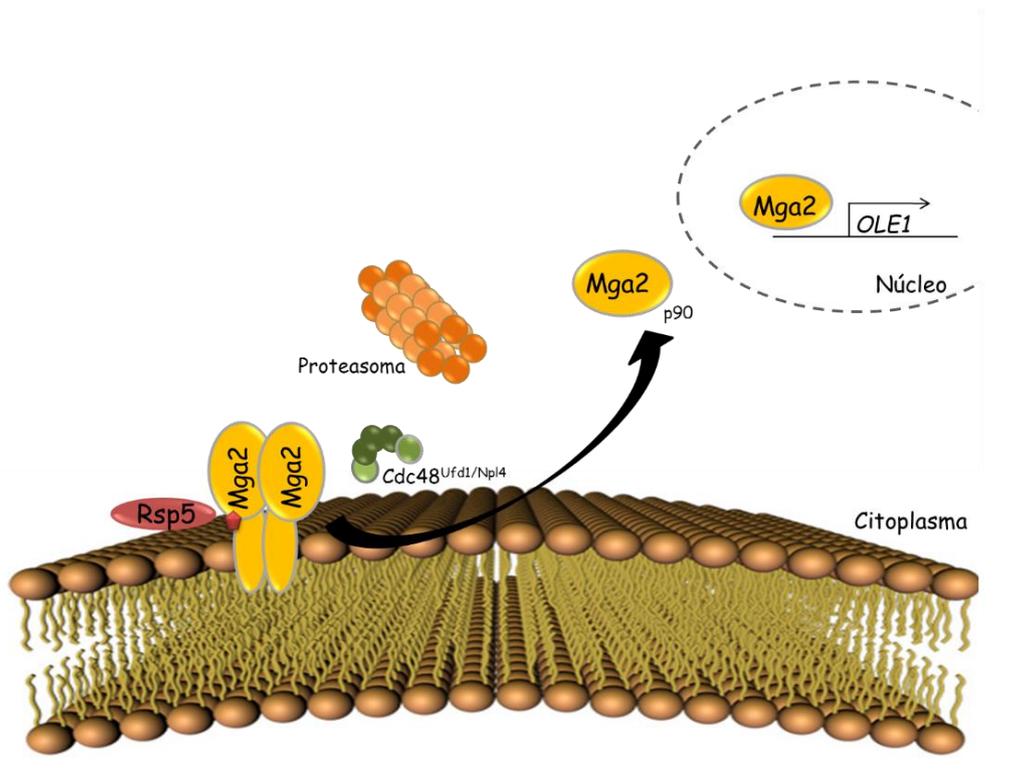


Figura I-3. Activación transcripcional de *OLE1* a través de Mga2. El procesamiento de Mga2, tras la ubiquitinación por Rsp5 y la acción del complejo Cdc48<sup>Ufd1/Npl4</sup> y el proteasoma, libera el fragmento p90 que finalmente entra al núcleo promoviendo la expresión de *OLE1*.

#### **4. Vía de señalización de nutrientes o ruta TOR.**

La ruta TOR (*Target Of Rapamycin*) o vía de señalización de nutrientes es una ruta de serina/treonina quinasas altamente conservada desde levaduras a mamíferos. Esta ruta regula el crecimiento y el metabolismo celular en respuesta a diferentes estreses ambientales. *S. cerevisiae* ha jugado un papel muy importante en la descripción de las características y funciones de la ruta TOR. A diferencia de lo que ocurre en la mayoría de organismos eucariotas que poseen un único gen *TOR*, en levaduras se han identificado dos genes, *TOR1* y *TOR2*, que codifican para dos fosfatidilinositol proteín quinasas, Tor1 y Tor2. Estas proteínas forman parte de los complejos TORC1 y TORC2, respectivamente. El complejo TORC1 está formado por las proteínas Tor1, Kog1, Lst8 y Tco89, y es sensible a rapamicina. Su activación afecta a la síntesis de proteínas, la biogénesis de ribosomas, la transcripción, el ciclo celular, la meiosis, la captación de nutrientes y la autofagia ( Reinke et al., 2004; Loewith et al., 2011). En ocasiones, la proteína Tor1 del complejo TORC1 puede ser sustituida por Tor2. El complejo TORC2 contiene la proteína Tor2 asociada con las proteínas Avo1-3, Bit61 y Lst8. A diferencia de TORC1, TORC2 es insensible a rapamicina y afecta a la organización del citoesqueleto de actina durante la polarización celular, la endocitosis y la supervivencia celular. Otra diferencia entre ambos complejos es que el complejo TORC1 se localiza mayoritariamente asociado a la membrana de la vacuola mientras que TORC2 se encuentra asociado a la membrana plasmática (Berchtod et al., 2009; Loewith et al., 2011).

La actividad de TORC1 se regula en respuesta a diferentes estreses ambientales. La exposición a rapamicina o cafeína, estrés salino, o la escasez de nutrientes como la falta de aminoácidos o de fuentes de carbono en el medio provocan una inhibición en la actividad de TORC1. Esta inhibición del complejo TORC1 provoca una reducción en la fosforilación de la quinasa Sch9 y en el complejo Tap42-PP2A. Sch9 es una proteína de 92 kDa, miembro de la familia de AGC quinasas. El complejo TORC1 fosforila seis serinas y treoninas presentes en el extremo carboxilo terminal de Sch9, siendo esta fosforilación esencial para que se produzca su activación (Urban et al., 2007). TORC1 también regula el complejo Tap42-PP2A. Este complejo está formado por la proteína Tap42 que interactúa con

las subunidades catalíticas de la fosfatasa de tipo 2A (PP2A), Pph21 y Pph22, y las fosfatasas Sit4, Pph3 y Ppg1 (Di Como et al., 1996; Yan et al., 2006). La interacción de Tap42 con las fosfatasas es un proceso dinámico que está regulado por la disponibilidad de nutrientes, siendo la activación de la ruta TOR la que favorece la fosforilación de Tap42 y promueve su interacción con las fosfatasas (Jiang et al., 1999).

A través de estas dos proteínas el complejo TORC1 permite a las células la adaptación a diferentes estreses ambientales regulando diferentes mecanismos en la fisiología de las células que influyen en el crecimiento de las células. Entre ellos se encuentran:

-Regulación transcripcional de los genes RPs (*Ribosomal protein*) y RiBis (*Ribosome biogenesis*).

El 50% de la actividad transcripcional de la RNA polimerasa II está dedicada a la expresión de genes de proteínas ribosómicas (RPs) y otras proteínas denominadas RiBis, necesarias para el procesamiento, el ensamblaje, la exportación nuclear de las partículas ribosómicas y su maduración citosólica. El complejo TORC1 regula la expresión coordinada de estos grupos de genes a través de diferentes mecanismos. Uno de ellos es la regulación de los genes RPs a través del sistema Ifh1/Fhl1/Crf1 (Loewith et al., 2011). Fhl1 se une a la región promotora de los genes y ejerce un efecto activador o represor en función de la proteína que se le una. En condiciones normales, cuando la ruta TOR está activa, Ifh1 está fosforilado y se une a Fhl1 ejerciendo su función como coactivador. Sin embargo, cuando la ruta TOR está inactiva se produce la fosforilación de Crf1 que se une a Fhl1 y ejerce su efecto como corepresor (Kim et al., 2016). Además de este sistema, el complejo TORC1 se une directamente y fosforila el activador transcripcional Sfp1, que se une a los promotores de los RPs y RiBis regulando su transcripción. Sfp1 interacciona con la proteína Mrs6 que es esencial para la localización nuclear. De esta forma, la ruta TOR activa favorece la expresión de estos genes en condiciones de crecimiento óptimas (Marion et al., 2004; Lempiäinen et al., 2009).

## Introducción

De la misma forma, TORC1 también regula la expresión de ambos grupos de genes a través de la quinasa Sch9 (Huber et al., 2009). Los promotores de los genes RiBis poseen elementos PAC (*Polymerase A and C*) y RRPE (*rRNA processing element*). Las proteínas Dot6 y Tod6 se unen a los elementos PAC mientras que Stb3 reconoce los elementos RRPE, y actúan como represores transcripcionales (Hughes et al., 2000; Liko et al., 2007). Stb3 también se une a secuencias ricas en T presentes en los promotores de los genes RPs. La quinasa Sch9 fosforila estas tres proteínas en condiciones óptimas de crecimiento (Huber et al., 2011). En cambio, la falta de nutrientes provoca la inactivación de TORC1 y la consecuente inactivación de Sch9, impidiéndose la fosforilación de los represores y permitiendo su unión a las regiones promotoras de los genes. De esta forma se produce el reclutamiento del complejo desacetilador de histonas RPD3L y se reprime la transcripción de los genes (Rohde et al., 2003; Humphrey et al., 2004).

Los ribosomas están formados por las proteínas ribosómicas asociadas a los rRNAs transcritos por las RNA polimerasas I y III. La producción de todas estas proteínas implicadas en la formación de los complejos ribosómicos conlleva un gasto energético muy alto para las células, por lo que las células también regulan la actividad de las RNA polimerasas I y III de manera coordinada en respuesta a las condiciones ambientales a través la ruta TOR. De esta forma se limita el gasto energético en condiciones de crecimiento desfavorable para las células.

### -Regulación de la RNA polimerasa I.

En *S. cerevisiae* el rDNA está formado por unas 150 copias situadas en tándem en el cromosoma XII. Cada repetición está compuesta por un rDNA *35S*, que es transcrito como un rRNA 35S policistrónico por la RNA polimerasa I, a partir del cual se originan los 18S, 5.8S y 25S, un rDNA *5S* transcrito por la RNA polimerasa III y dos regiones intergénicas no transcritas. Alrededor del 60% de la transcripción total de las células se atribuye a la actividad de la RNA polimerasa I. Entre los diferentes factores requeridos para el inicio de la transcripción de la RNA polimerasa I se encuentra la proteína Rrn3 que actúa como proteína activadora tras

su unión a una de las subunidades de la polimerasa. La formación de este complejo Rrn3-polimerasa I es un paso crucial para la regulación de la transcripción del rRNA. Se ha descrito cómo la inactivación de la ruta TOR promueve la degradación de Rrn3 a través del proteasoma favoreciendo la disminución de los complejos Rrn3-polimerasa I y permitiendo la asociación de homodímeros inactivos de la polimerasa I (Philippi et al., 2010; Torreira et al., 2017). Estudios recientes han mostrado evidencias de la unión del complejo Ccr4-Not al rDNA y a la propia polimerasa I; y cómo este complejo se requiere para la regulación de la transcripción de la polimerasa I a través de la ruta TOR ((Laribee et al., 2015).

#### -Regulación de la RNA polimerasa III.

Los tRNAs son moléculas que participan en la traducción y se transcriben por la RNA polimerasa III, al igual que el rRNA *5S*. En *S. cerevisiae* se ha identificado Maf1 como el principal represor de la RNA polimerasa III tras su unión a la subunidad grande de la polimerasa (Pluta et al., 2001). La actividad de Maf1 depende de su estado de fosforilación. En condiciones de crecimiento favorables, cuando la ruta TOR está activa, Maf1 se fosforila por las quinasas Sch9 y PKA favoreciendo su inactivación y su exportación al citoplasma al través de Msn5 (Moir et al., 2006; Huber et al., 2009; Graczyk et al., 2018). Por otra parte, la fosforilación por la casein quinasa 2 también contribuye a la inactivación de Maf1, inhibiendo su asociación a la RNA polimerasa III (Graczyk et al., 2011). En condiciones de estrés, Maf1 se desfosforila por el complejo fosfatasa PP4 favoreciendo su localización nuclear y la represión de la RNA polimerasa III (Oler et al., 2012).

#### -Regulación de la síntesis de proteínas.

Los mecanismos de regulación descritos hasta el momento tienen un efecto en la traducción global de las células. De esta forma, condiciones de crecimiento óptimas favorecen un estado traduccional activo en las células. Sin embargo, cuando las condiciones de crecimiento son desfavorables la inactivación de la ruta TOR

## Introducción

promueve una bajada en la traducción de las células que implica una reducción en su tasa de crecimiento. Se ha descrito como la presencia de rapamicina o la falta de aminoácidos en el medio produce la fosforilación del factor de inicio de la traducción eIF2 $\alpha$  a través de la quinasa Gcn2, provocando una parada de la traducción. En condiciones óptimas de crecimiento el factor eIF2 $\alpha$  está unido a GTP iniciando la formación del complejo ternario (CT), constituido por eIF2 $\alpha$ -GTP y el metionil-tRNA iniciador (eIF2 $\alpha$ -GTP-Met-tRNA<sub>i</sub>). Tras formarse el complejo ternario se une la subunidad 40S del ribosoma formando el complejo de preiniciación que reconoce el codón de inicio de AUG (Jackson et al., 2010). Una vez el complejo encuentra dicho codón, el GTP unido al complejo se hidroliza a GDP, liberándose así eIF2-GDP, y se recluta la subunidad ribosómica 60S formándose el complejo de iniciación 80S responsable de la síntesis de proteínas. En condiciones de ayuno de aminoácidos se produce la activación de la quinasa Gcn2 debido a la unión de tRNAs no cargados, Gcn2 activo fosforila el factor eIF2 $\alpha$  (Dong et al., 2000; Dever, 2002). Esta fosforilación reduce la formación del complejo ternario causando una parada en la traducción global.

Al contrario de lo que ocurre con la traducción global de las células, la falta de aminoácidos aumenta selectivamente la traducción de Gcn4p, un factor de transcripción de la familia *bZIP* (*Basic Leucine-Zipper*) que activa la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos (Natarajan et al., 2001). El mRNA de *GCN4* se caracteriza por tener 4 uORFs (*Upstream Open Reading Frames*) en el extremo 5' no traducible. La primera uORF se traduce de forma eficiente en cualquier condición, tras esto la subunidad 40S del ribosoma permanece unida al mRNA y continúa escaneando. En condiciones normales, debido a los altos niveles de complejos TC, los ribosomas son capaces de unir de nuevo a un TC y reiniciar la traducción del resto de uORFs. Tras esto, se produce el reciclado de los ribosomas y su disociación del mRNA evitando que se alcance la ORF principal y se traduzca *GCN4*. Sin embargo, en condiciones de ayuno la fosforilación de eIF2 $\alpha$  disminuye la cantidad de TC, esto permite que la subunidad 40S recorra el mRNA desde la primera uORF sin encontrar un TC. De esta forma se facilita que alguna de las

subunidades sea capaz de alcanzar el codón de inicio AUG y unirse entonces a un TC induciendo así la traducción de *GCN4* de manera selectiva (Conrad et al., 2014).

-Regulación de la fosforilación de Rps6.

Rps6 es una proteína ribosómica altamente conservada desde levaduras a mamíferos. En levaduras, esta proteína presenta dos sitios de fosforilación Ser232/Ser233 en su región carboxilo-terminal que están conservadas en mamíferos, correspondiendo en este caso a las Ser235/Ser236. Se ha descrito cómo la presencia de nutrientes en el medio favorece la fosforilación de Rps6 en estas serinas de manera dependiente del complejo TORC1 y a través de la quinasa Ypk3 (González et al., 2015). A pesar de que en humanos la fosforilación de esta proteína promueve la transcripción de genes de la biogénesis de ribosomas, en levaduras no se ha caracterizado su función.

-Regulación de la ruta retrógrada mitocondrial (RTG).

La ruta retrograda es la vía encargada de la conexión entre el núcleo y la mitocondria, ya que la expresión nuclear debe regularse en función de la funcionalidad mitocondrial. Su regulación está ligada al envejecimiento, al mantenimiento del DNA mitocondrial, la señalización por la ruta TOR y la señalización de nutrientes. Esta ruta tiene un papel crucial en la remodelación del metabolismo, provocando que los genes *CIT1*, *ACO1*, *IDH1* y *IDH2*, que en condiciones normales están regulados por el factor Hap1, pasen a estar regulados por el complejo Rtg1/Rtg3 en células deficientes en respiración, y activen su transcripción (Liu et al., 1999). Además de este grupo de genes implicados en la biosíntesis de  $\alpha$ -cetoglutarato dentro del ciclo de Krebs, también se ha descrito la activación de *CIT2*, que participa en el ciclo del glioxilato y *DLD3*, que codifica para una D-lactato deshidrogenasa (figura I-4). Esta remodelación metabólica favorece la presencia de  $\alpha$ -cetoglutarato para la síntesis de glutamato que actúa como

precursor de otros aminoácidos y de bases nitrogenadas (Butow et al., 2004; Liu et al., 2006).

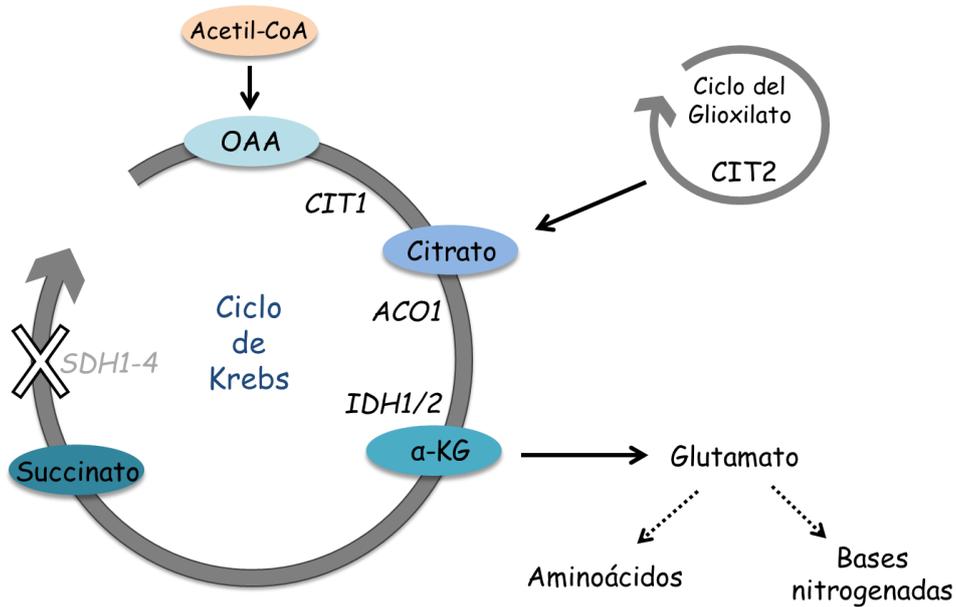


Figura I-4. Regulación metabólica mediada a través de la inducción de la ruta retrógrada cuando las células no respiran de forma eficiente.

La activación de esta ruta está mediada por los activadores transcripcionales Rtg1 y Rtg3, dos factores del tipo *bHLH-Zip* (*basic helix-loop-helix-leucine zipper*), que forman un heterodímero y entran al núcleo donde se unen a secuencias GTCAC conocidas como *R Box* en los genes diana. En condiciones normales, cuando la ruta RTG está inactiva, Rtg3 está hiperfosforilado y se mantiene en el citoplasma unido a Rtg1. Por el contrario, la activación de la ruta conlleva la desfosforilación parcial de Rtg3 y su entrada al núcleo junto a Rtg1 ejerciendo su función transcripcional. La entrada al núcleo de estos factores requiere de la proteína Rtg2, que interacciona de forma dinámica con la proteína Mks1, uno de los inhibidores de la vía RTG (Liu et al., 2003) (figura I1-5). Cuando la vía está inactiva, Mks1 está unido a las proteínas Bmh1/2 evitando la activación de Rtg1/3. El paso crítico en la activación de la ruta requiere la interacción entre Rtg2 y Mks1. Pese a desconocerse cuál es la señal que media esta interacción, se ha propuesto que podría ser la bajada de las concentraciones fisiológicas de ATP, lo que favorece esta unión (Zhang et al., 2013).

Otro mecanismo implicado en la activación de la ruta es la degradación de Mks1 por el complejo ubiquitina ligasa SCF<sup>Grr1</sup>, impidiendo así su función inhibitoria (Liu et al., 2002; Liu et al., 2005).

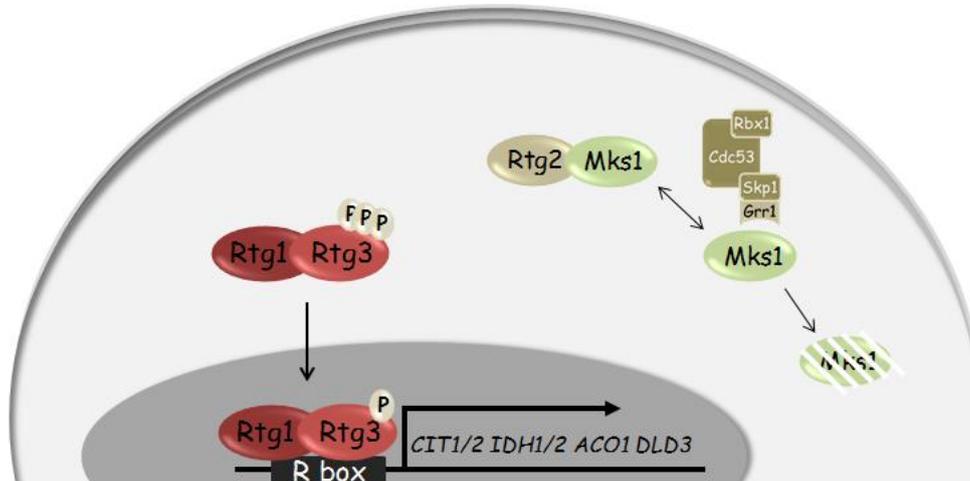


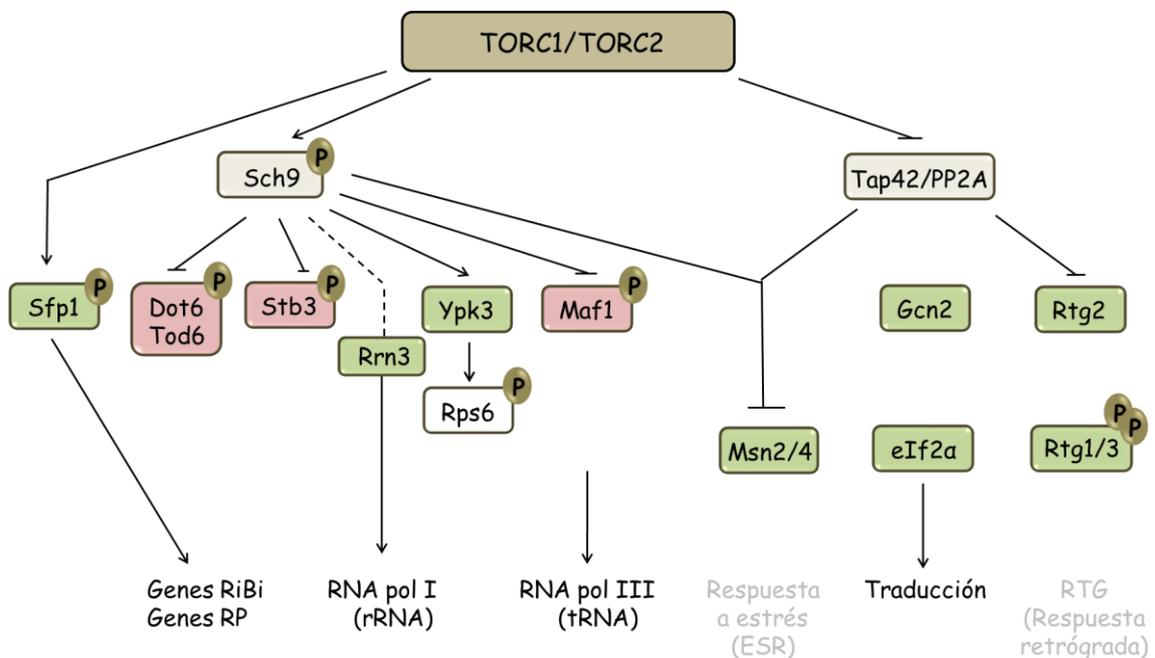
Figura I-5. Activación transcripcional de la ruta retrógrada mitocondrial.

La regulación de la respuesta retrógrada a través de la ruta TOR ocurre a través de la proteína Lst8, que forma parte del complejo TORC1. Esta regulación tiene lugar a dos niveles, uno a nivel de la percepción de los niveles de glutamato y el segundo en la activación de Rtg1/3 por Rtg2 (Liu et al., 2001). Además, se ha identificado la interacción entre Mks1 y el complejo TORC1 como reguladores negativos de la ruta, ya que parece que el complejo Mks1-TORC1 podrían fosforilar a Rtg3 directamente inactivándolo (Breitkreutz et al., 2010).

#### -Regulación de la respuesta a estrés:

El crecimiento de las células en presencia de condiciones de estrés conlleva la activación de la respuesta general de estrés o ESR (*Environmental Stress Response*) (Gasch et al. 2000). En ella, además de producirse la represión de genes implicados en el metabolismo del RNA, la traducción o la biosíntesis de nucleótidos que están relacionados con el crecimiento de las células, se produce la inducción de unos 300 genes. Estos codifican para proteínas implicadas en procesos de proteólisis, plegamiento de proteínas, metabolismo de carbohidratos, proteínas que

participan en reacciones redox para evitar la generación de especies reactivas de oxígeno, u otras que participan en la señalización intracelular. La ruta TOR participa en la regulación de esta ruta a través de la quinasa Sch9, y probablemente también por el complejo Tap42-PPasa. Los principales factores implicados en la activación de estos genes son las proteínas Msn2/4 a través de su unión a las secuencias promotoras STREs ("Stress Response Elements") (Martínez-Pastor et al., 1996). Los factores transcripcionales Gis1 y Hsf1, también participan en la activación de esta respuesta a estrés (Loewith et al., 2011).



**Figura I-6. Mecanismos regulados por la ruta TOR en condiciones de óptimas de nutrientes.** En verde se muestran las proteínas que tienen un efecto positivo en la regulación y en rojo las proteínas con función represora.

# *Objetivos*



La finalidad principal de este trabajo es identificar y caracterizar nuevos mecanismos que participen en la respuesta a deficiencia de hierro en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Para ello se han desarrollado los siguientes objetivos:

1. Caracterizar la respuesta transcripcional global de las células durante el transcurso de la deficiencia de hierro mediante la técnica *Genomic Run On* (GRO).
2. Establecer grupos de genes con un perfil similar de expresión que permitan identificar y caracterizar nuevos procesos regulados de forma coordinada en respuesta a la baja disponibilidad de hierro.
3. Caracterizar la regulación de la vía de señalización por nutrientes o ruta TOR en respuesta a la falta de hierro.
4. Estudiar la regulación transcripcional de la desaturasa de ácidos grasos Ole1 y su importancia en la adaptación a condiciones de déficit de hierro.
5. Estudiar el mecanismo molecular que regula por fosforilación a la proteína Cth2 en condiciones de deficiencia de hierro.



# ***Materiales y métodos***



## 1. Técnicas microbiológicas:

1.1 Listado de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas.

Cepa	Genotipo	Procedencia
<i>W303a</i> protótrofa	HTLU-2832-1B <i>His3</i> , <i>TRP1</i> , <i>LEU2</i> , <i>URA3</i> , <i>ADE2</i> , <i>can1</i>	Lab. Fred Cross
<i>pub1Δ</i>	SPY382 <i>pub1::KanMX</i>	Este trabajo
<i>BY4741</i>	<i>MATa</i> , <i>his3D1</i> , <i>leu2D0</i> , <i>met15D0</i> , <i>ura3D0</i>	Research Genetics
<i>rpd3Δ</i>	<i>rpd3::KanMX6</i>	Este laboratorio
<i>dot6Δtod6Δ</i>	<i>dot6::KanMX4</i> <i>tod6::his3MX6</i>	Este trabajo
<i>stb3Δ</i>	<i>stb3::KanMX4</i>	Research Genetics
<i>Sch9-HA</i>	ACY359: <i>Sch9-HA (TRP1)</i>	Lab. Andrew Capaldi
<i>Dot6-HA</i>	ACY322: <i>Dot6-HA (Kan)</i>	Lab. Andrew Capaldi
<i>Rrp12-GFP</i>	BY4741 <i>RRP12-GFP-His3MX6</i>	Lab. Joachim Griesenbeck
<i>Rrn3-GFP</i>	OCG0150	Lab. Olga Calvo
<i>HA-RPC160</i>	MW671 (alfa); <i>ade2-101</i> , <i>ade2-101</i> , <i>lys2-801</i> , <i>leu2-delta1</i> , <i>his3delta200</i> , <i>ura3-52</i> , <i>trp1-delta63</i> , <i>rpc160-1::HIS3</i> , <i>pC160-240[TRP1 HA-RPC160]</i>	Lab. Francisco Navarro
<i>rtg1Δ</i>	<i>rtg1::KanMX4</i>	Research Genetics
<i>rtg2Δ</i>	<i>rtg2::KanMX4</i>	Research Genetics
<i>rtg3Δ</i>	<i>rtg3::KanMX4</i>	Research Genetics
<i>spt23Δ</i>	<i>spt23::KanMX</i>	Research Genetics
<i>mga2Δ</i>	<i>mga2::KanMX</i>	Research Genetics
<i>fet3Δfet4Δ</i>	<i>fet3::KanMX</i> , <i>fet4::His3MX6</i>	Este laboratorio
<i>W303a</i>	<i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>trp1-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>ura3</i> , <i>can1-100</i>	Lab. Seiko Ishida
<i>aft1Δaft2Δ</i>	MML1088: <i>W303-1A aft1delta5 aft2::KanMX4</i>	Lab. Enrique Herrero
WT (FY23)	PSY580(FY23): <i>MATa ura3-52 leu2D1 trp1D63</i>	Lab. Pam Silver
<i>npl4-1</i>	PSY2340: <i>MATa ura3-52, leu2D1, trp1D63, npl4-1</i>	Lab. Pam Silver
<i>ufd1-1</i>	PSY3074: <i>his4-519, ura3-52, ade1-100, leu2-3,112 ufd1-1</i>	Lab. Pam Silver
WT (YWO1)	Y0002: <i>his3-D200, leu2-3,2-112, lys2-801, trp1-1(am), ura3-52</i>	Lab. Florian Paasch

## Materiales y métodos

<i>rsp5-1</i>	Y0356: <i>YWO1 rsp5::HIS3; ura3-52::RSP5::URA3</i>	Lab. Florian Paasch
WT	YWO 0607: <i>MATa ura3 leu2-3,112 his3-11,15 CanS Gal+</i>	Lab. Dieter H. Wolf
<i>pre1-1</i>	YWO 0608: <i>MATa pre1-1 ura3 leu2-3,112 his3-11,15 CanS Gal+</i>	Lab. Dieter H. Wolf
<i>cth2Δ</i>	<i>tis11::KanMX4</i>	Research Genetics
<i>cth1Δcth2Δ</i>	<i>cth1::KanMX4, cth2::HisMX6 #14</i>	
<i>Y80(w303 1a; WT)</i>	<i>MATa, can 1-100, ade2-1, his3-11,-15, leu2-3,-112, trp1-1, ura3-1</i>	Lab. Elledge
<i>skp1-11</i>	Y552	Lab. Elledge
<i>rbx1-1</i>	DKY219 <i>RBX1::HIS3 his3D200 canR cyhR ura3 leu2 trp1 lys2 MAT a CEN TRP1 rbx1-1</i>	Lab. Elledge
WT	<i>MATalpha his3D1 ura3D0 leu2D0 lys2D0</i>	Lab. D. Toczyski
<i>grr1Δ</i>	yJD45-1: <i>MATa his3D1 ura3D0 leu2D0 lys2D0 grr1::NLS-mRFP-LEU2</i>	Lab. D. Toczyski
<i>grr1Δrgt1Δ</i>	yJD54-1: <i>MATalpha his3D1 ura3D0 leu2D0 lys2D0 rgt1::KanMX grr1::NLS-mRFP-LEU2</i>	Lab. D. Toczyski
<i>rgt1Δ</i>	<i>rgt1::KanMX4</i>	Research Genetics
<i>cth2Δ</i>	SPY779 <i>cth2::hphB</i>	Este trabajo
<i>grr1Δcth2Δ</i>	yJD45-1 <i>cth2::hphB</i>	Este trabajo
<i>grr1Δrgt1Δcth2Δ</i>	yJD53-1 <i>cth2::hphB</i>	Este trabajo
<i>rgt1Δcth2Δ</i>	SPY786 <i>cth2::hphB</i>	Este trabajo
<i>hrr25Δ</i>	<i>MATa hrr25::KanMX4</i>	Este trabajo
<i>hrr25Δcth2Δ</i>	<i>MATa hrr25::KanMX4 cth2::HisMX6</i>	Este trabajo

### 1.2. Condiciones de crecimiento en *Saccharomyces cerevisiae*.

- Crecimiento en medio líquido:
  - YPD: medio rico compuesto por extracto de levadura al 1% (p/v), peptona bacteriológica al 2% (p/v) y glucosa al 2% (p/v).
  - SC: medio sintético completo compuesto por *Yeast Nitrogen Base* sin aminoácidos y sin sulfato amónico (*Difco*) 0.17% (p/v), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5% (p/v), glucosa 2% (p/v) y mezcla de requerimientos preparada

(*Formedium*) 0.2% (p/v). Para mantener la selección de levaduras transformadas con plásmidos con selección nutricional se utilizó SC sin alguno de los requerimientos. En algunos casos la fuente de carbono ha sido modificada por galactosa 2% (p/v) y/o rafinosa 2%.

Para llevar a cabo los experimentos de este trabajo en medio líquido, se seleccionaron colonias independientes para su crecimiento durante toda la noche hasta alcanzar el estado estacionario. Posteriormente las células fueron reinoculadas a una  $DO_{600}$  entre 0.1-0.2 e incubadas durante 3-9 horas a 30°C en un agitador orbital a 190 rpm en algunas de las siguientes condiciones de cultivo:

-Condiciones de suficiencia de hierro (+Fe): células reinoculadas en medio SC.

-Condiciones de deficiencia de hierro (-Fe): células reinoculadas en medio SC suplementado con 100  $\mu$ M de sulfato de bazofenantrolina (BPS, *Sigma*).

-Condiciones de hipoxia: células reinoculadas en SC sometidas a bombeo de nitrógeno durante 5 horas a una presión constante.

-Condiciones de baja temperatura: células reinoculadas en SC a 10°C durante una hora.

-Condiciones de presencia de ácido linoleico (18:2): células reinoculadas en medio SC suplementado con 1 mM de ácido linoleico estabilizado en Tergitol Nonidet P40 (*Sigma*) al 1%.

-Condiciones de crecimiento para mutantes termosensibles: células reinoculadas a temperatura restrictiva (37°C) durante al menos 3 horas, tras las cuales se someten a condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro manteniendo la temperatura restrictiva.

-Condiciones de crecimiento en presencia de rapamicina: células reinoculadas en medio SC hasta alcanzar la fase exponencial, momento en el que se añadió la Rapamicina (*Sigma*) a una concentración final de 1  $\mu$ g/ $\mu$ L durante 15 minutos.

○ Crecimiento en medio sólido:

El medio sólido se obtuvo añadiendo agar bacteriológico al 1.5% (p/v) a los medios descritos previamente. Para seleccionar transformantes con marcadores de auxotrofia se utilizó medio SC sin algún requerimiento. Para la selección con marcadores de resistencia a antibiótico se utilizó Geneticina (*G418, Gibco*) a una concentración final de 200 µg/mL.

Los ensayos de crecimiento en placa se llevaron a cabo a partir de cultivos de levadura crecidos durante toda la noche en medio SC y reinoculadas al día siguiente hasta alcanzar la fase exponencial. Tras igualar la DO<sub>600</sub> de los cultivos a 0.1 se hicieron diluciones seriadas (1:10, 1:100) y se realizaron las gotas con el *replicate plater* en placas de:

-Condiciones de suficiencia de hierro: SC, YPD.

-En presencia de galactosa y/o rafinosa: la glucosa del medio se sustituyó por 2% galactosa y/o 2% rafinosa.

-Condiciones respiratorias (YPGE): la glucosa se sustituyó por 3% glicerol y 2% etanol.

-Condiciones de deficiencia de hierro: en presencia de ferrocina (3-(2-piridil)-5,6 bis (4-ácido fenol sulfónico)-1,2,4-triacina, *Sigma*) a concentraciones entre 300-800 µM.

-Condiciones de presencia de ácidos grasos: los ácidos grasos, linoleico y oleico se añadieron a una concentración final de 1 mM estabilizados en Tergitol Nonidet p40 (*Sigma*) al 1%.

### 1.3. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae*.

Para la transformación de levaduras se utilizó el protocolo de acetato de litio, en el que las células son incubadas en presencia de acetato de litio, polietilenglicol, DNA "carrier" y el plásmido o "cassette" de interés y sometidas a un choque térmico de 42°C durante 20 minutos. Si la selección de transformantes requiere presencia

de antibióticos, las células fueron incubadas YPD durante dos horas en agitación tras el choque térmico. Posteriormente, las células se sembraron en los diferentes medios de selección y se incubaron a 30°C durante 2 o 3 días.

#### 1.4. Determinación del número de células y volumen celular.

Para determinar el volumen celular se utilizó el contador celular *COULTER COUNTER® Z™ Series*. Las muestras se diluyeron previamente en agua destilada estéril en función de la DO<sub>600</sub> y se añadieron a 10 mL de isotón en los recipientes adaptados para el contador celular. Las muestras se sonicaron antes de medir.

#### 1.5. Condiciones de crecimiento en *Escherichia coli*.

Células competentes de la cepa de *E. coli* (*F*- *mrcA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMSmcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*) (*One Shot® TOP10 Competent Cells, Invitrogen*). Las bacterias se crecieron a 37°C en agitación durante toda la noche.

- Crecimiento en medio líquido: medio Luria Bertani (LB: extracto de levadura 0.5% (p/v), triptona 1% (p/v), NaCl 1% (p/v)) suplementado con ampicilina a una concentración final de 50 µg/mL para mantener bacterias con plásmidos que confieren la resistencia al antibiótico.
- Crecimiento en medio sólido: el medio sólido se obtuvo añadiendo un 1,5 % (p/v) de agar bacteriológico al medio líquido y ampicilina a una concentración final de 50 µg/mL.

#### 1.6. Transformación de *Escherichia coli*.

Células competentes de la cepa de *E. coli* (*F*- *mrcA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMSmcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*) (*One Shot® TOP10 Competent Cells, Invitrogen*) fueron utilizadas como vehículo de propagación y aislamiento de plásmidos. Su transformación se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante.

## **2. Técnicas de biología molecular:**

### 2.1 Técnicas moleculares para el estudio y manipulación del DNA.

#### 2.1.1. Obtención de DNA genómico.

El DNA genómico se obtuvo a partir de un cultivo en YPD crecido a 30°C durante toda la noche. Tras recoger las células por centrifugación se resuspendieron en 200 µL de tampón de lisis para DNA (Triton X-100 2% (v/v), SDS 1% (v/v), NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8) y se transfirieron a un tubo de rosca con 200 µl de fenol a pH 8 y un volumen de perlas de vidrio. Se rompieron las células mediante agitación vigorosa utilizando *Millmix 20 bead beater* (*Tehtnica*) durante 3 pulsos de 1 minuto. Se añadieron 200 µL de TE 1x (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) y se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se adicionó 1 mL de etanol al 96% (v/v). Se precipitó el DNA congelando las muestras a -20°C durante al menos 30 minutos. Se centrifugaron las muestras de nuevo durante 5 minutos a 12000 rpm y tras eliminar el sobrenadante se resuspendió el pellet en 400 µl de TE 1X. Para eliminar el RNA de las muestras se añadieron 30 µL de RNasa A (1 mg/mL) y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos. Se añadieron 5.5 µL de acetato de amonio 4 M y 1 mL de etanol 96% y se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 5 minutos para precipitar el DNA que se resuspendió en 100 µL de TE 1X.

#### 2.1.2. Obtención de DNA plasmídico.

Para obtener el DNA plasmídico de *Escherichia Coli* se utilizó el kit de extracción de plásmidos *GenElute™HP Plasmid-Miniprep* (*Sigma*).

#### 2.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa.

Para la amplificación de fragmentos de DNA a partir de un DNA molde genómico o plasmídico se utilizaron diferentes DNA polimerasas en función de la necesidad de la actividad de corrección de errores: *Biotaq* (*Bioline*) sin actividad

exonucleasa 3'→5' y *Expand High Fidelity (Roche)*, *Phusion Polymerase (Finnzymes)* con actividad exonucleasa 3'→5'. La mezcla oligonucleótidos complementarias a la secuencia de DNA molde, dNTPs, soluciones tamponadoras y el DNA que actúa como molde se realizó según indicaba en el fabricante para cada uno de los enzimas.

La reacción de PCR consta de una fase de desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, seguida de una fase de elongación en la que el tiempo y el número de ciclos depende del tamaño del fragmento a amplificar y de la enzima DNA polimerasa utilizada: *Expand High Fidelity (Roche)*, 1 min/kb; *Biotaq (Bioline)*, 1 min/kb; *Phusion Polymerase (Finnzymes)*, 30 segundos/kb. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador *Mastercycler personal (Eppendorf)*.

-Listado de oligonucleótidos I.

Oligonucleótidos	Secuencia en sentido 5' -> 3'
<i>CTH2-S64,65A-F</i>	GAAACAAGCAGTGAAATAGCTGCGGCAGTT
<i>CTH2-S64,65A-R</i>	AACTGCCGCAGCTATTTCACTGCTTGTTTC
<i>CTH2-S64,65,68,70A-F</i>	ACAAGCAGTGAAATAGCTGCGGCAGTTGCATTGCTCCACCAA
<i>CTH2-S64,65,68,70A-R</i>	TTTGGTGGAGCGAATGCAACTGCCGCAGCTATTTCACTGCTTGT
<i>CTH2-1000F-BamHI+8</i>	aaattcgcGGATCCgcaccgctttctggtcaactgt
<i>CTH2+500R-XhoI+8</i>	aataattcCTCGAGgggtggggtggcaaatcagt
<i>CTH2-S68,70A-F</i>	TATCTTCGGCAGTTGCATTGCTCCACCAA
<i>CTH2-S68,70A-R</i>	TTGGTGGAGCGAATGCAACTGCCGAAGATA
<i>CTH2-5P-S68,70-F</i>	GCAGTTTCATTCTCTCCACCAAAAAAT
<i>CTH2-5P-S68,70A-F</i>	GCAGTTGCATTGCTCCACCAAAAAATACA
<i>CTH2-5P-S64,65-R</i>	CGAAGATATTTCACTGCTTGTTTCCTGTAT
<i>CTH2-5P-S64,65A-R</i>	CGCAGCTATTTCACTGCTTGTTTCCTGTATGTTATCCT
<i>PUB1-300F</i>	CGTATTTTCACTTCGTACTION
<i>PUB1-210F</i>	GGCCGTCTTTCCTTGTCTT
<i>5P-CTH2-C190R-F</i>	CAGTTTGCTCACGGACTCGGC
<i>5P-CTH2-C190R-R</i>	TCTCTTACTGCCATAAGGGCAACTTCTTTTAAAGT
<i>HRR25-pUG-F</i>	AAAGAAAAGATATATTTATAGAAAGGATACATTA AAAAGAGCAGCTGAAGCTTCGTACGC
<i>HRR25-pUG-R</i>	TATGTTTATTTTGTGCGTTTTGAGCAATATATGTTGCGCATAGGCCACTAGTGGATCTG
<i>TOD6-F1</i>	GAAAAGAATATATCACTGTTCTTATTGAAGTTCCTCGCGggatccccgggtaattaa
<i>TOD6-R1</i>	TTAAACGAATAGTCAAAACAACTAAATTCGTCTCTTAGCgaattcgagctcggttaaac

#### 2.1.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

Para separar el DNA se utilizaron geles de agarosa a diferentes concentraciones, entre 0,8 y 2%, según el tamaño de los fragmentos de DNA. Los geles se prepararon con tampón TAE 1X (Tris base pH 8, ácido acético glacial 4 M, EDTA 1 mM) que también se utilizó como tampón de electroforesis. Para visualizar los ácidos nucleicos bajo luz ultravioleta se añadió *Safe View* a los geles de agarosa. El DNA se resuspendió en tampón de carga (*Thermo Scientific*) y como patrón de tamaños para estimar el fragmento de los aislados de DNA se utilizó *1KB Plus DNA Ladder (Invitrogen)*.

#### 2.1.5. Construcción de plásmidos.

La construcción de plásmidos se realizó siguiendo dos estrategias diferentes:

1. Se amplificó la secuencia de DNA a clonar (inserto) mediante PCR utilizando oligonucleótidos que introducen sitios de restricción en los extremos del fragmento amplificado y que permiten su inserción en el vector correspondiente. A continuación, se realizó la digestión del inserto y el vector con los enzimas de restricción correspondientes y se realizó su ligación mediante el uso del *kit Rapid DNA ligation (Roche)* según las recomendaciones del fabricante.
2. Mutagénesis dirigida de sitio: se amplifica por PCR el plásmido de interés mediante el uso de dos oligonucleótidos fosforilados, que poseen la mutación deseada, y están previamente diseñados para que aparezca el plásmido de nuevo, según se muestra en el esquema. La circularización del plásmido se realizó con el kit de ligación anterior.

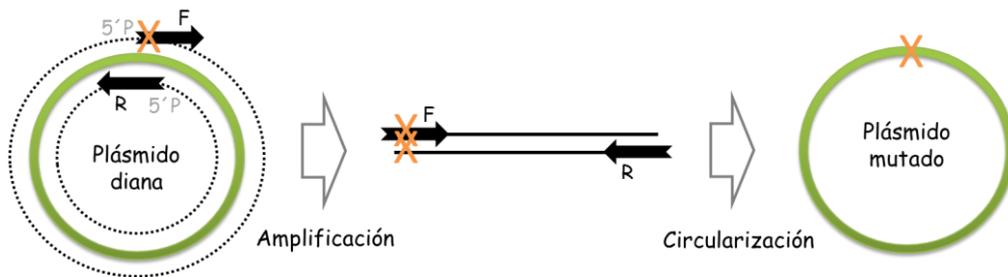


Figura M1-1. Esquema de mutagénesis dirigida de sitio a partir del plásmido de interés.

En ambos casos se realizó la transformación de *E. coli* y extrajo el DNA plasmídico como se ha descrito anteriormente. Posteriormente, se analizaron varios clones mediante PCR y/o digestión con enzimas de restricción según las condiciones del fabricante. Finalmente, los fragmentos de DNA clonado se secuenciaron para comprobar la secuencia obtenida.

-Listado de plásmidos.

Plásmido	Descripción	Procedencia
P135	<i>pUG6</i>	EUROSCARF
P136	<i>pUG27</i>	EUROSCARF
pSP490	<i>PromACO1-LacZ</i>	Este laboratorio
pSP925	pRS316- <i>Gal1-OLE1</i>	Lab. Stefan Jentsch
pSP994	<i>pMGA2</i>	Lab. Pam Silver
pSP997	<i>YEp-MGA2</i>	Lab. Pam Silver
pSP995	<i>pMGA2-ΔTM</i>	Lab. Pam Silver
pSP1039	<i>PromMGA2-lacZ</i>	Este trabajo
pSP414	pRS416- <i>Flag2-CTH2</i>	Este trabajo
pSP415	pRS416- <i>myc2-CTH2</i>	Este trabajo
pSP410	pRS416- <i>CTH2</i>	Este trabajo
pSP421	pRS426- <i>CTH2</i>	Este trabajo
pSP427	pRS416- <i>CTH2-C190R</i>	Este trabajo
pSP429	pRS416- <i>Flag2-CTH2-C190R</i>	Este trabajo
pSP851	pRS416- <i>Flag2-CTH2-S64A</i>	Este trabajo
pSP852	pRS416- <i>Flag2-CTH2-S65A</i>	Este trabajo

pSP853	pRS416- <i>Flag2-CTH2-S64,65A</i>	Este trabajo
pSP883	pRS416- <i>Flag2-CTH2-S68A</i>	Este trabajo
pSP884	pRS416- <i>Flag2-CTH2-S70A</i>	Este trabajo
pSP856	pRS416- <i>Flag2-CTH2-S68,70A</i>	Este trabajo
pSP892	pRS416- <i>Flag2-CTH2-S64,65,68,70A</i>	Este trabajo
pSP898	pRS416- <i>Flag2-CTH2-C190R-S64,65A</i>	Este trabajo
pSP899	pRS416- <i>Flag2-CTH2-C190R-S68,70A</i>	Este trabajo
pSP879	pRS415- <i>myc2-CTH2</i>	Este trabajo
pSP886	pRS413- <i>myc2-CTH2</i>	Este trabajo
pSP896	pRS413- <i>myc2-CTH2-S68,70A</i>	Este trabajo
pSP897	pRS413- <i>myc2-CTH2-S64,65A</i>	Este trabajo
pSP878	pYES2- <i>Grr1deltaFbox-Flag</i>	Lab. D. Toczycki
pSP1025	pGAL1- <i>HRR25</i>	Lab. Martha Cyert
pSP1026	pGAL1- <i>HRR25-K38A</i>	Lab. Martha Cyert

#### 2.1.6. Construcción de cepas.

La delección de genes se llevó a cabo mediante la amplificación de un *cassette* de disrupción mediante el uso de los oligonucleótidos que se muestran en la tabla de oligonucleótidos I, utilizando un plásmido que nos permite algún tipo de selección por auxotrofia o resistencia a antibiótico. Una vez obtenido el *cassette* de disrupción para un gen concreto, se realizó la transformación de levaduras para que tenga lugar la inserción del *cassette* en el genoma. Las colonias obtenidas tras la transformación fueron analizadas por PCR para comprobar la delección del gen de interés.

#### 2.1.7. Inmunoprecipitación de cromatina.

Para llevar a cabo la inmunoprecipitación de cromatina se recogieron 25 DO de células por muestra en un volumen de 50 mL de medio. Para realizar el *cross-linking*, se añadieron 1.35 mL de formaldehído 37% a cada muestra y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 minutos mezclándose por inversión de forma periódica. Se añadieron 2.5 mL de glicina 2.5 M incubándose

durante 5 minutos y se centrifugaron las células a 4000 rpm 2 minutos a 4 °C. Se realizaron 4 lavados de las células con TBS 1X y se congelaron las células con nitrógeno líquido. Para realizar la lisis celular las células se resuspendieron en 300 µL de tampón de lisis (50 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1 % desoxicolato sódico, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidina e inhibidores de proteasas Complete) y se transfirieron a un tubo de rosca cónico con el mismo volumen de perlas de vidrio. Se rompieron las células utilizando el *FasTPrep* con 2 ciclos de agitación durante 20 segundos. Se adicionaron 150 µL de tampón de lisis y el extracto soluble se transfirió a un nuevo tubo. Se sonicaron las células en un sonicador con baño a 4°C durante dos ciclos de 15 minutos y se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se guardaron 10 µL del sobrenadante, que se tomaron como *INPUT* del experimento, y el resto se transfirió a un nuevo tubo que contenía las perlas magnéticas previamente incubadas con el anticuerpo que reconocía la proteína a inmunoprecipitar, en nuestro caso se utilizó el anticuerpo monoclonal 8GW16 (*Covance*), que reconoce la subunidad grande de la RNA polimerasa II. Se incubaron con rotación durante 2 horas a 4° C. Se centrifugaron las muestras y se eliminó el sobrenadante utilizando la gradilla magnética. A partir de aquí se realizaron los siguientes lavados usando la gradilla magnética: 2 lavados con 1 mL de tampón de lisis, 2 lavados con 1 mL de tampón de lisis y 360 mM de NaCl, 2 lavados con 1 mL de tampón de lavado y un lavado con 1 mL de TE 1x. Posteriormente, se añadieron 90 µL de tampón de elución (50 mM Tris pH 8; 10 mM EDTA pH 8, SDS 1%) y se incubaron las muestras a 65 °C a 600 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se separó de las perlas con ayuda de la gradilla magnética y se transfirió a un nuevo tubo (inmunoprecipitado, IP). Tanto el *INPUT* como el IP se llevaron a un volumen final de 150 µL con tampón de elución y se incubaron a 65 °C a 600 rpm toda la noche. Para eluir el DNA de las muestras se añadieron 139.5 µL de TE 1X, 3 µL de glucógeno (20 mg/mL) y 7.5 µL de Proteínasa K (20 mg/mL) y se incubaron a 37 °C a 600 rpm durante 90 minutos. Después se purificó el DNA usando las columnas *GeneJET PCR Purification Kit #K0702* (*Fermentas*) según las instrucciones del fabricante. El análisis del DNA unido a la proteína en cada muestra se hizo relativo a la cantidad de DNA total en esa misma muestra. La determinación

del DNA se llevó a cabo por PCR cuantitativa (RT-qPCR) como se describe posteriormente.

## 2.2. Técnicas moleculares para el estudio del RNA.

### 2.2.1. Obtención de RNA.

Para extraer el RNA total se recogieron las células por centrifugación, se lavaron con agua fría estéril y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las células se resuspendieron en 500uL de tampón LETS (LiCl 0.1 M, EDTA pH 8.0 10 mM, SDS 0.2 %, Tris-HCl pH 7.4 10 mM) y se pasaron a tubos que contenían perlas de vidrio y 500ul de fenol: cloroformo (5:1). Se rompieron las células mediante ciclos de agitación de 30 segundos en frío utilizando *Millmix 20 bead beater (Tehtnica)*. El sobrenadante se transfirió a otro tubo que contenía 1 volumen de fenol: cloroformo (5:1) y posteriormente a otro con cloroformo-alcohol isoamílico (25:1). Por último, se precipito el RNA añadiendo 2.5 volúmenes de etanol 96% frío y 0.1 volumen de LiCl 5M. Se realizó una segunda precipitación añadiendo 2.5 volúmenes de etanol 96 % y 0.1 volumen de AcNa 3M. Posteriormente se resuspendió el RNA en agua milliQ libre de RNasas y se determinó su concentración e integridad utilizando el NanoDrop y electroforesis en geles de agarosa.

### 2.2.2. Tratamiento con DNasa.

Para eliminar el DNA de las muestras se trataron 2.5  $\mu\text{g}$  de RNA con el kit *DNase I RNase-free (Roche)* durante 15 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.3. Retrotranscripción de cDNA.

La retrotranscripción del RNA se llevó a cabo utilizando la *Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Scientific)*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Dependiendo de los requerimientos de cada experimento, la retrotranscripción se realizó mediante "Oligo dT" o "*Random primer*".

## 2.2.4. RT-qPCR

Se realizó la RT-qPCR en tiempo real utilizando un aparato *LightCycler® 2.0 de Roche* y usando como sonda fluorescente *SYBR Green Premix Ex Taq kit (TaKaRa)*. Para cada reacción se utilizaron 2.5 µl de cDNA usando oligonucleótidos correspondientes a una concentración de 0.2 µM en un volumen final de 10 µL. En cada placa se realizó una curva estándar de cada gen a partir de diluciones seriadas de las muestras de cDNA para intrapolar los valores cada muestra. Las condiciones de PCR fueron: 95°C durante 10 segundos, seguidos de 40 ciclos de 10 segundos a 95°C y 15 segundos a 55°C. Después de cada amplificación se examinaron las curvas de *melting* para verificar la especificidad de la reacción. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la siguiente tabla:

## -Listado de oligonucleótidos II.

<b>Oligonucleótidos</b>	<b>Secuencia en sentido 5'→3</b>
<i>Oligo dT</i>	TTTTTTTTTTTTTTTTVN (donde N es cualquier base nitrogenada y V es A, C o G)
<i>ACT1-qPCR-F</i>	TCGTTCCAATTTACGCTGGTT
<i>ACT1-qPCR-R</i>	CGGCCAAATCGATTCTCAA
<i>SCR1-qPCR-F</i>	TATCCAGCGTCAGCAAAGGT
<i>SCR1-qPCR-R</i>	CCAAATTAACCGCCGAAG
<i>CTH1-qPCR-F</i>	CGGTAAGCGTTGCTGTTT
<i>CTH1-qPCR-R</i>	AGGGAAGTAGGAAGTGGAGTCA
<i>CTH2-qPCR-F</i>	GCAGTTTCATTCTCTCCAC
<i>CTH2-qPCR-R</i>	TAGGTGCCGTGCTATTCAGG
<i>SDH4-qPCR-F</i>	GCACTCCAATGATGCCTAC
<i>SDH4-qPCR-R</i>	AATGGAACGACGGACAAGG
<i>PGK1-qPCR-F</i>	AAGCGTGTCTTCATCAGAGTTG
<i>PGK1-qPCR-R</i>	CGTATCTTGGGTGGTGTTC
<i>RLI1-qPCR-F</i>	GAGCCCCTGAATCTTTGTTG
<i>RLI1-qPCR-R</i>	CTTGGTCTGAAGGAGTTTGGA
<i>HEM15-qPCR-F</i>	CCAAAGTTGATGGCCTAATG
<i>HEM15-qPCR-R</i>	TATCCGATTCCCAATGAC
<i>OLE1-qPCR-F</i>	TCGACAAGAAGGGAAACGAA
<i>OLE1-qPCR-R</i>	CATGGTTGTTCCGGAGATGTG
<i>ACO1-qPCR-F</i>	GCCATCAAGAGACCCATTGT

*Materiales y métodos*

<i>ACO1-qPCR-R</i>	ATCCAGCGTTTCCACATTCT
<i>RNR2-qPCR-F</i>	GGAGACATTGAGAGAGGAAAACAG
<i>RNR2-qPCR-R</i>	TGTGACGGTGAACCTTGATGAG
<i>RPL17A-qPCR-F</i>	TCTTCTCCATCCACATTGA
<i>RPL17A-qPCR-R</i>	GCGGCGATTCTACCTCTTT
<i>RPL8B-qPCR-F</i>	GGGTGTTCCATACGCCATT
<i>RPL8B-qPCR-R</i>	TTCGTCTTCGGCTCTGACTT
<i>RPS16B-qPCR-F</i>	GACGAACAATCCAAGAACGA
<i>RPS16B-qPCR-R</i>	AGAACGAGCACCCCTTACCAC
<i>RPL27A-qPCR-F</i>	AGTTGCTGTCGTTGTCCGTG
<i>RPL27A-qPCR-R</i>	ATGGGTGAGACTTGGAACCT
<i>18S-qPCR-F</i>	CATGGCCGTTCTTAGTTGGT
<i>18S-qPCR-R</i>	ATTGCCTCAAACCTCCATCG
<i>tL(UAA)-qPCR-F</i>	CTGTGGGAATACTCAGGTATCGT
<i>tL(UAA)-qPCR-R</i>	TTTCTCGTCTTAGTCGGCTTC
<i>tV(UAC)-qPCR-F</i>	TCCTAAGCTGTCATCCGTAA
<i>tV(UAC)-qPCR-R</i>	ATCGAACTCGGGACCTTTG
<i>MGA2-qPCR-F</i>	ATCTGTTCCCGTTGTCTTGG
<i>MGA2-qPCR-R</i>	CCTCTTCCTCATAATCCTCTTCCT
<i>LTV1-qPCR-F</i>	CGTTTTGGTTCCTGTCTCCA
<i>LTV1-qPCR-R</i>	CCCTCTACCCTTTGGTTTT
<i>SRO9-qPCR-F</i>	GAATCGGCAGTAGGTGAGGA
<i>SRO9-qPCR-R</i>	AGGTGGTTGTTGCTGTTGTG
<i>GUA1-qPCR-F</i>	ACTTCGCCGTTGATTTGTGT
<i>GUA1-qPCR-R</i>	GGACCGACCAGTTTTCTGATT
<i>NOP14-qPCR-F</i>	GAAGAAGGCGAAGAAAGAGGA
<i>NOP14-qPCR-R</i>	CAGAATCAGCAATACCGTCA
<i>BRX1-qPCR-F</i>	TGAAGATGGCGAAGAAGACA
<i>BRX1-qPCR-R</i>	GGACCACCAAATGAACC
<i>25S-qPCR-F</i>	ATTGTCAGGTGGGGAGTTTG
<i>25S-qPCR-R</i>	GGGGCTTTTACCCTTTTGT
<i>GCN4-qPCR-F</i>	GACAACCTCATTCTTACCCACTCC
<i>GCN4-qPCR-R</i>	GATTCGTCATCCTTTCCAACA
<i>tS(AGA)J-qPCR-F</i>	CGAGTGGTTAAGGCGAAAGA
<i>tS(AGA)J-qPCR-R</i>	GGCAAAGCCCAAAGATTTTC
<i>tK(CUU)C-qPCR-F</i>	AATCGGTAGCGGTATGACT
<i>tK(CUU)C-qPCR-R</i>	GCTCGAACCCCTAACCTTAT
<i>OLE1-chIP-prom-287F</i>	CTCAGACACACCTATCCCTATTGT
<i>OLE1-chIP-prom-186R</i>	AGCCAGGAGCCGATGATTT
<i>CIT1-qPCR-F</i>	GGTCGTCCAATCAAGAAGT
<i>CIT1-qPCR-R</i>	TGCGTTCAAAGTATCCCACA
<i>CIT2-qPCR-F</i>	GATTCGTGGACTTGATGAGAC
<i>CIT2-qPCR-R</i>	GGGACAGATAAGGTGATGATAGTG

<i>IDH1-qPCR-F</i>	GAGAAAACACGGAGGGTGAG
<i>IDH1-qPCR-R</i>	GGCGAAGTCAAAGGCAAATC
<i>IDH2-qPCR-F</i>	CGAGGAGGTTTTTGGCTACT
<i>IDH2-qPCR-R</i>	TCAGGTCCGATACCATCACC
<i>DLD3-qPCR-F</i>	AGGACTTGCCTTTCCTCTG
<i>DLD3-qPCR-R</i>	GCTTCTCATCGTCGTGTCTCT
<i>ACO1-qPCR-F</i>	GCCATCAAGAGACCCATTGT
<i>ACO1-qPCR-R</i>	ATCCAGCGTTTCCACATTCT
<i>DLD3-ChIP-prom-183F</i>	GGATGACACCACTTGCCACA
<i>DLD3-ChIP-prom-57R</i>	GCATTTTGGCACCTGTCTCT
<i>IDH1-ChIP-prom-150F</i>	CCGCTTCATTGGCTTATTCTTG
<i>IDH1-ChIP-prom-25R</i>	AGGGAGAAGAATGAGGATAGGG
<i>CIT2-ChIP-prom-159F</i>	GGCCATTATTCTCGACGTT
<i>CIT2-ChIP-prom-85R</i>	TGAGGAACGAACACCATATC
<i>ACO1-ChIP-prom-186F</i>	GAAAGGCAAGCACAAAAAGG
<i>ACO1-ChIP-prom-64R</i>	GAGTGAACAGAACAAGGGACAA
<i>FUS1-ChIP-prom-F</i>	CATGTGGACCCTTTCAAAAC
<i>MGA2-qPCR-F</i>	ATCTGTTCCCGTTGTCTTGG
<i>MGA2-qPCR-R</i>	CCTCTTCCTCATAATCCTCTTCCT

### 2.2.7. Genomic Run On (GRO).

Para estudiar la tasa de transcripción naciente de los genes (nTR) y la cantidad de mRNA (RA) a escala genómica se utilizó la técnica *Genomic Run-On* (García-Martínez et al., 2004). A partir de un cultivo crecido en SC desde la noche anterior, se añadió el agente quelante BPS una vez alcanzada una  $DO_{600}$  de 0.2, a partir de aquí se recogieron dos alícuotas con el mismo número de células a diferentes tiempos: 0, 10, 30, 90, 180 y 360 minutos y se congelaron. Con una de las alícuotas se realizó el “*Run-On*”, para ello se resuspenden las células en 1 mL de Sarcosil 0.5%, se centrifugaron y se transfirieron a un tubo de rosca cónico. Posteriormente se resuspendieron las células en 115  $\mu$ L de agua destilada y se incubaron con la mezcla de transcripción que contiene 120  $\mu$ L de tampón de transcripción 2.5X (50 mM Tris-HCl pH 7.7, 500 mM KCl, 80 mM  $MgCl_2$ ) 16  $\mu$ L de rNTPs (AGC mix, 10 mM de cada uno de ellos), 6  $\mu$ L de DTT 0.1 M y 20  $\mu$ L de [ $\alpha$ - $^{33}P$ ]rUTP durante 5 minutos a 30°C y se detuvo la transcripción con 1 mL de agua fría. Tras realizar la extracción del RNA marcado se hibridó con los macroarrays de

## *Materiales y métodos*

DNA de levadura en presencia de una solución de hibridación ( $\text{H}_2\text{PO}_4$  0.5 M, EDTA 1 mM, 7% SDS, pH 7.2) durante 48 h. Tras la hibridación se realizó un lavado de 10 minutos en 1X SSC, 0.1% SDS y dos lavados de 10 minutos con 0.5x SSC y 0.1% SDS a 65°C y los macroarrays se sellaron y expusieron en pantallas hasta obtener una señal utilizando el *Phosphoroimager FLA-3000, FujiFilm* que se cuantificó usando el programa *ArrayVision (Imaging Research)*. Con la otra alícuota de células se realizó una extracción de RNA y se purificó usando el kit *RNeasy Qiagen*. Para obtener el cDNA marcado se utilizó para cada muestra: 1  $\mu\text{L}$  de oligo d(T)<sub>15</sub>VN (500 ng/  $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de inhibidor de RNasas (RNase OUT, Invitrogen), 3  $\mu\text{L}$  de DTT 0.1 M, 1.5  $\mu\text{L}$  de mezcla de dNTPs (16 mM de dATP, dGTP, dTTP y 0.1 mM de dCTP) y 1  $\mu\text{L}$  de enzima retrotranscriptasa SuperScript II (200 u/ $\mu\text{L}$ , Invitrogen), en presencia de 4  $\mu\text{L}$  del nucleótido radioactivo [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]dCTP (3000 Ci/mmol, Hartman) incubándose a 42 °C durante 1 hora y se detuvo la reacción añadiendo EDTA 0,5 M, pH 8. El cDNA marcado se purificó utilizando las columnas *Illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns* y se hibridó con los mismos macroarrays, tratados previamente con solución de *stripping* (SDS 0,1%,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  5 mM pH 7), se expusieron y se cuantificó la señal. Los valores de TR y RA fueron corregidos en función del porcentaje de residuos de uracilo y citosina, respectivamente, que posee cada sonda del array. Además, los valores de RA se corrigieron en función de la cantidad de mRNA determinada mediante *Dot Blot*, como se describe a continuación.

Los experimentos se realizaron por triplicado y se tomó como resultado el valor obtenido de la media normalizada estadísticamente por *Median Absolute Deviation (MAD)* utilizando *el software ArrayStat*.

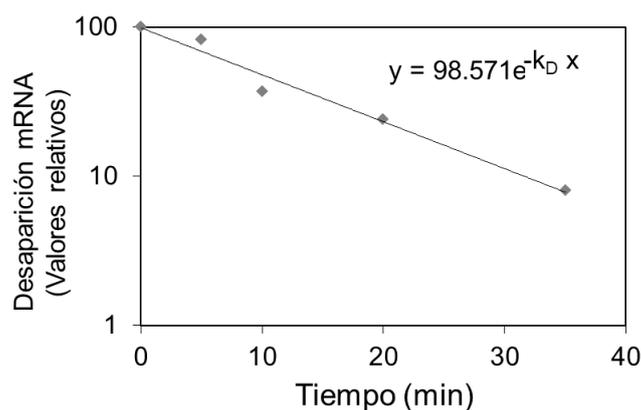
### 2.2.8. Determinación de cantidad de RNA mensajero mediante *Dot Blot*.

Para determinar la cantidad de mRNA se cargaron en una placa de 384 pocillos diluciones de aproximadamente 250, 125 y 75 ng/ $\mu\text{L}$  de cada muestra de RNA total que se cuantificaron posteriormente por *NanoDrop*. Las muestras de RNA total sobre transfirieron a una membrana de nylon *HybondXL (GE Healthcare)*, utilizando un robot de impresión *BioGrid (BioRobotics)* y se entrecruzó con la

membrana de nylon mediante el programa C-L de un *GS GeneLinker* (BioRad). Para marcar el mRNA en la muestra se utilizó una sonda oligo(dT)<sub>40</sub> marcado por la acción de la enzima polinucleótido quinasa (Roche, 10 U/ μL) en presencia del nucleótido radioactivo [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. La membrana se hibridó con la sonda radioactiva a 42°C durante 24 horas en presencia de la solución de hibridación (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 M, EDTA 1 mM, 7% SDS, pH 7.2) Tras realizar dos lavados, se expuso y se obtuvo la imagen utilizando el *Phosphoimager FLA-3000, FujiFilm*, que se cuantificó con el programa *ArrayVision* (Imaging Research). La señal cuantificada corresponde a la cantidad de mRNA de cada muestra relativa a la cantidad de RNA total que hay en cada pocillo (mRNA/RNA total).

#### 2.2.9. Determinación de la estabilidad de mRNA.

Los experimentos para calcular la vida media de los mRNA se realizaron mediante la parada de transcripción de la RNA polimerasa II mediante la adición de tiolutina (3 μg/mL) al medio. A partir de ese momento, se recogieron células a diferentes tiempos, se extrajo el RNA y se determinó la desaparición de los diferentes mRNAs por RT-qPCR. Los cálculos de vida media se realizaron según se detalla a continuación:



$$\text{Vida media} = \text{Ln}2/k_D$$

#### 2.2.10. Perfiles de polirribosomas.

Para realizar el análisis de polirribosomas se recogieron unos 100 mL de cultivo a una  $DO_{600}$  entre 0.4-1.0 (depende del experimento a realizar) en 2 tubos cónicos de 50mL, se añadieron 500 $\mu$ L de cicloheximida (10 g/mL) a cada uno y se incubaron en hielo durante 5 minutos. Se recogieron las células por centrifugación y se resuspendieron en un mismo tubo en 2 mL de tampón de lisis (20 mM Tris-HCl pH 8, 140 mM KCl, 5 mM  $MgCl_2$ , 0.5 mM DTT, 0.1 mg/mL cicloheximida, 0.5 mg/mL heparina, 1% Triton X-100), se lavaron con el mismo tampón y se resuspendieron en un volumen final de 700 $\mu$ L de tampón de lisis transfiriéndolas a un tubo con perlas de vidrio. Las células se rompieron utilizando vórtex durante 30 segundos 8 veces, se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Tras repetir este paso se midió la cantidad de RNA por *NanoDrop* teniendo en cuenta que la ratio  $A_{260}/A_{280}$  debe ser  $>2$ . Se midió el volumen final y se añadió glicerol hasta una concentración final de 5%, se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C.

La preparación de los gradientes de sacarosa se realizó con 50 mL de sacarosa 10% (Solución A) y 55 ml de sacarosa 50% (Solución B). La composición de la solución es: 20 mM Tris-HCl pH 8, 140 mM KCl, 5 mM  $MgCl_2$ , 0.5 mM DTT, 0.1 mg/mL CHX, variando el porcentaje de sacarosa para cada una de las soluciones. Utilizando el fraccionador de polisomas se obtuvieron los gradientes de sacarosa a partir de ambas soluciones. A continuación, se cargaron las muestras (el volumen a cargar de cada muestra bien determinado por la relación  $mL=10/A_{260}$ ) en los tubos con los gradientes de sacarosa y se equilibraron para el uso de la ultracentrífuga (*Beckman SW41*). La ultracentrifugación se realizó a 35000rpm durante 2 h 40 min a 4°C. Los gradientes se fraccionaron con una solución de sacarosa 60% como solución de bombeo y se escaneó el perfil mediante detección ultravioleta a  $A_{260nm}$  (*Density Gradient Fractionation System; Teledyne Isco, Lincoln, NE*)

### 2.2.11. Extracción de RNA a partir de fraccionamiento de polirribosomas.

El análisis de RNA de las fracciones de polisomas se llevó a cabo utilizando el kit *SpeedTools Total RNA Extraction kit (Biotools B&M Labs)* que incluye un tratamiento con rDNasa antes de eluir el RNA. Para extraer el RNA, de cada fracción se cogió un volumen de 200  $\mu$ L a los que se añadieron 8  $\mu$ L de mRNA *LYS* y *SPO* (6 ng/ $\mu$ L) de *Bacillus subtilis* que se utilizaron como controles de la extracción de RNA. Los mRNA de cada fracción se analizaron por qPCR mediante el uso de oligonucleótidos específicos.

## 2.3. Técnicas moleculares para el estudio de proteínas.

### 2.3.1. Obtención de extractos proteicos.

Para llevar a cabo la extracción de proteínas se recogieron las células por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos, se lavaron con agua estéril, y se resuspendieron en 200  $\mu$ L de NaOH 0.2 M incubándolas 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 1 minuto, el sedimento se resuspendió en 100  $\mu$ L de Tampón de Carga 5X-SDS (Tris-HCl pH 6.8, 60 mM Glicerol 25%, SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 14.4 mM, Azul de bromofenol 0.1%) calentándose durante 5 minutos a 95  $^{\circ}$ C. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm 10 minutos a 4  $^{\circ}$ C y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo que se congeló a -20  $^{\circ}$ C hasta ser utilizado.

Para cargar cantidades equivalentes de proteína, la concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford utilizando el reactivo *Dye Reagent (BioRad)* midiendo la absorbancia de cada muestra a  $A_{595}$ .

En el caso del estudio de la fosforilación de la proteína Sch9 se realizó la extracción de proteínas en 300  $\mu$ L de tampón de urea (6 M Urea, 50 mM Tris-HCl 7.5, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 5 mM NaF, 5 mM  $\text{NaN}_3$ , 5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM p-nitrofenilfosfato, 5 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 0.2% SDS, inhibidores de proteasas) que se transfirieron a un tubo de rosca cónico con perlas de vidrio y se sometieron a 4 pulsos de agitación de 45 segundos para romper las células y se centrifugaron a

3000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. A continuación, el lisado celular se calentó a 65 °C durante 10 minutos, se separaron las proteínas solubles por centrifugación y se determinó la concentración de proteínas usando el *NanoDrop*. A continuación, se trataron 60 µg de proteína aproximadamente con 1 mM NTCB (ácido 2-nitro-5-tiocianatobenzoico, Sigma), que corta las proteínas en sus residuos de cisteína, en presencia de tampón 100 mM CHES pH 10.5 (Sigma). En el caso de Sch9 se obtiene un péptido de entre 40-60 KDa. Se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente en oscuridad y después se disolvieron en el Tampón de Carga 5X-SDS y se calentaron a 95 °C durante 5 minutos.

### 2.3.2. Electroforesis e inmunodetección de proteínas (*Western Blot*).

Las electroforesis en condiciones desnaturizantes para separar proteínas se realizaron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) variando la concentración de poliacrilamida en función del peso molecular de la proteína de estudio. Se utilizó el sistema *MiniProtean 3 (BioRad)* con el tampón de electroforesis para proteínas con SDS 1X (25 mM Tris Base, 192mM Glicina, 0.1% SDS, pH: 8.1-8.5) a un voltaje constante de 100V. Una vez separadas las proteínas, se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa (*Protran BA 85 Nitrocellulose, Whatman*) utilizando el sistema de electrotransferencia *Transblot SD semi-dry transfer cell (BioRad)* con el tampón de Transferencia 1X (25 mM Tris Base, 192 mM Glicina, 20% metanol, 0.1% SDS, pH: 8.1-8.5). La transferencia se realizó a voltaje constante de 100V durante 45 minutos con refrigeración. Finalizada la transferencia se incubaron las membranas con tinción rojo de *Ponceau (Ponceau S Staining Solution, Sigma)* durante 5 minutos, una vez comprobado que las proteínas se habían transferido a la membrana se eliminó la tinción con TBS-T 1X (25 mM Tris Base, 15 mM NaCl, 0.05% Tween 20). Para bloquear sitios de unión no específicos se incubaron las membranas con leche desnatada en polvo (*OXOID*) al 2% disuelta en TBS-T 1X durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió el anticuerpo primario que se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C en función del anticuerpo. Tras 5 lavados con TBS-T 1X, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario, diluido en la solución de bloqueo, durante 1 hora a

temperatura ambiente, y se volvieron a repetir los lavados en TBS-T 1X. Los anticuerpos y condiciones utilizadas se detallan a continuación en la tabla.

La detección de proteínas se realizó con el sistema de quimioluminiscencia *ECL Advance Western blotting Detection Kit (GE Healthcare)* siguiendo las recomendaciones del fabricante. La señal se detectó mediante Sistema *Image Quant LAS 4000mini biomolecular Imager (GE Healthcare)* y las imágenes generadas se cuantificaron utilizando el programa *ImageQuant TL 1D gel analysis*.

-Listado de anticuerpos.

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
$\alpha$ - Flag M2 Peroxidasa conjugada ( <i>Sigma</i> ) 1:10000	
$\alpha$ - HA Peroxidasa conjugada ( <i>Roche-Sigma</i> ) 1:10000	
$\alpha$ - Myc ( <i>Roche</i> ) 1:2000	$\alpha$ - ratón ( <i>Amersham</i> ) 1:50000
$\alpha$ - Pgk1 ( <i>Invitrogen</i> ) 1:10000	$\alpha$ - ratón ( <i>Amersham</i> ) 1:50000
$\alpha$ -Maf1 ( <i>Olivier Lefebvre</i> ) 1:10000	$\alpha$ - conejo ( <i>Santa Cruz, Invitrogen</i> ) 1:10000
$\alpha$ -eIF2 $\alpha$ ( <i>John M Zaborske</i> ) 1:2000	$\alpha$ - conejo ( <i>Santa Cruz, Invitrogen</i> ) 1:10000
$\alpha$ -eIF2 $\alpha$ fosforilado (Ser51/Ser52) ( <i>Santa Cruz, Invitrogen</i> ) 1:2000	$\alpha$ - conejo ( <i>Santa Cruz, Invitrogen</i> ) 1:10000
$\alpha$ -Rps6 ( <i>Cell Signaling Technology</i> ) 1:2000	$\alpha$ - ratón ( <i>Amersham</i> ) 1:500000
$\alpha$ -Rps6 fosforilada (Ser235/236) ( <i>Cell Signaling Technology</i> ) 1:2000	$\alpha$ - ratón ( <i>Amersham</i> ) 1:500000

$\alpha$ -Rpb1 ( <i>Biolegend</i> ) 1:100000	$\alpha$ - ratón ( <i>Amersham</i> ) 1:500000
$\alpha$ -Rpb1 fosforilada (Ser2) ( <i>Abcam</i> ) 1:100000	$\alpha$ - conejo ( <i>Santa Cruz, Invitrogen</i> ) 1:10000

#### 2.3.4. Determinación de la estabilidad de proteínas.

Los experimentos para calcular la vida media de proteína se realizaron mediante la parada de traducción tras la adición de cicloheximida (50  $\mu$ g/mL) al medio. A partir de ese momento, se recogieron células a diferentes tiempos y se determinó la desaparición de las proteínas mediante *Western Blot*. Los cálculos de vida media se realizaron según se ha detallado para el cálculo de vida media de los mRNA (apartado 2.2.9).

#### 2.3.5. Co-Inmunoprecipitación de proteínas.

Para detectar la interacción entre dos proteínas se recogieron unos 50 mL de cultivo a una  $DO_{600}$  1 y se lavaron las células con agua fría. Las proteínas se extrajeron en condiciones no desnaturalizantes, para ello las células se resuspendieron en 700  $\mu$ L de tampón de lisis HEPES (25 mM HEPES [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 17 mg/mL PMSF, 5 mM NaF, 80 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 1 mM  $Na_3VO_4$ , y *Complete Proteasome Inhibitor Tablet* [*Roche Diagnostics*]) y se sometieron a 6 pulsos de agitación durante 1 minuto, alternándose con 1 minuto de reposo en hielo. Tras centrifugar las células a 12000 rpm 15 minutos a 4°C, el extracto clarificado se transfirió a un nuevo tubo y se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford. Se separó una alícuota del extracto total (*INPUT*) y se incubaron la misma cantidad de proteínas de cada muestra con 30  $\mu$ L de perlas magnéticas *anti-Flag M2 Magnetic Beads* (*Sigma-Aldrich*) en un rotor a 4°C durante toda la noche. Se recogieron las perlas con la ayuda de una gradilla magnética y se lavaron 3 veces con el tampón de lisis. A continuación, se eluyeron

las proteínas (*PULLDOWN*) en tampón PBS 1X con 500 ng/mL *3xFlag peptide* (*Sigma-Aldrich*) mediante agitación con vórtex durante 30 minutos. Tanto el extracto total como el eluido se hirvieron a 100°C durante 5 minutos y se analizaron por *Western Blot*.

### 2.3.6. Tratamiento con fosfatasa $\lambda$ .

El tratamiento con fosfatasa se realizó sobre un extracto proteico obtenido en condiciones no desnaturizantes como se ha descrito previamente. Se separaron dos alícuotas del extracto total, una de ellas fue tratada con fosfatasa  $\lambda$  (*New England Biolabs*), según las recomendaciones del fabricante, y la otra alícuota se trató con la fosfatasa junto a los inhibidores de fosfatasa 66 mM NaF and 66 mM EDTA. Ambas alícuotas fueron incubadas a 30 °C durante 30 minutos y se analizaron por *Western Blot* junto al extracto total para observar cambios en la movilidad electroforética de la proteína.

### 2.3.7. Ensayos de actividad $\beta$ -galactosidasa.

Las células de levadura utilizadas para el ensayo se transformaron con el plásmido que contenía el promotor del gen de interés fusionado al gen *lacZ*, que codifica la enzima  $\beta$ -galactosidasa, la cual hidroliza un compuesto análogo a la lactosa (OrthoNitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido, ONPG) dando lugar a un producto coloreado amarillo, orto-nitrofenol, que se puede medir por espectrofotometría a 420 nm. Para llevar a cabo el análisis de la actividad se recogió un volumen de células correspondiente a una  $DO_{600}$  de 1.0 y se resuspendió en 1 mL de Tampón Z ( $Na_2HPO_4$  60 mM,  $NaH_2PO_4$  40 mM, KCl 10 mM,  $MgSO_4$  1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 50 mM). Se transfirieron 700  $\mu$ L de este volumen de células en tampón Z a un nuevo tubo donde se añadieron 50  $\mu$ L de cloroformo y 50  $\mu$ L de SDS 0.1% y se agitaron con vórtex durante 10 segundos. Al inicio del ensayo se añadieron 200  $\mu$ L de ONPG (4 mg/mL) a cada tubo y se incubaron en agitación a 30 °C hasta que la solución adquirió color amarillento, momento en que se añadían 350  $\mu$ L de  $Na_2CO_3$  2 M para detener la reacción y se pasaban a hielo has terminar el ensayo. A continuación, las

muestras se centrifugaron durante 1 min y se midió la  $A_{420}$ . Con las células diluidas en tampón Z que no han sido utilizadas para el ensayo de actividad enzimática se midió la  $DO_{600}$  para conocer la cantidad de células de la que partimos para cada muestra y que es necesaria para el cálculo de la actividad con la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades Miller} = A_{420} * 1000 / A_{600} * \text{Vol. Células (mL)} * \text{tiempo de ensayo (min)}$$

La actividad  $\beta$ -galactosidasa se expresó en Unidades Miller, tipo de unidad arbitraria en que una unidad de  $\beta$ -galactosidasa es la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1 nmol de ONPG por minuto a 30 °C a pH 7.

### 2.3.8. Localización de proteínas mediante microscopía de fluorescencia.

La detección de las proteínas etiquetadas con la proteína fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*) se realizó con el Microscopio Nikon Eclipse 90i. Para la tinción y la observación del núcleo, las células se incubaron con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), que se une a regiones ricas en Adenina y Timina del DNA, a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 10 minutos en agitación a 30 °C, protegiendo las muestras de la luz y a continuación se observaron al microscopio.

## 3. Determinación de parámetros bioquímicos.

Cromatografía de gases: la determinación de ácidos grasos se realizó según se indica en Borrull et al., 2015 en colaboración con Nicolas Ròzes de la Universitat Rovira i Virgili, Tarragona.

Cromatografía líquida de alta eficacia o *high performance liquid chromatography (HPLC)*: la determinación de los niveles de glucosa y etanol en el medio se realizó utilizando el equipo *Surveyor Plus Chromatograph (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)*. Previamente, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm y se filtraron utilizando filtros de 0.22 mm de poro.

#### **4. Análisis bioinformáticos.**

La búsqueda de categorías funcionales enriquecidas se realizó mediante el uso de la herramienta *Gene Ontology enRichment anaLysis and visualizAtion tool* (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>).

La búsqueda de factores transcripcionales se utilizó la herramienta *Yeasttract* (<http://www.yeasttract.com/index.php>).



# *Capítulo 1*

## *Resultados*



## Capítulo 1. Identificación de mecanismos transcripcionales y postranscripcionales implicados en la respuesta a deficiencia de hierro.

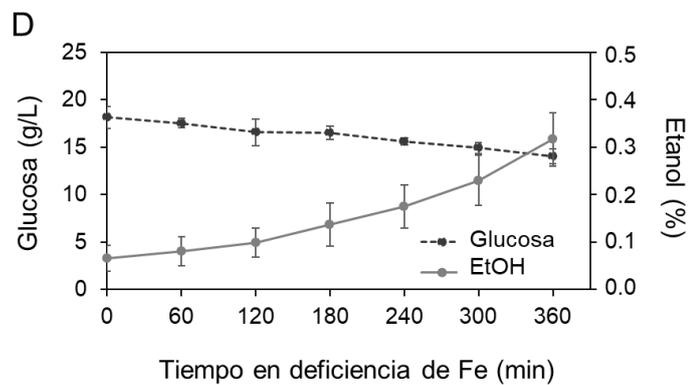
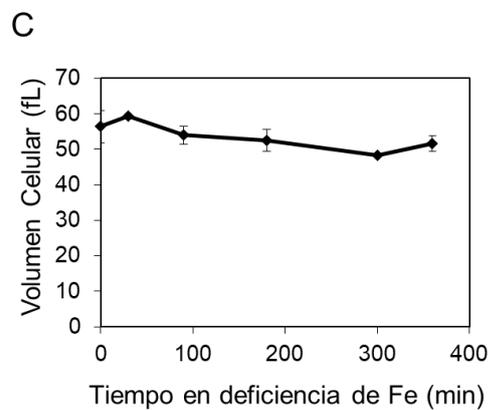
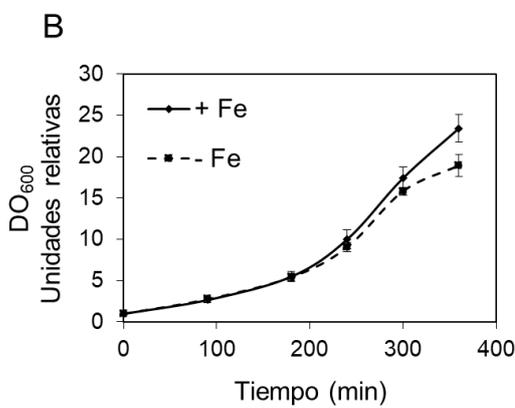
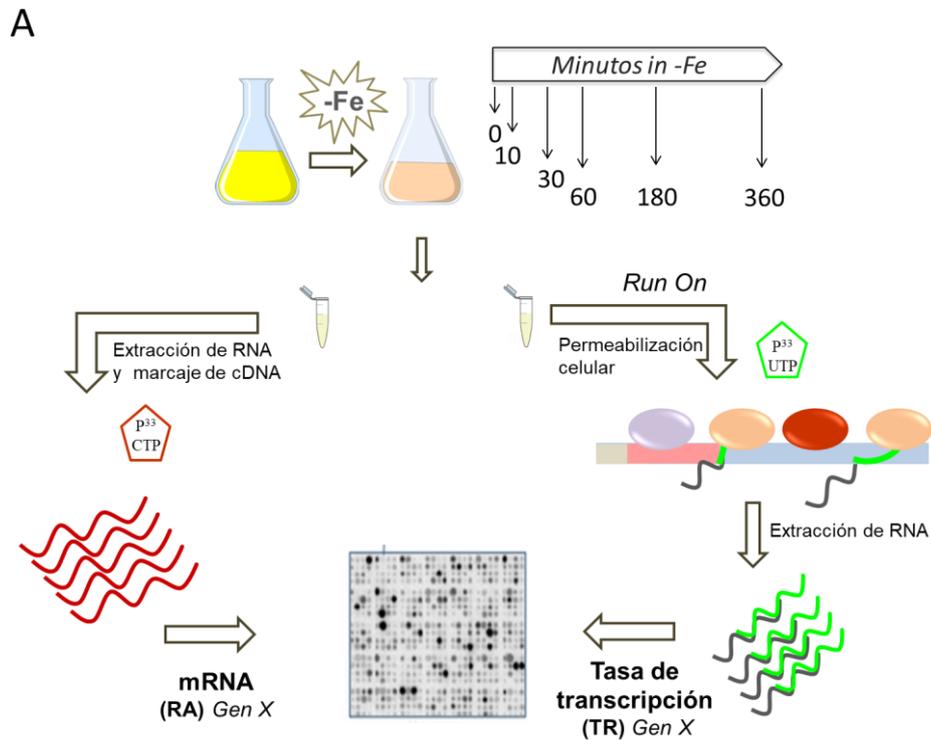
El estudio de los mecanismos implicados en la regulación de la expresión génica en respuesta a deficiencia de hierro ha sido abordado por diferentes grupos mediante análisis de expresión que han permitido describir cambios en las cantidades de RNA mensajeros. Nuestro trabajo aporta nuevos datos en relación a la contribución de la tasa de transcripción en la variación de la expresión de los genes durante el progreso de la deficiencia de hierro. Esto nos ha permitido identificar y caracterizar nuevos mecanismos que regulan la adaptación de las células a condiciones de déficit de hierro.

### 1.1. Diseño experimental para *Genomic Run On* en deficiencia de hierro.

El principal objetivo de este capítulo es estudiar los mecanismos transcripcionales implicados en la variación de los niveles de mRNA durante la deficiencia de hierro. Para llevar a cabo este estudio, se realizó la técnica *Genomic Run On* (GRO) (García-Martínez et al., 2004) que permite conocer a escala genómica, la tasa de transcripción para cada gen. De forma paralela realizamos la medida de la cantidad de cada mRNA en ese mismo punto, como se ha descrito detalladamente en materiales y métodos (figura C1-1). La caracterización inicial de estos cambios en expresión génica se realizó utilizando una cepa W303 protótrofa. Esta cepa tiene un alelo de *HAP1* que codifica para la proteína totalmente funcional, a diferencia de los que ocurre con el fondo genético BY4741 (Gaisne et al., 1999) El factor transcripcional Hap1 está implicado en la regulación transcripcional de genes en función de la disponibilidad de oxígeno y hemo en el medio, y resulta interesante analizar los cambios en la regulación de sus genes dianas en condiciones de limitación de hierro.

Para llevar a cabo la técnica de GRO, se inoculó la cepa W303 en medio SC hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0.2. En este punto se recogieron dos alícuotas con el mismo número de células, siendo este nuestro tiempo 0, y se añadió el agente quelante BPS al medio para crear la deficiencia de hierro. A partir de aquí se

recogieron células a diferentes tiempos hasta alcanzar las 6 horas de crecimiento en deficiencia de hierro, y realizamos el GRO según se detalla en la figura C1-1.



**Figura C1-1. Diseño experimental de GRO en condiciones de deficiencia de hierro.** **A.** Las células se crecieron en medio SC hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0.2, momento en el cual se añadió el agente quelante de hierro BPS y se recogieron dos alícuotas con el mismo número de células a los tiempos 0, 10, 30, 90, 180 y 360 minutos. A partir de una de las alícuotas se realiza el marcaje del RNA nascente en cada punto, mediante la incorporación de un nucleótido radiactivo (UTP- $P^{33}$ ) durante el *Run On*. Posteriormente se hibrida la muestra con el macrochip, obteniéndose la tasa de transcripción (TR) de todos los genes en cada tiempo. Con la otra alícuota, se extrae el mRNA de la muestra y se retrotranscribe en presencia de un nucleótido radiactivo (dCTP- $P^{33}$ ). Tras la hibridación de esta muestra con el macrochip, se obtiene la cantidad de cada mRNA (RA) para cada punto de la cinética. **B.** Curva de crecimiento de la cepa W303 en condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro, en la que se representa la variación de la  $DO_{600}$  con el tiempo. **C.** Representación del volumen celular medio, obtenido mediante medidas en *COULTER COUNTER® ZTM Series*, durante el crecimiento en deficiencia de hierro. **D.** Variación de las concentraciones de glucosa y etanol durante el crecimiento en deficiencia de hierro. Las medidas se realizaron mediante el uso de *HPLC Surveyor Plus Chromatograph (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)*.

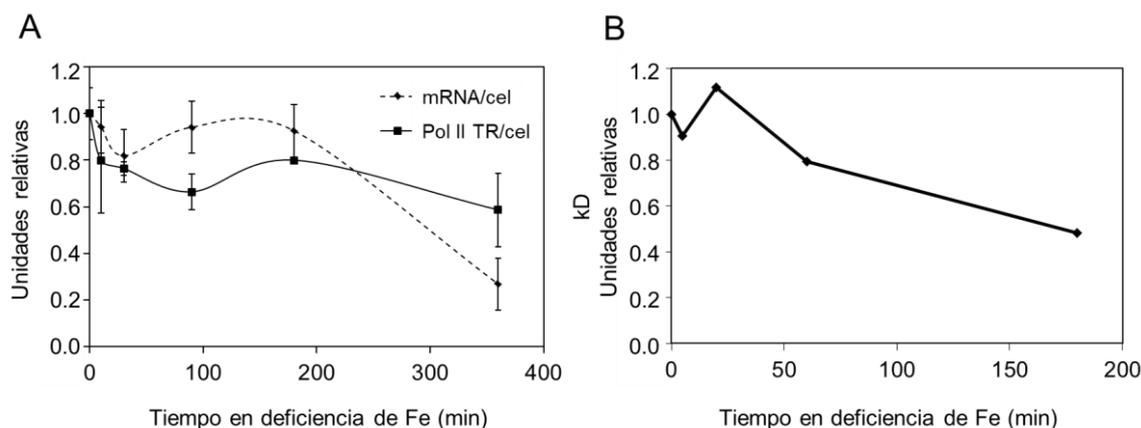
En primer lugar, determinamos el crecimiento del cultivo y el volumen de las células durante la deficiencia de hierro. Estos datos son importantes para obtener la tasa de transcripción y la cantidad de mRNA por célula. Como se observa en la figura C1-1 panel B, las células cultivadas en condiciones de deficiencia de hierro, presentan un crecimiento similar al de las células crecidas en condiciones normales, siendo las 6 horas de deficiencia el tiempo en el que empiezan a evidenciarse diferencias en el crecimiento entre ambas condiciones. En cuanto a la variación en el volumen celular, no se observan cambios de volumen durante las 6 horas de crecimiento en condiciones de deficiencia de hierro (figura C1-1 panel C). Para asegurarnos de que la respuesta que observamos es específica de la falta de hierro en el medio, decidimos determinar cómo varían los niveles de glucosa y etanol en el medio durante el crecimiento en deficiencia de hierro (figura C1-1 panel D). Las variaciones obtenidas para las concentraciones de glucosa y etanol durante el

transcurso de la deficiencia no suponen un estrés adicional al que tengan que responder las células.

## **1.2. Efecto de la deficiencia de hierro sobre los niveles globales de mRNA y la tasa de transcripción de la RNA polimerasa II.**

Como ya hemos señalado, la técnica de GRO nos permite conocer la tasa de transcripción (TR) y la cantidad de RNA mensajero (RA) de cada gen durante el progreso de la deficiencia de hierro. Para estudiar la variación en la transcripción global de la RNA polimerasa II, se determinó la tasa de transcripción global mediante el cálculo de la mediana de los valores de transcripción de todos los genes en cada punto (figura C1-2 panel C). Los resultados muestran como la deficiencia de hierro provoca un descenso en la tasa de transcripción global de la RNA polimerasa II.

A la hora de realizar la normalización de los datos de mRNA obtenidos entre los diferentes puntos de un mismo experimento, es necesario conocer cómo varía la cantidad de RNA mensajero por célula durante los tiempos de deficiencia de hierro. La cantidad de mRNA total por célula se estimó mediante ensayos de *dot blot* que permiten conocer la cantidad de RNA poliadenilado en cada muestra. Los resultados muestran tres fases diferentes en la variación de la cantidad de mRNA (figura C1-2 panel A). En primer lugar, se produce un ligero descenso en la cantidad de mRNA total de las células durante los primeros minutos de deficiencia de hierro, que se recupera y mantiene constante hasta las 3 horas de crecimiento en el medio. Finalmente, tras 6 horas de crecimiento en estas condiciones se produce una bajada de mRNA superior al 50%, indicando la fuerte caída en cantidad de mRNA total que experimentan las células en este punto.



**Figura C1-2. Variación de la tasa de transcripción global de la RNA polimerasa II y de la cantidad de mRNA durante el crecimiento en deficiencia de hierro.** **A.** Representación de la tasa de transcripción global, determinada a partir del sumatorio de los valores de transcripción de todos los genes, y de los niveles globales de mRNA determinados mediante *dot blot*. Los valores de cada tiempo están referidos al tiempo 0. Se representan los valores promedios correspondientes a las 3 réplicas. **B.** Representación de la constante de degradación ( $k_D$ ) de los mRNAs a nivel global durante el transcurso de la deficiencia de hierro. La  $k_D$  de cada gen ha sido calculada a partir de los datos de TR y RA obtenidos tras calcular el valor estadístico medio (MAD, *Median Absolute Deviation*) a partir de las 3 réplicas del experimento, por ello no se muestran barras de error. Se representa la mediana obtenida a partir de todos los valores de  $k_D$  de cada gen en cada tiempo, referidas al tiempo 0.

Los datos experimentales de cantidad de mRNA y transcripción de cada gen obtenidos mediante GRO en deficiencia de hierro nos permiten conocer de manera teórica los cambios en la estabilidad de los mRNAs mediante el cálculo de la constante de degradación de los genes ( $k_D$ ). Para estudiar de forma global la contribución de los cambios en la estabilidad de los mRNA a la expresión génica durante los primeros 90 minutos de la respuesta a deficiencia de hierro se utilizó el algoritmo matemático descrito previamente por Perez-Ortín et al., (2007). Este algoritmo permite estimar la constante de degradación de los mRNA ( $k_D$ ) a partir de la tasa de transcripción y la cantidad de un mRNA en situaciones de cambios rápidos y transitorios, asumidas como un estado no estacionario. En estas condiciones se

obtiene un valor de  $k_D$  para el intervalo intermedio entre dos tiempos ( $t_1$  y  $t_2$ ) en los que se conoce la tasa de transcripción ( $TR_1$  y  $TR_2$ ) y los valores de mRNA ( $RA_1$  y  $RA_2$ ) a partir de la siguiente ecuación:

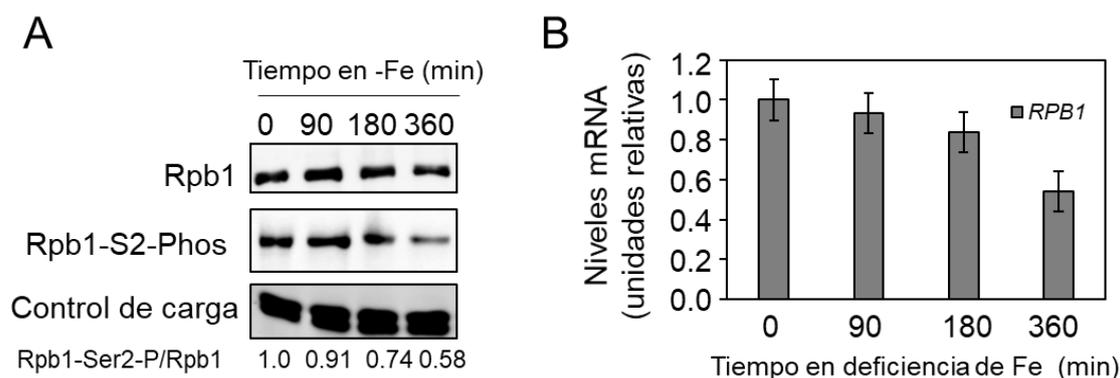
$$\left[ \frac{TR_2 - TR_1}{t_2 - t_1} \right] - TR_2 \cdot k_D + RA_2 \cdot k_D^2 = \left[ \left[ \frac{TR_2 - TR_1}{t_2 - t_1} \right] - TR_1 \cdot k_D + RA_1 \cdot k_D^2 \right] \cdot \exp[-k_D \cdot (t_2 - t_1)]$$

Resulta más sencillo el cálculo de la  $k_D$  para tiempos más largos en los que se asume un estado estacionario de los mRNAs. Este es el caso de las 3 y 6 horas de deficiencia de hierro, en el que la  $k_D$  se obtiene a partir del cociente entre  $TR/mRNA$  de cada gen. Mediante el uso de ambas fórmulas se determinó la constante de degradación de los mRNA durante la deficiencia de hierro, asumiendo un estado no estacionario durante los tiempos 10, 30 y 90 minutos; y estado estacionario a las 3 horas de deficiencia de hierro (figura C1-2 panel B). En el caso de las 6 horas de deficiencia de hierro, no pudimos obtener un valor de  $k_D$ , ya que la hibridación de la muestra de mRNA (RA) de las 6 horas de deficiencia de hierro no dio señal en ninguna de las réplicas. Los valores de  $k_D$  por encima de 1 indican desestabilización de los mRNAs, mientras que por debajo de 1 indican una estabilización de estos. La gráfica muestra ligeros cambios en la estabilidad de los mRNA durante los primeros 20 minutos, a partir de este punto comienza a disminuir la constante de degradación de los mRNAs indicando un incremento en la estabilidad de los mRNAs, siendo las 3 horas de deficiencia de hierro el punto de mayor estabilidad de los mRNAs.

### 1.3. Los niveles de RNA polimerasa II elongante disminuyen en deficiencia de hierro.

Para indagar en la bajada de transcripción de la RNA polimerasa II que se produce durante la deficiencia de hierro, decidimos determinar los niveles de proteína mediante el uso de un anticuerpo que reconoce la subunidad grande de la RNA pol II, Rpb1. Asimismo, también se determinaron los niveles de RNA pol II elongante mediante el uso de un anticuerpo que reconoce la fosforilación en la serina 2 del dominio CTD de la misma subunidad. Como se observa en la figura C1-3 panel A, la cantidad de RNA polimerasa II total muestra una ligera variación durante el progreso de la deficiencia de hierro, mientras que la cantidad de RNA

polimerasa elongante cae a la mitad tras las 6 horas de crecimiento. La determinación de los niveles de mRNA *RPB1*, que codifican para la subunidad grande de la polimerasa, muestran un comportamiento similar al obtenido para los niveles de proteína, confirmando así la bajada en la cantidad de RNA polimerasa II durante la deficiencia de hierro (figura C1-3 panel B).

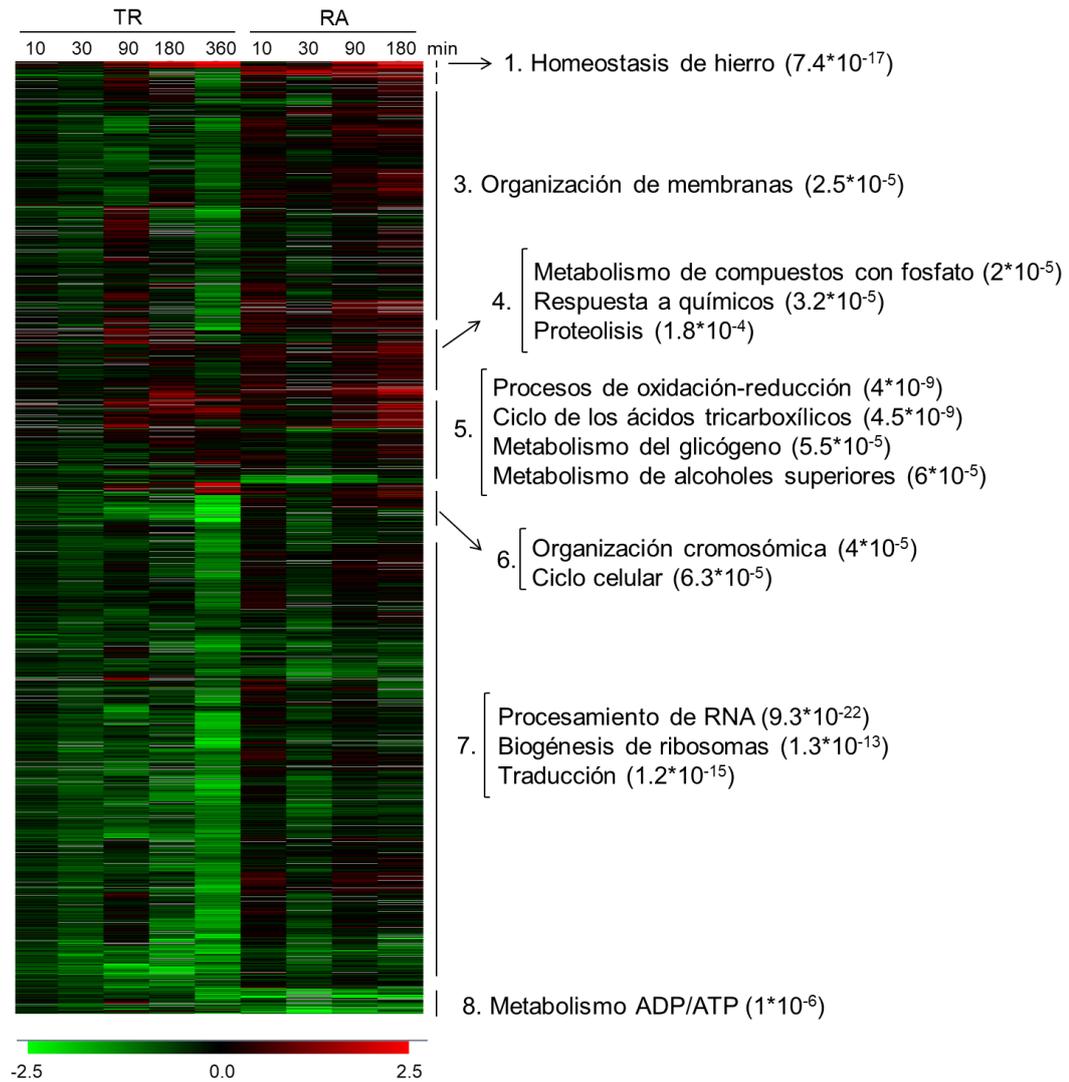


**Figura C1-3. Los niveles de RNA polimerasa II elongante disminuyen en respuesta a deficiencia de hierro.** Células silvestres (W303) se crecieron en SC con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe) durante 6 horas a 30  $^{\circ}$ C y se recogieron alícuotas a diferentes tiempos. **A.** Los extractos proteicos se analizaron mediante *Western Blot* utilizando anticuerpos  $\alpha$ -Rpb1 y  $\alpha$ -Rpb1-S2-P. Como control de carga se muestra una de bandas inespecíficas del anticuerpo. **B.** El RNA extraído de las muestras se analizó por RT-qPCR utilizando oligonucleótidos para determinar los niveles de *RPB1* que se muestran en las gráficas normalizados frente a los niveles de *ACT1*. Se representan los valores promedios correspondientes a 3 réplicas biológicas.

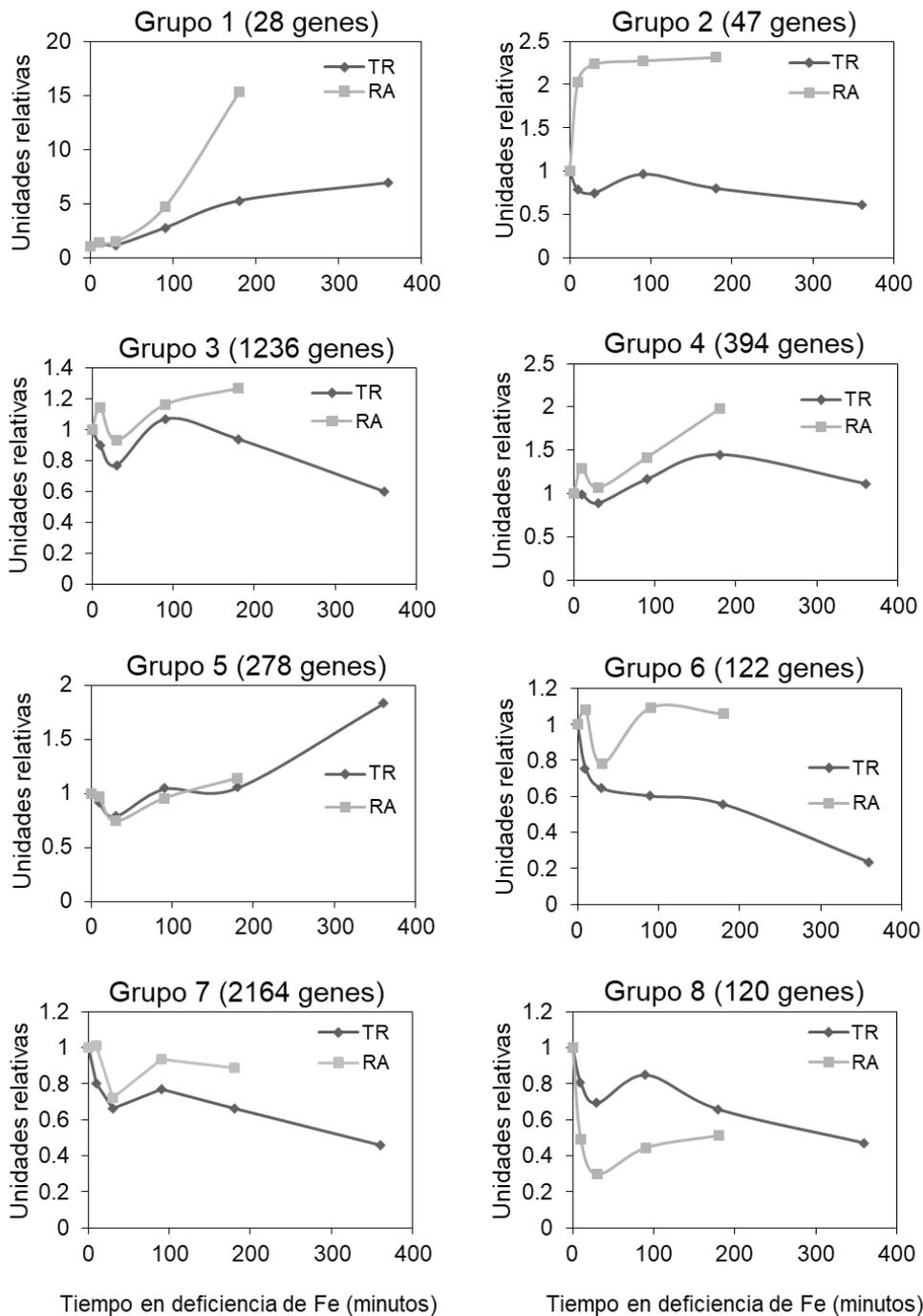
#### 1.4. Clasificación de los genes según la variación en la tasa de transcripción y cantidad de mRNA durante el transcurso de la respuesta a deficiencia de hierro.

La determinación de los valores de tasa de transcripción y cantidad de mRNA de cada gen en este estudio mediante *GRO* nos permite realizar análisis con el fin de encontrar grupos de genes con variaciones similares en su transcripción y en la cantidad de mRNA. De esta forma, se puede identificar grupos de genes que estén siendo regulados de manera coordinada durante la respuesta a deficiencia de hierro.

Para llevar a cabo este objetivo se realizó una clasificación de todos los genes atendiendo a su comportamiento en tasa de transcripción (TR) y cantidad de mRNA (RA) a medida que avanza la deficiencia de hierro mediante el programa *Multiple Array Viewer 4.8* (figura C1-4-1). Los valores absolutos de TR y RA de cada gen muestran grandes diferencias, por lo que se representaron los valores referidos al tiempo 0 en escala logarítmica. La clasificación muestra los 4389 genes analizados, distribuidos en 8 grupos diferentes que están constituidos por genes con un comportamiento similar. Además, para poder definir un perfil de comportamiento concreto en cada grupo, en la figura C1-4-2 se han representado los perfiles promedio de tasa de transcripción y cantidad de mRNA de los genes incluidos en cada grupo. Como ya hemos mencionado anteriormente, la hibridación de las muestras de mRNA de las 6 horas de crecimiento no generó señal, por lo que no disponemos del dato de cantidad de mRNA de cada gen en ese tiempo. Con el fin de identificar procesos celulares que pudieran estar regulados de forma coordinada durante la respuesta a deficiencia de hierro, se realizó una búsqueda de categorías funcionales enriquecidas en los diferentes grupos. Las categorías funcionales enriquecidas significativamente se muestran a la derecha de cada grupo en la figura C1-4-1.

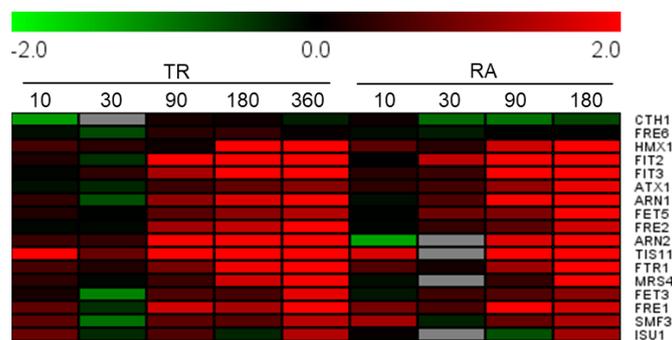


**Figura C1-4-1. Clasificación de los genes según sus perfiles de tasa de transcripción (TR) y cantidad de mRNA (RA) durante la respuesta a deficiencia de hierro.** Cada tiempo está referido a su tiempo 0 respectivo en escala logarítmica. Cada fila representa los valores de TR y RA correspondientes a cada gen en los diferentes tiempos. La represión relativa de los genes se muestra en verde y la inducción relativa en rojo. En la derecha de la figura se muestra las categorías funcionales de genes más representativas de cada grupo ( $p$ -valor  $\leq 10^{-3}$ )



**Figura C1-4-2.** Perfiles de la tasa de transcripción (TR) y la cantidad de mRNA (RA) de los grupos que presentan diferentes comportamientos durante el progreso de la deficiencia de hierro. Se representan los valores promedio de TR y RA de los genes incluidos en cada grupo en la figura C1-4-1 referidos al tiempo inicial.

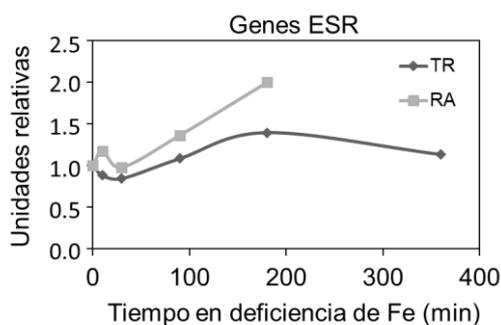
En primer lugar, observamos como el análisis de nuestros datos nos muestra la categoría funcional de “Homeostasis del hierro” enriquecida en el primer grupo. En este grupo se encuentran genes que sufren un fuerte aumento en la transcripción desde etapas tempranas de la deficiencia de hierro acompañado de un aumento en la cantidad de su mRNA. Como se observa en la figura C1-4-3 la mayor parte de los genes del regulón experimentan un fuerte incremento en su transcripción y en la cantidad de mRNA a medida que avanza la deficiencia de hierro. Ambos resultados confirman la inducción del regulón de hierro en las condiciones en las que hemos realizado el experimento e indican que la técnica de GRO nos permite estudiar otros cambios transcripcionales que estén ocurriendo durante la deficiencia de hierro.



**Figura C1-4-3. Los genes del regulón de hierro se inducen transcripcionalmente durante el progreso de la deficiencia de hierro.** *Heat map* representativo de los perfiles de transcripción (TR) y cantidad de mRNA (RA) de genes pertenecientes al regulón de hierro. Se muestra en escala logarítmica el valor de cada tiempo referido al tiempo 0, siendo verde la represión relativa de los genes y roja la inducción.

Si analizamos el comportamiento de la tasa de transcripción de los diferentes grupos, podemos observar una disminución de la transcripción en la mayoría de ellos, como ya sugería el perfil de transcripción global (figura C1-2 panel A), a excepción de los grupos 1 (ya descrito), 4 y 5. Dentro del grupo 1, además de los genes del regulón de hierro, se encuentra en gen *OLE1* que codifica para la desaturasa de ácidos grasos y cuya activación transcripcional es el objeto de estudio del siguiente capítulo. En el grupo 4, el aumento de la tasa de transcripción

es menos notable y se mantiene constante durante la evolución de la deficiencia de hierro. En este caso, resulta más relevante el aumento en la cantidad de mRNA de estos genes a las 3 horas de deficiencia de hierro. Este grupo está enriquecido en genes implicados en la “respuesta a químicos”, el “metabolismo de compuestos con fosfato” y la “proteólisis”. En el grupo 5, encontramos genes que inducen su transcripción a partir de las 3 horas, cuando la deficiencia de hierro empieza a ser más severa. En este caso no observamos el aumento en la cantidad de mRNA a las 3 horas, probablemente debido a que en este punto aún no hay activación transcripcional. Este grupo está altamente enriquecido en genes pertenecientes a “procesos de oxidación-reducción” y “ciclo de ácidos tricarbóxicos”, junto a genes implicados en el “metabolismo del glucógeno” y el de “alcoholes superiores”. La inducción de estas categorías funcionales enriquecidas en los grupos 4 y 5 se ha caracterizado durante la activación de la respuesta a estrés (ESR “*Environmental Stress Response*”) (Gasch et al., 2000). Por este motivo, hemos analizado el comportamiento transcripcional y de expresión durante la deficiencia de hierro de los genes inducidos como consecuencia de la activación de la ESR (figura C1-4-4). El perfil promedio de estos genes muestra un incremento en la cantidad de RNA hasta las 3 horas de deficiencia de hierro junto a un ligero aumento en la tasa de transcripción de estos genes. Estos datos sugieren que la respuesta general de estrés podría activarse durante la deficiencia de hierro, ya que la tendencia global es un descenso de la tasa de transcripción de los genes con el progreso de la deficiencia.



**Figura C1-4-4. Comportamiento global de los genes incluidos en la ESR durante el transcurso de la deficiencia de hierro.** Se representan los valores promedios de TR y RA de los genes cuya inducción se ha descrito durante la ESR. Los valores están referidos al tiempo inicial.

El resto de grupos (2, 3, 6, 7 y 8) muestran una disminución en la tasa de transcripción de sus genes. En el grupo 2, los genes disminuyen la tasa de transcripción durante la deficiencia de hierro, mientras que su cantidad de mRNA se ve muy aumentada desde los primeros minutos, sugiriendo una fuerte estabilización de estos genes. Pese a este comportamiento tan marcado, los genes que componen este grupo no están enmarcados en una categoría funcional conjunta. Los genes pertenecientes al grupo 3 experimentan una bajada en la transcripción que se recupera a los 90 minutos para después volver a descender. No ocurre lo mismo con la cantidad de mRNA que se mantiene o se incrementa ligeramente durante las 3 primeras horas de la respuesta a deficiencia de hierro. Este grupo está enriquecido en genes implicados en la organización de membranas. El grupo 6 experimenta una caída progresiva de la tasa de transcripción a medida que avanza la deficiencia de hierro. Sin embargo, los niveles de mRNA se mantienen ligeramente por encima de los niveles iniciales tras las 3 horas de crecimiento, tras recuperarse de una disminución a los 30 minutos. Los genes de este grupo están implicados en el ciclo celular y la organización cromosómica. El grupo 7 está constituido por casi el 50% de los genes, y su comportamiento implica un descenso en la tasa de transcripción durante la deficiencia de hierro. A pesar de este descenso, la cantidad de mRNA se mantiene transcurridas 3 horas de crecimiento en deficiencia de hierro. Este grupo es el que determina el comportamiento global de la tasa de transcripción y de la cantidad de mRNA y en él se encuentran enriquecidas de forma muy significativa las categorías funcionales pertenecientes al “procesamiento de RNA”, “biogénesis de ribosomas” y la “traducción”. Por último, en el grupo 8 encontramos genes que disminuyen su cantidad de mRNA desde los primeros minutos de la respuesta, mientras la transcripción cae de forma más suave. Aquí encontramos genes implicados en el “metabolismo del ATP/ADP”.

### 1.5. Búsqueda de factores transcripcionales asociados a los genes que aumentan su tasa de transcripción.

Con el fin de identificar los factores transcripcionales potencialmente responsables de la inducción transcripcional de los genes incluidos en los grupos, 4 y 5, decidimos realizar la búsqueda de factores transcripcionales asociados a estos genes mediante la herramienta *YEASTRACT*. Esta herramienta realiza una predicción de los factores transcripcionales que podrían estar regulando de forma coordinada la expresión de un grupo de genes. En nuestro caso, llevamos a cabo la búsqueda de los factores transcripcionales asociados a las categorías funcionales que encontramos en cada grupo. La tabla 1-5-1 muestra los resultados de la búsqueda de los factores transcripcionales asociados a las categorías del grupo 4, que mostraron un aumento transcripcional ligero y temprano durante la deficiencia de hierro. En este caso, la búsqueda mostró como los factores Hac1 y Hsf1 podrían estar regulando los genes de la proteólisis, mientras el metabolismo de compuestos con fosfato podría regularse por Hsf1, Ace1 y Hot1. Aft2 podría mediar la regulación de la respuesta a químicos.

<b>Grupo 4</b>		
<b>Proteólisis</b>		
<b>Factor transcripcional</b>	<b>Función</b>	<b>p-Valor</b>
Hac1p	Respuesta a proteínas mal plegadas	$5.0 \cdot 10^{-5}$
Hsf1p	Respuesta a choque térmico	$2.0 \cdot 10^{-4}$
<b>Compuestos con fosfato</b>		
<b>Factor transcripcional</b>	<b>Función</b>	<b>p-Valor</b>
Ace2p	Regula la división celular	$7.5 \cdot 10^{-7}$
Hsf1p	Respuesta a choque térmico	$6.4 \cdot 10^{-6}$
Hot1p	Respuesta a estrés osmótico	$1.2 \cdot 10^{-5}$
<b>Respuesta a químicos</b>		
<b>Factor transcripcional</b>	<b>Función</b>	<b>p-Valor</b>
Aft2p	Respuesta a deficiencia de hierro	$2.7 \cdot 10^{-5}$

Tabla C1-5-1. Factores transcripcionales asociados a los genes incluidos en el grupo 4 dentro de estas categorías funcionales.

En el grupo 5 se encontraban genes con un aumento transcripcional a tiempos más largos de la deficiencia de hierro. En esta búsqueda se han encontrado más factores transcripcionales con un valor más significativo. Asociados a los genes implicados en procesos redox encontramos entre otros los factores transcripcionales Yap1 necesario para la tolerancia al estrés oxidativo, Msn2/4 implicados en la respuesta a estrés, Hap1-5 que responden a cambios de niveles de grupos hemo y oxígeno, Aft1/2 y Zap1 que regulan la respuesta a cambios en las concentraciones de hierro y zinc respectivamente y otros factores que regulan el metabolismo de las células. Por otro lado, los factores asociados a la regulación de los genes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos son Rtg1/3, responsables de la activación de la ruta retrógrada, y Hap1-5 (tabla C1-5-2). En el caso de los genes implicados en el metabolismo del glucógeno encontramos cómo todos los genes incluidos en este grupo son dianas del factor Fkh1, que está implicado en la regulación de la elongación durante la transcripción. En menor medida estos genes, también están regulados por los factores Hot1 y Arr1, implicados en la respuesta a estrés osmótico y resistencia a arsénico, respectivamente. Para los genes implicados en el metabolismo de alcoholes superiores, entre los que hemos encontrado muchos de los genes que codifican para proteínas implicadas en la síntesis de ergosterol, observamos cómo son dianas de los factores transcripcionales Ecm22 y Upc2, implicados en la regulación de la síntesis de esteroides. Del mismo modo, estos genes también son diana de factores como Yap1, Rox1/Mot3 y Hap1-5 que se regulan en función de las condiciones redox en las que se encuentren las células y en función de los niveles de O<sub>2</sub> y hemo. Ya que muchos pasos de esta ruta de síntesis son dependientes de los niveles de hemo y O<sub>2</sub>, resulta interesante que estos genes estén coregulados durante la deficiencia de hierro.

<b>Grupo 5</b>		
<b>Procesos oxidación-reducción</b>		
<b>Factor transcripcional</b>	<b>Función</b>	<b>p-Valor</b>
Yap1p	Tolerancia a estrés oxidativo	1.4*10 <sup>-10</sup>
Rpn4p	Regulación del proteasoma	1.5*10 <sup>-9</sup>
Msn2p	Respuesta a estrés	6.0*10 <sup>-9</sup>
Hap1p	Respuesta a niveles de hemo y O <sub>2</sub>	1.3*10 <sup>-9</sup>
Zap1p	Respuesta a niveles de Zinc	1.4*10 <sup>-8</sup>
Sut1p	Regulación de adquisición de esteroides	2.5*10 <sup>-8</sup>
Sfp1p	Regulación genes de proteínas ribosómicas	3.4*10 <sup>-8</sup>
Hot1p	Respuesta a estrés osmótico	3.8*10 <sup>-8</sup>
Aft1p	Respuesta a deficiencia de hierro	4.2*10 <sup>-8</sup>
Tda9p	Metabolismo acetato	4.6*10 <sup>-8</sup>
Swi5p	Regulación del ciclo celular	4.7*10 <sup>-8</sup>
Msn4p	Respuesta a estrés	5.2*10 <sup>-8</sup>
Leu3p	Metabolismo de leucina	8.3*10 <sup>-8</sup>
Rap1p	Activador-represor transcripcional	3.1*10 <sup>-7</sup>
Hap4p	Respuesta a niveles de hemo y O <sub>2</sub>	5.3*10 <sup>-7</sup>
Spt23p	Regulación de <i>OLE1</i>	8.6*10 <sup>-7</sup>
Gcr1p	Metabolismo glicolítico	1.2*10 <sup>-6</sup>
Hap3p	Respuesta a niveles de hemo y O <sub>2</sub>	2.5*10 <sup>-8</sup>
Bas1p	Metabolismo de histidina y purinas	2.5*10 <sup>-6</sup>
Skn7p	Respuesta a estrés oxidativo	1.4*10 <sup>-6</sup>
Fkh1p	Regulador de la elongación transcripcional	2.0*10 <sup>-6</sup>
Aft2p	Respuesta a deficiencia de hierro	2.7*10 <sup>-6</sup>
Gcr2p	Metabolismo glicolítico	4.0*10 <sup>-6</sup>
Rox1p	Respuesta a niveles de O <sub>2</sub>	9.2*10 <sup>-6</sup>
<b>Ciclo de Ácidos Tricarboxílicos</b>		
<b>Factor transcripcional</b>	<b>Función</b>	<b>p-Valor</b>
Rtg1p	Activador de la ruta RTG	5.3*10 <sup>-11</sup>
Hap3p	Respuesta a niveles de hemo y O <sub>2</sub>	4.5*10 <sup>-9</sup>
Rtg3p	Activador de la ruta RTG	9.8*10 <sup>-8</sup>
Hap4p	Respuesta a niveles de hemo y O <sub>2</sub>	1.4*10 <sup>-7</sup>
Hap5p	Respuesta a niveles de hemo y O <sub>2</sub>	2.3*10 <sup>-6</sup>
Hap2p	Respuesta a niveles de hemo y O <sub>2</sub>	1.4*10 <sup>-5</sup>

<b>Metabolismo del glucógeno</b>		
<b>Factor transcripcional</b>	<b>Función</b>	<b>p-Valor</b>
Fkh1p	Regulador de la elongación transcripcional	0
Hot1p	Respuesta a estrés osmótico	1.33*10 <sup>-6</sup>
Arr1p	Resistencia a arsénico	2.25*10 <sup>-5</sup>
<b>Metabolismo de alcoholes superiores</b>		
<b>Factor transcripcional</b>	<b>Función</b>	<b>p-Valor</b>
Yap1p	Tolerancia a estrés oxidativo	0
Rox1p	Respuesta a niveles de O <sub>2</sub>	8.0*10 <sup>-9</sup>
Upc2p	Regulación de la síntesis de esteroides	1.1*10 <sup>-8</sup>
Hap1p	Respuesta a niveles de hemo y O <sub>2</sub>	2.0*10 <sup>-8</sup>
Ecm22p	Regulación de la síntesis de esteroides	3.8*10 <sup>-7</sup>
Mot3p	Respuesta a niveles de O <sub>2</sub>	7.8*10 <sup>-7</sup>
Tda9p	Metabolismo acetato	3.3*10 <sup>-6</sup>
Gcr1p	Metabolismo glicolítico	5.4*10 <sup>-5</sup>

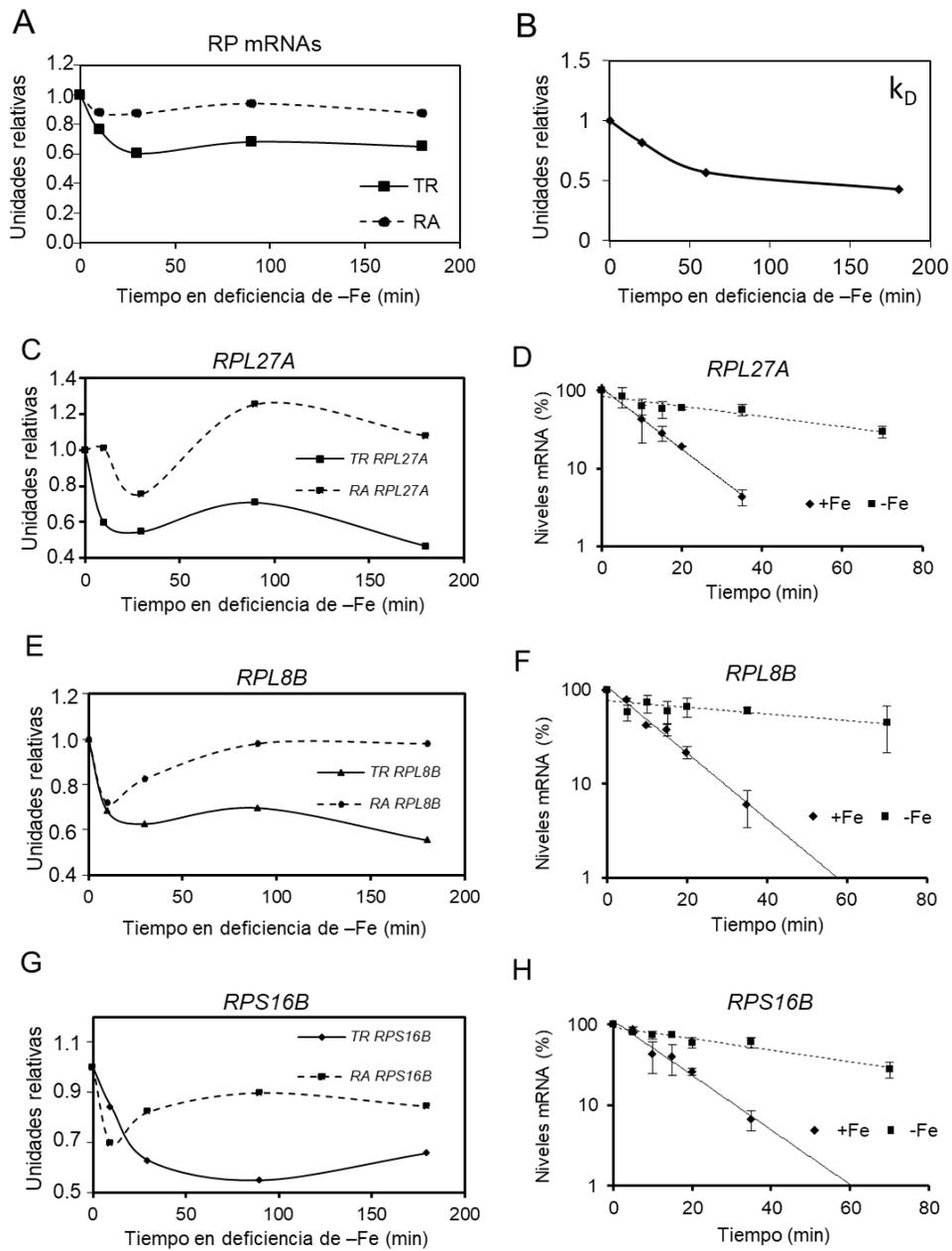
Tabla C1-5-2. Factores transcripcionales asociados a los genes incluidos en el grupo 5 dentro de estas categorías funcionales.

#### 1.6. Los genes RPs que codifican para proteínas ribosómicas se estabilizan en respuesta a la deficiencia de hierro.

En el grupo 7 nos encontramos el mayor número de genes, muchos de ellos pertenecientes a categorías funcionales relacionadas con la traducción en las células. Los genes implicados en traducción de proteínas se encuentran divididos en dos grupos, los genes que codifican para las proteínas ribosómicas (RPs) y los genes que codifican para proteínas que participan en la biogénesis de los ribosomas (RiBis). Pese a que ambos grupos se encuentran coregulados en las células, en este apartado nos hemos centrado en el grupo de los RPs. Estos genes mantienen la cantidad mRNA (RA) hasta las 3 horas, a pesar de experimentar una bajada en su transcripción (figura C1-6 panel A), como ocurre con los genes clasificados dentro del grupo 7. Esto sugiere que estos mRNAs aumentan su estabilidad en deficiencia de hierro, como predice el cálculo de la constante de degradación de los genes que

disminuye durante el transcurso de la deficiencia de hierro (figura C1-6 panel B). Para determinar de forma experimental la estabilidad de estos mRNAs, se llevaron a cabo ensayos de vida media en los que se detuvo la transcripción de la RNA polimerasa II en presencia de tiolutina tras crecer las células 3 horas en condiciones de suficiencia y deficiencia (figura C1-6, paneles D, F, H). Mediante RT-qPCR se determinaron los niveles de los mRNAs *RPL27A*, *RPL8B* y *RPS16B* que mostraban bajada en la tasa de transcripción (TR), mientras la cantidad de mRNA se mantenía constante (RA) (figura C1-6, paneles C, E, G). Los resultados de estos muestran como la vida media de estos mRNAs es superior en células crecidas en deficiencia de hierro, confirmando el aumento en la estabilidad de este grupo de genes en deficiencia de hierro.

A continuación, nos planteamos explorar cual podría ser el factor postranscripcional implicado en este aumento de la estabilidad de los genes RPs. Pub1 se ha caracterizado como una proteína de unión a RNA que actúa como factor postranscripcional modificando la estabilidad de diferentes mRNAs. En el caso de los mRNAs que codifican para las RPs, la ausencia de Pub1 provoca su desestabilización (Matunis et al., 1993; Duttagupta et al., 2005). Para estudiar si Pub1 está implicado en la estabilización de los RPs en deficiencia de hierro, se realizaron experimentos de estabilidad de mensajeros similares a los anteriores, pero esta vez con el mutante *pub1Δ*. Como ya se había descrito, en condiciones normales observamos una desestabilización de los RPs en ausencia de Pub1. Sin embargo, en condiciones de deficiencia de hierro se sigue produciendo la misma estabilización de estos mRNAs que se da en la cepa silvestre, pese a la falta del factor Pub1 (figura C1-6 panel I). Estos resultados permiten descartar el papel de Pub1 como principal factor responsable de la estabilización de estos mRNAs en deficiencia de hierro.



I

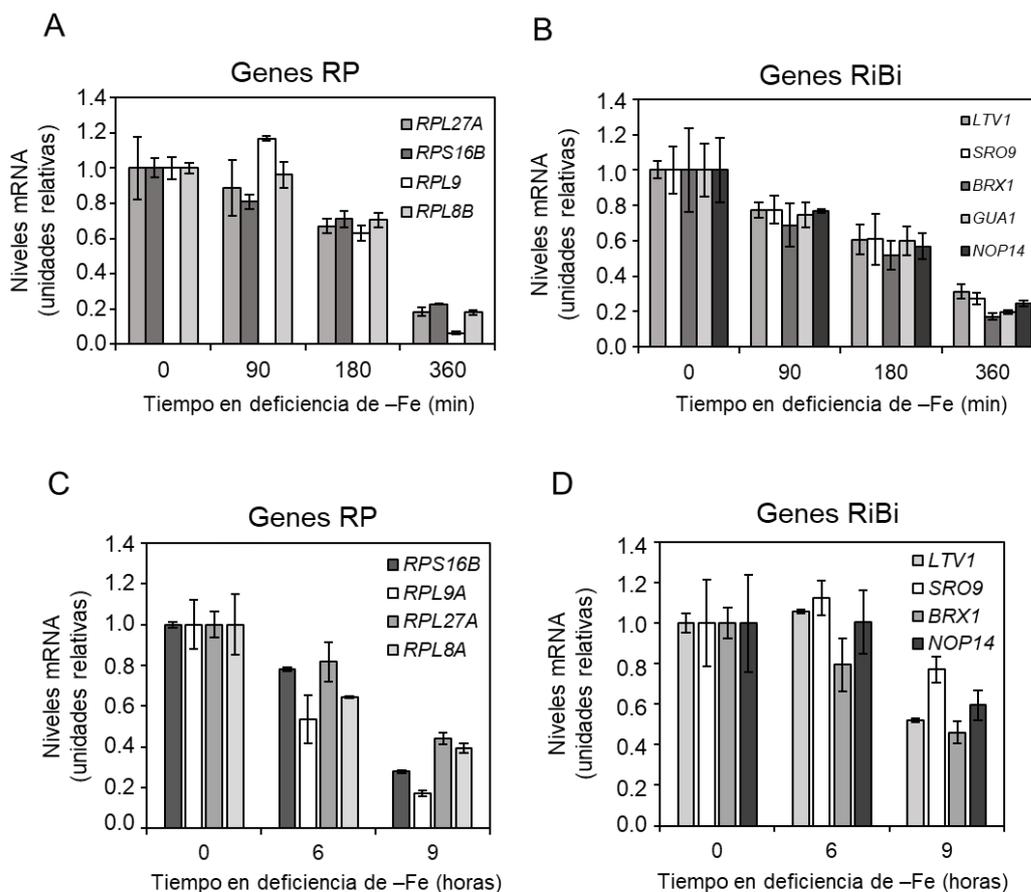
Vida media (min)	WT		<i>pub1Δ</i>	
	+Fe	-Fe	+Fe	-Fe
<i>RPS16B</i>	12±5	37±4	8±2	18±1
<i>RPL8B</i>	13±5	44±8	7±1	22±6
<i>RPL27A</i>	8±0.5	38±1	10±0.5	30±1

Figura C1-6. Los genes RPs se estabilizan en respuesta al déficit de hierro en el medio. A. Representación gráfica del comportamiento global de los genes que codifican para

proteínas ribosómicas en cuanto a su tasa de transcripción (TR) y cantidad de mRNA (RA) durante 3 horas de deficiencia de hierro, obtenidos a partir de los datos de *GRO*. Se representa la mediana de los genes que constituyen el regulón de los RPs. **B.** Representación de la constante de degradación ( $k_D$ ) de los genes RPs. **C. E. y G.** Representación de la TR y RA de los genes *RPL27A*, *RPL8B* y *RPS16B* durante 3 horas de crecimiento en deficiencia de hierro. **D. F. H. e I.** Células silvestre (*W303*) y *pub1Δ* se crecieron en SC (+Fe) y SC con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe) a 30 °C durante 3 horas. Transcurrido este tiempo se añadió tiolutina (3  $\mu$ g/mL) al medio y se recogieron alícuotas a diferentes puntos. El RNA extraído de las muestras se analizó por RT-qPCR utilizando oligonucleótidos para determinar los niveles de mRNA de *RPL27A*, *RPL8B* y *RPS16B*, normalizados frente a los niveles de *SCR1*.

### **1.7. Los genes que codifican para las proteínas ribosómicas (RP) y la biogénesis de ribosomas (RiBi) disminuyen su cantidad de mRNA en etapas prolongadas de la deficiencia de hierro.**

Con el fin de indagar en la regulación de genes RPs y RiBis en deficiencia de hierro, decidimos determinar la cantidad de mRNA de estos genes cuando la deficiencia de hierro es más severa. La cantidad de mRNA de algunos genes pertenecientes a ambos grupos a las 6 horas de deficiencia de hierro se determinó por RT-qPCR a partir de un cultivo crecido en las mismas condiciones en las que se realizó el *GRO*. Los resultados muestran una bajada acusada de mRNA para ambos grupos de genes tras 6 horas de deficiencia de hierro (figura C1-7, paneles A y B). Esta disminución en la cantidad de estos mRNAs también se observa a las 9 horas de crecimiento de una cepa BY4741 (figura C1-7, paneles C y D). Ambos resultados nos permiten establecer como condiciones severas de déficit de hierro, 6 horas de crecimiento en deficiencia de hierro en el fondo genético *W303* protótrofo y 9 horas en el fondo con auxotroffías BY4741. Estas serán las condiciones de crecimiento utilizadas para describir el comportamiento de cada cepa en respuesta a una limitación de hierro severa.

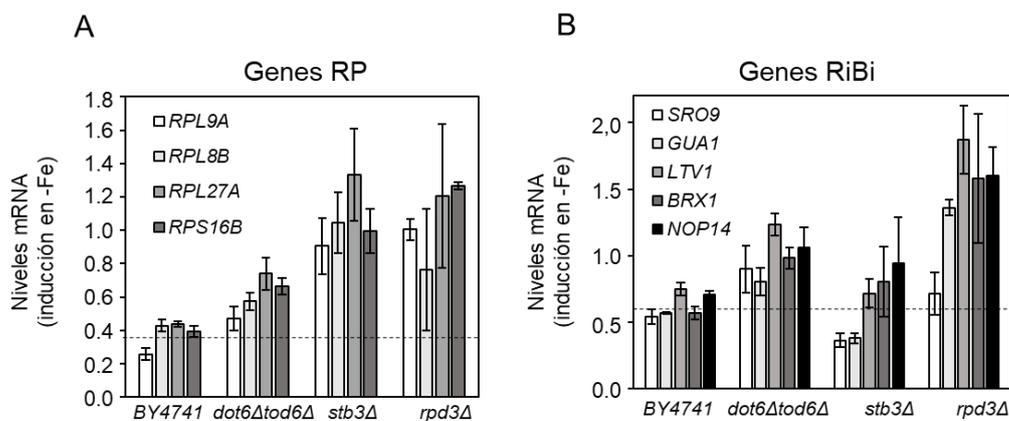


**Figura C1-7. Los genes RPs y RiBis disminuyen su cantidad de mRNA en condiciones de deficiencia de hierro severa. A. y B.** Células silvestres (W303) se crecieron en SC con 100  $\mu\text{M}$  de BPS (-Fe) a 30  $^{\circ}\text{C}$  durante 6 horas y se recogieron alícuotas a diferentes tiempos. El RNA extraído de las muestras se analizó por RT-qPCR utilizando oligonucleótidos para determinar los niveles de mRNA de los genes que se muestran en las gráficas normalizados frente a los niveles de *ACT1*. **C. y D.** Células silvestres (BY4741) se crecieron en SC con 100  $\mu\text{M}$  de BPS (-Fe) durante 9 horas y se recogieron alícuotas a diferentes tiempos. El RNA extraído de las muestras se analizó por RT-qPCR como en el apartado anterior.

### 1.8. Los genes RPs y RiBis se reprimen transcripcionalmente en deficiencia de hierro por la acción de las proteínas Dot6, Tod6, Stb3 y Rpd3.

Los genes RPs y RiBi están regulados transcripcionalmente de manera coordinada a través de la ruta de señalización de nutrientes o ruta TOR. La bajada en la cantidad de mRNAs de ambos grupos de genes sugiere que podrían estar

siendo reprimidos a nivel transcripcional durante la deficiencia de hierro. La represión de estos genes la realizan los represores transcripcionales Dot6, Tod6 y Stb3 que median el reclutamiento del complejo desacetilador de histonas RPD3L que contiene a la proteína Rpd3 (Huber et al., 2011). Para identificar si estos factores están ejerciendo su función represora sobre estos grupos de genes en deficiencia de hierro, se midieron los niveles de mRNA de estos genes en condiciones de deficiencia de hierro severas en cepas que carecen de los represores y de Rpd3. En el caso de Dot6 y Tod6 se utilizó el doble mutante *dot6Δtod6Δ* ya que actúan al mismo nivel. Como se observa en la figura, los genes pertenecientes a ambos grupos aumentan su cantidad de mRNA en ausencia de los represores transcripcionales en comparación con la cepa silvestre. En el caso del doble mutante *dot6Δtod6Δ* se observa un mayor aumento en la cantidad de mensajero de los genes RiBi. Estos resultados están de acuerdo con su mayor asociación a elementos PAC, presentes en los promotores de los genes RiBi. Lo mismo ocurre en el caso del mutante *stb3Δ* para los genes RPs, ya que Stb3 se une a las secuencias ricas en T de los promotores de estos genes (Huber et al., 2011). El mayor efecto de la falta de represión de estos genes lo encontramos tras eliminar la desacetilasa de histonas Rpd3, ya que es la encargada de reprimir el inicio de la transcripción de los genes tras ser reclutada a las secuencias promotoras de ambos grupos de genes. Todas estas observaciones sugieren que en deficiencia de hierro se reprime la transcripción de los genes RiBi y RPs a través de estos factores.

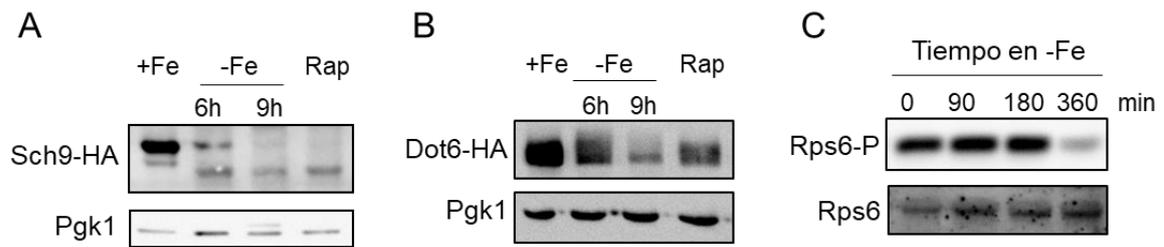


**Figura C1-8. Los genes RP y RiBi están reprimidos a nivel transcripcional a través de la inactivación de la ruta TOR en etapas prolongadas de la deficiencia de hierro.** A. B. Células silvestres (BY4741), *dot6Δtod6Δ*, *stb3Δ* y *rpd3Δ* se crecieron en SC con 100 μM de BPS (-Fe) a 30 °C durante 9 horas. El RNA extraído de las muestras se analizó por RT-qPCR utilizando oligonucleótidos para determinar los niveles de mRNA de los genes que se muestran en las gráficas normalizados frente a los niveles de *ACT1*.

### 1.9. La ruta TOR se inactiva como consecuencia de la deficiencia de hierro severa.

Los factores transcripcionales que median la represión de la transcripción de los genes RiBi y RPs mencionados en el apartado anterior modifican su estado de fosforilación como consecuencia de la señalización mediada por la ruta TOR. En ausencia de nutrientes la inactivación de la ruta TOR provoca la falta de fosforilación de la quinasa Sch9 y con ello su defecto de activación. Esta inhibición de Sch9 favorece el estado hipofosforilado de Dot6, Tod6 y Stb3 (Hughes et al., 2014). Para averiguar si la deficiencia de hierro promueve la inactivación de la ruta TOR decidimos estudiar el estado de fosforilación de Sch9 y Dot6 por *Western Blot*. Para ello, se utilizaron dos cepas que poseían ambas proteínas etiquetadas con el epítipo HA crecidas en condiciones de suficiencia y deficiencia bajo limitación de hierro. Como control positivo de la inactivación de la ruta TOR, las células fueron tratadas con rapamicina. Como muestra la figura, Sch9 y Dot6 en condiciones normales experimentan un retraso en su movilidad electroforética debido a su estado hiperfosforilado (figura C1-9 paneles A y B). Sin embargo, a medida que avanza la deficiencia de hierro va desapareciendo este retraso en la movilidad, hasta alcanzar las 9 horas de crecimiento donde la deficiencia de hierro es severa y ambas proteínas muestran un estado hipofosforilado, similar al de las células tratadas con rapamicina. Otro marcador utilizado para estudiar la inactivación de la ruta TOR es el estado de fosforilación de la proteína Rps6. En condiciones normales esta proteína es fosforilada por la quinasa Ypk3, mientras que en ausencia de nutrientes se encuentra desfosforilada (González et al., 2015). Para conocer su comportamiento en deficiencia de hierro se utilizó un anticuerpo que reconoce únicamente la forma fosforilada de Rps6. Como se observa en la imagen, la cantidad de proteína Rps6

fosforilada disminuye en condiciones de deficiencia de hierro severas, mientras que la cantidad de proteína Rps6 total no varía. Este resultado apoya la inactivación de la ruta TOR en condiciones severas de déficit de hierro. Estos resultados sugieren que en condiciones de deficiencia de hierro severa se produce la inactivación de la ruta TOR.



**Figura C1-9. Las proteínas Sch9, Dot6 y Rps6 se encuentran hipofosforiladas en condiciones severas de deficiencia de hierro.** **A.** Células *SCH9-HA* se crecieron en SC (+Fe), SC con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe) durante 9 horas y en presencia de rapamicina (Rap). Los extractos proteicos se analizaron mediante *Western Blot* utilizando anticuerpos  $\alpha$ -HA y  $\alpha$ -Pgk1, este último se utilizó como control de carga. **B.** Células *DOT6-HA* se crecieron en SC (+Fe), SC con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe) y en presencia de rapamicina (Rap). Los extractos proteicos se analizaron igual que en el apartado anterior. **C.** Células W303 se crecieron en SC con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe) durante 6 y se recogieron alícuotas a diferentes tiempos. Los extractos proteicos se analizaron por *Western Blot* utilizando un anticuerpo que reconoce únicamente la forma fosforilada de Rps6 y otro anticuerpo que reconoce la cantidad total de proteína.

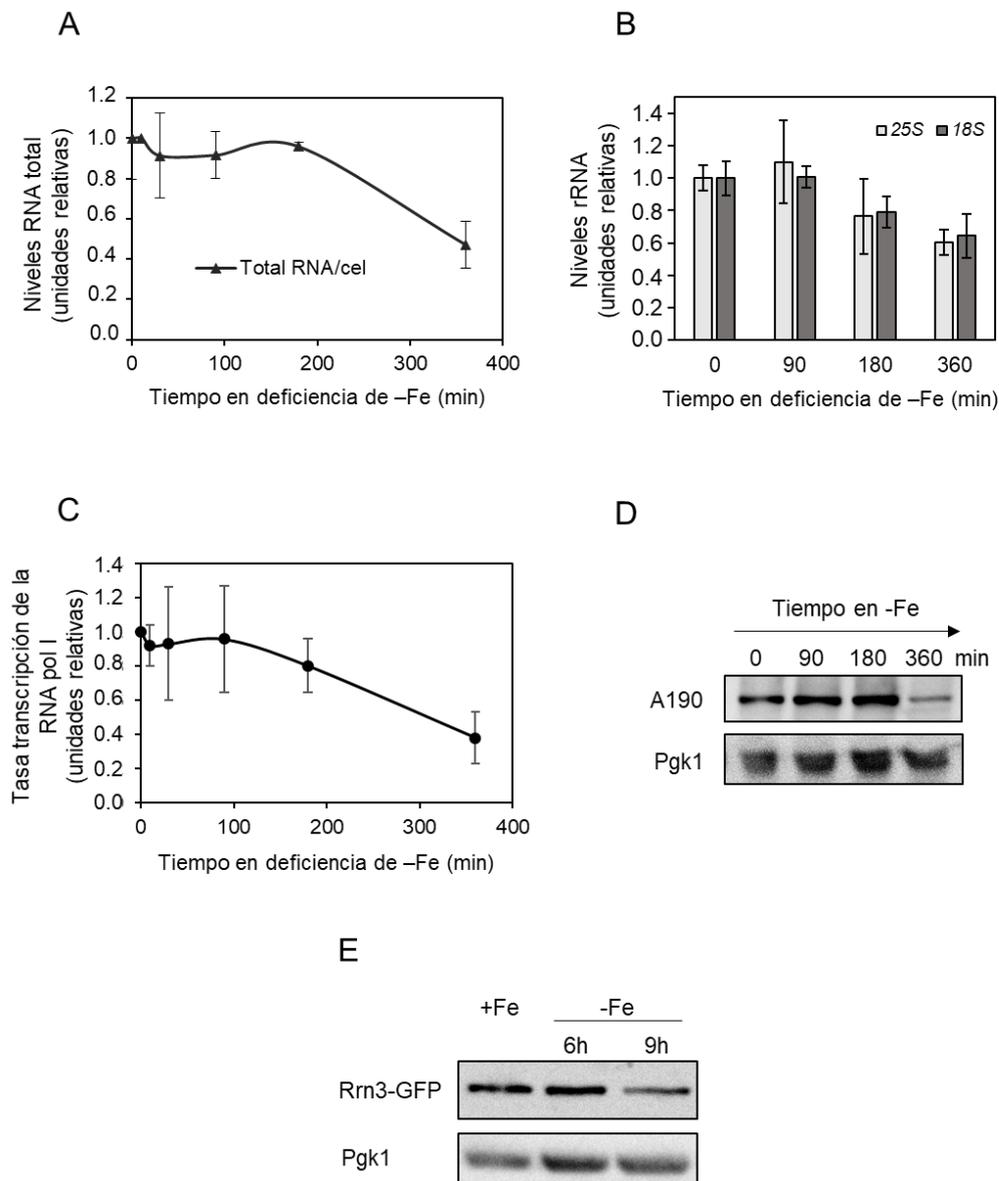
### 1.10. Regulación de la RNA polimerasa I en respuesta a deficiencia de hierro.

La biogénesis de ribosomas es un proceso muy costoso para las células por lo que las vías de síntesis de sus constituyentes están altamente reguladas y lo hacen de manera coordinada. Para ello, además de regular la transcripción de los RPs y los RiBis transcritos por la RNA polimerasa II, las células regulan la transcripción de los

rRNA y tRNA transcritos por las RNA polimerasas I y III; siendo la ruta TOR la encargada de esta regulación coordinada.

La determinación de la cantidad de RNA total, obtenida a partir del mismo número de células a medida que avanza la deficiencia de hierro nos muestra una disminución en la cantidad de RNA total tras las 6 horas de crecimiento, donde la deficiencia de hierro es severa (figura C1-10 panel A). Puesto que el 60% de la cantidad de RNA total pertenece al rRNA decidimos determinar por RT-qPCR la variación en cantidad de rRNA *25S* y *18S* a medida que transcurre la deficiencia de hierro. Como ya sugerían los datos anteriores, las células experimentan una bajada en la cantidad de los rRNAs cuando la deficiencia de hierro es severa (figura C1-10 panel B). Los datos de tasa de transcripción obtenidos por el *Genomic Run On* nos muestran como estos genes disminuyen su transcripción por la RNA polimerasa I en condiciones severas de deficiencia (figura C1-10 panel C). Para conocer si esta disminución es debida a una bajada de la RNA polimerasa I, se determinaron los niveles de su subunidad mayor durante el progreso de la deficiencia de hierro (figura C1-10 panel D). Como se observa en la imagen, los niveles de la subunidad grande de la polimerasa I decaen en condiciones severas de deficiencia.

Estudios anteriores han mostrado como Rrn3, proteína activadora de la RNA polimerasa I, se degrada como consecuencia de la inactivación de la ruta TOR en presencia de rapamicina (Phillipi et al., 2010). Para estudiar si esta disminución de la proteína Rrn3 ocurre en deficiencia de hierro, se determinaron sus niveles mediante *Western Blot*. En este caso se utilizó una cepa con la proteína Rrn3 etiquetada con GFP en el fondo BY4741, por ello las condiciones de deficiencia de hierro severas son 9 horas de crecimiento. Los resultados sugieren que condiciones de deficiencia de hierro severas inducen la degradación de la proteína Rrn3 que actúa favoreciendo la activación de la RNA polimerasa I.



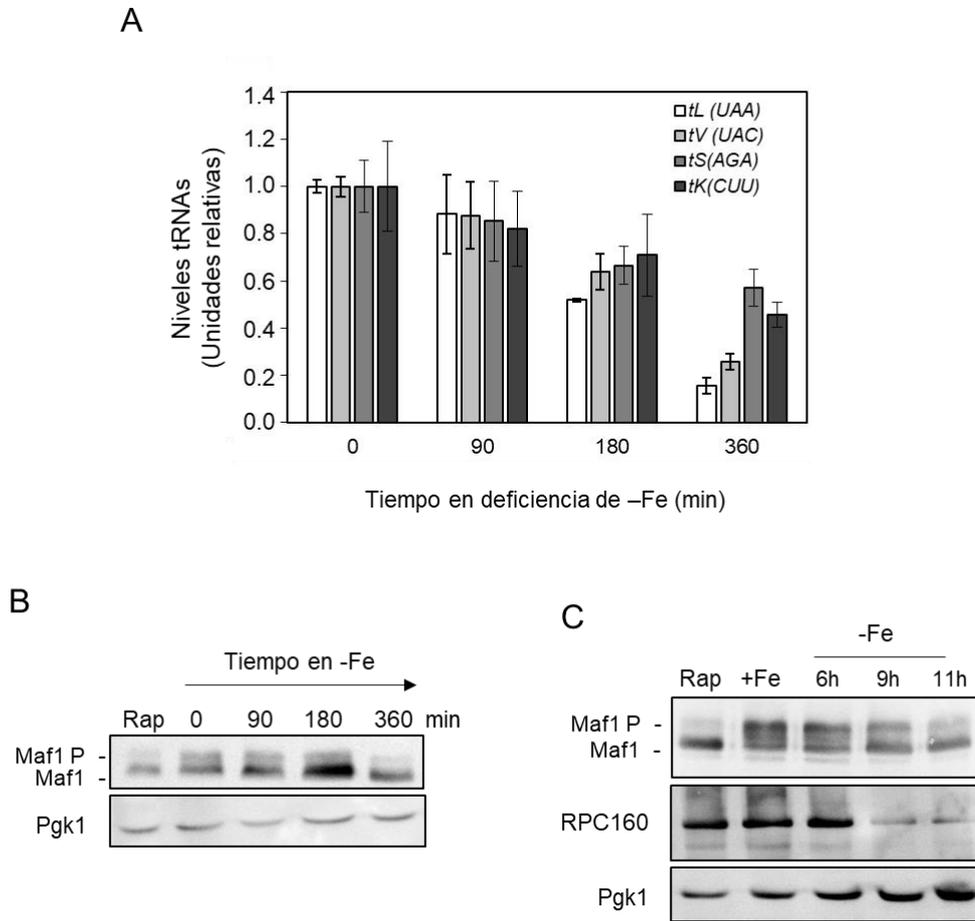
**Figura C1-10. La RNA polimerasa I se inhibe en respuesta a condiciones de deficiencia de hierro severas.** **A.** Células silvestres (W303) se crecieron en SC con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe) durante 6 horas a 30  $^{\circ}$ C y se recogieron alícuotas a diferentes tiempos. Posteriormente se cuantificó el RNA total extraído a partir del mismo número de células en los diferentes tiempos de deficiencia de hierro. **B.** A partir de los RNAs anteriores, se determinó la cantidad de RNA 25S y 18S mediante RT-qPCR, normalizando frente a los niveles de *ACT1*. **C.** Representación de los datos obtenidos mediante el *Run On* correspondientes a las sondas 18S y 25S presentes en los *arrays* durante los diferentes tiempos de deficiencia de hierro. **D.** Células W303 se crecieron en SC con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe) durante 6 y se recogieron

alícuotas a diferentes tiempos. Los extractos proteicos se analizaron mediante *Western Blot* utilizando anticuerpos  $\alpha$ -Rpa190 y  $\alpha$ -Pgk1, este último se utilizó como control de carga. E. Células *RRN3-GFP* se crecieron en SC (+Fe) y SC con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe) durante 9 horas a 30 °C. Los extractos proteicos se analizaron mediante *Western Blot* utilizando anticuerpos  $\alpha$ -GFP y  $\alpha$ -Pgk1.

### 1.11. Regulación de la RNA polimerasa III en respuesta a deficiencia de hierro.

Una de las consecuencias de la inactivación de la ruta TOR es la inhibición de la RNA polimerasa III a través del inhibidor Maf1. En condiciones de crecimiento favorables, Maf1 se mantiene fosforilado fuera del núcleo favoreciéndose la actividad de la RNA polimerasa III. Por el contrario, condiciones desfavorables provocan la inactivación de la ruta TOR favoreciendo la desfosforilación de Maf1 y su acumulación en el núcleo (Oficjalska-Pham et al., 2006; Roberts et al., 2006). La proteína Maf1 desfosforilada se une a la RNA polimerasa III bloqueando la transcripción de los tRNAs. Para averiguar si la RNA polimerasa III está inhibida en deficiencia de hierro, en primer lugar, medimos como varían la cantidad de algunos tRNAs a medida que avanza la deficiencia de hierro. Como se muestra en la figura, la cantidad de algunos tRNAs disminuye durante el crecimiento en deficiencia de hierro (figura C1-11 panel A). A continuación, decidimos analizar si se producen cambios en la fosforilación de Maf1 mediante *Western Blot*. Como se puede observar en la figura C1-11 panel B, Maf1 aumenta su migración a medida que progresa el crecimiento en deficiencia de hierro. Tras 6 horas de crecimiento en limitación de hierro se observa un colapso de la banda que corresponde a la proteína desfosforilada, igual que ocurre en presencia de rapamicina tras la inhibición de la ruta TOR. Además, se determinaron los niveles de la RNA polimerasa III, utilizando una cepa que posee la subunidad grande de esta polimerasa etiquetada con un epítipo HA (figura C1-11 panel C). En este caso, al ser una cepa W303 auxótrofa, igual que el fondo BY4741, los tiempos utilizados para estudiar la deficiencia de hierro son a partir de las 9 horas de crecimiento. En la figura se observa como a partir de las 9 horas disminuye la cantidad de la subunidad mayor de la polimerasa, a la vez que Maf1 se desfosforila. Todos estos resultados sugieren que la deficiencia

de hierro severa provoca la inactivación de la ruta TOR promoviendo la falta de fosforilación de Maf1 y su localización nuclear para ejercer su función represora sobre la RNA polimerasa III.



**Figura C1-11. La RNA polimerasa III se inhibe en respuesta a condiciones de hierro severas.**

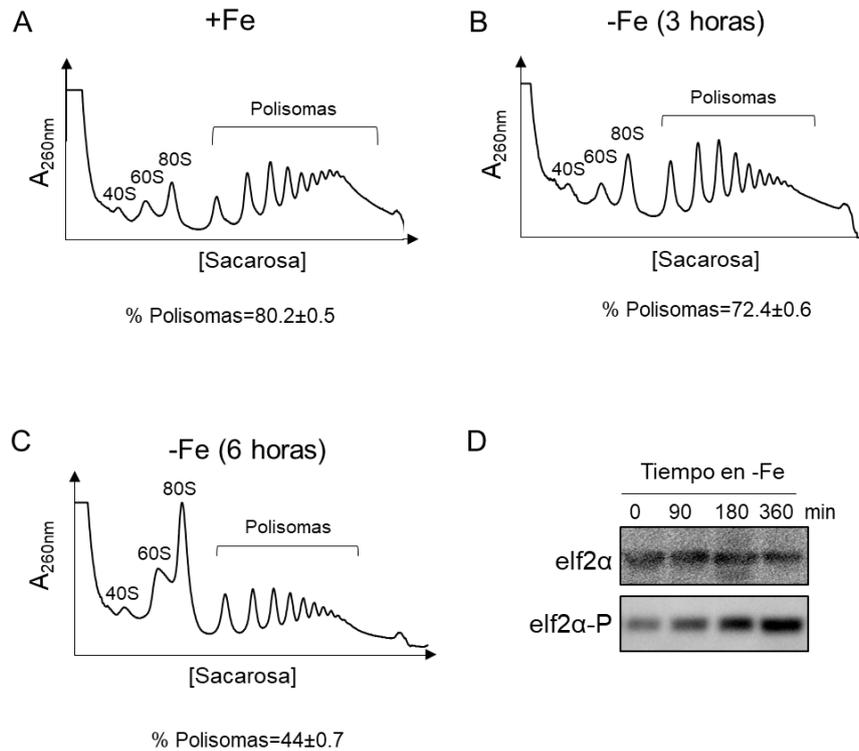
**A.** Células silvestres (W303) se crecieron en SC con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe) durante 6 horas a 30 °C y se recogieron alícuotas a diferentes tiempos. El RNA extraído de las muestras se analizó por RT-qPCR utilizando oligonucleótidos para determinar los niveles de los tRNAs que se muestran en las gráficas normalizados frente a los niveles de *ACT1*. **B.** Células W303 se crecieron en presencia de rapamicina (Rap) y SC con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe) durante 6 y se recogieron alícuotas a diferentes tiempos. Los extractos proteicos se analizaron mediante *Western Blot* utilizando anticuerpos  $\alpha$ -Maf1 y  $\alpha$ -Pgk1. **C.** Células RPC160-HA se crecieron en SC (+Fe), SC con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe) durante 9 horas y en presencia de rapamicina (Rap). Los extractos proteicos se analizaron mediante *Western Blot* utilizando anticuerpos  $\alpha$ -Maf1,  $\alpha$ -HA y  $\alpha$ -Pgk1, este último se utilizó como control de carga.

### 1.12. La deficiencia de hierro severa provoca la inhibición de la traducción.

Tras conocer la regulación de los diferentes constituyentes de los ribosomas durante la deficiencia de hierro, decidimos evaluar qué ocurre con la traducción durante la adaptación de las células a escasez de hierro, ya que la inhibición de la traducción es una consecuencia de la inactivación de la ruta TOR. Para ello realizamos perfiles de polirribosomas con la cepa W303 crecida en las mismas condiciones de limitación de hierro en las que realizamos el *Genomic Run On* y en condiciones de suficiencia. En los perfiles de polirribosomas se determina la cantidad de RNA asociada a monosomas y polisomas, lo cual habitualmente es indicativo de un estado traduccional inactivo o activo respectivamente. El porcentaje de polisomas se calcula a partir del área bajo la curva de las fracciones asociadas a polisomas frente al área total y sirve como indicador del estado traduccional de las células. El perfil de polirribosomas en condiciones normales muestra un porcentaje de polisomas de un 80%, que indica un estado traduccional activo de las células (figura C1-12 panel A). Las células crecidas durante 3 horas en deficiencia de hierro experimentan una ligera bajada en la traducción ya que el porcentaje de polisomas cae un 10% en comparación a las condiciones normales (figura C1-12 panel B). El efecto más llamativo del crecimiento en deficiencia de hierro sobre la traducción en las células lo observamos tras las 6 horas de crecimiento en estas condiciones, considerada como una deficiencia de hierro severa (figura C1-12 panel C). En este caso se observa una fuerte parada traduccional en el perfil de polisomas ya que aumenta la cantidad de RNA asociada a monosomas, lo cual conlleva una caída a la mitad del porcentaje de polisomas.

Para estudiar si esta parada de la traducción en condiciones de hierro severas se debía a la inactivación de la ruta TOR en estas condiciones, decidimos estudiar el estado de fosforilación del factor eIF2 $\alpha$  implicado en el inicio de la traducción. eIF2 $\alpha$  se fosforila por la quinasa Gcn2, tras la inactivación de la ruta TOR en presencia de rapamicina (Dong et al., 2000). Tras estudiar el estado de fosforilación de esta proteína mediante el uso de un anticuerpo que reconoce únicamente la proteína fosforilada, observamos un aumento en la fosforilación de eIF2 $\alpha$  mientras que la cantidad de proteína total se mantiene constante (figura C1-12 panel D). Estos

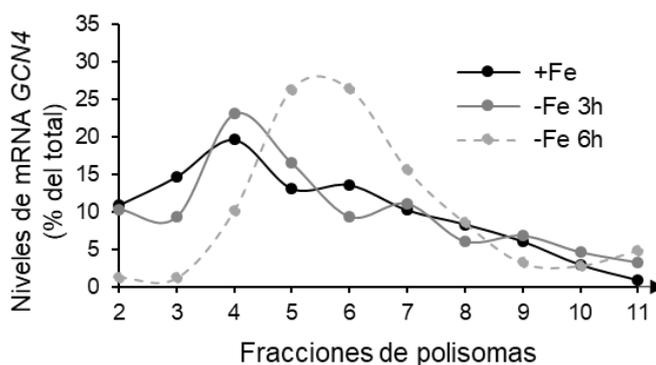
resultados sugieren que la inactivación de la ruta en condiciones de deficiencia de hierro severas promueve la fosforilación de eIF2 $\alpha$  y una parada de la traducción de las células.



**Figura C1-12. La inactivación de la ruta TOR en etapas prolongadas de la deficiencia de hierro provoca la inhibición de la traducción.** A-C. Células silvestre (W303) se crecieron en SC (+Fe), SC con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe) durante 3 y 6 horas a 30  $^{\circ}$ C y a continuación se añadió cicloheximida. Tras la ruptura de las células, se cargaron los extractos en los gradientes de sacarosa que posteriormente fueron fraccionados para obtener los perfiles de polirribosomas. D. Células W303 se crecieron en SC con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe) durante 6 y se recogieron alícuotas a diferentes tiempos. Los extractos proteicos se analizaron por *Western Blot* utilizando un anticuerpo que reconoce únicamente la forma fosforilada de eIF2 $\alpha$  y otro anticuerpo que reconoce la cantidad total de proteína eIF2 $\alpha$ .

### 1.13. La deficiencia de hierro severa favorece la traducción de *GCN4*.

La fosforilación de eIF2 $\alpha$  reprime el inicio de la traducción global en las células. Sin embargo, la traducción del mRNA del factor transcripcional Gcn4 se ve favorecida tras la inactivación de la ruta TOR en condiciones de escasez de aminoácidos debido a la presencia de *upstream* ORFs (uORFs) en el promotor de este gen (Conrad et al., 2004). Para estudiar qué ocurre en condiciones de deficiencia de hierro con la traducción de *GCN4*, se realizó la extracción de RNA de los perfiles de polirribosomas mostrados en el apartado anterior, y se determinó la cantidad de mRNA *GCN4* asociada a las diferentes fracciones por RT-qPCR. La gráfica muestra como en condiciones de suficiencia la cantidad de mRNA *GCN4* es mayor en las fracciones asociadas a monosomas, indicando un estado inactivo en su traducción (figura C1-13). Los mismos resultados se obtuvieron a las 3 horas de crecimiento en deficiencia de hierro. Sin embargo, a las 6 horas de crecimiento, donde la deficiencia de hierro es más severa, observamos una mayor cantidad de *GCN4* asociado a las fracciones de polisomas. Estos resultados sugieren que la deficiencia de hierro severa favorece la traducción de *GCN4* como consecuencia de la inactivación de la ruta TOR.

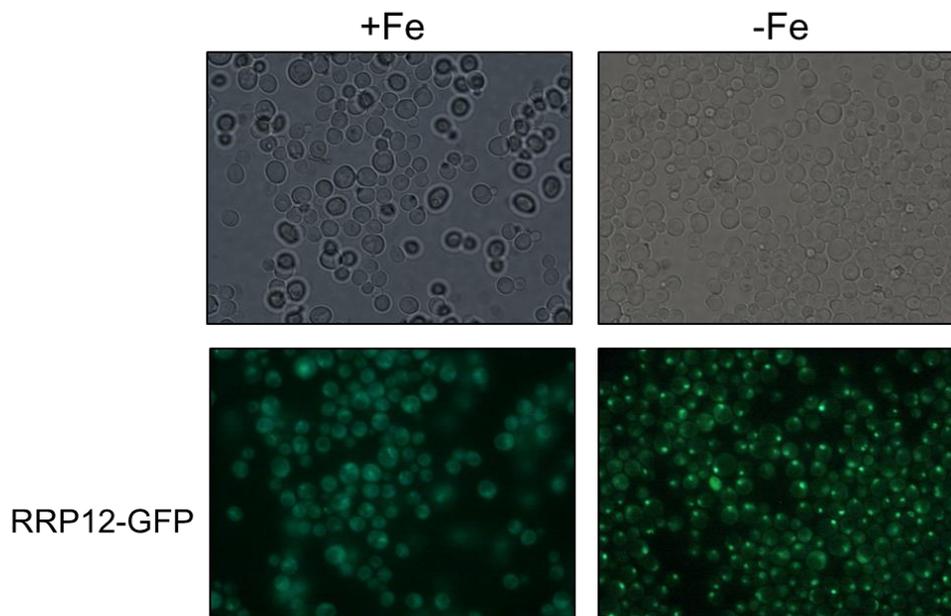


**Figura C1-13. La traducción de *GCN4* se activa a etapas prolongadas de la deficiencia de hierro como consecuencia de la inactivación de la ruta TOR.** Células silvestres (W303) se crecieron en SC (+Fe), SC con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe) durante 3 y 6 horas a 30  $^{\circ}$ C. Tras realizar el fraccionamiento de polirribosomas, se extrajo el RNA de las diferentes fracciones y se determinó mediante RT-qPCR la cantidad de mensajero *GCN4* asociada a cada fracción. En

la gráfica se representa el porcentaje de *GCN4* asociada a cada fracción respecto a su cantidad total de mRNA.

#### 1.14. La proteína Rrp12 se localiza en el nucleolo en condiciones de deficiencia de hierro severa.

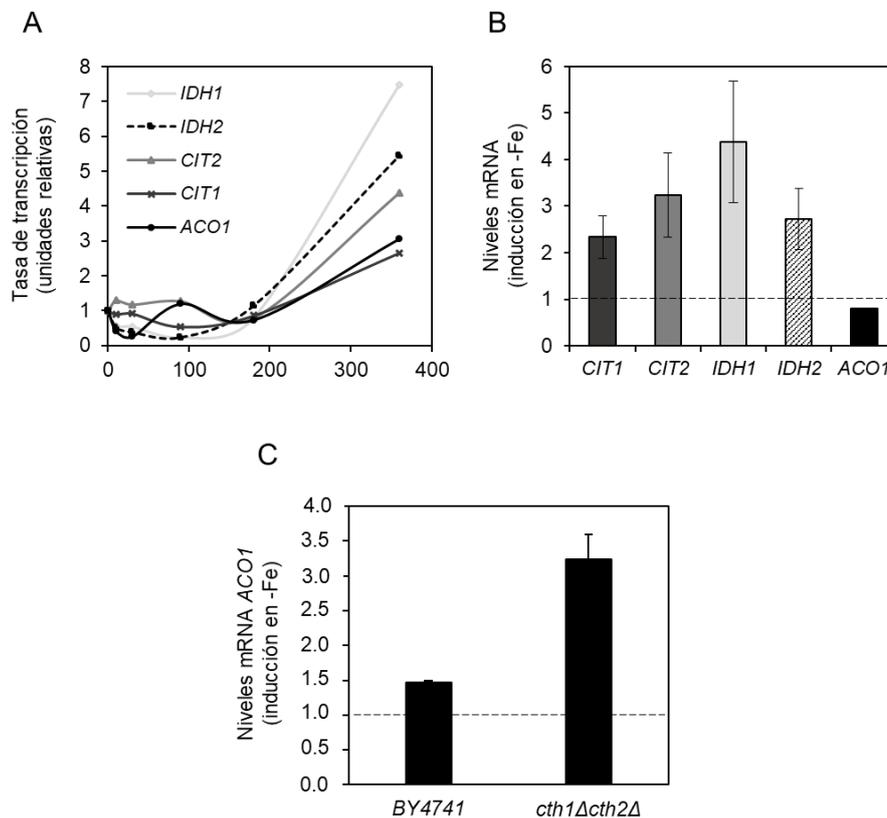
Rrp12 es una proteína que se requiere para la exportación de las subunidades ribosómicas. Se ha descrito su localización nucleolar en respuesta a estrés nutricional como consecuencia de la inactivación de la ruta TOR (Vanrobays et al., 2008). Hemos determinado la localización celular de la proteína Rrp12 etiquetada con el epítipo GFP en condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro. Como se observa en la imagen, en condiciones normales la proteína presenta una localización mayoritariamente citoplasmática. Sin embargo, en condiciones de deficiencia de hierro severas tras 9 horas de crecimiento la proteína Rrp12 queda atrapada en el nucleolo. Estos datos apoyan que la deficiencia de hierro severa provoca la inactivación de la ruta TOR en las células.



**Figura C1-14.** La proteína ribosómica Rrp12 presenta localización nucleolar en etapas prolongadas de deficiencia de hierro. Localización subcelular de la proteína Rrp12-GFP en células crecidas en SC (+Fe) y SC con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe) durante 9 horas a 30  $^{\circ}$ C.

### 1.15. La ruta retrógrada mitocondrial (RTG) se activa en condiciones de deficiencia de hierro severas.

La activación de la ruta retrógrada mitocondrial que conecta el núcleo y la mitocondria es otra de las consecuencias de la inactivación de la ruta TOR. Los datos de transcripción obtenidos por el *Genomic Run On* muestran una activación en la tasa de transcripción de los genes implicados en esta ruta *IDH1*, *IDH2*, *CIT1*, *CIT2* y *ACO1* después de 3 horas de crecimiento en deficiencia de hierro, cuando la limitación de hierro comienza a ser severa (figura C1-15 panel A). Este aumento en la tasa de transcripción de los genes se ve reflejada en el aumento de la cantidad de mRNA de estos genes, excepto para *ACO1* (figura C1-15 panel B).



**Figura C1-15. Activación transcripcional de la ruta retrógrada en respuesta a deficiencia de hierro.** **A.** Representación de la tasa de transcripción de los genes implicados en la ruta retrógrada obtenidos a partir del *Genomic Run On*. **B.** Células silvestres (W303) se crecieron en SC con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe) durante 6 horas a 30  $^{\circ}$ C y se recogieron alícuotas a diferentes tiempos. El RNA extraído de las muestras se analizó por RT-qPCR utilizando oligonucleótidos para determinar los niveles de los mRNAs que se muestran en la gráfica

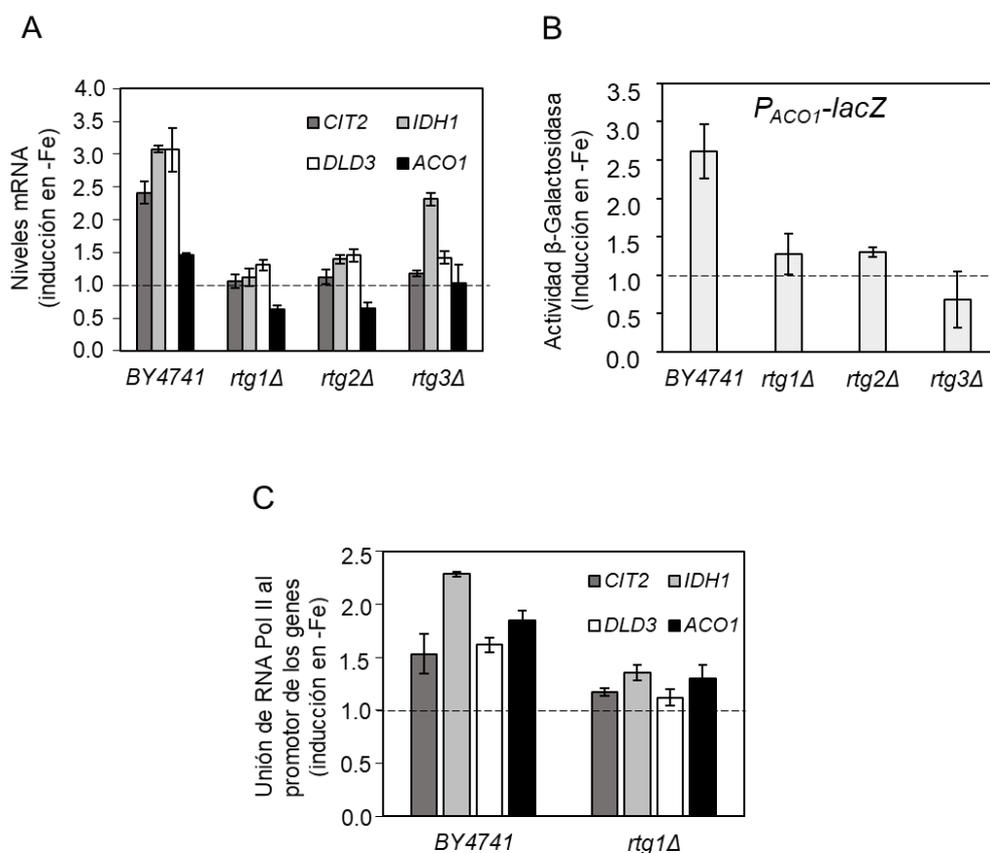
normalizados frente a los niveles de *ACT1*. C. Células silvestres (BY4741) y *cth1Δcth2Δ* se crecieron en SC (+Fe) y SC con 100 μM de BPS (-Fe) durante 9 horas a 30 °C. El RNA extraído de las muestras se analizó por RT-qPCR utilizando oligonucleótidos para determinar los niveles de *ACO1* normalizados frente a los niveles de *ACT1*.

En el caso de *ACO1*, no se observa un aumento en su cantidad de mRNA pese al incremento de su transcripción. Puesto que *ACO1* es uno de los mRNAs dianas de Cth1 y Cth2 (Puig et al., 2005; Puig et al., 2008), decidimos analizar si en ausencia de Cth2 se observa el incremento en la cantidad de mRNA *ACO1*. Para ello se determinó la inducción de *ACO1* en una cepa silvestre y el doble mutante *cth1Δcth2Δ* en condiciones de deficiencia de hierro. Como se puede observar en la figura C1-15 panel C, la delección de *CTH1* y *CTH2* permite el aumento en la cantidad de mRNA de *ACO1* ya que se elimina su regulación postranscripcional. Estos resultados apoyan la inactivación de la ruta TOR en condiciones de deficiencia de hierro severa y la consecuente activación transcripcional de la vía RTG.

#### **1.16. La activación transcripcional de la ruta retrógrada en deficiencia de hierro depende de los factores transcripcionales Rtg1 y Rtg3.**

Para estudiar si la activación transcripcional en deficiencia de hierro de los genes RTG depende de los factores transcripcionales Rtg1 y Rtg3 y el activador Rtg2, descritos como principales activadores de la ruta, se determinaron los niveles de mRNAs de los diferentes genes de la ruta en condiciones de deficiencia de hierro en las cepas *rtg1Δ*, *rtg2Δ* y *rtg3Δ* (figura C1-16 panel A). Los resultados muestran como la falta de los activadores transcripcionales elimina la inducción de estos mRNAs en deficiencia de hierro. Para estudiar la dependencia de estos factores en la activación transcripcional de *ACO1*, se realizaron experimentos de actividad β-galactosidasa con el promotor de *ACO1* fusionado al gen *lacZ* en las cepas *rtg1Δ*, *rtg2Δ* y *rtg3Δ* para determinar su inducción transcripcional en deficiencia de hierro (figura C1-16 panel B). La falta de inducción en la actividad β-galactosidasa en ausencia de los activadores transcripcionales señala la dependencia de estos factores para activar

la transcripción de *ACO1*. En último lugar, decidimos estudiar el reclutamiento de la RNA polimerasa II a los promotores de estos genes en deficiencia de hierro. Los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina revelan como la deficiencia de hierro promueve la unión de la RNA polimerasa a los promotores de estos genes y como este reclutamiento depende de la presencia de los activadores transcripcionales (figura C1-16 panel C).



**Figura C1-16. Los factores Rtg1 y Rtg3 activan la vía RTG en deficiencia de hierro.** **A.** Células silvestres (BY4741), *rtg1Δ*, *rtg2Δ* y *rtg3Δ* se crecieron en SC (+Fe) y SC con 100 μM de BPS (-Fe) durante 9 horas a 30 °C. El RNA extraído de las muestras se analizó por RT-qPCR utilizando oligonucleótidos para determinar los niveles de los mRNAs que se muestran en la gráfica normalizados frente a los niveles de *ACT1*. **B.** Células silvestres (BY4741), *rtg1Δ*, *rtg2Δ* y *rtg3Δ* transformadas con el plásmido *P<sub>ACO1</sub>-lacZ* se crecieron en SC-ura (+Fe) y SC-ura con 100 μM de BPS (-Fe) durante 9 horas a 30 °C. A continuación, se determinó la

actividad enzimática mediante ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa. **C.** Células silvestres (BY4741) y *rtg1* $\Delta$  se crecieron en SC (+Fe) y SC con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe) durante 6 horas a 30 °C. Se recogieron las células y a partir del extracto proteico se llevó a cabo la inmunoprecipitación de cromatina utilizando un anticuerpo  $\alpha$ -Rpb1 que reconoce la subunidad grande de la RNA polimerasa II. El reclutamiento de la RNA polimerasa II al promotor de los genes que se muestran en la gráfica se determinó mediante RT-PCR usando oligonucleótidos que amplifican la secuencia promotora de estos, normalizando frente al promotor del gen *FUS1*.

# *Capítulo 1*

## *Discusión*



El hierro desempeña un papel crucial en numerosos procesos celulares, muchos de ellos esenciales para el crecimiento y supervivencia de las células, como son la traducción o la síntesis de dNTPs (Kispal et al., 2005; Sanvisens et al., 2011). *S. cerevisiae* ha sido utilizada como organismo modelo para estudiar la respuesta de las células eucariotas a condiciones de deficiencia de hierro. Muchos de los estudios realizados hasta el momento se han basado en el análisis de los niveles de mRNAs y han permitido identificar procesos regulados en estas condiciones. Nuestro estudio de la regulación génica en condiciones de deficiencia de hierro mediante *Genomic Run On* nos permite conocer la tasa de transcripción de los genes, aportando así nuevos datos sobre la contribución que ejerce la transcripción en los cambios de expresión génica durante el crecimiento en condiciones de escasez de hierro.

En este trabajo hemos mostrado cómo el crecimiento de las células no se ve alterado en nuestras condiciones de deficiencia de hierro, al menos durante las primeras 3 horas, a diferencia de lo que ocurre en respuesta a otros estreses como el estrés osmótico o el estrés alcalino (Romero-Santacreu et al., 2009; Canadell et al., 2015). El análisis de la variación de la tasa de transcripción de la RNA polimerasa II revela un descenso en la transcripción global de las células. Este descenso lo hemos visto reflejado en un descenso de los niveles de la RNA polimerasa II elongante en los tiempos más largos de la deficiencia.

A pesar de esta bajada de la tasa de transcripción global, la determinación de la cantidad de mRNA total muestra cómo los niveles se mantienen durante las 3 primeras horas de crecimiento en deficiencia de hierro. Esta observación nos permite plantear una estabilización de los mRNAs a nivel global en estas condiciones como predicen los datos de la constante de degradación obtenidos hasta este punto. Sin embargo, se observa una fuerte disminución en la cantidad de mRNA al alcanzar las 6 horas de deficiencia, sugiriendo que los mecanismos de estabilización no son suficientes para compensar la bajada de transcripción. Estos resultados, junto con el hecho de no obtener señal tras la hibridación de las muestras de cantidad de mRNA a las 6 horas en el experimento de GRO, nos indican que el crecimiento de células en condiciones de deficiencia de hierro provoca grandes cambios en su fisiología.

La clasificación de los genes según su perfil transcripcional y de cantidad de mRNA y la búsqueda de categorías funcionales enriquecidas en los diferentes grupos nos ha permitido conocer procesos que se regulan en respuesta a la deficiencia de hierro. De esta forma, hemos observado la inducción transcripcional, ya descrita, para los genes del regulón de hierro desde los primeros minutos de la respuesta a la limitación de hierro, como consecuencia de la acción de los factores Aft1 y Aft2 (Rutherford et al., 2003). Dentro de esta clasificación, la mayoría de los genes se encuentran en un mismo grupo (grupo 7), que presenta una bajada de transcripción durante el transcurso de la deficiencia de hierro, mientras la cantidad de mRNA se mantiene constante hasta las 3 horas. El comportamiento de este grupo de genes es el que ejerce una mayor contribución al comportamiento global de tasa de transcripción y cantidad de mRNA, y en él se encuentran los genes asociados a la traducción de las células, entre los que encontramos los genes RiBi y RPs. Los datos obtenidos mediante el GRO sugieren la estabilización de estos genes durante las 3 primeras horas de deficiencia, al igual que ocurre con la estabilización global de los mRNAs. De forma experimental, se ha confirmado la estabilización de los genes que codifican para las proteínas ribosómicas a las 3 horas de crecimiento en deficiencia de hierro. Para corroborar si la estabilización de este grupo es un reflejo de la estabilización global de los mRNAs sería necesario realizar ensayos para comparar la vida media global de los mRNAs en condiciones de escasez de hierro frente a condiciones normales.

Nuestros datos muestran que la deficiencia de hierro severa provoca la inactivación de la ruta TOR y esto desencadena la regulación transcripcional y traduccional de numerosos procesos celulares. La prueba más evidente de esta inactivación es el aumento de la quinasa Sch9 en su estado hipofosforilado a medida que progresa la deficiencia de hierro, puesto que Sch9 es una diana directa del complejo TORC1 (Urban et al., 2009). La bajada de transcripción que experimentan los genes RiBi y RPs sugiere que ambos grupos podrían regularse a nivel transcripcional a través de las proteínas Dot6/Tod6 y Stb3, que cambian su estado de fosforilación y reclutan al complejo RPD3L, inhibiendo la transcripción como consecuencia de su regulación por la ruta TOR. La subida en los niveles de los

mRNAs de ambos grupos en ausencia de estas proteínas y la falta de fosforilación de Dot6 cuando la deficiencia de hierro es más drástica apoyan nuestra hipótesis en la que la inactivación de la ruta TOR favorece la represión transcripcional de estos grupos de genes.

En esta levadura, más del 80% de la maquinaria transcripcional está dedicada a la síntesis de los componentes ribosómicos: las proteínas ribosómicas transcritas por la RNA polimerasa II, el rRNA por la RNA polimerasa I y el rRNA 5S y tRNAs transcritos por la polimerasa III. Por ello las células han desarrollado su regulación coordinada mediante la ruta TOR. En nuestro caso, la inactivación de la ruta TOR en condiciones de deficiencia de hierro severa también provoca la inhibición de las RNA polimerasas I y III. Esto se ha demostrado a través de diferentes resultados, entre ellos la bajada en las cantidades de sus transcritos en condiciones de limitación de hierro, y el control de sus proteínas reguladoras Rrn3 y Maf1. En la regulación de la RNA polimerasa I hemos demostrado su bajada en la actividad transcripcional tras 6 horas de crecimiento en deficiencia de hierro, lo cual provoca una disminución de los rRNAs. Este descenso en su actividad en condiciones severas de deficiencia de hierro es debido a la disminución de su proteína activadora Rrn3, cuya degradación se ha descrito como consecuencia de la inactivación de la ruta TOR (Philippi et al., 2010). Además de esta regulación caracterizada en deficiencia de hierro, los rRNAs también podrían regularse a nivel postranscripcional, ya que se ha demostrado la participación de la ruta TOR en el procesamiento del pre-rRNA (Kos-Braun et al., 2017). Para la RNA polimerasa III, hemos descrito el descenso de algunos tRNAs durante el transcurso de la deficiencia de hierro, junto a su inhibición a través de la proteína represora Maf1. La fosforilación de Maf1 desaparece a medida que avanza la deficiencia de hierro debido a la inactivación de la ruta TOR, permitiendo ejercer su función represora sobre la RNA polimerasa III. Por otra parte, tenemos que destacar la bajada en los niveles de proteína de ambas RNA polimerasas cuando la deficiencia de hierro es severa. Este descenso en la cantidad de las RNA polimerasas, no descrito para otras condiciones en las que se produce la inactivación de la ruta TOR, posiblemente se

deba a la bajada global de transcripción y traducción que se da en nuestras condiciones de limitación de hierro.

La regulación de la traducción por la ruta TOR no se da únicamente a través del control de la síntesis de los componentes ribosómicos. La fosforilación del factor de inicio de la traducción eIF2 $\alpha$  por la quinasa Gcn2 en condiciones desfavorables provoca una represión de la traducción a nivel global (Dong et al., 2000). Por un lado, en nuestras condiciones hemos observado un aumento de la fosforilación de eIF2 $\alpha$  a medida que progresa la deficiencia de hierro. Por otro lado, los perfiles de polirribosomas nos han permitido observar cierta disminución de la traducción global cuando la deficiencia de hierro es moderada, que se hace más notable a las 6 horas de crecimiento cuando la deficiencia es más severa. Estos resultados junto con la localización nucleolar de proteína Rrp12 implicada en la exportación de los ribosomas evidencian la regulación de la traducción como consecuencia de la inactivación de la ruta TOR en nuestras condiciones de limitación severa de hierro. Al mismo tiempo, hemos observado cómo la fosforilación de eIF2 $\alpha$  en deficiencia de hierro favorece la traducción del factor transcripcional Gcn4. Este aumento en la traducción del mRNA *GCN4* se ha descrito cuando las células crecen en condiciones desfavorables, como la falta de aminoácidos activándose la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos (Hinnebusch, 2005). Recientemente se ha descrito cómo Gcn4 ejerce un efecto positivo en la longevidad de las células, actuando como represor de la síntesis de proteínas. A través de ensayos de inmunoprecipitación de cromatina se ha mostrado la unión de Gcn4 tanto a los genes que se activan a nivel transcripcional, como a los genes que codifican para las proteínas ribosómicas cuya transcripción se reprime (Mittal et al., 2017). Esta última función descrita para el factor Gcn4 podría ser su papel principal durante la respuesta a deficiencia de hierro contribuyendo a la disminución de la síntesis de proteínas.

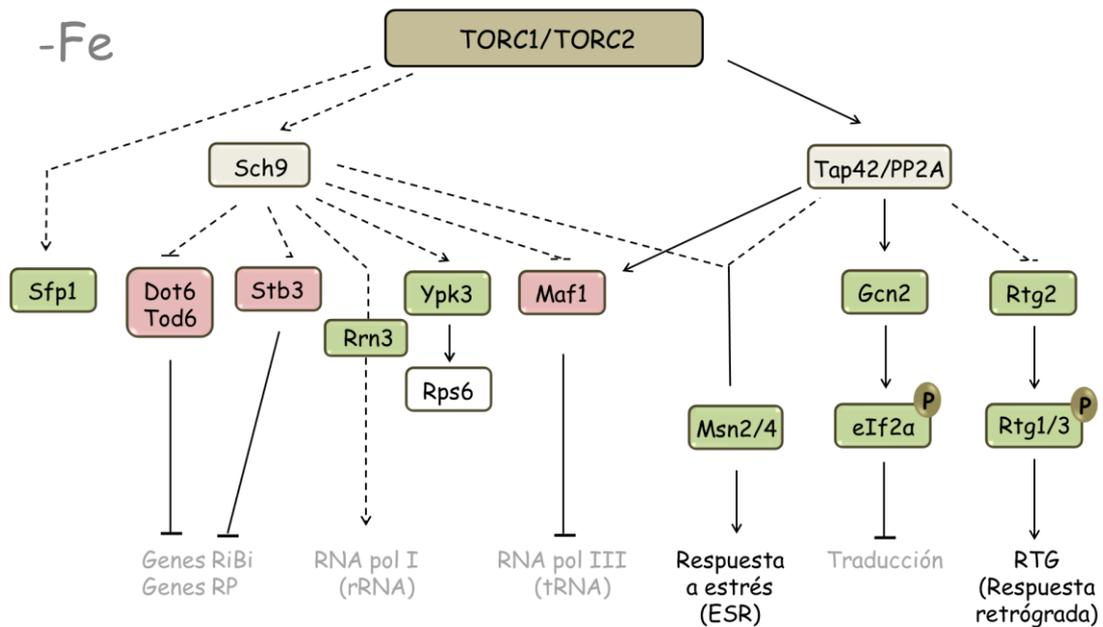
Nuestros resultados evidencian la represión de genes ribosómicos, genes implicados en el metabolismo del RNA y en la síntesis de proteínas. La represión de estos grupos de genes es característica de la respuesta general de estrés que además engloba la activación transcripcional de unos 300 genes implicados en proteólisis,

metabolismo de carbohidratos, en reacciones redox, o en la reparación del DNA (Gasch, 2007). Estos genes, inducidos como consecuencia de la respuesta a estrés, muestran una tendencia a aumentar ligeramente su transcripción en deficiencia de hierro. Probablemente, este ligero aumento de transcripción acompañado de la estabilización global de los mRNAs contribuye a aumentar la expresión de los genes implicados en la respuesta a estrés. Para comprobar si los factores transcripcionales Msn2/4, Hsf1 o Gis1 asociados a la activación de estos genes participan en la respuesta a deficiencia de hierro, como consecuencia de su regulación por la ruta TOR, serían necesarios estudios de expresión génica o ensayos de localización de estos factores en nuestras condiciones.

Entre los genes que se inducen en deficiencia de hierro a nivel transcripcional encontramos los genes *CIT1*, *CIT2*, *ACO1*, *IDH1* e *IDH2* regulados por los factores Rtg1/Rtg3. Esta activación transcripcional es consecuencia de la regulación de la respuesta retrógrada a través de la ruta TOR. En células crecidas bajo condiciones respiratorias estos genes están regulados por el factor transcripcional Hap1. Sin embargo, la disfunción mitocondrial, la falta de DNA mitocondrial o el bloqueo del ciclo a nivel de la succinato deshidrogenasa promueven la activación de estos genes a través de los factores Rtg1/Rtg3 (Liu et al., 2006). El crecimiento de las células en deficiencia de hierro conlleva una remodelación metabólica que implica la disminución de la respiración, en parte dirigida por las proteínas Cth1 y Cth2 que degradan mRNAs que codifican para proteínas implicadas en respiración (Puig et al., 2005; Puig et al., 2008) y para las proteínas del complejo succinato deshidrogenasa. Por este motivo, es posible que tanto la bajada en la respiración de las células, como el bloqueo del ciclo de Krebs a nivel de la succinato deshidrogenasa contribuyan a que se produzca la activación de la ruta retrógrada durante en condiciones de escasez de hierro. Los cambios metabólicos que provoca la activación de la ruta retrógrada permiten mantener los niveles necesarios de  $\alpha$ -cetoglutarato para la síntesis de glutamato y suplir así la demanda de nitrógeno que requieren numerosos procesos biosintéticos.

En resumen, la inactivación de la ruta TOR en condiciones de deficiencia de hierro severa produce la activación de la respuesta retrógrada que conecta en

núcleo y la mitocondria, y se produce una ligera inducción de los genes implicados en la ESR. Por otro lado, la inactivación de esta ruta de señalización en nuestras condiciones provoca la inhibición de la traducción a través de la represión transcripcional de los genes necesarios para la formación de los ribosomas, RPs, RiBis y rRNAs, lo cual implica una regulación coordinada de las tres RNAs polimerasas. Además de ello, la fosforilación del factor eIF2 $\alpha$  a medida que avanza la deficiencia de hierro impide el inicio de la traducción, favoreciendo la inhibición de la traducción a nivel global.



**Figura D1-1. Mecanismos regulados a través de la inactivación de la ruta TOR en condiciones de deficiencia de hierro.** En verde se muestran las proteínas que tienen un efecto positivo en la regulación y en rojo las proteínas con función represora.





# *Capítulo 2*

## *Resultados*



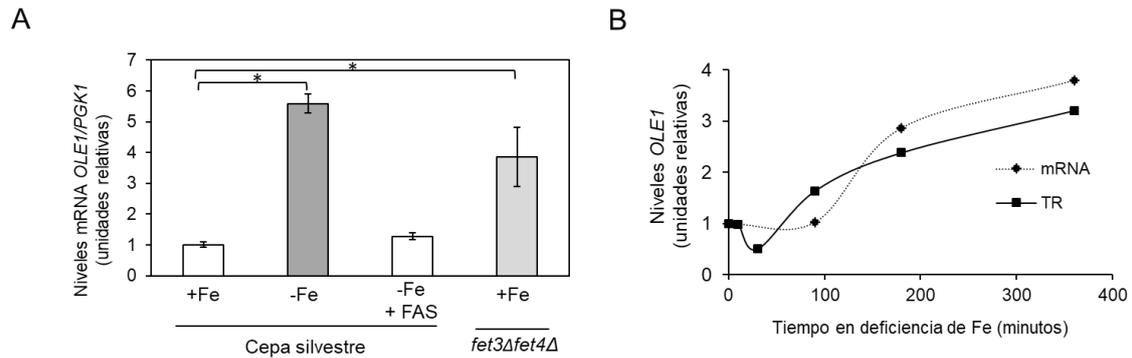
## Capítulo 2. Regulación de la desaturasa de ácidos grasos *OLE1* en respuesta a deficiencia de hierro

Los ácidos grasos insaturados son componentes esenciales de las membranas celulares, que contribuyen a sus propiedades biofísicas modificando su permeabilidad y su fluidez. En *Saccharomyces cerevisiae*, Ole1 es la proteína encargada de llevar a cabo la biosíntesis de los ácidos grasos insaturados, siendo un enzima esencial para las células cuya actividad es dependiente de las concentraciones de hierro y oxígeno. Hasta el momento se ha descrito la regulación de la expresión de *OLE1* en respuesta a cambios en temperatura y niveles de oxígeno y ácidos grasos insaturados. En este capítulo se ha estudiado la regulación en la expresión de *OLE1* en condiciones de deficiencia de hierro y los mecanismos implicados en esta regulación.

### 2.1. *OLE1* se induce a nivel transcripcional en deficiencia de hierro.

La expresión del gen *OLE1* se regula en función de la disponibilidad de hierro. En concreto, se ha descrito un aumento en los niveles de mRNA de *OLE1* en condiciones de déficit de hierro inducidas en presencia de agentes quelantes (Vasconcelles et al., 2001; Puig, et al., 2005; Shakoury-Elizeh et al., 2010). Para averiguar si este aumento de *OLE1* es una consecuencia específica del déficit de hierro en el medio y no un efecto secundario del agente quelante, se determinaron los niveles de mRNA *OLE1* en una cepa *fet3Δfet4Δ* deficiente en la adquisición de hierro extracelular. Los resultados muestran como la cepa *fet3Δfet4Δ* crecida en condiciones normales incrementa los niveles de *OLE1* en comparación con la cepa silvestre crecida en el mismo medio (figura C2-1 panel A). También se determinaron los niveles de *OLE1* en un medio con el agente quelante de hierro BPS, suplementado con exceso de hierro (300 μM de sulfato amónico ferroso) (-Fe +FAS). En este caso, los niveles de mensajero obtenidos son similares a los que presentan las cepas crecidas en condiciones normales. Ambos resultados indican que la inducción de *OLE1* es consecuencia de la disminución del hierro en las células.

La determinación de la tasa de transcripción de los genes mediante *Genomic Run On* en presencia del quelante de hierro BPS permitió averiguar que el aumento de los niveles de mRNA *OLE1* se debe a una activación de su transcripción (figura C2-1 panel B).

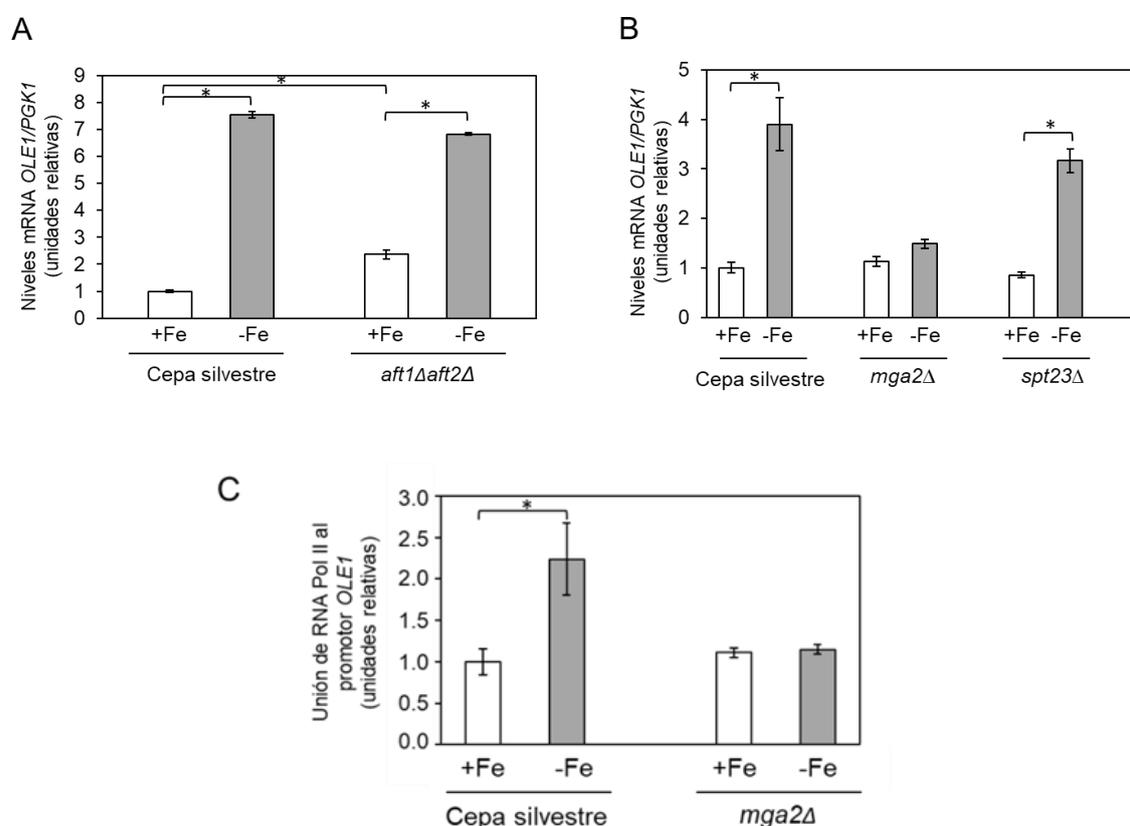


**Figura C2-1. Regulación de los niveles de mRNA *OLE1* en deficiencia de hierro.** **A.** Células silvestres se crecieron en medio SC (+Fe), SC con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe) y SC con 100  $\mu$ M de BPS con 300  $\mu$ M de FAS (-Fe +FAS). Células *fet3Δfet4Δ* se crecieron en medio SC (+Fe). Todos los cultivos se incubaron a 30 °C durante 6 horas. El RNA extraído de las muestras se analizó por RT-PCR utilizando oligonucleótidos para medir los niveles de *OLE1* normalizados frente a los niveles de *PGK1*. El asterisco (\*) muestra diferencias estadísticamente significativas ( $p$ -valor < 0.05). **B.** Niveles de mRNA y tasa de transcripción (TR) de *OLE1* durante la deficiencia de hierro obtenidos a partir de RT-PCR y *Genomic Run On*, respectivamente.

## 2.2. Identificación de Mga2 como responsable de la activación transcripcional de *OLE1* en déficit de hierro.

La respuesta transcripcional a la deficiencia de hierro está dirigida por los factores transcripcionales Aft1 y Aft2 (Sanvisens et al., 2011; Philpott et al., 2008). Para estudiar si estos factores son los responsables de la inducción de la transcripción de *OLE1*, medimos los niveles de mRNA *OLE1* en una cepa silvestre y una cepa *aft1Δaft2Δ* en condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro. Como se

observa en la gráfica, la cepa *aft1Δaft2Δ* aumenta los niveles de *OLE1* en ausencia de hierro igual que la cepa silvestre (figura C2-2 panel A). Por otra parte, la cepa *aft1Δaft2Δ* en condiciones normales presenta un aumento significativo en los niveles de *OLE1* comparado con la cepa silvestre. Este resultado es consistente con la deficiencia de hierro genética que presenta este mutante. Estos resultados permiten descartar la participación Aft1 y Aft2 en la activación transcripcional de *OLE1*.



**Figura C2-2. La inducción de *OLE1* en deficiencia de hierro depende de Mga2.** **A.** Células silvestre y *aft1Δaft2Δ* se crecieron en SC (+Fe) y SC con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe) durante 6 horas. La cantidad de mRNA de *OLE1* se determinó mediante RT-PCR, normalizando frente a los niveles de *PGK1*. **B.** Células silvestre, *mga2Δ* y *spt23Δ* se crecieron en SC (+Fe) y SC con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe) durante 6 horas. Los niveles de *OLE1* se determinaron como en el apartado A. **C.** Células silvestre y *mga2Δ* se crecieron en SC (+Fe) y SC con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe) durante 6 horas. Se recogieron las células y a partir del extracto proteico se llevó a cabo la inmunoprecipitación de cromatina utilizando un anticuerpo  $\alpha$ -Rpb1 que reconoce

la subunidad grande de la RNA polimerasa II. El reclutamiento de la RNA polimerasa II al promotor *OLE1* se determinó mediante RT-PCR usando oligonucleótidos que amplifican la secuencia promotora de *OLE1* normalizando frente al promotor del gen *FUS1*. El asterisco (\*) muestra diferencias estadísticamente significativas ( $p$ -valor  $< 0.05$ ).

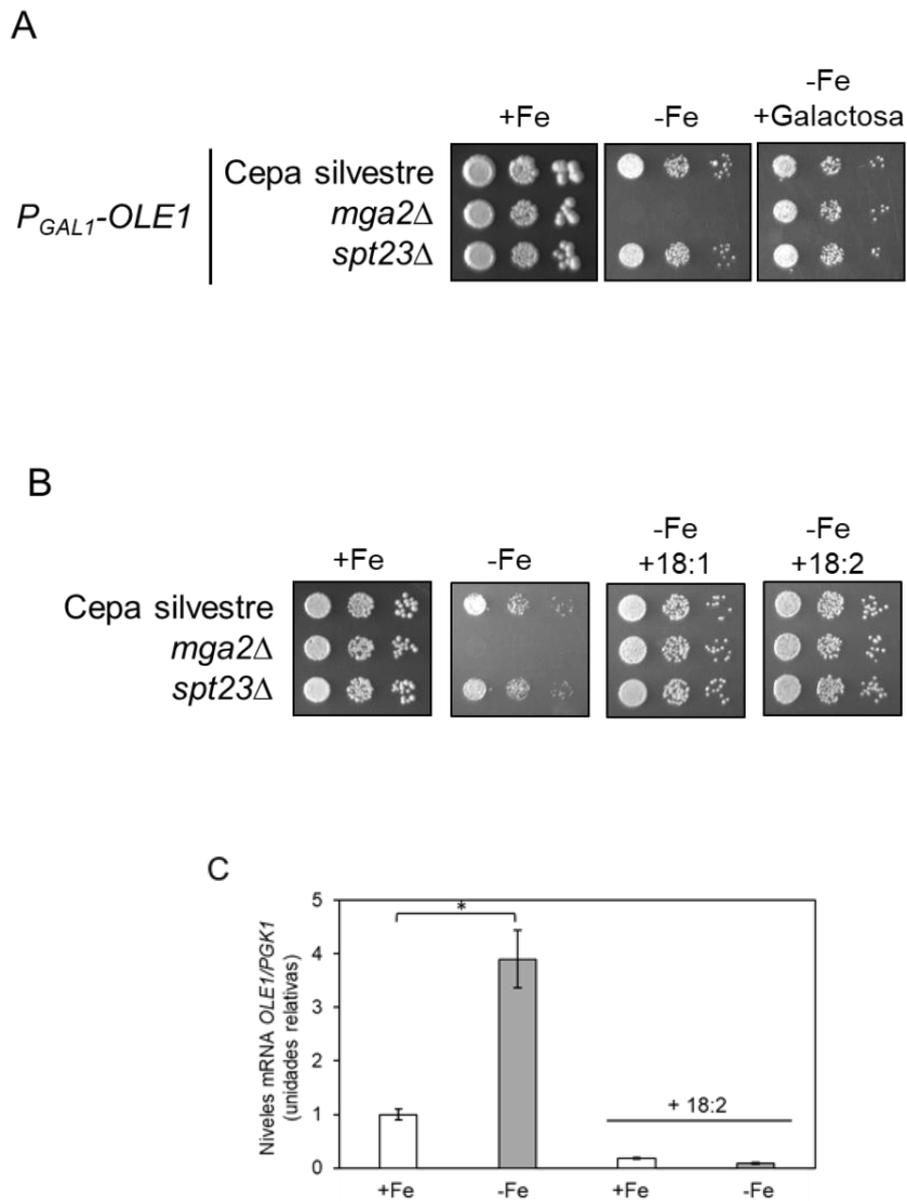
En respuesta a otras condiciones de estrés como hipoxia, bajada de temperatura o disminución de ácidos grasos insaturados también se ha descrito un aumento en los niveles de *OLE1*. La causa de esta activación transcripcional es la liberación de los factores transcripcionales Spt23 y Mga2 de la membrana del retículo endoplásmico (RE) (Nakagawa et al., 2002; Hoppe et al., 2000; Jiang et al., 2002). Para averiguar si estos factores están implicados en la regulación de *OLE1* en condiciones de baja disponibilidad de hierro se determinaron los niveles de *OLE1* en las cepas *mga2Δ* y *spt23Δ*, en presencia y ausencia de hierro. La cepa *mga2Δ* muestra un defecto en la inducción de *OLE1* al pasar a condiciones de deficiencia, mientras que en condiciones de suficiencia mantiene los mismos niveles que la cepa silvestre. La cepa *spt23Δ* sigue activando *OLE1* en ausencia de hierro, pero alcanzando unos niveles de mRNA ligeramente más bajos que los de la cepa silvestre (figura C2-2 panel B). Estos resultados identifican a Mga2 como principal responsable de la activación transcripcional de *OLE1* en deficiencia de hierro.

Con el fin de indagar en el papel que ejerce Mga2 en la activación de la transcripción de *OLE1*, se determinó el reclutamiento de la RNA polimerasa II (RNA pol II) a la región promotora del gen. Se realizaron experimentos de inmunoprecipitación de cromatina en una cepa silvestre y en el mutante *mga2Δ* crecidos en condiciones de suficiencia y limitación de hierro. La cepa silvestre muestra un aumento en la unión de la RNA pol II al promotor de *OLE1* tras 6 horas de crecimiento en deficiencia de hierro. Por el contrario, la cepa que carece del factor transcripcional Mga2 no incrementa el reclutamiento de la RNA pol II a la región promotora en el medio con limitación de hierro (figura C2-2 panel C). Estos resultados indican que Mga2 activa la transcripción de *OLE1* promoviendo el reclutamiento de la RNA polimerasa II a su promotor.

### 2.3. La activación de *OLE1* por *Mga2* es esencial para el crecimiento en deficiencia de hierro.

Estudios globales de fenotipado han mostrado como el gen *MGA2* es necesario para crecimiento de las células en condiciones de limitación de hierro (Samanfar et al., 2013). Para testar si este defecto de crecimiento es debido a la falta de activación de *OLE1*, se realizaron ensayos de crecimiento utilizando la cepa silvestre, *mga2Δ* y *spt23Δ* transformadas con el plásmido *P<sub>GAL1</sub>-OLE1* que nos permite inducir la expresión del gen en presencia de galactosa. Por un lado, la cepa *spt23Δ* muestra un crecimiento similar a la cepa silvestre en ausencia de hierro, lo cual corrobora su papel no esencial en la activación de *OLE1* (figura C2-3 panel A). Por otro lado, el defecto de crecimiento descrito para el mutante *mga2Δ* en deficiencia de hierro revierte al sobreexpresar *OLE1* en presencia de galactosa. Este hecho demuestra que la inducción de *OLE1* a través de *Mga2* es esencial para que las células sobrevivan en medios con déficit de hierro.

A pesar de que el doble mutante *mga2Δspt23Δ* y el mutante *ole1Δ* no son viables en condiciones normales, se ha logrado rescatar su crecimiento añadiendo ácidos grasos insaturados al medio (Zhang et al., 1999; Chellappa et al., 2001). A partir de estas observaciones decidimos testar si el defecto de crecimiento de *mga2Δ* en ausencia de hierro se recupera suplementando el medio con 1 mM de ácido linoleico (C18:2) o 1 mM de ácido oleico (C18:1). El ensayo demuestra que la adición de ácidos grasos insaturados permite el crecimiento de *mga2Δ* en estas condiciones (figura C2-3 panel B). Este rescate de crecimiento de *mga2Δ* sugiere que la presencia de ácidos grasos insaturados en el medio podría eliminar la regulación de *OLE1* debida al déficit de hierro. Para averiguar qué ocurre en estas condiciones, se midieron los niveles de mRNA *OLE1* en condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro, con presencia y ausencia de ácidos grasos insaturados en el medio. Como se observa en la figura C2-3 panel C, la adición de ácidos grasos insaturados disminuye la expresión de *OLE1*, eliminando así la regulación que se produce debido a la falta de hierro en el medio.



**Figura C2-3. La inducción de *OLE1* es esencial para el crecimiento en deficiencia de hierro. A.** Células silvestre,  $mga2\Delta$  y  $spt23\Delta$  transformadas con el plásmido  $P_{GAL1-OLE1}$  se crecieron en SC-ura durante toda la noche, al día siguiente se realizaron los ensayos de crecimiento en medio sólido según se describe en material y métodos, en medios en SC-ura (+Fe), SC-ura con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe), SC-ura 2% de galactosa con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe + Galactosa) para inducir la expresión de *OLE1*. Las placas se crecieron a 30°C durante al menos 3 días. **B.** Células silvestre,  $mga2\Delta$  y  $spt23\Delta$  se crecieron en medio Sc durante toda la noche, al día siguiente se realizaron los ensayos de crecimiento en medio SC (+Fe), SC con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe), SC con 100  $\mu$ M de BPS y 1 mM de ácido oleico (-Fe +18:1) o SC con 100  $\mu$ M de

BPS y 1 mM de ácido linoleico (-Fe +18:2). C. Células silvestre se crecieron en SC (+Fe) y SC con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe) en presencia y ausencia de ácidos grasos insaturados (18:2). Los niveles de *OLE1* se determinaron por RT-PCR como en apartados anteriores. El asterisco (\*) muestra diferencias estadísticamente significativas (p-valor < 0.05).

#### **2.4. Mga2 es necesario para mantener los niveles de ácidos grasos insaturados requeridos durante el crecimiento bajo déficit de hierro.**

La complementación de Mga2 en deficiencia de hierro al añadir ácidos grasos insaturados al medio sugiere que la cepa *mga2Δ* podría tener un defecto en la síntesis de éstos debido a la falta de activación de *OLE1*. Por este motivo decidimos determinar la concentración de ácidos grasos, tanto saturados como insaturados, en una cepa silvestre y en un mutante *mga2Δ*. Para ello se crecieron las células en condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro durante 8 horas, tiempo al que se apreciaba el defecto de crecimiento de la cepa *mga2Δ* y en el que ésta se había duplicado al menos dos veces. La determinación de ácidos grasos se llevó a cabo mediante cromatografía de gases, en colaboración con Nicolas Rozès de la Universitat Rovira i Virgili de Tarragona. Los análisis mostraron como la cepa silvestre muestra menor porcentaje de ácidos grasos insaturados frente ácidos grasos saturados en condiciones de limitación de hierro (figura 2-4 panel A). En concreto se produce una disminución de los ácidos palmitoleico (16:1) y oleico (18:1) acumulándose sus precursores: palmítico (16:0) y esteárico (18:0) (figura 2-4 panel B). La misma determinación se llevó a cabo utilizando la cepa *fet3Δfet4Δ* crecida en condiciones normales durante 8 horas. Por un lado, el porcentaje de ácidos grasos insaturados disminuye, igual que ocurre en la cepa silvestre crecida en ausencia de hierro. Por otro lado, se produce una mayor acumulación de los precursores que en la cepa silvestre crecida en las mismas condiciones, y una menor aparición de los ácidos palmitoleico (16:1) y oleico (18:1). Todos estos resultados sugieren que la síntesis de ácidos grasos insaturados decrece durante una deficiencia de hierro nutricional y genética, probablemente debido a la disminución de la actividad catalítica de Ole1 que depende de hierro. La cepa *mga2Δ* mantiene los mismos niveles de ácidos grasos insaturados en condiciones normales,

confirmando que la expresión de *OLE1* no se ve alterada en estas condiciones. Sin embargo, al pasar a deficiencia de hierro el mutante *mga2Δ* alcanza menores niveles de ácidos grasos insaturados que la cepa silvestre, esto sugiere que en este caso la falta de activación de *OLE1* provoca que no se alcancen los niveles de ácidos grasos insaturados necesarios para el crecimiento en estas condiciones.

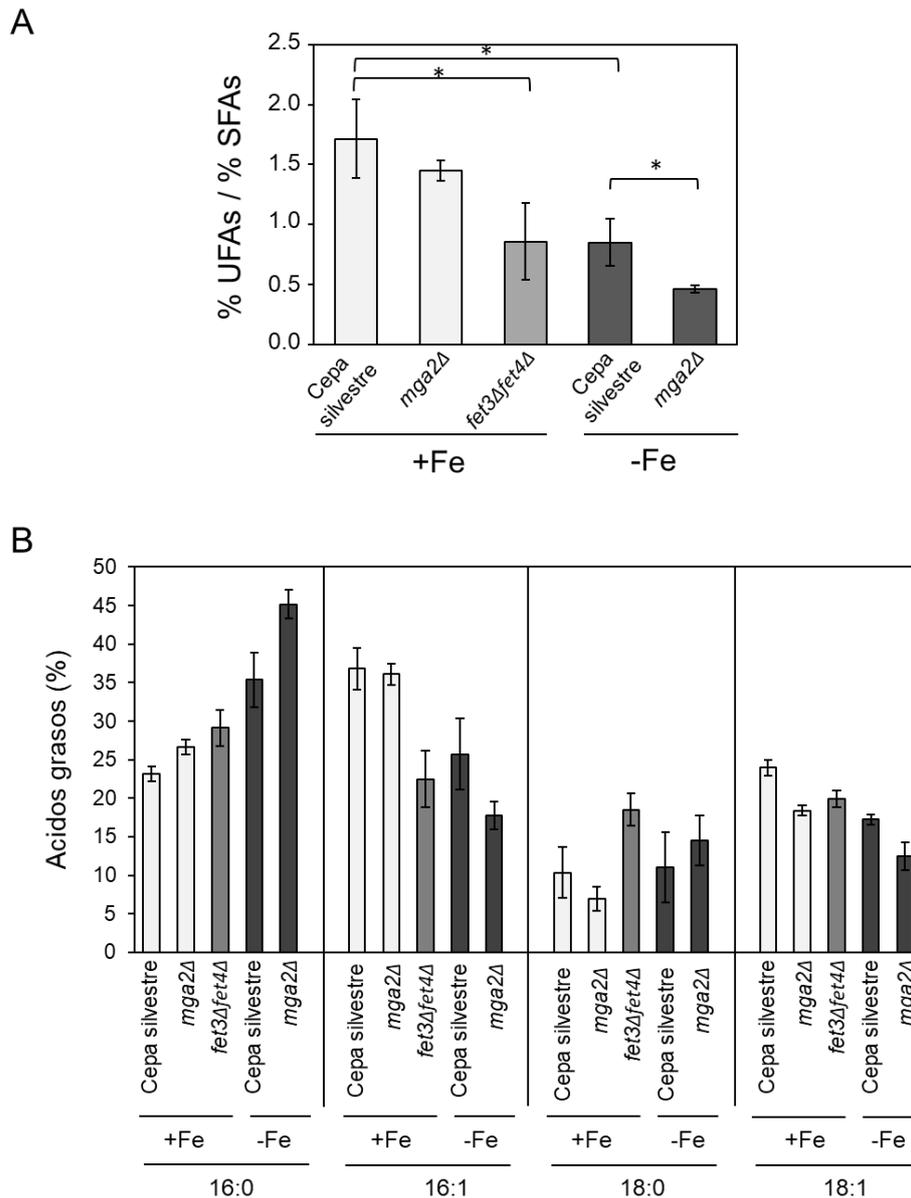


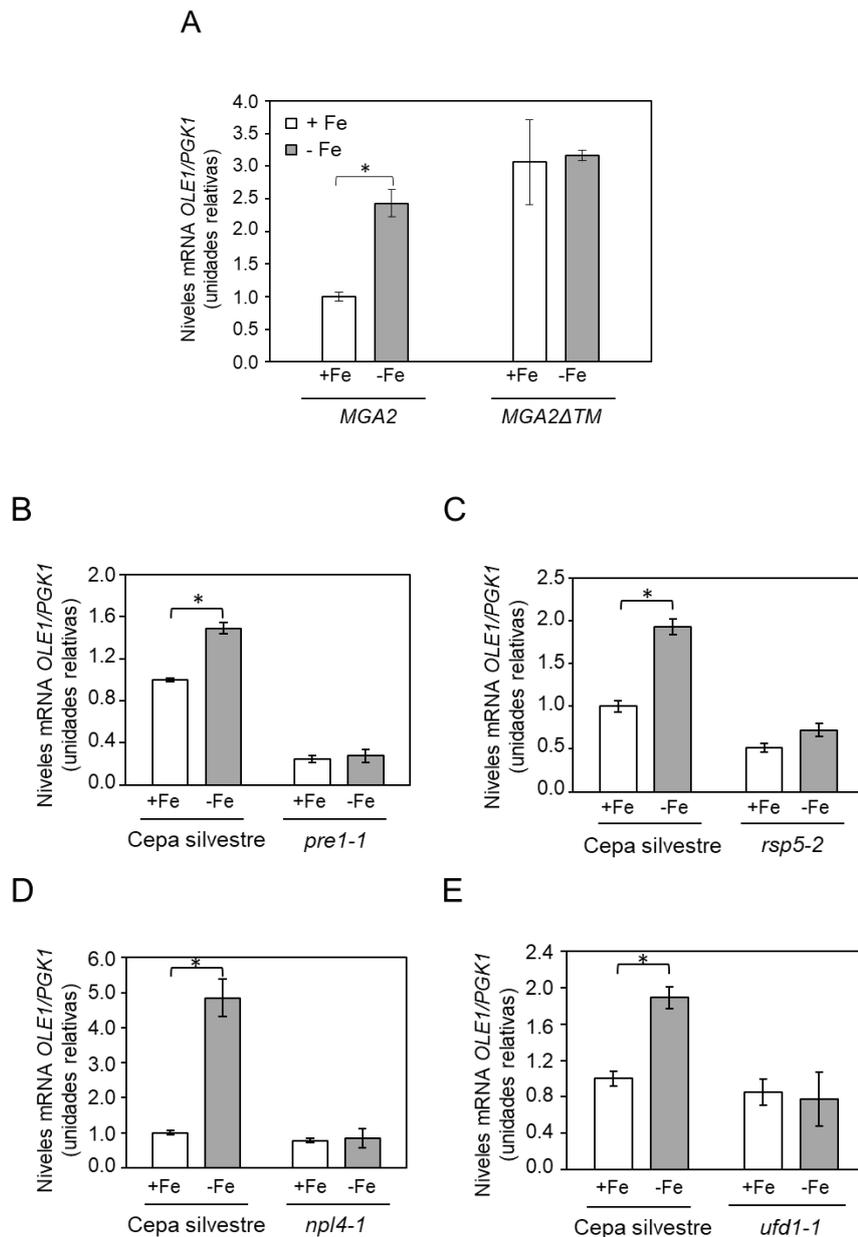
Figura C2-4. La deficiencia de hierro provoca una disminución de los ácidos grasos insaturados. Células silvestres, *fet3Δfet4Δ* y *mga2Δ* se crecieron en medio SC (+Fe) y en SC

con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe) durante 8 horas. Transcurrido este tiempo, se recogieron las células y se determinaron los niveles de ácidos grasos por cromatografía de gases. **A.** Representación de la relación entre el porcentaje de ácidos grasos insaturados (UFAs) y el porcentaje de ácidos grasos saturados (SFAs). El asterisco (\*) muestra diferencias estadísticamente significativas (p-valor < 0.05). **B.** Representación del porcentaje de cada uno de los ácidos grasos (16:0, 16:1, 18:0, 18:1) de cada cepa crecida en las diferentes condiciones (+Fe, -Fe).

### **2.5. La activación de *OLE1* requiere el procesamiento de Mga2 a través de la ubiquitin ligasa Rsp5, el complejo segregasa Cdc48 Npl4/Ufd1 y el proteasoma.**

Mga2 es una proteína que se encuentra anclada a la membrana del retículo endoplásmico a través un segmento transmembrana en su dominio carboxilo terminal. La disminución de ácidos grasos insaturados o la bajada de oxígeno provocan la proteólisis de Mga2 dando lugar a dos fragmentos p90 y p120. El fragmento p90 se libera de la membrana del retículo y entra al núcleo provocando la activación transcripcional de *OLE1*. (Hoppe et al., 2000).

Dado que el procesamiento proteolítico de Mga2 es necesario para la inducción de la expresión de *OLE1* en otros estreses, decidimos estudiar si ocurre lo mismo en condiciones de déficit de hierro. En primer lugar, determinamos los niveles de *OLE1* en una cepa que expresa la proteína Mga2 con su segmento transmembrana delecionado (*MGA2 $\Delta$ TM*) que impide su anclaje en la membrana del retículo. Como se muestra en la figura C2-5 panel A, la expresión de esta forma de Mga2 aumenta los niveles de *OLE1* en condiciones normales en comparación con la cepa que expresa la proteína Mga2 completa. Cabe destacar que las células que expresan *MGA2 $\Delta$ TM* no varían los niveles de *OLE1* en función de la disponibilidad de hierro en el medio (figura C2-5 panel A). Estos resultados sugieren que la deficiencia de hierro podría alterar la composición de la membrana del retículo facilitando la liberación de Mga2 y la consecuente inducción de *OLE1*.



**Figura C2-5. La activación de *OLE1* en deficiencia de hierro requiere la liberación y procesamiento de *Mga2*.** **A.** Células *mga2Δ* transformadas con los plásmidos pMGA2 y pMGA2ΔTM se crecieron en SC-ura (+Fe) y SC-ura con 100 μM de BPS (-Fe) durante 6 horas a 30°C. El RNA extraído de las muestras se analizó por RT-PCR utilizando oligonucleótidos para medir los niveles de *OLE1* normalizados frente a los niveles de *PGK1*. **B-E.** Células silvestres se crecieron en medio SC (+Fe) a temperatura restrictiva (37°C) durante 6 horas. Los mutantes termosensibles *pre1-1*, *rsp5-2*, *npl4-1* y *ufd1-1* se crecieron en SC a 37°C durante una hora, después se adicionó 100 μM de BPS (-Fe) y se incubaron durante 5 horas

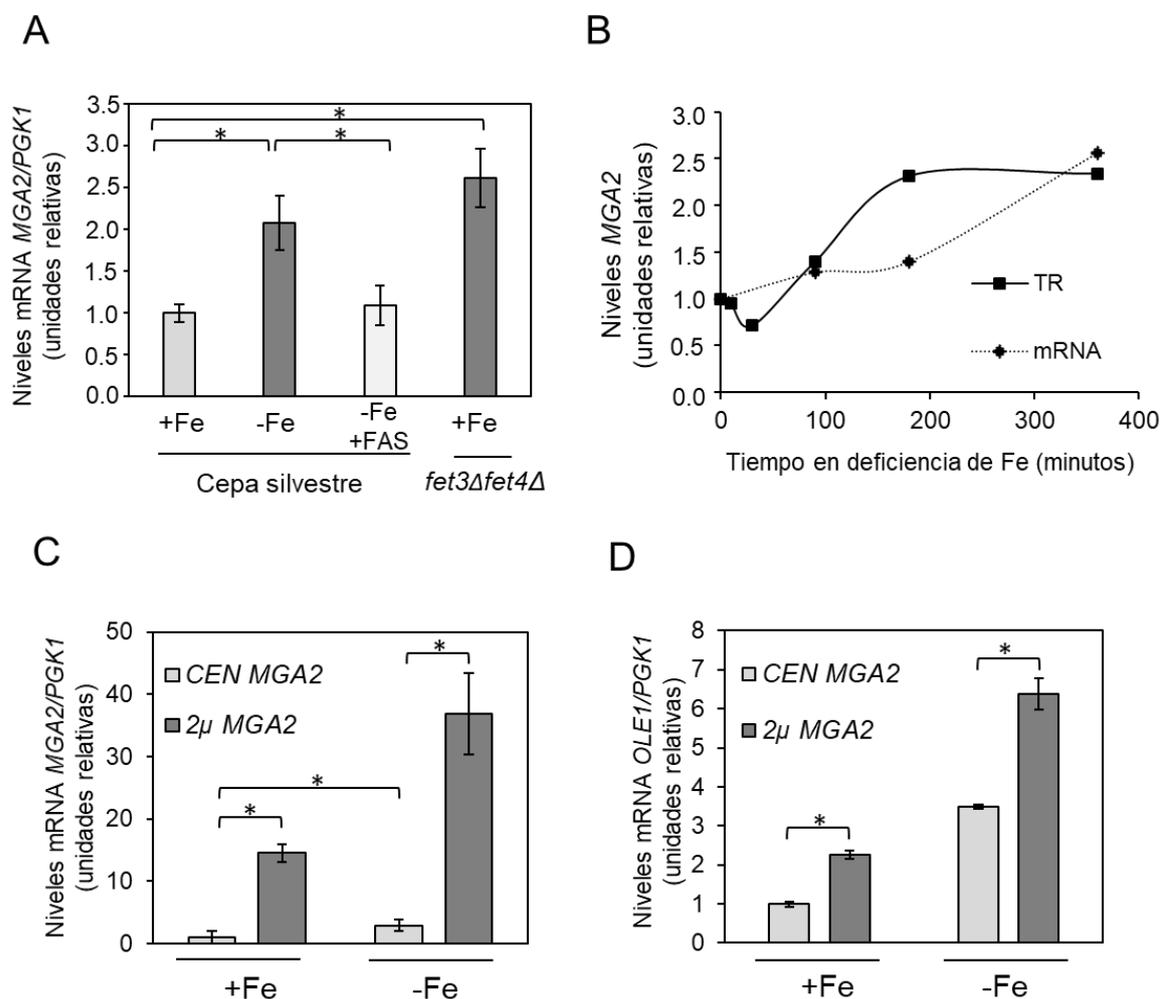
más a 37°C. Los niveles de *OLE1* se determinaron igual que en el apartado anterior. El asterisco (\*) muestra diferencias estadísticamente significativas (p-valor < 0.05).

En el proceso de liberación de Mga2 de la membrana del retículo participan la ubiquitin ligasa Rps5, el complejo segregasa y el proteasoma (Hitchcock et al., 2001; Shcherbik et al., 2007; Shcherbik et al., 2007; Surma et al., 2013). Todas estas proteínas resultan esenciales para las células, por lo que hemos trabajado con mutantes termosensibles para eliminar la funcionalidad de todas ellas. La figura C2-5 (paneles B-E) muestra como todas las cepas silvestres inducen la expresión de *OLE1* en condiciones de deficiencia de hierro a diferencia de lo que ocurre con los mutantes termosensibles del proteasoma *pre1-1*, la ubiquitin ligasa *rsp5-2*, y las proteínas del complejo segregasa *npl4-1* y *ufd1-1*. Estos resultados indican que el procesamiento de Mga2 para activar *OLE1* por deficiencia de hierro es similar al descrito para otras condiciones, siendo necesaria la participación de la ubiquitin ligasa Rsp5, el complejo segregasa y el proteasoma.

## 2.6. Mga2 se activa a nivel transcripcional en deficiencia de hierro.

Decidimos estudiar si los niveles de *MGA2* se regulan en respuesta a deficiencia de hierro, igual que ocurre con el mRNA de *OLE1*. Para ello, se determinaron los niveles de *MGA2* en condiciones de deficiencia de hierro. Tanto las células crecidas en presencia de BPS, como la cepa *fet3Δfet4Δ* incrementan los niveles del mRNA *MGA2* (figura C2-6 panel A). Este incremento no ocurre al suplementar el medio con exceso de hierro (-Fe +FAS). Estos resultados indican que la falta de hierro en el medio provoca un aumento de los niveles del transcrito *MGA2*. El análisis genómico de *GRO* nos ha permitido conocer que el incremento de los niveles de mRNA de *MGA2* durante el transcurso de la deficiencia de hierro se debe a un aumento en su tasa de transcripción (figura C2-6 panel B). Para averiguar si esta inducción tiene relevancia en la expresión de *OLE1* en deficiencia de hierro, decidimos estudiar los niveles del mRNA *OLE1* alterando la expresión de *MGA2*. Para ello, se utilizaron un plásmido centromérico (*CEN-MGA2*) y un plásmido

multicopia ( $2\mu$ -*MGA2*). En primer lugar, se comprobó que la expresión de *MGA2* era superior al expresar *MGA2* con un plásmido multicopia y que la deficiencia de hierro aumentaba los niveles de *MGA2* con ambos plásmidos (figura C2-6 panel C). Tras examinar los niveles de *OLE1* en estas mismas muestras, observamos un incremento del mRNA *OLE1* al aumentar la expresión de *MGA2* con el plásmido multicopia (figura C2-6 panel D). Estos datos confirman que la activación de *MGA2* favorece la expresión de *OLE1*.



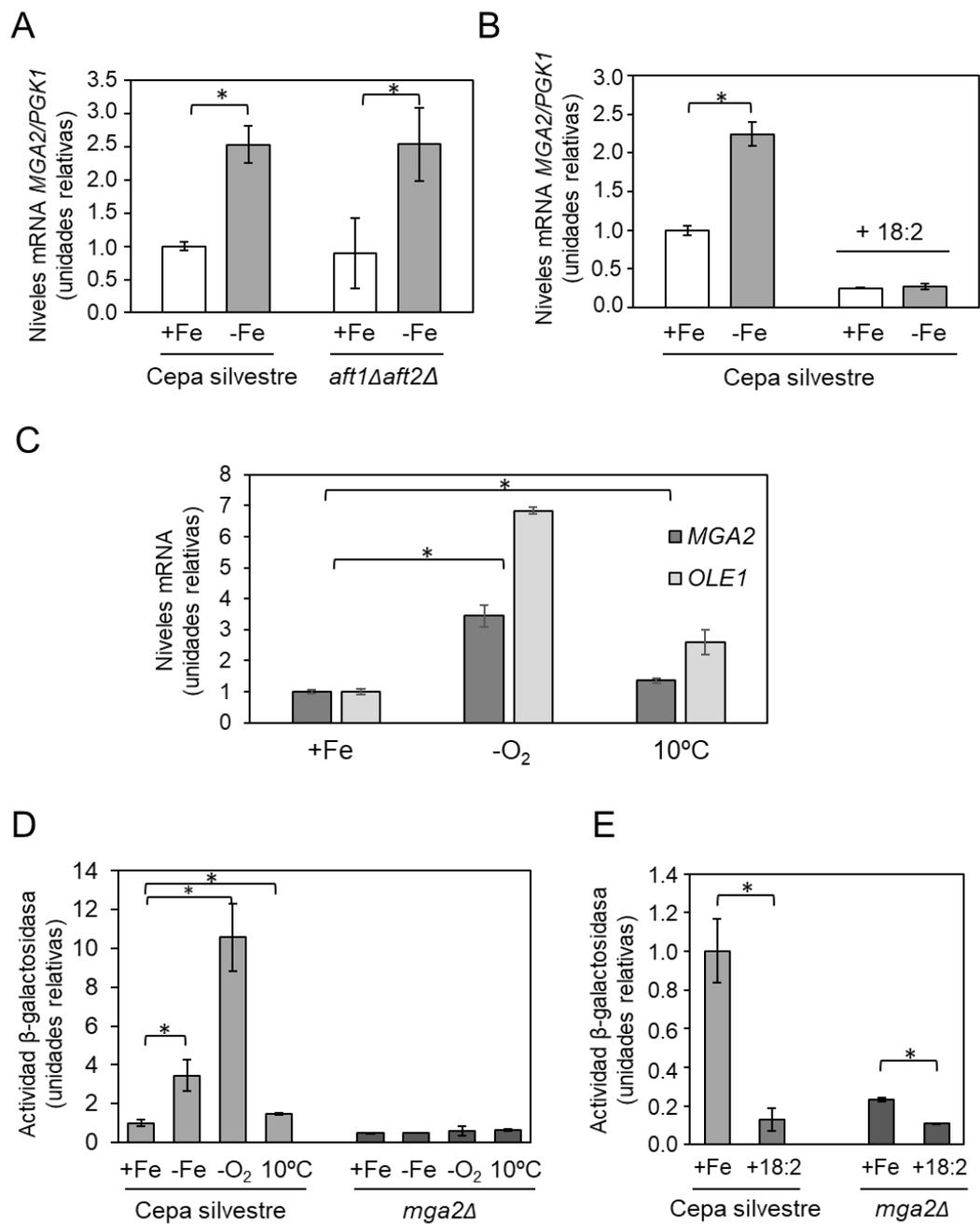
**Figura C2-6.** La activación transcripcional de *MGA2* favorece la inducción de *OLE1* en deficiencia de hierro. **A.** Células silvestres se crecieron en medio SC (+Fe), SC con 100 $\mu$ M de BPS (-Fe) y SC con 100  $\mu$ M de BPS con 300  $\mu$ M de FAS (-Fe +FAS). Células *fet3Δfet4Δ* se

crecieron en medio SC (+Fe). Todos los cultivos se incubaron a 30°C durante 6 horas. El RNA extraído de las muestras se analizó por RT-PCR utilizando oligonucleótidos para medir los niveles de *MGA2* normalizados frente a los niveles de *PGK1*. **B.** Niveles de mRNA y tasa de transcripción (TR) de *MGA2* durante la deficiencia de hierro obtenidos a partir de RT-PCR y *Genomic Run On*, respectivamente. **C. y D.** Células *mga2Δ* transformadas con los plásmidos pMGA2 (centromérico) o YEplac181-3HA-MGA2 (multicopia) se crecieron en SC-ura (+Fe) y SC-ura con 100 μM de BPS (-Fe) durante 6 horas a 30°C. El RNA extraído de las muestras se analizó por RT-PCR utilizando oligonucleótidos para medir los niveles de *MGA2* y *OLE1* normalizados frente a los niveles de *PGK1*. El asterisco (\*) muestra diferencias estadísticamente significativas (p-valor < 0.05).

### **2.7. Mga2 autorregula su expresión en condiciones de deficiencia de hierro, hipoxia, baja temperatura y bajas concentraciones de ácidos grasos insaturados.**

Decidimos estudiar si los factores Aft1 y Aft2 son los responsables de la activación de *MGA2* en deficiencia de hierro. Para ello, se determinaron los niveles de mRNA *MGA2* en una cepa que carece de ambos factores transcripcionales crecida en condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro. Como se observa en la figura, los niveles de *MGA2* aumentan en condiciones de deficiencia, descartando la implicación de estos factores en la activación de *MGA2* (figura C2-7 panel A).

Por otra parte, estudiamos si la regulación de *MGA2* también ocurre en respuesta a otros estreses donde se ha descrito la regulación de la expresión de *OLE1*. Para ello, decidimos determinar los niveles de mRNA *MGA2* frente a cambios en la concentración de ácidos grasos, hipoxia o disminución de temperatura. Al añadir ácidos grasos insaturados al medio se produce una disminución de los niveles de *MGA2*, eliminando la regulación dependiente de hierro igual que ocurre con la expresión de *OLE1* en estas condiciones (figura C2-7 panel B). Para estudiar qué ocurre en condiciones de hipoxia se crecieron las células durante 5 horas en ausencia de oxígeno y se determinaron los niveles de mRNA de *OLE1* y *MGA2*. En este caso, se observa un incremento en la cantidad de ambos transcritos (figura C2-7 panel C). Lo mismo ocurre al crecer las células a baja temperatura, aunque en este caso el incremento es menor (figura C2-7 panel C).



**Figura C2-7. Mga2 se autorregula frente a diferentes tipos de estrés. A.** Células silvestre y *aft1Δaft2Δ* se crecieron en SC (+Fe) y SC con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe) durante 6 horas. La cantidad de mRNA de *MGA2* se determinó mediante RT-PCR, normalizando frente a los niveles de *PGK1*. **B.** Células silvestre se crecieron en SC (+Fe) y SC con 100  $\mu$ M de BPS (-Fe) en presencia y ausencia de ácidos grasos insaturados (18:2). **C.** Células silvestre se crecieron

en SC (+Fe) o SC en ausencia de oxígeno durante 5 horas (-O<sub>2</sub>) y en SC a 10°C durante 1 hora. Los niveles de *MGA2* se determinaron como en el apartado anterior. **D. y E.** Células silvestre y *mga2Δ* transformadas con el plásmido *P<sub>MGA2</sub>-lacZ* se crecieron en SC-ura en las mismas condiciones descritas en los paneles anteriores (+Fe, -Fe, -O<sub>2</sub>, 10°C, +18:2) y se determinó la actividad enzimática mediante ensayos de actividad β-galactosidasa. El asterisco (\*) muestra diferencias estadísticamente significativas (p-valor < 0.05).

Dado que Mga2 activa la expresión de *OLE1* en deficiencia de hierro, nos preguntamos si también regula su propia expresión en las diferentes condiciones. Para ello, se transformaron una cepa silvestre y una cepa *mga2Δ* con un plásmido que contiene el promotor de *MGA2* fusionado al gen *lacZ*. Este diseño experimental nos permite estudiar la activación transcripcional del promotor del gen en diferentes condiciones mediante la determinación de la actividad β-galactosidasa. En el caso de la deficiencia de hierro, se observa un incremento de la actividad enzimática en la cepa silvestre crecida en deficiencia de hierro, indicando un aumento en la transcripción del promotor de *MGA2* (figura C2-7 panel D). Estos datos apoyan la activación transcripcional del gen caracterizada a partir del *GRO*. Cabe destacar que este incremento en la actividad enzimática no ocurre en la cepa *mga2Δ*, indicando que es Mga2 la proteína responsable de su propia activación en las condiciones de limitación de hierro. Estos mismos resultados se muestran en condiciones de hipoxia y baja temperatura (figura C2-7 panel D). En el caso de la suplementación del medio con ácidos grasos insaturados se observa una caída de la actividad β-galactosidasa y una disminución mayor en ausencia de Mga2 (figura C2-7 panel E). Todos estos resultados indican que Mga2 activa su propia expresión en respuesta a todos estos estreses.



# *Capítulo 2*

## *Discusión*



### Regulación de la desaturasa *OLE1* en respuesta a deficiencia de hierro

La desaturasa de ácidos grasos Ole1 es esencial para la supervivencia de las células. Su actividad depende de hierro y oxígeno, ya que posee un grupo oxodihierro como cofactor. En *S. cerevisiae* se ha descrito un aumento en la expresión de *OLE1* frente a bajas concentraciones de oxígeno (Jiang et al., 2001). Esta activación de *OLE1* también se ha descrito por la adición de quelantes de hierro, por la presencia de otros metales como el cobalto que induce el regulón de hierro o cuando se altera la síntesis mitocondrial de los centros Fe-S (Kwast et al., 1999; Chellappa et al., 2001; Puig et al., 2005; Bellí et al., 2004). Esta regulación es diferente a la de numerosos enzimas dependientes de hierro que exhiben defectos en su expresión durante la limitación de hierro, resaltando así la importancia de la actividad de Ole1 en estas condiciones (Puig et al., 2005).

En este trabajo hemos observado la activación en la expresión de *OLE1* en células con una capacidad de adquisición del metal reducida (mutantes *fet3Δfet4Δ* y *aft1Δaft2Δ*), que muestran una deficiencia nutricional de hierro. Además, también hemos comprobado que, en presencia del agente quelante de hierro BPS, la adición de exceso de hierro elimina la regulación de la expresión de *OLE1*, disminuyendo sus niveles a su expresión basal. Los estudios genómicos de transcripción (*Genomic Run-On*) han revelado que el aumento en los niveles de *OLE1* se debe a una activación transcripcional durante la deficiencia de hierro. La inducción transcripcional de *OLE1* ya se había descrito en condiciones de hipoxia, baja temperatura o ausencia de ácidos grasos insaturados, siendo Spt23 y Mga2 los factores transcripcionales responsables de esta activación (Chellappa et al., 2001; Jiang et al., 2001; Jiang et al., 2002; Nakagawa et al., 2002). En el caso de la deficiencia de hierro hemos descartado el papel de Aft1 y Aft2 como partícipes de la activación de *OLE1*, pese a ser los principales reguladores transcripcionales en respuesta a la falta de hierro. El principal responsable de la inducción de *OLE1* en ausencia de hierro es Mga2, aunque no podemos descartar la contribución de Spt23 en esta regulación ya que en un mutante *spt23Δ* se alcanzan niveles más bajos de *OLE1* tras su activación. Actualmente no se conoce el mecanismo por el que Mga2

aumenta la transcripción de sus dianas. Se ha propuesto que Mga2 podría actuar reclutando la maquinaria de remodelación de la cromatina (Zhang et al., 1997) ya que carece de dominios de unión al DNA. En nuestro caso, hemos comprobado que Mga2 es necesario para que se produzca el incremento en la unión de la RNA polimerasa II al promotor de *OLE1* en respuesta a la deficiencia de hierro, aumentándose así la expresión de *OLE1*.

El papel esencial de Mga2 para el crecimiento en condiciones de limitación de hierro ya había sido descrito por otros autores (Samanfar et al., 2013). Ensayos de crecimiento nos han permitido demostrar como la sobreexpresión de *OLE1* rescata la letalidad del mutante *mga2Δ* en ausencia de hierro, lo cual indica que la activación de *OLE1* por Mga2 es fundamental en estas condiciones. En el mismo sentido, la complementación del crecimiento del mutante *mga2Δ* tras añadir ácidos grasos insaturados sugiere que el aumento de la expresión de *OLE1* por Mga2 es necesario para mantener niveles adecuados de ácidos grasos insaturados. La determinación de ácidos grasos saturados (SFAs) e insaturados (UFAs) en condiciones de déficit de hierro, tanto nutricional (100 μM BPS), como genética, (*fet3Δfet4Δ*) aporta evidencias sobre la alteración en la actividad de Ole1 debido a la escasez de hierro, del cual depende su actividad. Las células en deficiencia de hierro presentan niveles más bajos de ácidos grasos insaturados de los que presentan en condiciones normales. Así, el déficit de hierro provoca una acumulación de los precursores 16:0 y 18:0 y la consecuente reducción en la aparición de los productos de la ruta 16:1 y 18:1. Estudios anteriores en los que se determinaron cambios en las concentraciones de diferentes metabolitos comparando condiciones de déficit y exceso de hierro no mostraron variación en las concentraciones de ácidos grasos saturados e insaturados (Shakoury-Elizeh et al., 2010). Esto podría deberse a las diferencias entre sus condiciones de limitación de hierro y las que se han utilizado en este trabajo, que en principio son más severas. Tampoco observan diferencias en la expresión de Ole1 a nivel de proteína, lo cual justifica que no se observen cambios en los niveles de ácidos grasos entre ambas condiciones. En el caso del mutante *mga2Δ* los niveles de ácidos grasos insaturados en condiciones normales son similares a la cepa silvestre, las diferencias se observan

en ausencia de hierro donde no llegan a alcanzarse los mismos niveles. Estos resultados explican el defecto del crecimiento de la cepa *mga2Δ* en deficiencia de hierro y la complementación de su fenotipo aportando ácidos grasos al medio. Además, estos resultados apoyan la necesidad de las células de sobreexpresar *OLE1* con el fin de compensar la bajada en la actividad del enzima dependiente de hierro. Esta idea se refuerza tras observar cómo la adición de ácidos grasos poliinsaturados al medio elimina la regulación de *OLE1* de las células crecidas en ausencia de hierro.

La variación en la concentración de ácidos grasos provoca cambios en la fluidez de las membranas lipídicas. En este caso, la disminución de ácidos grasos insaturados en las células durante la escasez de hierro provocaría cambios en la membrana del retículo endoplásmico, causando la activación de Mga2 y su liberación para activar la expresión de *OLE1*. La inducción de *OLE1* observada en condiciones normales tras expresar la forma libre de Mga2, que no posee su segmento transmembrana, sugiere que la deficiencia de hierro está regulando el procesamiento proteolítico de Mga2. Estos resultados concuerdan con el mecanismo molecular propuesto por Covino et al. (2016) en el cual Mga2 participa en la percepción del empaquetamiento de lípidos en la membrana del retículo a través de su segmento transmembrana. Este dominio de la proteína cambia su estado rotacional en función de la fluidez de la membrana, permitiendo el procesamiento del propio factor de transcripción y la regulación de la síntesis de ácidos grasos insaturados por *OLE1*. Además, la falta de activación de *OLE1* tras añadir ácidos grasos insaturados al medio, que pueden ser incorporados a las membranas en las células, reafirma que la falta de ácidos grasos en deficiencia de hierro altera la fluidez en la membrana favoreciendo la activación de Mga2. En cuanto al mecanismo implicado en el procesamiento proteolítico de Mga2, es similar al descrito en respuesta a otros estreses siendo dependiente de su ubiquitinación por Rsp5 y la acción del complejo Cdc48<sup>Ufd1/Npl4</sup> y el proteasoma.

Además del papel de Mga2 como activador transcripcional de *OLE1*, se ha descrito como Mga2 actúa en la regulación postranscripcional aumentando la estabilidad del transcrito *OLE1* en ausencia de ácidos grasos insaturados (Kandasamy et al., 2004). En este trabajo no hemos abordado esta regulación en

deficiencia de hierro. En principio, creemos que se trataría de un mecanismo relativamente complejo en el que participarían Mga2 y Cth2 realizando funciones antagónicas. Cth2 estaría promoviendo la degradación del transcrito, a través de su unión a las secuencias ARE identificadas en el extremo 3'UTR del mRNA *OLE1*; mientras que Mga2 estaría contribuyendo a la estabilización del transcrito en estas condiciones (Kandasamy et al., 2004; Puig et al., 2005). En cualquier caso, el resultado global de la deficiencia de hierro implica un aumento de los niveles de mRNA *OLE1*.

Nuestro trabajo también ha revelado como la deficiencia de hierro provoca la inducción transcripcional de *MGA2*. Al igual que ocurre con *OLE1*, *MGA2* aumenta sus niveles en condiciones de deficiencia de hierro nutricional y genética, como resultado de su activación transcripcional. El incremento en los niveles de *MGA2* favorece la expresión de *OLE1* en ausencia de hierro, sugiriendo que esta misma regulación podría ocurrir en otras condiciones en las que se induce *OLE1*. Así pues, observamos como los niveles de mRNA *MGA2* también se incrementan en respuesta a hipoxia y baja temperatura. Los ensayos de actividad enzimática  $\beta$ -galactosidasa confirmaron el aumento de *MGA2* como consecuencia de su inducción transcripcional. Por el contrario, la adición de ácidos grasos insaturados al medio deficiente en hierro elimina la inducción de *MGA2*. Este hecho sugiere que los cambios en la fluidez de la membrana del retículo activan Mga2 y este podría controlar la expresión de su propio mRNA.

El modelo final propuesto a partir de los resultados en este trabajo indica que la disminución en la biodisponibilidad de hierro provoca la disminución de la actividad enzimática de Ole1, dependiente de este cofactor, originando cambios en la concentración relativa de ácidos grasos y con ello en la fluidez de membranas. Esto provoca la activación de Mga2 a través de su procesamiento proteolítico, liberándose de la membrana del retículo endoplasmático y entrando al núcleo para activar la transcripción de *OLE1* y su propio mRNA *MGA2*. Este nuevo mecanismo de autorregulación de *MGA2* ocurre en respuesta a otros estreses como la baja temperatura y la hipoxia, y contribuye a aumentar la expresión de *OLE1* (figura D2-1).

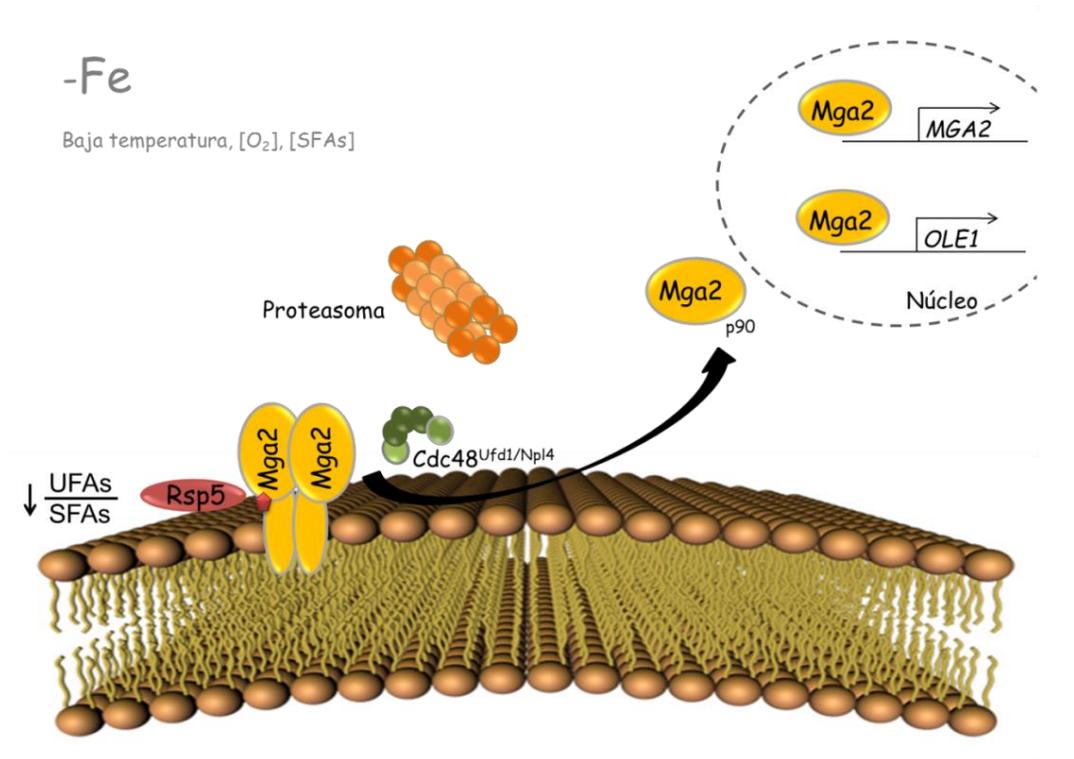


Figura D2-1. Modelo propuesto para la regulación transcripcional de *OLE1* y *MGA2* en condiciones de deficiencia de hierro.



# *Capítulo 3*

## *Resultados*

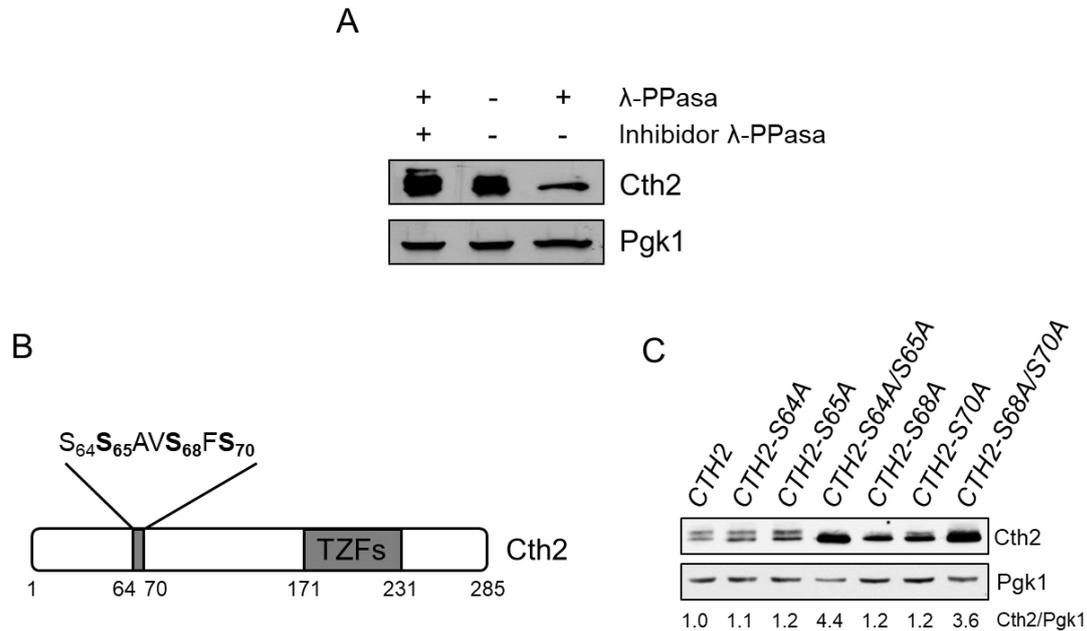


### Capítulo 3. Regulación postraduccional de la proteína Cth2 en deficiencia de hierro.

Cth2 es una proteína esencial en la homeostasis del hierro debido a su papel como factor postranscripcional. Su función es clave para que tenga lugar la remodelación metabólica necesaria para la adaptación a condiciones de deficiencia de hierro. Hasta ahora, se han descrito diferentes mecanismos postranscripcionales que permiten limitar su expresión para evitar la toxicidad debida a un exceso de la proteína. En este capítulo se han caracterizado los mecanismos implicados en la regulación postraduccional de Cth2, que permiten controlar los niveles de proteína en condiciones de deficiencia de hierro.

#### 3.1. Cth2 se fosforila durante la deficiencia de hierro.

Durante el estudio de la proteína Cth2 en deficiencia de hierro se han observado cambios de movilidad electroforética que sugieren que Cth2 podría modificarse de manera postraduccional (Puig et al., 2005, Vergara et al., 2008, Martínez-Pastor et al., 2013). Para abordar la naturaleza de estas alteraciones se ha utilizado la proteína Cth2 etiquetada con un epítipo Flag<sub>2</sub> en su extremo amino terminal, manteniendo así su funcionalidad (Puig et al., 2005). Tras crecer las células durante 6 horas en deficiencia de hierro, se analizó Cth2 por *Western Blot*. En este caso, parte de la proteína muestra un retraso en su movilidad, similar a la de resultados descritos previamente (figura C3-1 panel A). Para estudiar si esta disminución en la migración de Cth2 se debía a una fosforilación, se trató el extracto total de proteínas con fosfatasa  $\lambda$  en ausencia o presencia de inhibidores de fosfatasa (66 mM NaF y 66 mM EDTA). Como se observa en la figura C3-1 (panel A), el retraso en la migración electroforética de la proteína desaparece con el tratamiento de fosfatasa  $\lambda$  y se mantiene al añadir los inhibidores de fosfatasa. Este resultado indica que la proteína Cth2 se fosforila en deficiencia de hierro.



**Figura C3-1. Cth2 se fosforila en deficiencia de hierro en las serinas 64, 65, 68 y 70. A.** Células *cth2Δ* transformadas con el plásmido pRS416-Flag<sub>2</sub>-CTH2 se crecieron durante 6 horas en SC-ura con 100 μM de BPS (-Fe). Los extractos proteicos obtenidos en condiciones no desnaturalizantes se trataron con fosfatasa λ en presencia o ausencia de los inhibidores de la fosfatasa (66 mM NaF y 66 mM EDTA) y se analizaron por *Western Blot* utilizando un anticuerpo α-Flag. **B.** Representación de los sitios de fosforilación identificados por espectrometría de masas. TZFs señala los dedos de Zn de la proteína que unen los mRNAs diana. **C.** Células *cth1Δcth2Δ* transformadas con los plásmidos pRS416-Flag<sub>2</sub>-CTH2, pRS416-Flag<sub>2</sub>-CTH2-S64A, pRS416-Flag<sub>2</sub>-CTH2-S65A, pRS416-Flag<sub>2</sub>-CTH2-S64A/S65A, pRS416-Flag<sub>2</sub>-CTH2-S68A, pRS416-Flag<sub>2</sub>-CTH2-S70A o pRS416-Flag<sub>2</sub>-CTH2-S68A/S70A se crecieron durante 6 horas en SC-ura con 100 μM de BPS (-Fe). Los extractos proteicos se analizaron mediante *Western Blot* utilizando anticuerpos α-Flag y α-Pgk1, este último se utilizó como control de carga.

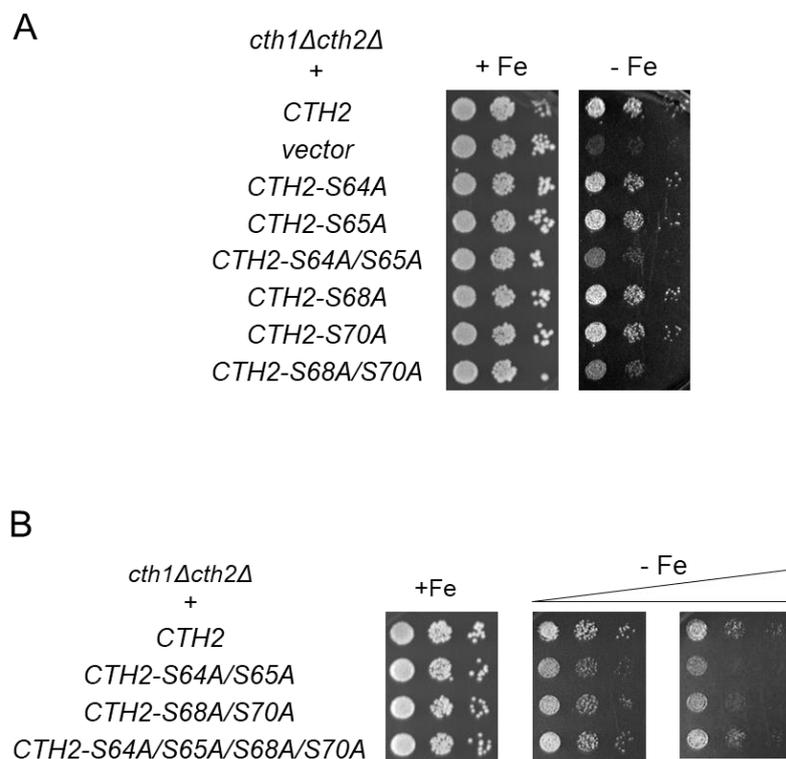
Para determinar los residuos fosforilados de Cth2, se crecieron células en deficiencia de hierro y se inmunoprecipitó Cth2 de manera específica mediante la utilización del epítipo Flag<sub>2</sub> con el que esta etiquetada. Los estudios de espectrometría de masas, realizados en colaboración con el Dr. James A.

Wohlschlegel de la *University of California Los Angeles (UCLA)*, identificaron diferentes péptidos fosforilados, la mayoría de ellos en las serinas 65, 68 y 70 (figura C3-1 panel B). Para estudiar la importancia de la fosforilación de Cth2 se construyeron diferentes mutantes de la proteína en estos residuos sustituyendo las serinas por alaninas para impedir su fosforilación. Se construyeron mutantes simples y dobles de estos residuos, incluida la mutación de la serina 64, debido a su cercana posición con los residuos identificados (S64A; S65A; S68A; S70A; S64A/S65A; S68A/S70A). El estudio por *Western Blot* de los diferentes mutantes muestra como la mutación simple de las serinas 64 o 65 no altera el patrón de fosforilación de la proteína, ni provoca cambios en los niveles de proteína Cth2 (figura 3-1 panel C). Los niveles de Cth2 también se mantienen al mutar las serinas 68 y 70 de forma individual, pero en este caso si se ve alterado el patrón de fosforilación, disminuyendo la banda de menor migración. En el caso de los dobles mutantes S64A/S65A y S68A/S70A, se observa una desaparición de la fosforilación y un aumento de los niveles de proteína de 4.4 y 3.7 veces, respectivamente. Estos resultados evidencian la importancia de estos residuos en la fosforilación de la proteína Cth2.

### **3.2. La fosforilación de las serinas S64/S65 y S68/S70 es necesaria para el crecimiento en deficiencia de hierro.**

La proteína Cth2 es esencial para el crecimiento en deficiencia de hierro debido al papel que ejerce en la remodelación metabólica de procesos dependientes de hierro (Puig et al., 2005). Para estudiar la importancia de la fosforilación de estos residuos de Cth2 en deficiencia de hierro, se realizaron ensayos de crecimiento con los mutantes de fosforilación de Cth2 crecidos en presencia de un agente quelante de hierro. El experimento se realizó con un doble mutante *cth1Δcth2Δ*, con el fin de eliminar la redundancia entre ambas proteínas. Esta cepa se transformó con los diferentes mutantes de Cth2 construidos previamente. El ensayo muestra un defecto de crecimiento en condiciones de deficiencia en ausencia de la proteína Cth2 como ya se había descrito (Puig et al., 2005; figura C3-2 panel A). Los mutantes de fosforilación simples muestran un crecimiento similar al que presenta la cepa que

expresa la proteína silvestre. Por el contrario, los dobles mutantes de fosforilación Cth2-S64A/S65A y Cth2-S68A/S70A tienen un defecto de crecimiento en condiciones de limitación de hierro similar al que se observa con la falta de expresión de Cth2. En base a estos resultados, nos preguntamos si la mutación simultánea de las cuatro serinas daría un fenotipo más severo de crecimiento que los mutantes dobles. Los ensayos de crecimiento del mutante Cth2-S64A/S65A/S68A/S70A no muestran un defecto de crecimiento mayor que los mutantes dobles en un medio con falta de hierro (figura C3-2 panel B). Los resultados de estos ensayos permiten concluir que la fosforilación de estos residuos de Cth2 es esencial para el crecimiento en condiciones de escasez de hierro.

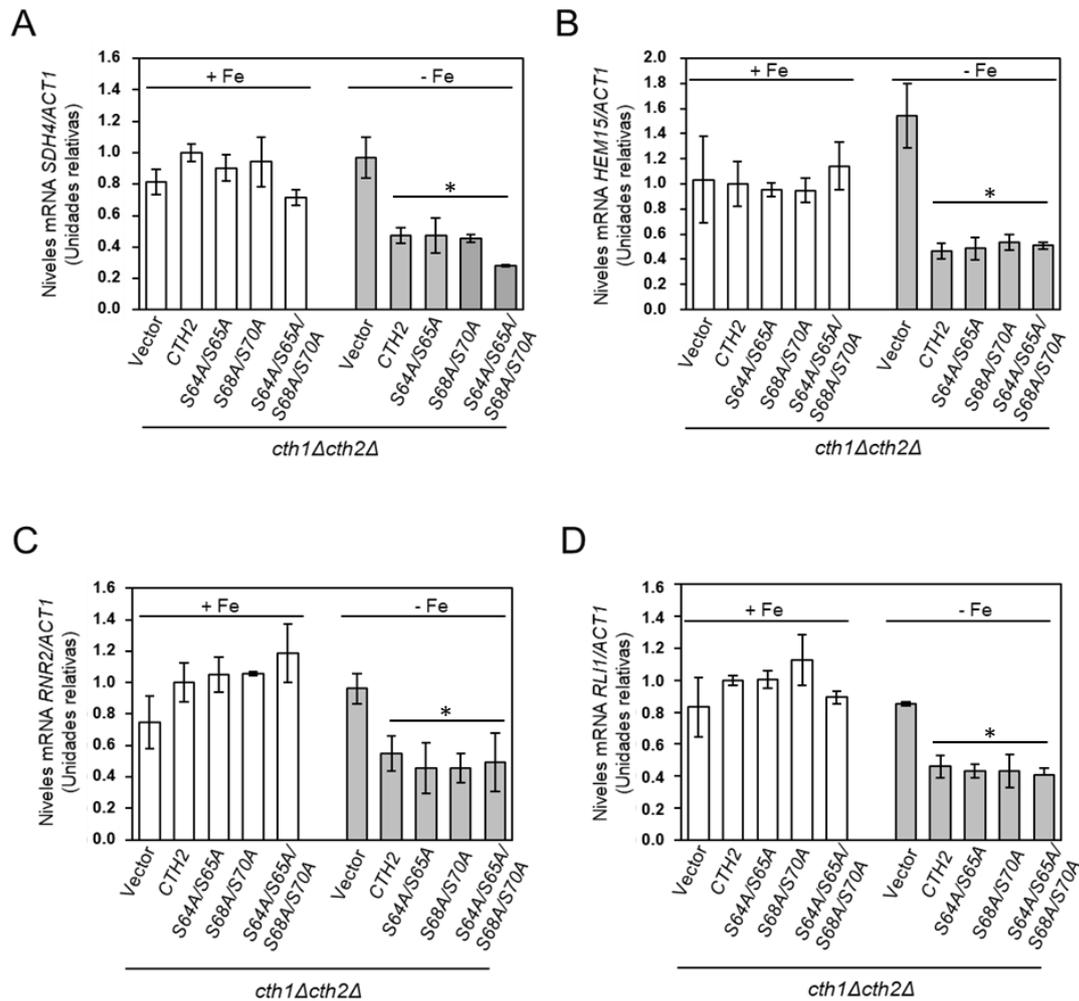


**Figura C3-2. La fosforilación de Cth2 es necesaria para el crecimiento en condiciones de deficiencia de hierro.** A. Células *cth1Δcth2Δ* transformadas con los plásmidos pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2*, pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2-S64A*, pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2-S65A*, pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2-S64A/S65A*, pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2-S68A*, pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2-S70A* o pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2-S68A/S70A* se crecieron en SC-ura durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron los ensayos de crecimiento en medio sólido, según se describe en material y métodos, en

medios con suficiencia de hierro (SC-ura; +Fe) y deficiencia de hierro (en presencia de ferrocina; -Fe) y se incubaron a 30°C al menos 3 días. B. Células *cth1Δcth2Δ* transformadas con los plásmidos pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2*, pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2-S64A/S65A*, pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2-S68A/S70A* o pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2-S64A/S65A/S68A/S70A* se analizaron mediante ensayos de crecimiento al igual que se describe en el apartado A.

### 3.3. La degradación de mRNAs diana de Cth2 es independiente de la fosforilación en las serinas S64/S65 y S68/S70.

El principal papel de Cth2 en condiciones de deficiencia de hierro consiste en promover la degradación de mRNAs implicados en procesos dependientes de hierro (Puig et al., 2005). Para averiguar si el defecto de crecimiento que muestran los mutantes de fosforilación Cth2-S64A/S65A y Cth2-S68A/S70A se debe a un defecto en la degradación, se determinaron los niveles de mRNA de algunas dianas de Cth2 en células que expresan la proteína silvestre, los mutantes de fosforilación Cth2-S64A/S65A, Cth2-S68A/S70A o un vector, crecidas en presencia o ausencia de hierro. Se midieron por PCR cuantitativa (RT-qPCR) los niveles de *SDH4*, que codifica para una de las subunidades del complejo succinato deshidrogenasa del ciclo de Krebs; *HEM15*, que codifica para la ferroquelatasa implicada en la síntesis de grupos hemo; *RNR2*, que codifica para una de las subunidades pequeñas de la ribonucleótido reductasa que cataliza la síntesis de dNTPs; y *RLI1*, que codifica para una proteína implicada en el ensamblaje y reciclaje de los ribosomas (Bullis et al., 1994; Ferreira, 1999; Elledge et al., 1987; Dong et al., 2004). Como se puede observar en la figura C3-3, las células que expresan Cth2-S64A/S65A y Cth2-S68A/S70A degradan sus mRNAs dianas igual que las células que expresan la forma silvestre de Cth2. Lo mismo ocurre cuando expresamos el cuádruple mutante de fosforilación Cth2-S64A/S65A/S68A/S70A (figura C3-2 panel B). Estos resultados determinan que la fosforilación de estos residuos de Cth2 no tiene ningún efecto sobre la función de degradación de mRNAs.

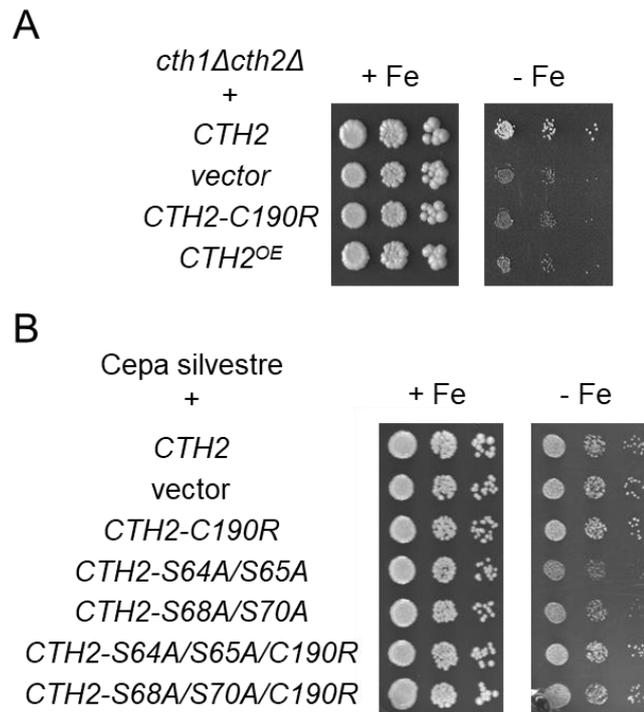


**Figura C3-3.** Los mutantes de fosforilación de Cth2 degradan sus mRNAs diana. Células *cth1Δcth2Δ* transformadas con los plásmidos pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2*, pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2-S64A/S65A*, pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2-S68A/S70A*, pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2-S64A/S65A/S68A/S70A* o pRS416 (vector) se crecieron durante 6 horas en SC-ura (+Fe) o SC-ura con 100 μM de BPS (-Fe). El RNA extraído de las muestras se analizó por RT-PCR utilizando oligonucleótidos para determinar los niveles de mRNA de *SDH4* (A), *HEM15* (B), *RNR2* (C) y *RLI1* (D) normalizados frente a los niveles de actina (*ACT1*). El asterisco (\*) indica diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes plásmidos de Cth2 y el vector (p-valor < 0.05).

### 3.4. La sobreexpresión de Cth2 resulta tóxica en condiciones de deficiencia de hierro.

Estudios previos han mostrado como la sobreexpresión de Cth2 resulta tóxica en condiciones normales y como esta toxicidad desaparece si se expresa una proteína Cth2 no funcional, consecuencia de una mutación en sus dedos de zinc que impide la unión a sus mRNAs diana (Pedro-Segura et al., 2008). Otros estudios han mostrado como la autorregulación de Cth2 a través de la unión a las AREs de su propio RNA mensajero es necesaria para el crecimiento óptimo en deficiencia de hierro. Para estudiar si la sobreexpresión de Cth2 es tóxica en condiciones de deficiencia se realizaron ensayos de crecimiento de una cepa *cth1Δcth2Δ* transformada con plásmidos centroméricos de *CTH2* (*CTH2* y *CTH2-C190R*; que codifican para la forma funcional y no funcional de la proteína, respectivamente), multicopia (*CTH2<sup>OE</sup>*) o vector. Como se observa en la figura C3-4 (panel A), la sobreexpresión de Cth2 (*CTH2<sup>OE</sup>*) causa un defecto de crecimiento similar al que presentan las células que carecen de Cth2 (vector) o que expresan una proteína no funcional (*CTH2-C190R*).

A partir de estos resultados, nos planteamos si la toxicidad de los mutantes de fosforilación podría deberse a un aumento en los niveles de proteína ya que, previamente habíamos observado un aumento de los niveles estacionarios de proteína Cth2 en los mutantes de fosforilación Cth2-S64A/S65A y Cth2-S68A/S70A (figura C3-1 panel C). Para testar esta hipótesis se realizaron, en primer lugar, ensayos de crecimiento en una cepa silvestre transformada con los diferentes mutantes de fosforilación (figura C3-4 panel B). De esta manera podíamos determinar si la mutación con la que estamos trabajando se debe a una pérdida de función, como es el caso de la mutación C190R que no causa ningún efecto en el crecimiento de una cepa silvestre, o si por el contrario se trata de una ganancia de función que provocaría un defecto en la cepa silvestre. Los ensayos muestran un defecto de crecimiento al expresar las proteínas Cth2-S64A/S65A y Cth2-S68A/S70A, indicando que se trata de una mutación de efecto dominante. En el ensayo también se incluyeron las proteínas Cth2-S64A/S65A/C190R y Cth2-S68A/S70A/C190R, que no se unen a los mRNAs diana y cuya expresión no produce ningún efecto en el crecimiento, sugiriendo que la toxicidad de estas proteínas es dependiente de su unión a los mRNAs.



**Figura C3-4. La sobreexpresión de Cth2 funcional resulta tóxica en deficiencia de hierro. A.** Células *cth1Δcth2Δ* transformadas con los plásmidos pRS416-*CTH2* (*CTH2*), pRS416 (vector), pRS416-*CTH2-C190R* (*CTH2-C190R*) o pRS426-*CTH2* (*CTH2<sup>OE</sup>*) se crecieron en SC-ura durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron los ensayos de crecimiento en medio sólido, según se describe en material y métodos, en medios con suficiencia de hierro (SC-ura; +Fe) y deficiencia de hierro (en presencia de ferrocina; -Fe) y se dejaron crecer a 30°C al menos 3 días. **B.** Células silvestres (BY4741) transformadas con los plásmidos pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2* (*CTH2*), pRS416 (vector), pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2-C190R* (*CTH2-C190R*), pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2-S64A/S65A*, pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2-S68A/S70A*, pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2-S64A/S65A-C190R*, o pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2-S68A/S70A-C190R* se analizaron mediante ensayos de crecimiento igual que se describe en el apartado A.

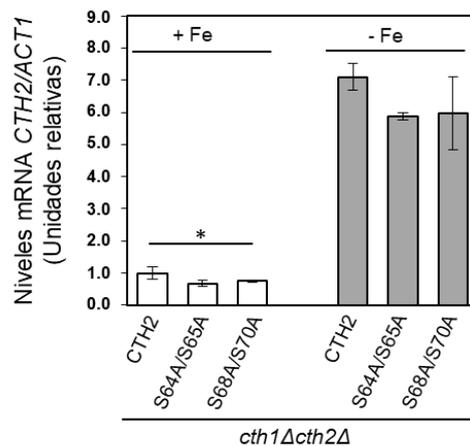
### 3.5. La fosforilación de las serinas S64/S65 y S68/S70 regula la estabilidad de Cth2.

Debido a que habíamos observado un aumento en los niveles estacionarios de proteína Cth2 en los mutantes de fosforilación, decidimos estudiar si el aumento de los niveles de proteína Cth2-S64A/S65A y Cth2-S68A/S70A observado en la figura C3-1 (panel C) era consecuencia de una mayor expresión de *CTH2* en estos mutantes. Para ello se midieron los niveles de mRNA *CTH2* por RT-PCR en células crecidas durante 6 horas en suficiencia y deficiencia de hierro. Los niveles de mensajero obtenidos de *CTH2-S64A/S65A* y *CTH2-S68A/S70A* fueron similares a los de la forma silvestre de *CTH2* al pasar a condiciones de escasez de hierro, descartando así una mayor expresión del RNA mensajero de estos mutantes (figura C3-5 panel A).

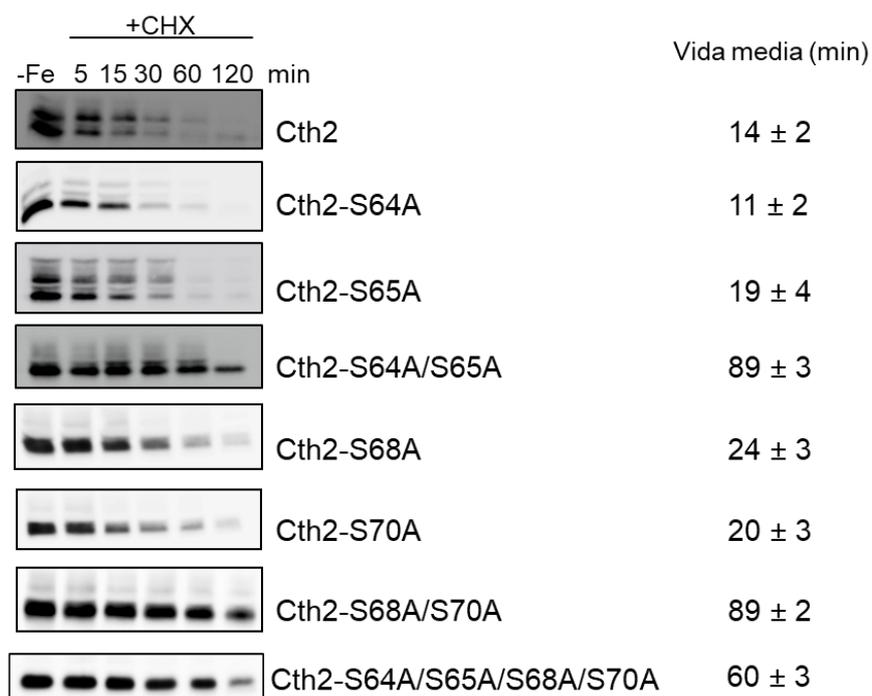
A continuación, nos preguntamos si el aumento de los niveles de proteína Cth2 en los mutantes de fosforilación podría deberse a cambios en la estabilidad de la proteína. Para testar esta hipótesis se realizaron ensayos de vida media de la proteína Cth2 en los que se crecieron las células durante 6 horas en presencia del agente quelante de hierro BPS, se añadió cicloheximida al medio para detener la traducción de proteínas en las células, se recogieron alícuotas a diferentes puntos y se determinaron los niveles de proteína Cth2 (figura C3-5 panel A). Con estos ensayos determinamos el tiempo de vida media de la proteína Cth2 silvestre etiquetada con Flag<sub>2</sub> en deficiencia de hierro en 14 minutos. Resultados similares se obtuvieron con una etiqueta Myc<sub>2</sub> (resultados no mostrados). Los mutantes de fosforilación simples S64A, S65A, S68A y S70A muestran un ligero incremento en su estabilidad, a diferencia de lo que ocurre con los dobles mutantes, Cth2-S64A/S65A y Cth2-S68A/S70A, que evidencian un gran incremento de su estabilidad, alcanzando una vida media de hasta 90 minutos. El cuádruple mutante Cth2-S64A/S65A/S68A/S70A no muestra una mayor estabilidad que los mutantes dobles por separado, reafirmando los resultados obtenidos en los ensayos de crecimiento previos donde parece que el defecto de crecimiento de este mutante es menor que el de los dobles mutantes por separado (figura C3-5 panel B). Por este motivo hemos centrado el trabajo en el estudio de los dobles mutantes. Los ensayos de estabilidad de Cth2 nos permiten concluir que la fosforilación de las serinas S64/S65 y S68/S70

son necesarias para regular la estabilidad de la proteína Cth2 en deficiencia de hierro.

A



B



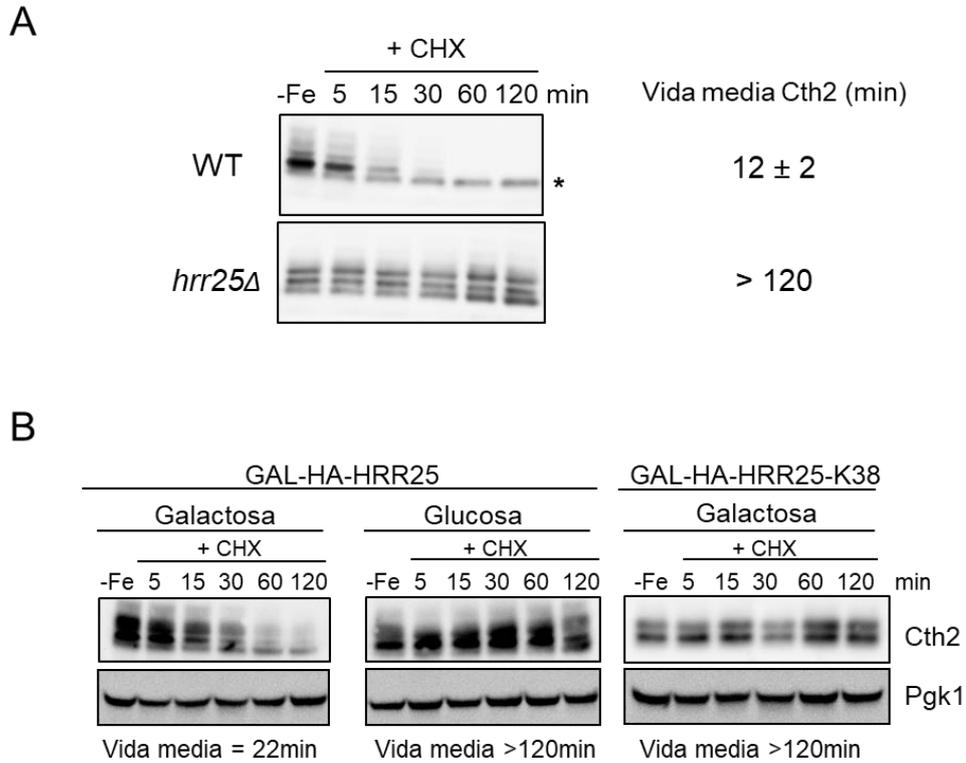
**Figura C3-5. La fosforilación de Cth2 en deficiencia de hierro determina la estabilidad de la proteína.** A. Células *cth1Δcth2Δ* transformadas con los plásmidos pRS416-Flag<sub>2</sub>-CTH2, pRS416-Flag<sub>2</sub>-CTH2-S64A/S65A o pRS416-Flag<sub>2</sub>-CTH2-S68A/S70A se crecieron durante 6 horas en SC-ura (+Fe) o SC-ura con 100 μM de BPS (-Fe). El RNA extraído de las muestras

se analizó por RT-qPCR utilizando oligonucleótidos para determinar los niveles de mRNA *CTH2* normalizados frente a los niveles de *ACT1*. El asterisco (\*) indica diferencias estadísticamente significativas para cada plásmido entre las condiciones de +Fe y -Fe (p-valor < 0.05). **B.** Células *cth1Δcth2Δ* transformadas con los plásmidos pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2*, pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2-S64A*, pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2-S65A*, pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2-S64A/S65A*, pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2-S68A*, pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2-S70A*, pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2-S68A/S70A* o pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2-S64A/S65A/S68A/S70A* se crecieron en SC-ura con 100μM de BPS (-Fe) durante 6 horas. Transcurrido este tiempo se añadió cicloheximida (50 μg/mL) al medio y se recogieron alícuotas a diferentes puntos. Los extractos proteicos de las muestras se analizaron mediante *Western Blot* utilizando un anticuerpo α-Flag.

### 3.6. La quinasa Hrr25 es esencial para la degradación de Cth2 en deficiencia de hierro.

Con el fin de identificar las quinasas responsables de la fosforilación de Cth2 se realizaron ensayos de actividad quinasa *in vitro*, en colaboración con el grupo de los Dres. Francesc Posas y Eulàlia de Nadal de la Universitat Pompeu Fabra. Esta técnica permitió identificar diferentes quinasas que podrían estar fosforilando a Cth2 *in vivo*. Para caracterizar el efecto de estas quinasas sobre la estabilidad de Cth2 en deficiencia de hierro se realizaron ensayos de estabilidad de proteína en mutantes de las quinasas que habían salido positivas en el ensayo *in vitro*. Sorprendentemente encontramos que en el mutante de la caseína quinasa I Hrr25 la vida media de Cth2 aumenta, siendo superior a los 120 minutos (figura C3-10 panel A). Para estudiar si la falta de actividad quinasa provoca un aumento en la estabilidad de Cth2, se crecieron en deficiencia de hierro células que expresaban *HRR25* y un mutante de su actividad quinasa (*HRR25-K38A*) bajo el promotor inducible del gen *GAL1* y se midió la estabilidad de Cth2 (figura C3-10 panel B). Al crecer las células en presencia de galactosa para inducir la expresión de Hrr25, la vida media de Cth2 es de 22 minutos. Sin embargo, al crecer las células en presencia de glucosa e inhibir la expresión de Hrr25, la vida media de Cth2 supera los 120 minutos, al igual que ocurre al expresar el mutante de Hrr25 que carece de actividad quinasa (*HRR25-K38A*). Estos resultados sugieren que la fosforilación de Cth2 por

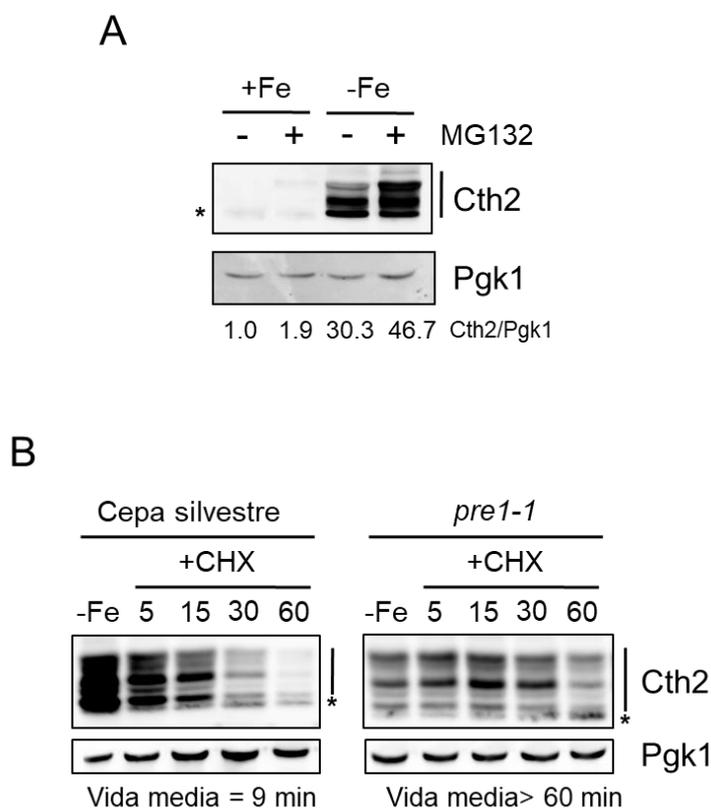
la quinasa Hrr25 es esencial para que se produzca la degradación de Cth2 en deficiencia de hierro.



**Figura C3-6. La fosforilación de Cth2 por Hrr25 es esencial para su degradación en deficiencia de hierro. A.** Células silvestres (W303) y *hrr25Δ* transformadas con pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2* se crecieron en SC-ura con 100 μM de BPS (-Fe) durante 6 horas. Transcurrido este tiempo se añadió cicloheximida (50 μg/mL) al medio y se recogieron alícuotas a diferentes puntos. Los extractos proteicos de las muestras se analizaron mediante *Western Blot* utilizando un anticuerpo α-Flag. **B.** Células *cth2Δhrr25Δ* cotransformadas con pRS415-Flag<sub>2</sub>-*CTH2* y pGAL1-3HA-*HRR25* o pGAL1-3HA-*HRR25-K38A* se crecieron SC-ura-leu 2% rafinosa 2% galactosa o 2% glucosa, con 100 μM de BPS (-Fe) durante 6 horas. Para medir la estabilidad de Cth2 se procedió igual que en el apartado A.

### 3.7. La degradación de Cth2 se lleva a cabo a través del proteasoma.

Con el fin de averiguar cuales son los mecanismos implicados en la regulación de los niveles de Cth2, decidimos estudiar cual es la vía por la que la célula lleva a cabo la degradación de Cth2. En primer lugar, determinamos los niveles estacionarios de Cth2 en condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro, en presencia o ausencia del inhibidor del proteasoma MG132. Para ello se utilizó una cepa *pdr5Δ* que facilita la acumulación de MG132. Como ya se ha descrito previamente, los niveles de Cth2 se inducen en condiciones de escasez de hierro, mientras que en condiciones normales sus niveles son indetectables (figura C3-7 panel A). Al añadir MG132 al medio, se observa un aumento en los niveles de Cth2 en deficiencia de hierro, sugiriendo una posible degradación de Cth2 en estas condiciones a través del proteasoma.



**Figura C37. Cth2 se degrada por el proteasoma en deficiencia de hierro.** A. Células *pdr5Δ* transformadas con el pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2* se crecieron en SC-ura (+Fe) y SC-ura con 100  $\mu$ M de BPS durante 6 horas y se incubaron durante 1 hora más con 100  $\mu$ M MG132 o DMSO

como control negativo. Los extractos proteicos se analizaron por *Western Blot* utilizando anticuerpos  $\alpha$ -Flag y  $\alpha$ -Pgk1. **B.** Células silvestre y *pre1-1* termosensibles transformadas con el plásmido pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2* se crecieron en SC-ura durante 3 horas a 37 °C. A continuación, se añadió al medio el quelante de hierro BPS (-Fe) y las células se crecieron durante 6 horas más a 37 °C. Se añadió cicloheximida (50  $\mu$ g/mL) y se recogieron alícuotas a diferentes tiempos. Los extractos proteicos se analizaron mediante *Western Blot* utilizando anticuerpos  $\alpha$ -Flag y  $\alpha$ -Pgk1.

Para estudiar con más detalle la implicación del proteasoma en la degradación de Cth2 durante la deficiencia de hierro, se determinó la vida media de la proteína en células que presentan inactivo el gen *PRE1*, implicado en el ensamblaje de la subunidad 20S del proteasoma (Heinemeyer et al., 1991). Al tratarse de un gen esencial para las células, se utilizó un mutante termosensible *pre1-1*, junto a su correspondiente cepa silvestre, crecidos a temperatura restrictiva (37°C) durante tres horas. Pasado este tiempo, se añadió el quelante de hierro BPS a ambos cultivos para inducir condiciones de deficiencia de hierro durante 6 horas. Posteriormente, se añadió cicloheximida al medio para detener la traducción de proteínas en las células y se recogieron alícuotas a diferentes puntos para determinar los niveles de Cth2. Como se muestra en la figura C3-7 (panel B), la vida media de Cth2 a 37°C es de 9 minutos. Sin embargo, el mutante *pre1-1* aumenta la estabilidad de la proteína alcanzando una vida media superior a los 60 minutos demostrándose que la degradación de Cth2 en deficiencia de hierro es dependiente del proteasoma.

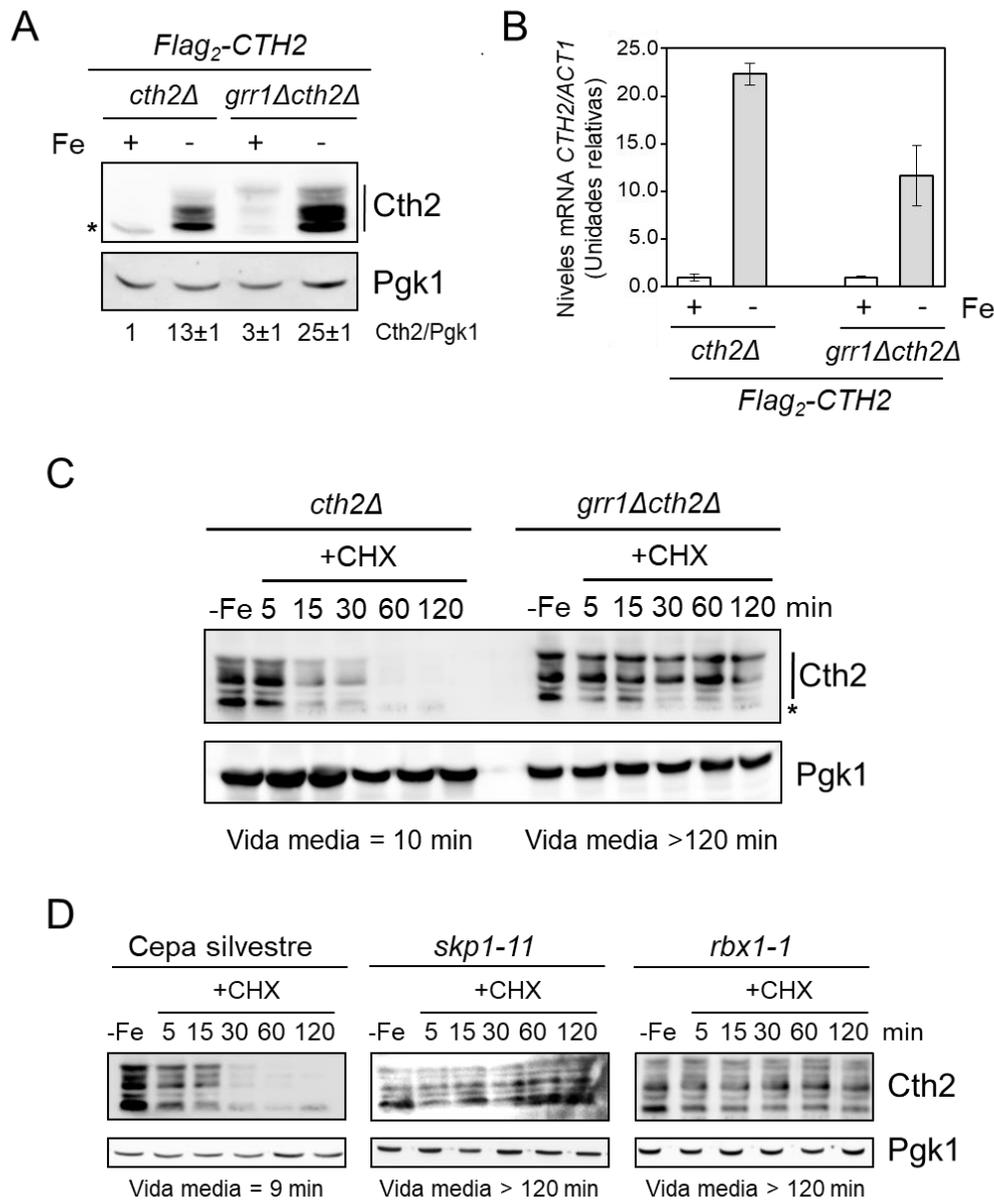
### 3.8. El complejo ubiquitin-ligasa SCF<sup>Grr1</sup> provoca la degradación de Cth2.

Grr1 es una proteína de tipo *F-box* que forma parte del complejo ubiquitin ligasa SCF<sup>Grr1</sup> y se encarga del reconocimiento de determinados sustratos para su posterior degradación por el proteasoma (Finley et al., 2012). Estudios globales previos en los que se identificaron diferentes sustratos de la proteína Grr1 mostraron cómo Cth2 interacciona con Grr1 (Mark et al., 2014). Con el fin de estudiar si Grr1 está implicada en la regulación de la estabilidad de Cth2 determinamos los niveles de proteína Cth2 en condiciones de suficiencia y escasez

de hierro en células que carecen del gen *GRR1*. Como ya se ha descrito previamente, en la figura C3-8 (panel A) se puede observar la inducción de los niveles de Cth2 en ausencia de hierro en el medio. Por otra parte, también se puede observar como el mutante *grr1Δ* muestra un incremento de dos veces en los niveles de Cth2 en deficiencia de hierro igual que ocurre en condiciones de suficiencia a pesar de que los niveles de proteína en esta condición son mucho más bajos. Para estudiar si el aumento de los niveles de Cth2 en el mutante *grr1Δ* es debido a un aumento de la expresión del mRNA *CTH2* se determinaron los niveles de este mRNA por RT-qPCR en estas mismas muestras. Como muestra la figura C3-8 (panel B), los niveles de *CTH2* no aumentan en el mutante *grr1Δ*, descartando así una posible regulación del mRNA a través de la proteína Grr1.

Los resultados anteriores sugieren que Grr1 podría estar regulando a la proteína Cth2 a nivel postraduccion, por lo que decidimos estudiar qué ocurre con la estabilidad de la proteína Cth2 en ausencia de Grr1. Se realizaron experimentos de vida media de proteína similares a los descritos anteriormente en una cepa silvestre y el mutante *grr1Δ* en condiciones de deficiencia de hierro (figura C3-8 panel C). La vida media de Cth2 obtenida para la cepa silvestre es de 10 minutos, a diferencia de lo que ocurre en el mutante *grr1Δ* en el que la proteína se estabiliza alcanzando una vida media superior a los 120 minutos. La proteína Grr1 funciona formando parte del complejo ubiquitin ligasa SCF<sup>Grr1</sup> compuesto por la culina Cdc53 que actúa de andamio entre la proteína adaptadora Skp1, que une a Grr1, y la proteína Rbx1, que interacciona con la E2 de la vía de ubiquitinación. Decidimos comprobar si la estabilidad de Cth2 también aumentaba en ausencia de estas proteínas del complejo SCF<sup>Grr1</sup>. Para ello, se determinó la vida media de Cth2 en ausencia de las proteínas Skp1 y Rbx1 utilizando mutantes termosensibles ya que ambas son esenciales para la supervivencia celular. Se crecieron los mutantes termosensibles *skp1-11* y *rbx1-1* con su correspondiente cepa silvestre a temperatura restrictiva (37°C) durante 3 horas y se añadió el quelante de hierro BPS para inducir condiciones de deficiencia de hierro durante 6 horas más. Transcurrido este tiempo, se añadió cicloheximida al medio para detener la traducción y se recogieron alícuotas a diferentes puntos. Como puede observarse en

la figura C3-8 (panel D), la vida media de Cth2 es superior a 120 minutos en ambos mutantes del complejo, al igual que ocurría con el mutante *grr1Δ*. Con todos estos resultados podemos concluir que el complejo ubiquitin ligasa SCF<sup>Grr1</sup> está implicado en la degradación de Cth2 durante la deficiencia de hierro.

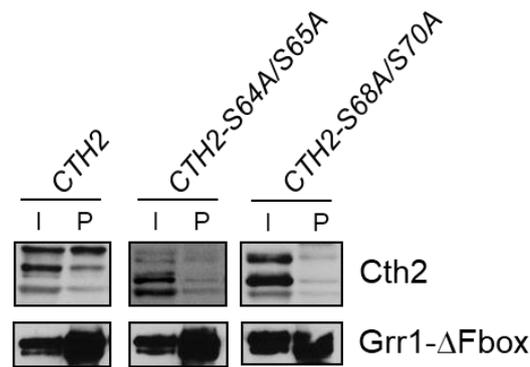


**Figura C3-8. La degradación de Cth2 en deficiencia de hierro depende del complejo SCF<sup>Grr1</sup>.** Células *cth2Δ* y *cth2Δgrr1Δ* transformadas con el plásmido pRS416-Flag<sub>2</sub>-Cth2 se crecieron en SC-ura (+Fe) y SC-ura con 100 μM de BPS durante 6 horas. Se recogieron células y se analizaron los niveles de proteína Cth2 por *Western Blot* utilizando anticuerpos α-Flag y α-Pgk1 (A) y los niveles de mRNA *CTH2* por RT-qPCR utilizando *ACT1* como control de carga

(B). C. Células *cth2Δ* y *cth2Δgrr1Δ* transformadas con el pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2* se crecieron en SC-ura con 100 μM de BPS durante 6 horas. Se añadió cicloheximida (50 μg/mL) y se recogieron alícuotas a diferentes tiempos. Los extractos proteicos se analizaron mediante *Western Blot* utilizando anticuerpos α-Flag y α-Pgk1. D. Células silvestre, *skp1-11* y *rbx1-1* transformadas con el plásmido pRS416-Flag<sub>2</sub>-*CTH2* se crecieron en Sc-ura durante 3 horas a 37 °C. A continuación, se añadió al medio el quelante de hierro BPS (-Fe) y las células se crecieron durante 6 horas más a 37 °C. Se añadió cicloheximida (50 μg/mL) y se recogieron alícuotas a diferentes tiempos para su posterior análisis por *Western Blot*.

### 3.9. Grr1 interacciona con Cth2 a través de las serinas S64/S65 y S68/S70 fosforiladas.

Hasta el momento hemos visto como Cth2 se fosforila en sus serinas S64/S65 y S68/S70; lo cual provoca cambios en su estabilidad. Por otra parte, se ha descrito como Grr1, a través de sus motivos ricos en leucina, reconoce sustratos fosforilados (Hsiung et al., 2001). A partir de ambas observaciones y teniendo en cuenta que Grr1 interacciona con Cth2 (Mark et al., 2014) decidimos estudiar si la fosforilación de Cth2 es necesaria para su posterior reconocimiento por Grr1. Para ello, se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación de proteínas en una cepa *cth2Δgrr1Δ* transformada con un plásmido que expresa una forma truncada de la proteína Grr1 (Grr1ΔFbox-Flag) en la que se ha delecionado su dominio de interacción con la proteína Skp1 del complejo impidiendo la degradación de sus dianas; junto con los diferentes plásmidos de los mutantes de fosforilación de Cth2-S64A/S65A y Cth2-S68A/S70A (figura C3-9). Los resultados muestran como Grr1 interacciona con la forma silvestre de Cth2, siendo más evidente la interacción con la forma fosforilada de Cth2 de menor migración electroforética. Por el contrario, cuando expresamos los mutantes de fosforilación Cth2-S64A/S65A o Cth2-S68A/S70A disminuye la interacción con Grr1 sugiriendo que la fosforilación de estos residuos de Cth2 es necesaria para que se produzca el reclutamiento por Grr1.

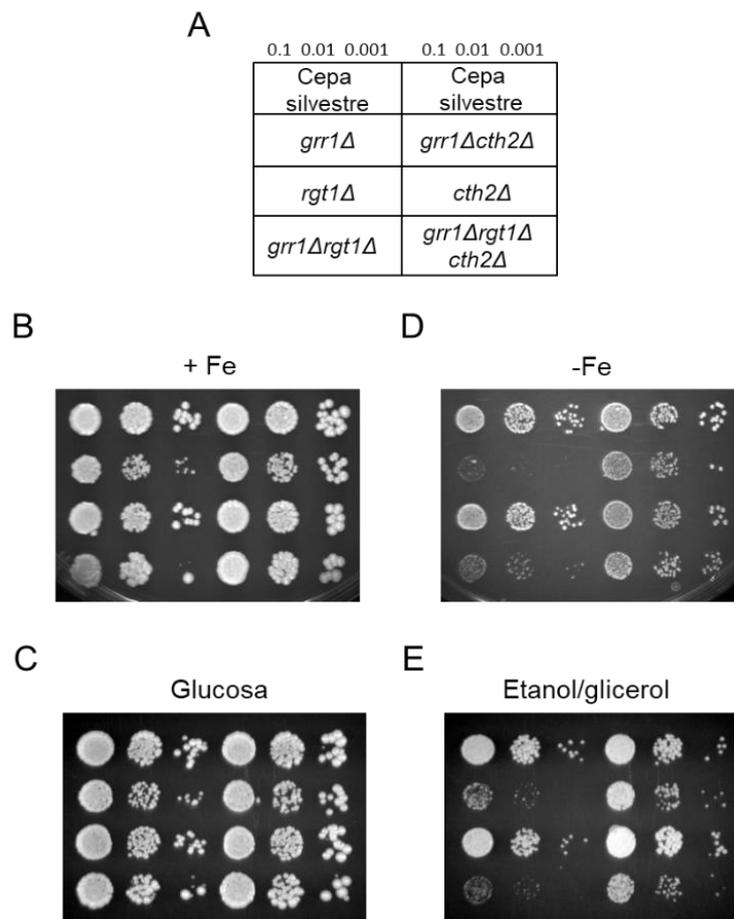


**Figura C3-9. La fosforilación de Cth2 es esencial para su reconocimiento por Grr1.** Células *cth2Δgrr1Δ* cotransformadas con los plásmidos pYES-*GRR1ΔFbox*-Flag y pRS413-Myc<sub>2</sub>-*CTH2*, pRS413-Myc<sub>2</sub>-*CTH2-S64A/S65A* o pRS413-Myc<sub>2</sub>-*CTH2-S68A/S70A* se crecieron en medio SC-ura-his 2% rafinosa con 100 μM BPS (-Fe). Transcurridas 3 horas se añadió galactosa al medio a una concentración final de 2% para inducir la expresión de Grr1ΔFbox-Flag. Tras 3 horas más de crecimiento, se recogieron las células y se obtuvieron los extractos proteicos en condiciones no desnaturizantes. Se llevó a cabo la inmunoprecipitación de Grr1ΔFbox-Flag utilizando perlas magnéticas α-Flag. El extracto proteico total (I) y el inmunoprecipitado (P) se analizaron por *Western Blot* utilizando anticuerpos α-Flag y α-Myc.

### 3.10. Grr1 es esencial para el crecimiento en deficiencia de hierro.

Hasta ahora hemos demostrado como un incremento en los niveles de Cth2 provoca un defecto de crecimiento en condiciones de deficiencia de hierro, ya sea debido a una mayor expresión de la proteína (figura C3-4) o un aumento en su estabilidad (figura C3-2 y C3-5). Puesto que la proteína Grr1 es necesaria para que se produzca la degradación de Cth2 en deficiencia de hierro, decidimos averiguar si Grr1 es esencial para el crecimiento en deficiencia de hierro. El mutante *grr1Δ* en condiciones normales muestra un ligero defecto de crecimiento ya que participa en la inactivación de Rgt1, represor transcripcional de transportadores de azúcares (Flick et al., 2003). La delección de *RGT1* en este mutante logra rescatar su defecto de crecimiento. Por este motivo se realizaron los ensayos de crecimiento en placa con una cepa silvestre y los mutantes *grr1Δ*, *grr1Δrgt1Δ* y *rgt1Δ* en condiciones

normales y en presencia del agente quelante ferrocina en el medio (figura C3-10 paneles B y C). En condiciones de suficiencia se puede observar que el defecto de crecimiento del mutante *grr1Δ* desaparece en el doble mutante *grr1Δrgt1Δ*. Al crecer en condiciones de deficiencia de hierro, ambas cepas muestran defecto en su crecimiento, a diferencia de lo que ocurre con la cepa silvestre y el mutante *rgt1Δ*. Estos resultados demuestran que la proteína Grr1 es esencial en condiciones de déficit de hierro. Con el fin de comprobar si este defecto de crecimiento es debido al incremento de los niveles de Cth2, se deletionó *CTH2* en las cepas que carecen de Grr1. Como se puede observar, la eliminación de *CTH2* logra rescatar parcialmente el defecto de crecimiento de los mutantes de *grr1Δ*, evidenciando que es el exceso de Cth2 lo que provoca el defecto de crecimiento. Cabe destacar que este rescate del crecimiento es solo parcial es debido a que la falta de Cth2 provoca defectos de crecimiento en estas condiciones de deficiencia como puede observarse al comparar el crecimiento de la cepa silvestre y *cth2Δ*.



**Figura C3-10. Grr1 es necesario para el crecimiento en deficiencia de hierro y en presencia de fuentes de carbono respirables.** **A.** Representación gráfica de la localización de las cepas incluidas en los ensayos de crecimiento. Células silvestres, *grr1Δ*, *rgt1Δ*, *grr1Δrgt1Δ*, *grr1Δcth2Δ*, *cth2Δ* y *grr1Δrgt1Δcth2Δ* se crecieron en medio SC (+Fe) durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron los ensayos de crecimiento en medio sólido, según se describe en material y métodos en: **A.** Medio con suficiencia de hierro (SC, +Fe). **B.** Deficiencia de hierro (en presencia de 600 μM ferrocina; -Fe). **C.** Medio con suficiencia de hierro (YPD, glucosa). **D.** Medio respiratorio (YPEG-2% Etanol-3% Glicerol; sin glucosa) se dejaron crecer a 30°C durante al menos 3 días.

Como se ha mencionado en la introducción, muchas de las mRNAs diana de Cth2 están implicados en respiración. Por este motivo decidimos estudiar qué ocurría en ausencia de Grr1 en un medio con presencia únicamente de fuentes de carbono no fermentables, etanol y glicerol, en el que las células se ven obligadas a respirar. Como se observa en el ensayo de crecimiento (figura C3-10 paneles C y D), los mutantes *grr1Δ* y *grr1Δrgt1Δ* muestran un defecto de crecimiento en el medio con etanol y glicerol que no se observa en presencia de glucosa, lo cual sugiere que la represión de la respiración por exceso de los niveles de Cth2 podría estar causando este fenotipo. De nuevo, la delección de *CTH2* mejora el crecimiento de estos mutantes en el medio con fuentes de carbono respirables. Con estos resultados podemos concluir que Grr1 es esencial para la supervivencia de las células en deficiencia de hierro debido a su papel en la degradación de Cth2.

# *Capítulo 3*

## *Discusión*



### **Regulación postraduccional de la proteína Cth2 en deficiencia de hierro.**

La proteína Cth2 cumple un papel crucial en la remodelación metabólica durante la adaptación de las células a condiciones de deficiencia de hierro. Su expresión en estas condiciones permite la desestabilización de mRNAs que codifican para proteínas implicadas en el metabolismo de hierro. Como consecuencia de esto, se produce una redistribución del hierro disponible en las células, priorizando algunos procesos que son esenciales para la supervivencia de las células en estas condiciones, como la síntesis de dNTPs, e inhibiendo otros procesos que tienen un consumo elevado de hierro como la respiración (Sanvisens et al., 2011; Puig et al., 2005). A pesar de que la expresión de Cth2 se limita a condiciones de falta de hierro, también se ha descrito su participación en la adaptación de las levaduras frente al estrés oxidativo (Castells-Roca et al., 2016).

Estudios previos han mostrado como la sobreexpresión de Cth2 en condiciones normales resulta tóxica para las células, siendo esta toxicidad dependiente de los TZFs (Thompson et al., 1996; Pedro-Segura et al., 2008). En este trabajo hemos mostrado cómo el exceso de Cth2 también resulta tóxico en deficiencia de hierro, por lo que las células han desarrollado diferentes mecanismos para controlar la expresión de Cth2 a diferentes niveles. El primer paso en la regulación de la expresión de Cth2 se da a nivel postranscripcional. Al igual que ocurre con sus mRNAs diana, la unión de Cth2 a las secuencias ARE en el extremo 3'UTR de su mensajero le permiten desestabilizar su propio mRNA e inhibir su traducción (Martínez-Pastor et al., 2013, Ramos-Alonso et al., 2018). Esta autorregulación negativa a través de sus secuencias ARE es necesaria para mantener los niveles óptimos de proteína Cth2 en deficiencia de hierro y evitar su toxicidad, y además permitir una rápida adaptación a cambios en la disponibilidad de hierro en el medio. Nuestros resultados han permitido identificar un segundo paso en el control de los niveles de Cth2, esta vez a nivel postraduccional. Los estudios de Cth2 en deficiencia de hierro sugerían que la proteína podría estar siendo modificada a nivel postraduccional, igual que ocurre con su proteína homóloga en humanos hTTP. Se ha demostrado como Cth2 se fosforila en sus residuos serina 65, 68 y 70 durante

la deficiencia de hierro y cómo esta fosforilación afecta a la estabilidad de la proteína. La fosforilación de Cth2 promueve su degradación, al contrario de lo que ocurre con la fosforilación de hTTP en humanos que provoca su estabilización, además de afectar a su localización y su función (Clark et al., 2016). En el caso de Cth2, hemos descartado la regulación de su función en la degradación de mensajeros a través de su fosforilación, ya que los mRNAs diana continúan degradándose, aunque evitemos la fosforilación de sus serinas. El hecho de que la degradación de sus dianas siga ocurriendo tras evitar su fosforilación pone de manifiesto que la fosforilación de Cth2 tampoco regula su localización subcelular, ya que es necesario que la proteína transite entre el núcleo y el citosol para promover la desestabilización de los mRNAs. Estos datos están de acuerdo con la localización nucleocitoplasmática descrita para el mutante Cth2 al que se le han delecionado 89 aminoácidos de su región carboxilo terminal, en el que tampoco ocurriría la fosforilación de la proteína (Vergara et al., 2011). Por otra parte, no podemos descartar que la fosforilación de Cth2 esté regulando su papel en la inhibición de la traducción de sus mRNAs diana. No obstante, estudios anteriores realizados con mutantes de deleción de Cth2 en la región amino terminal sugieren que la proteína posee una región conservada CR1 entre los 35 y 58 aminoácidos que sería la encargada de mediar la interacción de Cth2 con la maquinaria de degradación de mRNAs (Prouteau et al., 2008). Puesto que muchas de estas proteínas implicadas en la degradación de mRNAs también tienen un papel en la regulación del inicio de la traducción, pensamos que la fosforilación de Cth2 no está implicada en mediar la interacción con esta maquinaria y por lo tanto no regula sus funciones en la desestabilización e inhibición de la traducción de sus mRNAs diana.

La mutación de los TZFs implicados en la unión a los mRNAs o la deleción del dominio carboxilo terminal implicado en la inhibición del inicio de la traducción provocan un defecto de crecimiento debido a la falta de función de la proteína (Puig et al., 2005; Ramos-Alonso et al., 2018). En el caso de los residuos de fosforilación de Cth2 su mutación provoca un defecto de crecimiento incluso en una cepa silvestre, indicando que se está produciendo una ganancia de función de la proteína. También hemos visto que este efecto desaparece al impedir la unión de la proteína

a los mRNAs, tras mutar los TZFs, y quedar atrapada en el núcleo. Estos datos refuerzan la idea de que un exceso de proteína funcional resulta tóxico para las células.

En cuanto al momento en el que tiene lugar la fosforilación de Cth2, estudios previos han mostrado como la proteína Cth2 que tiene mutada la secuencia NLS, forzando así su localización citoplasmática, está fosforilada (Vergara et al., 2011). Lo mismo ocurre con la proteína que queda anclada en el núcleo tras mutar los TZFs, siendo su estabilidad similar a la de la proteína silvestre (Martínez-Pastor et al., 2013; Ramos-Alonso et al., 2018). Ambos resultados sugieren que la fosforilación de Cth2 ocurre antes de su entrada al núcleo y unión a los mRNAs.

Aproximaciones *in vitro* e *in vivo*, nos han permitido averiguar que la fosforilación de Cth2 a través de la quinasa Hrr25 es esencial para su degradación durante la deficiencia de hierro. Hrr25 forma parte de la familia de casein quinasas y está implicada en números procesos celulares como la biogénesis y ensamblaje de ribosomas, autofagia y respuesta a daños en el DNA (Ho et al., 1997; Ray et al., 2008; Pfaffenwimmer et al., 2014). Cth2 aumenta su estabilidad en ausencia de Hrr25; y además se observa acumulación de proteína fosforilada. Esto sugiere que Cth2 estará siendo fosforilado por otras quinasas en deficiencia de hierro, aunque Hrr25 es la encargada de promover su degradación.

Previamente se había identificado la interacción de Cth2 con la proteína *F-box* Grr1 (Mark et al., 2014). Nuestros resultados muestran la participación del complejo SCF<sup>Grr1</sup> en la degradación de Cth2 mediada por el proteasoma. A partir de ellos queda patente la relevancia de la fosforilación de Cth2 en la estabilidad de la proteína, ya que es necesaria para que se produzca la interacción con Grr1 y promueva su degradación. En ausencia de Grr1, la proteína Cth2 se estabiliza y con ello se incrementan los niveles de Cth2, sobre todo en su forma fosforilada. Este aumento ocurre a pesar de que los niveles de mRNA *CTH2* que encontramos tras la delección de *GRR1* son menores probablemente debido a la autorregulación negativa que ejerce Cth2 sobre su propio mensajero. Los resultados de los ensayos de crecimiento realizados con el mutante *grr1Δ* ponen de manifiesto su papel crucial en el crecimiento de las células en deficiencia de hierro mediando la degradación de

Cth2. Estos ensayos también han demostrado como Grr1 es necesario en presencia de fuentes de carbono no fermentables, ya que la falta de degradación de Cth2 en estas condiciones impediría la expresión adecuada de genes implicados en la respiración.

Recientemente se ha descrito la participación de los complejos E3 ubiquitin ligasa en la homeostasis de hierro de mamíferos a través del complejo SCF<sup>FBLX5</sup> que media la degradación del factor postranscripcional IRP2. Esto ha permitido identificar un nuevo paso en la regulación de la respuesta a cambios en la concentración de hierro. El dominio hemeritina identificado en la *F-box* FBLX5 percibe cambios en las concentraciones de hierro, que provoca alteraciones en la estabilidad de esta proteína, regulando así su función frente a las diferentes condiciones de disponibilidad de hierro (Ruiz et al., 2013). También se ha descrito la existencia de este dominio en la E3 ubiquitin ligasa BRUTUS que participa en la homeostasis de hierro de *Arabidopsis thaliana* (Selote et al., 2015). Por el contrario, en levaduras no se han identificado dominios hemeritina que permitan a Grr1 modificar sus niveles en función de la cantidad de hierro en el medio. Pese a ello, Grr1 parece tener un papel relevante en la regulación de la respuesta a deficiencia de hierro debido a su implicación en diferentes procesos. Por un lado, no solo se ha descrito su interacción con Cth2, sino también con la proteína Dre2 que forma parte de la maquinaria de ensamblaje de los centros Fe-S citosólica (Mark et al., 2014). Igualmente, se ha descrito su papel en la degradación de Mks1 promoviendo la activación de la ruta retrógrada mitocondrial que, como ya hemos identificado en la primera parte de este trabajo, se activa como consecuencia de la inactivación de la ruta TOR durante la deficiencia de hierro (Liu et al., 2005). Todos estos datos destacan la importancia de los complejos E3 ubiquitin ligasas en la regulación de la homeostasis de hierro.

A partir de los resultados obtenidos hemos propuesto un modelo para la regulación postraduccional de Cth2 durante la deficiencia de hierro. En este modelo, la proteína Cth2 es fosforilada por la casein quinasa Hrr25 antes de su entrada al núcleo para unirse a los mRNAs. Posteriormente, el complejo SCF<sup>Grr1</sup> reconoce los residuos fosforilados de Cth2 y promueve su ubiquitinación y posterior degradación

por el proteasoma. Esta regulación de los niveles de Cth2 es esencial para el crecimiento óptimo de las células en condiciones de déficit de hierro.

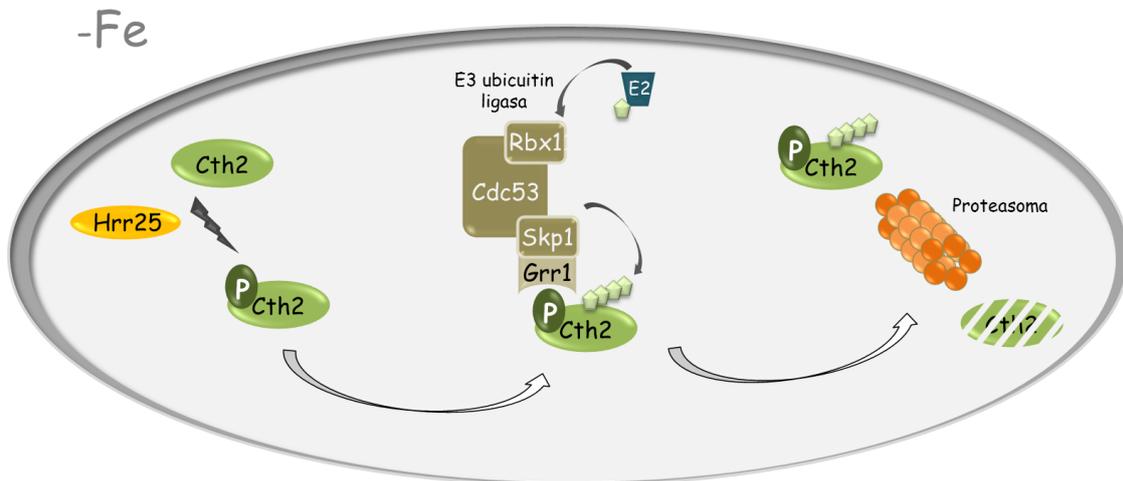


Figura D3-1. Modelo propuesto para la regulación postraduccional de Cth2 durante la deficiencia de hierro.



# *Conclusiones*



1. La deficiencia de hierro provoca un descenso en la tasa de transcripción global en la levadura *S. cerevisiae*, observándose una disminución de la cantidad de RNA polimerasa II elongante. Sin embargo, los niveles de mRNA total se mantienen durante al menos las primeras 3 horas de crecimiento probablemente debido a una estabilización global de los mRNAs.
2. El grupo de genes que codifican para proteínas ribosómicas, genes RPs, disminuyen su transcripción en deficiencia de hierro. A pesar de ello, se mantienen los niveles de mRNA debido a su estabilización tras 3 horas de crecimiento en deficiencia de hierro.
3. El crecimiento de las células durante al menos 6 horas en condiciones de baja biodisponibilidad de hierro provoca la inactivación de la ruta TOR. Esta inactivación de la ruta TOR se refleja en el estado hipofosforilado que presentan las proteínas Sch9, Dot6 y Rps6 en condiciones de deficiencia severa.
4. Los grupos de genes RPs y RiBis se reprimen a nivel transcripcional en condiciones de deficiencia de hierro, a través de las proteínas represoras Dot6/Tod6, Stb3 y la desacetilasa de histonas Rpd3, como consecuencia de la inactivación de la ruta TOR. Esto conlleva una bajada en los niveles de sus mRNAs a tiempos largos de deficiencia de hierro.
5. Las RNA polimerasas I y III disminuyen su cantidad de proteína y se inhiben en condiciones de deficiencia de hierro severas. Por un lado, la inactivación de la ruta TOR provoca la disminución de la proteína activadora de la RNA polimerasa I, Rrn3. Por otro lado, se favorece la desfosforilación de la proteína inhibidora Maf1 para que ejerza su acción inhibitoria sobre la RNA polimerasa III.
6. La deficiencia de hierro severa provoca la fosforilación del factor de inicio de la traducción eIf2 $\alpha$  y una disminución en la traducción global de las células en estas condiciones. Al mismo tiempo, la fosforilación del factor eIf2 $\alpha$  favorece la traducción del factor transcripcional Gcn4.

7. La ruta retrógrada se activa a nivel transcripcional a través de los factores Rtg1/Rtg3 como consecuencia de la deficiencia de hierro severa, probablemente debido a la inactivación de la ruta TOR.
8. La deficiencia de hierro provoca la inducción transcripcional de la desaturasa de ácidos grasos Ole1 a través del factor transcripcional Mga2. Esta inducción de los niveles de *OLE1* es necesaria para el crecimiento en deficiencia de hierro.
9. La baja biodisponibilidad de hierro provoca una disminución en la cantidad de ácidos grasos insaturados favoreciendo la activación de *OLE1*.
10. La activación transcripcional de *OLE1* por deficiencia de hierro requiere la liberación de Mga2 de la membrana del retículo endoplásmico y la acción del proteasoma, de la ubiquitin ligasa Rsp5 y del complejo Cdc48<sup>Npl4/Ufd1</sup>.
11. Mga2 se induce a nivel transcripcional en condiciones de deficiencia de hierro favoreciendo la activación de *OLE1*. Esta activación es consecuencia de su autorregulación, la cual también ocurre en respuesta a hipoxia y a bajas temperaturas.
12. La proteína Cth2 se fosforila durante la deficiencia de hierro en sus residuos serina 65, 68 y 70.
13. La fosforilación de Cth2 en sus residuos S64/S65 y S68/S70 regula la estabilidad de la proteína, sin afectar a su función en la degradación de sus mRNAs diana.
14. El complejo ubiquitin ligasa SCF<sup>Grr1</sup> se requiere para la degradación de Cth2 en condiciones de deficiencia de hierro. Grr1 reconoce los residuos fosforilados de Cth2 y promueve su degradación a través del proteasoma.
15. Hrr25 fosforila a Cth2 en deficiencia de hierro, siendo esencial esta fosforilación para la degradación de Cth2.
16. La fosforilación y degradación de Cth2 durante la deficiencia de hierro son necesarias para el crecimiento óptimo de las células en estas condiciones, ya que el aumento excesivo de los niveles de Cth2 resulta tóxico para las células.

# *Bibliografía*



- Adibhatla, R.M. & Hatcher, J.F., 2007. Role of lipids in brain injury and diseases. *Future Lipidology*, 2(4), 403–422.
- Andrews, N.C., 2002. Metal transporters and disease. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(2), 181–186.
- Ballweg, S. & Ernst, R., 2016. Control of membrane fluidity: the OLE pathway in focus. *Biological Chemistry*, 0(0), 215–228.
- Bellí, G. et al., 2004. Saccharomyces cerevisiae Glutaredoxin 5-deficient Cells Subjected to Continuous Oxidizing Conditions Are Affected in the Expression of Specific Sets of Genes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 12386–12395.
- Blaiseau, P.L., Lesuisse, E. & Camadro, J.M., 2001. Aft2p, a Novel Iron-regulated Transcription Activator That Modulates, with Aft1p, Intracellular Iron Use and Resistance to Oxidative Stress in Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 34221–34226.
- Braymer, J.J. & Lill, R., 2017. Iron–sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 292(31), 12754–12763.
- Breitkreutz, A. et al., 2010. Supporting Online Material for A Global Protein Kinase and Phosphatase Interaction Network in Yeast. *Methods*, 1043, 1043–6.
- Brooks, S.A. & Blackshear, P.J., 2013. Tristetraprolin (TTP): Interactions with mRNA and proteins, and current thoughts on mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(6–7), 666–679.
- Bullis, B.L. & Lemire, B.D., 1994. Isolation and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *SDH4* gene encoding a membrane anchor subunit of succinate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 269(9), 6543–6549.
- Butow, R.A. & Avadhani, N.G., 2004. Mitochondrial signaling: The retrograde response. *Molecular Cell*, 14(1), 1–15.
- C.Walther, D.B. and T., 2009. TORC2 Plasma Membrane Localization Is Essential for Cell Viability and Restricted to a Distinct Domain. *Molecular and Cellular Biology*, 20(4), 1565–1575.

## Bibliografia

- Canadell, D. et al., 2015. Impact of high pH stress on yeast gene expression: A comprehensive analysis of mRNA turnover during stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(6), 653–664.
- Carroll, J.S., Munchel, S.E. & Weis, K., 2011. The DEAD/H box ATPase Dhh1 functions in translational repression, mRNA decay, and processing body dynamics. *Journal of Cell Biology*, 194(4), 527–537.
- Castells-Roca, L. et al., 2016. Cth2 protein mediates early adaptation of yeast cells to oxidative stress conditions. *PLoS ONE*, 11(1), 1–16.
- Chellappa, R. et al., 2001. The membrane proteins, Spt23p and Mga2p, play distinct roles in the activation of *Saccharomyces cerevisiae* *OLE1* gene expression: Fatty acid-mediated regulation of Mga2p activity is independent of its proteolytic processing into a soluble transcription act. *Journal of Biological Chemistry*, 276(47), 43548–43556.
- Choi, J.Y. et al., 1996. Regulatory elements that control transcription activation and unsaturated fatty acid-mediated repression of the *Saccharomyces cerevisiae* *OLE1* gene. *Journal of Biological Chemistry*, 271(7), 3581–3589.
- Ciais, D., Bohnsack, M.T. & Tollervey, D., 2008. The mRNA encoding the yeast ARE-binding protein Cth2 is generated by a novel 3' processing pathway. *Nucleic Acids Research*, 36(9), 3075–3084.
- Clark, A.R. & Dean, J.L.E., 2016. The control of inflammation via the phosphorylation and dephosphorylation of tristetraprolin: a tale of two phosphatases. *Biochemical Society Transactions*, 44(5), 1321–1337.
- Coller, J. & Parker, R., 2004. Eukaryotic mRNA Decapping. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1), 861–890.
- Coller, J. & Parker, R., 2005. General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell*, 122(6), 875–886.
- Di Como, C.J. & Arndt, K.T., 1996. Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes and Development*,

- 10(15), 1904–1916.
- Conrad, M. et al., 2014. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(2), 254–299.
- Courel, M. et al., 2005. Direct activation of genes involved in intracellular iron use by the yeast iron-responsive transcription factor Aft2 without its paralog Aft1. *Molecular and cellular biology*, 25(15), 6760–6771.
- Covino, R. et al., 2016. A Eukaryotic Sensor for Membrane Lipid Saturation. *Molecular Cell*, 63(1), 49–59.
- Craig D. Kaplan & Jerry Kaplan, 2009. Iron Acquisition and Transcriptional Regulation. *Chem. Rev.*, 109(10), 4536–4552.
- Deguil, J. et al., 2011. Modulation of Lipid-Induced ER Stress by Fatty Acid Shape. *Traffic*, 12(3), 349–362.
- Dever, T.E., 2002. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell*, 108(4), 545–556.
- Dong, J. et al., 2004. The essential ATP-binding cassette protein *RLI1* functions in translation by promoting preinitiation complex assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 42157–42168.
- Dong, J. et al., 2000. Uncharged tRNA activates Gcn2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Molecular Cell*, 6(2), 269–279.
- Duttagupta, R. et al., 2005. Global Analysis of Pub1p Targets Reveals a Coordinate Control of Gene Expression through Modulation of Binding and Stability Global Analysis of Pub1p Targets Reveals a Coordinate Control of Gene Expression through Modulation of Binding and Stability. *Molecular and cellular biology*, 25(13), 5499–5513.
- Elledge, S.J. & Davis, R.W., 1987. Identification and isolation of the gene encoding the small subunit of ribonucleotide reductase from *Saccharomyces cerevisiae*: DNA damage-inducible gene required for mitotic viability. *Molecular and cellular biology*, 7(8), 2783–93.

## Bibliografía

- Ferreira, G.C., 1999. Ferrochelataze. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31(10), 995–1000.
- Finley, D. et al., 2012. The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 192(2), 319–360.
- Froschauer, E.M., Schweyen, R.J. & Wiesenberger, G., 2009. The yeast mitochondrial carrier proteins Mrs3p/Mrs4p mediate iron transport across the inner mitochondrial membrane. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(5), 1044–1050.
- Gaisne, M. et al., 1999. A “natural” mutation in *Saccharomyces cerevisiae* strains derived from S288c affects the complex regulatory gene *HAP1 (CYP1)*. *Current Genetics*, 36(4), 195–200.
- García-Martínez, J., Aranda, A. & Pérez-Ortín, J.E., 2004. Genomic run-on evaluates transcription rates for all yeast genes and identifies gene regulatory mechanisms. *Molecular Cell*, 15(2), 303–313.
- Gasch, A.P., 2007. Comparative genomics of the environmental stress response in ascomycete fungi. *Yeast*, 24(10), 961–976.
- Gasch, A.P. et al., 2000. Genomic Expression Programs in the Response of Yeast Cells to Environmental Changes. *Molecular Biology of the Cell*, 11(12), 4241–4257.
- González, A. et al., 2015. TORC1 promotes phosphorylation of ribosomal protein S6 via the AGC Kinase Ypk3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*, 10(3), 1–12.
- Graczyk, D. et al., 2011. Casein kinase II-mediated phosphorylation of general repressor Maf1 triggers RNA polymerase III activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(12), 4926–4931.
- Graczyk, D., Cieśla, M. & Boguta, M., 2018. Regulation of tRNA synthesis by the general transcription factors of RNA polymerase III - TFIIB and TFIIC, and by the MAF1 protein. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1861(4), 320–329.
- Hausmann, A. et al., 2008. Cellular and mitochondrial remodeling upon defects in

- iron-sulfur protein biogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 283(13), 8318–8330.
- Heinemeyer, W. et al., 1991. Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *The EMBO journal*, 10(3), 555–562.
- Hinnebusch, A.G., 2005. Translational regulation of *GCN4* and the general amino acid control of yeast. *Annual Review of Microbiology*, 59(1), 407–450.
- Hitchcock, A.L. et al., 2001. The conserved Npl4 protein complex mediates proteasome-dependent membrane-bound transcription factor activation. *Molecular biology of the cell*, 12(10), 3226–3241.
- Ho, Y. et al., 1997. Role of the casein kinase I isoform, Hrr25, and the cell cycle-regulatory transcription factor, SBF, in the transcriptional response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(2), 581–6.
- Hoppe, T. et al., 2000. Activation of a Membrane-Bound Transcription Factor by Regulated Ubiquitin/Proteasome-Dependent Processing. *Cell*, 102(3), 577–586.
- Hsiung, Y.G. et al., 2001. F-box protein Grr1 interacts with phosphorylated targets via the cationic surface of its leucine-rich repeat. *Molecular and cellular biology*, 21(7), 2506–20.
- Huber, A. et al., 2009. Characterization of the rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis. *Genes & Development*, 1929–1943.
- Huber, A. et al., 2011. Sch9 regulates ribosome biogenesis via Stb3, Dot6 and Tod6 and the histone deacetylase complex RPD3L. *The EMBO journal*, 30(15), 3052–64.
- Hughes, J.D. et al., 2000. Computational identification of cis-regulatory elements

## Bibliografia

- associated with groups of functionally related genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology*, 296(5), 1205–1214.
- Hughes Hallett, J.E., Luo, X. & Capaldi, A.P., 2014. State transitions in the TORC1 signaling pathway and information processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 198(2), 773–786.
- Humphrey, E.L. et al., 2004. Rpd3p Relocation Mediates a Transcriptional Response to Rapamycin in Yeast. *Chemistry & Biology*, 11(1), 295–299.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U.T. & Pestova, T. V., 2010. The Mechanism Of Eucaryotic Translation Initiation And Principles Of Its Regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(2), 113–127.
- Jensen, L.T. & Culotta, V.C., 2002. Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* *FET4* by oxygen and iron. *Journal of Molecular Biology*, 318(2), 251–260.
- Jiang, Y. et al., 2001. *MGA2* is involved in the low-oxygen response element-dependent hypoxic induction of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 21(18), 6161–9.
- Jiang, Y. et al., 2002. Mga2p Processing by Hypoxia and Unsaturated Fatty Acids in *Saccharomyces cerevisiae*: Impact on LORE-Dependent Gene Expression. *Eukaryotic cell*, 1(3), 739–748.
- Jiang, Y. & Broach, J.R., 1999. Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *EMBO Journal*, 18(10), 2782–2792.
- Jin, J. et al., 2004. Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes and Development*, 18(21), 2573–2580.
- Kaliszewski, P. & Zoładek, T., 2008. The role of Rsp5 ubiquitin ligase in regulation of diverse processes in yeast cells. *Acta Biochimica Polonica*, 55(4), 649–662.
- Kandasamy, P. et al., 2004. Regulation of unsaturated fatty acid biosynthesis in *Saccharomyces*: The endoplasmic reticulum membrane protein, Mga2p, a transcription activator of the *OLE1* gene, regulates the stability of the *OLE1*

- mRNA through exosome-mediated mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 279(35), 36586–36592.
- Karin M. et al., 2003. Grr1-dependent inactivation of Mth1 mediates glucose-induced dissociation of Rgt1 from HXT gene promoters. *Molecular biology of the cell*, 14, 3230–3241.
- Kim, M.S. & Hahn, J.S., 2016. Role of CK2-dependent phosphorylation of Ifh1 and Crf1 in transcriptional regulation of ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(8), 1004–1013.
- Kispal, G. et al., 2005. Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. *EMBO Journal*, 24(3), 589–598.
- Kolberg, M. et al., 2004. Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductases. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1699(1–2), 1–34.
- Kos-Braun, I.C., Jung, I. & Koš, M., 2017. Tor1 and CK2 kinases control a switch between alternative ribosome biogenesis pathways in a growth-dependent manner. *PLOS Biology*, 15(3), 200–245.
- Kwast, K.E. et al., 1999. Oxygen sensing in yeast: evidence for the involvement of the respiratory chain in regulating the transcription of a subset of hypoxic genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(10), 5446–5451.
- Laribee, R.N. et al., 2015. Ccr4-Not Regulates RNA Polymerase I Transcription and Couples Nutrient Signaling to the Control of Ribosomal RNA Biogenesis. *PLoS Genetics*, 11(3), 1–24.
- Lempiäinen, H. et al., 2009. Sfp1 Interaction with TORC1 and Mrs6 Reveals Feedback Regulation on TOR Signaling. *Molecular Cell*, 33(6), 704–716.
- Liko, D., Slattery, M.G. & Heideman, W., 2007. Stb3 binds to ribosomal RNA processing element motifs that control transcriptional responses to growth in

## Bibliografia

- Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(36), 26623–26628.
- Lill, R. et al., 2012. The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823(9), 1491–1508.
- Liu, Z. et al., 2002. Mks1 in concert with TOR signaling negatively regulates RTG target gene expression in *S. cerevisiae*. *Current Biology*, 12(5), 389–395.
- Liu, Z. et al., 2003. Retrograde signaling is regulated by the dynamic interaction between Rtg2p and Mks1p. *Molecular Cell*, 12(2), 401–411.
- Liu, Z. et al., 2001. RTG-dependent mitochondria to nucleus signaling is negatively regulated by the seven WD-repeat protein Lst8p. *EMBO Journal*, 20(24), 7209–7219.
- Liu, Z. & Butow, R.A., 2006. Mitochondrial Retrograde Signaling. *Annual Review of Genetics*, 40(1), 159–185.
- Liu, Z. & Butow, R., 1999. A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to a reduction or loss of respiratory function. *Molecular and cellular biology*, 19(10), 6720–8.
- Loewith, R. & Hall, M.N., 2011. Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics*, 189(4), 1177–1201.
- Ramos-Alonso L. et al., 2018. Yeast Cth2 protein represses the translation of ARE-containing mRNAs in response to iron deficiency. *PLoS Genetics*, 14, 1–23.
- Mahtani, K.R. et al., 2001. Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability. *Molecular and Cellular Biology*, 21(19), 6461–9.
- Matunis M.J. et al., 1993. PUB1 : Major Yeast Poly ( A ) RNA-Binding Protein. *Molecular and cellular biology*, 13(10), 6114–6123.

- Marion, R.M. et al., 2004. Sfp1 is a stress- and nutrient-sensitive regulator of ribosomal protein gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(40), 14315–14322.
- Mark, K.G. et al., 2014. Ubiquitin Ligase Trapping Identifies an SCF<sup>Saf1</sup> Pathway Targeting Unprocessed Vacuolar/Lysosomal Proteins. *Molecular Cell*, 53(1), 148–161.
- Martin, C.E., Oh, C.S. & Jiang, Y., 2007. Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1771(3), 271–285.
- Martínez-Pastor, M. et al., 2013. Negative feedback regulation of the yeast *CTH1* and *CTH2* mRNA binding proteins is required for adaptation to iron deficiency and iron supplementation. *Molecular and cellular biology*, 33(11), 2178–87.
- Martínez-Pastor, M.T. et al., 2013. Post-transcriptional regulation of iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), 15785–15809.
- Martinez-Pastor, M.T. et al., 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). *The EMBO Journal*, 15(9), 2227–2235.
- Miao, R., Holmes-Hampton, G.P. & Lindahl, P.A., 2011. Biophysical investigation of the iron in Aft1-1up and Gal-YAH1 *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 50(13), 2660–2671.
- Mittal, N. et al., 2017. The Gcn4 transcription factor reduces protein synthesis capacity and extends yeast lifespan. *Nature Communications*, 8(1), 1–11.
- Moir, R.D. et al., 2006. Protein kinase A regulates RNA polymerase III transcription through the nuclear localization of Maf1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(41), 15044–15049.
- Muckenthaler, M.U. et al., 2017. A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell*, 168(3), 344–361.

## Bibliografia

- Mugler, C.F. et al., 2016. ATPase activity of the DEAD-box protein Dhh1 controls processing body formation. *eLife*, 5.
- Mühlenhoff, U. et al., 2003. A Specific Role of the Yeast Mitochondrial Carriers Mrs3/4p in Mitochondrial Iron Acquisition under Iron-limiting Conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 40612–40620.
- Nakagawa, Y. et al., 2002. Mga2p is a putative sensor for low temperature and oxygen to induce *OLE1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291(3), 707–713.
- Natarajan, K. et al., 2001. Transcriptional Profiling Shows that Gcn4p Is a Master Regulator of Gene Expression during Amino Acid Starvation in Yeast. *Molecular and cellular biology*, 21(13), 4347–4368.
- Oficjalska-Pham, D. et al., 2006. General Repression of RNA Polymerase III Transcription Is Triggered by Protein Phosphatase Type 2A-Mediated Dephosphorylation of Maf1. *Molecular Cell*, 22(5), 623–632.
- Oler, A.J. & Cairns, B.R., 2012. PP4 dephosphorylates Maf1 to couple multiple stress conditions to RNA polymerase III repression. *EMBO Journal*, 31(6), 1440–1452.
- Pedro-Segura, E. et al., 2008. The Cth2 ARE-binding protein recruits the Dhh1 helicase to promote the decay of succinate dehydrogenase *SDH4* mRNA in response to iron deficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 283(42), 28527–28535.
- Pfaffenwimmer, T. et al., 2014. Hrr25 kinase promotes selective autophagy by phosphorylating the cargo receptor Atg19. *EMBO reports*, 15(8), 862–870.
- Philippi, A. et al., 2010. TOR-dependent reduction in the expression level of Rrn3p lowers the activity of the yeast RNA Pol I machinery, but does not account for the strong inhibition of rRNA production. *Nucleic Acids Research*, 38(16), 5315–5326.

- Philpott, C.C., Leidgens, S. & Frey, A.G., 2012. NIH Public Access. *Biochim Biophys Acta*, 1823(9), 1509–1520.
- Philpott, C.C. & Protchenko, O., 2008. Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 7(1), 20–27.
- Pijuan, J. et al., 2015. Impaired mitochondrial Fe-S cluster biogenesis activates the DNA damage response through different signaling mediators. *Journal of cell science*, 128(24), 4653–65.
- Pimentel, C. et al., 2012. The role of the Yap5 transcription factor in remodeling gene expression in response to Fe bioavailability. *PLoS ONE*, 7(5), 1–11.
- Pluta, K. et al., 2001. Maf1p , a Negative Effector of RNA Polymerase III in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 21(15), 5031–5040.
- Presnyak, V. & Coller, J., 2013. The DHH1/RCKp54 family of helicases: An ancient family of proteins that promote translational silencing. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(8), 817–823.
- Prouteau, M., Daugeron, M.C. & Séraphin, B., 2008. Regulation of ARE transcript 3' end processing by the yeast Cth2 mRNA decay factor. *EMBO Journal*, 27(22), 2966–2976.
- Puig, S. et al., 2007. Copper and iron homeostasis in *Arabidopsis*: Responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant, Cell and Environment*, 30(3), 271–290.
- Puig, S. et al., 2017. The elemental role of iron in DNA synthesis and repair. *Metallomics*, 1483–1500.
- Puig, S., Askeland, E. & Thiele, D.J., 2005. Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. *Cell*, 120(1), 99–110.
- Puig, S., Vergara, S. V. & Thiele, D.J., 2008. Cooperation of Two mRNA-Binding Proteins Drives Metabolic Adaptation to Iron Deficiency. *Cell Metabolism*, 7(6), 555–564.

## *Bibliografía*

- Radhakrishnan, A. et al., 2016. The DEAD-Box Protein Dhh1p Couples mRNA Decay and Translation by Monitoring Codon Optimality. *Cell*, 167(1), p.122–132.e9.
- Ray, P. et al., 2008. The *Saccharomyces cerevisiae* 60 S ribosome biogenesis factor Tif6p is regulated by Hrr25p-mediated phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(15), 9681–9691.
- Reinke, A. et al., 2004. TOR Complex 1 Includes a Novel Component, Tco89p (YPL180w), and Cooperates with Ssd1p to Maintain Cellular Integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15), 14752–14762.
- Roberts, D.N. et al., 2006. Dephosphorylation and Genome-Wide Association of Maf1 with Pol III-Transcribed Genes during Repression. *Molecular Cell*, 22(5), 633–644.
- Rohde, J.R. & Cardenas, M.E., 2003. The Tor Pathway Regulates Gene Expression by Linking Nutrient Sensing to Histone Acetylation. *Molecular and Cellular Biology*, 23(2), 629–635.
- Romero-santacreu, L. et al., 2009. Specific and global regulation of mRNA stability during osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Rna*, 1110–1120.
- Ruiz, J.C. et al., 2013. F-box and leucine-rich repeat protein 5 (FBXL5) is required for maintenance of cellular and systemic iron homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 288(1), 552–560.
- Ruiz, J.C. & Bruick, R.K., 2014. F-box and leucine-rich repeat protein 5 (FBXL5): Sensing intracellular iron and oxygen. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 133, 73–77.
- Rutherford, J.C. et al., 2001. A second iron-regulatory system in yeast independent of Aft1p. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(25), 14322–14327.
- Rutherford, J.C., Jaron, S. & Winge, D.R., 2003. Aft1p and Aft2p mediate iron-responsive gene expression in yeast through related promoter elements.

- Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 27636–27643.
- Ueta, R. et al., 2007. Mechanism Underlying the Iron-dependent Nuclear Export of the Iron-responsive Transcription Factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 18, 2980–2990.
- Samanfar, B. et al., 2013. Large-scale investigation of oxygen response mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular BioSystems*, 9(6), p.1351.
- Sanduja, S. et al., 2012. The role of tristetraprolin in cancer and inflammation. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 17(4), 174–88.
- Sanvisens, N. et al., 2011. Regulation of Ribonucleotide Reductase in Response to Iron Deficiency. *Molecular Cell*, 44, 759–769.
- Selote, D. et al., 2015. Iron-Binding E3 Ligase Mediates Iron Response in Plants by Targeting Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors. *Plant Physiology*, 167(1), 273–286.
- Shakoury-Elizeh, M. et al., 2010. Metabolic Response to Iron Deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(19), 14823–14833.
- Shcherbik, N. et al., 2007. Rsp5p Is Required for ER Bound Mga2p120 Polyubiquitination and Release of the Processed/Tethered Transactivator Mga2p90. *Current Biology*, 13(2), 1227–1233.
- Shcherbik, N. & Haines, D.S., 2007. Cdc48pNpl4p/Ufd1p Binds and Segregates Membrane-Anchored/Tethered Complexes via a Polyubiquitin Signal Present on the Anchors. *Molecular Cell*, 25(3), 385–397.
- Stehling, O. et al., 2012. Metabolism and Genomic Integrity. *Science*, 337(July), 195–199.
- Stordeur, C. et al., 2014. Crosstalk of lipid and protein homeostasis to maintain membrane function. *Biological Chemistry*, 395(3), 313–326.
- Stukey, J.E., McDonough, V.M. & Martin, C.E., 1990. The *OLE1* gene of *Saccharomyces*

## Bibliografia

- cerevisiae* encodes the delta 9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearyl CoA desaturase gene. *Journal of Biological Chemistry*, 265(33), 20144–20149.
- Surma, M.A. et al., 2013. A lipid E-MAP identifies Ubx2 as a critical regulator of lipid saturation and lipid bilayer stress. *Molecular Cell*, 51(4), 519–530.
- Thompson, J.W. et al., 2012. Structural and molecular characterization of iron-sensing hemerythrin-like domain within F-box and leucine-rich repeat protein 5 (FBXL5). *Journal of Biological Chemistry*, 287(10), 7357–7365.
- Thompson, M.J. et al., 1996. Cloning and characterization of two yeast genes encoding members of the CCCH class of zinc finger proteins: Zinc finger-mediated impairment of cell growth. *Gene*, 174(2), 225–233.
- Torreira, E. et al., 2017. The dynamic assembly of distinct RNA polymerase I complexes modulates rDNA transcription. *eLife*, 6, 1–23.
- Ueta, R. et al., 2012. Iron-Induced Dissociation of the Aft1p Transcriptional Regulator from Target Gene Promoters Is an Initial Event in Iron-Dependent Gene Suppression. *Molecular and Cellular Biology*, 32(24), 4998–5008.
- Ueta, R., Fukunaka, A. & Yamaguchi-Iwai, Y., 2003. Pse1p Mediates the Nuclear Import of the Iron-responsive Transcription Factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 50120–50127.
- Urban, J. et al., 2007. Sch9 Is a Major Target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell*, 26(5), 663–674.
- Vanrobays, E. et al., 2008. TOR regulates the subcellular distribution of DIM2, a KH domain protein required for cotranscriptional ribosome assembly and pre-40S ribosome export. *Rna*, 14(10), 2061–2073.
- Vasconcelles, M.J. et al., 2001. Identification and characterization of a low oxygen response element involved in the hypoxic induction of a family of *Saccharomyces cerevisiae* genes. Implications for the conservation of oxygen sensing in eukaryotes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(17), 14374–14384.

- Vembar, S.S. & Brodsky, J.L., 2008. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(12), 944–957.
- Vergara, S. V., Puig, S. & Thiele, D.J., 2011. Early Recruitment of AU-Rich Element-Containing mRNAs Determines Their Cytosolic Fate during Iron Deficiency. *Molecular and Cellular Biology*, 31(3), 417–429.
- Yamaguchi-Iwai, Y. et al., 1996. Iron-regulated DNA binding by the Aft1 protein controls the iron regulon in yeast. *The EMBO journal*, 15(13), 3377–84.
- Yamaguchi-Iwai, Y. et al., 2002. Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 18914–18918.
- Yan, G., Shen, X. & Jiang, Y., 2006. Rapamycin activates Tap42-associated phosphatases by abrogating their association with Tor complex 1. *EMBO Journal*, 25(15), 3546–3555.
- Yarunin, A. et al., 2005. Functional link between ribosome formation and biogenesis of iron-sulfur proteins. *EMBO Journal*, 24(3), 580–588.
- Zhang, F. et al., 2013. Adenosine triphosphate (ATP) is a candidate signaling molecule in the mitochondria-to-nucleus retrograde response pathway. *Genes*, 4(1), 86–100.
- Zhang, S., Burkett, T.J. & Yamashita, I., 1997. Genetic Redundancy between *SPT23* and *MGA2*: Regulators of Ty-induced Mutations and Ty1 Transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. 17(8), 4718–4729.
- Zhang, S., Skalsky, Y. & Garfinkel, D.J., 1999. *MGA2* or *SPT23* is required for transcription of the delta9 fatty acid desaturase gene, *OLE1*, and nuclear membrane integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 151(2), 473–483.
- Zhengchang Liu, Mario Spirek, Janet Thornton, and R.A.B., 2005. A Novel Degron-mediated Degradation of the RTG Pathway Regulator, Mks1p, by SCF<sup>Grr1</sup>. *Molecular biology of the cell*, 16, 4893–4904.

